

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

**Estudo Fitoquímico de Plantas das Famílias Rutaceae e Meliaceae  
Visando o Isolamento de Substâncias Protótipos para o  
Desenvolvimento de Novos Fármacos Antichagásicos e  
Antileishmanioses**

Alessandra Regina Pepe Ambrozini\*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA, na área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

\*bolsista FAPESP

SÃO CARLOS – SP  
2004

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

A479ef

Ambrozin, Alessandra Regina Pepe.

Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses / Alessandra Regina Pepe Ambrozin. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

241 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Produtos naturais. 2. Leishmaniose. 3. Chagas, Doença de. 4. Rutaceae. 5. Meliaceae. I. Título.

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

Dedico integralmente esse trabalho ao grande amor de minha vida, minha mãe Rosa Maria (*in memorium*), que sempre me incentivou em minha formação pessoal e profissional.

**“Quando eu me for,  
deixarei contigo o meu coração  
e as boas lembranças do passado  
de tudo o que aconteceu,  
de todas as nossas conversas,  
sobre alegrias e tristezas,  
sobre amores e decepções,  
de todas as brincadeiras,  
dos risos e das lágrimas,  
enfim de tudo...”**

## *Agradecimentos*

Ao prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, pela orientação e amizade durante esses anos.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Dra. M. Fátima das G. Fernandes da Silva, Dr. João Batista Fernandes e Dr. Edson Rodrigues Filho, pela colaboração.

Aos alunos Eli Pimenta, Márcio Silva, Marcelo Castilho e aos professores Dr. Otávio H. Thiermann e Dr. Glaucius Oliva do IFSC-USP, pela realização dos ensaios enzimáticos.

Ao prof. Dr. Sérgio de Albuquerque da FCFRP-USP, pela realização dos testes tripanocidas.

Ao prof. Dr. Javier A. Ellena do IFSC-USP, pela análise de difração de raios-X.

À Luciana e ao Paulo, pela obtenção dos espectros de RMN.

À Doraí e Elaine, pela aquisição dos espectros de massas.

À FAPESP, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À todos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela convivência sempre alegre.

Agradeço aos meus pais, Rosa e José, à minha avó Lydia, aos meus irmãos, Andréia, Artur e Alexandre, aos meus cunhados, Kaleizu, Milena e Carolina, e à maior preciosidade da família, Ana Luiza, pelo constante incentivo.

## Resumo

ESTUDO FITOQUÍMICO DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS RUTACEAE E MELIACEAE VISANDO O ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS PROTÓTIPOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS E ANTILEISHMANIOSES - Esse trabalho envolveu o estudo fitoquímico de *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus*, *Galipea carinata* (Rutaceae) e *Trichilia ramalhoi* (Meliaceae), biomonitorado através de três modelos biológicos: enzimas GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae*; e ensaios *in vitro* nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os testes biológicos de extratos e frações mostraram que as plantas selecionadas são promissoras na procura de compostos antiparasitários. O estudo químico das frações (ou extratos) ativas permitiu o isolamento de 30 substâncias, sendo 6 inéditas: sesquiterpeno eudesmano, piranoflavonas, alcalóide tetraidrofuroquinolínico, alcalóide indolopiridoquinazolínico, derivado do ácido antranílico e 1,5-difenil-1-pentanona; e 24 já descritas na literatura:  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, sitostenona, benzoato de  $\beta$ -sitosterila, lupeol, lupenona, flavona, 7-metoxiflavona, 5-hidroxiflavona, dictamina, kokusagina, esquimianina,  $\delta$ -fagarina, isokokusagina, isoesquimianina, isodutaduprina, haplotusina, alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona, arborinina, escoparona, escopoletina, marmesina, paprazina, *N-trans*-feruloitiramina e ácido siríngico. Dentre essas substâncias, os alcalóides furoquinolônicos isokokusagina e isoesquimianina mostraram ser inibidores potentes da enzima APRT; a cumarina marmesina ocasionou uma inibição considerável da atividade da enzima GAPDH; e os alcalóides haplotusina e 2-fenil-1-metil-4-quinolona, e o triterpeno lupeol apresentaram atividades tripanocidas significativas. Os resultados biológicos indicaram a necessidade de um estudo sistemático posterior das classes dos compostos ativos, para a determinação da relação estrutura-atividade e, desta forma, de substâncias mais ativas, que possam ser

utilizadas como protótipos no desenvolvimento de novos quimioproláticos e/ou quimioterápicos para a doença de Chagas e leishmanioses.

## *Abstract*

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF PLANTS FROM RUTACEAE AND MELIACEAE FAMILIES AIMING FOR THE ISOLATION OF TARGET SUBSTANCES TO THE DEVELOPING OF NEW ANTICHAGASIC AND ANTILEISHMANIASIS DRUGS – This work involved the bioassay-guided study of *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus*, *Galipea carinata* (Rutaceae), and *Trichilia ramalhoi* (Meliaceae). The bioassays were carried out with *T. cruzi* GAPDH and *L. tarentolae* APRT enzymes, and trypomastigote forms of *T. cruzi* as model assays. The results obtained with extracts and fractions showed that selected plants are promising source for the search of antiprotozoal compounds. Chemical investigation of active fractions (or extracts) allowed the isolation of 30 substances. Among them, 6 are described for the first time: an eudesmane sesquiterpene, pyranoflavones, a tetrahydrofuroquinoline alkaloid, an indolopyridoquinazoline alkaloid, an anthranilic acid derivative, and 1,5-diphenyl-1-pentanone; and 24 substances have already been described in the literature:  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, sitostenone,  $\beta$ -sitosteryl benzoate, lupeol, lupenone, flavone, 7-methoxyflavone, 5-hydroxyflavone, dictamine, kokusagine, skimmianine,  $\delta$ -fagarine, isokokusagine, isoskimmianine, isodutaduprine, haplotusine, 1-methyl-2-phenyl-4-quinolone, arborinine, scoparone, scopoletin, marmesine, paprazine, *N-trans*-feruloyltyramine, and siringic acid. Among these substances, furoquinolone alkaloids isokokusagine and isoskimmianine were actives on the inhibition of APRT enzyme; marmesine was active on GAPDH enzyme; and haplotusine and the 1-methyl-2-phenyl-4-quinolone alkaloid showed significant trypanocidal activities. The biological results showed that a systematic investigation of active chemical classes is needed for determination of structure-activity relationship and obtaining more active substances, that could be used as targets for the development of new antichagasic and antileishmaniasis drugs.

## Sumário

Resumo.....	iv
<i>Abstract</i> .....	vi
Lista de Símbolos e Abreviações.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xviii
1. Introdução.....	1
1.1. Doenças tropicais.....	1
1.1.1. Doença de Chagas.....	2
1.1.1.1. Agente etiológico: <i>T. cruzi</i> .....	3
1.1.1.2. Transmissor: <i>Triatoma infestans</i> .....	3
1.1.1.3. Formas de transmissão e fases da doença.....	4
1.1.1.4. Tratamento.....	5
1.1.1.5. Enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> .....	7
1.1.2. Leishmanioses.....	9
1.1.2.1. Agente etiológico: <i>Leishmania</i> .....	9
1.1.2.2. Transmissor: <i>Lutzomyia</i> .....	10
1.1.2.3. Transmissão e manifestações clínicas da doença.....	11
1.1.2.4. Tratamento.....	12
1.1.2.5. Enzima APRT de <i>Leishmania</i> .....	14
1.1.3. Controle com produtos naturais.....	16
1.2. Seleção das espécies vegetais.....	17
1.3. Família Rutaceae.....	20
1.4. Família Meliaceae.....	24
2. Objetivos.....	25
3. Resultados e discussões.....	26
3.1. Substâncias isoladas.....	26
3.2. Identificação dos esteróides.....	35
3.2.1. Identificação do $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol.....	35
3.2.2. Identificação da sitostenona.....	37
3.2.3. Identificação do benzoato de $\beta$ -sitosterila.....	38
3.3. Identificação dos triterpenos.....	46
3.3.1. Identificação do lupeol.....	46
3.3.2. Identificação da lupenona.....	48
3.4. Identificação do sesquiterpeno.....	50
3.5. Identificação das flavonas.....	63
3.5.1. Identificação da flavona.....	63
3.5.2. Identificação da 7-metoxiflavona.....	66
3.5.3. Identificação da 5-hidroxiflavona.....	69
3.5.4. Identificação das piranoflavonas.....	72



3.6. Identificação dos alcalóides.....	84
3.6.1. Identificação da dictamina.....	86
3.6.2. Identificação da kokusagina.....	88
3.6.3. Identificação da esquimianina.....	91
3.6.4. Identificação da $\delta$ -fagarina.....	93
3.6.5. Identificação da isokokusagina.....	96
3.6.6. Identificação da isoesquimianina.....	99
3.6.7. Identificação da isodutaduprina.....	101
3.6.8. Identificação do alcalóide tetraidrofuroquinolínico.....	104
3.6.9. Identificação da haplotusina.....	113
3.6.10. Identificação do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona.....	119
3.6.11. Identificação da arborinina.....	128
3.6.12. Identificação do alcalóide indolopiridoquinazolínico.....	130
3.7. Identificação das cumarinas.....	140
3.7.1. Identificação da escoparona.....	140
3.7.2. Identificação da escopoletina.....	142
3.7.3. Identificação da marmesina.....	144
3.8. Identificação das amidas.....	150
3.8.1. Identificação da paprazina.....	150
3.8.2. Identificação da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina.....	157
3.9. Identificação de outras classes de metabólitos.....	166
3.9.1. Identificação do derivado do ácido antranílico.....	166
3.9.2. Identificação da 1,5-difenil-1-pentanona.....	175
3.9.3. Identificação do ácido siríngico.....	183
3.10. Atividades biológicas dos extratos vegetais.....	185
3.10.1. Atividade inibitória da enzima gGAPDH.....	185
3.10.2. Atividade inibitória da enzima APRT.....	186
3.10.3. Atividade tripanocida.....	188
3.11. Atividades biológicas das frações.....	189
3.11.1. Atividade inibitória da enzima gGAPDH.....	190
3.11.2. Atividade inibitória da enzima APRT.....	191
3.11.3. Atividade tripanocida.....	193
3.12. Atividades biológicas das substâncias isoladas.....	195
3.12.1. Atividade inibitória da enzima gGAPDH.....	195
3.12.2. Atividade inibitória da enzima APRT.....	196
3.12.3. Atividade tripanocida.....	198
4. Procedimento experimental.....	201
4.1. Materiais e métodos.....	201
4.2. Equipamentos.....	202
4.3. Coleta e identificação do material botânico.....	203
4.4. Preparação dos extratos vegetais.....	204
4.5. Obtenção das frações.....	205

4.6. Isolamento dos constituintes de <i>Almeidea coerulea</i> .....	208
4.6.1. Estudo químico da fração AGMD.....	208
4.6.2. Estudo químico da fração AGMA.....	209
4.7. Isolamento dos constituintes de <i>Almeidea rubra</i> .....	216
4.7.1. Estudo químico da fração ALFMA.....	216
4.8. Isolamento dos constituintes de <i>Conchocarpus heterophyllus</i> .....	220
4.8.1. Estudo químico da fração AHFHD.....	220
4.8.2. Estudo químico da fração AHFHA.....	223
4.8.3. Estudo químico da fração AHCMA.....	224
4.9. Isolamento dos constituintes de <i>Trichilia ramalhoi</i> .....	225
4.9.1. Estudo químico do extrato TRGH.....	225
4.10. Metodologia dos ensaios biológicos.....	226
4.10.1. Ensaio com a enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> .....	226
4.10.2. Ensaio com a enzima APRT de <i>L. tarentolae</i> .....	228
4.10.3. Ensaio com as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	229
5. Conclusões.....	231
6. Referências bibliográficas.....	233

## Lista de Símbolos e Abreviações

### Símbolos

$\phi$  = diâmetro

h = altura

$\delta$  = deslocamento químico em partes por milhão

J = constante de acoplamento

m/z = relação massa/carga

### Abreviações

APRT = enzima adenina fosforribosiltransferase

CCDA = cromatografia em camada delgada analítica

CCDP = cromatografia em camada delgada preparativa

COSY = *correlated spectroscopy*

CG-EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DEPT = *distortionless enhancement by polarization transfer*

DMSO = dimetilsulfóxido

ES = *electrospray*

gGAPDH = enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HMBC = *heteronuclear multiple quantum correlation*

HSQC = *heteronuclear single quantum correlation*

IC<sub>50</sub> = 50 % *inhibitory concentration*

IE = impacto eletrônico

NOE = *nuclear overhauser effect*

NOESY = *nuclear overhauser effect spectroscopy*

RMN = ressonância magnética nuclear

RMN <sup>1</sup>H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C = ressonância magnética nuclear de carbono 13

UV = ultravioleta

## Lista de Figuras

FIGURA 1.1. Formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> (FIOCRUZ, 2004).....	3
FIGURA 1.2. Triatomíneo <i>Triatoma infestans</i> (BIOMANIA, 2004).....	4
FIGURA 1.3. Estruturas químicas do nifurtimox e do benzonidazol.....	5
FIGURA 1.4. Metabolismo da glicólise e do glicerol em glicossomos.....	8
FIGURA 1.5. Classificação taxonômica de <i>Leishmanias</i> encontradas em mamíferos (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001).....	9
FIGURA 1.6. Formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> (Pesquisa FAPESP, 2003).....	10
FIGURA 1.7. Mosquito-palha (Pesquisa FAPESP, 2003).....	11
FIGURA 1.8. Estruturas químicas da anfotericina B, da paramomicina e da miltefosina.....	14
FIGURA 1.9. <i>Via de recuperação</i> de purino-nucleotídeos em <i>Leishmania</i> (SILVA, 2001).....	15
FIGURA 1.10. Reação catalisada pela APRT.....	16
FIGURA 1.11. Produtos naturais antimaláricos.....	17
FIGURA 1.12. Produtos naturais antichagásicos.....	19
FIGURA 1.13. Produtos naturais anti- <i>Leishmania</i> .....	20
FIGURA 1.14. Substâncias isoladas de <i>A. coerulea</i> e <i>A. rubra</i> (CORTEZ, 2002; MAFEZOLI, 2001; SANTOS et al., 1998).....	22
FIGURA 3.1. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura de β-sitosterol e estigmasterol ( <b>1</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	36
FIGURA 3.2. Espectros de massas (IE = 70 e.V.) do β-sitosterol e estigmasterol ( <b>1</b> ).....	36
FIGURA 3.3. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da sitostenona ( <b>2</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	38
FIGURA 3.4. Espectro de massas (ES <sup>+</sup> ) da sitostenona ( <b>2</b> ).....	38
FIGURA 3.5. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	40
FIGURA 3.6. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	40
FIGURA 3.7. Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	41
FIGURA 3.8. Mapa de contorno de HSQC do benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	42
FIGURA 3.9. Ampliação do mapa de contorno de HSQC do benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	42
FIGURA 3.10. Mapa de contorno de HMBC do benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	44
FIGURA 3.11. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do benzoato de β-sitosterila ( <b>3</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	44

FIGURA 3.12. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do lupeol ( <b>4</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	47
FIGURA 3.13. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do lupeol ( <b>4</b> ).....	47
FIGURA 3.14. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lupenona ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)...	49
FIGURA 3.15. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da lupenona ( <b>5</b> ).....	49
FIGURA 3.16. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	51
FIGURA 3.17. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	51
FIGURA 3.18. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	52
FIGURA 3.19. Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	52
FIGURA 3.20. Espectro de DEPT 135° do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	53
FIGURA 3.21. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do sesquiterpeno <b>6</b> .....	54
FIGURA 3.22. Mapa de contorno de HSQC do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	55
FIGURA 3.23. Ampliação do mapa de contorno de HSQC do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	56
FIGURA 3.24. Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	57
FIGURA 3.25. Ampliação do espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	57
FIGURA 3.26. Mapa de contorno de HMBC do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	59
FIGURA 3.27. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	60
FIGURA 3.28. Espectro de NOESY do sesquiterpeno <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	61
FIGURA 3.29. Diferentes perspectivas da estrutura tridimensional mais provável do sesquiterpeno eudesmano <b>6</b> .....	61
FIGURA 3.30. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da flavona ( <b>7</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	64
FIGURA 3.31. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da flavona ( <b>7</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	64
FIGURA 3.32. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da flavona ( <b>7</b> ).....	65
FIGURA 3.33. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da 7-metoxiflavona ( <b>8</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	67
FIGURA 3.34. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da 7-metoxiflavona ( <b>8</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	67
FIGURA 3.35. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da 7-metoxiflavona ( <b>8</b> ). 69	69
FIGURA 3.36. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da 5-hidroxiflavona ( <b>9</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	70
FIGURA 3.37. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da 5-hidroxiflavona ( <b>9</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	71

FIGURA 3.38. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da 5-hidroxi-flavona ( <b>9</b> )	72
FIGURA 3.39. Espectro de RMN <sup>1</sup> H das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	74
FIGURA 3.40. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	74
FIGURA 3.41. Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	75
FIGURA 3.42. Ampliação do espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	75
FIGURA 3.43. Mapa de contorno de HSQC das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	76
FIGURA 3.44. Ampliação do mapa de contorno de HSQC das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	77
FIGURA 3.45. Espectro de RMN <sup>13</sup> C das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)	77
FIGURA 3.46. Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)	78
FIGURA 3.47. Espectro de DEPT 135° das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)	78
FIGURA 3.48. Mapa de contorno de HMBC das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	80
FIGURA 3.49. Ampliação do mapa de contorno de HMBC das piranoflavonas <b>10</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	80
FIGURA 3.50. Espectro de massas (ES+) das piranoflavonas <b>10</b>	82
FIGURA 3.51. Alcalóides de Rutaceae formados a partir da combinação de ácido antranílico e acetato (WATERMAN, 1999)	85
FIGURA 3.52. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da dictamina ( <b>11</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	87
FIGURA 3.53. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da dictamina ( <b>11</b> )	87
FIGURA 3.54. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da kokusagina ( <b>12</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	89
FIGURA 3.55. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da kokusagina ( <b>12</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)	90
FIGURA 3.56. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da kokusagina ( <b>12</b> )	90
FIGURA 3.57. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da esquimianina ( <b>13</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	92
FIGURA 3.58. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da esquimianina ( <b>13</b> )	93
FIGURA 3.59. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da δ-fagarina ( <b>14</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	94
FIGURA 3.60. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da δ-fagarina ( <b>14</b> )	95
FIGURA 3.61. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da isokokusagina ( <b>15</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	97

FIGURA 3.62. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da isokokusagina ( <b>15</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	97
FIGURA 3.63. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da isokokusagina ( <b>15</b> )....	98
FIGURA 3.64. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da isoesquimianina ( <b>16</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	100
FIGURA 3.65. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da isoesquimianina ( <b>16</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	100
FIGURA 3.66. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da isodutaduprina ( <b>17</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	103
FIGURA 3.67. Espectro de NOE da isodutaduprina ( <b>17</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	103
FIGURA 3.68. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	105
FIGURA 3.69. Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	107
FIGURA 3.70. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	108
FIGURA 3.71. Mapa de contorno de HSQC do alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	108
FIGURA 3.72. Mapa de contorno de HMBC do alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	109
FIGURA 3.73. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b> .....	111
FIGURA 3.74. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da haplotusina ( <b>19</b> ) (MeOD, 200 MHz).....	114
FIGURA 3.75. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da haplotusina ( <b>19</b> ) (MeOD, 50 MHz).....	115
FIGURA 3.76. Mapa de contorno de HSQC da haplotusina ( <b>19</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	116
FIGURA 3.77. Mapa de contorno de HMBC da haplotusina ( <b>19</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	117
FIGURA 3.78. Espectro de massas (ES+) da haplotusina ( <b>19</b> ).....	118
FIGURA 3.79. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	121
FIGURA 3.80. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	121
FIGURA 3.81. Mapa de contorno de HSQC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	122
FIGURA 3.82. Ampliação do mapa de contorno de HSQC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	122
FIGURA 3.83. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	123

FIGURA 3.84. Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	124
FIGURA 3.85. Mapa de contorno de HMBC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	125
FIGURA 3.86. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	126
FIGURA 3.87. Espectro de massas (ES+) do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( <b>20</b> ).....	126
FIGURA 3.88. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da arborinina ( <b>21</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	129
FIGURA 3.89. Espectro de massas (ES+) da arborinina ( <b>21</b> ).....	129
FIGURA 3.90. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do alcalóide indolopiridoquinazolínico <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	132
FIGURA 3.91. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do alcalóide indolopiridoquinazolínico <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	132
FIGURA 3.92. Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do alcalóide indolopiridoquinazolínico <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	133
FIGURA 3.93. Mapa de contorno de HSQC do alcalóide indolopiridoquinazolínico <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	134
FIGURA 3.94. Mapa de contorno de HMBC do alcalóide indolopiridoquinazolínico <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	137
FIGURA 3.95. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do alcalóide indolopiridoquinazolínico <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	137
FIGURA 3.96. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da escoparona ( <b>23</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	141
FIGURA 3.97. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da escoparona ( <b>23</b> ).....	141
FIGURA 3.98. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da escopoletina ( <b>24</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	143
FIGURA 3.99. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da escopoletina ( <b>24</b> ).....	143
FIGURA 3.100. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da marmesina ( <b>25</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	144
FIGURA 3.101. Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H da marmesina ( <b>25</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	145
FIGURA 3.102. Mapa de contorno de HSQC da marmesina ( <b>25</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	146
FIGURA 3.103. Mapa de contorno de HMBC da marmesina ( <b>25</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	147
FIGURA 3.104. Ampliação do mapa de contorno de HMBC da marmesina ( <b>25</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	147
FIGURA 3.105. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da marmesina ( <b>25</b> ).....	149
FIGURA 3.106. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	151



FIGURA 3.107. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	151
FIGURA 3.108. Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	152
FIGURA 3.109. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 50 MHz).....	153
FIGURA 3.110. Mapa de contorno de HSQC da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	153
FIGURA 3.111. Ampliação do mapa de contorno de HSQC da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	154
FIGURA 3.112. Mapa de contorno de HMBC da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	154
FIGURA 3.113. Ampliação do mapa de contorno de HMBC da paprazina ( <b>26</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	155
FIGURA 3.114. Espectro de massas (ES+) da paprazina ( <b>26</b> ).....	156
FIGURA 3.115. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	159
FIGURA 3.116. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	159
FIGURA 3.117. Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	160
FIGURA 3.118. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 50 MHz).....	161
FIGURA 3.119. Mapa de contorno de HSQC da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	161
FIGURA 3.120. Ampliação do mapa de contorno de HSQC da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	162
FIGURA 3.121. Mapa de contorno de HMBC da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	164
FIGURA 3.122. Ampliação do mapa de contorno de HMBC da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ) (DMSO, 400 MHz).....	165
FIGURA 3.123. Espectro de massas (ES+) da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> ).....	165
FIGURA 3.124. Estrutura cristalográfica do derivado do ácido antranílico <b>28</b> .....	167
FIGURA 3.125. Proposta biogenética para a formação do derivado do ácido antranílico <b>28</b> .....	168
FIGURA 3.126. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do derivado do ácido antranílico <b>28</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	169
FIGURA 3.127. Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do derivado do ácido antranílico <b>28</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	170

FIGURA 3.128. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do derivado do ácido antranílico <b>28</b> (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	171
FIGURA 3.129. Mapa de contorno de HSQC do derivado do ácido antranílico <b>28</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	171
FIGURA 3.130. Mapa de contorno de HMBC do derivado do ácido antranílico <b>28</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	173
FIGURA 3.131. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do derivado do ácido antranílico <b>28</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	174
FIGURA 3.132. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do derivado do ácido antranílico <b>28</b> .....	174
FIGURA 3.133. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	176
FIGURA 3.134. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	176
FIGURA 3.135. Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	177
FIGURA 3.136. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	178
FIGURA 3.137. Mapa de contorno de HSQC da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	179
FIGURA 3.138. Ampliação do mapa de contorno de HSQC da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	179
FIGURA 3.139. Mapa de contorno de HMBC da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	181
FIGURA 3.140. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da 1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> ).....	181
FIGURA 3.141. Substâncias isoladas de <i>Flindersia laevicarpa</i> (GRAY, 1983).....	182
FIGURA 3.142. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do ácido siríngico ( <b>30</b> ) (DMSO, 200 MHz).....	184
FIGURA 3.143. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do ácido siríngico ( <b>30</b> ) (DMSO, 50 MHz).....	184

## Lista de Tabelas

TABELA 1.1. Aspectos das principais doenças tropicais (GELB e HOL, 2002).....	1
TABELA 3.1. Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $^1J$ ) para o benzoato de $\beta$ -sitosterila.....	41
TABELA 3.2. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do benzoato de $\beta$ -sitosterila.....	45
TABELA 3.3. Correlações a $^1J$ para o sesquiterpeno <b>6</b> .....	55
TABELA 3.4. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do sesquiterpeno eudesmano.....	62
TABELA 3.5. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da flavona.....	65
TABELA 3.6. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da 7-metoxiflavona.....	68
TABELA 3.7. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da 5-hidroxiavona.....	71
TABELA 3.8. Determinação de <i>R</i> das piranoflavonas.....	82
TABELA 3.9. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das piranoflavonas.....	83
TABELA 3.10. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da dictamina.....	88
TABELA 3.11. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da kokusagina....	91
TABELA 3.12. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da esquimianina.....	93
TABELA 3.13. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da $\delta$ -fagarina.....	95
TABELA 3.14. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da isokokusagina.....	98
TABELA 3.15. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da isoesquimianina.....	101
TABELA 3.16. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da isodutaduprina.....	104
TABELA 3.17. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do alcalóide tetraidrofuroquinolínico.....	112
TABELA 3.18. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da haplotusina....	119
TABELA 3.19. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona.....	127
TABELA 3.20. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da arborinina.....	130
TABELA 3.21. Correlações a $^1J$ para o alcalóide indopiridoquinazolínico <b>22</b> .....	133
TABELA 3.22. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ do alcalóide indolopiridoquinazolínico.....	138
TABELA 3.23. Dados espectroscópicos de RMN $^{13}\text{C}$ do alcalóide indolopiridoquinazolínico.....	139
TABELA 3.24. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da escoparona.....	141
TABELA 3.25. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ da escopoletina.....	143
TABELA 3.26. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da marmesina....	149
TABELA 3.27. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da paprazina.....	157

TABELA 3.28. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina.....	166
TABELA 3.29. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do derivado do ácido antranílico.....	175
TABELA 3.30. Dados espectroscópicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da 1,5-difenil-1-pentanona.....	182
TABELA 3.31. Efeito dos extratos vegetais sobre a atividade da enzima gGAPDH.....	186
TABELA 3.32. Efeito dos extratos vegetais sobre a atividade da enzima APRT.....	187
TABELA 3.33. Atividade tripanocida dos extratos vegetais.....	189
TABELA 3.34. Efeito das frações sobre a atividade da enzima gGAPDH.....	190
TABELA 3.35. Efeito das frações sobre a atividade da enzima APRT.....	192
TABELA 3.36. Atividade tripanocida das frações.....	193
TABELA 3.37. Efeito das substâncias isoladas sobre a atividade da enzima gGAPDH.....	196
TABELA 3.38. Efeito das substâncias isoladas sobre a atividade da enzima APRT.....	197
TABELA 3.39. Atividade tripanocida das substâncias isoladas.....	198
TABELA 4.1. Informações relativas às coletas das plantas.....	204
TABELA 4.2. Massas dos extratos vegetais preparados.....	205
TABELA 4.3. Frações obtidas por CLV.....	206
TABELA 4.4. Frações obtidas por partição líquido-líquido.....	207

## 1. Introdução

### 1.1. Doenças tropicais

As doenças tropicais tais como malária, leishmaniose e doença de Chagas afetam 3 bilhões de pessoas em todo o mundo (TABELA 1.1.). A grande maioria dessas pessoas reside em países em desenvolvimento, sobrevivendo com US\$ 2,00 ou menos por dia (GELB e HOL, 2002).

TABELA 1.1. Aspectos das principais doenças tropicais (GELB e HOL, 2002).

doença	parasita causador	inseto vetor	região afetada	número de casos estimados	número de mortes estimadas por ano
malária	<i>Plasmodium falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	mosquito <i>Anopheles</i>	tropicais	300 milhões /ano	> 1 milhão
doença do sono	<i>Trypanosoma brucei</i>	mosca tsé-tsé ( <i>Glossina</i> spp)	África	300.000	66.000
leishmaniose (cutânea, mucocutânea e visceral)	<i>Leishmania</i> spp.	flebotomíneos	tropicais e subtropicais	1,5-2 milhões	57.000
doença de Chagas	<i>T. cruzi</i>	triatomíneos	América Latina	16-18 milhões	50.000

As estatísticas relativas a essas doenças são alarmantes. A malária mata duas pessoas, geralmente crianças, por minuto. A doença de Chagas afeta milhões de indivíduos na América Latina, ocasionando a morte de 20-30 % dos infectados. Já, a leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença, é endêmica em dois estados da Índia (GELB e HOL, 2002).

Essas doenças constituem um grave problema de saúde pública, devido às severas manifestações que ocasionam, à ampla distribuição geográfica, e por não

possuírem tratamento eficaz seguro. Além disso, apesar dos avanços no entendimento dos eventos imunes que ocorrem em resposta a essas doenças, não se espera em um curto período de tempo, o desenvolvimento de vacinas (DENISE et al., 1999).

A sociedade científica tem se empenhado bastante para encontrar métodos mais seguros e eficientes para o controle dessas enfermidades. Atualmente, o sequenciamento dos genomas dos agentes etiológicos dessas doenças traz esperança para o desenvolvimento de uma nova forma de controle. O genoma funcional é essencial para a identificação de proteínas alvo para o genoma estrutural e para o desenvolvimento de fármacos.

A pesquisa de novos fármacos é extremamente necessária e pode ser realizada por diferentes abordagens. Estima-se que 20-30 novos fármacos serão necessários para o controle prolongado das doenças tropicais (GELB e HOL, 2002).

Desta forma, devido à necessidade eminente de novos fármacos, neste trabalho se propôs procurar em plantas compostos protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses, utilizando-se para isso três modelos biológicos: ensaios *in vitro* nas formas tripomastigotas do *T. cruzi*, ensaios bioquímicos sobre a enzima gGAPDH (gliceradeído-3-fosfato desidrogenase) de *T. cruzi*, e ensaios sobre a enzima APRT (adenina fosforribosiltransferase) de *L. tarentolae*.

### **1.1.1. Doença de Chagas**

A doença de Chagas é uma infecção generalizada, de natureza endêmica, causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, e transmitida originalmente ao homem através de triatomíneos (VERONESI, 1991).

### 1.1.1.1. Agente etiológico: *T. cruzi*

O parasita *T. cruzi* (FIGURA 1.1) é um protozoário da classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Durante seu ciclo de vida, apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota). No homem e nos demais vertebrados (tatus, macacos, gambás, etc), o tripomastigoto tem por *habitat* o meio circulante, e o amastigoto, os tecidos. No triatomíneo, além das formas amastigotas e tripomastigotas, observa-se a forma de transição epimastigota (VERONESI, 1991). Considera-se que os epimastigotos são formas que se dividem nos invertebrados, que os amastigotos se dividem nos vertebrados, enquanto que, os tripomastigotos são as formas infectantes, que não se multiplicam.

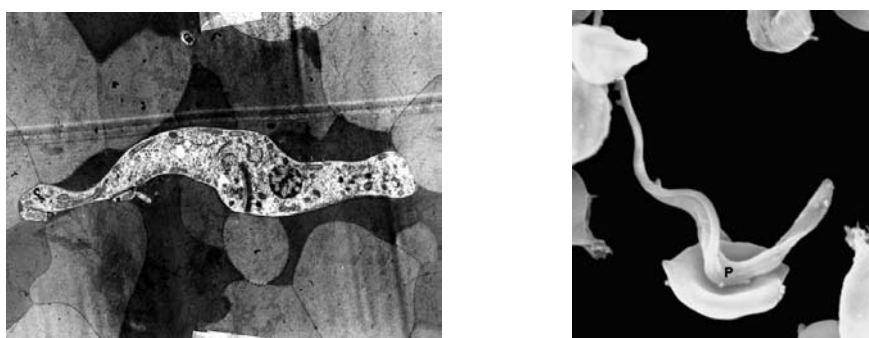


FIGURA 1.1. Formas tripomastigotas do *T. cruzi* (FIOCRUZ, 2004).

### 1.1.1.2. Transmissor: *Triatoma infestans* (VERONESI, 1991)

Os triatomíneos são insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, vulgarmente conhecidos como “barbeiros” ou “chupanças”. Já foram descritas cerca de 110 espécies de triatomíneos, sendo que em cada região prevalece uma espécie. Na América do Sul, as de maior importância epidemiológica são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e

*Panstrongylus megistus*, sendo que o primeiro é o principal transmissor no Brasil.

Eles são relativamente grandes, geralmente, pretos ou acinzentados, com manchas vermelhas, amarelas ou alaranjadas ao redor de seu abdome (FIGURA 1.2), e podem ser silvestres, peridomiciliares ou domiciliares.

Os triatomíneos são insetos de hematofagismo obrigatório, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento de seu ciclo evolutivo, e de hábitos noturnos, sendo aversos à luz.



FIGURA 1.2. Triatomíneo *Triatoma infestans* (BIOMANIA, 2004).

### **1.1.1.3. Formas de transmissão e fases da doença**

Até a metade da década de 90, a principal forma de transmissão da doença de Chagas era através da picada do triatomíneo. Entretanto, através de várias medidas profiláticas de combate ao inseto, a transfusão de sangue passou a ser a principal causa do surgimento de novos casos dessa enfermidade (RAMIREZ et al., 1995). Outras formas menos comuns são a transmissão congênita, pelo leite materno, por acidentes em laboratórios, por transplantes de órgãos e por via digestiva (através da contaminação de alimentos ou utensílios domésticos com fezes de triatomíneos infectados). (VERONESI, 1991).

Uma vez infectado, o indivíduo pode passar por duas fases da doença: aguda e crônica. A fase aguda é definida como o estágio da doença no qual o parasita *T. cruzi* é facilmente detectado pelo exame direto do sangue periférico



(LUQUETTI, 1997). Ela caracteriza-se pelo aparecimento de manifestações de intensidades variáveis, após um período de incubação de 8 a 10 dias. Além da infecção local, ocorrem sintomas gerais, como febre, mal estar e cefaléia. Alguns órgãos, como coração, fígado e baço, apresentam aumento de volume. Com a regressão das manifestações da fase aguda (geralmente em 2 meses), o paciente entra em um estado de cura aparente, podendo permanecer assintomático durante longo período. Após 10 ou 20 anos, podem aparecer os sintomas característicos da fase crônica, principalmente de problemas relacionados ao coração e ao sistema digestivo (VERONESI, 1991).

#### 1.1.1.4. Tratamento

O tratamento da doença de Chagas é feito de forma sintomática (para atenuação dos sintomas) e através de terapêutica específica (contra o parasita).

Desde o final da década de 60 e início dos anos 70, dois fármacos têm sido usados para o tratamento específico dessa doença: o nifurtimox e benzonidazol (FIGURA 1.3).

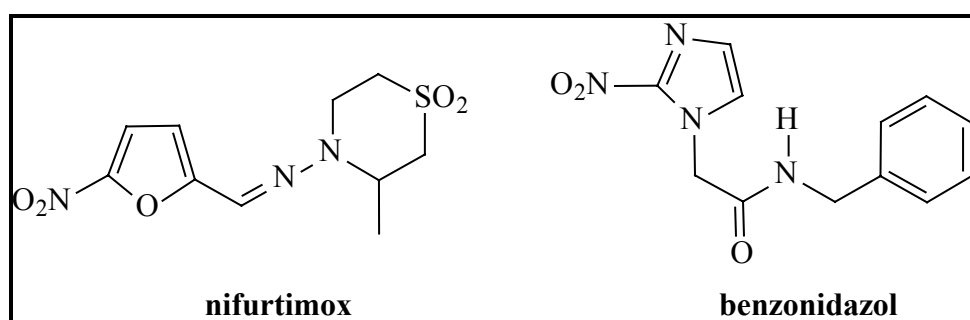


FIGURA 1.3. Estruturas químicas do nifurtimox e do benzonidazol.

O nifurtimox (Lampit®) é um derivado 5-nitrofurfurilideno, que desde os anos 80 não é mais comercializado no Brasil. O modo de ação desse fármaco envolve a formação do radical nitroânion por nitroredutases, que, na presença de

oxigênio, levam a intermediários reativos. Como o *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxificação de radicais livres, ele fica suscetível a tais intermediários (DO CAMPO e MORENO, 1986).

O benzonidazol (Rochagan®) é um derivado 2-nitroimidazólico, cujo modo de ação pode envolver a ligação covalente (ou outras interações) dos intermediários nitroreduzidos com os componentes do parasita (POLAK e RICHLE, 1978) ou ao DNA, lipídeos e proteínas (DE TORANZO et al., 1988).

A eficiência desses fármacos depende do estágio da doença, do período de tratamento, da dosagem, da idade e da região geográfica em que residem os pacientes (COURA e DE CASTRO, 2002). Em geral, o período de tratamento é de 30 a 60 dias, com 2 ou 3 doses diárias do medicamento, e requer internação do paciente.

Esses medicamentos parecem ser eficientes apenas nas fases aguda ou crônica recente da doença (menos que 10 anos de contaminação), com taxa de cura sorológica e parasitológica de até 60 %, sendo contra-indicados na fase crônica (LUQUETTI, 1997). Quando utilizados na fase crônica, a definição de cura é bastante difícil, pois se observa geralmente parasitemia negativa e a persistência de resultados positivos de sorologia.

Além disso, possuem graves efeitos colaterais. O nifurtimox afeta principalmente o sistema digestivo, podendo causar náuseas, vômito, cólicas intestinais e diarreia, e o benzonidazol causa manifestações cutâneas (LUQUETTI, 1997).

Os fatos anteriores evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos específicos para a doença de Chagas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) postula que o fármaco ideal para o tratamento dessa doença deva preencher os seguintes requisitos: cura parasitológica dos casos agudos e crônicos; baixo custo; não apresentar efeitos colaterais ou teratogênicos; não deve haver necessidade de hospitalização para o

tratamento; não induzir resistência no protozoário (COURA e DE CASTRO, 2002).

#### **1.1.1.5. Enzima gGAPDH de *T. cruzi***

O desenvolvimento de quimioterápicos antiparasitários pode ser feito de diversas formas: a partir do *screening* de bibliotecas de compostos naturais ou sintéticos, que possuam similaridade estrutural com uma substância ativa; através de ensaios com fármacos utilizados para outras doenças; ou, pela determinação de um “alvo” específico, que faça parte de uma etapa essencial no metabolismo do parasita (COURA e DE CASTRO, 2002).

Avanços recentes no estudo da bioquímica do *T. cruzi* permitiram a identificação de novos “alvos”, que incluem: a biossíntese dos esteróides; e enzimas, tais como, tripanotiona redutase, cisteína protease, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, DNA topoisomerasas, diidrofolato redutase, farnesilpirofosfato sintase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (DO CAMPO, 2001; RODRIGUEZ, 2001).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) faz parte da via glicolítica do protozoário (FIGURA 1.4), realizando a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-difosfoglicerato, em presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) e de fosfato inorgânico.

Essa enzima é considerada um “alvo” promissor na busca de novos compostos antichagásicos, pois as formas tripomastigotas do *T. cruzi* são exclusivamente dependentes da via glicolítica para obtenção de energia, já que nessas formas não existem citocromos e a mitocôndria é muito reduzida, suprimindo a cadeia respiratória (CLARKSON e BROHN, 1976). Considera-se que inibidores que diminuam significativamente o “fluxo” glicolítico irão matar o parasita. Em simulações computacionais e estudos experimentais da glicólise nas formas tripomastigotas de *T. brucei* observou-se a diminuição do fluxo

glicolítico com a inibição de determinada(s) enzima(s) glicolítica(s), dentre elas a GAPDH (BAKKER et al., 2000).

Além deste fato, as estruturas tridimensionais da GAPDH humana e da glicossomal do *T. cruzi* apresentaram diferenças em resíduos dos seus “sítios” ativos (Asp<sup>201</sup> para *T. cruzi* e Leu<sup>194</sup> para GAPDH humana). Isto significa que elas serão distintamente seletivas aos potenciais inibidores (SOUZA et al., 1998).

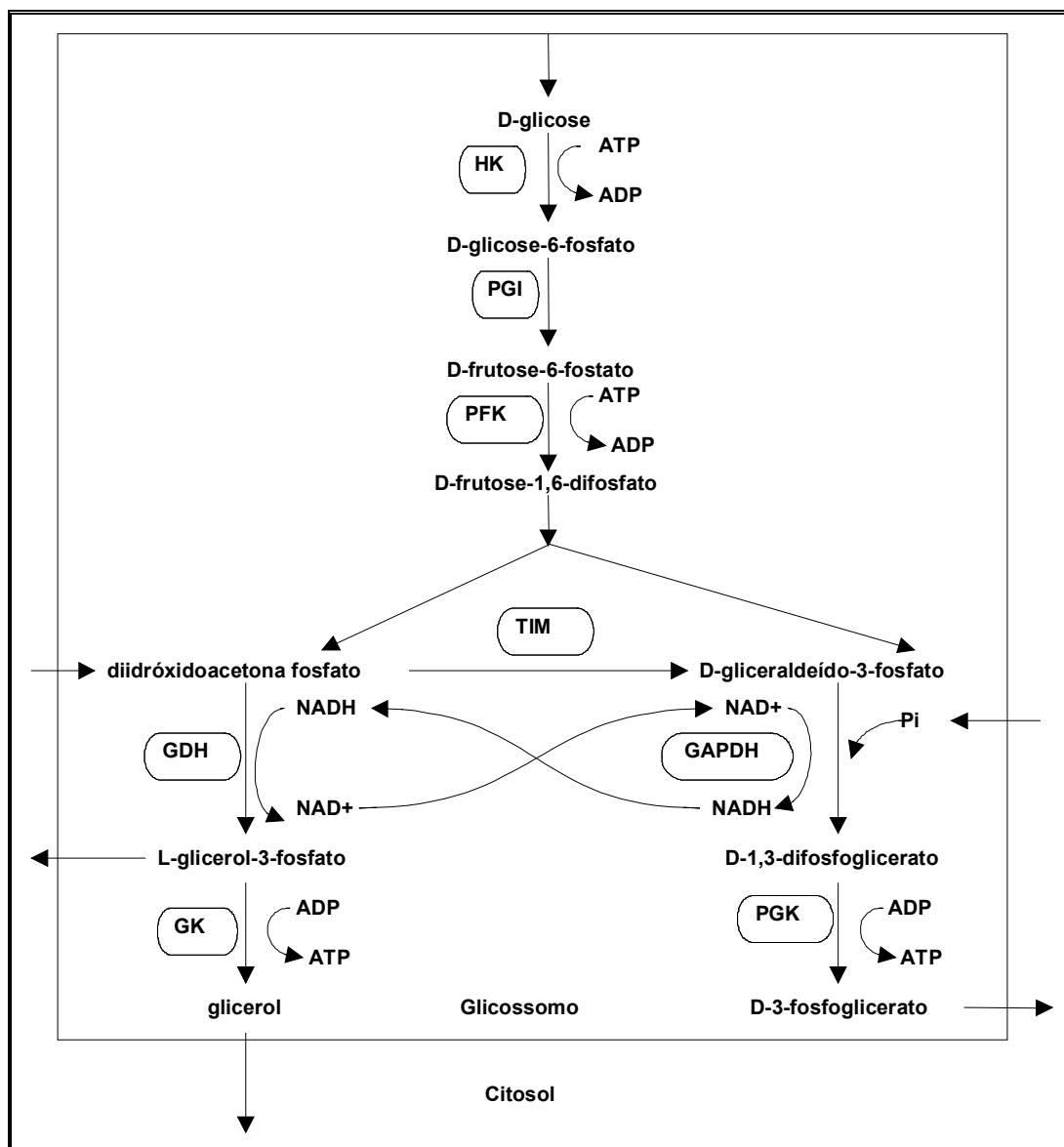


FIGURA 1.4. Metabolismo da glicólise e do glicerol em glicossomos.

\* os compostos permeáveis à membrana são mostrados com setas.

\*\* HK = hexoquinase; PGI = fosfoglicose isomerase; PFK = 6-fosfofrutoquinase; ALDO = frutose bifosfato aldolase; GDH = glicerol 3-fosfato desidrogenase; GK = glicerol quinase; TIM = triose fosfato isomerase; GAPDH, gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase; PGK = 3-fosfoglicerato quinase.

## 1.1.2. Leishmanioses

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem por insetos flebótomos (NEVES, 1991).

### 1.1.2.1. Agente etiológico: *Leishmania*

Os membros do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e são classificados em diferentes “complexos”, como descreve a FIGURA 1.5 (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001).

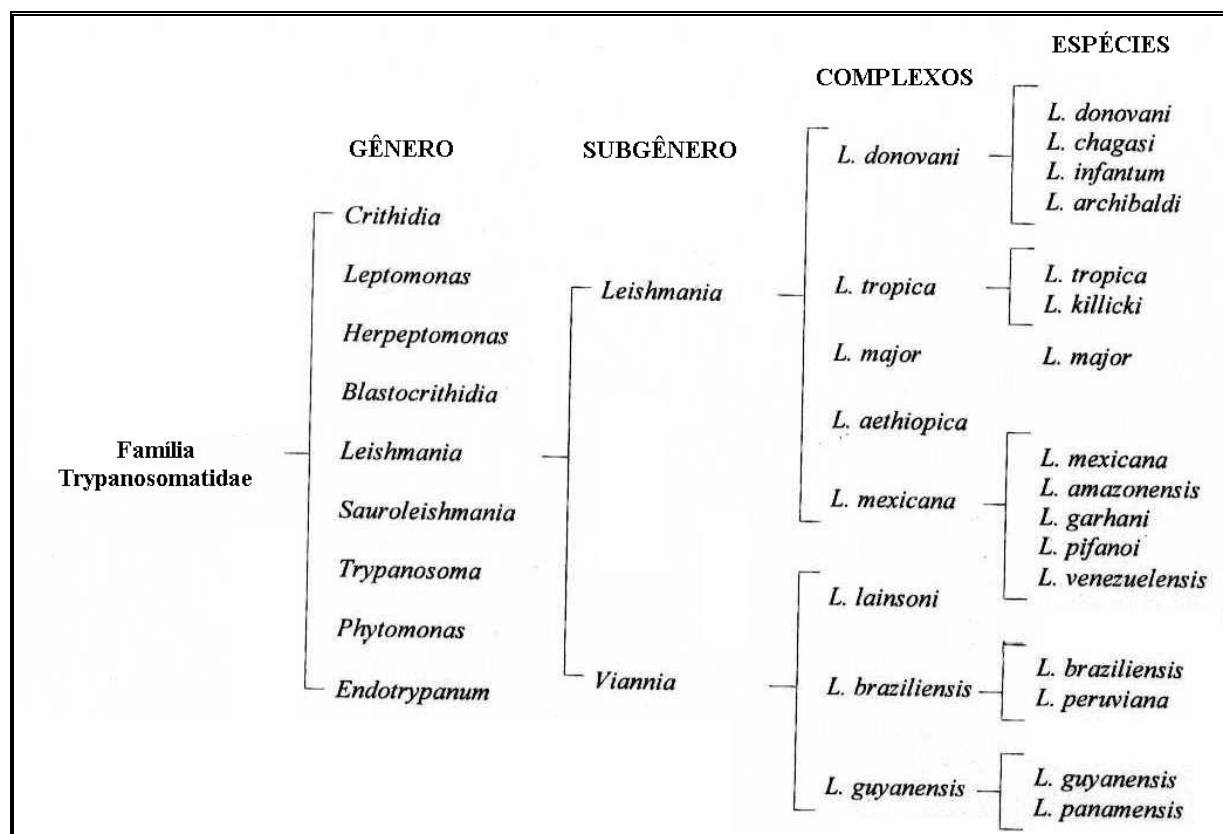


FIGURA 1.5. Classificação taxonômica de *Leishmanias* encontradas em mamíferos (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Durante seu ciclo biológico, os parasitas do gênero *Leishmania* existem em duas formas: promastigota e amastigota (FIGURA 1.6). A forma promastigota é flagelada e extracelular e infecta seres humanos e outros vertebrados, vivendo também no trato digestivo do inseto vetor. A forma amastigota é destituída de movimento e localiza-se nos macrófagos dos hospedeiros. Ambas formas possuem a propriedade de se dividir (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001; VERONESI, 1991).

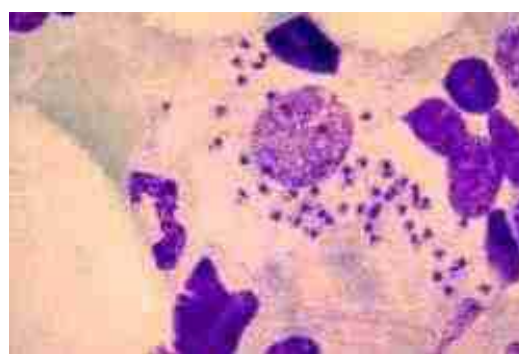
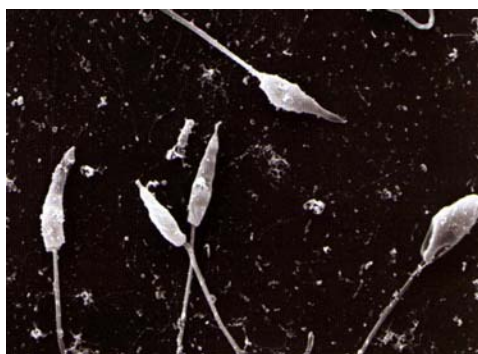


FIGURA 1.6. Formas promastigotas de *L. chagasi* e amastigotas de *L. amazonensis* (Pesquisa FAPESP, 2003).

#### **1.1.2.2. Transmissor: *Lutzomyia***

A leishmaniose é adquirida devido à ação hematófaga de insetos fêmeas pertencentes à família Psychodidae, conhecidos pelo nome genérico de flebótomos. No “Novo Mundo”, eles estão representados pelo gênero *Lutzomyia*, e são vulgarmente conhecidos por “birigui” ou “mosquito-palha”; e no “Velho Mundo” por insetos do gênero *Phlebotomus* (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001; NEVES, 1991).



FIGURA 1.7. Mosquito-palha (Pesquisa FAPESP, 2003).

### 1.1.2.3. Transmissão e manifestações clínicas da doença

A principal forma de transmissão da leishmaniose é através da picada do inseto flebótomo, mas existem outros meios que, apesar de serem raros e sem importância epidemiológica, podem ocorrer, dentre eles: transmissão congênita, transfusão de sangue e acidentes em laboratório (NEVES, 1991).

Uma vez infectado com o parasita *Leishmania* spp o indivíduo pode apresentar uma das manifestações clínicas da doença. Essas manifestações são usadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para classificar as leishmanioses em quatro formas distintas: visceral, mucocutânea, cutânea difusa ou disseminada e cutânea.

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, sendo fatal na maioria dos casos. As demais leishmanioses geralmente não são fatais, mas causam a desfiguração dos indivíduos, além de, se não tratadas, poderem evoluir para a forma mais grave da doença (GARNIER e CROFT, 2002).

A cada forma clínica da doença está associada uma espécie do parasita: *Leishmanias* do complexo *donovani* causam a leishmaniose visceral; do complexo *tropica* induzem a lesão cutânea no “Velho Mundo”; e do complexo *mexicana* ocasionam as leishmanioses cutânea e cutânea difusa em países da América Latina (FIGURA 1.5) (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001). No Brasil, a leishmaniose cutânea é causada por *L. amazonensis*; a forma mucocutânea por *L. braziliensis*; e a visceral por *L. chagasi*.

#### **1.1.2.4. Tratamento**

Há 50 anos a quimioterapia das leishmanioses baseia-se na utilização de antimoniais, principalmente do estilbogliconato de sódio (Pentosam®) e do antimoniato de meglumina (Glucantime®).

Esses antimoniais agem através da interferência nos processos bioenergéticos das formas amastigotas. Eles ligam-se e inibem diferentes proteínas do parasita, particularmente enzimas envolvidas na glicólise e na oxidação de ácidos graxos, resultando na redução da geração de ATP e GTP (BERMAN, 1988).

As formulações destes fármacos contêm várias estruturas moleculares “não caracterizadas”. O Pentosam® contém muitos complexos de antimônio com derivados de carboidratos, formados a partir do ácido glucônico. Já o Glucantime® é constituído por derivados da *N*-metilglucamina (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Diversos problemas estão associados à utilização destes medicamentos na quimioterapia antileishmanioses. Eles causam efeitos colaterais graves, que incluem problemas gastrointestinais, cardiotoxicidade e insuficiência renal e hepática, além de serem caros e requererem administração parenteral em tratamentos prolongados (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001). Entretanto, pelo menos um dos inconvenientes associado ao uso dos antimoniais poderá ser solucionado por pesquisadores brasileiros: a administração parenteral poderá em curto período de tempo ser substituída por formulações orais contendo os antimoniais associados com ciclodextrina (Pesquisa FAPESP, 2004).

Uma das alternativas na quimioterapia da leishmaniose é a utilização do antibiótico antifúngico anfotetericina B (FIGURA 1.8), que age ligando-se ao ergosterol na membrana do parasita, aumentando a permeabilidade de pequenas



moléculas. Existem várias formulações desta substância, que foram desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sua biodisponibilidade e reduzir a sua toxicidade (Ambisome®, Ambicel® e Anfocil®). Entretanto, alterações das funções renais ainda são observadas em 80 % dos indivíduos tratados (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Outro antibiótico utilizado é a aminosidina (FIGURA 1.8) também conhecida como paromomicina ou monomicina, mas também requer administração parenteral, tem alto custo e origina vários efeitos colaterais.

Mais recentemente, o alquilfosfolípideo miltefosina (FIGURA 1.8), que foi originalmente desenvolvido como um agente anticâncer (UNGER et al., 1989), passou pela fase III dos testes clínicos e foi registrado em março de 2002 para o tratamento de leishmaniose visceral na Índia (GELB e HOL, 2002).

O modo de ação desse fármaco ainda é desconhecido, mas sugere-se que ele interfira na remodelagem éter-lipídio do parasita (KAMINSKY, 2002).

A possibilidade de administração oral é a grande vantagem da utilização desse medicamento na terapêutica das leishmanioses, além de ter sido 95 % eficaz no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral na Índia. Entretanto, este fármaco, quando utilizado na dose recomendada, ocasiona alguns efeitos colaterais graves (incluindo distúrbios gastrointestinais e teratogenicidade) em 60 % dos pacientes (KAMINSKY, 2002).

Apesar de ter havido nos últimos anos um grande avanço no controle das leishmanioses, ainda é necessária a pesquisa de novos compostos que apresentem efeitos colaterais menos graves e sejam mais eficientes.

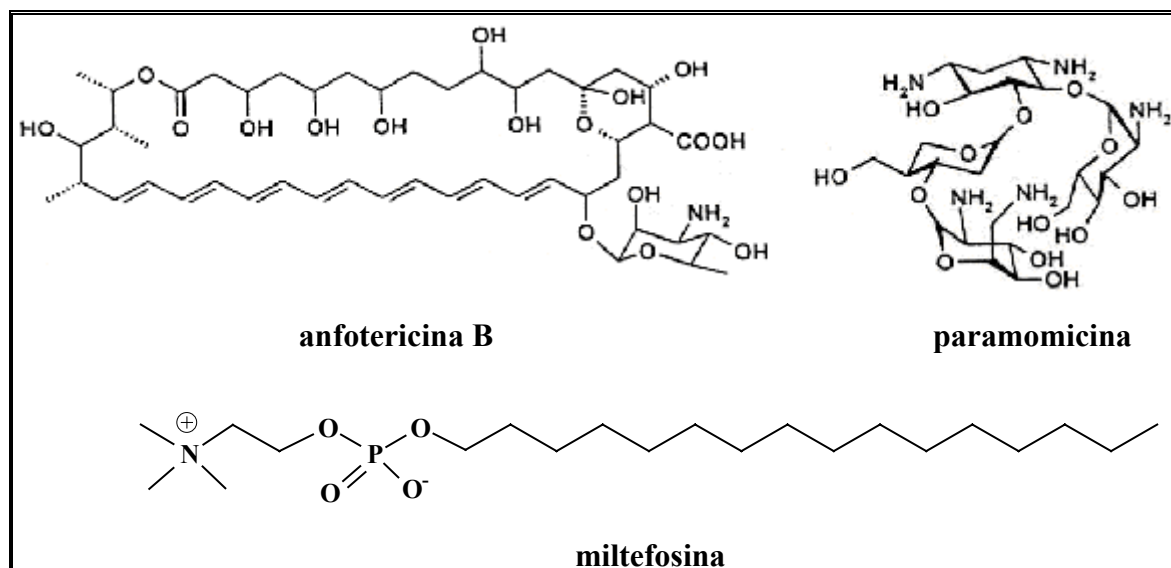


FIGURA 1.8. Estruturas químicas da anfotericina B, da paramomicina e da miltefosina.

#### 1.1.2.5. Enzima APRT de *Leishmania*

Uma abordagem atual no descobrimento de novos fármacos antiparasitários inicia-se pela identificação de um “alvo” molecular do patógeno, que seja essencial às suas funções vitais. Portanto, a inibição desse “alvo” poderia ser prejudicial à sobrevivência do parasita (CRAIG III e EAKIN, 1997).

As enzimas envolvidas na *via de recuperação* de purino-nucleotídeos em *Leishmania*, conhecidas genericamente como PRTases (fosforribosil-transferases) (FIGURA 1.9), são “alvos” metabólicos promissores para o desenvolvimento de novos compostos anti-*Leishmania*, pois através delas o parasita utiliza bases purínicas pré-formadas pelo hospedeiro mamífero, e sintetiza os nucleotídeos, que são essenciais para a formação de RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico).

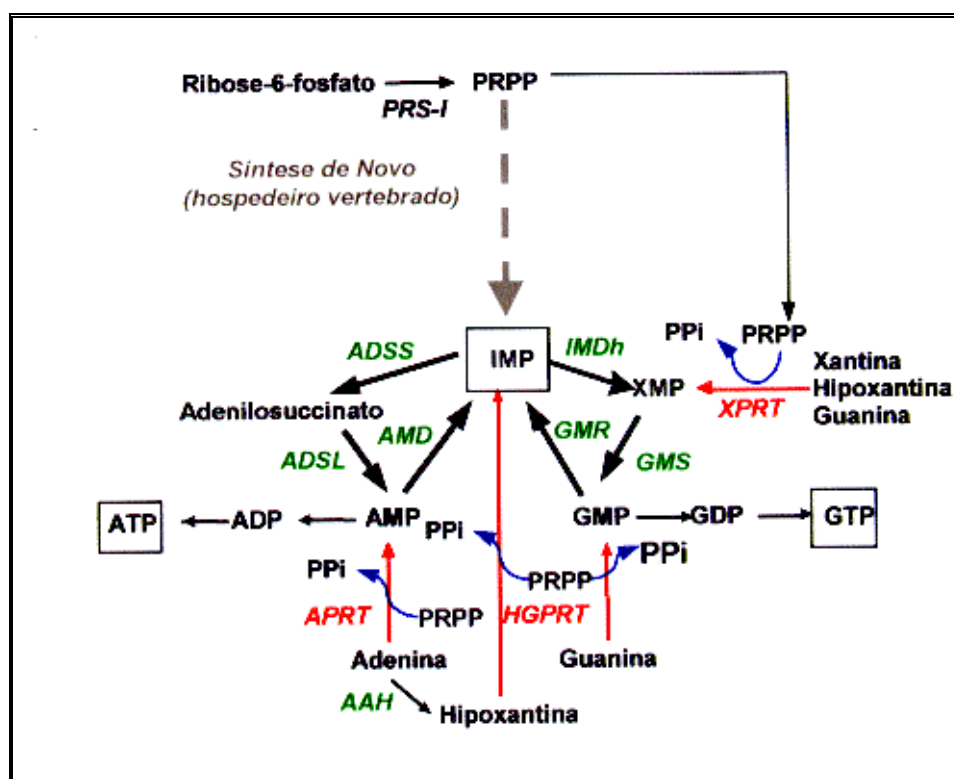


FIGURA 1.9. Via de recuperação de purino-nucleotídeos em *Leishmania*. (SILVA, 2001).

\* AAH = adenina dearminase; ADP = difosfato de adenosina; ADSL = adenilsuccinato liase; ADSS = adenilsuccinato sintetase; AMD = adenosina monofosfato deaminase; AMP = monofosfato de adenosina; APRT = adenina fosforribosiltransferase; ATP = trifosfato de adenosina; GDP = difosfato de guanosina; GMP = monofosfato de guanosina; GMR = guanosina monofosfato redutase; GMS = guanosina monofosfato sintetase; GTP = trifosfato de guanosina; HGPRT = hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase; IMDh = inosina monofosfato desidrogenase; IMP = monofosfato de inosina; P<sub>pi</sub> = pirofosfato; PRPP = 5-fosforribosil-1-pirofosfato; XMP = monofosfato de xantósina; XPRT = xantina fosforribosiltransferase.

Estudos metabólicos de muitos parasitas mostram que eles não possuem enzimas necessárias à síntese *de novo* de purino-nucleotídeos e, então, eles são “forçados” a recuperar de seus hospedeiros as purinas necessárias para o metabolismo celular (CRAIG III e EAKIN, 1997).

Uma das PRTases é a adenina-fosforribosil-transferase (APRT), que catalisa a reação nucleofílica entre a base purínica adenina e o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), formando a adenosina 5'-monofosfato (AMP) (FIGURA 1.10).

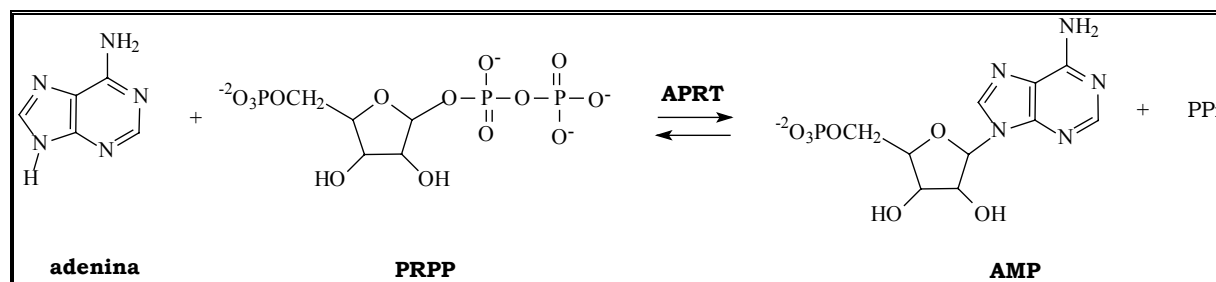


FIGURA 1.10. Reação catalisada pela APRT.

A enzima APRT foi escolhida neste trabalho para a seleção de compostos protótipos no desenvolvimento de fármacos antileishmanioses. Entretanto, sabe-se que a inibição de uma dada PRTase pode não ocasionar a morte do parasita, pois a *via de recuperação* (FIGURA 1.9) é formada por “caminhos independentes”, que podem ser utilizados pelo parasita como alternativa para a obtenção de nucleotídeos. Este fato foi observado em um estudo de inativação genética da HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase), no qual observou-se a sobrevivência *in vitro* de alguns parasitas (CRAIG III e EAKIN, 1997).

### 1.1.3. Controle com produtos naturais

Os fatos descritos anteriormente relativos principalmente à importância epidemiológica e à falta de tratamento eficaz seguro contra a doença de Chagas e as leishmanioses evidenciam a necessidade da procura de novos compostos para tais doenças.

A utilização de plantas para a pesquisa de novos compostos antiparasitários é um campo bastante promissor. Exemplos dos compostos antimaláricos quinina (FIGURA 1.11), isolada de *Cinchona succiruba* (Rubiaceae), e artemisinina (FIGURA 1.11), obtida de *Artemisia annua* (Asteraceae), ilustram a importância das plantas para o desenvolvimento de novos fármacos. Outra evidência para este fato é deduzida dos números

relacionados aos fármacos mais vendidos na década de 90, dos quais 50 % eram produtos naturais ou derivados (MAHIDOL et al., 1998).

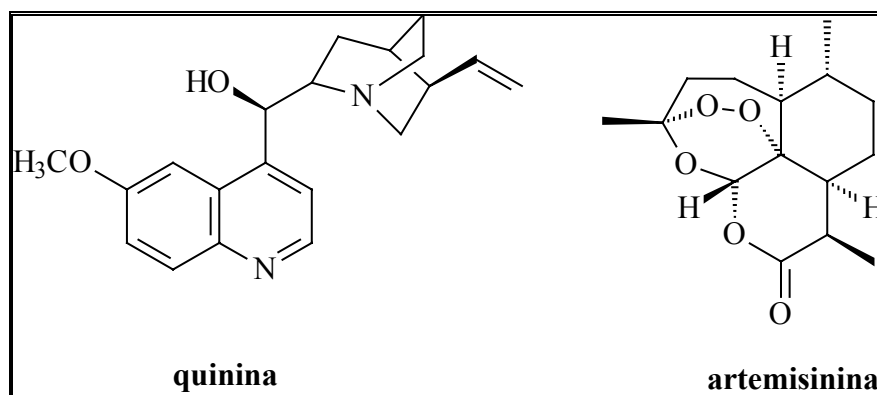


FIGURA 1.11. Produtos naturais antimaláricos.

Nos últimos anos, houve o aumento das pesquisas de fármacos para a doença de Chagas e leishmanioses a partir de plantas (PHILLIPSON e WRIGHT, 1991a,b) e vários metabólitos com ação tripanocida (COURA e DE CASTRO, 2002; SEPÚLVEDA-BOZA e CASSELS, 1995) e leishmanicida (AKENDENGUE et al., 1999; CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001; IWU et al., 1994) foram identificados. Dentre os compostos tripanocidas mais ativos estão as naftoquinonas, especialmente o lapachol (FIGURA 1.12) e seus derivados; e entre os compostos leishmanicidas os alcalóides, especialmente os 2-*R*-quinolínicos (FIGURA 1.13) (FOURNET et al., 1989, 1993a,b, 1994a,b,c e 1996).

## 1.2. Seleção das espécies vegetais

As atividades antiparasitárias de extratos e compostos isolados de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae foram uma das razões para a escolha das espécies *Almeidea coerulea* A. St.-Hil., *A. rubra* A. St.-Hil., *Conchocarpus*

*heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani, *Galipea carinata* Pirani (Rutaceae), e *Trichilia ramalhoi* Rizzini (Meliaceae) para este trabalho.

MAFEZOLI et al. (2000) e VIEIRA et al. (2001) determinaram a atividade tripanocida de várias espécies de Rutaceae e Meliaceae, destacando-se *Pilocarpus spicatus*, *Conchocarpus obovatus*, *Monnieira trifolia* e *Ravenia infelix*. Também se observou a inibição da enzima gGAPDH de *T. cruzi* principalmente por extratos de plantas da família Meliaceae (VIEIRA et al., 2001).

Da espécie *Zanthoxylum naranjillo* (Rutaceae) foi isolada a lignana (-)-metilpluviatolídeo (FIGURA 1.12), que foi bastante ativa contra as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (BASTOS et al., 1999).

A cumarina chalepina (FIGURA 1.12), isolada de *Pilocarpus spicatus* (MAFEZOLI, 2001; PAVÃO et al., 2002), uma série de cumarinas (VIEIRA et al., 2001), a flavona 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (FIGURA 1.12), isolada de *Neoraputia magnifica* (TOMAZELA et al., 2000), e outros flavonóides polimetoxilados (MORAES et al., 2003) inibiram significativamente a atividade da enzima gGAPDH, demonstrando que são substâncias que podem ser utilizadas como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos.

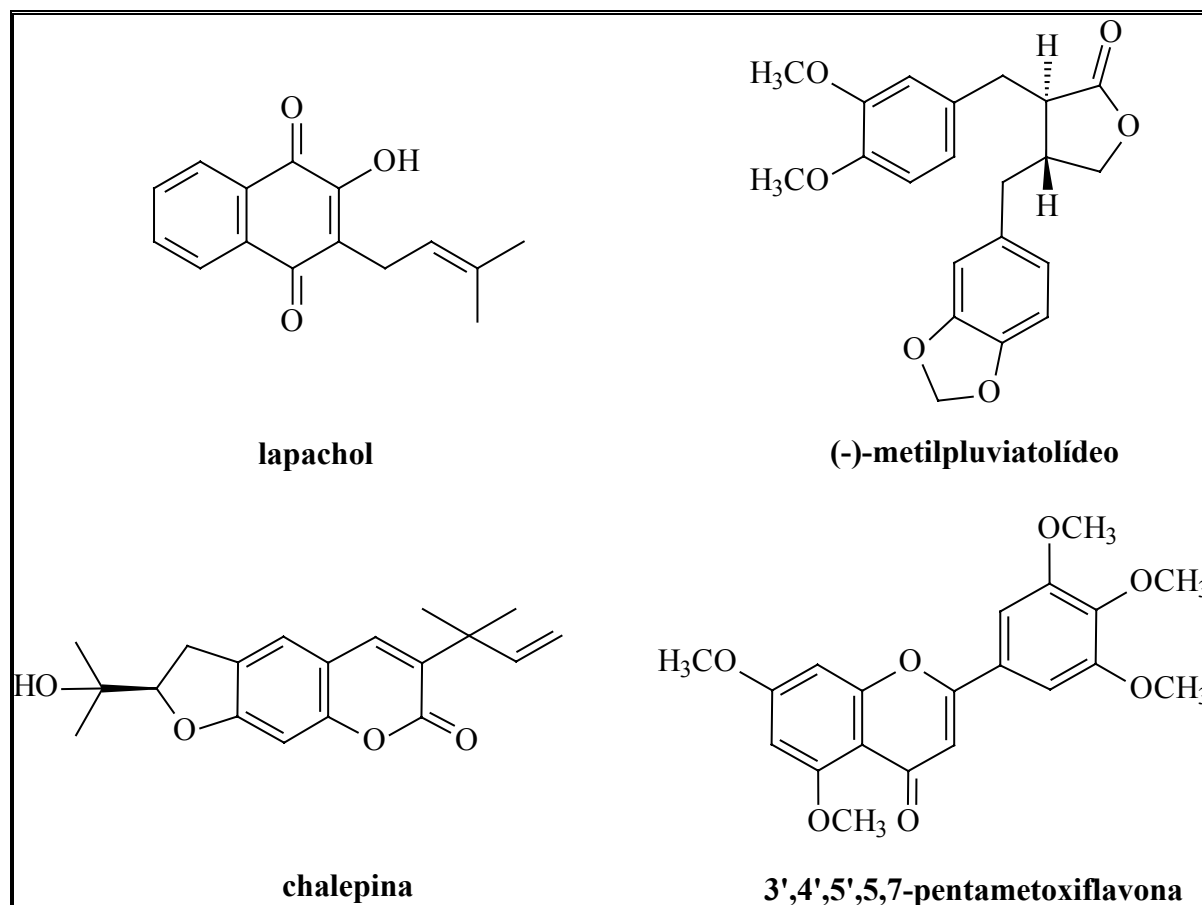


FIGURA 1.12. Produtos naturais antichagásicos.

Um dos grandes avanços recentes na quimioterapia das leishmanioses se deve à descoberta da potente atividade leishmanicida dos alcalóides 2-*R*-quinolínicos isolados da planta boliviana *Galipea longiflora* (Rutaceae). Dentre os vários alcalóides testados, as chimaninas B e D (FIGURA 1.13) foram as mais ativas sobre as formas promastigotas de *Leishmania* (FOURNET et al., 1994a). Outros alcalóides com potente atividade leishmanicida são as dictiolomidas A e B (FIGURA 1.13), isoladas de *Dictyoloma peruviana* (Rutaceae) (LAVAUD et al., 1995), a 6-metoxidictiolomida (FIGURA 1.13) identificada em *D. vandellianum* (SARTOR, 2001) e um alcalóide 2-quinolônico obtido de *Conchocarpus gaudichaudianus* (Rutaceae) (CORTEZ, 2002).

Uma outra razão para a escolha das espécies deste trabalho é a grande variedade de estruturas químicas produzidas por plantas das famílias Rutaceae e

Meliaceae. A ordem Rutales, as quais elas pertencem (DAHLGREEN, 1980), é uma das fontes mais ricas e diversas de metabólitos secundários em Angiospermas (WATERMAN, 1993).

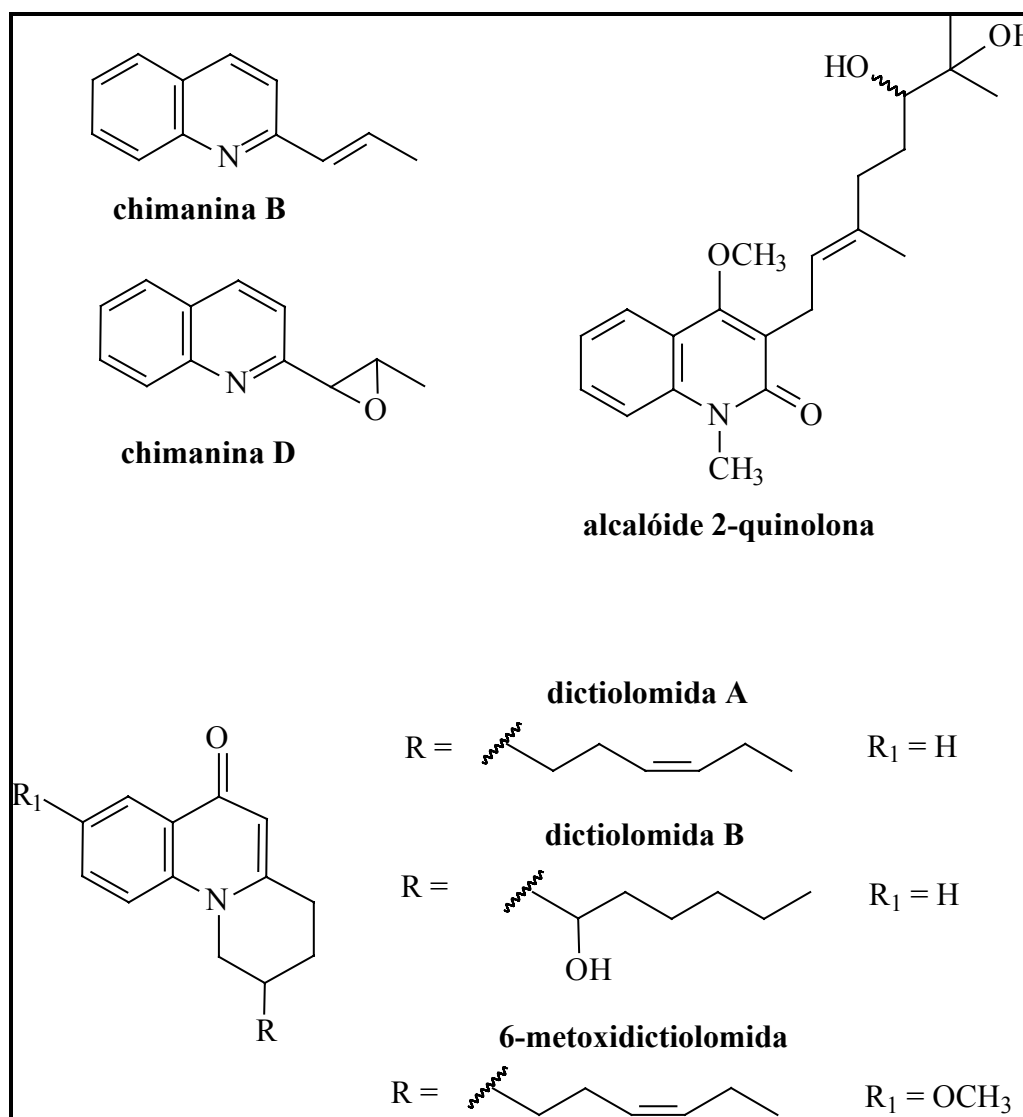


FIGURA 1.13. Produtos naturais anti-*Leishmania*.

### 1.3. Família Rutaceae

As espécies *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus*, *Galipea carinata* são classificadas na família Rutaceae, subfamília Rutoideae, tribo Cusparieae (DA SILVA et al., 1988).



A família Rutaceae constitui o maior grupo da ordem Rurales (DAHLGREEN, 1980), possuindo 150 gêneros, com 1500 espécies de tamanhos variados, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África, Ásia e Austrália. No Brasil, são descritas cerca de 160 espécies (ALBUQUERQUE, 1976).

Essa família apresenta uma diversidade muito grande de metabólitos secundários destacando-se: os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico (MESTER, 1983; WATERMAN, 1975), cumarinas, lignanas, flavonóides, terpenóides e limonóides.

#### *A. coerulea* e *A. rubra*

As espécies *A. coerulea* e *A. rubra* foram anteriormente estudadas (CORTEZ, 2002; MAFEZOLI, 2001; SANTOS et al., 1998), permitindo o isolamento de esteróides, triterpenos, sesquiterpenos e de vários alcalóides derivados do ácido antranílico (FIGURA 1.14). De outra espécie desse gênero foram obtidas flavonas C-glicosiladas e diversos alcalóides característicos da família Rutaceae (JAY et al., 1979; MOULIS et al., 1983; WIRASUTISNA et al., 1986).

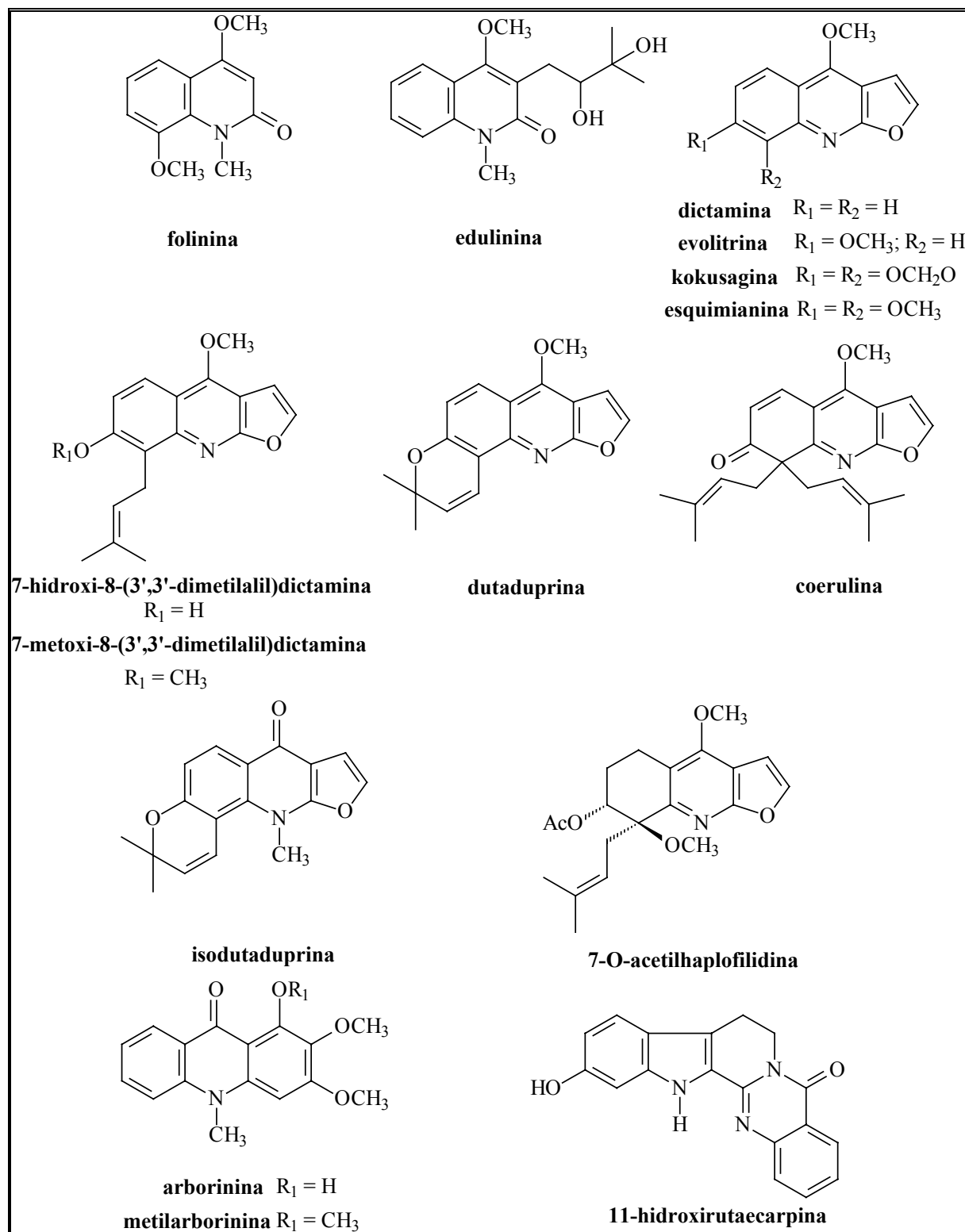
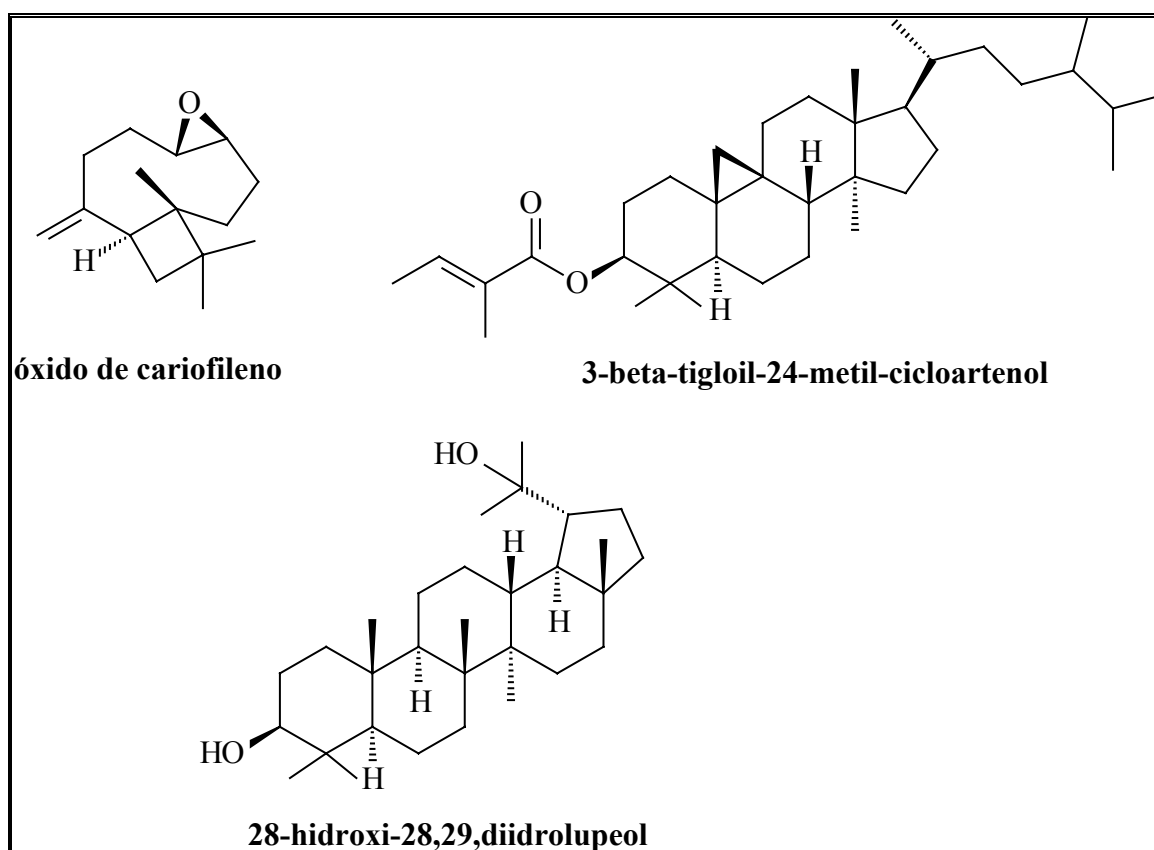


FIGURA 1.14. Substâncias isoladas de *A. coerulea* e *A. rubra* (CORTEZ, 2002; MAFEZOLI, 2001; SANTOS et al., 1998).



Continuação da FIGURA 1.14. Substâncias isoladas de *A. coerulea* e *A. rubra* (CORTEZ, 2002; MAFEZOLI, 2001; SANTOS et al., 1998).

### *C. heterophyllus*

O gênero *Conchocarpus* é constituído por 45 espécies, muitas das quais eram anteriormente classificadas em *Angostura* (KALLUNKI e PIRANI, 1998), como é o caso da espécie *C. heterophyllus*, escolhida para este trabalho, que era denominada *Angostura heterophylla*.

Nenhum trabalho fitoquímico desta espécie está relatado na literatura. Entretanto, de outras espécies do gênero foram isolados alcalóides acridônicos, 2- e 4-quinolônicos e indoloquinazolínicos, além de amidas, flavonas e diversas cumarinas (CORTEZ, 2002; MAFEZOLI, 2001; VELOSO, 1995; VIEIRA et al., 1992).

*G. carinata*

O gênero *Galipea* é composto de aproximadamente 20 espécies, encontradas principalmente na América do Sul (FOURNET et al., 1989). Vários estudos fitoquímicos desse gênero estão descritos na literatura (BAKHTIAR et al., 1990 e 1994; FOURNET et al., 1989; HOUGHTON et al., 1999; JACQUEMOND-COLLET et al., 1999; LÓPEZ et al., 1997 e 1998; RAKOTOSON et al., 1998; VIEIRA e KUBO, 1990; WIRASUTISNA et al., 1987), entretanto, a espécie *G. carinata* não foi anteriormente investigada.

#### **1.4. Família Meliaceae**

A espécie *Trichilia ramalhoi* pertence à família Meliaceae, que é formada por árvores de grande porte, fornecedoras de madeira com alto valor comercial (PENNINGTON e STYLES, 1975), e caracterizada pela presença dos limonóides (DA SILVA et al., 1984).

O gênero *Trichilia* apresenta aproximadamente 70 espécies, que ocorrem na América tropical e África. É um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família, que apresenta mais características morfológicas de Meliaceae, além de ter o maior número e tipos de limonóides dentro da subfamília Melioideae, onde está classificado (PENNINGTON e STYLES, 1975; SALLES, 1995).

Nenhum estudo sobre a espécie *Trichilia ramalhoi* estava descrito na literatura. Desta forma, a espécie foi estudada pela primeira vez.

## 2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi estudar fitoquimicamente as espécies *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus*, *Galipea carinata* (Rutaceae) e *Trichilia ramalhoi* (Meliaceae) visando obter substâncias químicas que pudessem ser utilizadas como protótipos no desenvolvimento de quimioprolifáticos ou quimioterápicos para a doença de Chagas e para as leishmanioses.

A busca de tais substâncias foi orientada por três testes biológicos: ensaio *in vitro* nas formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*; testes bioquímicos frente às enzimas gGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *T. cruzi* e APRT (adenina-fosforribosiltransferase) de *Leishmania tarentolae*.

Esse trabalho envolveria: 1) preparação dos extratos vegetais; 2) testes dos extratos nos três modelos biológicos; 3) obtenção das frações vegetais; 4) ensaios biológicos das frações; 5) isolamento das substâncias através de métodos cromatográficos; 6) identificação das estruturas químicas por diversos métodos espectroscópicos, principalmente RMN; 7) avaliação das atividades das substâncias; 8) modificações estruturais de substância(s) muito(s) ativa(s) e novos testes biológicos, para se compreender a relação estrutura-atividade.

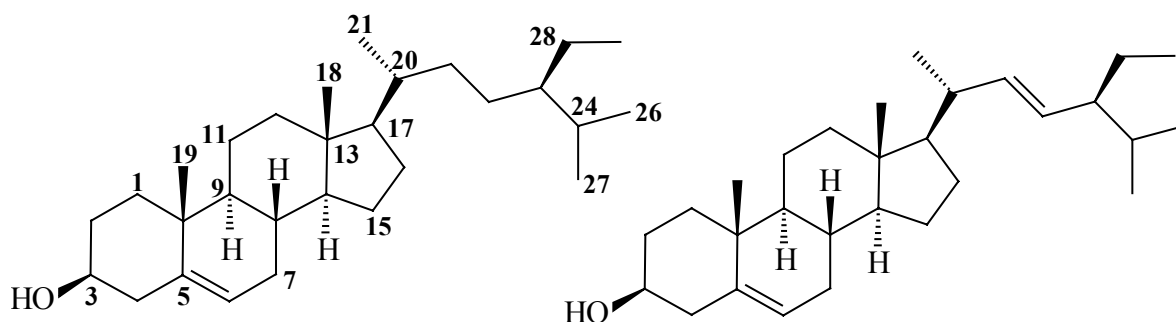
### 3. Resultados e discussões

#### 3.1. Substâncias isoladas

O estudo químico dos extratos e frações ativos de *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus* e *Trichilia ramalhoi* permitiu o isolamento de diversas classes de substâncias, num total de 30 metabólitos, dos quais 6 estão sendo citados pela primeira vez na literatura. Neste trabalho fitoquímico foram investigados os extratos e frações que apresentaram atividade em um (ou mais) dos modelos biológicos selecionados.

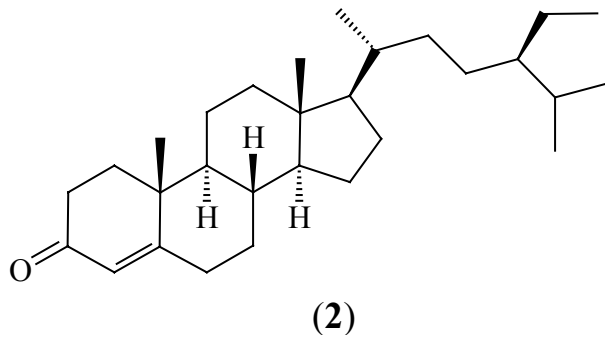
Para facilitar a descrição estrutural dos metabólitos isolados, eles foram organizados nesta seção por classe química. Entretanto, na seção *Procedimento Experimental*, a organização dos mesmos é feita segundo a espécie da qual foram isolados.

#### Esteróides

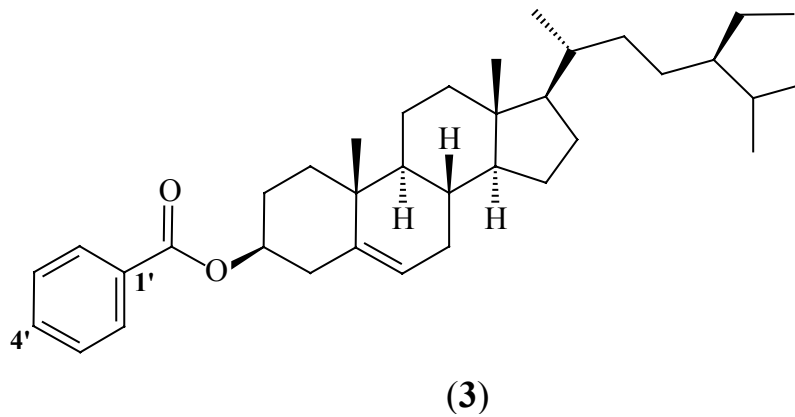


(1)

**$\beta$ -sitosterol e estigmasterol** ( $C_{29}H_{50}O$  e  $C_{29}H_{48}O$ )  
 29,5 mg  
 mistura obtida dos galhos de *T. ramalhoi*  
 isolamento: p. 225-226  
 identificação: p. 35-36  
 atividades biológicas: p. 198-200

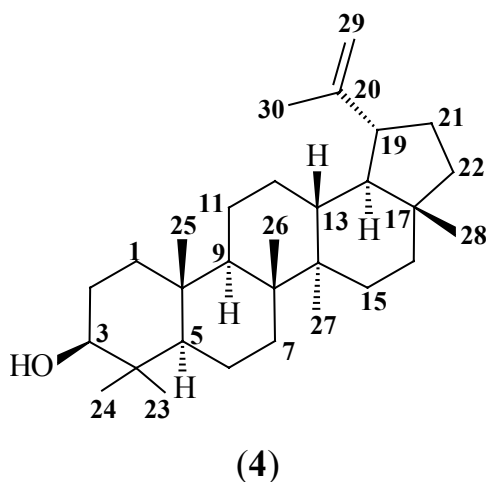


**sitostenona** (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O)  
 3,0 mg  
 isolada dos galhos de *A. coerulea*  
 isolamento: p. 208-209  
 identificação: p. 37-38  
 atividades biológicas: p. 198-200

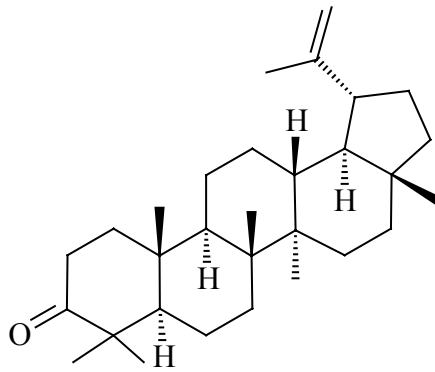


**benzoato de β-sitosterila**  
 (C<sub>36</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub>)  
 11,6 mg  
 isolado das folhas de *C. heterophyllus*  
 isolamento: p. 221  
 identificação: p. 38-45  
 atividades biológicas: p. 198-200

### Triterpenos



**lupeol** (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O)  
 95,2 mg  
 isolado dos galhos de *T. ramalhoi*  
 isolamento: p. 225-226  
 identificação: p. 46-47  
 atividades biológicas: p. 198-200



(5)

**lupenona** (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O)

45,9 mg

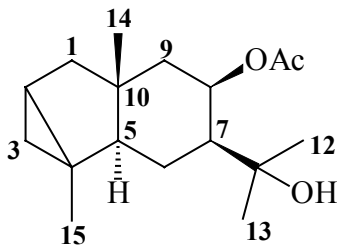
isolada dos galhos de *T. ramalhoi*

isolamento: p. 225-226

identificação: p. 48-49

atividades biológicas: não foi testada

Sesquiterpeno



(6)

**sesquiterpeno eudesmano**

(C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>), inédito

3,7 mg

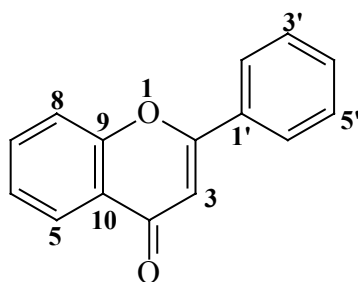
isolado dos galhos de *A. coerulea*

isolamento: p. 210-211

identificação: p. 50-62

atividades biológicas: p. 198-200

Flavonóides



(7)

**flavona** (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)

1,2653 g

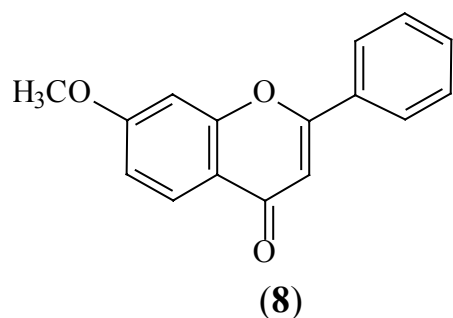
isolada das folhas de *C. heterophyllus*

isolamento: p. 223

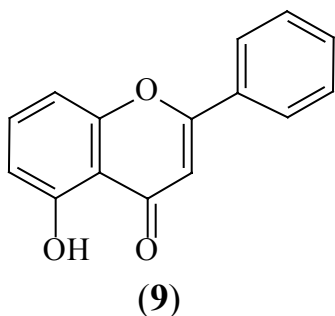
identificação: p. 63-65

atividades biológicas: p. 195-200

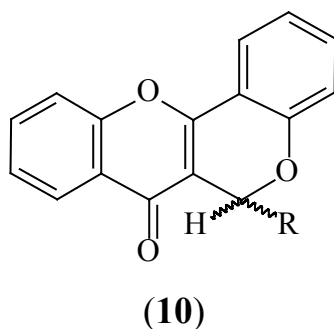




**7-metoxiflavona** (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>)  
 22,7 mg  
 isolada das folhas de *C. heterophyllus*  
 isolamento: p. 223  
 identificação: p. 66-69  
 atividades biológicas: p. 195-200

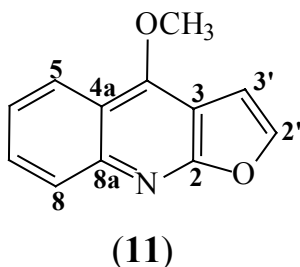


**5-hidroxiavona** (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>)  
 5,2 mg  
 isolada das folhas de *C. heterophyllus*  
 isolamento: p. 223  
 identificação: p. 69-72  
 atividades biológicas: p. 195-197

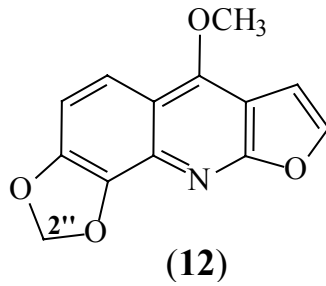


**piranoflavonas**  
 inéditas  
 2,8 mg  
 isolada das folhas de *C. heterophyllus*  
 isolamento: p. 222  
 identificação: p. 72-83  
 atividades biológicas: p. 198-200

## Alcalóides

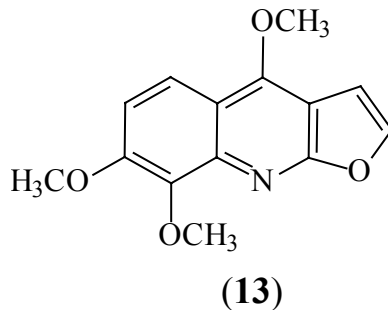


**dictamina** (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>)  
 8,9 mg  
 isolada dos galhos de *A. coerulea*  
 isolamento: p. 212-213  
 identificação: p. 86-87  
 atividades biológicas: p. 195-200



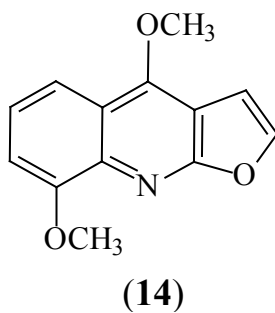
**kokusagina** (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>)

2,5 mg  
 isolada das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 217-218  
 identificação: p. 88-91  
 atividades biológicas: p. 195-200



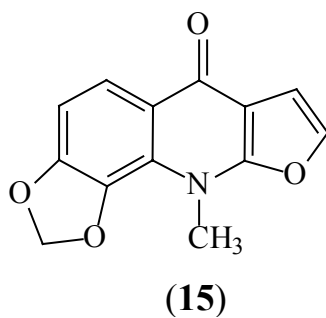
**esquimianina** (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>)

1,6 mg  
 isolada das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 217-218  
 identificação: p. 91-93  
 atividades biológicas: p. 195-200



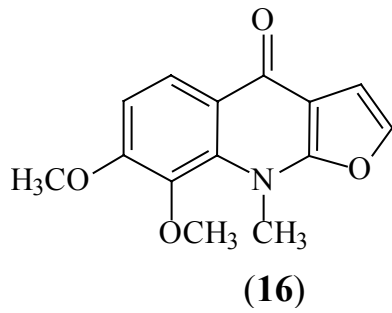
**δ-fagarina** (C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

5,0 mg  
 isolada dos galhos de *A. coerulea*  
 isolamento: p. 212-214  
 identificação: p. 93-95  
 atividades biológicas: p. 195-200

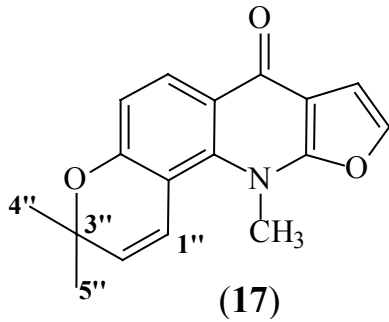


**isokokusagina** (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>)

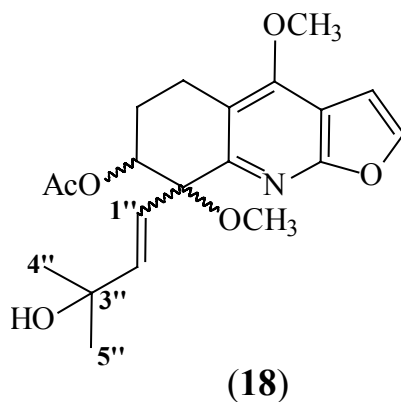
32,1 mg  
 isolada das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 216-217  
 identificação: p. 96-98  
 atividades biológicas: p. 195-197



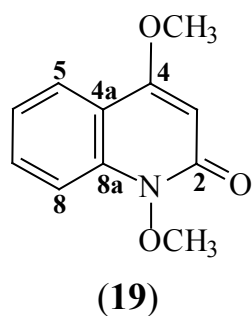
**isoquimianina** (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>)  
 28,8 mg  
 isolada das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 216-217  
 identificação: p. 99-101  
 atividades biológicas: p. 195-197



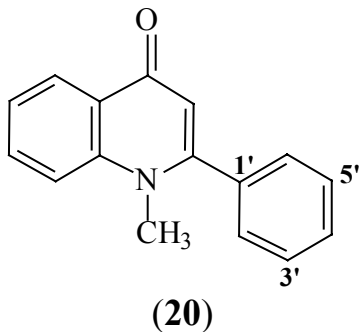
**isodutaduprina** (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>)  
 25,6 mg  
 isolada das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 216-217  
 identificação: p. 101-104  
 atividades biológicas: p. 195-197



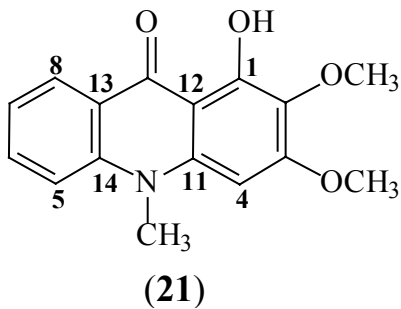
**alcalóide tetraidrofuroquinolínico**  
 (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>), inédito  
 2,6 mg  
 isolado das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 219-220  
 identificação: p. 104-112  
 atividades biológicas: p. 195-200



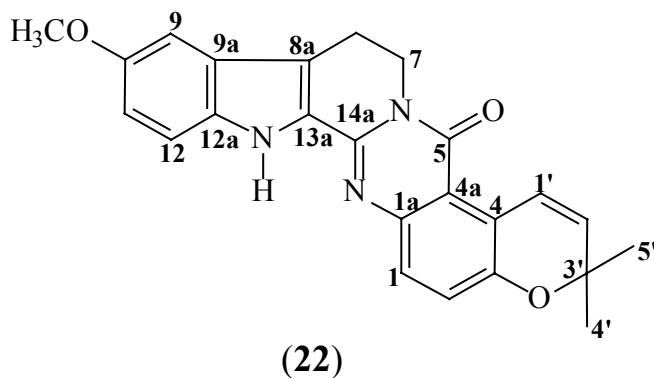
**haplotusina** (C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)  
 5,3 mg  
 isolada do caule de *C. heterophyllus*  
 isolamento: p. 224-225  
 identificação: p. 113-119  
 atividades biológicas: p. 195-200



**alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona**  
 (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO)  
 22,1 mg  
 isolado do caule de *C. heterophyllus*  
 isolamento: p. 224-225  
 identificação: p. 119-127  
 atividades biológicas: p. 195-200

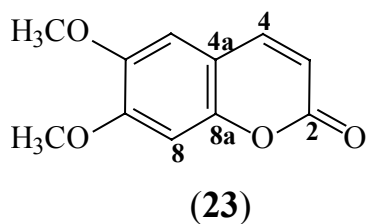


**arborinina** (C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>)  
 43,2 mg  
 isolada das folhas de *A. rubra*  
 isolamento: p. 216-217  
 identificação: p. 128-130  
 atividades biológicas: p. 195-200

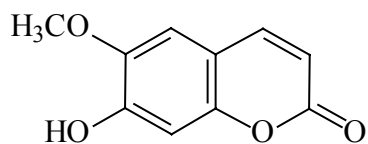


**alcalóide indolopiridoquinazolínico**  
 (C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>), inédito  
 0,4 mg  
 isolado dos galhos de *A. coerulea*  
 isolamento: p. 211-212  
 identificação: p. 130-139  
 atividades biológicas: não foi testado

## Cumarinas



**escoparona** (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>)  
 3,2 mg  
 isolada dos galhos de *A. coerulea*  
 isolamento: p. 214-215  
 identificação: p. 140-141  
 atividades biológicas: p. 195-200



(24)

**escopoletina** (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>)

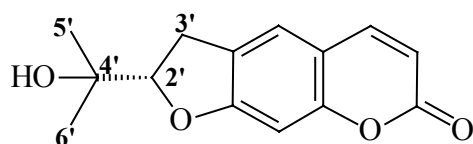
4,6 mg

isolada dos galhos de *A. coerulea*

isolamento: p. 214-216

identificação: p. 142-143

atividades biológicas: p. 195-200



(25)

**marmesina** (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)

5,2 mg

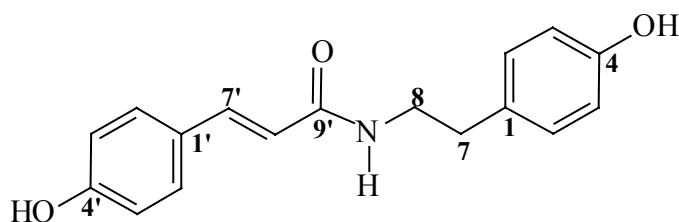
isolada dos galhos de *A. coerulea*

isolamento: p. 214-216

identificação: p. 144-149

atividades biológicas: p. 195-200

## Amidas



(26)

**paprazina** (C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>)

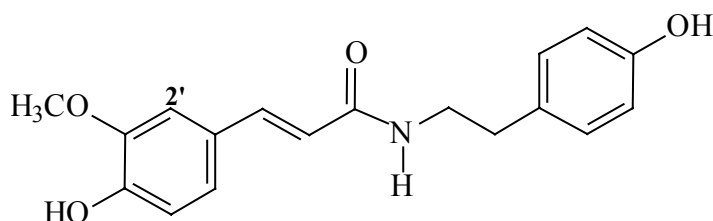
17,1 mg

isolada dos galhos de *A. coerulea*

isolamento: p. 212-213

identificação: p. 150-157

atividades biológicas: p. 195-200



(27)

***N-trans*-feruloiltiramina**

(C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>)

106,2 mg

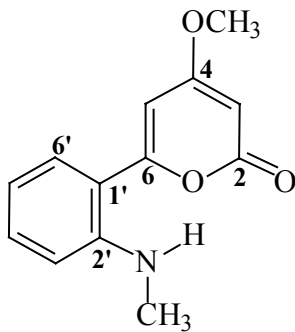
isolada dos galhos de *A. coerulea*

isolamento: p. 212-213

identificação: p. 157-166

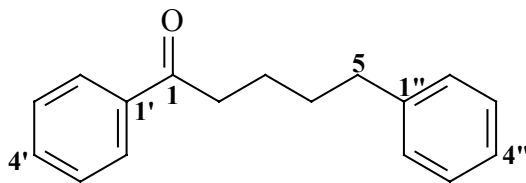
atividades biológicas: p. 195-200

Outras classes de metabólitos



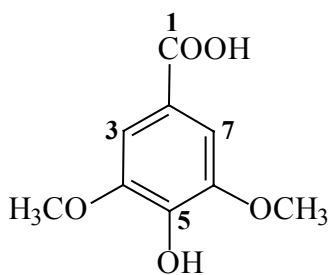
(28)

**derivado do ácido antranílico**  
(C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>), inédito  
14,7 mg  
isolado das folhas de *A. rubra*  
isolamento: p. 217-218  
identificação: p. 166-175  
atividades biológicas: p. 195-200



(29)

**1,5-difenil-1-pentanona**  
(C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O), inédita  
3,0 mg  
isolado dos galhos de *A. coerulea*  
isolamento: p. 208-209  
identificação: p. 175-182  
atividades biológicas: p. 195-200



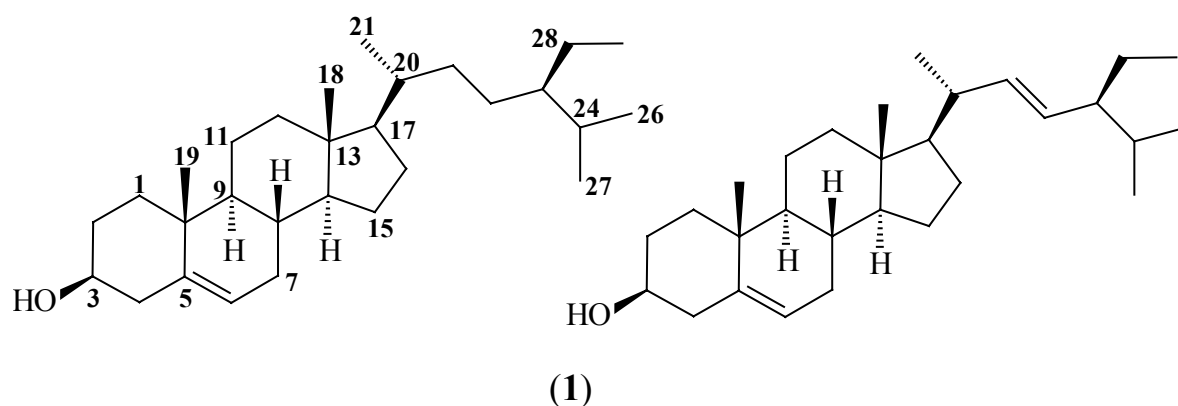
(30)

**ácido siríngico** (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)  
20,1 mg  
isolado dos galhos de *A. coerulea*  
isolamento: p. 212-213  
identificação: p. 183-184  
atividades biológicas: p. 195-200

## 3.2. Identificação dos esteróides

### 3.2.1. Identificação do $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol

A mistura dos fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (**1**), de ampla ocorrência nos vegetais, foi obtida do extrato hexânico dos galhos de *Trichilia ramalhoi* (TRGH) (p. 225-226) e caracterizada por RMN  $^1\text{H}$  e EM.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1** (FIGURA 3.1) apresentou um acúmulo de sinais relativos a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, na região de 0,60 - 2,30  $\delta$ , o que indicou a presença de esteróides na mistura **1**. O dubleto largo em 5,35  $\delta$  (H-6;  $J = 5,0$  Hz) e o multipeto centrado em 3,53  $\delta$  (H-3) caracterizaram o  $\beta$ -sitosterol na mistura. Já a presença do estigmasterol foi deduzida pelos sinais em 5,02 ( $dd$ ,  $J = 14,8$  e 8,8 Hz) e 5,14  $\delta$  ( $dd$ ,  $J = 14,8$  e 8,8 Hz), relativos aos hidrogênios vinílicos da cadeia lateral.

A identificação dos constituintes da mistura **1** foi confirmada por CG-EM. Os picos do íon molecular em  $m/z$  414 e 412 daltons nos espectros de massas (FIGURA 3.2) são compatíveis com as fórmulas moleculares do  $\beta$ -sitosterol ( $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ ) e do estigmasterol ( $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ ).

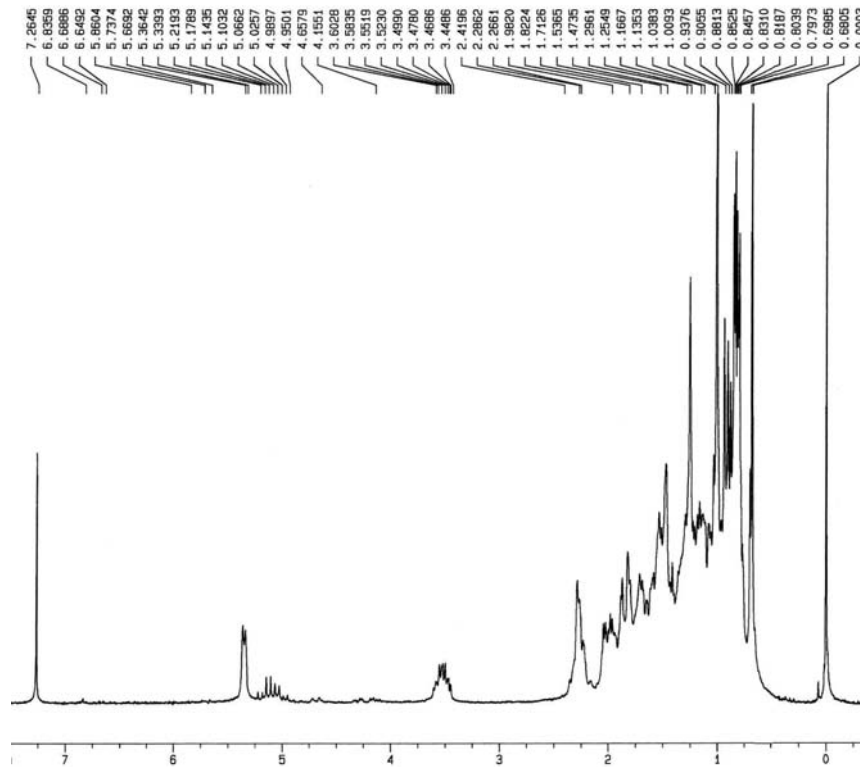


FIGURA 3.1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (1) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

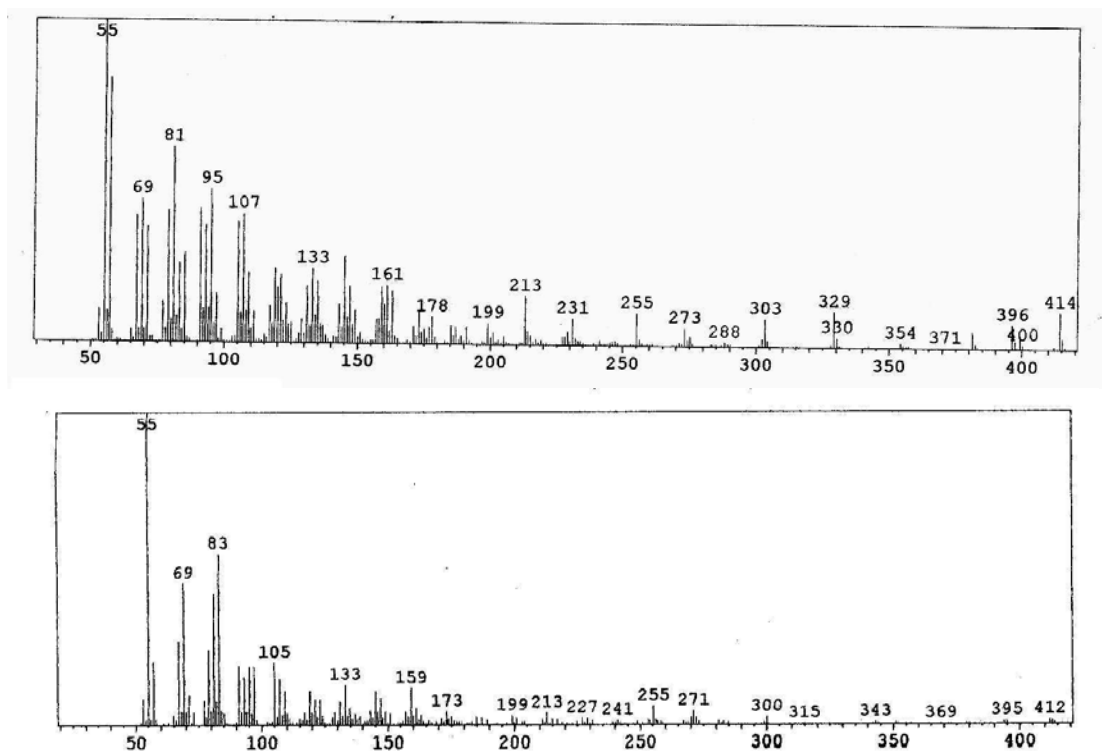
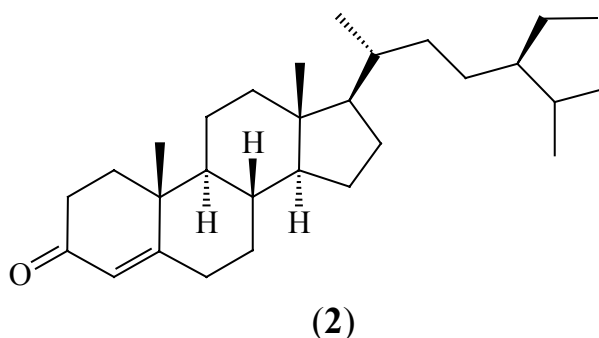


FIGURA 3.2. Espectros de massas (IE = 70 e.V.) do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.



### 3.2.2. Identificação da sitostenona

O esteróide sitostenona (**2**) foi identificado, através de RMN  $^1\text{H}$  e EM, na fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMD) (p. 208-209).



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.3) de **2** apresentou-se bastante similar ao da mistura de esteróides **1** (p. 36). O núcleo esteroidal foi definido por um conjunto de sinais na região mais protegida do espectro, em 2,4 - 0,7  $\delta$ ; um singlete em 5,72  $\delta$  foi atribuído à H-4 no esqueleto do tipo do  $\beta$ -sitosterol. Entretanto, não foi observado o multiplete em 3,53  $\delta$ , relativo a H-3, sugerindo que esta posição não seria hidrogenada e, portanto, estaria substituída por uma carbonila, caracterizando a sitostenona (**2**).

O pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  413 daltons no espectro de massas (FIGURA 3.4), compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ , confirmou a identificação do esteróide **2**. Já os picos  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  399 e 411 daltons indicaram a co-ocorrência da campestenona e da estigmastenona com a sitostenona (**2**).

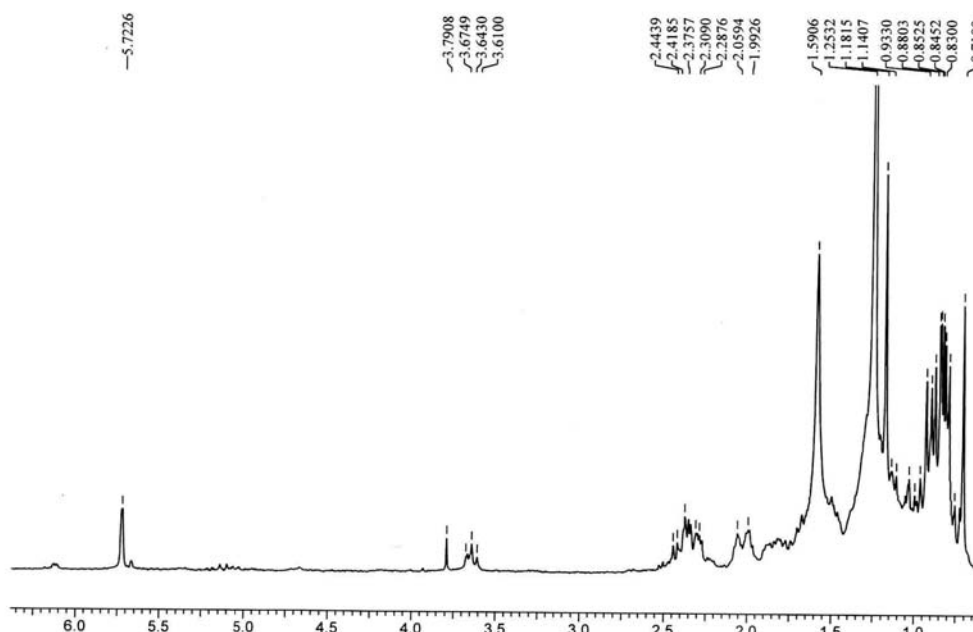


FIGURA 3.3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da sitostenona (**2**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

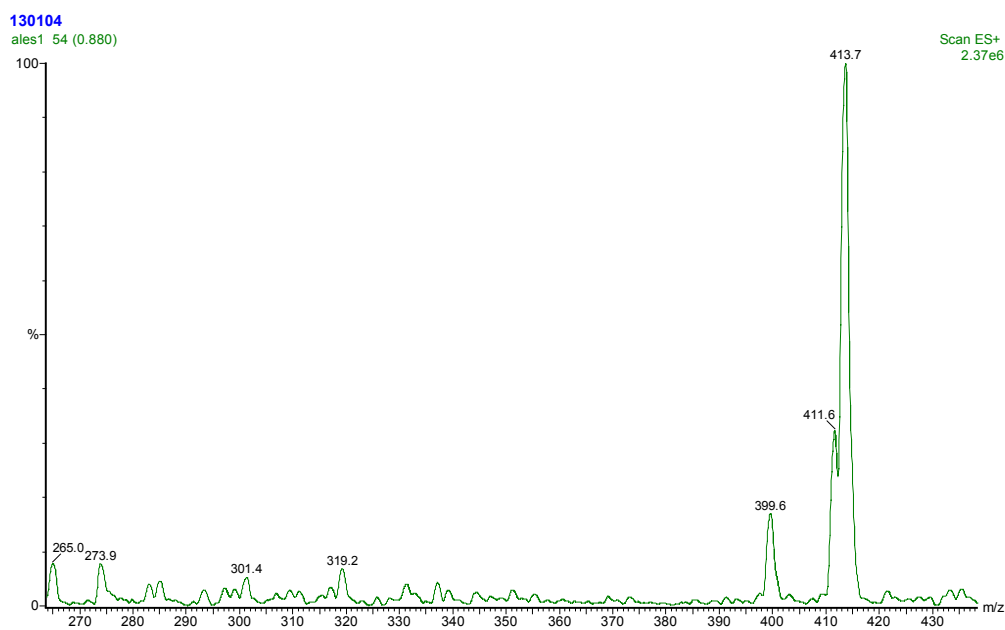
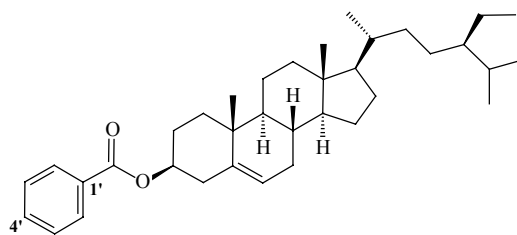


FIGURA 3.4. Espectro de massas ( $\text{ES}^+$ ) da sitostenona (**2**).

### 3.2.3. Identificação do benzoato de $\beta$ -sitosterila

O benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) foi obtido da fração diclorometânica do extrato hexânico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* (AHFHD) (p. 221) e foi caracterizado por RMN em uma e duas dimensões.

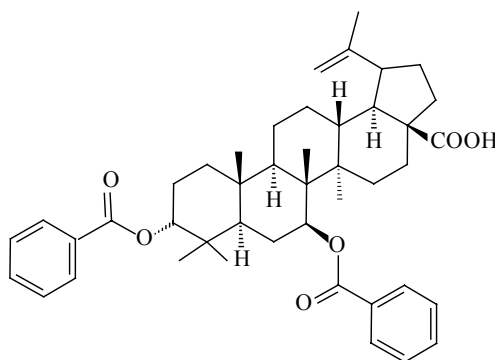


(3)

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **3** (FIGURA 3.5) foram observados os sinais em 5,42  $\delta$  (*dl*,  $J = 4,2$  Hz) e na região de 0,69 - 2,17  $\delta$ , semelhantes aos do  $\beta$ -sitosterol. Entretanto, a desblindagem de H-3 (de 3,53 para 4,83  $\delta$ ) e a presença de um conjunto de sinais na região de hidrogênios aromáticos, típicos de anel aromático monosubstituído, sugeriram a esterificação da posição 3 por um grupo benzoato.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **3** (FIGURAS 3.6 e 3.7) apresentou 36 carbonos, sendo que a região mais blindada do espectro, relativa a carbonos alifáticos, era bastante congestionada. Alguns deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  foram atribuídos por comparação com os dados do  $\beta$ -sitosterol (MAFEZOLI, 2001) e do triterpeno lupânico dibenzoilado (**A**) (RODRÍGUEZ-GAMBOA et al., 2001). Os carbonos em 165,99, 132,70, 130,78, 129,51 e 128,24  $\delta$  confirmaram a presença do grupo benzoato na molécula. Já os carbonos em 74,55, 139,63 e 122,76  $\delta$  caracterizaram C-3, C-5 e C-6 no núcleo esteroidal.

A esterificação de C-3 do  $\beta$ -sitosterol por um ácido graxo é bastante comum, o que desblinda H-3 em 1,3 ppm e C-3 em 3,0 ppm. Entretanto a esterificação por um grupo benzoato parece ser bastante rara em esteróides, sendo relativamente comum em triterpenos.



(A)

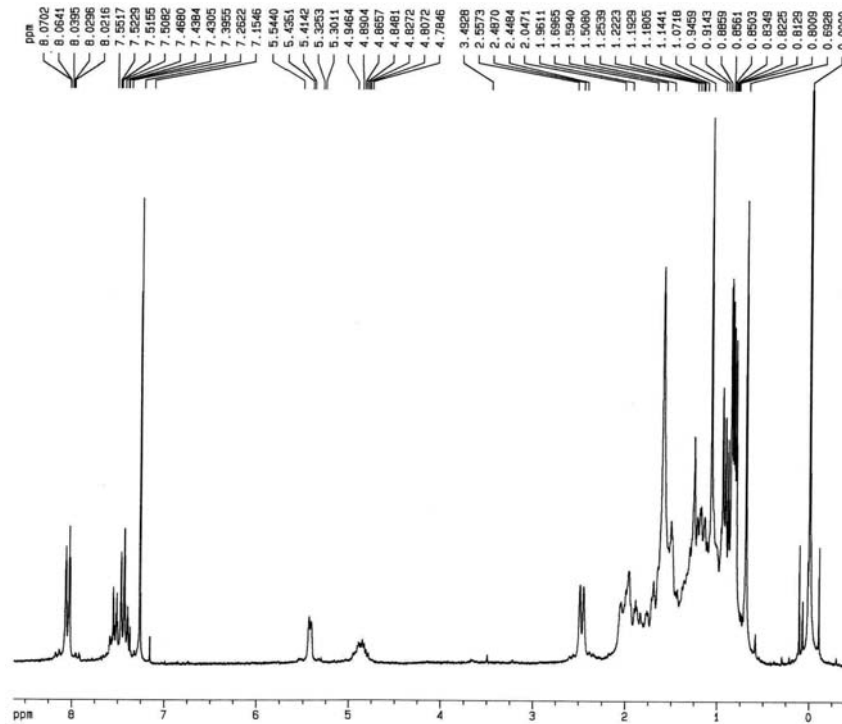


FIGURA 3.5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

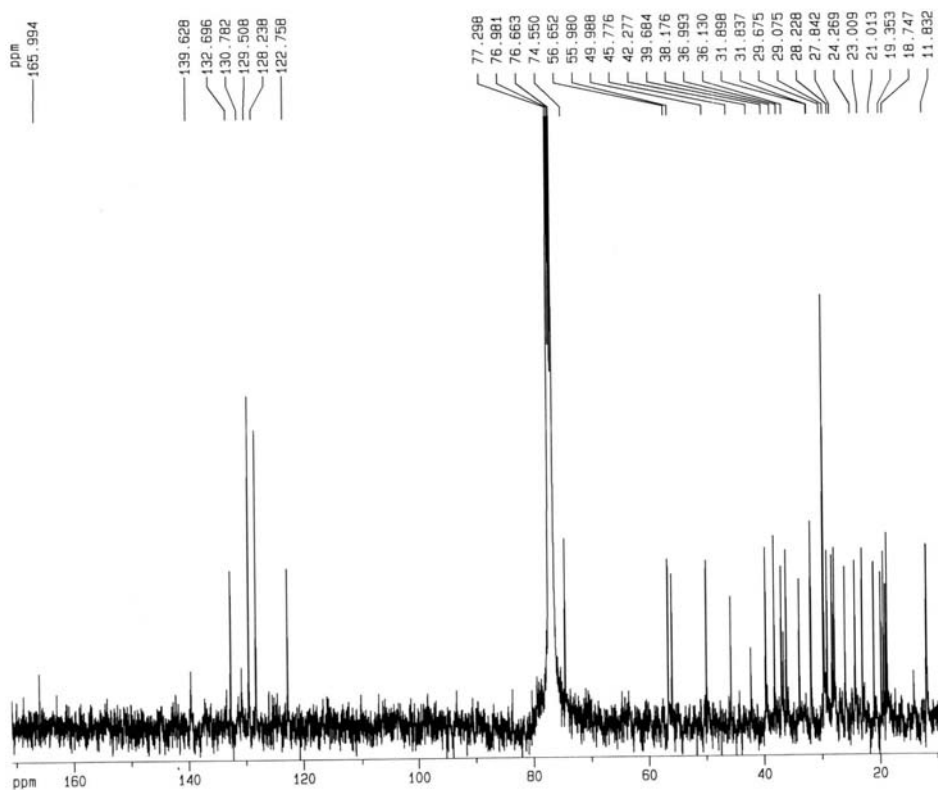


FIGURA 3.6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

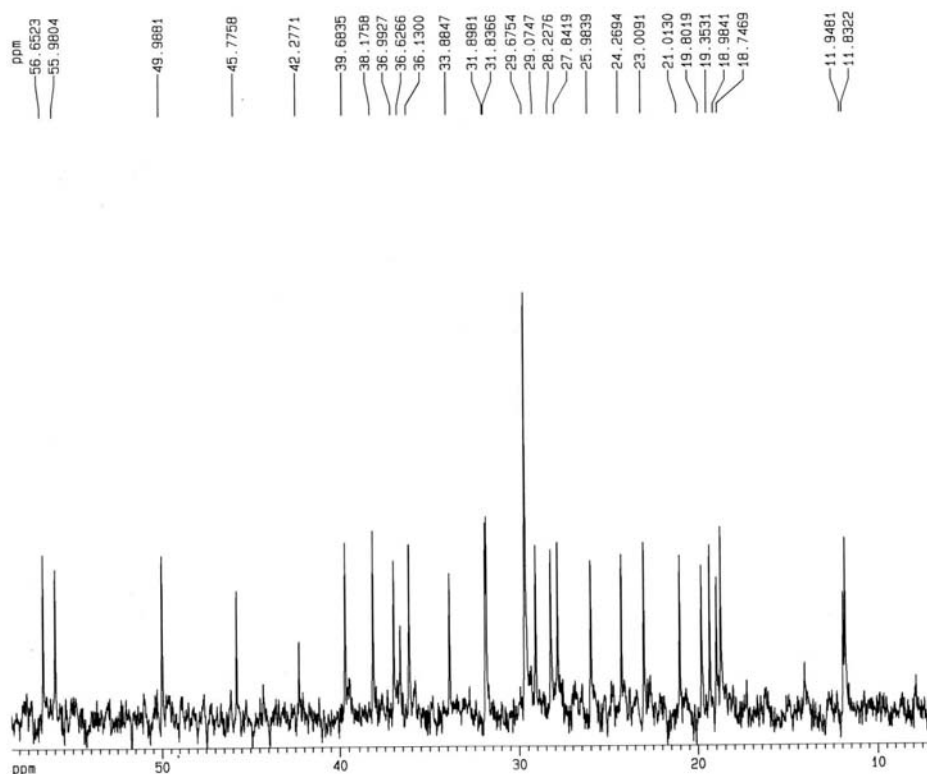


FIGURA 3.7. Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

O mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.8 e 3.9) permitiu que fossem determinadas algumas correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $^1J$ ) para a substância **3** (TABELA 3.1). Entretanto, grande parte das correlações relativas ao esqueleto esteroidal não pode ser determinada por ocorrerem muito próximas no mapa.

TABELA 3.1. Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $^1J$ ) para o benzoato de  $\beta$ -sitosterila.

$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
8,05	129,51
7,55	132,70
7,43	128,24
5,42	122,76
4,83	74,55
2,47	38,18
1,08	19,35
0,69	11,84

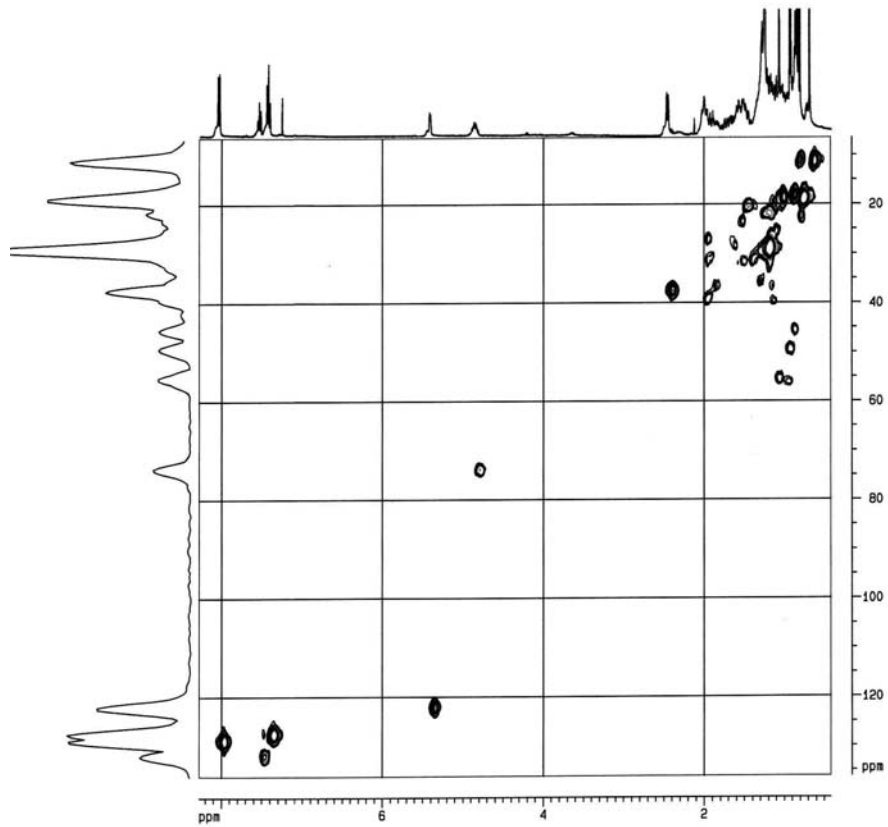


FIGURA 3.8. Mapa de contorno de HSQC do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

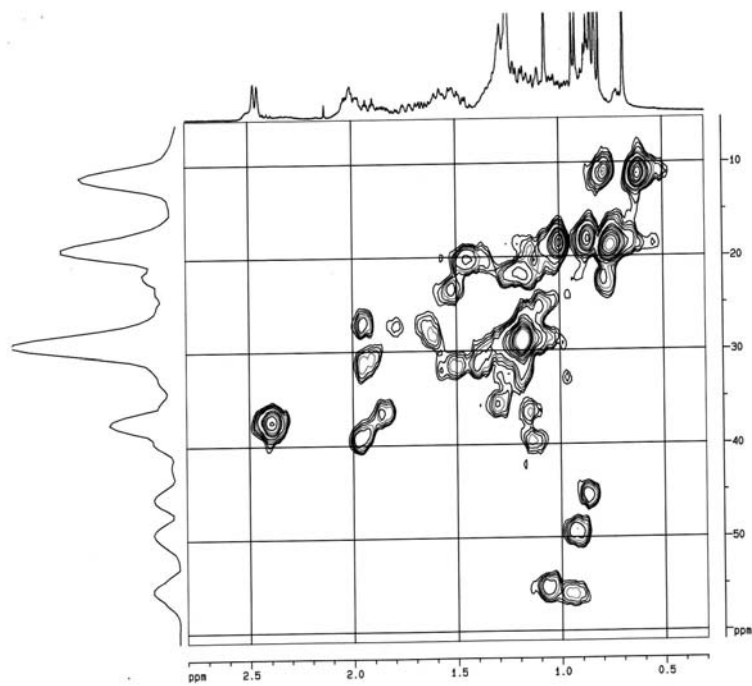
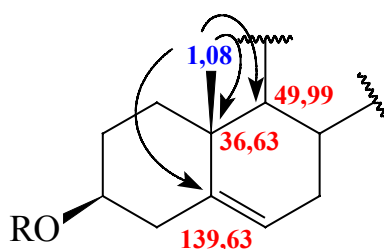


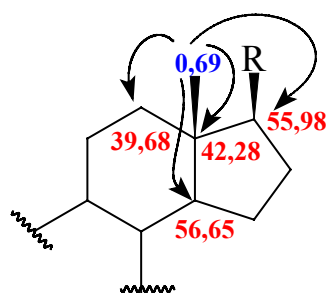
FIGURA 3.9. Ampliação do mapa de contorno de HSQC do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

No mapa de contorno de HMBC de **3** (FIGURAS 3.10 e 3.11) não se observou correlação do carbono carbonílico do benzoato, em 165,99  $\delta$ , com H-3 (4,83  $\delta$ ). A observação de correlação ( $^3J$ ) entre os átomos de hidrogênio e carbono ocorre se eles estiverem numa conformação específica. Portanto, a ausência da correlação não é indicativa de que C-3 não esteja esterificado, principalmente quando se analisam as evidências espectroscópicas anteriormente descritas.

A correlação ( $^3J$ ) entre C-5 (139,63  $\delta$ ) e os hidrogênios em 1,08  $\delta$ , definiram a metila terciária 19. Os hidrogênios desta metila também correlacionaram com o carbono quaternário em 36,63  $\delta$ , e com o carbono metínico em 49,99  $\delta$ , correspondentes a C-10 e C-9, respectivamente.



A outra metila terciária (em 0,69  $\delta$ ) correlacionou com dois carbonos metínicos em 56,65 e 55,98  $\delta$ , com um carbono quaternário em 42,28  $\delta$ , e com um carbono metilênico em 39,68  $\delta$ , relativos a C-14, C-17, C-13 e C-12, respectivamente. Vale ressaltar que os carbonos metínicos foram atribuídos por comparação com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do  $\beta$ -sitosterol (MAFEZOLI, 2001).



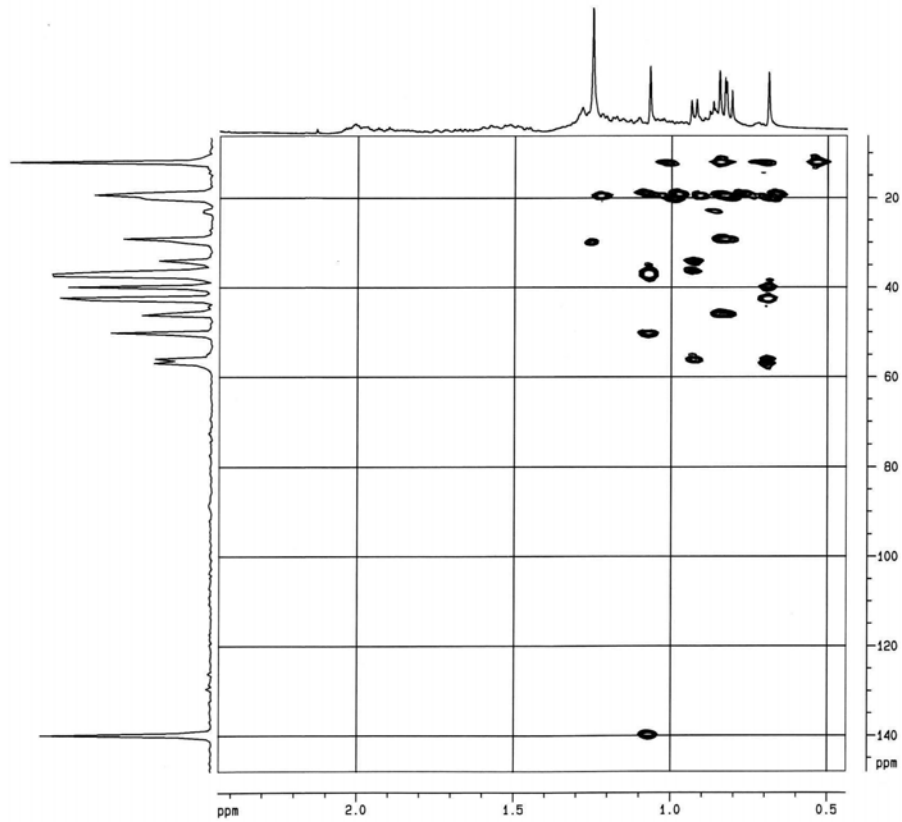


FIGURA 3.10. Mapa de contorno de HMBC do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

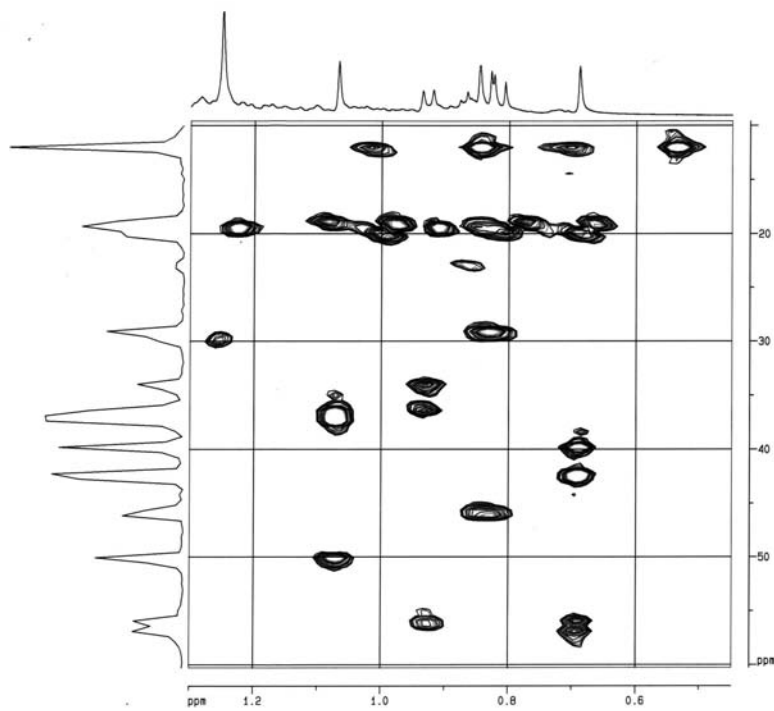


FIGURA 3.11. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



Desta forma, a substância **3** foi identificada como benzoato de  $\beta$ -sitosterila, e seus dados de RMN  $^1\text{H}$  são comparados na TABELA 3.2 com os do benzoato de  $\alpha$ -estigmasterol semi-sintético (BARRERO et al., 1993).

TABELA 3.2. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do benzoato de  $\beta$ -sitosterila.

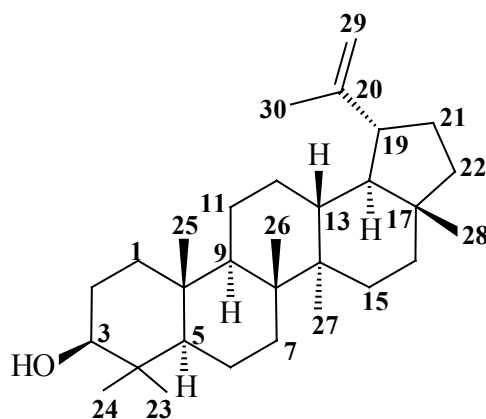
H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\#}$
3	4,83 <i>m</i>	5,30 <i>m</i>	74,55	71,8
5			139,63	140,8
6	5,42 <i>dl</i> ( $J = 4,4$ , Hz)	n.d.	122,76	121,7
9			49,99	50,2
10			36,63	36,5
12			39,68	39,7
13			42,28	42,3
14			56,65	56,9
17			55,98	56,0
18	0,69 <i>s</i>	0,70 <i>s</i>	11,84	12,2
19	1,08 <i>s</i>	0,87 <i>s</i>	19,35	19,4
1'			130,78	131,0
2' e 6'	8,05 <i>m</i>	7,50 <i>m</i>	129,51	129,6
3' e 5'	7,43 <i>m</i>	8,07 <i>m</i>	128,24	128,4
4'	7,55 <i>m</i>	7,50 <i>m</i>	132,70	132,8
C=O			165,99	165,8

\* $\delta_{\text{H}}$  do benzoato de  $\alpha$ -estigmasterol ( $\text{CDCl}_3$ , 80 MHz) (BARRERO et al., 1993);  $\delta_{\text{C}}^{\#}$  do  $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) (MAFEZOLI, 2001) e do grupo benzoato do triterpeno (A) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) (RODRÍGUEZ-GAMBOA et al., 2001).

### 3.3. Identificação dos triterpenos

#### 3.3.1. Identificação do lupeol

O triterpeno lupeol (**4**) foi isolado do extrato hexânico dos galhos de *Trichilia ramalhoi* (p. 225-226) e caracterizado através de RMN  $^1\text{H}$  e EM.



(4)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4** (FIGURA 3.12) apresentou um grande número de sinais em 0,76 - 1,91  $\delta$ , sendo que nessa região foram observados claramente seis singletos de metilas terciárias (em 0,76, 0,79, 0,83, 0,95, 0,97 e 1,03  $\delta$ ) e um singletto relativo à metila ligada a carbono insaturado (em 1,68  $\delta$ ). Estes dados espectroscópicos sugeriram a natureza de **4** como um triterpeno, cuja classe foi definida através dos sinais referentes aos hidrogênios olefinicos em 4,57  $\delta$  (*dd*,  $J = 2,3$  e 1,3 Hz) e 4,69  $\delta$  (*d*,  $J = 2,3$  Hz), que são característicos dos triterpenos com esqueleto lupânico. Já o sinal de hidrogênio carbinólico em 3,19  $\delta$  (*dd*,  $J = 10,8$  e 5,0 Hz), definiu a substituição de C-3 por um grupo hidroxila, que foi disposto em  $\beta$  devido a magnitude das constantes de acoplamento do hidrogênio carbinólico H-3. Desta forma, os dados de RMN  $^1\text{H}$  sugeriram a identidade da substância **4** como o triterpeno lupeol, cuja confirmação estrutural foi realizada pelo espectro de massas (FIGURA 3.13),

através do pico do íon molecular em  $m/z$  426 daltons, compatível com a fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ .

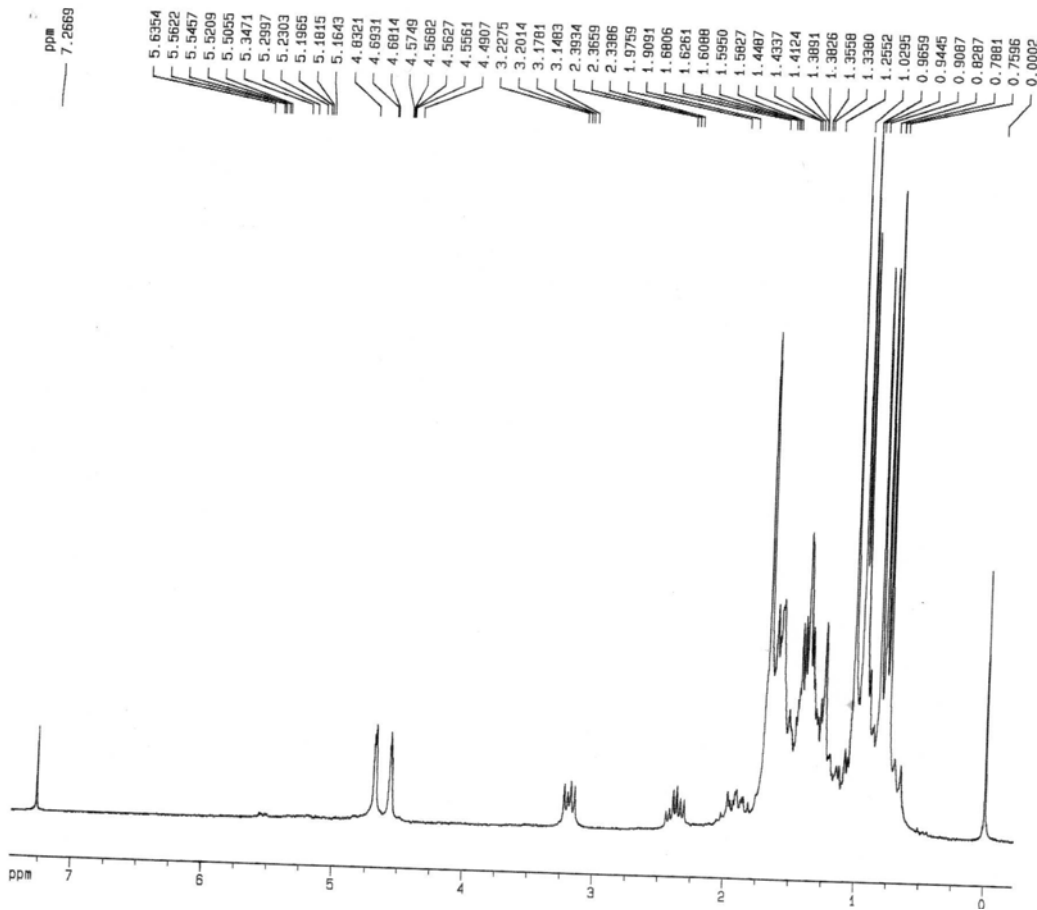


FIGURA 3.12. Espectro de RMN  $^1H$  do lupeol (4) ( $CDCl_3$ , 200 MHz).

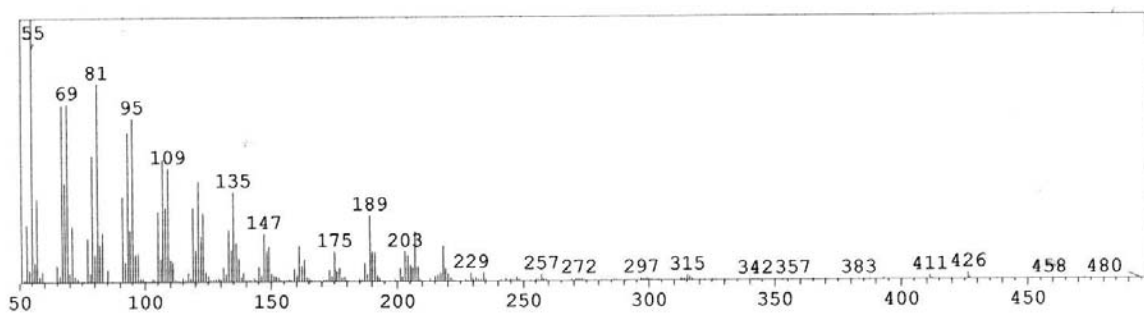
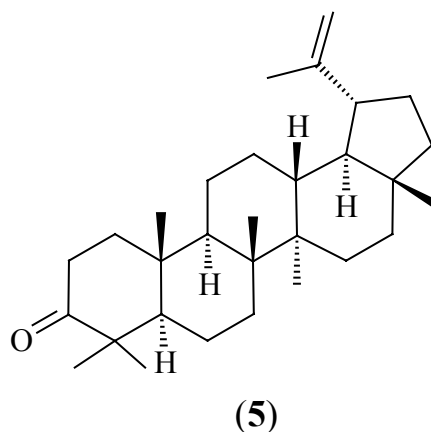


FIGURA 3.13. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do lupeol (4).

### 3.3.2. Identificação da lupenona

O triterpeno lupenona (**5**) foi isolado do extrato hexânico dos galhos de *Trichilia ramalhoi* (p. 225-226) e caracterizado através de RMN  $^1\text{H}$  e EM.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **5** (FIGURA 3.14) apresentou sinais bastante similares aos do lupeol (**4**): seis metilas terciárias em 0,80, 0,93, 0,95, 1,03, 1,07 e 1,07  $\delta$ ; uma metila sobre carbono  $sp^2$  em 1,68  $\delta$ ; e, os sinais característicos de triterpenos lupânicos em 4,57 (*dd*,  $J = 2,4$  e 1,0 Hz) e 4,69  $\delta$  (*d*,  $J = 2,4$  Hz). Entretanto, no espectro de **5** não se observou o sinal relativo ao hidrogênio carbinólico H-3 em 3,19  $\delta$ , sugerindo que C-3 era um carbono carbonílico e que, portanto, o triterpeno **5** fosse a lupenona. Isto foi confirmado pelo espectro de massas de **5** (FIGURA 3.15) através do pico do íon molecular em  $m/z$  424 daltons, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$  da lupenona.

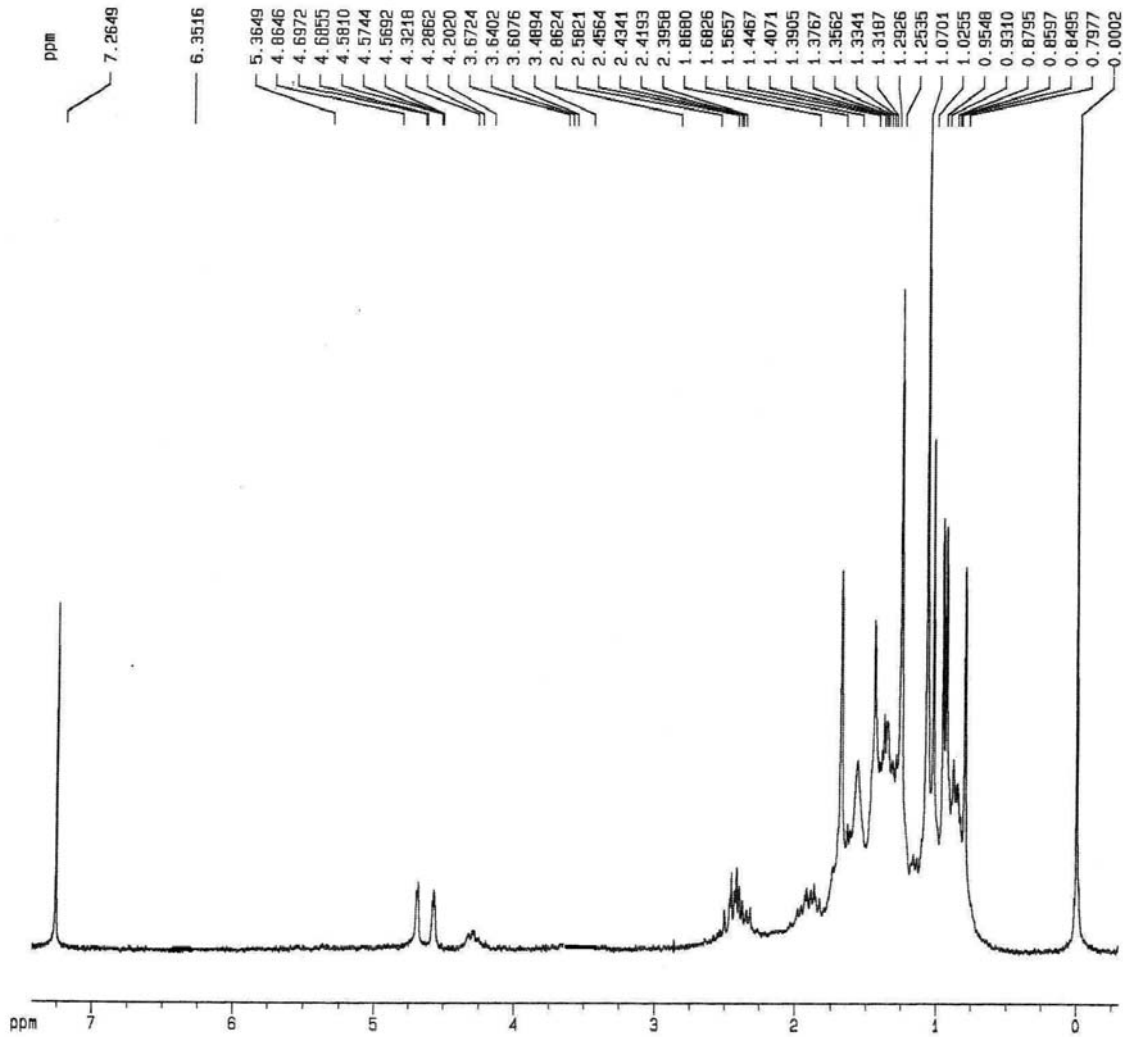


FIGURA 3.14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lupenona (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

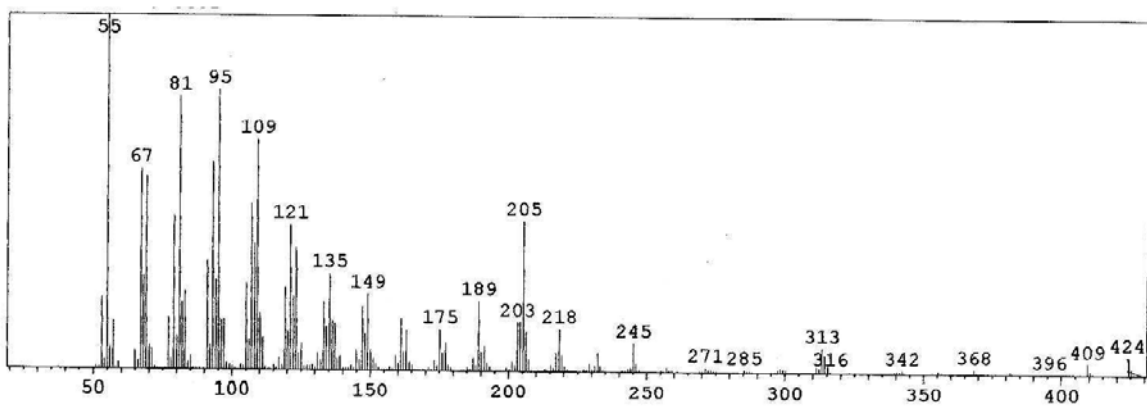
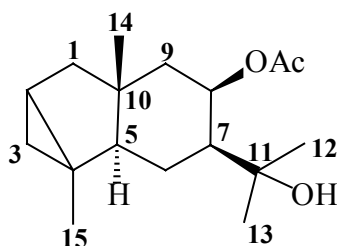


FIGURA 3.15. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da lupenona (**5**).

### 3.4. Identificação do sesquiterpeno

O sesquiterpeno eudesmano **6** foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 210-211) e identificado por EM e RMN em uma e duas dimensões.



(6)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.16 – 3.17) da substância **6** apresentou grande acúmulo de sinais em sua região mais blindada, especificamente entre 2,07 e 0,38  $\delta$ . Apenas um sinal, em 5,26  $\delta$ , foi observado na região mais desblindada, o qual referia-se a um hidrogênio acetilcarbinólico.

Destacou-se neste espectro de RMN  $^1\text{H}$  um sinal bastante blindado em 0,38  $\delta$  (1H), indicativo da presença de um anel ciclopropânico na molécula. Além disso, observaram-se claramente dois singletos (3H cada) em 1,15 e 1,07  $\delta$ , de metilas terciárias sobre carbono saturado, e um singlete (6H) em 1,24  $\delta$ , relativo à metila sobre carbono oxigenado. Já o sinal em 2,07  $\delta$  (s, 3H) indicou a presença de um substituinte acetato na molécula.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 3.18 – 3.19) foram observados 17 carbonos, sendo dois deles (169,91 e 21,69  $\delta$ ) referentes ao grupo acetato. Desta forma, a análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sugeriu a natureza do composto **6** como um sesquiterpeno.

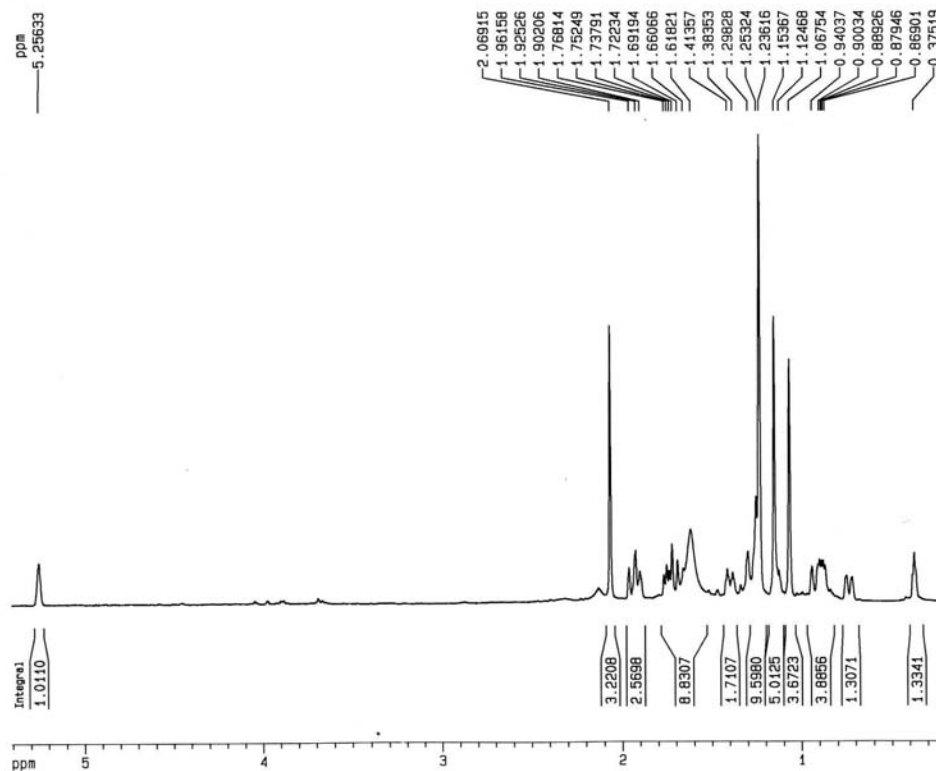


FIGURA 3.16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

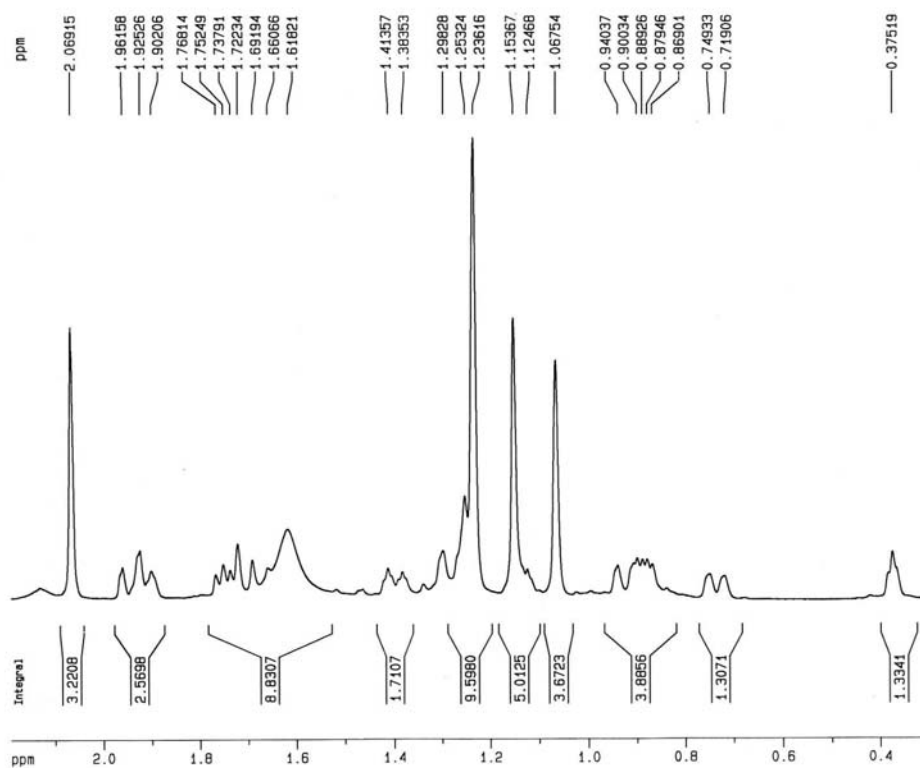


FIGURA 3.17. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

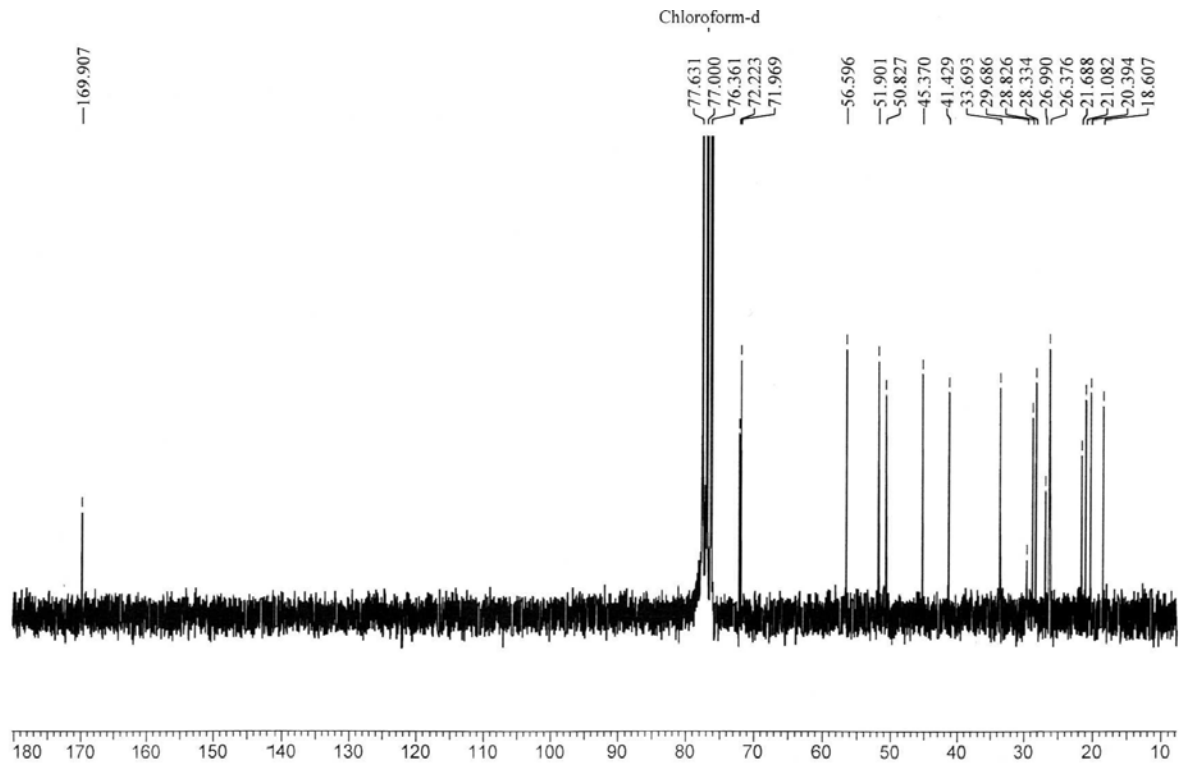


FIGURA 3.18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

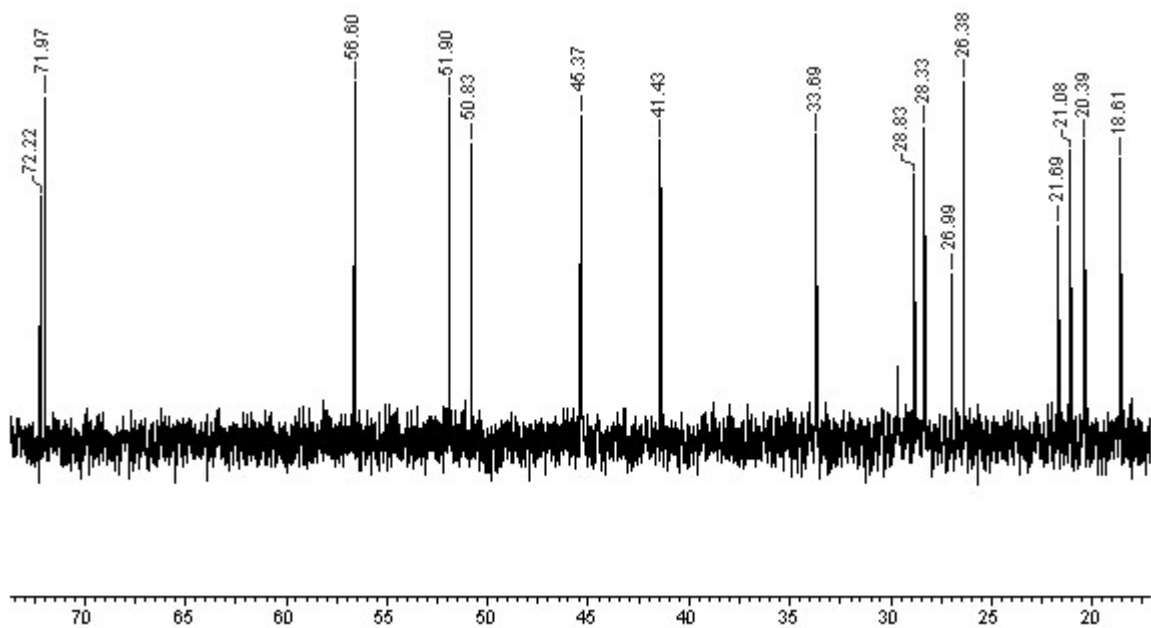


FIGURA 3.19. Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).



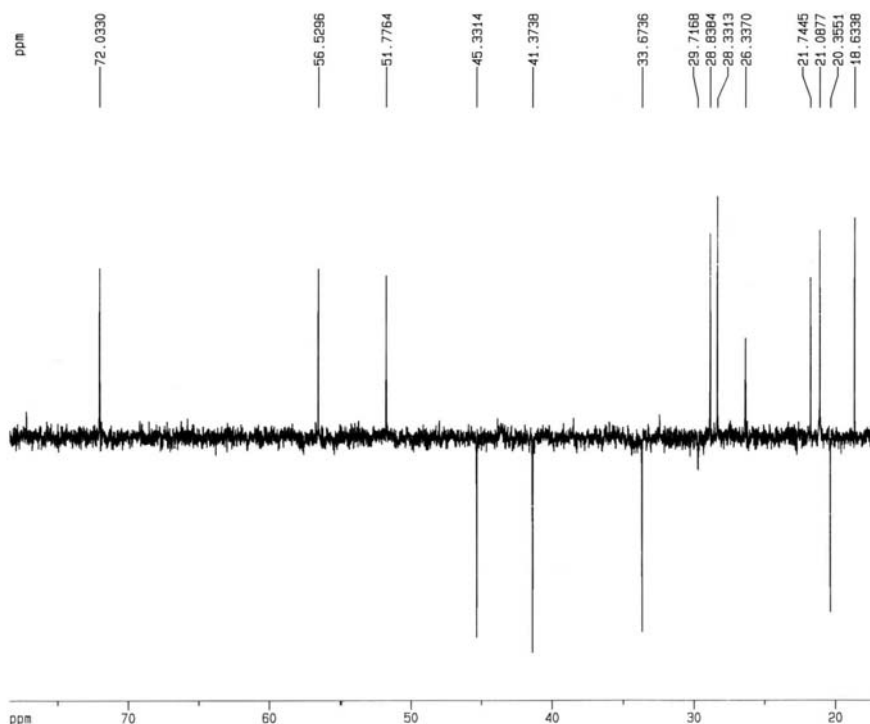


FIGURA 3.20. Espectro de DEPT 135° do sesquiterpeno **6** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).

Através dos espectros de RMN <sup>13</sup>C (FIGURAS 3.18 – 3.19) e DEPT 135° (FIGURA 3.20) foram definidos na molécula 4 carbonos quaternários (169,91, 72,22, 50,83 e 26,99 δ), 4 CH (71,97, 56,60, 51,90 e 26,38 δ), 4 CH<sub>2</sub> (45,37, 41,43, 33,69 e 20,39 δ) e 5 CH<sub>3</sub> (28,83, 28,33, 21,69, 21,08 e 18,61 δ).

A fórmula molecular do sesquiterpeno **6** foi deduzida a partir dos espectros de RMN (BROCHINI et al., 1999). No espectro de RMN <sup>13</sup>C foram observados dois carbonos carbinólicos (em 72,22 e 71,97 δ), um ligado ao grupo acetato e o outro, que pelo espectro de RMN <sup>1</sup>H, só poderia estar ligado a uma hidroxila. Isto sugeriu que a molécula possuía três oxigênios e um hidrogênio (OH) a mais do que indicavam os tipos de carbonos (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e CH) no espectro de RMN <sup>13</sup>C. Desta maneira, foi determinada a fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> para o sesquiterpeno **6**, que indicou um grau de deficiência de hidrogênio igual a 4, evidenciando que ele era tricíclico, já que possuía uma insaturação relativa ao grupo acetato.

O espectro de EM (FIGURA 3.21) de **6** apresentou um pico em  $m/z$  202 daltons, diferente do esperado (280 daltons). Como o espectro foi obtido por impacto eletrônico (a 70 e.V.), a molécula poderia perder facilmente  $H_2O$  e  $CH_3COOH$ , originando o pico 202. O pico base em  $m/z$  59 daltons indicou a presença de um grupo hidroxiisopropílico na molécula, que é bastante comum em sesquiterpenos (BROCHINI et al., 1999).

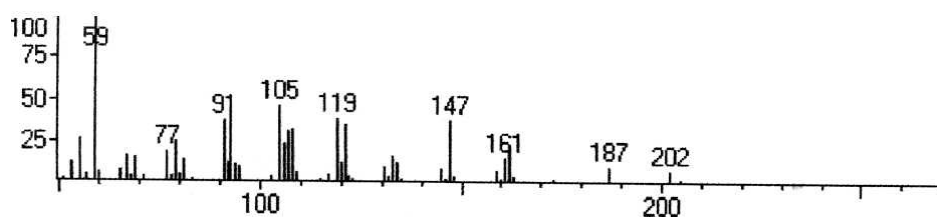


FIGURA 3.21. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do sesquiterpeno **6**.

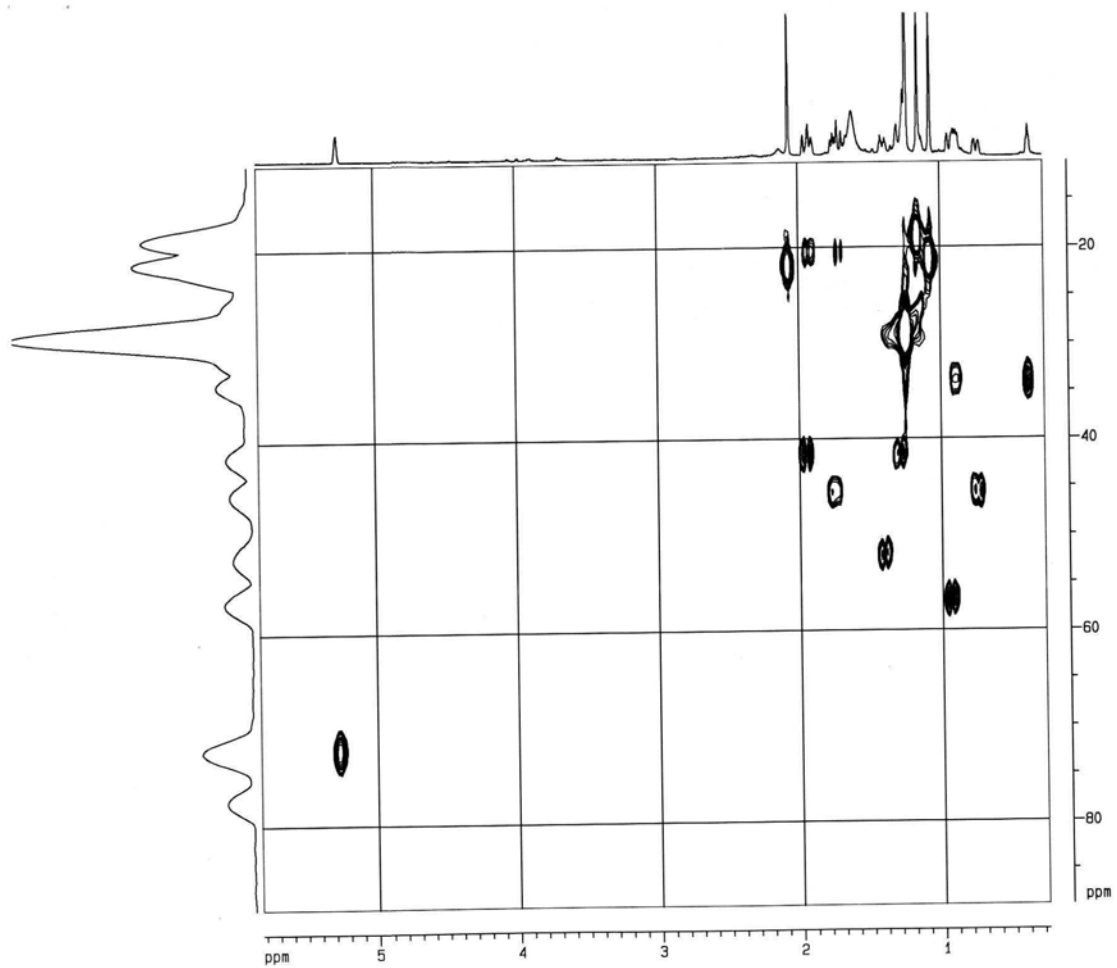
Portanto, os dados espectroscópicos analisados sugeriram a natureza do composto **6** como um sesquiterpeno tricíclico (sendo um dos ciclos o ciclopropano) com substituintes acetato e um grupo hidroxiisopropila.

Uma pesquisa sobre os tipos estruturais de sesquiterpenos com essas características indicou que **6** deveria ser da classe dos eudesmanos, que é a única na qual é possível a correlação ( $^3J$ ) de duas metilas terciárias com um mesmo carbono metínico, como será descrito adiante na discussão do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.26 – 3.27).

No mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.22 – 3.23) foram determinadas as correlações C-H a  $^1J$  para o sesquiterpeno **6**, como mostra a TABELA 3.3.

TABELA 3.3. Correlações a  $^1J$  para o sesquiterpeno **6**.

$\delta_H$	$\delta_C$
5,26	71,97
2,07	21,69
1,94 e 1,28	41,43
1,91 e 1,71	20,39
1,75 e 0,73	45,37
1,40	51,90
1,25	26,38
1,24	28,83 e 28,33
1,15	18,61
1,07	21,08
0,92	56,60
0,88 e 038	33,69

FIGURA 3.22. Mapa de contorno de HSQC do sesquiterpeno **6** ( $CDCl_3$ , 400 MHz).

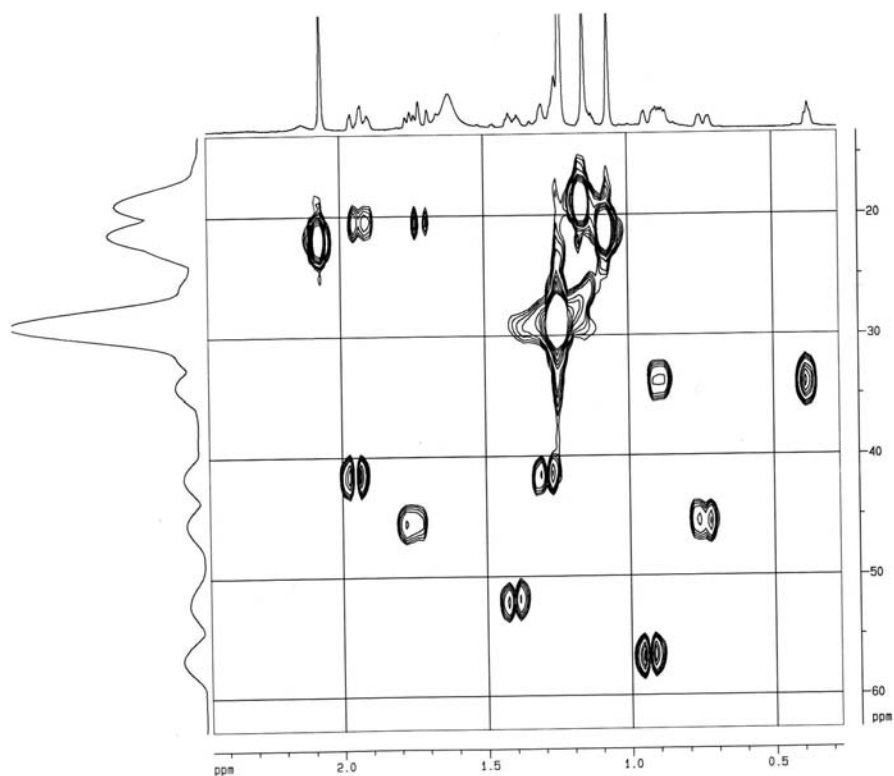
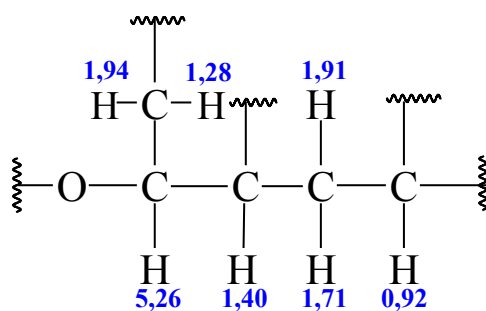


FIGURA 3.23. Ampliação do mapa de contorno de HSQC do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.24 – 3.25) foram observados os acoplamentos geminais entre os hidrogênios em 0,38 e 0,88  $\delta$ , 0,73 e 1,75  $\delta$ , 1,28 e 1,94  $\delta$ , 1,71 e 1,91  $\delta$ . Neste espectro verificou-se também o acoplamento entre os hidrogênios em 0,92 e 1,71  $\delta$  e, deste último com o hidrogênio em 1,40  $\delta$ . Além disso, o hidrogênio em 5,26  $\delta$  acoplou com os hidrogênios em 1,28 e 1,40  $\delta$ . Desta forma, o sesquiterpeno **6** tem em seu esqueleto a “sequência” ilustrada abaixo.



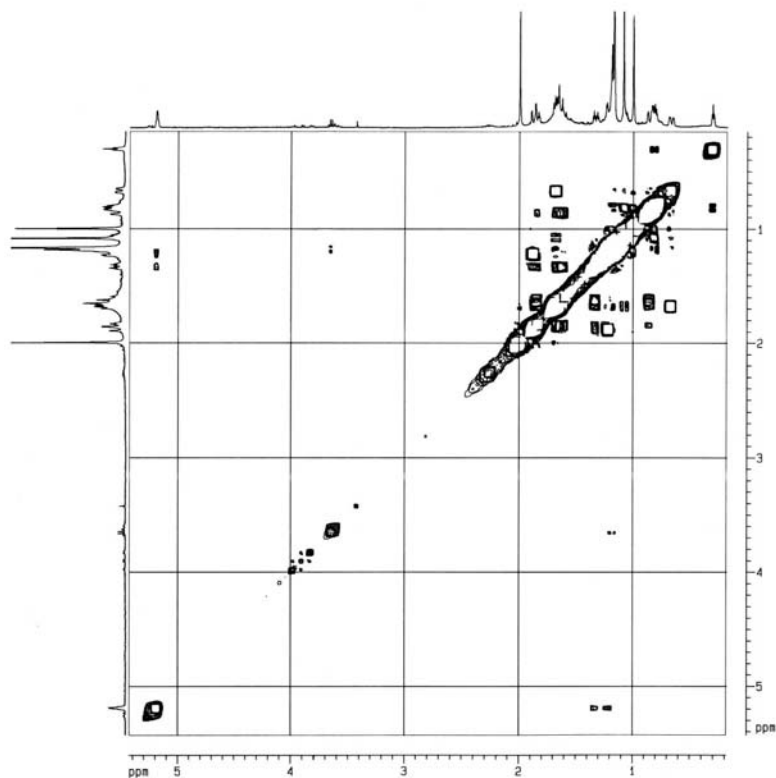


FIGURA 3.24. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

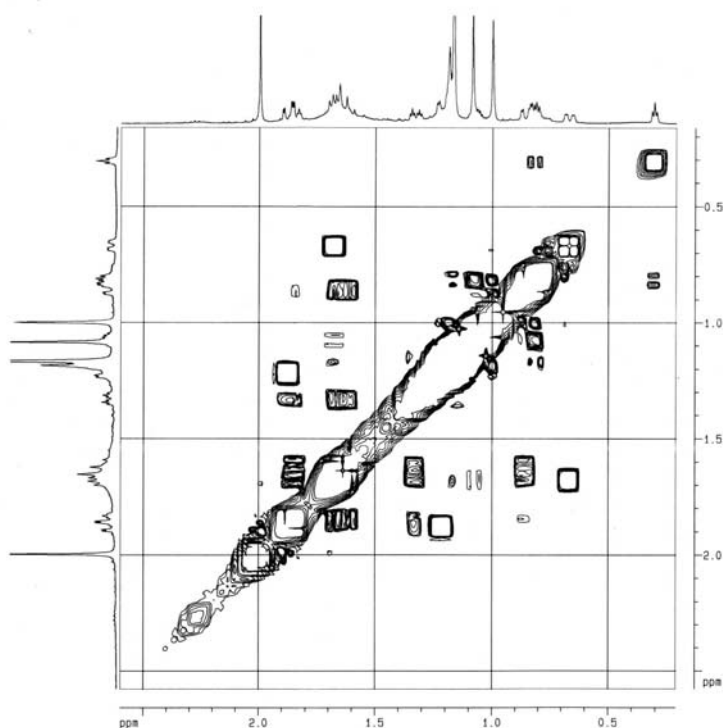
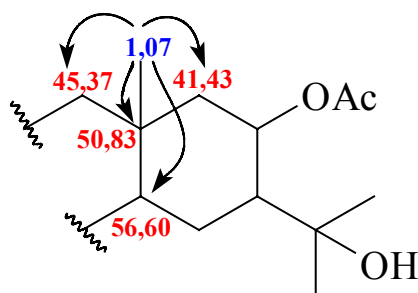


FIGURA 3.25. Ampliação do espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

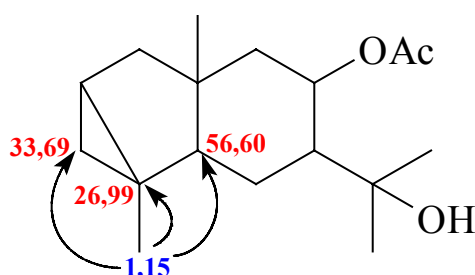
No mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.26 – 3.27) do sesquiterpeno **6**, observou-se a correlação das duas metilas terciárias (em 1,15 e 1,07  $\delta$ ) com um mesmo carbono metínico em 56,60  $\delta$ , que foi atribuído a C-5. Essa característica foi essencial para que se definisse a classe do sesquiterpeno **6** como eudesmano.

Para as atribuições dos deslocamentos químicos do sesquiterpeno **6** foram analisadas principalmente as informações obtidas no espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.24 – 3.25) e no mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.26 – 3.27).

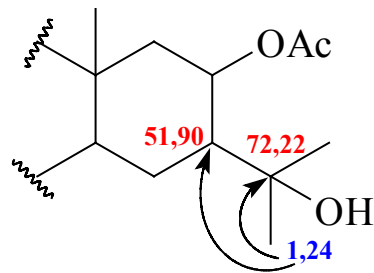
A metila terciária em 1,07  $\delta$  foi definida na posição 14 através das correlações com os carbonos em 41,43 (C-9), 45,37 (C-1), 50,83 (C-10) e 56,60  $\delta$ (C-5).



A outra metila terciária sobre carbono saturado (em 1,15  $\delta$ ) foi atribuída à posição 15 por correlacionar com os carbonos em 26,99 (C-3), 33,69 (C-2) e 56,60  $\delta$ (C-5).



As duas metilas mais desprotegidas, em 1,24  $\delta$ , apresentaram correlação com os carbonos em 51,90 e 72,22  $\delta$ , confirmando, portanto, a presença do grupo hidroxiisopropílico.



H-9 (1,94  $\delta$ ) correlacionou com o carbono acetilcarbinólico (71,97  $\delta$ ), indicando que o grupo acetato deveria substituir C-8. As atribuições de C-5 a C-8 foram realizadas através das informações obtidas pelo COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , no qual pode-se vislumbrar a “seqüência” ilustrada anteriormente.

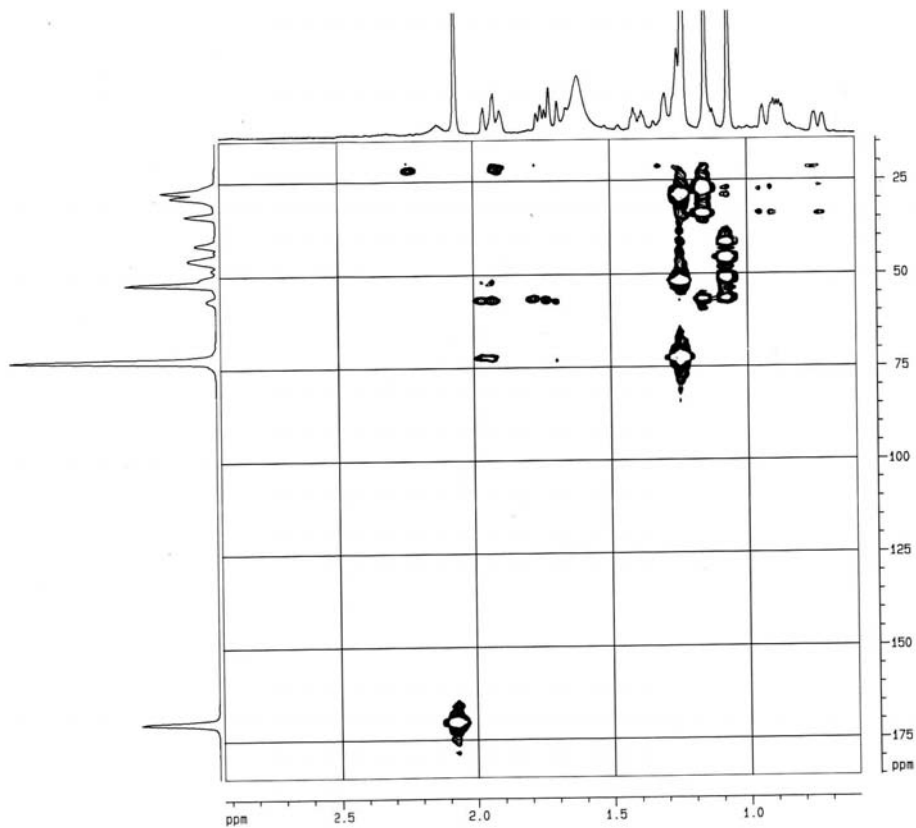
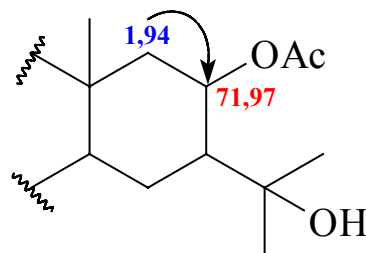


FIGURA 3.26. Mapa de contorno de HMBC do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

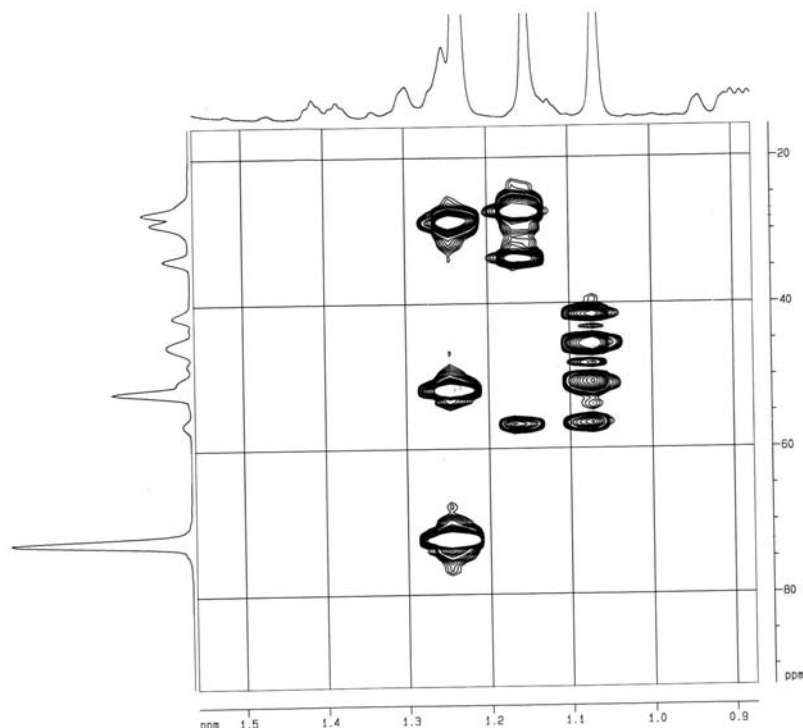


FIGURA 3.27. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

As configurações relativas de C-5 e C-10 foram definidas através do conhecimento da biossíntese dos sesquiterpenos eudesmanos, que, a partir do *trans-trans* farnesilpirofosfato, ciclizam em dois anéis de seis membros, com junção *trans* (DEWICK, 1997). Desta forma, a metila 14 estaria em  $\beta$  e H-5 em  $\alpha$  (FIGURA 3.28).

Também segundo a biossíntese dos eudesmanos, o grupo hidroxiisopropila (em C-7) deveria ser *equatorial* (ou  $\beta$ ). Isto foi confirmado pela magnitude da constante de acoplamento de H-7 com H-6, que por ser grande ( $J=12,2$  Hz), indicou que este hidrogênio seria *axial* (ou  $\alpha$ ). Já o grupo acetato (em C-8) foi definido em  $\beta$ , pois H-8 ocorreu como um singlete largo, mostrando que possuía uma constante de acoplamento pequena com os hidrogênios vicinais, indicando, portanto, que seria *equatorial* e, desta forma,  $\alpha$  em relação ao plano dos anéis (FIGURA 3.28).



O espectro de NOESY (FIGURA 3.28) não permitiu a determinação da configuração do anel ciclopropânico no sesquiterpeno **6**, pois não se observou nenhum acoplamento que permitisse tal determinação, como, por exemplo, o acoplamento entre a metila 14 (1,07  $\delta$ ) e os hidrogênios 2 (0,88 e 0,38  $\delta$ ).

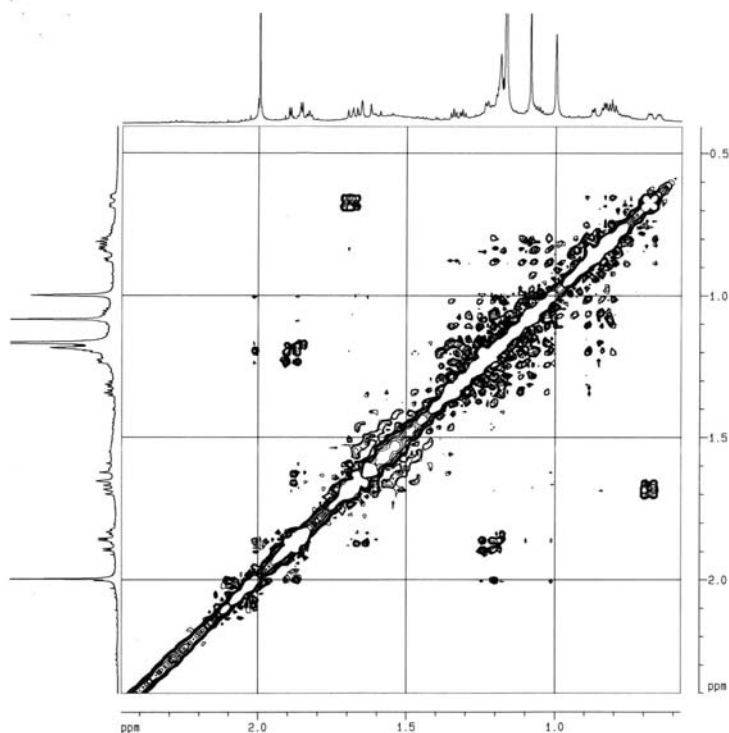


FIGURA 3.28. Espectro de NOESY do sesquiterpeno **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A simulação computacional no programa *Hyperchem* do sesquiterpeno **6** indicou a conformação ilustrada na FIGURA 3.29 como a mais estável.

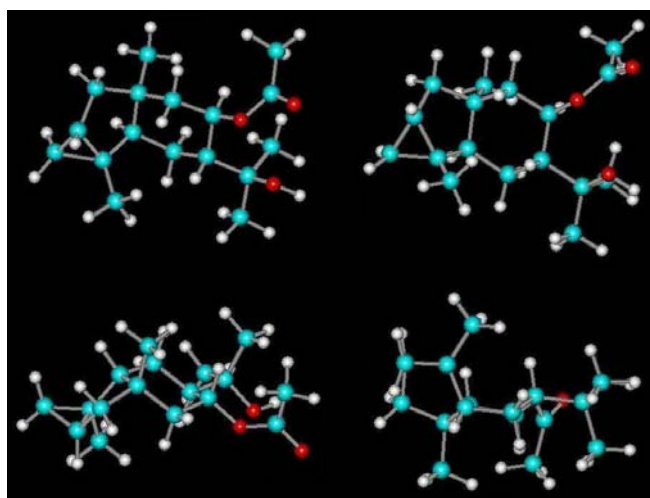


FIGURA 3.29. Diferentes perspectivas da estrutura tridimensional mais provável do sesquiterpeno eudesmano **6**.

Assim, a estrutura da substância **6** foi definida como um sesquiterpeno eudesmano que está sendo pela primeira vez citado na literatura e cujos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão descritos na TABELA 3.4.

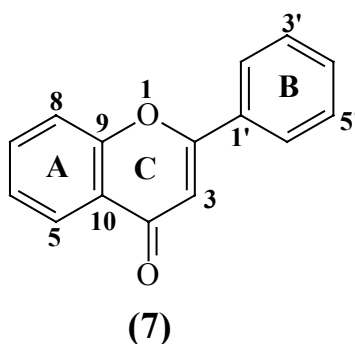
TABELA 3.4. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do sesquiterpeno eudesmano.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	0,73 <i>d</i> l ( $J = 12,1$ Hz) 1,75 <i>d</i> l ( $J = 12,1$ Hz)	45,37
2	1,25 <i>m</i>	26,38
3	0,88 <i>m</i> e 038 <i>tl</i>	33,69
4		26,99
5	0,92 <i>d</i> l ( $J = 12,2$ Hz)	56,60
6	1,91 <i>d</i> l ( $J = 12,2$ Hz) 1,71 <i>d</i> l ( $J = 12,2$ Hz)	20,39
7	1,40 <i>dt</i> ( $J = 12,2$ Hz)	51,90
8	5,26 <i>sl</i>	71,97
9	1,94 <i>d</i> l ( $J = 14,5$ Hz) 1,28 <i>d</i> l ( $J = 14,5$ Hz)	41,43
10		50,83
11		72,22
12 e 13	1,24 <i>s</i>	28,33 28,83
14	1,07 <i>s</i>	21,08
15	1,15 <i>s</i>	18,61
-OOC <u>C</u> H <sub>3</sub>	2,07 <i>s</i>	21,69
-OOC <u>C</u> H <sub>3</sub>		169,91

### 3.5. Identificação das flavonas

#### 3.5.1. Identificação da flavona

A flavona (**7**) foi obtida da fração acetato de etila do extrato hexânico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* (AHFHA) (p. 223) e caracterizada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e EM.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **7** (FIGURA 3.30) apresentou sinais somente na região de hidrogênios aromáticos (de 6,79 à 8,22  $\delta$ ). Esse conjunto de sinais, juntamente com o singlete em 6,79  $\delta$ , que é característico de H-3 das flavonas, indicaram a natureza de **7**. A ausência de sinais na região mais blindada do espectro sugeriu que não houvesse quaisquer substituintes no esqueleto base de uma flavona. Isto foi confirmado ao se verificar o padrão de substituição dos anéis aromáticos (A e B). Para o anel A, o padrão de acoplamento entre os hidrogênios H-5 (8,20  $\delta$ , *dd*,  $J = 8,0$  e 1,7 Hz), H-6 (7,37  $\delta$ , *ddd*,  $J = 8,0$ , 7,0 e 1,2 Hz), H-7 (7,66  $\delta$ , *ddd*,  $J = 8,4$ , 7,0 e 1,7 Hz) e H-8 (7,52  $\delta$ , *dd*,  $J = 8,4$  e 1,2 Hz) o caracterizou como um anel *orto*-dissubstituído. Já o anel B deveria ser monossubstituído, pois se verificou dois conjuntos de sinais em 7,82 - 7,91  $\delta$  (2H) e em 7,43 - 7,53  $\delta$  (3H).

Os dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  indicaram a identidade da substância **7** como a flavona. Isto foi confirmado através da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **7** (FIGURA 3.31), no qual foram observados 15 carbonos

insaturados, dentre eles, os carbonos em 106,73 e 177,45  $\delta$  (C-3 e C-4) que são característicos do núcleo de uma flavona.

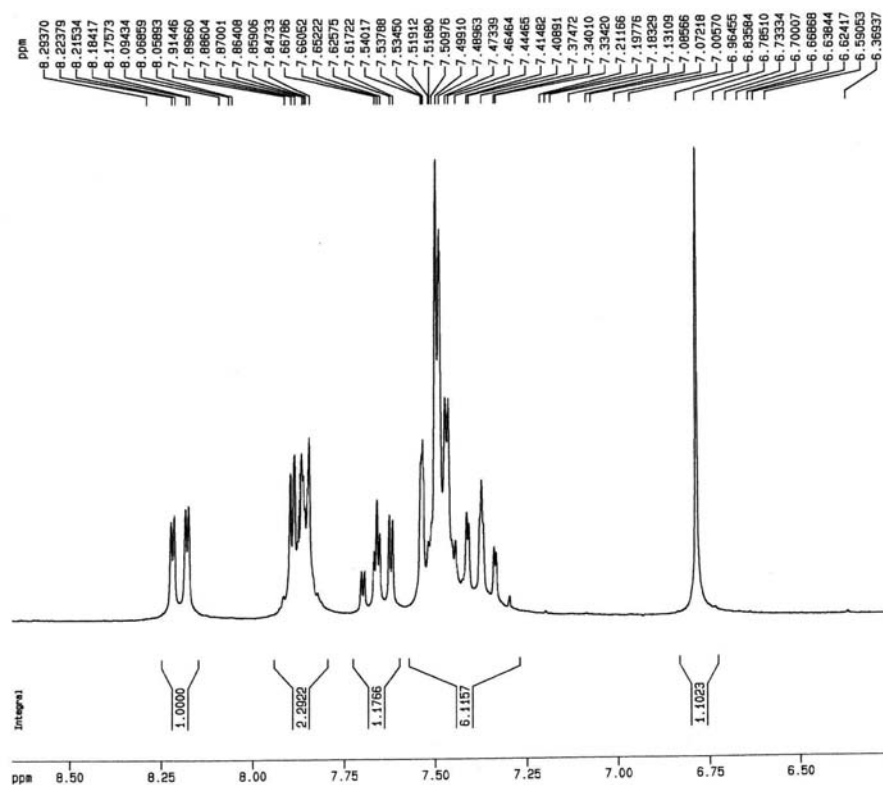


FIGURA 3.30. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da flavona (7) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

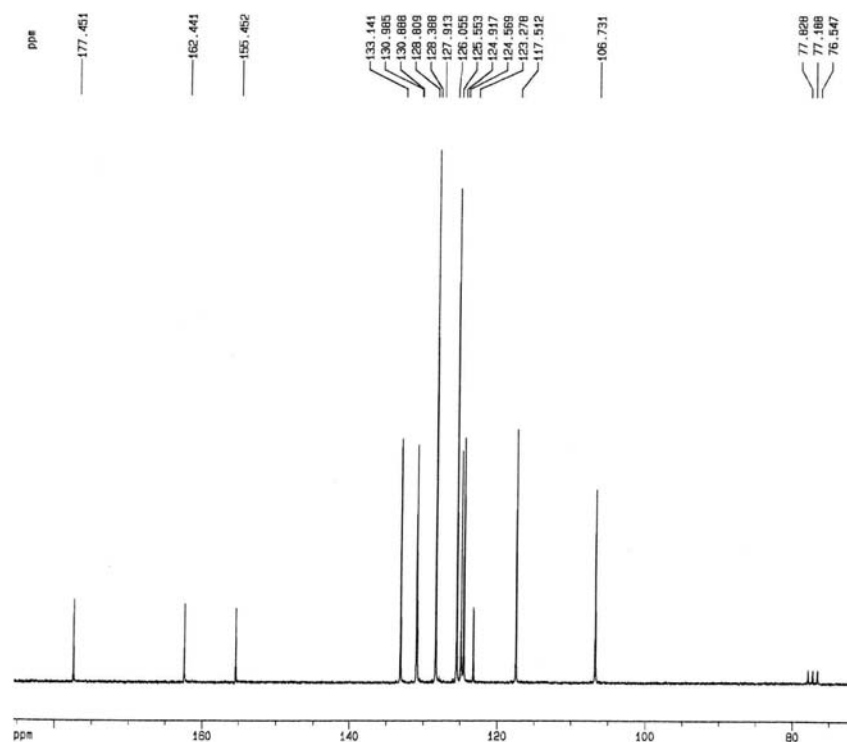


FIGURA 3.31. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da flavona (7) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

Os dados espectroscópicos de RMN para a flavona (7) foram atribuídos (TABELA 3.5) através de comparação com valores descritos na literatura (KINGSBURY e LOOKER, 1975).

TABELA 3.5. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da flavona.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2		162,44	163,0
3	6,79 s	106,73	107,3
4		177,45	178,0
5	8,20 dd ( $J = 8,0$ e $1,7$ Hz)	124,57	125,4
6	7,37 ddd ( $J = 8,0, 7,0$ e $1,2$ Hz)	124,91	124,9
7	7,66 ddd ( $J = 8,4, 7,0$ e $1,7$ Hz)	133,14	133,5
8	7,52 dd ( $J = 8,4$ e $1,2$ Hz)	117,51	117,9
9		155,45	156,0
10		123,28	123,7
1'		130,88	131,5
2' e 6'	7,43 - 7,53	125,55	126,0
3' e 5'	7,82 - 7,91	128,38	128,8
4'	7,43 - 7,53	130,98	131,3

\*  $\delta_{\text{C}}$  da flavona ( $\text{CDCl}_3$ , 25,2 MHz) (KINGSBURY e LOOKER, 1975).

O espectro de massas de 7 (FIGURA 3.32) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  222 daltons, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2$  da flavona, e os picos em  $m/z$  194 e 120, que são resultantes da perda de CO e da reação de retro Diels-Alder (TOMAZELA, 2001).

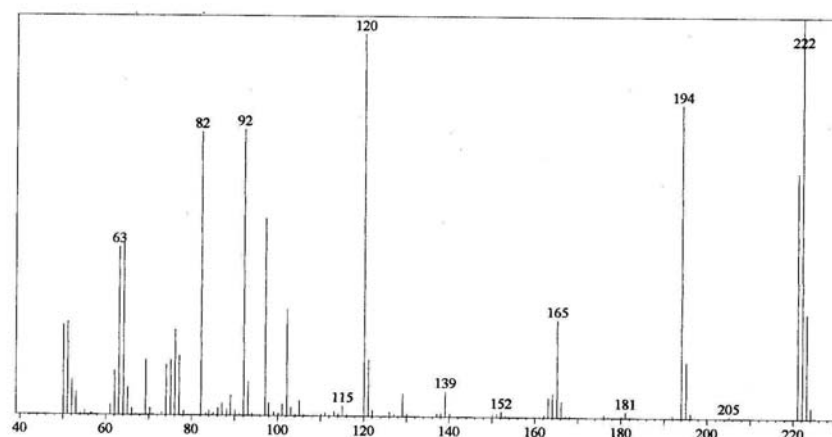
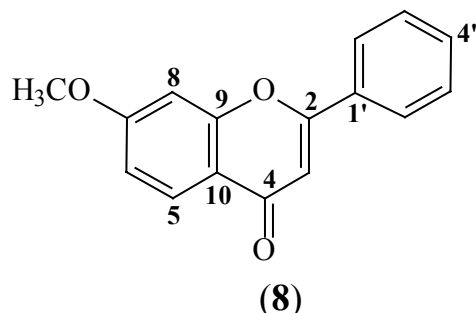


FIGURA 3.32. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da flavona (7).

### 3.5.2. Identificação da 7-metoxiflavona

A 7-metoxiflavona (**8**) foi isolada da fração acetato de etila do extrato hexânico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* (AHFHA) (p. 223) e caracterizada por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **8** (FIGURA 3.33) apresentou similaridades com o de **7**, com sinais na região de hidrogênios aromáticos (em 6,76 - 8,15  $\delta$ ) e o singlete característico de H-3 de flavonas (em 6,76  $\delta$ ). Entretanto, o padrão de substituição aromática conjuntamente com um singlete em 3,93  $\delta$  (3H), relativo a um grupo metoxila, indicou que um dos anéis (A ou B) do núcleo da flavona estaria substituído na substância **8**.

O padrão de substituição do anel B apresentou-se idêntico ao de **7**, com dois conjuntos de sinais em 7,85 - 7,95  $\delta$  (2H) e 7,46 - 7,57  $\delta$  (3H), indicando então que o anel A fosse substituído.

No anel A, a posição da metoxila em C-7 foi atribuída pelo padrão de acoplamento entre os hidrogênios H-5 (8,13  $\delta$ , *d*,  $J = 7,6$  Hz), H-6 (6,97  $\delta$ , *dd*,  $J = 7,6$  e 1,7 Hz) e H-8 (6,96  $\delta$ , *d*,  $J = 1,7$  Hz). O fato de H-5 ocorrer como um dubleto com constante de acoplamento grande *orto* indicou que C-7 era uma posição substituída. Os demais acoplamentos entre os hidrogênios do anel A confirmaram essa indicação.

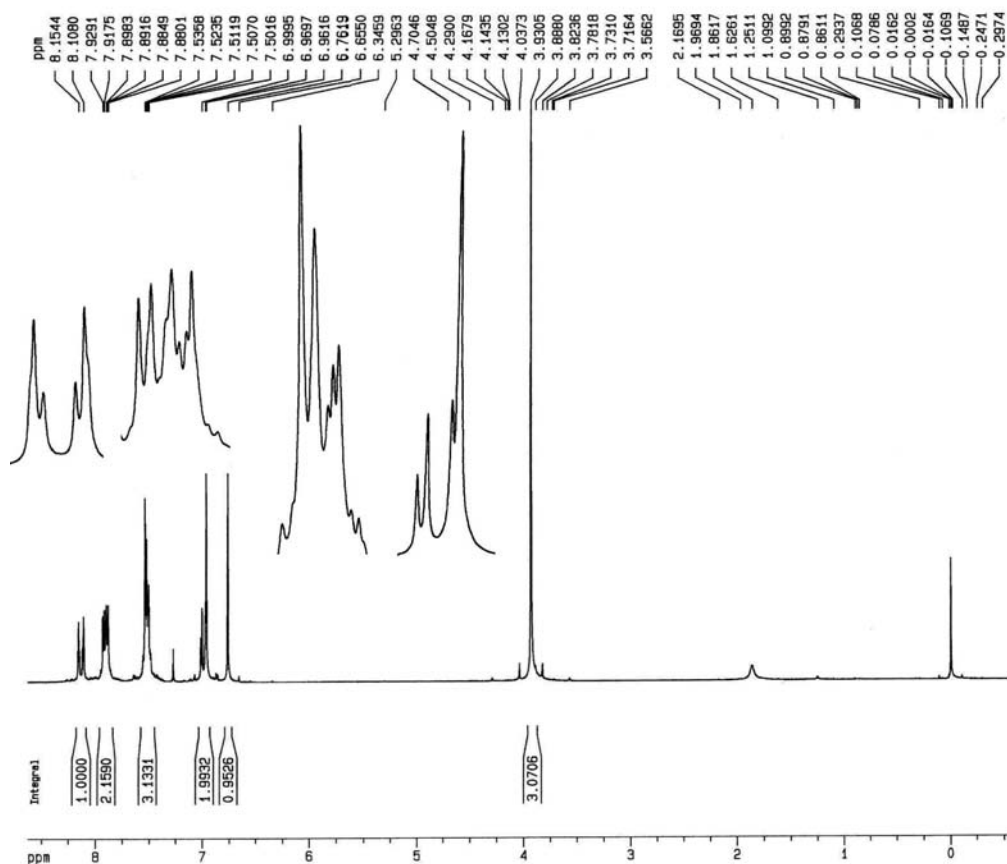


FIGURA 3.33. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 7-metoxiflavona (**8**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

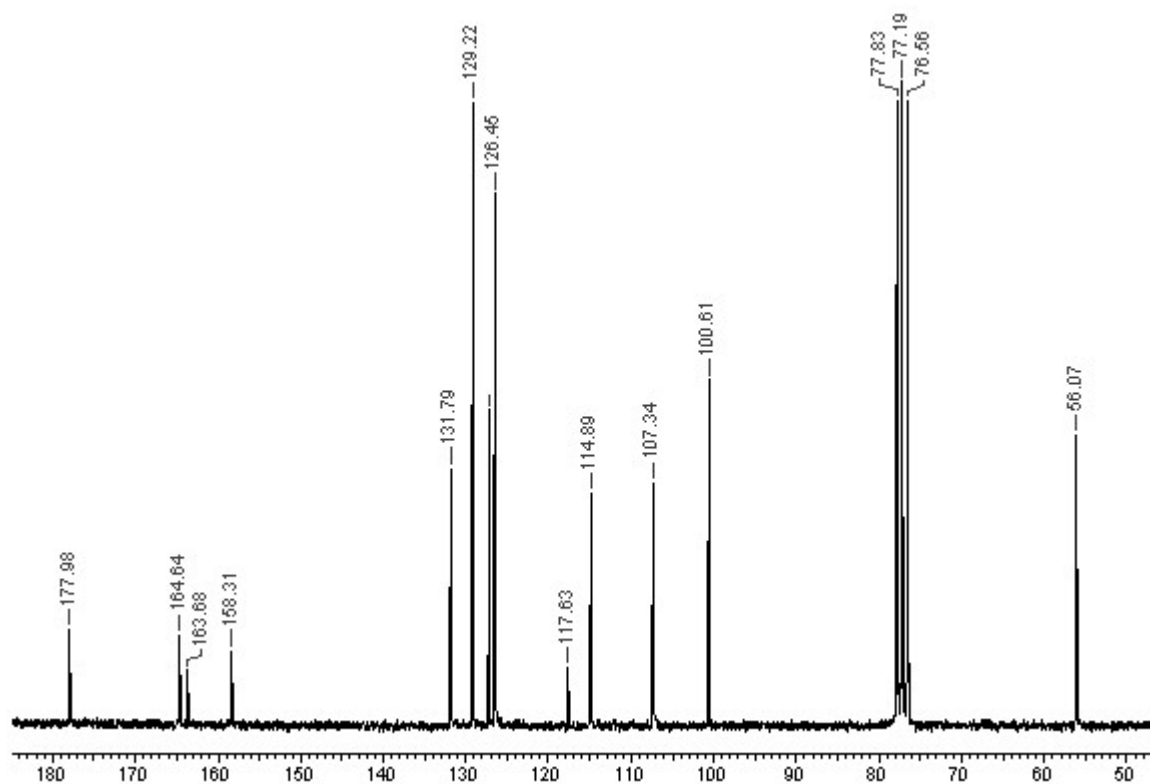


FIGURA 3.34. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da 7-metoxiflavona (**8**) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **8** (FIGURA 3.34), além dos carbonos indicativos do esqueleto de uma flavona (C-3 e C-4), destacam-se os carbonos C-6 e C-8 que são blindados, em comparação com os da flavona (**7**), em aproximadamente 10 ppm devido ao efeito da metoxila em *orto*.

Desta forma, os dados de RMN sugeriram a identidade de **8** como a 7-metoxiflavona, o que foi confirmado pela comparação dos dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  (TABELA 3.6) com os descritos na literatura (KINGSBURRY e LOOKER, 1975).

TABELA 3.6. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da 7-metoxiflavona.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2		164,64	162,6
3	6,76 <i>s</i>	107,34	107,2
4		177,98	177,4
5	8,13 <i>d</i> ( $J = 7,6$ Hz)	127,26	126,7
6	6,97 <i>dd</i> ( $J = 7,6$ e 1,7 Hz)	114,89	114,1
7		163,68	163,7
8	6,96 <i>d</i> ( $J = 1,7$ Hz)	100,61	100,2
9		158,31	157,7
10		117,63	117,6
1'		131,79	131,6
2' e 6'	7,46 - 7,57	126,45	125,8
3' e 5'	7,85 - 7,95	129,22	128,7
4'	7,46 - 7,57	131,79	131,1
OCH <sub>3</sub>	3,93 <i>s</i>	56,07	55,9

\*  $\delta_{\text{C}}$  da 7-metoxiflavona (CDCl<sub>3</sub>, 25,2 MHz) (KINGSBURRY e LOOKER, 1975).

O pico do íon molecular em  $m/z$  252 daltons no espectro de massas de **8** (FIGURA 3.35) confirmou a identidade da 7-metoxiflavona (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>). Os picos em  $m/z$  224 e 209 são resultantes da perda de CO e metila e são bastante comuns em flavonóides metoxilados. Já o pico em  $m/z$  150 origina-se da reação de retro Diels-Alder (TOMAZELA, 2001).



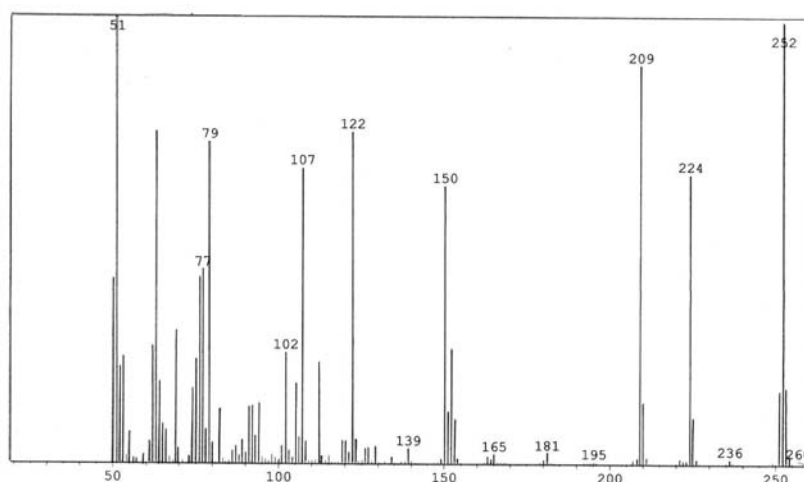
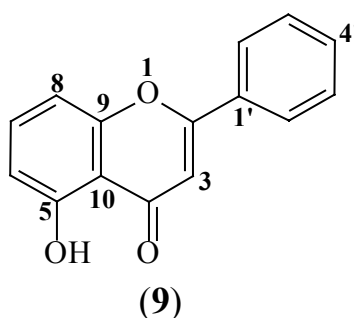


FIGURA 3.35. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da 7-metoxiflavona (**8**).

### 3.5.3. Identificação da 5-hidroxiavona

A 5-hidroxiavona (**9**) foi identificada por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  na fração acetato de etila do extrato hexânico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* (AHFHA) (p. 223).



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **9** (FIGURA 3.36) apresentou sinais que caracterizam as flavonas: grande número de sinais na região de 6,76 - 7,94  $\delta$  e o singlete característico de H-3, em 6,76  $\delta$ . A presença de um sinal em 12,59  $\delta$  (1H) indicou a existência de uma hidroxila quelada, que só poderia estar em C-5 numa flavona. Isto foi confirmado pela ausência do sinal relativo a H-5 no

espectro, que sempre é o hidrogênio mais desblindado por estar sob o efeito anisotrópico da carbonila C-4, e também pelo padrão dos acoplamentos entre os hidrogênios H-6 (6,83  $\delta$ , *dd*,  $J = 8,4$  e  $0,8$  Hz), H-8 (7,02  $\delta$ , *dd*,  $J = 8,4$  e  $0,8$  Hz) e H-7 (7,57  $\delta$ , *dd*,  $J = 8,4$  Hz).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.37) de **9** apresentou 15 carbonos, destacando-se a blindagem dos carbonos C-6, C-8 e C-10, devido ao efeito *orto/para* da hidroxila, e a desblindagem de 6 ppm do carbono carbonílico C-4, por ele estar quelado.

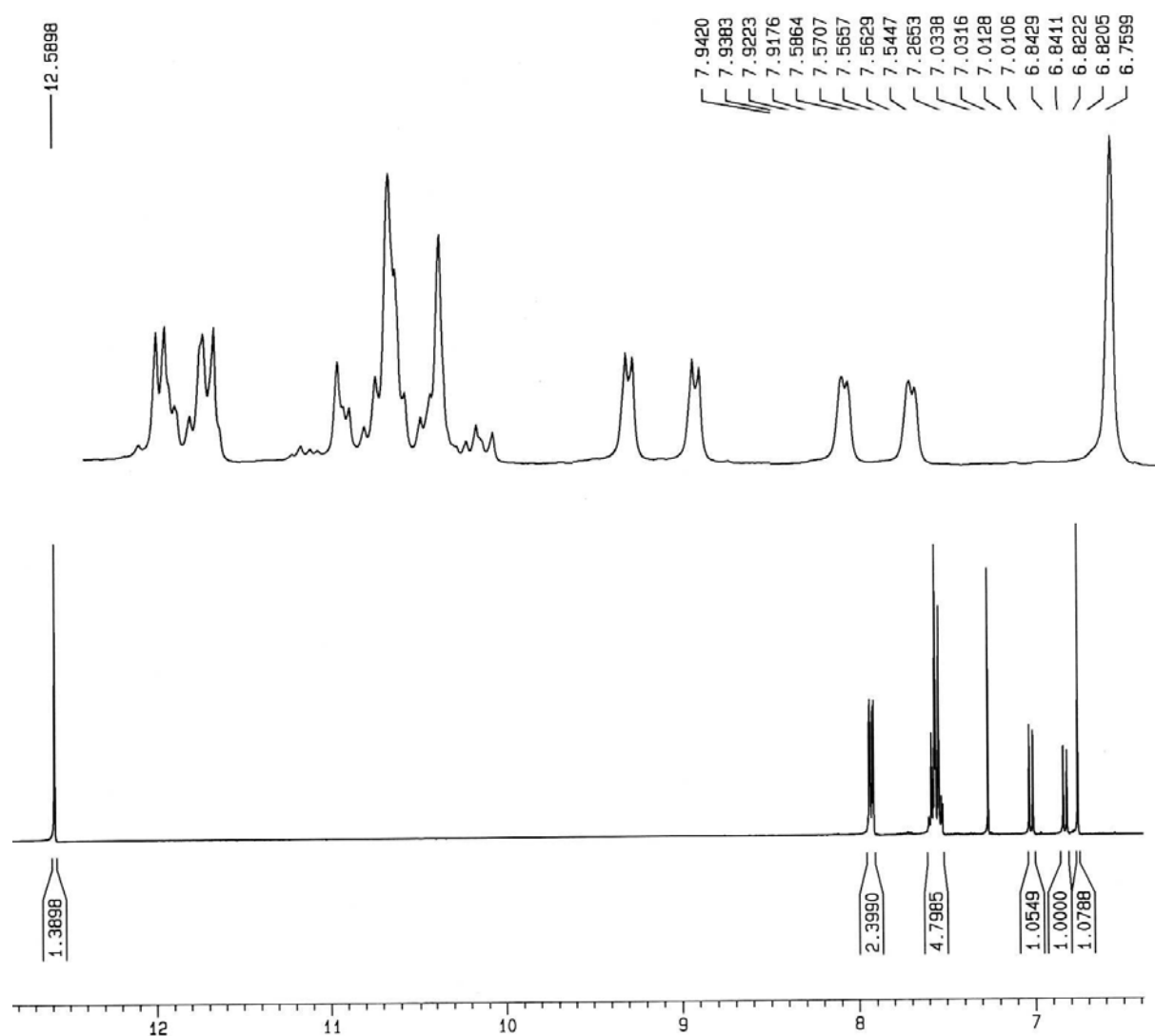


FIGURA 3.36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 5-hidroxiavona (**9**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

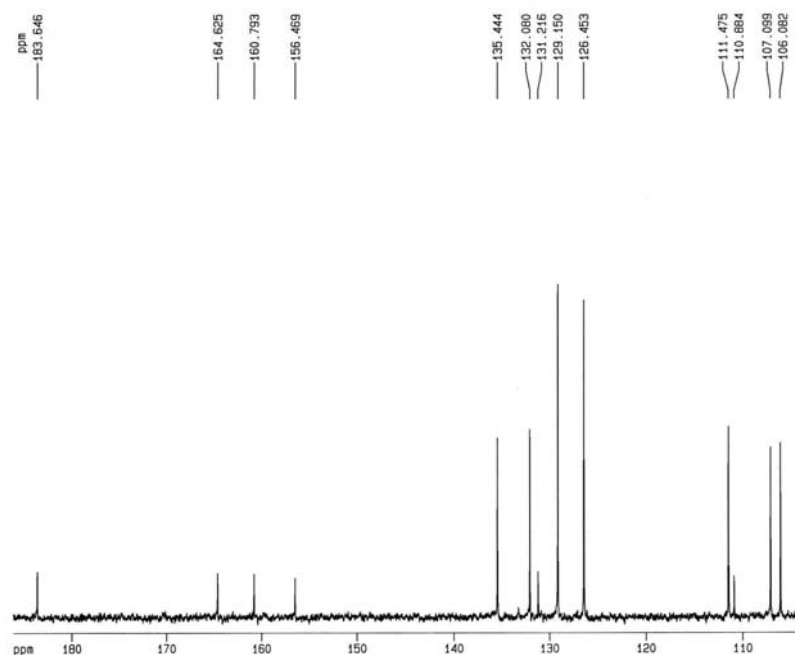


FIGURA 3.37. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da 5-hidroxiavona (**9**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

Desta forma, a substância **9** foi identificada como a 5-hidroxiavona e seus dados espectroscópicos (TABELA 3.7) foram compatíveis com os descritos na literatura (TERNAI e MARKHAM, 1976).

TABELA 3.7. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da 5-hidroxiavona.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2		164,62	164,1
3	6,76 <i>s</i>	106,08	105,6
4		183,65	182,9
5		160,79	159,8
6	6,83 <i>dd</i> ( $J = 8,4$ e $0,8$ Hz)	107,10	107,2
7	7,57 <i>dd</i> ( $J = 8,4$ Hz)	135,44	135,6
8	7,02 <i>dd</i> ( $J = 8,4$ e $0,8$ Hz)	111,48	110,8
9		156,47	155,8
10		110,88	110,3
1'		131,22	130,5
2' e 6'	7,46 - 7,57	126,45	126,3
3' e 5'	7,85 - 7,95	129,15	128,9
4'	7,46 - 7,57	132,08	131,9
<u>OH</u>	12,59 <i>s</i>		

\*  $\delta_{\text{C}}$  da 5-hidroxiavona (DMSO, 25 MHz) (TERNAI e MARKHAM, 1976).

O espectro de massas de **9** (FIGURA 3.38) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  238 daltons, confirmando a fórmula molecular da 5-hidroxi flavona ( $C_{15}H_{10}O_3$ ). Os picos em  $m/z$  210 e 136 resultam da perda de CO e da reação de retro Diels-Alder (TOMAZELA, 2001).

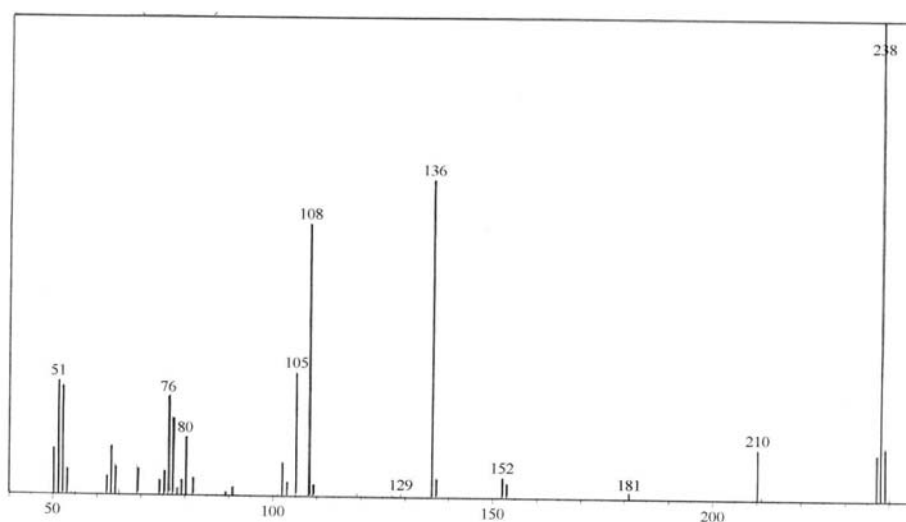
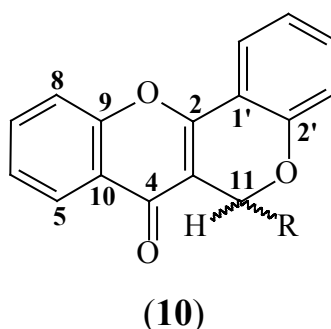


FIGURA 3.38. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da 5-hidroxi flavona (**9**).

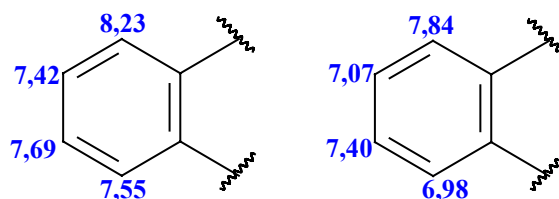
### 3.5.4. Identificação das piranoflavonas

Da fração diclorometânica do extrato hexânico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* (AHFHD) foi obtida a mistura de piranoflavonas **10** (p. 222), cuja identificação foi realizada através de EM e RMN, em uma e duas dimensões.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.39 – 3.40) da mistura **10** apresentou sinais relativos a oito hidrogênios aromáticos em: 8,23 (*dd*,  $J = 7,9$  e  $1,6$  Hz), 7,84 (*dd*,  $J = 7,8$  e  $1,6$  Hz), 7,69 (*ddd*,  $J = 8,4$ ,  $7,2$  e  $1,6$  Hz), 7,55 (*dl*,  $J = 8,4$  Hz), 7,42 (*m*), 7,40 (*m*), 7,07 (*ddd*,  $J = 7,8$  e  $0,9$  Hz) e 6,98  $\delta$  (*dl*,  $J = 8,2$  Hz).

Através da análise desses sinais no espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.41 – 3.42) foi possível estabelecer a existência de dois anéis aromáticos *orto* dissubstituídos, pois se observou o acoplamento do hidrogênio em 8,23  $\delta$ , com os hidrogênios em 7,42 (*orto*) e 7,69  $\delta$  (*meta*). Este último por sua vez acoplava *orto* com os hidrogênios em 7,55 e 7,42  $\delta$ . O outro anel foi definido a partir do acoplamento *orto* entre os hidrogênios em 7,84 e 7,07  $\delta$ , e também do acoplamento *meta* do primeiro com o hidrogênio em 7,40  $\delta$ , que por sua vez, estava *orto* aos hidrogênios em 7,07 e 6,98  $\delta$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.39 – 3.40) de **10** também apresentou: dois sinais em 5,69 (1H, *dd*,  $J = 9,5$  e  $3,4$  Hz) e 5,34  $\delta$  (1H, *m*); e, vários sinais na região mais blindada do espectro, destacando-se os multipletos em 1,85 e 1,70  $\delta$ , um sinal intenso em 1,25  $\delta$  e o triplete ( $J = 7,1$  Hz) em 0,88  $\delta$ . Os dois últimos sinais são característicos de diversos grupos metilênicos e da metila terminal numa cadeia alquílica.

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.41 – 3.42) notou-se o acoplamento entre o hidrogênio carbinólico em 5,69  $\delta$  e os metilênicos em 1,85 e 1,70  $\delta$ , e destes entre si.

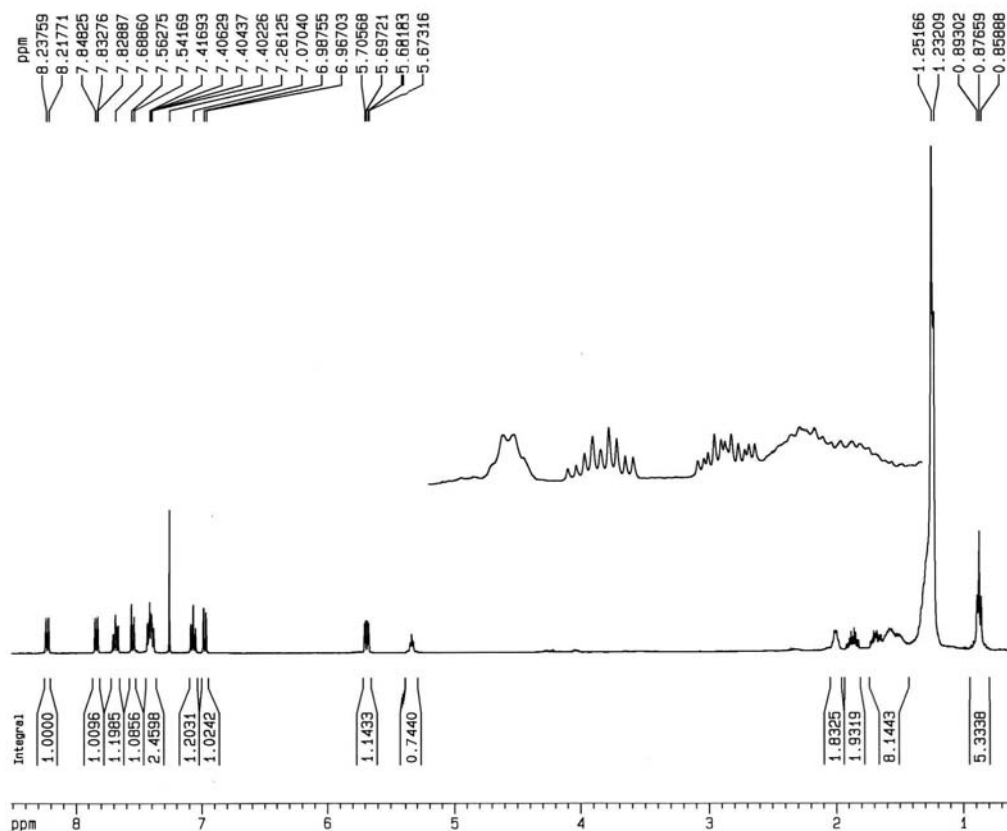


FIGURA 3.39. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das piranoflavonas **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

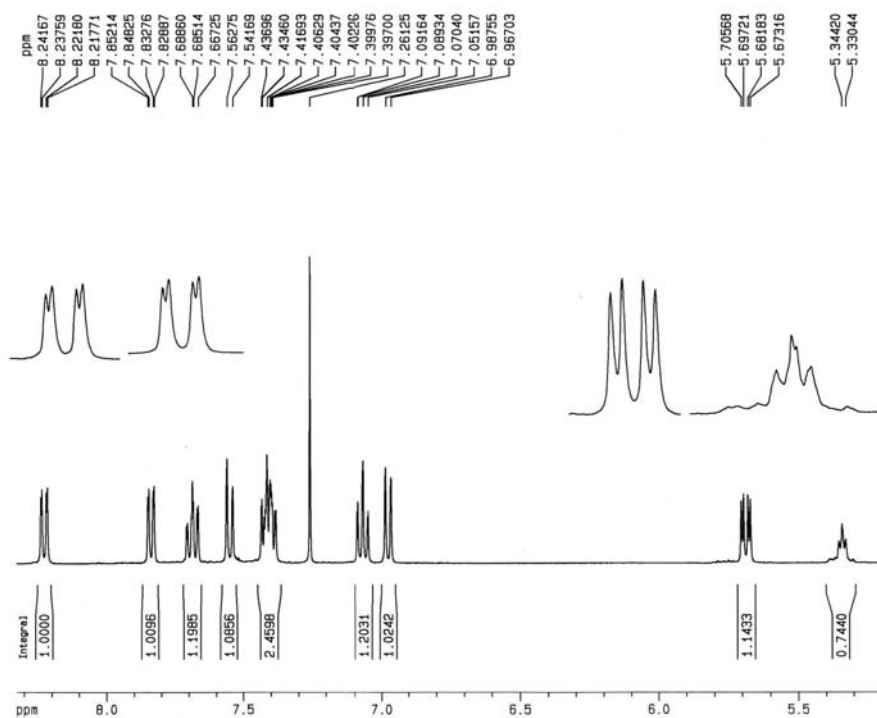


FIGURA 3.40. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  das piranoflavonas **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

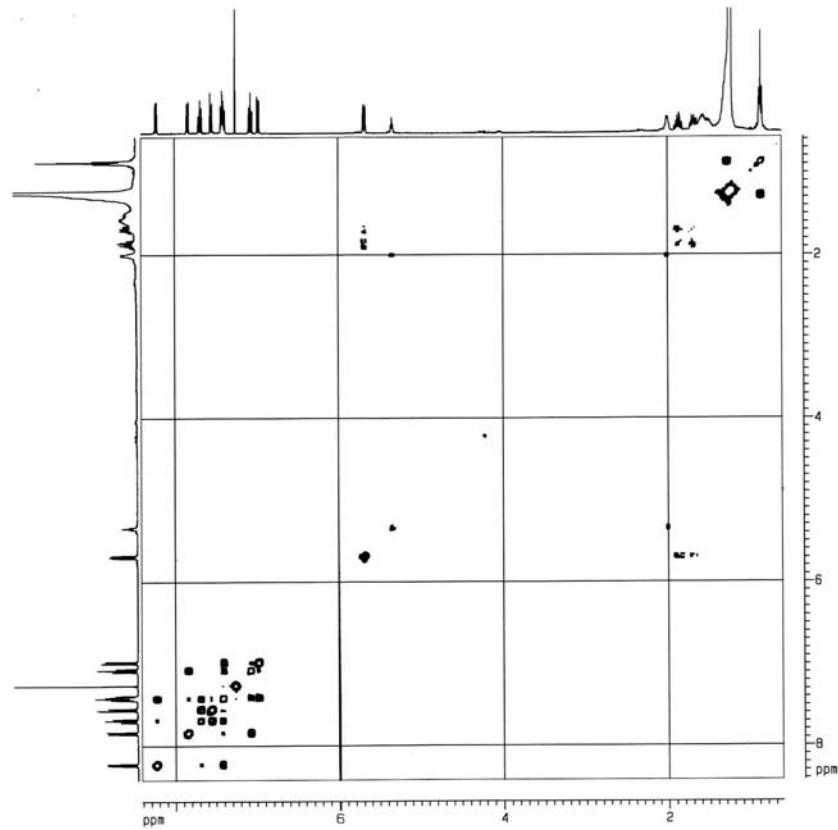


FIGURA 3.41. Espectro de COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H das piranoflavonas **10** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

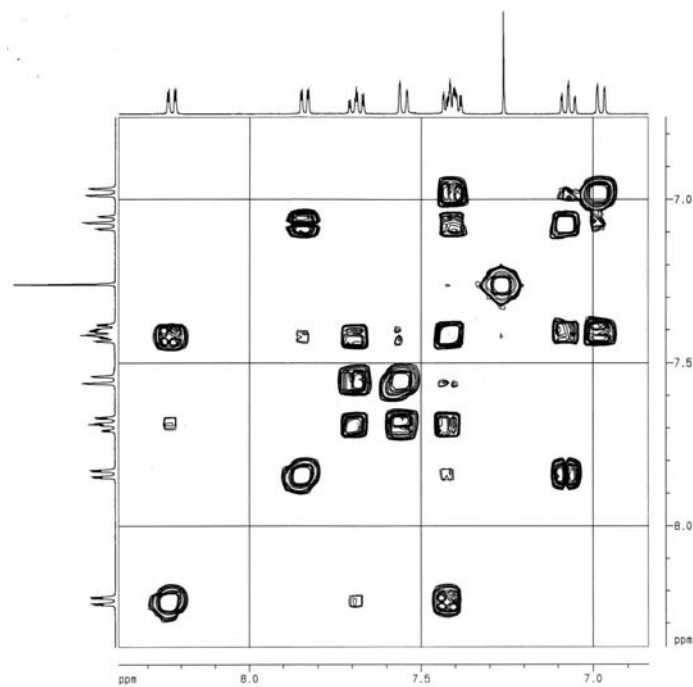


FIGURA 3.42. Ampliação do espectro de COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H das piranoflavonas **10** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.43 – 3.44) e o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 3.45 – 3.46) de **10** permitiram que se determinassem os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados.

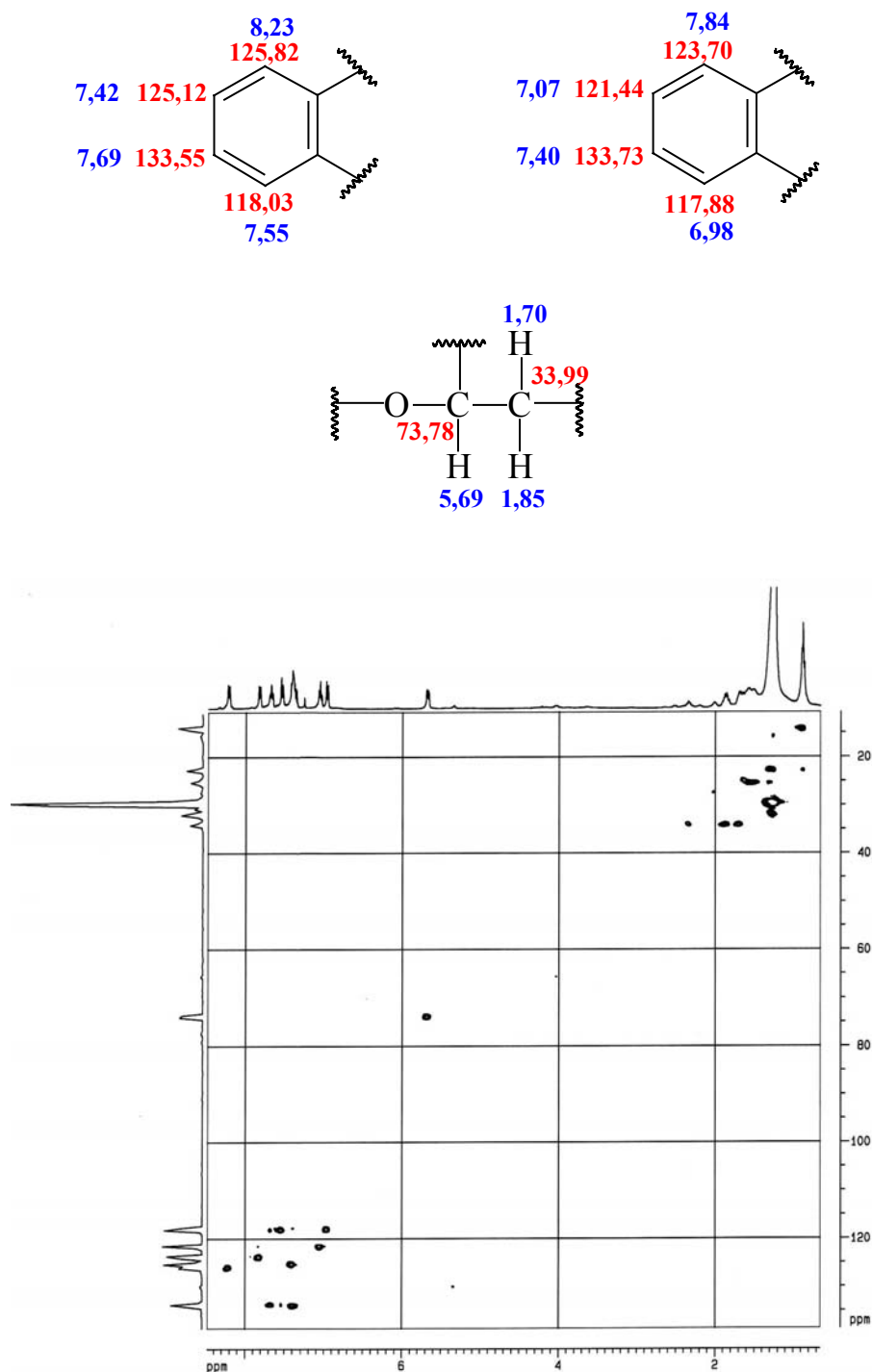


FIGURA 3.43. Mapa de contorno de HSQC das piranoflavonas **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



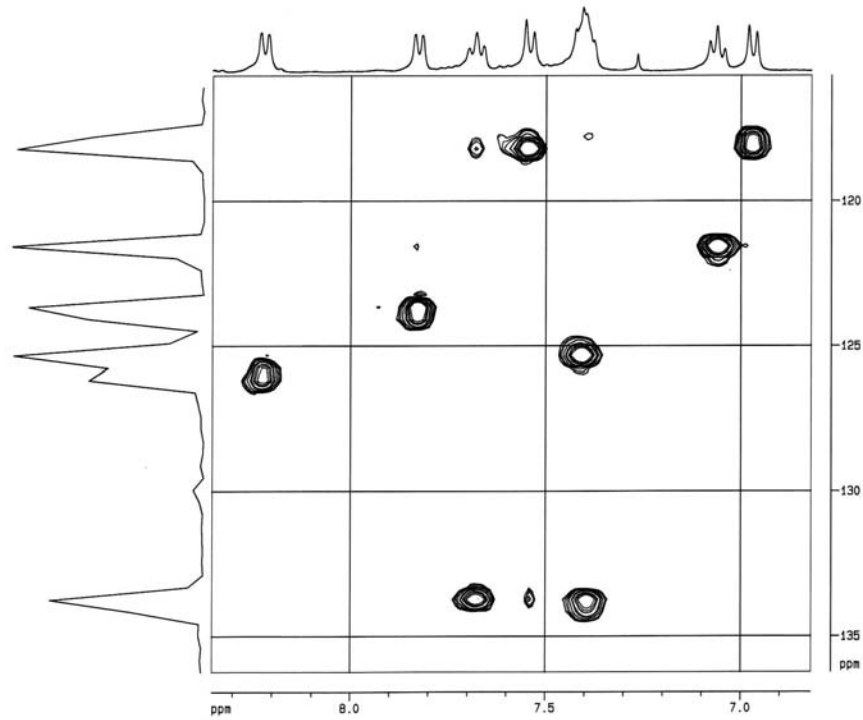


FIGURA 3.44. Ampliação do mapa de contorno de HSQC das piranoflavonas **10** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

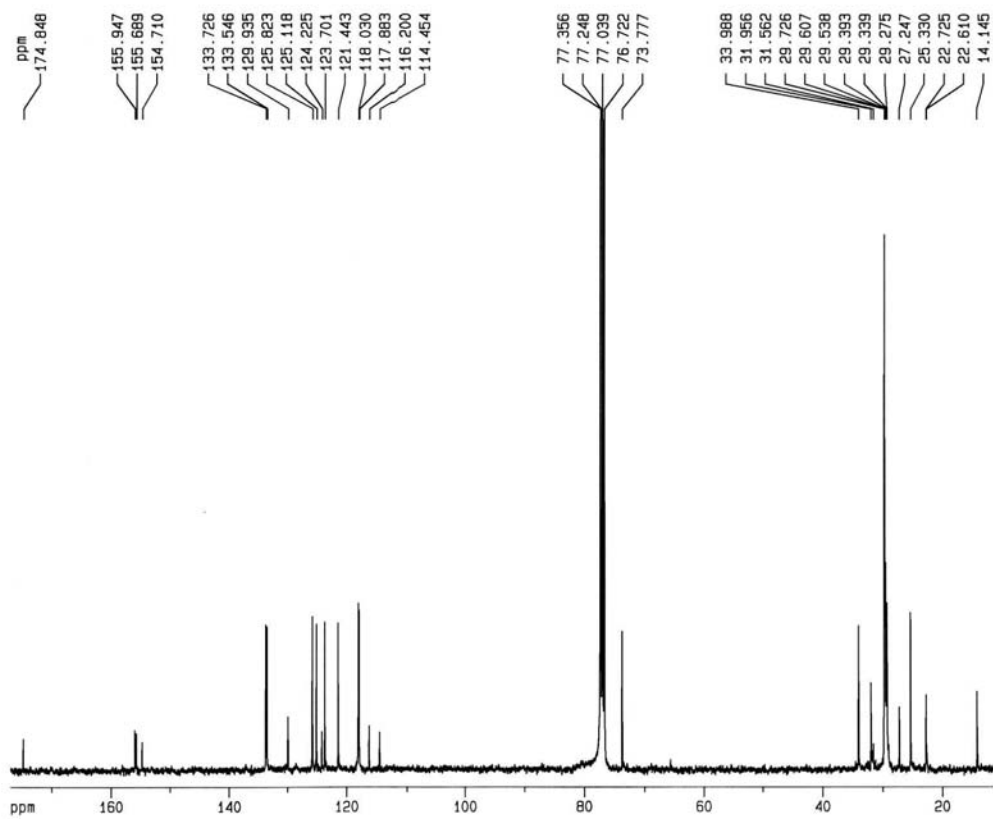


FIGURA 3.45. Espectro de RMN <sup>13</sup>C das piranoflavonas **10** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).

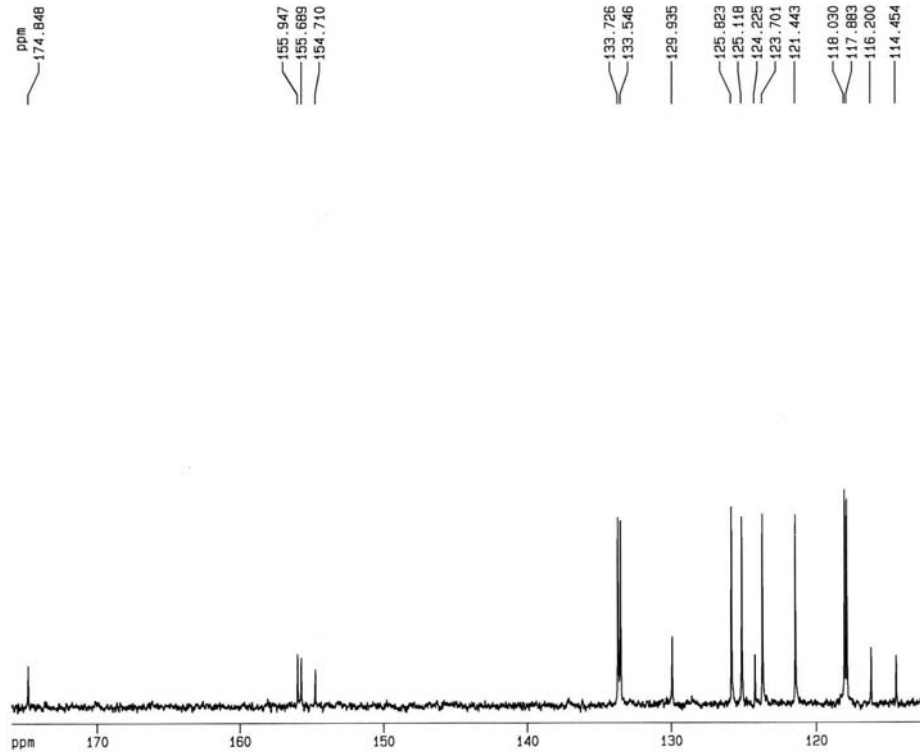


FIGURA 3.46. Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das piranoflavonas **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

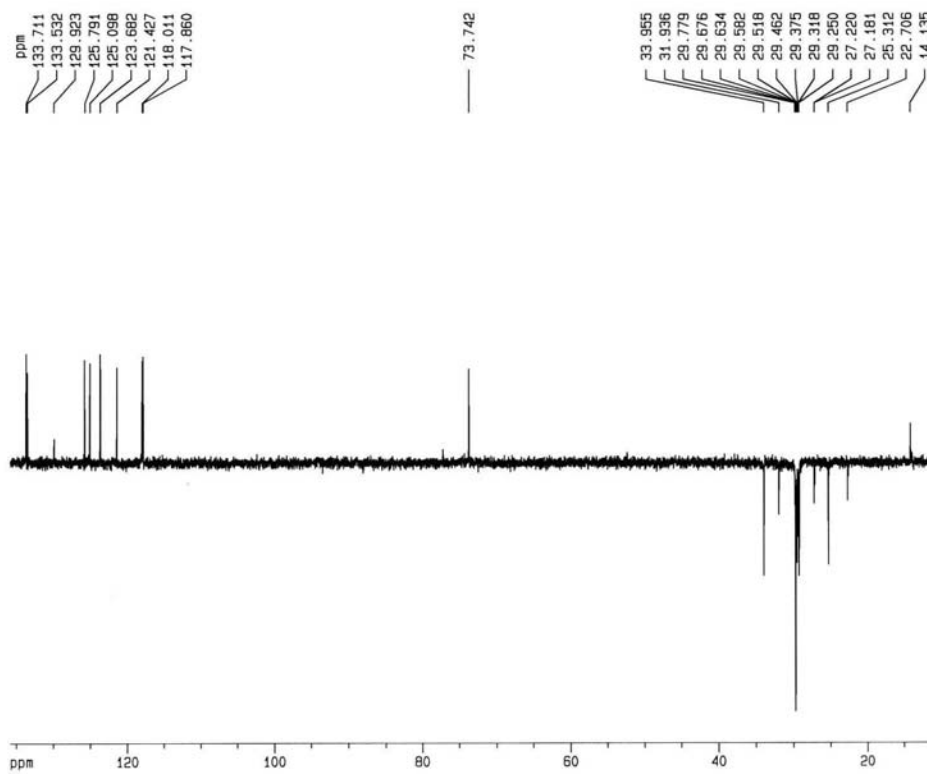


FIGURA 3.47. Espectro de DEPT  $135^\circ$  das piranoflavonas **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

A análise conjunta dos experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 3.45 – 3.46), DEPT  $135^\circ$  (FIGURA 3.47) e HSQC (FIGURAS 3.43 – 3.44) indicou que existiam, excluindo-se os carbonos relativos às cadeias alquílicas em região bastante blindada, 8 CH aromáticos (descritos anteriormente) e 7 carbonos quaternários (174,85, 155,95, 155,69, 154,71, 124,22, 116,20 e 114,45  $\delta$ ), num total de 15 carbonos, sugerindo, portanto, a estrutura de um flavonóide para **10**.

Os dados de RMN da posição 3 dos flavonóides oferecem importante informação sobre qual o seu tipo estrutural (flavona, flavanona, flavonol, etc) (TOMAZELA, 2001). Na mistura de flavonóides **10** não existia o sinal relativo a H-3, que na flavona (**7**) (p. 60), por exemplo, ocorria como um singlete em 6,79  $\delta$ . Isto indicou que **10** seriam flavonas substituídas em C-3. Adicionalmente, deveriam existir dois anéis aromáticos *orto* dissubstituídos, o que só seria possível numa flavona se a posição C-2' fosse substituída. Essas evidências em conjunto com os sinais “remanescentes” nos espectros de RMN (hidrogênio carbinólico, dois hidrogênios metilênicos e cadeia alquílica) indicaram a ciclização entre os anéis B e C da flavona, com a formação de um anel pirano. Este tipo de ciclização é comum em flavonóides prenilados (ACHMAD et al., 1996; LIN e SHIEH, 1991 e 1992; LIN et al., 1996; LU e LIN, 1994). Rara é a ciclização ser efetuada sem a presença de um prenila, mas com uma cadeia alquílica, como é o caso de **10**.

Os carbonos quaternários das piranoflavonas **10** foram atribuídos através da comparação com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da 2'-metoxiflavona (KINGSBURRY e LOOKER, 1975) e pela análise do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.48 – 3.49).

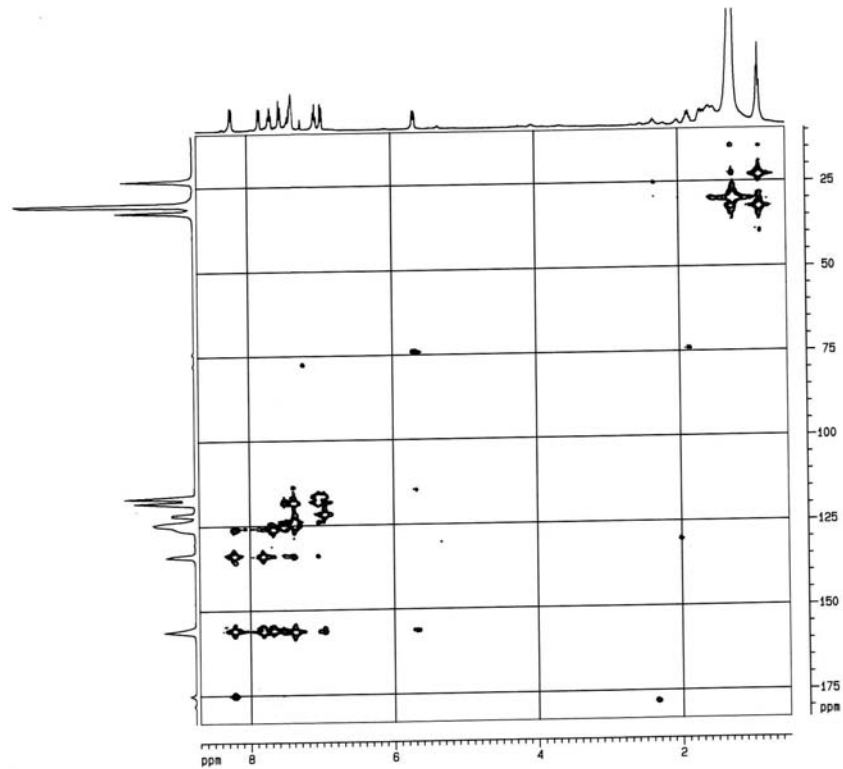


FIGURA 3.48. Mapa de contorno de HMBC das piranoflavonas **10** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

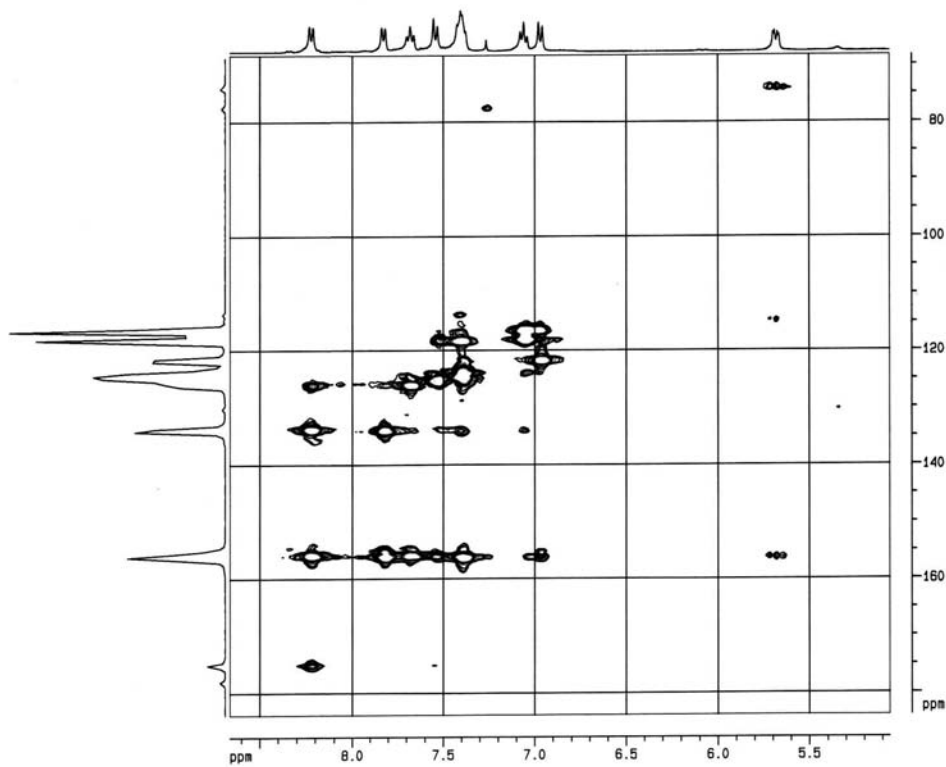
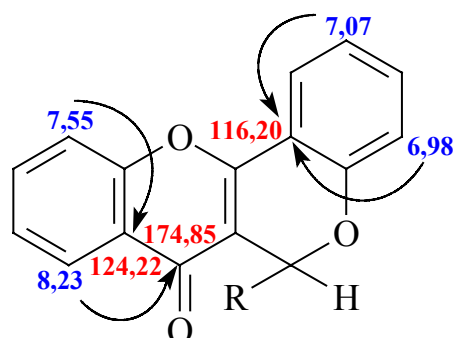


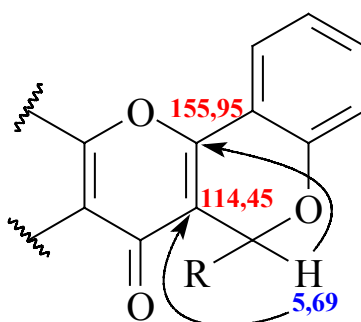
FIGURA 3.49. Ampliação do mapa de contorno de HMBC das piranoflavonas **10** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Os carbonos quaternários em 155,95, 155,69 e 154,71  $\delta$ , por serem coincidentes na projeção do mapa de contorno de HMBC, foram atribuídos por comparação com a 2'-metoxiflavona, a C-2, C-2' e C-9, respectivamente.

O carbono carbonílico em 174,85  $\delta$  foi determinado como C-4 através de sua correlação com H-5 (8,23  $\delta$ ); C-1' (116,20  $\delta$ ) pela correlação com os hidrogênios 3' (6,98  $\delta$ ) e 5' (7,07  $\delta$ ); e, C-10 (124,22  $\delta$ ) através da correlação com H-8 (7,55  $\delta$ ).



A presença do anel pirano nas flavonas **10** foi confirmada através da correlação entre o hidrogênio carbinólico em 5,69  $\delta$  (H-11) e C-2 (155,95  $\delta$ ). Já a correlação deste hidrogênio com um carbono quaternário em 114,45  $\delta$  permitiu atribuir C-3.



Faltava ainda determinar o tamanho das cadeias alquílicas (*R*) ligadas às piranoflavonas. Para tal fim, foi feito espectro de massas (FIGURA 3.50) da amostra **10**. Nesse espectro foram observados vários picos que permitiram definir a existência de uma mistura de piranoflavonas, que se diferenciavam pela extensão e insaturação da cadeia carbônica (*R*), como descrito na TABELA 3.8.

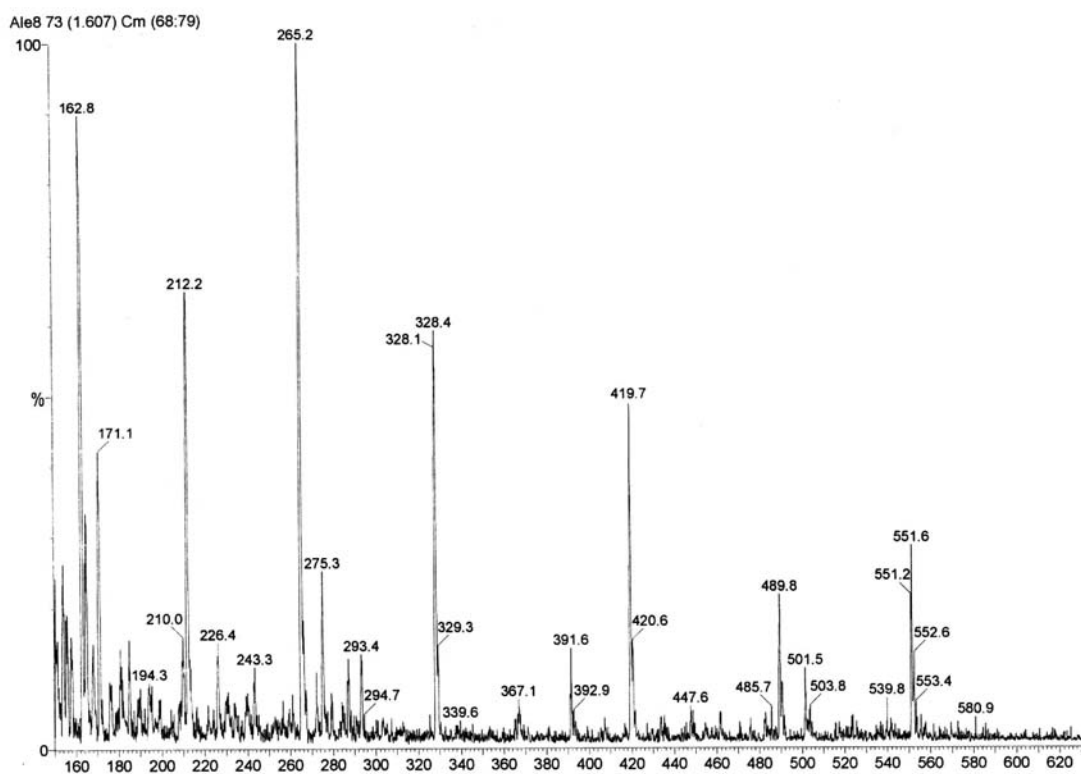


FIGURA 3.50. Espectro de massas (ES+) das piranoflavonas **10**.

TABELA 3.8. Determinação de *R* das piranoflavonas.

pico $[M+H]^+$ em $m/z$	<i>R</i>
391	$(CH_2)_9CH_3$
419	$(CH_2)_{11}CH_3$
489	$(CH_2)_{16}CH_3$
501	$(CH_2)_{15}(CH=CH)CH_3$
503	$(CH_2)_{17}CH_3$

Portanto, algumas das piranoflavonas que constituem a mistura **10** foram identificadas e são inéditas, pois representam um novo tipo de ciclização em flavonas. Os dados espectroscópicos referentes ao “núcleo” das piranoflavonas são descritos na TABELA 3.9.

TABELA 3.9. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das piranoflavonas.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2		155,95	160,6
3		114,45	112,5
4		174,85	178,7
5	8,23 <i>dd</i> ( $J = 7,9$ e $1,6$ Hz)	125,82	125,4
6	7,42 <i>m</i>	125,12	124,6
7	7,69 <i>ddd</i> ( $J = 8,4$ , $7,2$ e $1,6$ Hz)	133,55	133,3
8	7,55 <i>dI</i> ( $J = 8,4$ Hz)	118,03	117,8
9		154,71	156,2
10		124,22	120,7
11	5,69 <i>dd</i> ( $J = 9,5$ e $3,4$ Hz)	73,78	-
12	1,85 <i>m</i> e 1,70 <i>m</i>	33,99	-
1'		116,20	n.d.
2'		155,69	157,8
3'	6,98 <i>dI</i> ( $J = 8,2$ Hz)	117,88	111,6
4'	7,40 <i>m</i>	133,73	132,2
5'	7,07 <i>ddd</i> ( $J = 7,8$ e $0,9$ Hz)	121,44	120,5
6'	7,84 <i>dd</i> ( $J = 7,8$ e $1,6$ Hz)	123,70	129,1
OCH <sub>3</sub>		-	55,6

\*  $\delta_{\text{C}}$  da 2'-metoxiflavona (CDCl<sub>3</sub>, 25,2 MHz) (KINGSBURRY e LOOKER, 1975).

### **3.6. Identificação dos alcalóides**

Na família Rutaceae ocorrem cinco tipos diferentes de alcalóides, que são classificados segundo a sua origem biogenética: derivados da fenilalanina/tirosina; derivados do triptofano; alcalóides derivados do ácido antranílico; derivados da histidina; e, alcalóides de origem não definida, tais como os carbazóis (WATERMAN, 1999).

Entretanto, essa família é caracterizada pela presença dos alcalóides derivados do ácido antranílico, que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rutaceae.

As plantas da família Rutaceae são capazes de produzir uma grande variedade de alcalóides baseados na combinação inicial do ácido antranílico com uma ou mais unidades de acetato (FIGURA 3.51), sendo que a ocorrência de tais alcalóides é restrita (ou predominante) à essa família.

Neste trabalho foram isolados alcalóides derivados do ácido antranílico (furoquinolínicos, furoquinolônicos, tetraidrofuroquinolínico, 2-quinolona, 4-quinolona e acridônico) e um alcalóide indolopiridoquinazolínico, de origem mista.



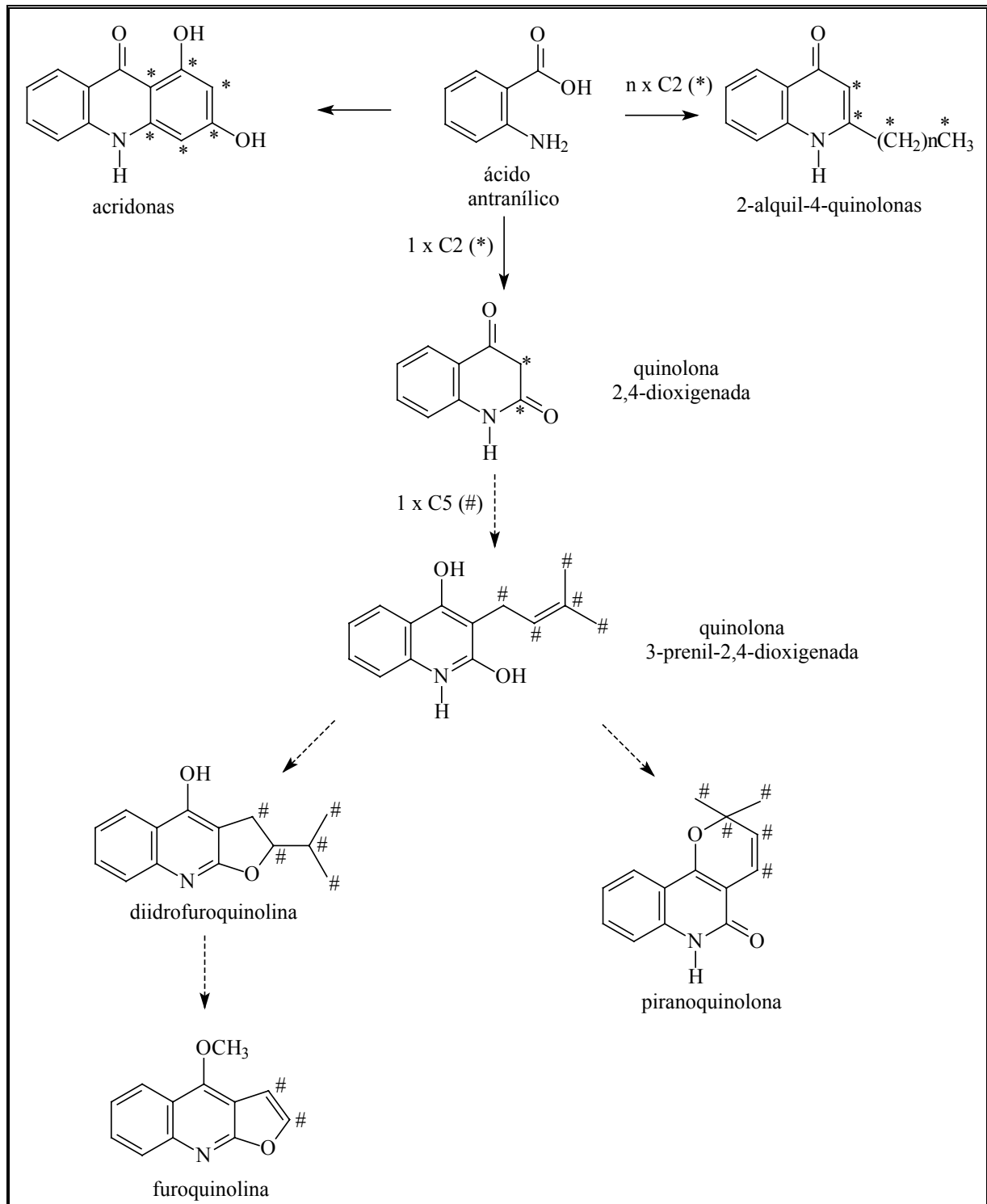
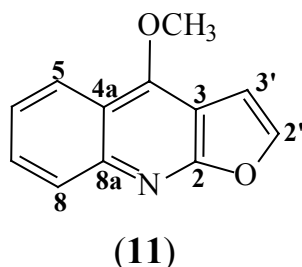


FIGURA 3.51. Alcalóides de Rutaceae formados a partir da combinação de ácido antranílico e acetato (WATERMAN, 1999).

### 3.6.1. Identificação da dictamina

O alcalóide dictamina (**11**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 212-213) e identificado através de EM e RMN  $^1\text{H}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.52) do alcalóide **11** apresentou um singlete em 4,47  $\delta$ , relativo a uma metoxila, e dois dubletos ( $J = 2,8$  Hz) em 7,64 e 7,10  $\delta$ , de hidrogênios furânicos, que são sinais bastante característicos dos alcalóides furoquinolínicos encontrados em Rutaceae.

Os sinais de quatro hidrogênios aromáticos em 8,28 ( $dd$ ,  $J = 8,5$  e 1,2 Hz), 8,03 ( $d1$ ,  $J = 8,5$  Hz), 7,70 ( $ddd$ ,  $J = 8,5$ , 8,5 e 1,2 Hz) e 7,47  $\delta$  ( $ddd$ ,  $J = 8,5$ , 8,5 e 1,5 Hz) e a ausência de outros sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriram a natureza de **11** como um alcalóide furoquinolínico não substituído, a dictamina, que foi anteriormente isolada de várias espécies de Rutaceae (MESTER, 1983), sendo inclusive obtida de *A. coerulea* (CORTEZ, 2002).

A atribuição dos valores de RMN  $^1\text{H}$  (TABELA 3.10) foi realizada por comparação com a literatura (MAFEZOLI, 2001) e através das magnitudes das constantes de acoplamento observadas. Nos alcalóides furoquinolínicos H-5 é sempre mais desblindado, devido ao efeito de compressão estérica da metoxila em C-4. Desta forma, partindo-se do sinal relativo a esse hidrogênio (em 8,28  $\delta$ ) sabe-se que o sinal em 7,70  $\delta$  refere-se a H-7, já que eles acoplam com uma constante *meta* pequena ( $J = 1,2$  Hz); e, que o sinal em 7,47  $\delta$  refere-se a H-6

por acoplar com uma constante grande *orto* ( $J = 8,5$  Hz) com H-5. Finalmente, H-8 ( $8,03 \delta$ ) foi definido através da constante de acoplamento *orto* ( $J = 8,5$  Hz) com H-7 ( $7,70 \delta$ ).

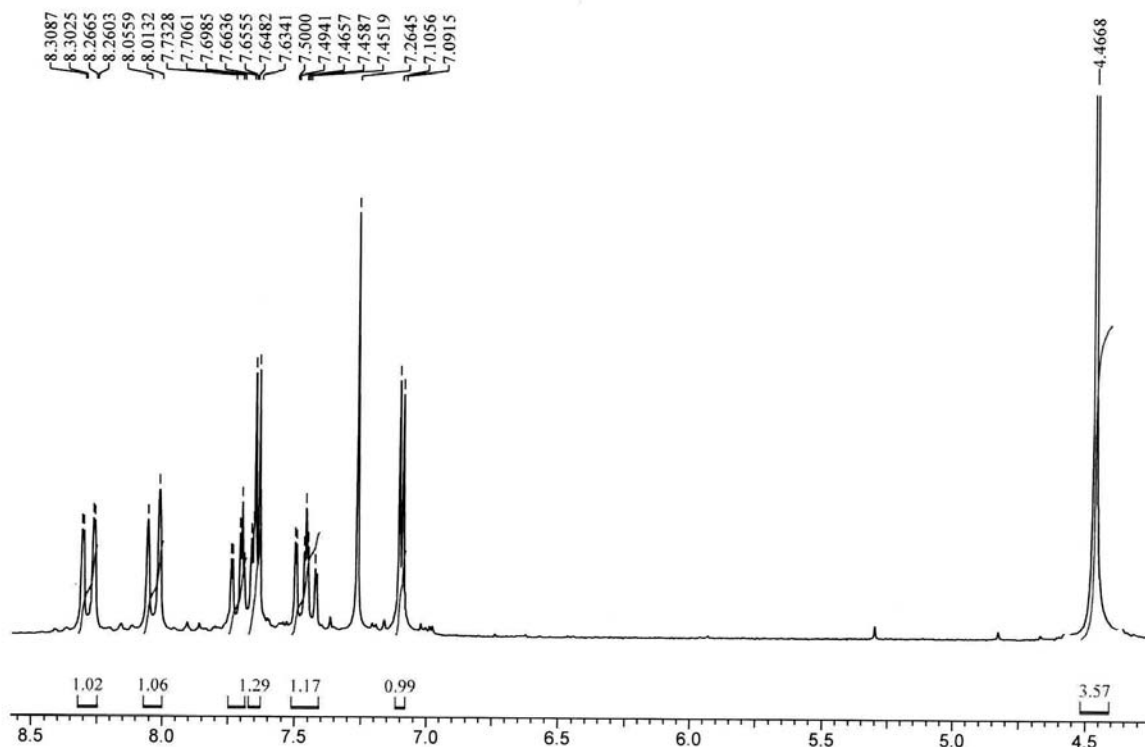


FIGURA 3.52. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da dictamina (**11**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

O espectro de massas (FIGURA 3.53) confirmou a identificação da dictamina (**11**) através do pico do íon molecular em  $m/z$  199 daltons, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_2$ .

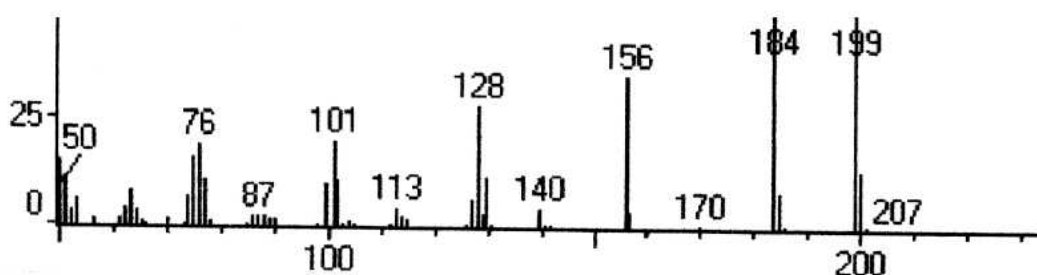


FIGURA 3.53. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da dictamina (**11**).

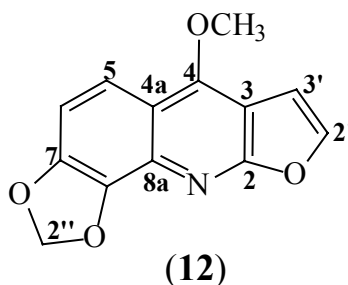
TABELA 3.10. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da dictamina.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
5	8,28 <i>dd</i> ( $J = 8,5$ e $1,2$ Hz)	8,29 <i>ddd</i> ( $J = 8,5$ , $1,2$ e $0,6$ Hz)
6	7,47 <i>ddd</i> ( $J = 8,5$ , $8,5$ e $1,5$ Hz)	7,46 <i>ddd</i> ( $J = 8,4$ , $6,8$ e $1,5$ Hz)
7	7,70 <i>ddd</i> ( $J = 8,5$ , $8,5$ e $1,2$ Hz)	7,69 <i>ddd</i> ( $J = 8,4$ , $6,8$ e $1,5$ Hz)
8	8,03 <i>dI</i> ( $J = 8,5$ Hz)	8,01 <i>ddd</i> ( $J = 8,5$ , $1,2$ e $0,6$ Hz)
2'	7,64 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,64 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)
3'	7,10 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,10 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)
4-OCH <sub>3</sub>	4,47 <i>s</i>	4,47 <i>s</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  da dictamina (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) (MAFEZOLI, 2001).

### 3.6.2. Identificação da kokusagina

O alcalóide kokusagina (**12**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 217-218) e identificado através de EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.54) da substância **12** apresentou, assim como **11**, um singleto em  $4,45 \delta$ , característico da metoxila em C-4 dos alcalóides furoquinolínicos, e dois dubletos ( $J = 2,8$  Hz) em  $7,58$  e  $7,05 \delta$ , dos hidrogênios furânicos 2' e 3' desses alcalóides.

Observaram-se ainda dois dubletos ( $J = 8,9$  Hz) em  $7,87$  e  $7,14 \delta$ , sugerindo a presença de apenas dois hidrogênios aromáticos em relação *orto* na molécula.

Por um desses hidrogênios ser bastante desblindado ( $7,87 \delta$ ), este pode ser atribuído a H-5 dos alcalóides furoquinolínicos. Assim, o outro sinal refere-se a H-6 e a substituição no anel aromático, ocorre em C-7 e C-8. A natureza desse substituinte foi definida por um singlete em  $6,24 \delta$  (2H), indicativo de um grupo metilenodioxi.

Desta forma, o alcalóide **12** foi identificado como a kokusagina, que havia sido anteriormente isolada de *Almeidea rubra* (SANTOS et al., 1998) e *Almeidea coerulea* (MAFEZOLI, 2001).

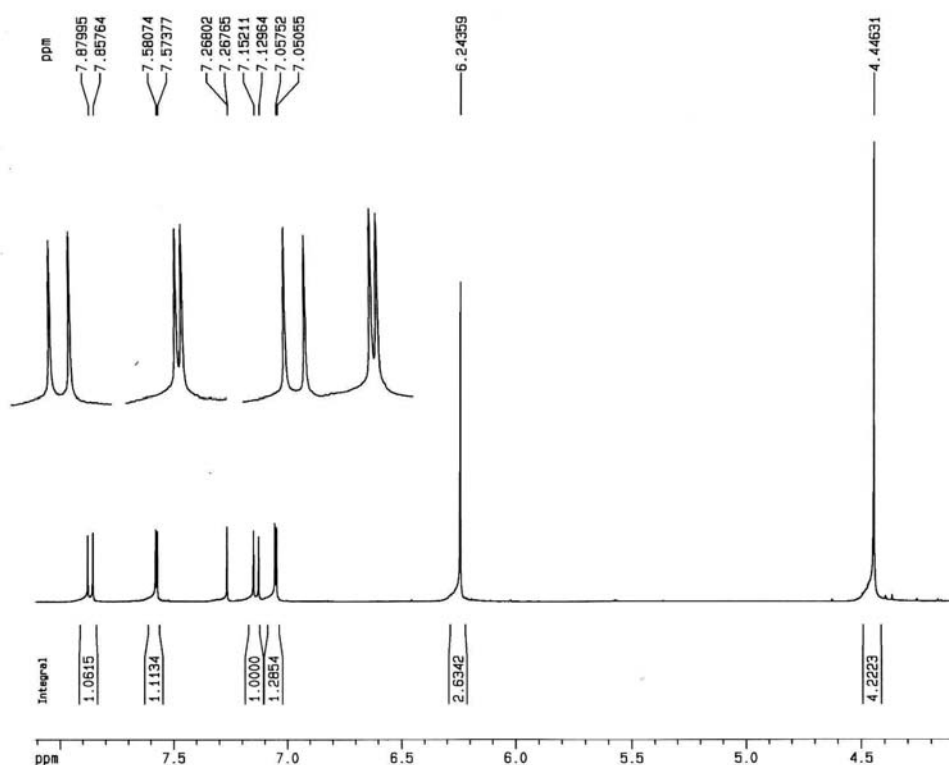


FIGURA 3.54. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da kokusagina (**12**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Apesar dos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  serem suficientes para definir a estrutura de **12**, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.55) dessa substância foi adquirido para fins de comparação com seu isômero **15**. Nesse espectro foram observados 13 carbonos, sendo 7 quaternários ( $164,41$ ,  $157,67$ ,  $147,38$ ,  $139,97$ ,  $132,48$ ,  $115,65$  e  $102,36 \delta$ ), 2 CH aromáticos ( $116,73$  e  $108,12$

$\delta$ ), os carbonos característicos do anel furânico, C-2' (143,19  $\delta$ ) e C-3' (104,88  $\delta$ ), C-2'' (102,36  $\delta$ ) do grupo metilenodioxí, e um carbono em 59,19  $\delta$  de metoxila.

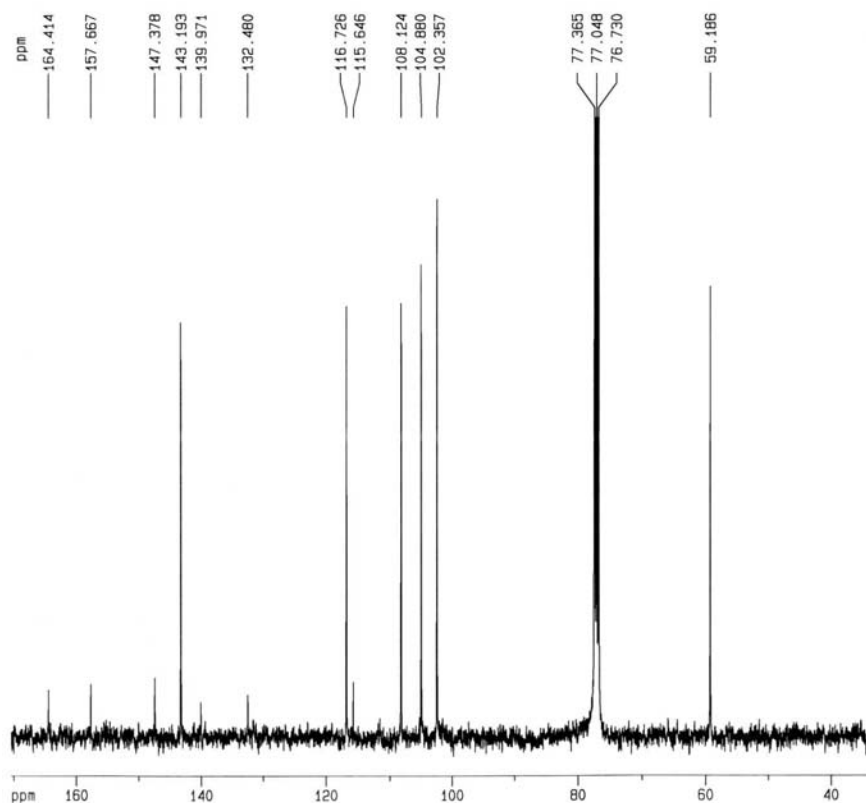


FIGURA 3.55. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da kokusagina (**12**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

O espectro de massas (FIGURA 3.56) de **12** confirmou a estrutura proposta, através do pico do íon molecular em  $m/z$  243 daltons, coerente com a fórmula molecular  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$ .

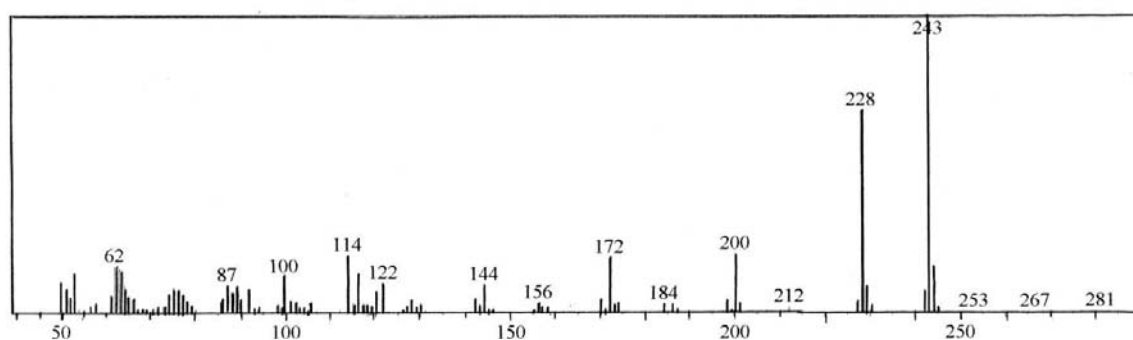


FIGURA 3.56. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da kokusagina (**12**).

Na TABELA 3.11 são descritos os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcalóide kokusagina (**12**).

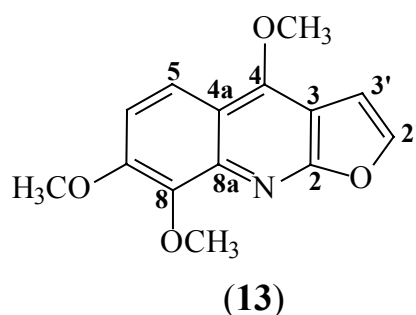
TABELA 3.11. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da kokusagina.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\#}$
2			164,41	164,3
3			115,65	114,8
4			157,67	157,1
4a			102,36	101,8
5	7,87 <i>d</i> ( $J = 8,9$ Hz)	7,88 <i>d</i> ( $J = 8,9$ Hz)	116,73	118,1
6	7,14 <i>d</i> ( $J = 8,9$ Hz)	7,14 <i>d</i> ( $J = 8,9$ Hz)	108,12	111,8
7			139,97	141,9
8			132,48	141,1
8a			147,38	152,0
2'	7,58 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,58 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	143,19	142,8
3'	7,05 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,05 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	104,88	104,6
2''	6,24 <i>s</i>	6,24 <i>s</i>	102,36	-
4-OCH <sub>3</sub>	4,45 <i>s</i>	4,43 <i>s</i>	59,19	61,6
OCH <sub>3</sub>			-	56,7
			-	58,8

\*  $\delta_{\text{H}}$  da kokusagina (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) (MAFEZOLI, 2001); #  $\delta_{\text{C}}$  da esquimianina (SANTOS, 1988).

### 3.6.3. Identificação da esquimianina

O alcalóide esquimianina (**13**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 217-218) e identificado por RMN  $^1\text{H}$  e EM.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.57) da substância **13** apresentou, assim como os alcalóides **11** e **12**, o singlete em 4,44  $\delta$ , relativo a metoxila em C-4 dos alcalóides furoquinolínicos, e os dois dubletos ( $J = 2,8$  Hz) em 7,59 e 7,05  $\delta$ , dos hidrogênios furânicos 2' e 3'.

Assim como para o alcalóide **12**, no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **13** (FIGURA 3.57) observaram-se apenas dois dubletos ( $J = 9,4$  Hz) em 8,03 e 7,19  $\delta$ , que indicaram a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *orto*, os quais foram atribuídos a H-5 e H-6. Estes dados indicaram que C-7 e C-8 deveriam estar substituídos. Por existirem ainda no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dois singletos em 4,12 e 4,04  $\delta$ , relativos a grupos metoxilas, definiu-se a estrutura de **13** como sendo o alcalóide esquimianina, que foi identificado anteriormente em *Almeidea rubra* (SANTOS et al., 1998).

No espectro de massas (FIGURA 3.58) de **13** confirmou-se a estrutura proposta através do pico do íon molecular em  $m/z$  259 daltons, compatível com a fórmula molecular da esquimianina ( $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ).

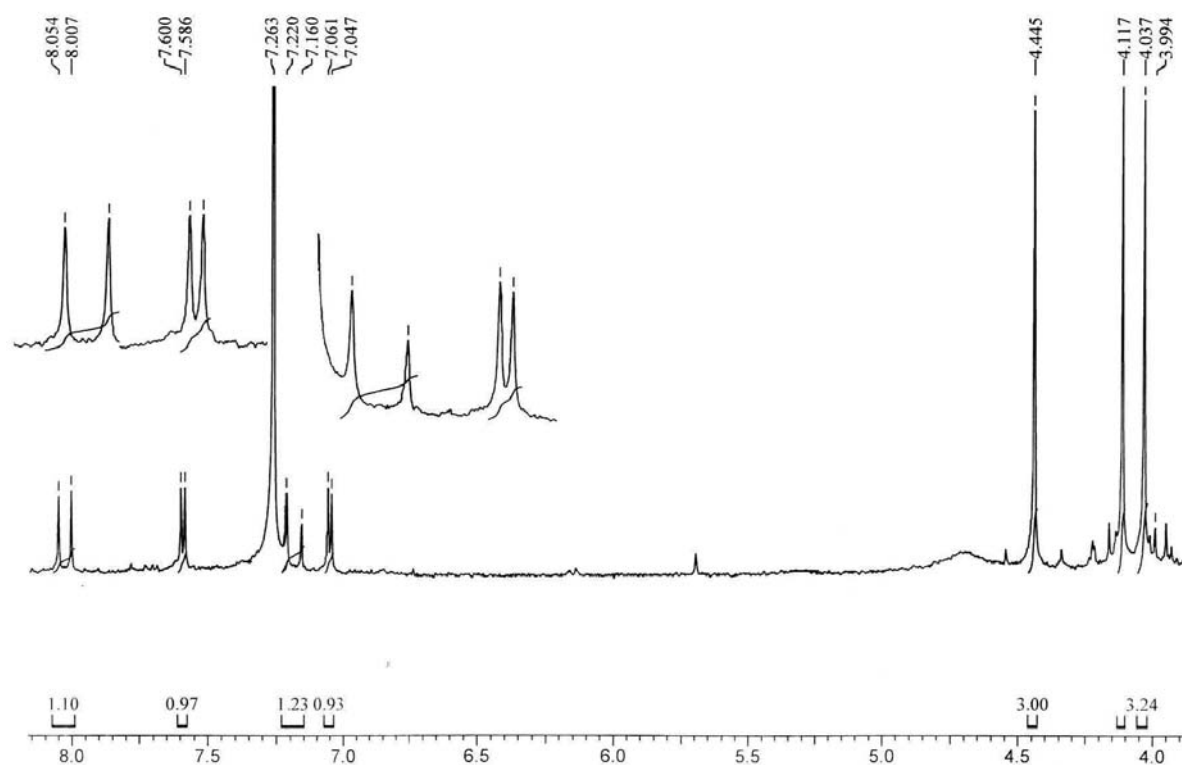


FIGURA 3.57. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da esquimianina (**13**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



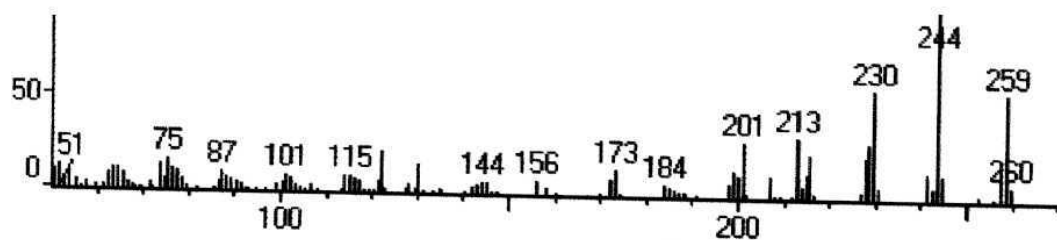


FIGURA 3.58. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da esquimianina (**13**).

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide esquimianina (**13**) são ilustrados na TABELA 3.12.

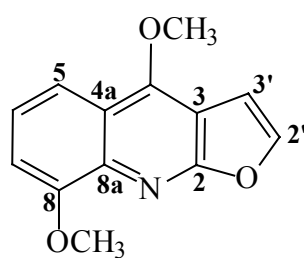
TABELA 3.12. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da esquimianina.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
5	8,03 <i>d</i> ( $J = 9,4$ Hz)	8,03 <i>d</i> ( $J = 9,3$ Hz)
6	7,19 <i>d</i> ( $J = 9,4$ Hz)	7,24 <i>d</i> ( $J = 9,3$ Hz)
2'	7,59 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,59 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)
3'	7,05 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,05 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)
4-OCH <sub>3</sub>	4,44 <i>s</i>	4,44 <i>s</i>
OCH <sub>3</sub>	4,12 <i>s</i>	4,11 <i>s</i>
	4,04 <i>s</i>	4,03 <i>s</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  da esquimianina (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) (CUCA S. et al., 1998).

### 3.6.4. Identificação da $\delta$ -fagarina

O alcalóide  $\delta$ -fagarina (**14**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 212-214) e identificado por RMN  $^1\text{H}$  e EM.



(**14**)

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.59) do alcalóide **14** observaram-se o singlete em 4,46  $\delta$ , da metoxila em C-4 nos alcalóides furoquinolínicos, e os hidrogênios furânicos 2' e 3', em 7,65 ( $d$ ,  $J = 2,8$  Hz) e 7,09  $\delta$  ( $d$ ,  $J = 2,8$  Hz).

O sinal mais desblindado (7,85  $\delta$ ) no espectro, referente a H-5, ocorreu como um duplodubleto ( $J = 8,4$  e 1,2 Hz), sugerindo a presença dos hidrogênios H-6 e H-7. Como o sinal em 7,37  $\delta$  apresentou-se como um duplodubleto com constantes de acoplamento grandes *orto* ( $J = 8,4$  e 8,4 Hz), ele foi atribuído a H-6. Desta forma, o outro sinal de hidrogênio aromático, em 7,07  $\delta$  ( $dd$ ,  $J = 8,4$  e 1,2 Hz), foi atribuído a H-7.

A substituição em C-8 foi definida como uma metoxila, por no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.59) ser observado um singlete em 4,09  $\delta$  (3H).

Assim, o alcalóide **14** foi identificado como a  $\delta$ -fagarina, que não havia sido isolada do gênero *Almeidea*, mas que é amplamente distribuída na família Rutaceae (MESTER, 1983).

O espectro de massas (FIGURA 3.60) confirmou a identificação de **14** através do pico em  $m/z$  229 daltons, coerente com a fórmula molecular da  $\delta$ -fagarina ( $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ).

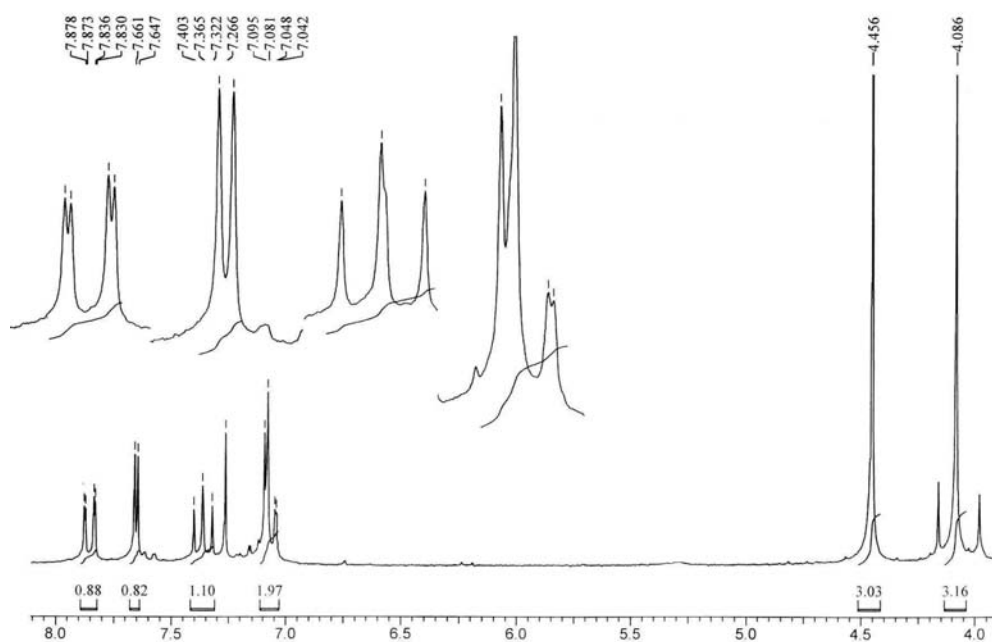


FIGURA 3.59. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da  $\delta$ -fagarina (**14**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

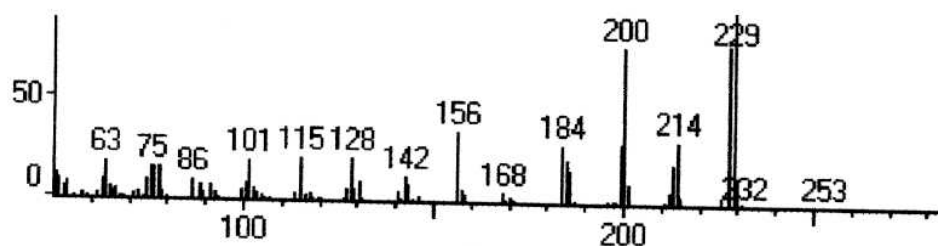


FIGURA 3.60. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da  $\delta$ -fagarina (**14**).

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide **14** são mostrados na TABELA 3.13.

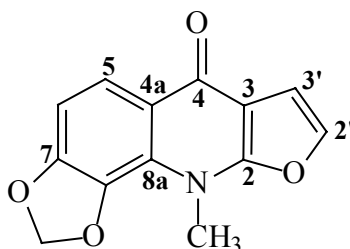
TABELA 3.13. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da  $\delta$ -fagarina.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
5	7,85 <i>dd</i> ( $J = 8,4$ e $1,2$ Hz)	7,85 <i>dI</i> ( $J = 8,5$ Hz)
6	7,37 <i>dd</i> ( $J = 8,4$ e $8,4$ Hz)	7,34 <i>ddd</i> ( $J = 8,5, 7,8$ e $0,9$ Hz)
7	7,07 <i>dd</i> ( $J = 8,4$ e $1,2$ Hz)	7,07 <i>dI</i> ( $J = 7,8$ Hz)
2'	7,65 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,65 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)
3'	7,09 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)	7,09 <i>d</i> ( $J = 2,8$ Hz)
4-OCH <sub>3</sub>	4,46 <i>s</i>	4,44 <i>s</i>
OCH <sub>3</sub>	4,09 <i>s</i>	4,07 <i>s</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  da  $\delta$ -fagarina (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) (CUCA S. et al., 1998).

### 3.6.5. Identificação da isokokusagina

O alcalóide isokokusagina (**15**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 216-217) e caracterizado por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



(15)

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.61) da substância **15** foram observados dois dubletos ( $J = 2,3$  Hz) em 7,14 e 7,29  $\delta$ , relativos aos hidrogênios em um anel furânico, e um singlete em 4,14  $\delta$  (3H), referente a uma metila ligada a um heteroátomo; além de dois sinais de hidrogênios aromáticos em relação *orto* ( $J = 8,6$  Hz), em 8,18 e 6,96  $\delta$ , e de um singlete em 6,13  $\delta$  (2H), relativo a um grupo metilenodioxí.

Desta forma, o espectro da substância **15** mostrou-se bastante semelhante ao do alcalóide kokusagina (**12**). Entretanto, o singlete em 4,45  $\delta$ , que em conjunto com os hidrogênios furânicos, é característico de um núcleo furoquinolínico, estava mais blindado para **15**. Estes dados sugeriram alguma modificação no esqueleto furoquinolínico.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.62) de **15**, em contraste do que para **12**, não foi observado o carbono metoxílico em 59,19  $\delta$ , mas um carbono em 34,20  $\delta$ , sugerindo a presença de uma *N*-metila ao invés de *O*-metila. Adicionalmente, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou um carbono carbonílico em 195,82  $\delta$ , indicando a isomerização do esqueleto furoquinolínico para furoquinolônico.

Assim, a substância **15** foi definida como o alcalóide isokokusagina, que não tinha sido descrita no gênero *Almeidea*.

O espectro de massas de **15** (FIGURA 3.63) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  243 daltons, confirmando a fórmula molecular  $C_{13}H_9NO_4$  da isokokusagina.

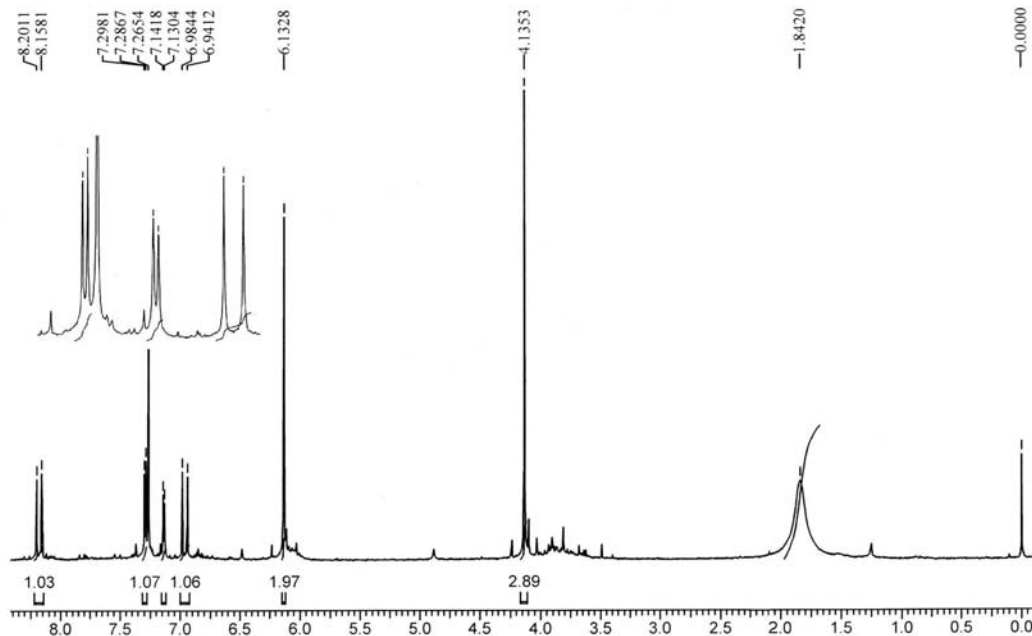


FIGURA 3.61. Espectro de RMN  $^1H$  da isokokusagina (**15**) ( $CDCl_3$ , 200 MHz).

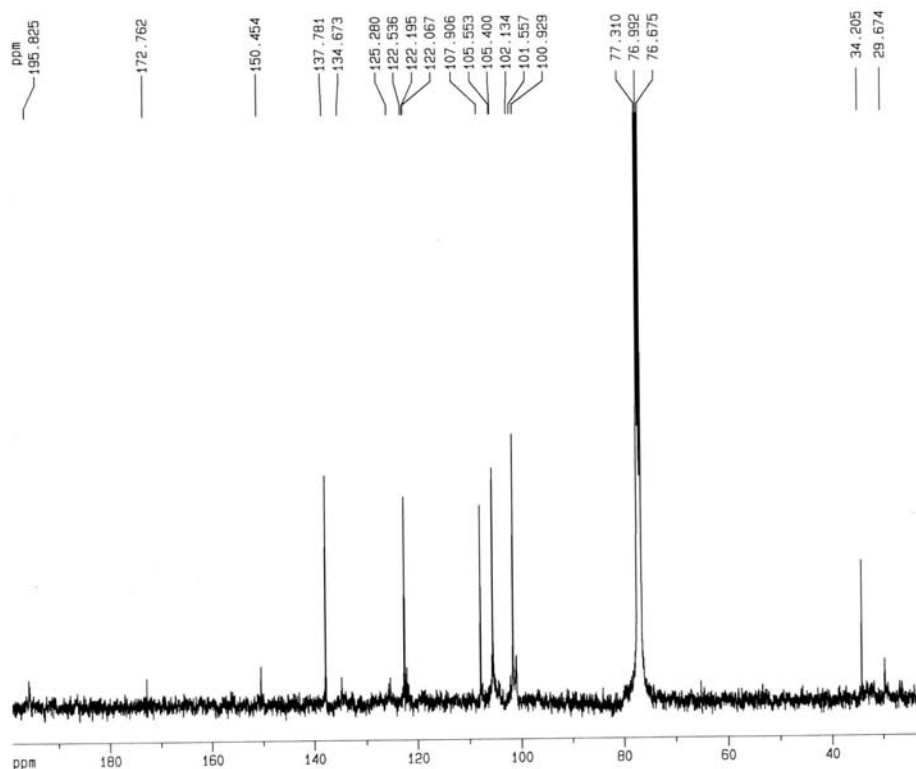


FIGURA 3.62. Espectro de RMN  $^{13}C$  da isokokusagina (**15**) ( $CDCl_3$ , 100 MHz).

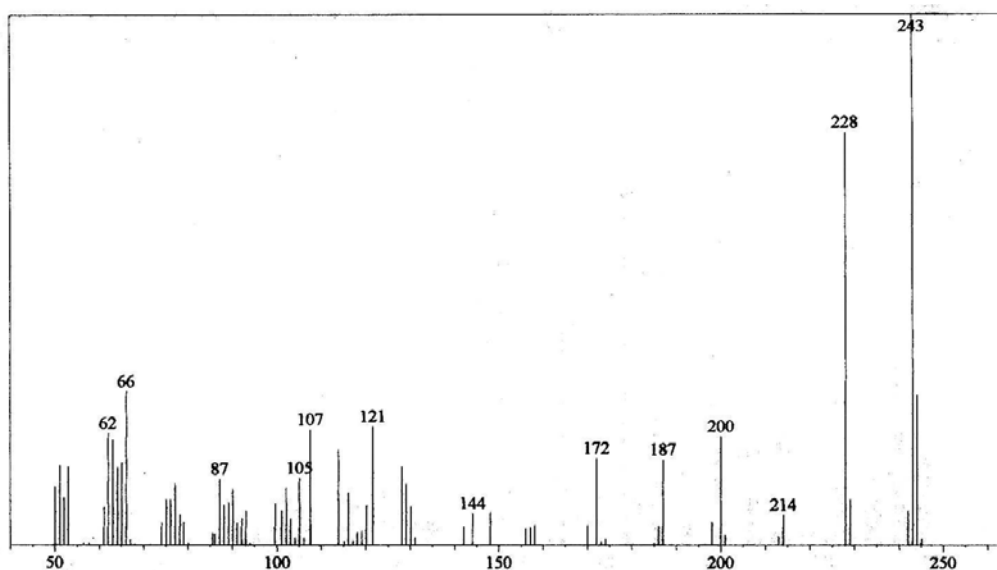


FIGURA 3.63. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da isokokusagina (**15**).

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcalóide isokokusagina (**15**), descritos na TABELA 3.14, foram atribuídos através da análise dos espectros e por comparação com valores da iso- $\delta$ -fagarina (WU et al., 1999).

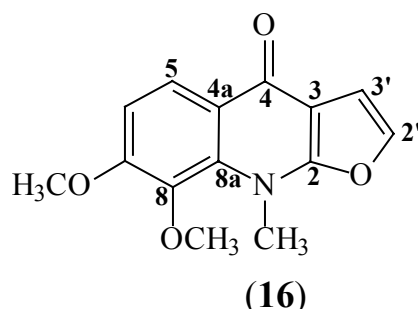
TABELA 3.14. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da isokokusagina.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2			n.d	157,2
3			n.d.	111,2
4			195,82	183,7
4a			134,67	131,4
5	8,18 <i>d</i> ( $J = 8,6$ Hz)	8,02 <i>dd</i> ( $J = 7,9$ e 1,9 Hz)	122,54	123,9
6	6,96 <i>d</i> ( $J = 8,6$ Hz)	7,28 <i>t</i> ( $J = 7,9$ Hz)	105,55	119,9
7	-	7,35 <i>dd</i> ( $J = 7,9$ e 1,9 Hz)	n.d.	115,7
8			n.d.	131,8
8a			150,45	152,0
2'	7,29 <i>d</i> ( $J = 2,3$ Hz)	7,56 <i>d</i> ( $J = 2,2$ Hz)	137,78	139,7
3'	7,14 <i>d</i> ( $J = 2,3$ Hz)	6,94 <i>d</i> ( $J = 2,2$ Hz)	107,91	108,2
2''	6,13 <i>s</i>	-	101,56	-
<i>N</i> -CH <sub>3</sub>	4,14 <i>s</i>	4,20 <i>s</i>	34,20	37,7
<i>O</i> -CH <sub>3</sub>	-	4,01 <i>s</i>	-	57,3

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  da iso- $\delta$ -fagarina ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400 e 100 MHz) (WU et al., 1999); n.d. = não determinado.

### 3.6.6. Identificação da isoesquimianina

O alcalóide isoesquimianina (**16**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 216-217) e caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.64) de **16** apresentou os dubletos ( $J = 2,3$  Hz) dos hidrogênios furânicos 2' e 3', em 7,28 e 7,05  $\delta$ , e um singlete de metila ligada a heteroátomo, em 4,19  $\delta$ . Adicionalmente, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.65) foram observados um carbono de  $N\text{-CH}_3$  em 35,83  $\delta$ , e um carbono carbonílico em 202,73  $\delta$ , que sugeriram a natureza da substância **16** ser idêntica a do alcalóide **15**, ou seja, de um alcalóide furoquinolônico.

Dois dubletos ( $J = 9,1$  Hz) de hidrogênios aromáticos, em 8,34 e 7,05  $\delta$ , e dois singletos relativos a duas metoxilas, em 4,01 e 3,88  $\delta$ , indicaram a substituição do núcleo furoquinolônico em C-7 e C-8 por grupos metoxilas e, portanto, demonstraram a identidade de **15** como a isoesquimianina, que é isômero do alcalóide **13**, e que não tinha sido isolada de *Almeidea*, mas já era relatada na natureza (BERINZAGHI et al., 1943). Os dados espectroscópicos desta substância estão ilustrados na TABELA 3.15.

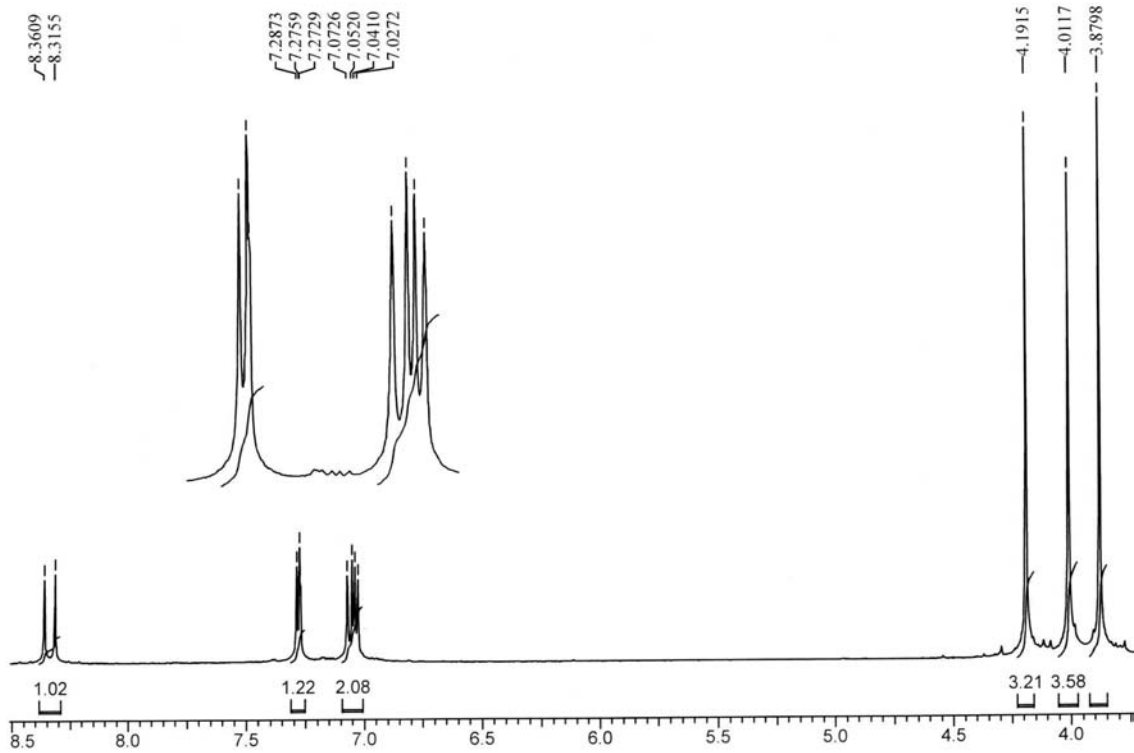


FIGURA 3.64. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da isoesquimianina (**16**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

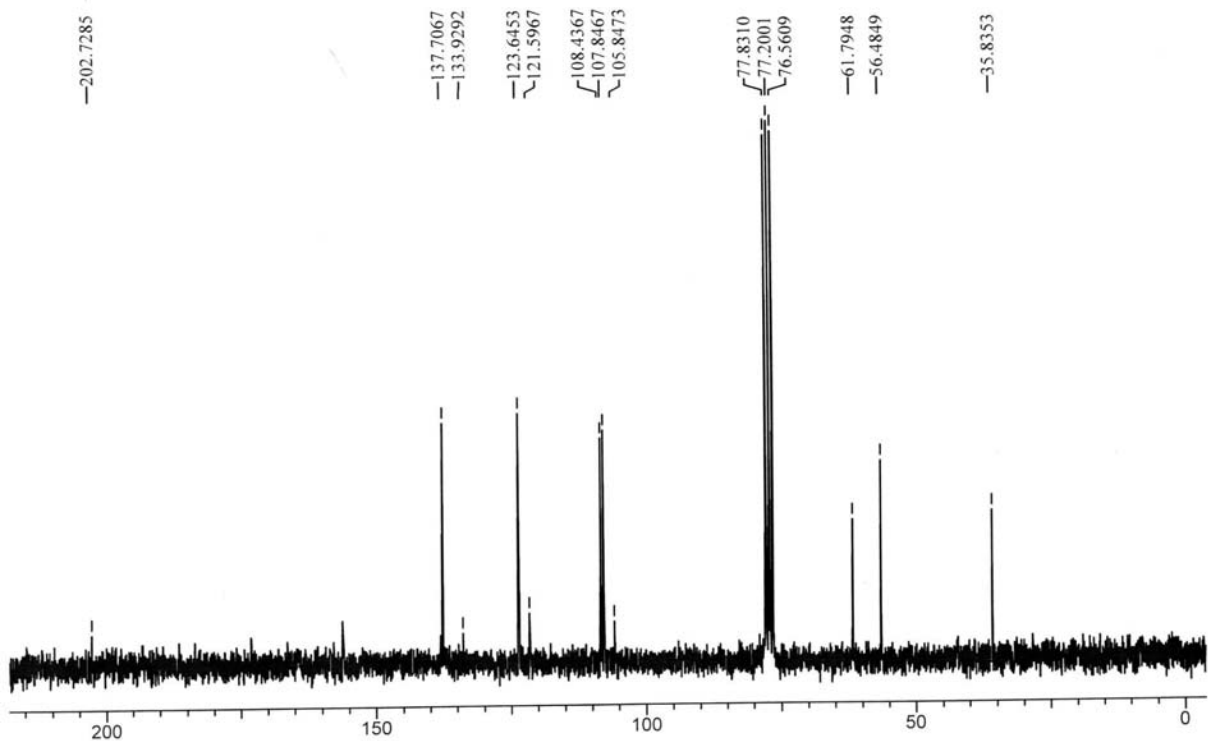


FIGURA 3.65. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da isoesquimianina (**16**) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).



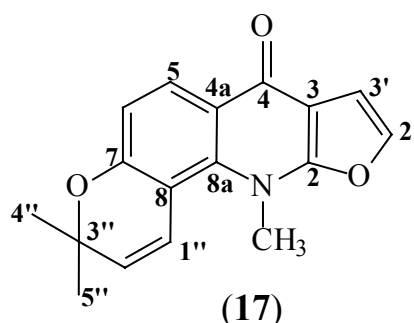
TABELA 3.15. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da isoesquimianina.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2		156,23
3		n.d.
4		202,73
4 <sup>a</sup>		133,92
5	8,34 <i>d</i> (J = 9,1 Hz)	123,65
6	7,05 <i>d</i> (J = 9,1 Hz)	108,44
7		n.d.
8		n.d.
8 <sup>a</sup>		n.d.
2'	7,28 <i>d</i> (J = 2,3 Hz)	137,71
3'	7,05 <i>d</i> (J = 2,3 Hz)	107,85
<u>N-CH<sub>3</sub></u>	4,19 <i>s</i>	35,83
<u>O-CH<sub>3</sub></u>	4,01 <i>s</i>	61,79
	3,88 <i>s</i>	56,48

n.d. = não determinado

### 3.6.7. Identificação da isodutaduprina

O alcalóide isodutaduprina (**17**) foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 216-217) e identificado por RMN  $^1\text{H}$ .



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.66) da substância **17** foram observados os dois dubletos ( $J = 2,0$  Hz) dos hidrogênios furânicos 2' e 3', em

7,30 e 7,04  $\delta$ , e o singlete em 3,96  $\delta$ , relativo a uma *N*-CH<sub>3</sub>, que indicaram a identidade de **17** como uma alcalóide furoquinolônico.

Esse espectro apresentou também dois sinais de hidrogênios aromáticos, em 8,35 e 6,90  $\delta$ , e os sinais relativos a um anel 2,2-dimetilcromeno em 6,75 (1H, *d*<sub>l</sub>, *J* = 10,0 Hz), 5,64 (1H, *d*, *J* = 10,0 Hz) e 1,53  $\delta$  (6H, *s*). O sinal mais desblindado, referente à H-5, ocorreu como um dubleto, sugerindo que as posições C-7 e C-8 estariam substituídas. Pelas evidências anteriormente descritas, a substituição deveria ocorrer pelo anel 2,2-dimetilcromeno, e este poderia estar posicionado de duas formas: com o oxigênio em C-7 ou em C-8. A substituição de C-7 pelo oxigênio do anel 2,2-dimetilcromeno foi atribuída como a correta, pois se observou no espectro de NOE (FIGURA 3.67) o incremento do singlete da *N*-CH<sub>3</sub> (3,96  $\delta$ ) ao se irradiar o sinal de H-1' (6,75  $\delta$ ). Essa posição do anel 2,2-dimetilcromeno também explica o “alargamento” dos sinais de H-6 e de H-1', que acoplam em *w* estendido.

Desta forma, a substância **17** foi identificada como o alcalóide isodutaduprina, que tinha sido isolada anteriormente de *A. coerulea* (SANTOS et al., 1998) e cujo isômero dutaduprina também havia sido relatado para essa espécie (MAFEZOLI, 2001; SANTOS et al., 1998).

A comparação dos dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H da isodutaduprina (**17**) com os de literatura (SANTOS, 1988), na TABELA 3.16, confirmaram a estrutura proposta.

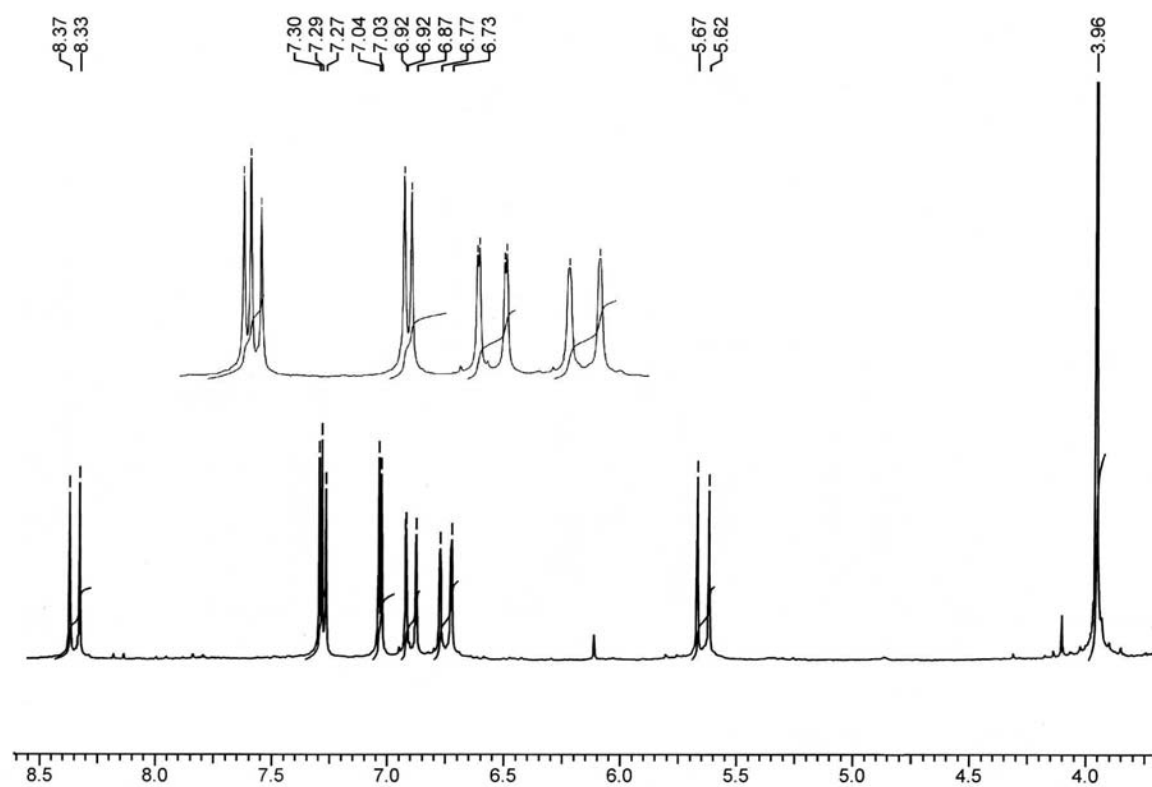


FIGURA 3.66. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da isodutaduprina (**17**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

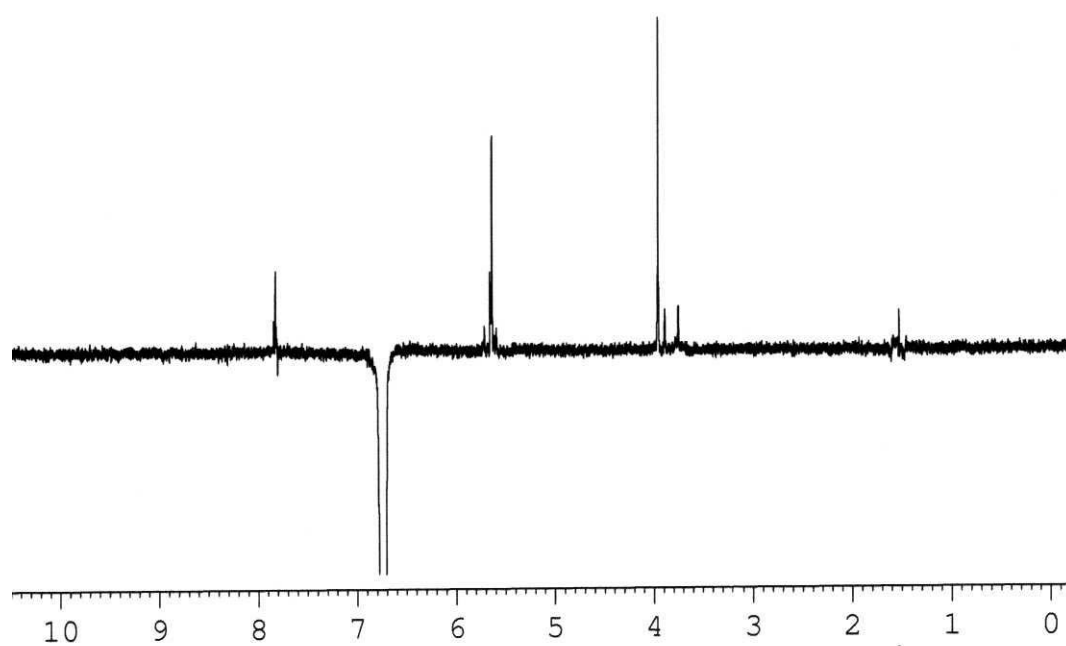


FIGURA 3.67. Espectro de NOE da isodutaduprina (**17**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

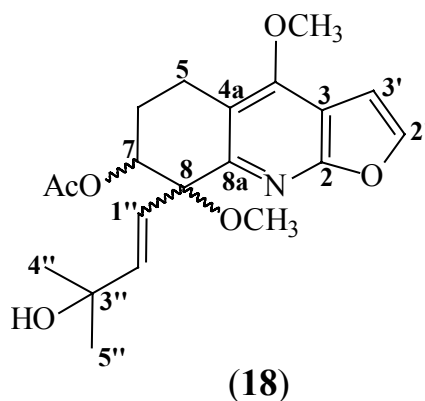
TABELA 3.16. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da isodutaduprina.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
5	8,35 <i>d</i> ( $J = 8,0$ Hz)	8,30 <i>d</i> ( $J = 9$ Hz)
6	6,90 <i>dd</i> ( $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)	6,87 <i>d</i> ( $J = 9$ Hz)
2'	7,30 <i>d</i> ( $J = 2,0$ Hz)	7,23 <i>d</i> ( $J = 3$ Hz)
3'	7,04 <i>d</i> ( $J = 2,0$ Hz)	6,96 <i>d</i> ( $J = 3,0$ Hz)
1''	6,75 <i>d</i> ( $J = 10,0$ Hz)	6,73 <i>d</i> ( $J = 10$ Hz)
2''	5,64 <i>d</i> ( $J = 10,0$ Hz)	5,60 <i>d</i> ( $J = 10$ Hz)
4'' e 5''	1,53 <i>s</i>	1,50 <i>s</i>
$\text{N-CH}_3$	3,96 <i>s</i>	3,85 <i>s</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  da isodutaduprina ( $\text{CDCl}_3$ , 80 MHz) (SANTOS, 1988).

### 3.6.8. Identificação do alcalóide tetraidrofuroquinolínico

O alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18** foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 219-220) e caracterizado por EM e RMN em uma e duas dimensões.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **18** (FIGURA 3.68) apresentou os dubletos ( $J = 2,6$  Hz) em  $7,58$  e  $6,97$   $\delta$ , referentes aos hidrogênios furânicos 2' e 3', e o singlete em  $4,30$   $\delta$  de metoxila, que caracterizam um alcalóide com esqueleto furoquinolínico. Entretanto, a ausência de sinais relativos a outros

hidrogênios aromáticos e a blindagem da metoxila em C-4 (4,30 ao invés de 4,4  $\delta$ ) sugeriram que o núcleo furoquinolínico seria reduzido no alcalóide **18**.

A natureza de **18** como um alcalóide tetraidrofuroquinolínico foi confirmada através dos multipletos em 2,78 (2H), 2,20 (1H) e 2,01  $\delta$  (1H). Adicionalmente, foram observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ : dois singletos em 3,14 e 2,03  $\delta$ , relativos a uma metoxila e a uma metila de acetato; um sinal (*dd*,  $J = 8,5$  e  $2,9$  Hz) de hidrogênio acetilcarbinólico em 5,43  $\delta$ ; outros dois dubletos ( $J = 16,1$  Hz) em 6,06 e 5,69  $\delta$ , de hidrogênios olefínicos em relação *trans*; e dois sinais de metilas terciárias sobre carbono oxigenado, em 1,34 e 1,31  $\delta$ .

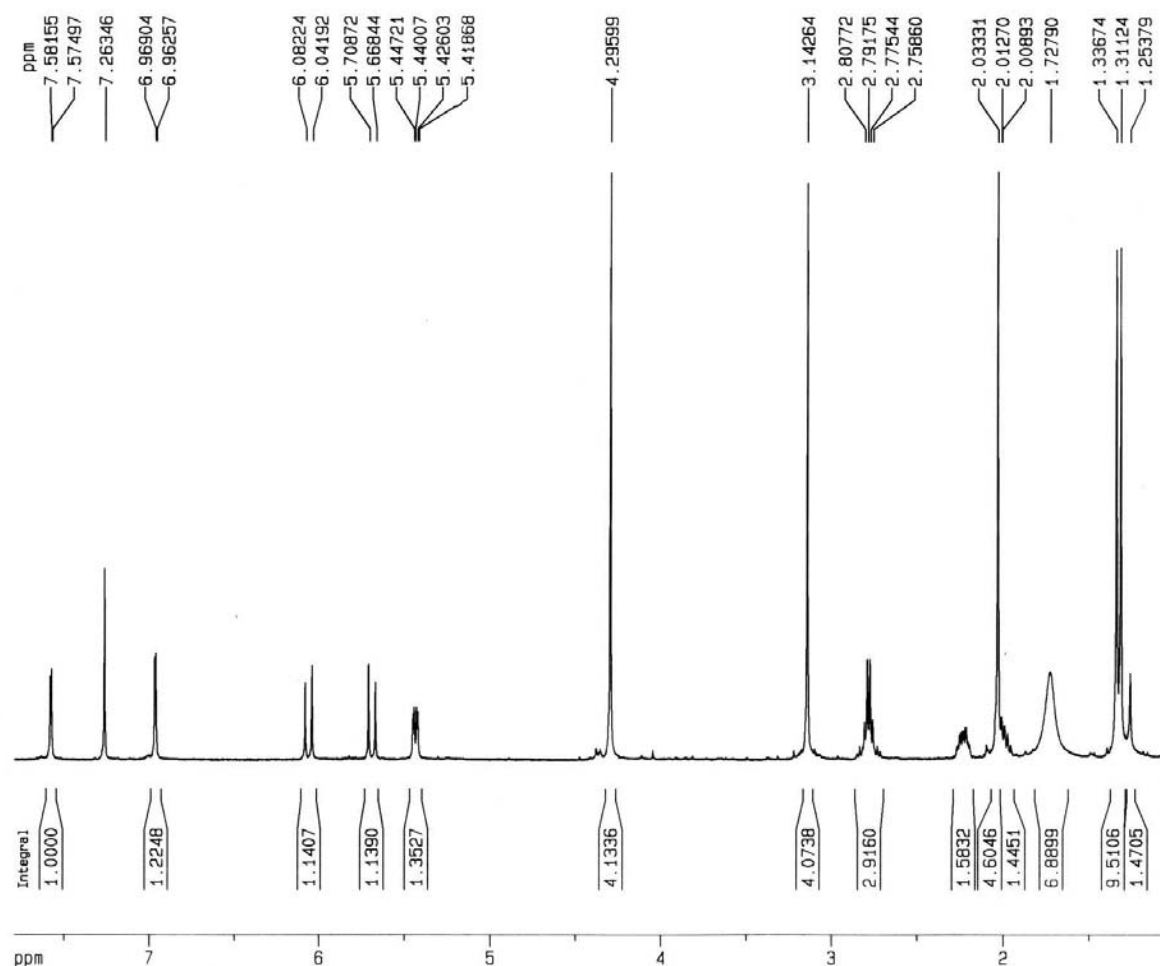
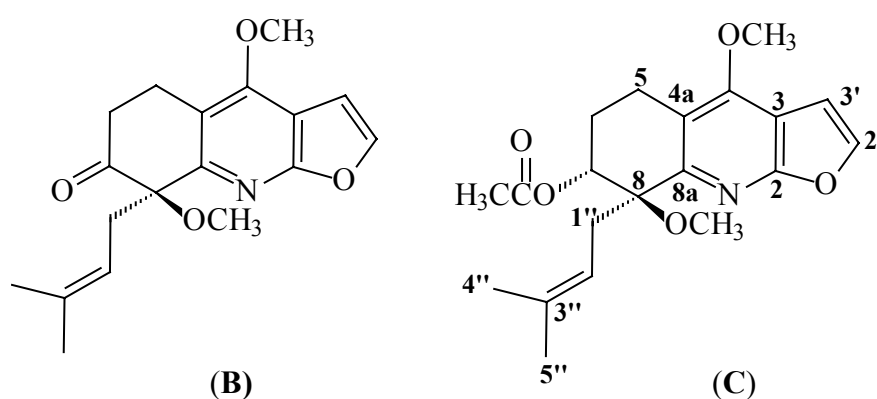
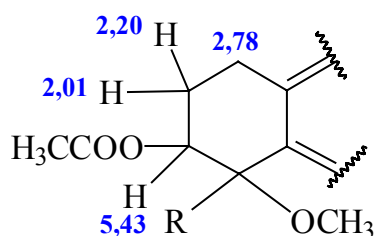


FIGURA 3.68. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A diidroperfamina (**B**) (RÓZSA et al., 1986) e a 7-*O*-acetilhaplofilidina (**C**) (SANTOS et al., 1998) são exemplos de alcalóides tetraidrofuroquinolínicos, sendo que este último apresenta dados espectrais bastante semelhantes com o alcalóide **18**, diferenciando-se apenas no substituinte em C-8, que em **C** é um grupo  $\gamma,\gamma$ -dimetilalil e em **18**, os dados espectrais indicaram ser um substituinte 3-hidroxi-2-isopentenila.



No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.69) de **18**, observaram-se os acoplamentos entre o hidrogênio acetilcarbinólico (em 5,43  $\delta$ ) e os hidrogênios em 2,01 e 2,20  $\delta$ , destes entre si, e também com os hidrogênios em 2,78  $\delta$ . Isto evidenciou que os hidrogênios metilênicos em 2,01 e 2,20  $\delta$  eram vicinais ao hidrogênio acetilcarbinólico (H-7) e aos metilênicos em 2,78  $\delta$ , referentes a H-5, como é ilustrado abaixo.



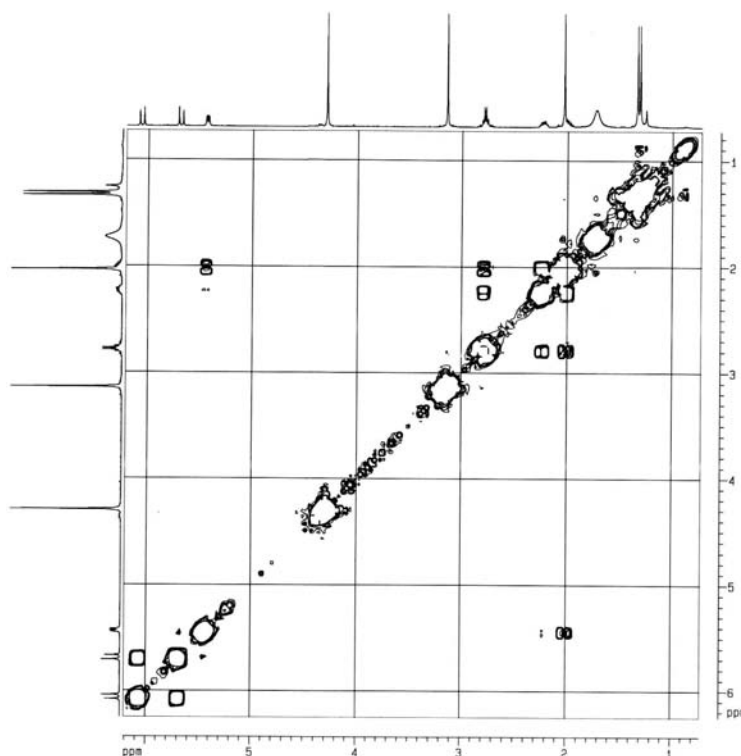
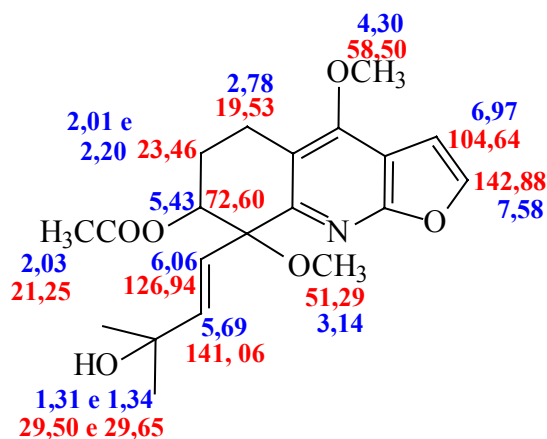


FIGURA 3.69. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.70) e do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 3.71) permitiu as atribuições de deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados e a definição de oito carbonos quaternários (170,33, 162,74, 158,24, 150,01, 117,64, 105,20, 79,71 e 70,77  $\delta$ ) na molécula.



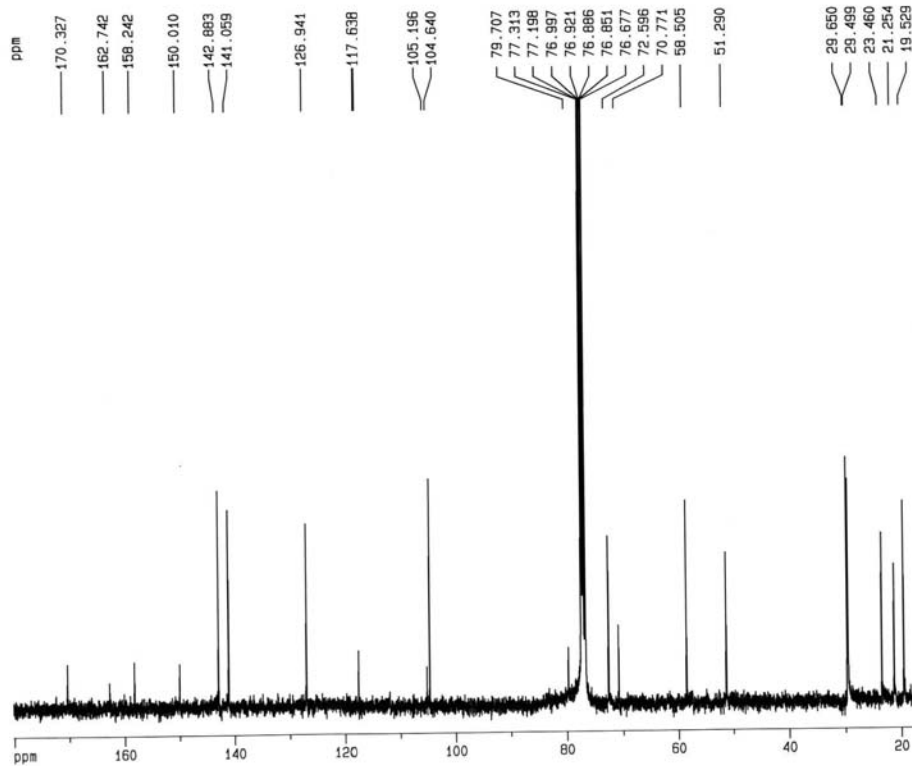


FIGURA 3.70. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

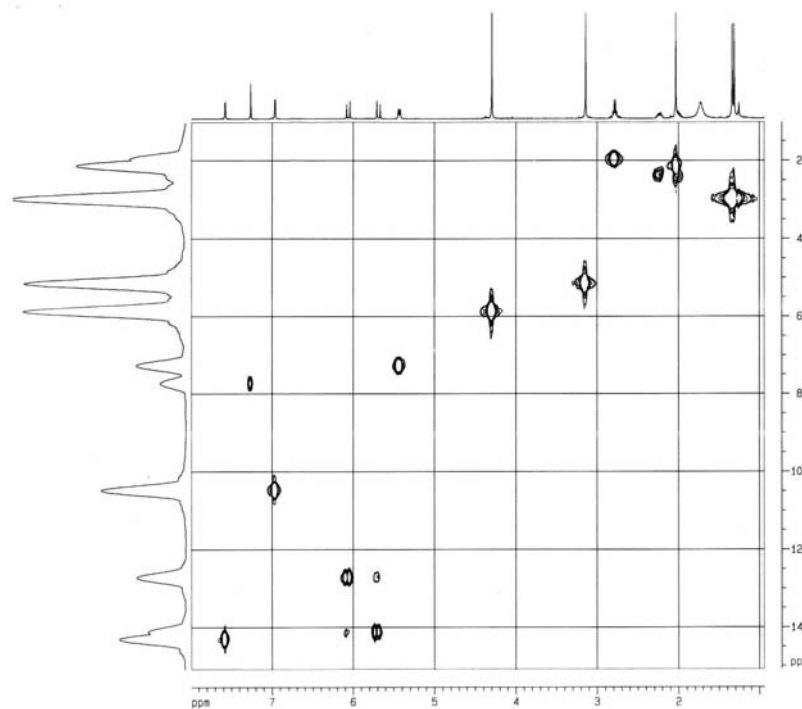


FIGURA 3.71. Mapa de contorno de HSQC do alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foram atribuídos através das correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 3.72).

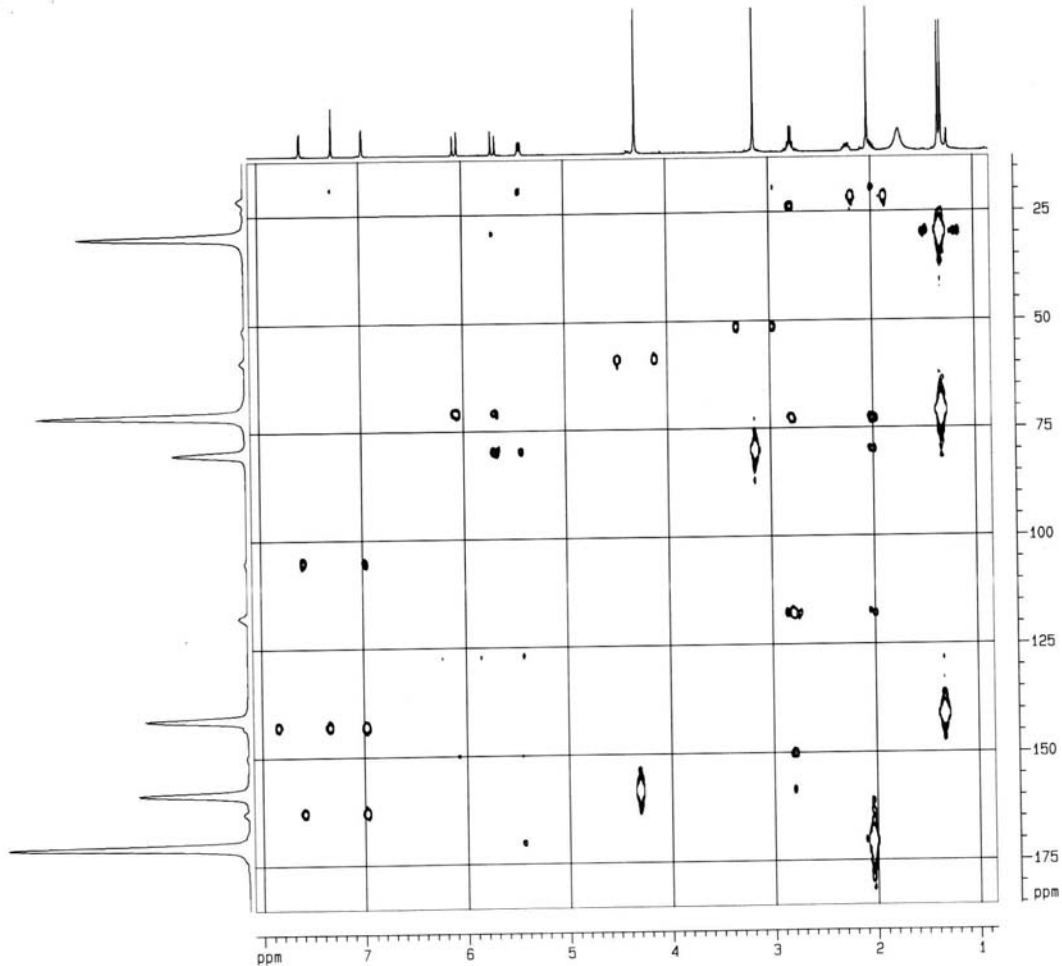
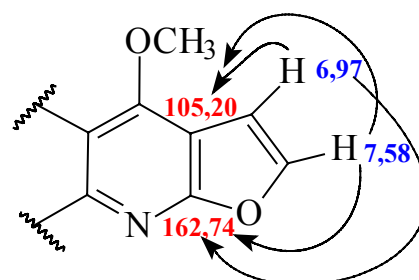
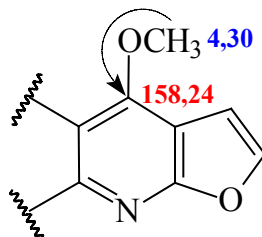


FIGURA 3.72. Mapa de contorno de HMBC do alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

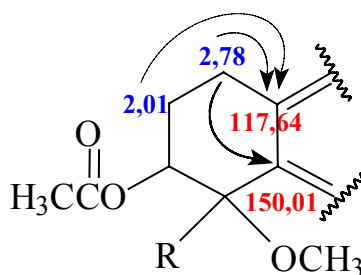
A correlação de H-2' (7,58  $\delta$ ) e H-3' (6,97  $\delta$ ) com os carbonos em 162,74 e 105,20  $\delta$  definiu C-2 e C-3, respectivamente.



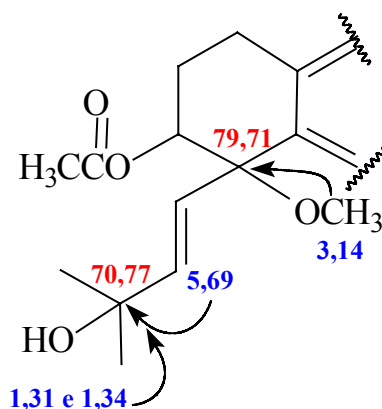
O carbono 4 foi definido através da correlação dos hidrogênios da metoxila, em 4,30  $\delta$ , com o carbono em 158,24  $\delta$ .



H-5 (2,78  $\delta$ ) e H-6 (2,01  $\delta$ ) correlacionaram com um mesmo carbono em 117,64  $\delta$ , que foi atribuído a C-4a. E a correlação de H-5 com outro carbono em 150,01  $\delta$ , definiu C-8a.



C-8 foi atribuído através da correlação da metoxila em 3,14  $\delta$ , com o carbono em 79,71  $\delta$ . Já a correlação de H-2'' (5,69  $\delta$ ) e dos hidrogênios das metilas (1,31 e 1,34  $\delta$ ) com um mesmo carbono (70,77  $\delta$ ) definiu C-3''.



Vale ressaltar, que as estereoquímicas relativas de C-7 e C-8 não puderam ser determinadas através dos experimentos de RMN realizados. Em um experimento de NOE no qual se irradiou os hidrogênios metoxílicos (em 3,14  $\delta$ ) e/ou o hidrogênio olefínico 1'' (em 6,06  $\delta$ ) não se observou o incremento do

sinal referente ao hidrogênio acetilcarbinólico (em 5,43  $\delta$ ), não permitindo, portanto, a determinação da estereoquímica de C-8.

No espectro de massas do alcalóide **18** (FIGURA 3.73) não foi observado o pico do íon molecular em  $m/z$  375 daltons, compatível com a fórmula molecular  $C_{20}H_{25}NO_6$ , mas o pico em  $m/z$  326, resultante da perda de um grupo metoxila e de uma molécula de água.

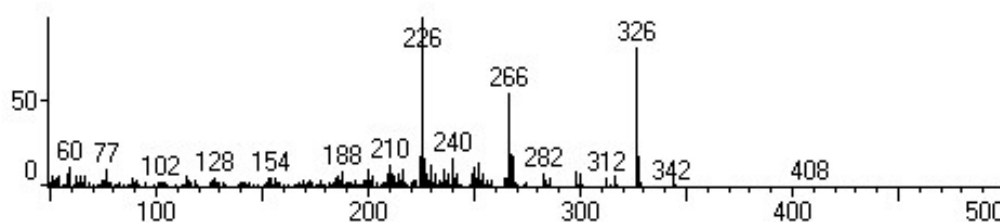


FIGURA 3.73. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do alcalóide tetraidrofuroquinolínico **18**.

Desta forma, a estrutura do alcalóide **18** foi detalhadamente definida e esta sendo, pela primeira vez, citada na literatura. Seus dados espectroscópicos de RMN foram atribuídos através da análise dos espectros e por comparação com os dados da 7-*O*-acetilhaplofilidina (**C**) (SANTOS et al., 1998) e estão descritos na TABELA 3.17.

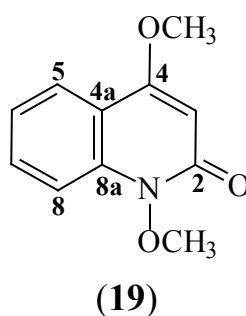
TABELA 3.17. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcalóide tetraidrofuroquinolínico.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2			162,74	161,5
3			105,20	116,4
4			158,24	157,6
4a			117,64	104,4
5	2,78 <i>m</i>	n.d.	19,53	17,9
6	2,20 <i>m</i>	n.d.	23,46	20,7
7	2,01 <i>m</i>	n.d.	72,60	71,7
8			79,71	76,9
8a			150,01	149,6
2'	7,58 <i>d</i> ( $J = 2,6$ Hz)	7,55 <i>d</i> ( $J = 3$ Hz)	142,88	141,9
3'	6,97 <i>d</i> ( $J = 2,6$ Hz)	6,95 <i>d</i> ( $J = 3$ Hz)	104,64	104,0
1''	6,06 <i>d</i> ( $J = 16,1$ Hz)	n.d.	126,94	28,5
2''	5,69 <i>d</i> ( $J = 16,1$ Hz)	5,20 <i>m</i>	141,06	118,3
3''			70,77	132,6
4'' e 5''	1,34 e 1,31 <i>s</i>	1,66 e 1,60 <i>s</i>	29,65 e 29,50	25,2 e 17,3
4-OCH <sub>3</sub>	4,30 <i>s</i>	4,28 <i>s</i>	58,50	57,7
8-OCH <sub>3</sub>	3,14 <i>s</i>	3,13 <i>s</i>	51,29	49,8
-OOCCH <sub>3</sub>			170,33	169,2
-OOCCH <sub>3</sub>	2,03 <i>s</i>	1,98 <i>s</i>	21,25	20,7

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  da 7-*O*-acetilhaplofilidina (CDCl<sub>3</sub>, 80 e 20 MHz) (SANTOS et al., 1998); n.d. = não determinado.

### 3.6.9. Identificação da haplotusina

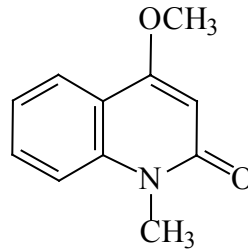
Da fração acetato de etila do extrato metanólico do caule de *Conchocarpus heterophyllus* (AHCMA) foi obtido o alcalóide haplotusina (**19**) (p. 224-225), cuja identificação foi realizada por EM e RMN, em uma e duas dimensões.



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.74) de **19** observaram-se quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos, em 8,00 (*dl*,  $J = 8,0$  Hz), 7,73 (*m*), 7,68 (*m*) e 7,34  $\delta$  (*ddd*,  $J = 8,0$ , 6,4 e 1,6 Hz). As multiplicidades desses sinais indicaram a presença de um anel aromático *orto* dissustituído na substância **19**. Adicionalmente, um singlete em 6,08  $\delta$ , integrado para um hidrogênio, revelou a identidade dessa substância como um alcalóide 4-*R*-2-quinolônico, que é de ocorrência bastante comum em plantas da família Rutaceae (FIGURA 3.51) (MESTER, 1983; WATERMAN, 1999).

Um alcalóide muito comum desta classe é a 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (**D**), que apresenta, assim como **19**, quatro hidrogênios aromáticos num anel *orto* dissustituído, e um hidrogênio (H-3) em 6,05  $\delta$ . Entretanto, eles diferem quanto aos deslocamentos químicos das metilas ligadas a heteroátomos (em **19** elas ocorrem em 4,02 e 4,00  $\delta$  e em **D**, em 3,68 e 3,95  $\delta$ ) (MAFEZOLI, 2001). Estes dados confirmaram a natureza de **19** como um alcalóide do tipo 4-metoxi-2-quinolona, no qual alguma mudança estaria desblindando os sinais das metilas ligadas a heteroátomos. Vale ressaltar, que essas diferenças foram observadas

mesmo no espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido em  $\text{CDCl}_3$ , onde os singletos ocorreram em 4,08 e 3,96  $\delta$ .



(D)

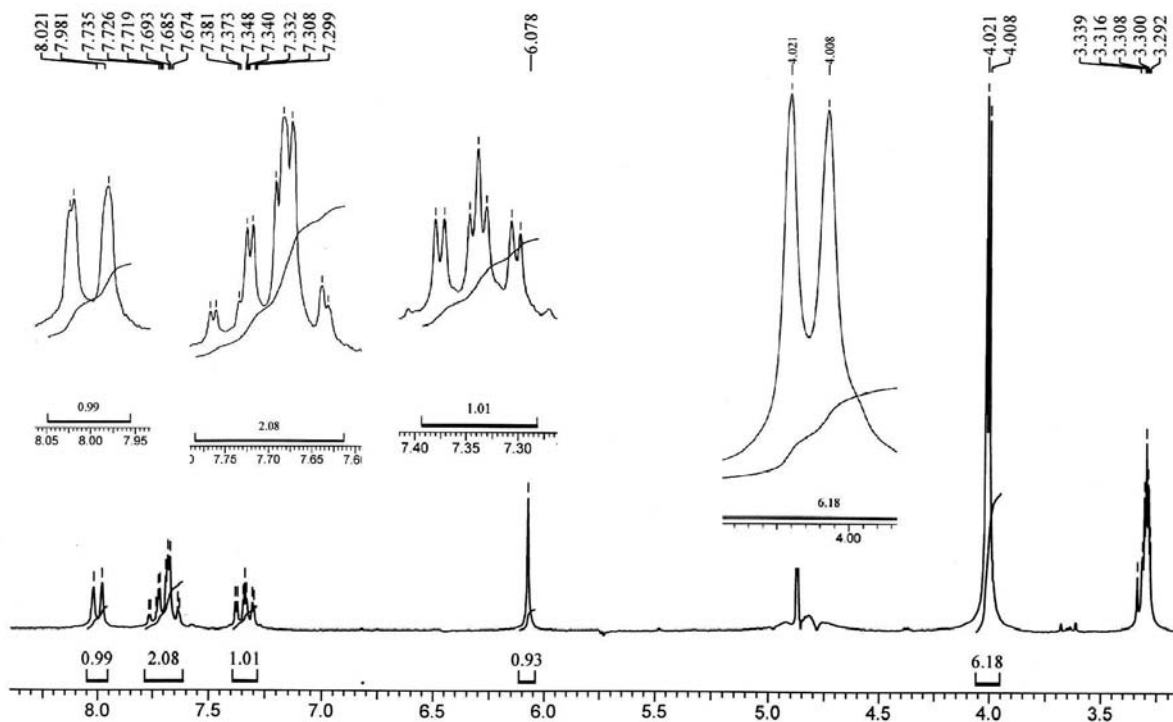


FIGURA 3.74. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da haplotusina (**19**) (MeOD, 200 MHz).

A partir do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **19** (FIGURA 3.75), deduziu-se a ausência de  $N\text{-CH}_3$  na molécula, cujo sinal deveria ocorrer  $\sim 29 \delta$ . Entretanto foram observados um sinal de metoxila aromática não impedida estericamente, em 57,06  $\delta$ , e um outro sinal bastante desblindado em 63,73  $\delta$ . Na estrutura da 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (**D**) seria plenamente aceitável que a metoxila

com um deslocamento químico de 57,06  $\delta$  substituísse C-4. Como não poderia haver na molécula nenhum substituinte no anel aromático, a única posição, na qual a outra metila ligada a heteroátomo (63,73  $\delta$ ) poderia estar, seria no nitrogênio. Já que esta metila era muito desblindada para ser *N*-CH<sub>3</sub>, foi proposto que ela seria *N*-OCH<sub>3</sub>. Isto foi confirmado pelos demais experimentos de RMN e parece ser uma característica bastante rara.

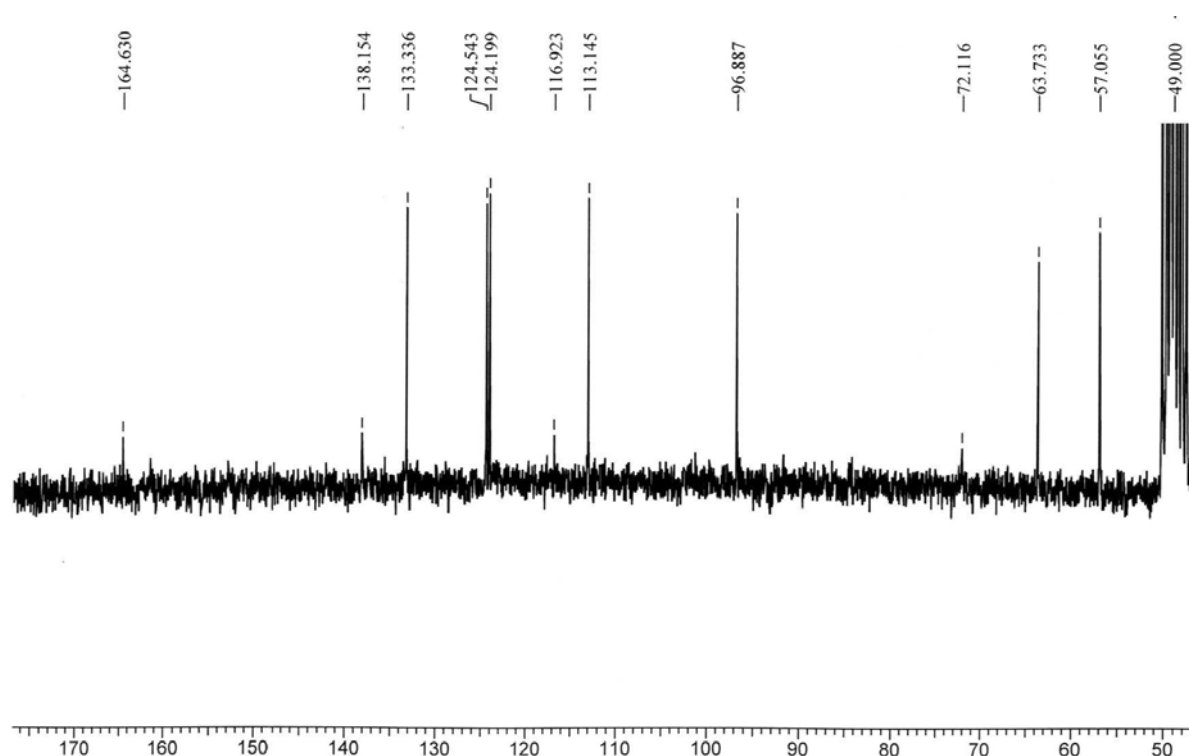


FIGURA 3.75. Espectro de RMN <sup>13</sup>C da haplotusina (**19**) (MeOD, 50 MHz).

A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 3.76), do espectro de RMN <sup>13</sup>C (FIGURA 3.75) e dos dados espectroscópicos da substância modelo **D** (MAFEZOLI, 2001) permitiu que fossem atribuídos alguns valores de deslocamentos químicos. Ressaltando-se, entretanto, que eles foram definidos a partir dos espectros em MeOD.

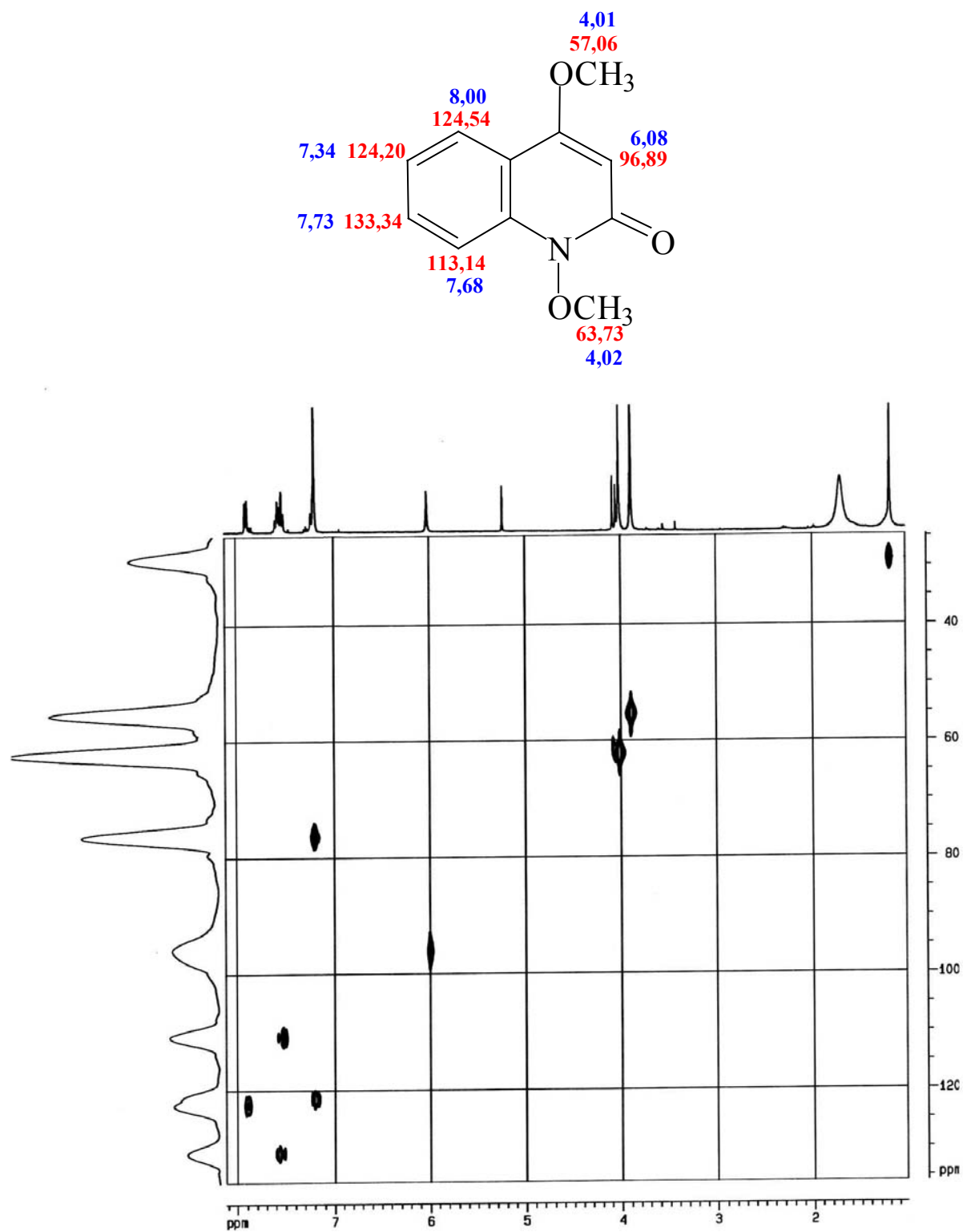


FIGURA 3.76. Mapa de contorno de HSQC da haplotusina (19) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Através da análise do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 3.77) foram definidos os carbonos quaternários do alcalóide **19**, exceto C-2, que não foi observado.

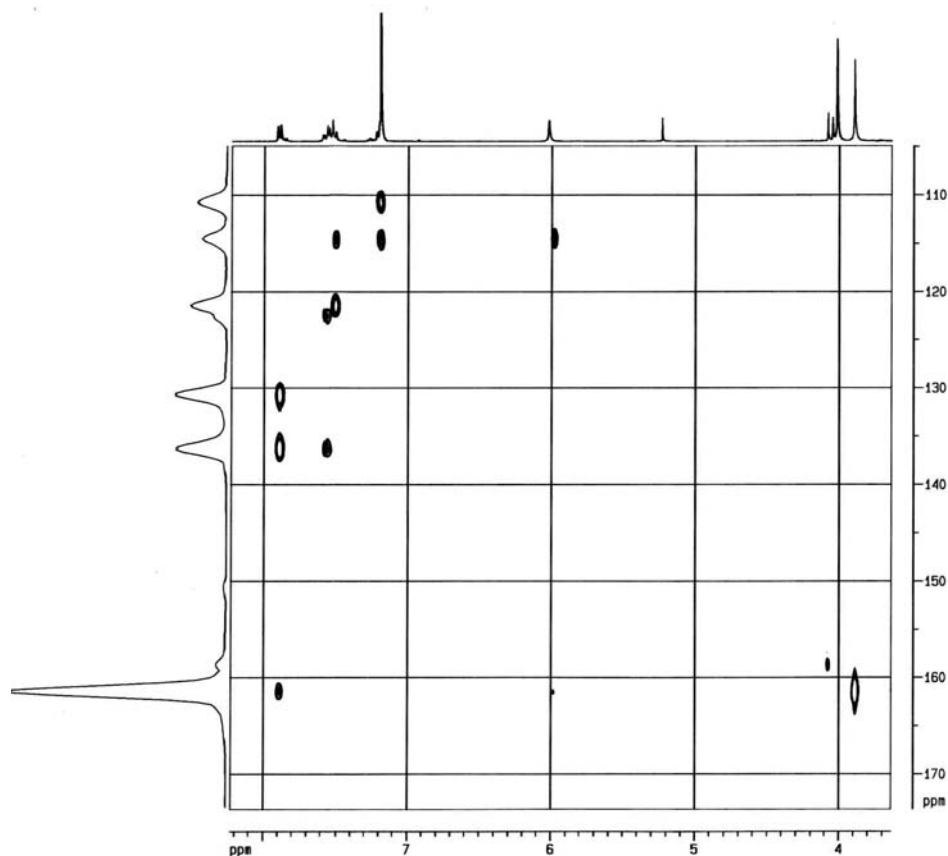
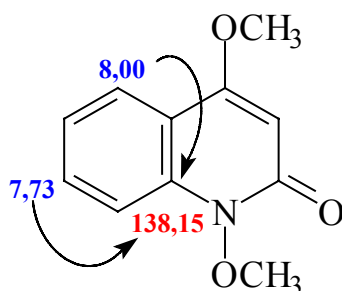
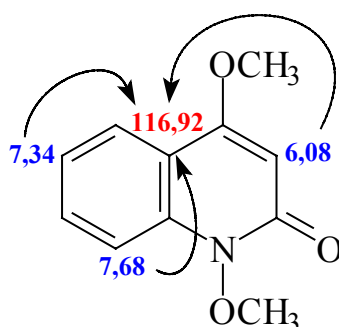


FIGURA 3.77. Mapa de contorno de HMBC da haplotusina (**19**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

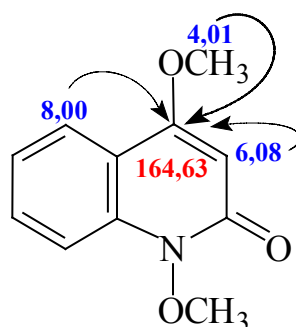
C-8a foi definido através da correlação de H-5 (8,00  $\delta$ ) e H-7 (7,73  $\delta$ ) com um carbono em 138,15  $\delta$ .



As correlações de H-3 (6,08  $\delta$ ), H-6 (7,34  $\delta$ ) e H-8 (7,68  $\delta$ ) com um mesmo carbono (em 116,92  $\delta$ ) determinaram C-4a.



C-4 foi atribuído através da correlação da metoxila em C-4 (4,01  $\delta$ ), H-3 (6,08  $\delta$ ) e H-5 (8,00  $\delta$ ) com o carbono em 164,63  $\delta$ .



O espectro de massas de **19** (FIGURA 3.78), obtido por *electrospray* no modo positivo, mostrou os picos  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  206 e 228 daltons, confirmando a estrutura proposta para a haplotusina ( $C_{11}H_{11}NO_3$ ).

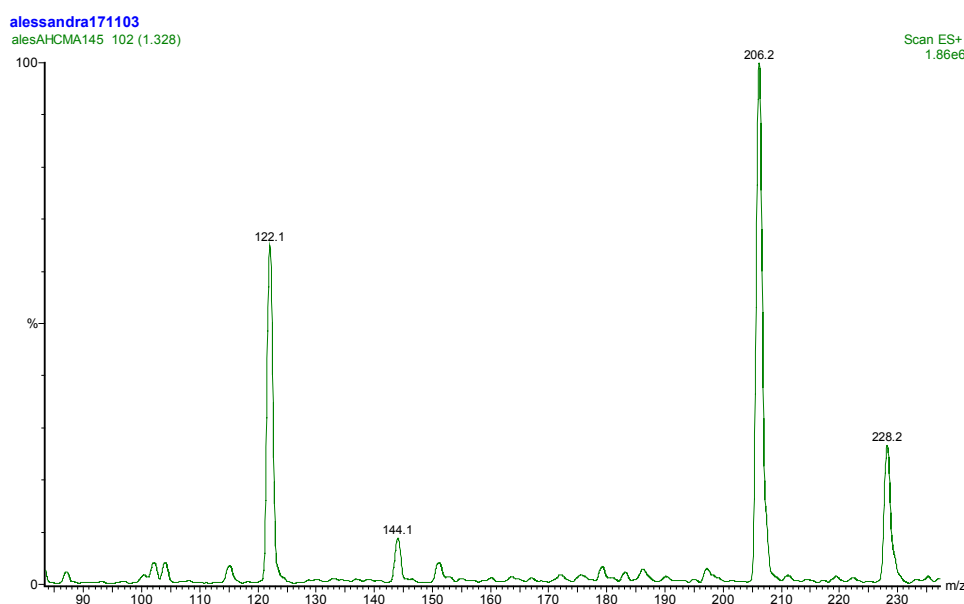


FIGURA 3.78. Espectro de massas (ES+) da haplotusina (**19**).

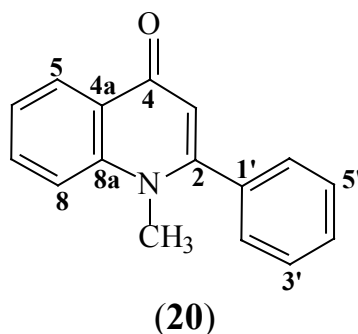
Portanto, a análise dos dados espectroscópicos indicou a estrutura de **19** como sendo o alcalóide 1,4-dimetoxi-2-quinolona, isolado anteriormente de *Haplophyllum obtusifolium* (Rutaceae) (RASAKOVA et al., 1984) e vulgarmente denominado de haplotusina. Os dados de RMN desta substância são descritos na TABELA 3.18.

TABELA 3.18. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da haplotusina.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2		n.d.
3	6,08 <i>s</i>	96,89
4		164,63
4a		116,92
5	8,00 <i>d</i> l (J = 8,0 Hz)	124,54
6	7,34 <i>ddd</i> (J = 8,0, 6,4 e 1,6 Hz)	124,20
7	7,73 <i>m</i>	133,34
8	7,68 <i>m</i>	113,14
8a		138,15
4-OCH <sub>3</sub>	4,01 <i>s</i>	57,06
N-OCH <sub>3</sub>	4,02 <i>s</i>	63,73

### 3.6.10. Identificação do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona

O alcalóide **20** foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico do caule de *Conchocarpus heterophyllum* (AHCMA) (p. 224-225) e identificado por EM e RMN em uma e duas dimensões.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.79 – 3.80) do alcalóide **20** apresentou um conjunto de sinais na região de hidrogênios aromáticos e um singlete em 3,74  $\delta$ , relativo a hidrogênio ligado a heteroátomo. Como no mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.81 – 3.82) esse hidrogênio (3,74  $\delta$ ) correlacionava com um carbono em 38,36  $\delta$ , determinou-se a existência de *N*-CH<sub>3</sub> na substância **20**.

O conhecimento da ampla ocorrência de alcalóides derivados do ácido antranílico em Rutaceae (MESTER, 1983; WATERMAN, 1999) e o singlete em 6,67  $\delta$  no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.79 – 3.80) determinaram a identidade de **20** como um alcalóide 2-*R*-4-quinolona. A hipótese que esse alcalóide fosse 4-*R*-2-quinolona foi descartada, pois o H-3 seria mais blindado.

A análise mais detalhada do espectro de RMN  $^1\text{H}$  permitiu que se definissem nove hidrogênios aromáticos na molécula e, portanto, a existência de dois anéis aromáticos. As multiplicidades dos sinais em 8,51 (*dd*,  $J = 8,1$  e  $1,4$  Hz), 7,81 (*ddd*,  $J = 8,5$ ,  $7,0$  e  $1,4$  Hz), 7,67 (*dl*,  $J = 8,5$  Hz) e 7,52  $\delta$  (*m*) indicaram que um dos anéis seria *orto* dissustituído. Assim, o outro anel só poderia ser monossustituído, sendo que os sinais relativos aos seus hidrogênios ocorreram em 7,53 (*m*, 3H) e 7,44  $\delta$  (*m*, 2H).

Desta forma, definiu-se que a substituição em C-2 no alcalóide **20** se daria por um grupo fenil. Isto foi confirmado pelos demais experimentos de RMN e por comparação com os dados de literatura para esse alcalóide, isolado anteriormente de *Raulinoa echinata* (Rutaceae) (BIAVATTI et al., 2002).

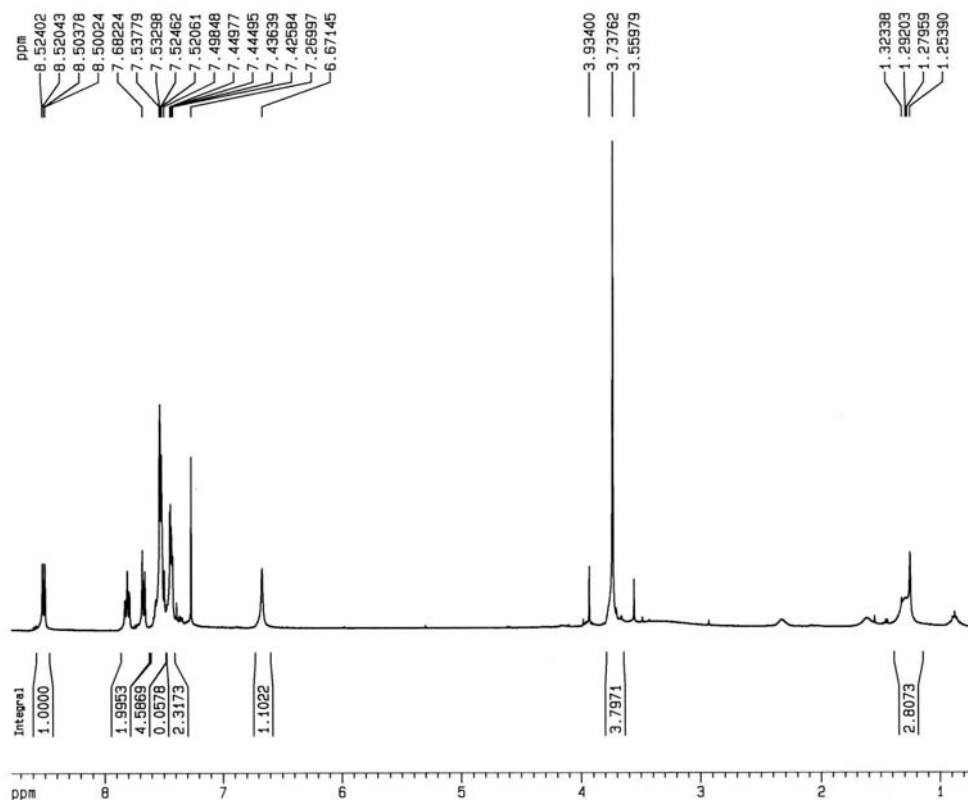


FIGURA 3.79. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

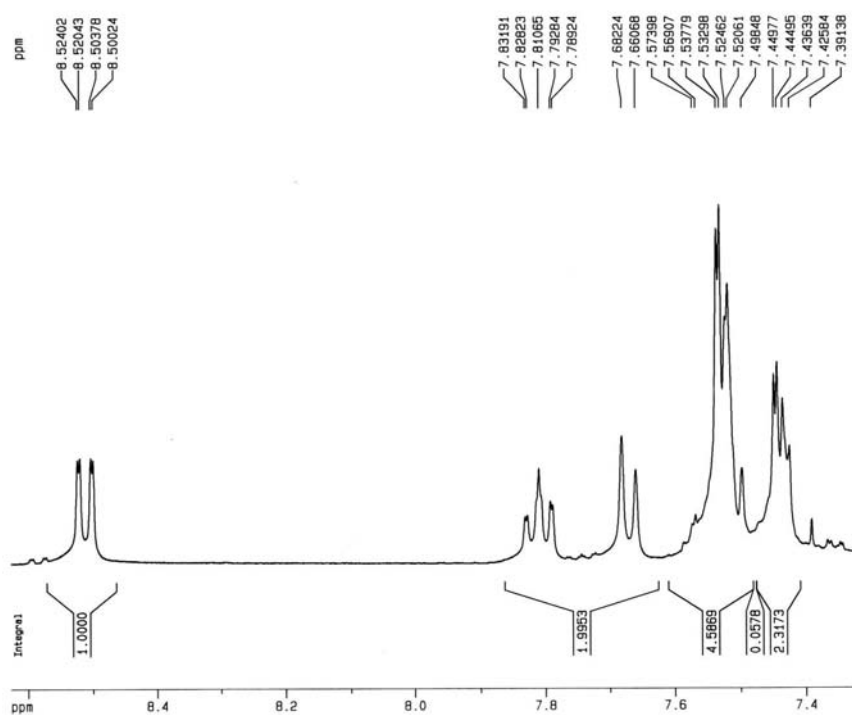


FIGURA 3.80. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

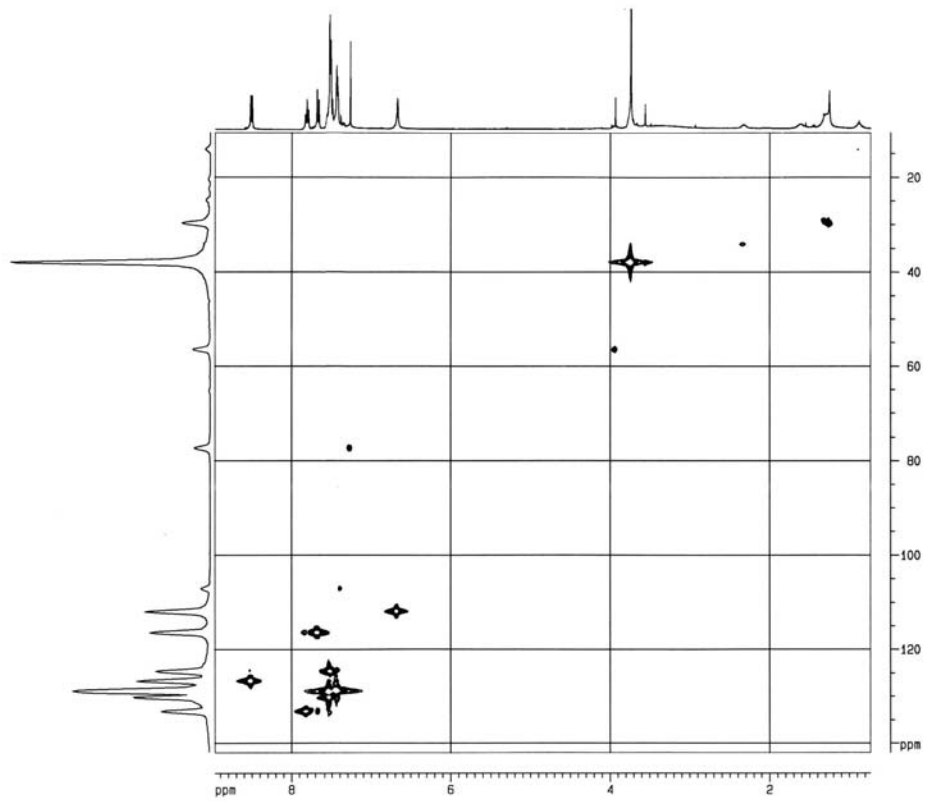


FIGURA 3.81. Mapa de contorno de HSQC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

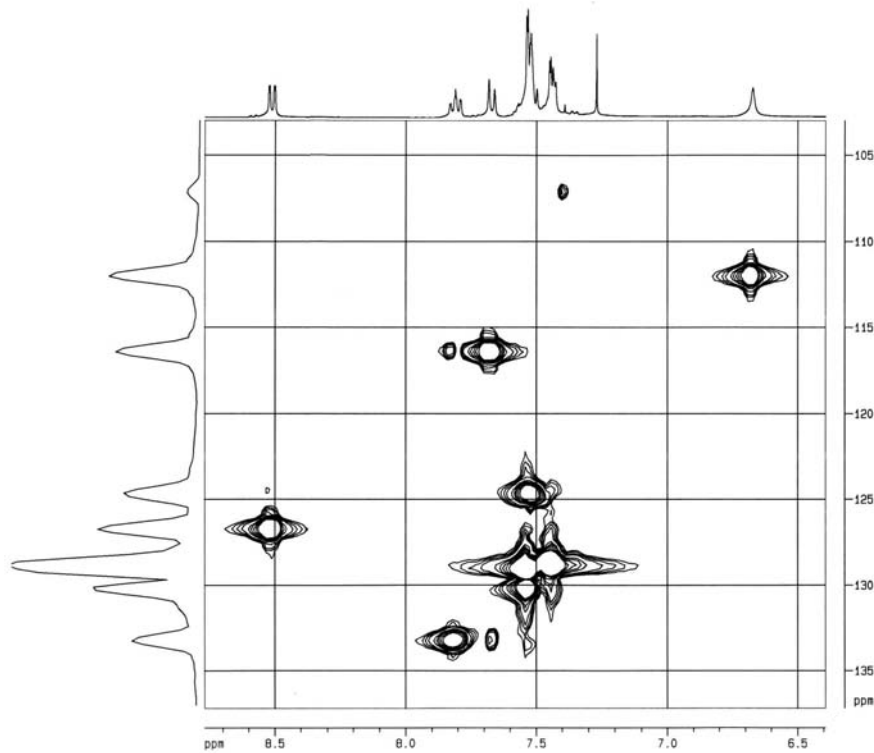


FIGURA 3.82. Ampliação do mapa de contorno de HSQC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

A análise conjunta do mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.81 – 3.82), do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 3.83 – 3.84) e dos dados de literatura (BIAVATTI et al., 2002) permitiu que fossem definidos alguns deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o alcalóide **20**.

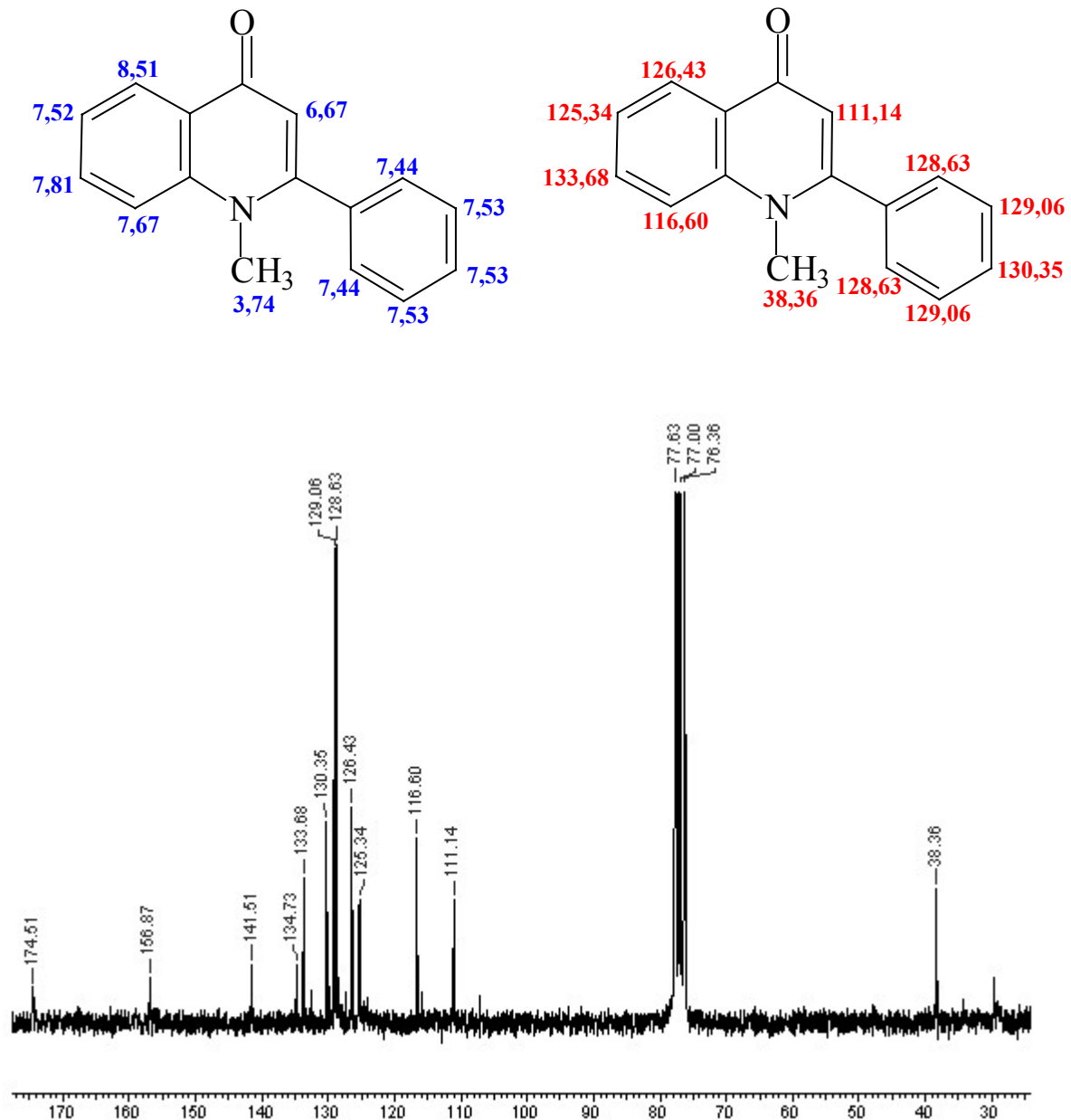


FIGURA 3.83. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

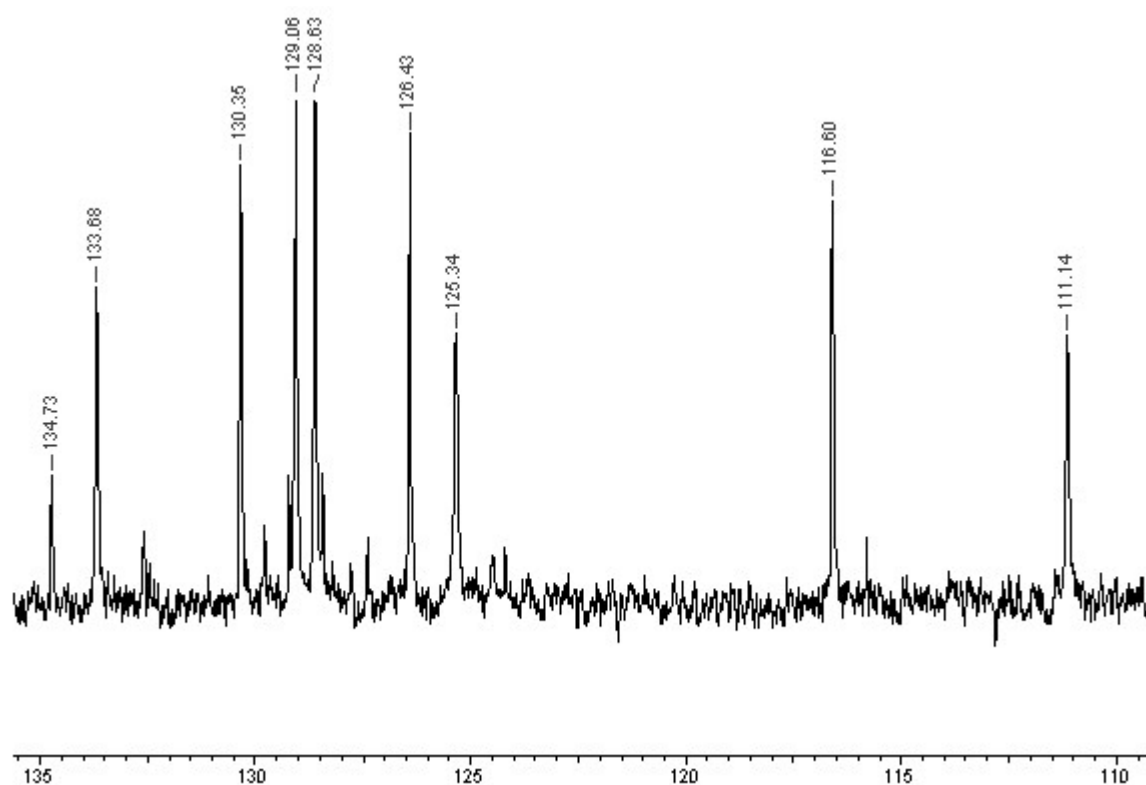
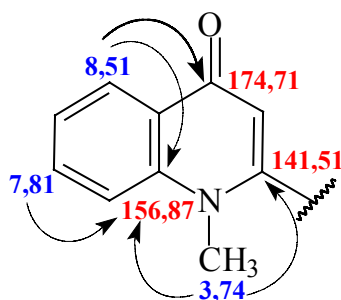


FIGURA 3.84. Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

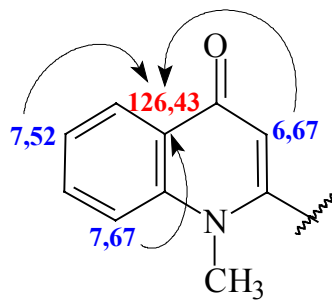
Através da análise do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.85 – 3.86) do alcalóide **20** foram definidos os carbonos quaternários da molécula.

Neste mapa, observou-se a correlação entre os hidrogênios *N*-metílicos (3,74  $\delta$ ) e os carbonos em 156,87 e 141,51  $\delta$ . Como os hidrogênios aromáticos H-5 e H-7, em 8,51 e 7,81  $\delta$ , também correlacionavam com o último, ele foi atribuído a C-8a e o outro a C-2. H-5 (8,51  $\delta$ ) apresentou ainda correlação com um carbono carbonílico em 174,51  $\delta$ , que foi atribuído a C-4.





As correlações de H-8 (7,67  $\delta$ ), H-6 (7,52  $\delta$ ) e H-3 (6,67  $\delta$ ) com o mesmo carbono, em 126,43  $\delta$ , definiu C-4a, que coincidiu com C-5.



H-3 (6,67  $\delta$ ) também correlacionou com os carbonos em 134,73 e 156,87  $\delta$  (C-2). Como o último já estava atribuído a C-2, o primeiro foi definido como C-1'.

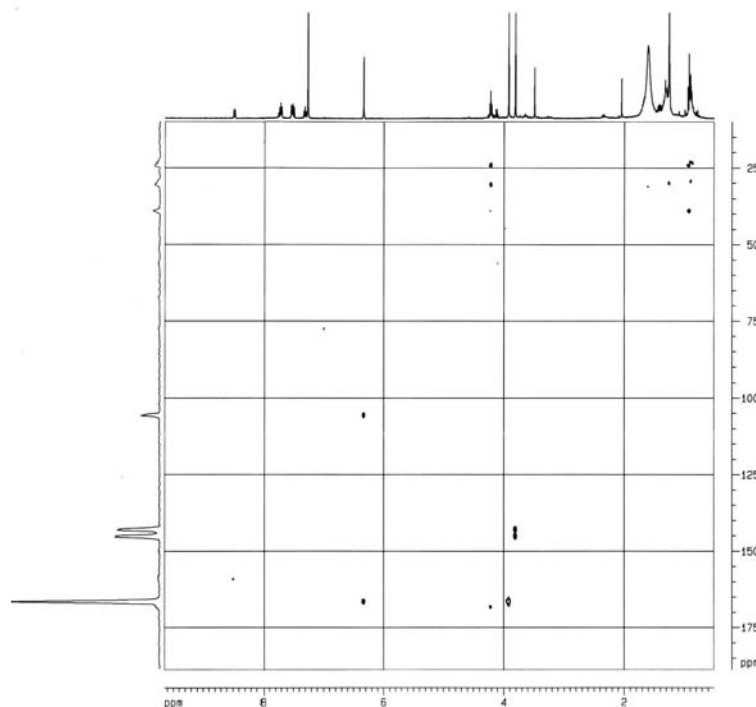
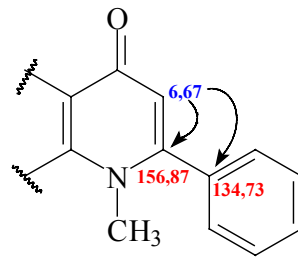


FIGURA 3.85. Mapa de contorno de HMBC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

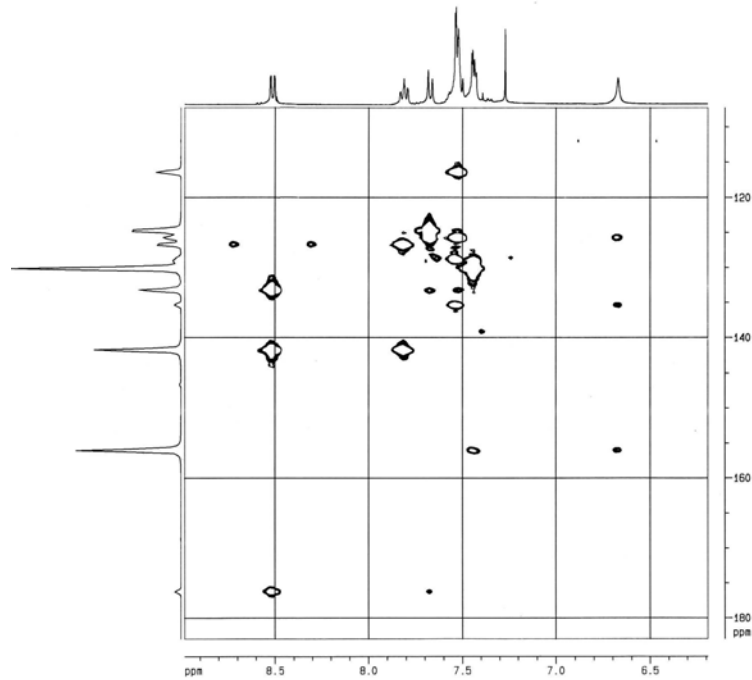


FIGURA 3.86. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

O espectro de massas de **20** (FIGURA 3.87), obtido por *electrospray* no modo positivo, mostrou o pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  236 daltons, confirmando a estrutura proposta para este alcalóide ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}$ ).

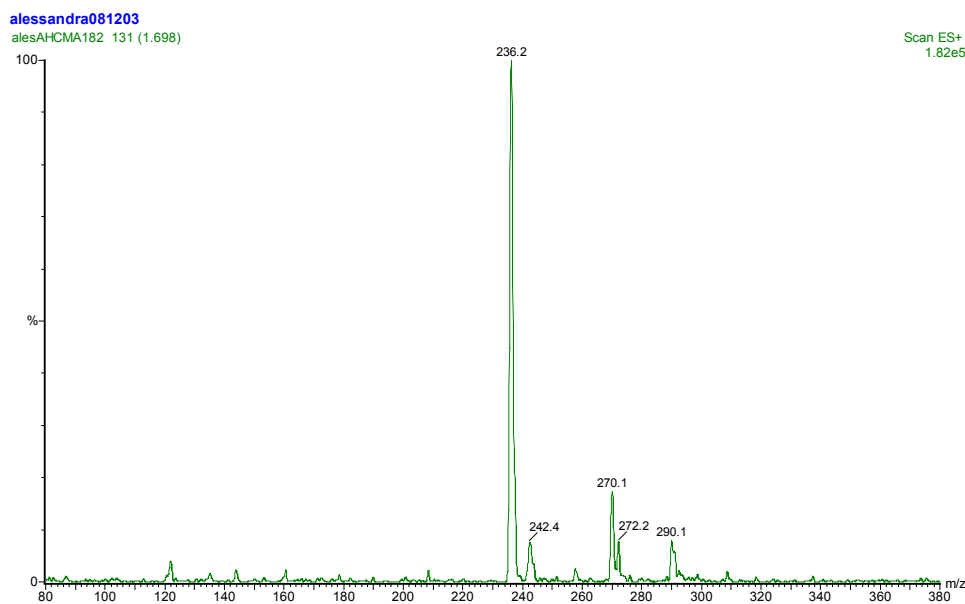


FIGURA 3.87. Espectro de massas (ES+) do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**).

Portanto, a análise dos dados espectroscópicos e a comparação com dados de literatura (BIAVATTI et al., 2002) permitiram definir a estrutura de **20** como o alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona, que está sendo pela primeira vez descrito no gênero *Conchocarpus*. Seus dados de RMN estão ilustrados na TABELA 3.19.

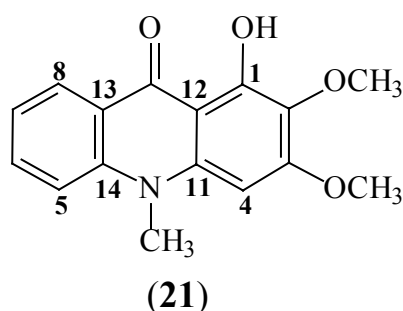
TABELA 3.19. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2			156,87	154,8
3	6,67 <i>s</i>	6,31 <i>s</i>	111,14	112,7
4			174,51	177,6
4a			126,43	126,8
5	8,51 <i>dd</i> ( $J = 8,1$ e $1,4$ Hz)	8,51 <i>dd</i> ( $J = 8,0$ e $1,4$ Hz)	126,43	126,8
6	7,52 <i>m</i>	7,45 <i>tl</i> ( $J = 1,0$ Hz)	125,34	123,8
7	7,81 <i>ddd</i> ( $J = 8,5, 7,0$ e $1,4$ Hz)	7,73 <i>dt</i> ( $J = 7,8$ e $1,6$ Hz)	133,68	132,3
8	7,67 <i>dl</i> ( $J = 8,5$ Hz)	7,57 <i>d</i> ( $J = 8,5$ Hz)	116,60	115,9
8a			141,51	141,9
1'			134,73	135,9
2' e 6'	7,44 <i>m</i>	7,42 <i>m</i>	128,63	128,5
3' e 5'	7,53 <i>m</i>	7,52 <i>m</i>	129,06	128,8
4'	7,53 <i>m</i>	7,52 <i>m</i>	130,35	129,6
<u>N-CH<sub>3</sub></u>	3,74 <i>s</i>	3,62 <i>s</i>	38,36	37,3

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  da 2-fenil-1-metil-4-quinolona ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) (BIAVATTI et al., 2002).

### 3.6.11. Identificação da arborinina

Da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) foi isolado o alcalóide arborinina (**21**) (p. 216-217), cuja identificação foi realizada por EM e RMN  $^1\text{H}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **21** (FIGURA 3.88) apresentou sinais em 8,43 (*dd*,  $J = 8,0$  e  $2,0$  Hz), 7,72 (*ddd*,  $J = 9,0$ ,  $8,0$  e  $2,0$  Hz), 7,50 (*dI*,  $J = 9,0$  Hz) e 7,29  $\delta$  (*ddd*,  $J = 8,0$ ,  $8,0$  e  $2,0$  Hz) relativos a hidrogênios aromáticos, cujas multiplicidades caracterizaram a presença de um anel *orto* dissubstituído na substância **21**. Foram observados também três singletos relativos à metila ligada a heteroátomo, em 4,01, 3,92 e 3,83  $\delta$ , um singlete de hidrogênio aromático, em 6,27  $\delta$  (1H), e um sinal em 14,75  $\delta$ , referente à uma hidroxila quelada.

Estes dados espectroscópicos em conjunto com o conhecimento da ocorrência de alcalóides derivados do ácido antranílico em plantas da família Rutaceae (MESTER, 1983; WATERMAN, 1999) sugeriram a natureza de **21** como um alcalóide acridônico.

O singlete relativo a uma hidroxila quelada evidenciou que C-1 no esqueleto acridônico estava substituído por uma hidroxila; e a presença de um sinal de metoxila impedida estericamente (em 4,01  $\delta$ ) indicou que as posições C-2 e C-3 deveriam estar substituídas pelas metoxilas. Assim, o singlete de hidrogênio aromático (em 6,27  $\delta$ ) correspondia a H-4 e o sinal mais blindado (em 3,83  $\delta$ ) correspondia a *N*-CH<sub>3</sub>.

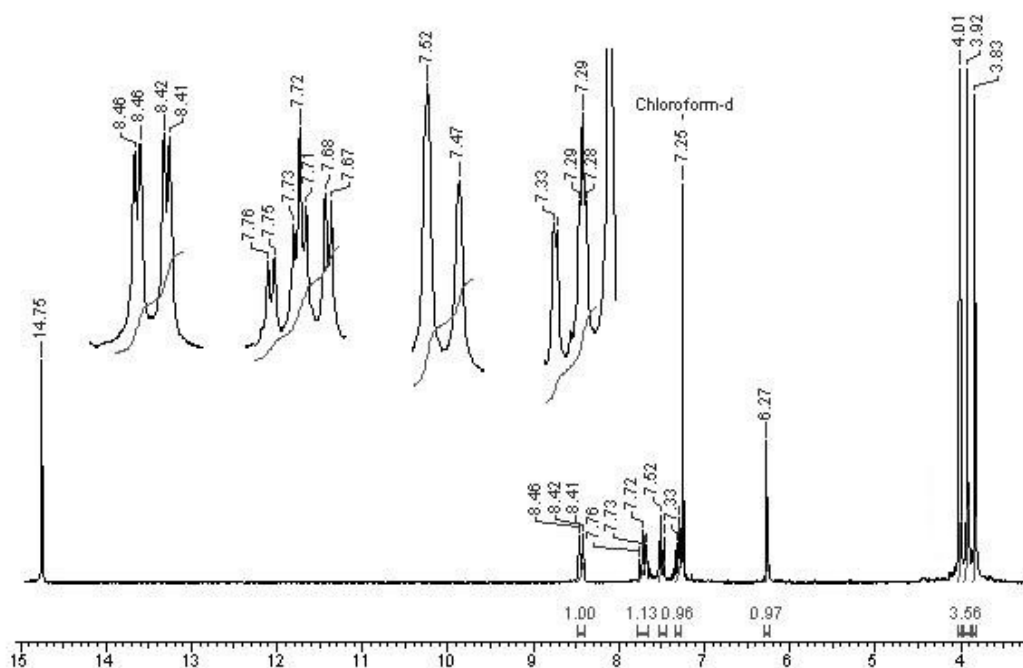


FIGURA 3.88. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da arborinina (**21**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

Portanto, os dados espectroscópicos indicaram a natureza de **21** como um alcalóide acridônico substituído em C-1, C-2 e C-3, vulgarmente conhecido como arborinina. Ele é de ampla ocorrência na família Rutaceae, e foi inclusive isolado do gênero *Almeidea* (SANTOS et al., 1998). Seus dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  são descritos na TABELA 3.20.

A fórmula molecular ( $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ ) do alcalóide arborinina (**21**) foi confirmada através dos picos  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  286 e 308 daltons, no espectro de massas (FIGURA 3.89).

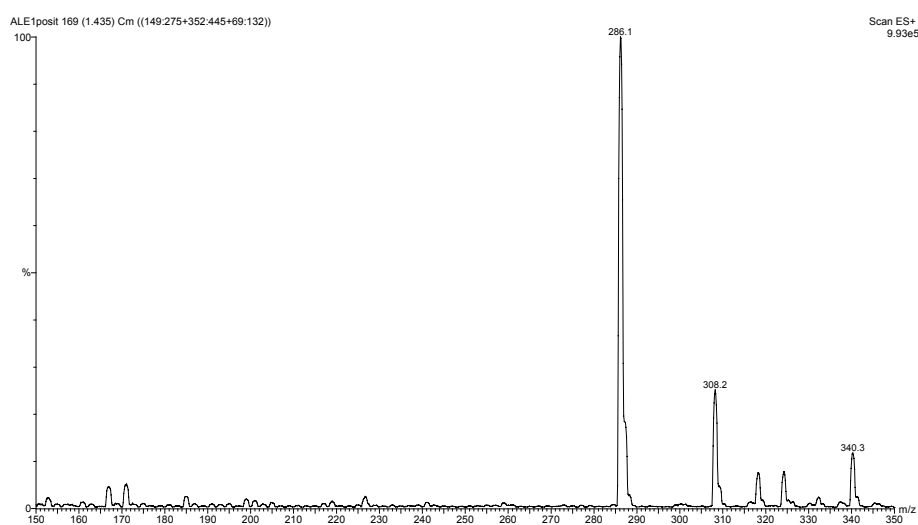


FIGURA 3.89. Espectro de massas (ES+) da arborinina (**21**).

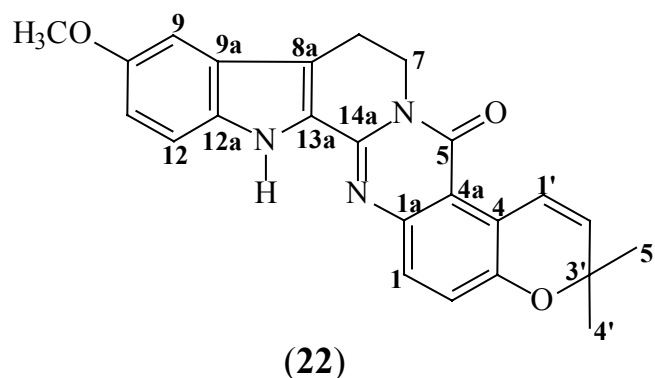
TABELA 3.20. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da arborinina.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
4	6,27 <i>s</i>	6,32 <i>s</i>
5	7,50 <i>dI</i> ( $J = 9,0$ Hz)	7,54 <i>d</i> ( $J = 8,8$ Hz)
6	7,72 <i>ddd</i> ( $J = 9,0, 8,0$ e $2,0$ Hz)	7,75 <i>ddd</i> ( $J = 8,7, 6,8$ e $1,6$ Hz)
7	7,29 <i>ddd</i> ( $J = 8,0, 8,0$ e $2,0$ Hz)	7,33 <i>t</i> ( $J = 8,0$ Hz)
8	8,43 <i>dd</i> ( $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)	8,50 <i>dd</i> ( $J = 8,0$ e $1,6$ Hz)
2-OCH <sub>3</sub>	4,01 <i>s</i>	4,04 <i>s</i>
3-OCH <sub>3</sub>	3,92 <i>s</i>	3,95 <i>s</i>
NCH <sub>3</sub>	3,83 <i>s</i>	3,88 <i>s</i>
<u>OH</u>	14,75 <i>s</i>	-

\*  $\delta_{\text{H}}$  da arborinina (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) (JANUÁRIO, 1995).

### 3.6.12. Identificação do alcalóide indolopiridoquinazolínico

O alcalóide **22** foi isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 211-212) e caracterizado por RMN em uma e duas dimensões.



A substância **22** apresentou em seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.90 – 3.91) dois tripletos ( $J = 6,8$  Hz) em 4,52 e 3,18  $\delta$ , que, em conjunto com os sinais dos hidrogênios aromáticos, indicaram a natureza de **22** como um alcalóide indolopiridoquinazolínico, que só é descrito na família Rutaceae (MESTER, 1983).

Observaram-se ainda dois dubletos ( $J = 10,2$  Hz) em  $8,04$  e  $5,80$   $\delta$ , e um singlete (6H) em  $1,47$   $\delta$ , que sugeriram a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno na substância **22**.

Na região aromática do espectro havia quatro hidrogênios que ocorriam como dubletos e acoplavam dois a dois [ $7,47$  com  $7,20$   $\delta$  ( $J = 8,7$  Hz) e  $7,33$  com  $6,99$   $\delta$  ( $J = 8,5$  Hz)] e um singlete (1H) em  $7,00$   $\delta$ . As multiplicidades de tais sinais indicaram a presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído e de outro 1,2,3,4-tetrassubstituído. O espectro também mostrou um singlete em  $3,88$   $\delta$ , relativo a uma metoxila aromática.

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.92) confirmou-se o acoplamento entre H-7 ( $4,52$   $\delta$ ) e H-8 ( $3,18$   $\delta$ ), o padrão de substituição dos anéis aromáticos e o acoplamento dos hidrogênios olefinicos ( $8,04$  e  $5,80$   $\delta$ ) do anel 2,2-dimetilcromeno.

Desta forma, estabeleceu-se que a substância **22** era um alcalóide indolopiridoquinazolínico, que possuía cinco hidrogênios aromáticos (dispostos como citado acima), um anel 2,2-dimetilcromeno e uma metoxila. Além disso, pelos dados espectroscópicos até então analisados, o anel 2,2-dimetilcromeno e a metoxila teriam que substituir anéis diferentes, sendo que a metoxila só poderia estar no anel 1,2,4-trissubstituído. Para se definir em qual dos anéis os substituintes estariam, verificou-se que não existia no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.91 – 3.92) um sinal de hidrogênio bastante desblindado, em  $\sim 8,0$   $\delta$ , que é característico de H-4 para os alcalóides indolopiridoquinazolínicos (AYAFOR et al., 1982; IKUTA et al., 1998). Assim, C-4 deveria ser uma posição substituída, excluindo a possibilidade da metoxila estar neste anel, definido, portanto, que ela estaria em C-8 (ou C-9) e que o anel 2,2-dimetilcromeno deveria substituir as posições C-3 e C-4.

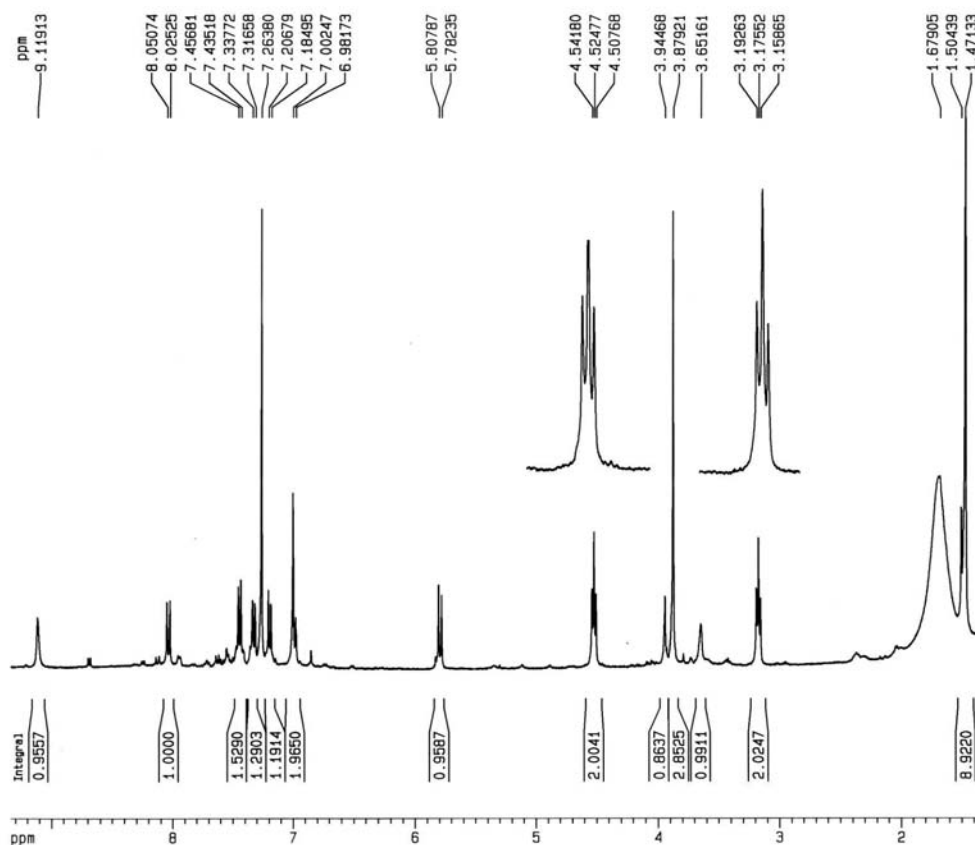


FIGURA 3.90. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide indolopiridoquinazolínico **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

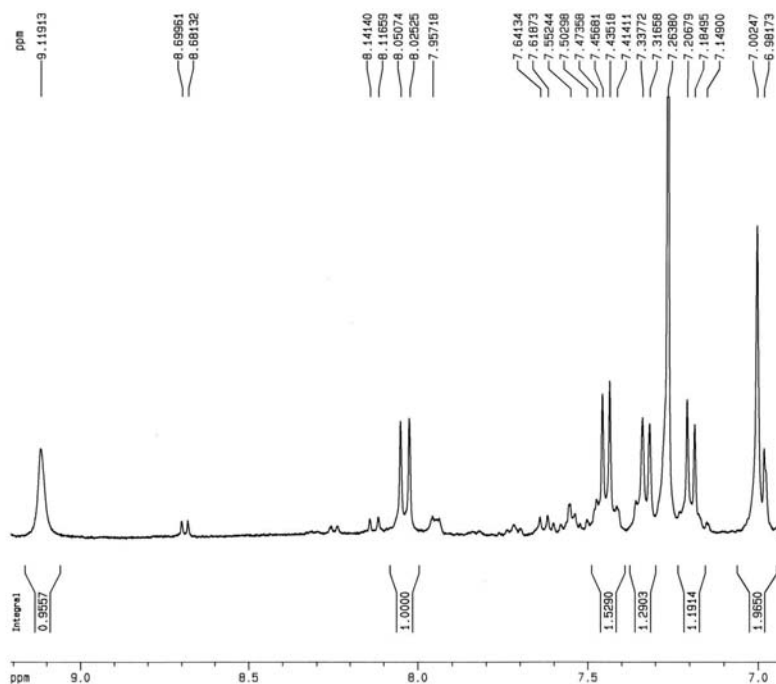


FIGURA 3.91. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide indolopiridoquinazolínico **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



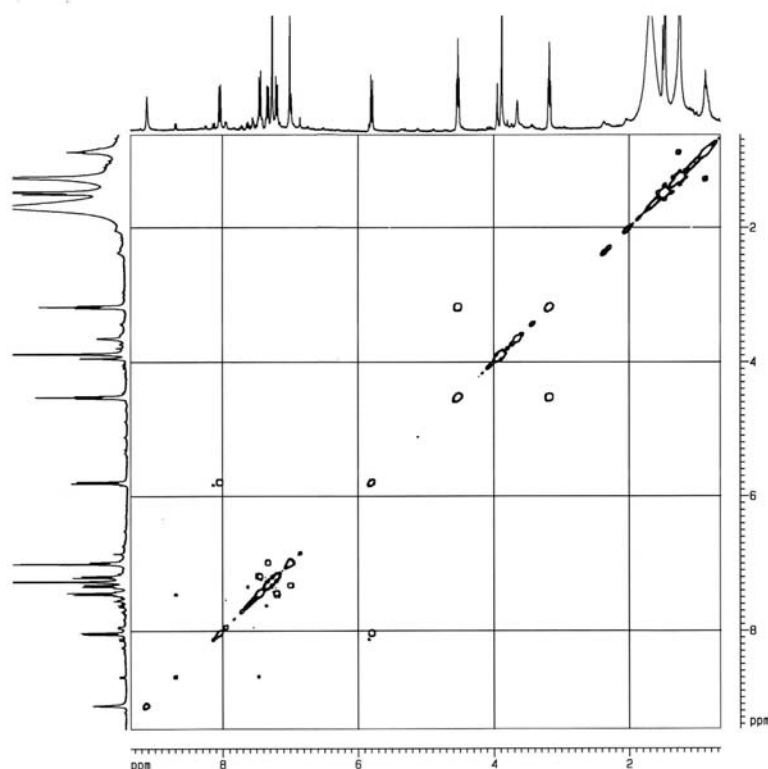


FIGURA 3.92. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do alcalóide indolpiridoquinazolínico **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

O mapa de contorno de HSQC (FIGURA 3.93; TABELA 3.21) mostrou as correlações C-H a  $^1J$  para o alcalóide **22** e indicou que o sinal em 9,12  $\delta$  (sl, 1H) referia-se ao N-H da molécula.

TABELA 3.21. Correlações a  $^1J$  para o alcalóide indolpiridoquinazolínico **22**.

$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
8,04	121
7,47	127
7,33	113
7,20	125
7,00	101
6,99	116
5,80	132
4,52	41
3,88	56
3,18	20
1,47	27

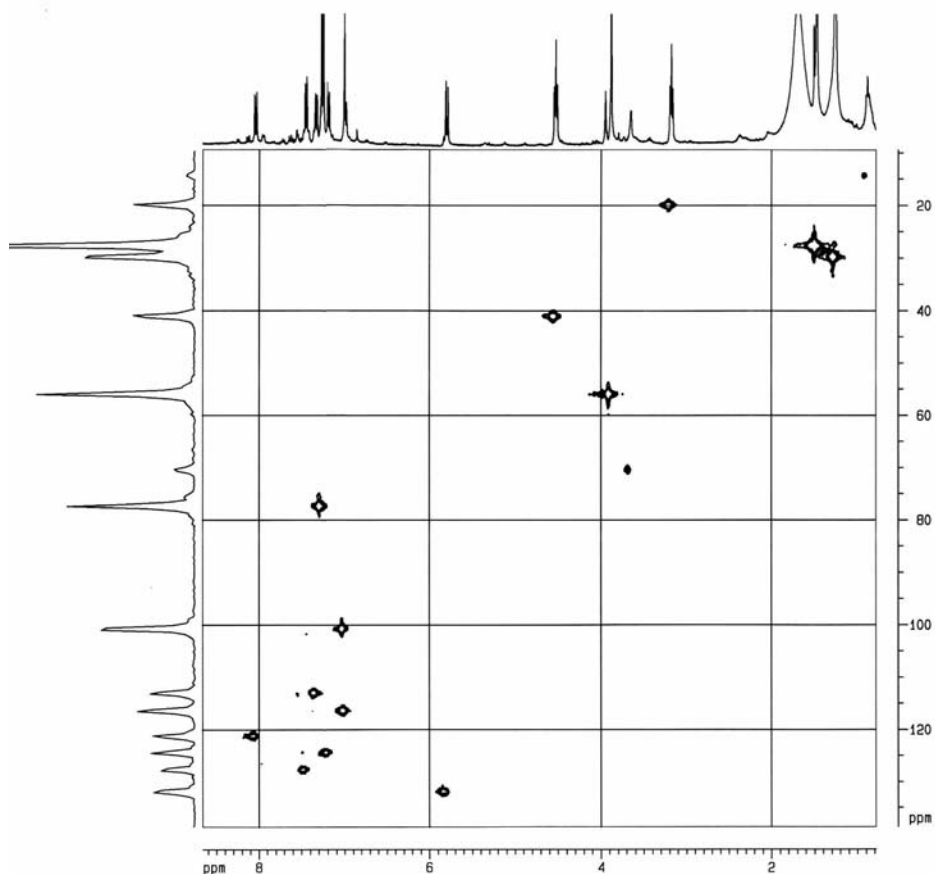
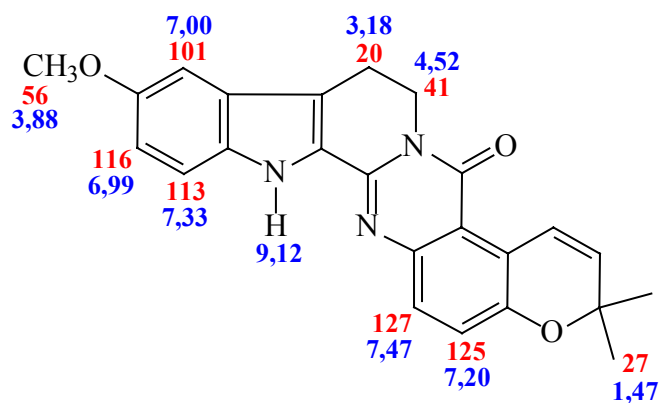
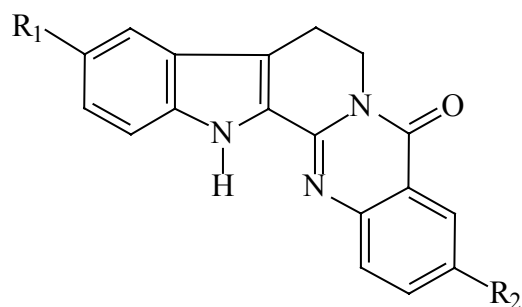


FIGURA 3.93. Mapa de contorno de HSQC do alcalóide indolopiridoquinazolínico **22** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

A análise conjunta do mapa de contorno de HSQC e a comparação com os dados espectroscópicos de RMN da hortiacina (**E**) (CUCA S. et al., 1998) e da 3-hidroxitrutacarpina (**F**) (LI et al., 2001) permitiram a atribuição de alguns dados de RMN para o alcalóide **22**.



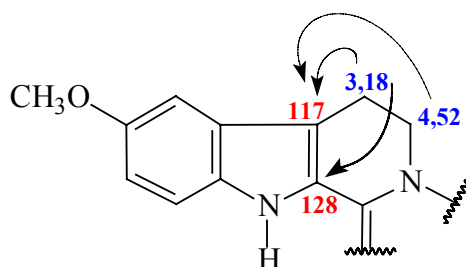


(E): R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

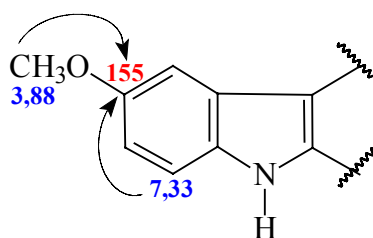
(F): R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH

Através do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.94 – 3.95) foram determinados alguns dos carbonos quaternários do alcalóide **22**.

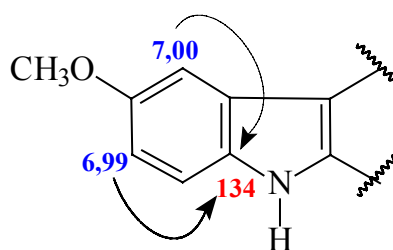
Nesse mapa, a correlação dos hidrogênios metilênicos 7 (4,52  $\delta$ ) e 8 (3,18  $\delta$ ) com um mesmo carbono em 117  $\delta$ , definiu C-8a. E a correlação de H-8 com o carbono em 128  $\delta$  determinou C-13a.



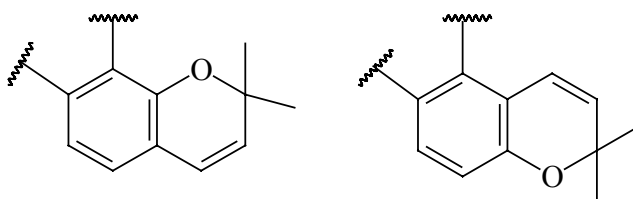
A metoxila em 3,88  $\delta$  correlacionou com um carbono em 155  $\delta$ , atribuído a C-10. Este foi confirmado também através da correlação com H-12 (7,33  $\delta$ ).



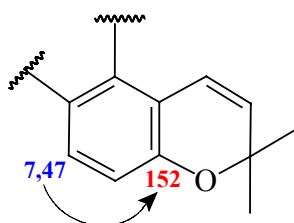
A correlação de H-9 (7,00  $\delta$ ) e/ou H-11 (6,99  $\delta$ ) com um carbono em 134  $\delta$  determinou C-12a.



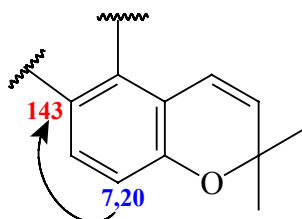
O anel 2,2-dimetilcromeno poderia estar posicionado de duas formas:



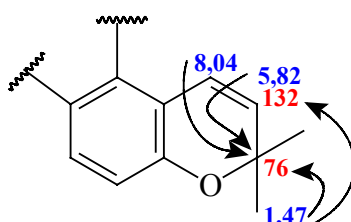
O mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.94 – 3.95) e a comparação com a 3-hidroxitrutacarpina (**F**) (LI et al., 2001) sugeriram que a segunda forma de ligação fosse a mais provável, pois se observou a correlação de H-1 (7,47  $\delta$ ) com um carbono em 152  $\delta$ , que na molécula modelo **F** ocorria em 155,0  $\delta$  e era atribuído a C-3.



C-1a (143  $\delta$ ) foi determinado através da sua correlação com H-2 (7,20  $\delta$ ).



Os dados de RMN para o anel 2,2-dimetilcromeno foram atribuídos através da correlação dos hidrogênios metílicos (1,47  $\delta$ ) com um carbono em 132  $\delta$  (C-2'); e, C-3' (76  $\delta$ ) foi determinado pela correlação com os hidrogênios metílicos (1,47  $\delta$ ), com H-1' (8,04  $\delta$ ) e H-2' (5,82  $\delta$ ). O deslocamento químico de H-1' retificou o posicionamento do anel 2,2-dimetilcromeno já que ele estava bastante desblindado devido à proximidade com a carbonila C-5.



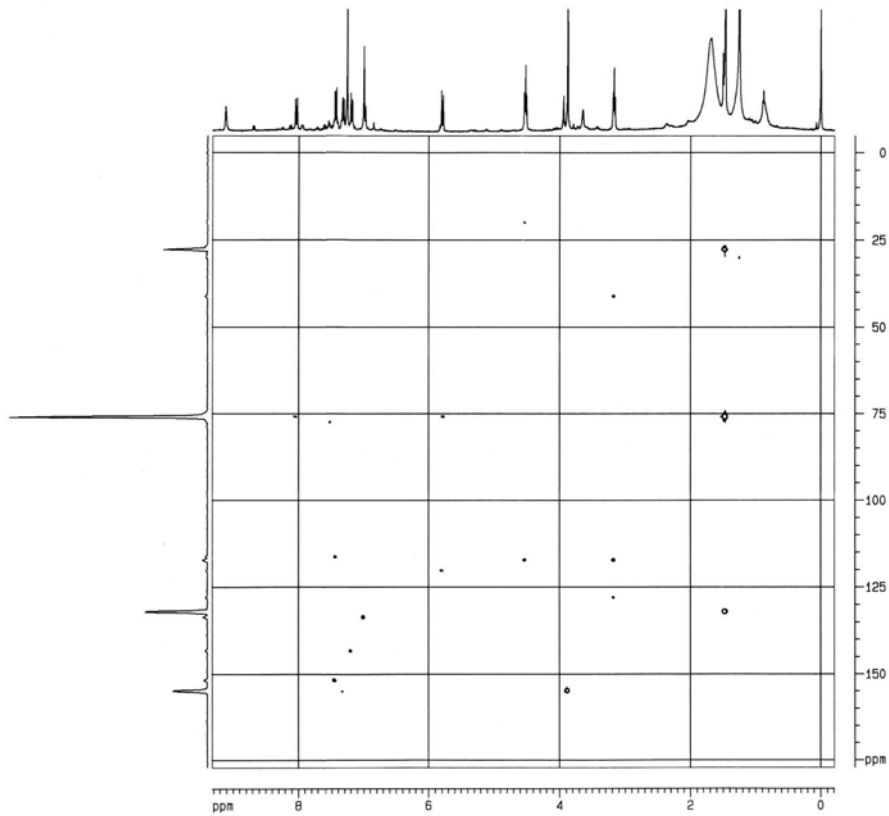


FIGURA 3.94. Mapa de contorno de HMBC do alcalóide indolopiridoquinazolínico **22** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

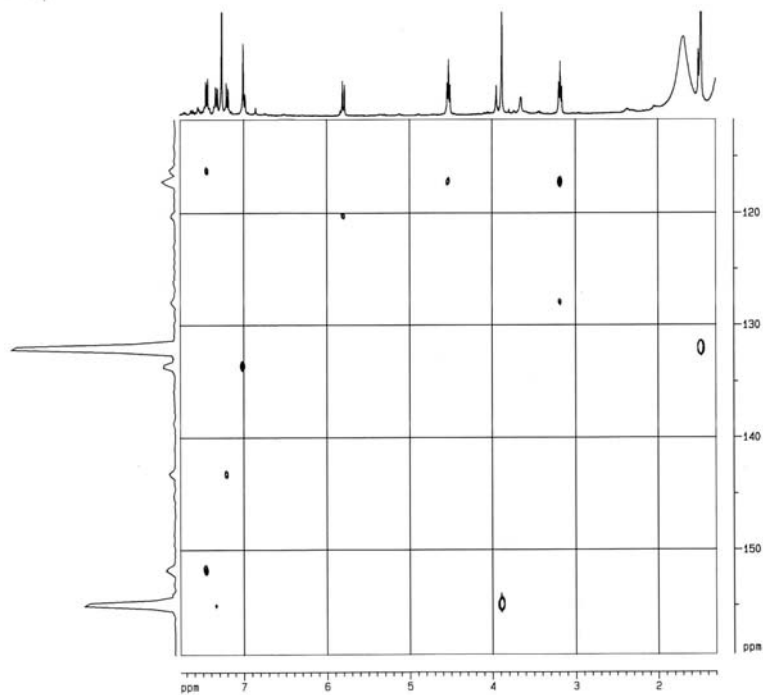


FIGURA 3.95. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do alcalóide indolopiridoquinazolínico **22** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Na estrutura proposta para o alcalóide **22** não puderam ser determinados os carbonos quaternários 4, 4a, 5, 9a e 14a. No artigo de LI et al. (2001) cita-se a importância da técnica HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  para a elucidação estrutural desta classe de compostos, já que o número de nitrogênios e a conectividade C-N na molécula podem ser deduzidos a partir de tal experimento.

Embora alguns carbonos não tenham sido determinados, a estrutura do alcalóide **22** é inédita e as atribuições dos dados de RMN estão descritas nas TABELAS 3.22 e 3.23.

TABELA 3.22. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  do alcalóide indolopiridoquinazolínico.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$ de E *	$\delta_{\text{H}}$ de F #
1	7,47 <i>d</i> ( $J = 8,7$ Hz)	7,63 <i>d</i> ( $J = 7,2$ Hz)	7,56 <i>d</i> ( $J = 8,8$ Hz)
2	7,20 <i>d</i> ( $J = 8,7$ Hz)	7,75 <i>ddd</i> ( $J = 8,4, 7,2$ e 1,5 Hz)	7,27 <i>dd</i> ( $J = 8,8$ e 2,7 Hz)
3	-	7,45 <i>ddd</i> ( $J = 8,4, 8,0$ e 1,1 Hz)	-
4	-	8,30 <i>dd</i> ( $J = 8,0$ e 1,5 Hz)	7,48 <i>d</i> ( $J = 2,7$ Hz)
7	4,52 <i>t</i> ( $J = 6,8$ Hz)	4,56 <i>t</i> ( $J = 7,0$ Hz)	4,41 <i>t</i> ( $J = 6,8$ Hz)
8	3,18 <i>t</i> ( $J = 6,8$ Hz)	3,21 <i>t</i> ( $J = 7,0$ Hz)	3,14 <i>t</i> ( $J = 6,8$ Hz)
9	7,00 <i>s</i>	7,01 <i>d</i> ( $J = 2,4$ Hz)	7,59 <i>d</i> ( $J = 7,4$ Hz)
10	-	-	7,05 <i>t</i> ( $J = 7,4$ Hz)
11	6,99 <i>d</i> ( $J = 8,5$ Hz)	7,04 <i>dd</i> ( $J = 7,3$ e 2,4 Hz)	7,22 <i>t</i> ( $J = 7,4$ Hz)
12	7,33 <i>d</i> ( $J = 8,5$ Hz)	7,40 <i>d</i> ( $J = 7,3$ Hz)	7,46 <i>d</i> ( $J = 7,4$ Hz)
1'	8,04 <i>d</i> ( $J = 10,2$ Hz)	-	-
2'	5,80 <i>d</i> ( $J = 10,2$ Hz)	-	-
4' e 5'	1,47 <i>s</i>	-	-
OCH <sub>3</sub>	3,88 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>	-
NH	9,12 <i>sl</i>	9,40 <i>sl</i>	11,7 <i>s</i>
OH	-	-	10,1 <i>sl</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  de E (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (CUCA S. et al., 1998); #  $\delta_{\text{H}}$  de F (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (LI et al., 2001).

TABELA 3.23. Dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  do alcalóide indolopiridoquinazolinico.

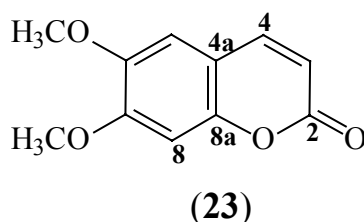
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ de E *	$\delta_{\text{C}}$ de F #
1	127	126,2	128,2
1a	143	126,7	140,5
2	125	134,5	123,9
3	152	125,8	155,0
4	n.d.	127,1	109,7
4a	n.d.	120,6	121,7
5	n.d.	161,7	160,3
7	41	41,2	40,9
8	20	19,5	19,0
8a	117	118,4	116,6
9	101	116,9	119,7
9a	n.d.	125,2	125,0
10	155	154,4	119,6
11	116	100,3	124,3
12	113	113,1	112,3
12a	134	133,8	138,4
13a	128	147,0	127,3
14a	n.d.	145,3	142,6
1'	121	-	-
2'	132	-	-
3'	76	-	-
4' e 5'	27	-	-
OCH <sub>3</sub>	56	55,7	-

\*  $\delta_{\text{C}}$  de E (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (CUCA S. et al., 1998); #  $\delta_{\text{C}}$  de F (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (LI et al., 2001); n.d. = não determinado.

### 3.7. Identificação das cumarinas

#### 3.7.1. Identificação da escoparona

A cumarina escoparona (**23**) foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 214-215) e caracterizada por EM e RMN  $^1\text{H}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.96) da substância **23** apresentou dois dubletos ( $J = 9,5$  Hz) em 7,63 e 6,29  $\delta$ , característicos dos hidrogênios 4 e 3 de um esqueleto cumarínico. A presença de apenas um singlete em 6,86  $\delta$ , integrado para dois hidrogênios, sugeriu a existência de dois hidrogênios aromáticos na molécula em relação *para*, que na estrutura de uma cumarina só poderiam ser atribuídos a H-5 e H-8. Desta forma, C-6 e C-7 deveriam ser posições substituídas. Os singletos em 3,96 e 3,93  $\delta$  indicaram a substituição destas posições por grupos metoxila.

Portanto, a substância **23** foi identificada como a 6,7-dimetoxicumarina, comumente conhecida como escoparona, que não havia sido isolada do gênero *Almeidea*, mas que é amplamente encontrada na família Rutaceae (GRAY, 1983). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  da escoparona (**23**) são descritos na TABELA 3.24.

O espectro de massas de **23** (FIGURA 3.97) confirmou a estrutura proposta através do pico do íon molecular em  $m/z$  206 daltons, coerente com a fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$  da escoparona.



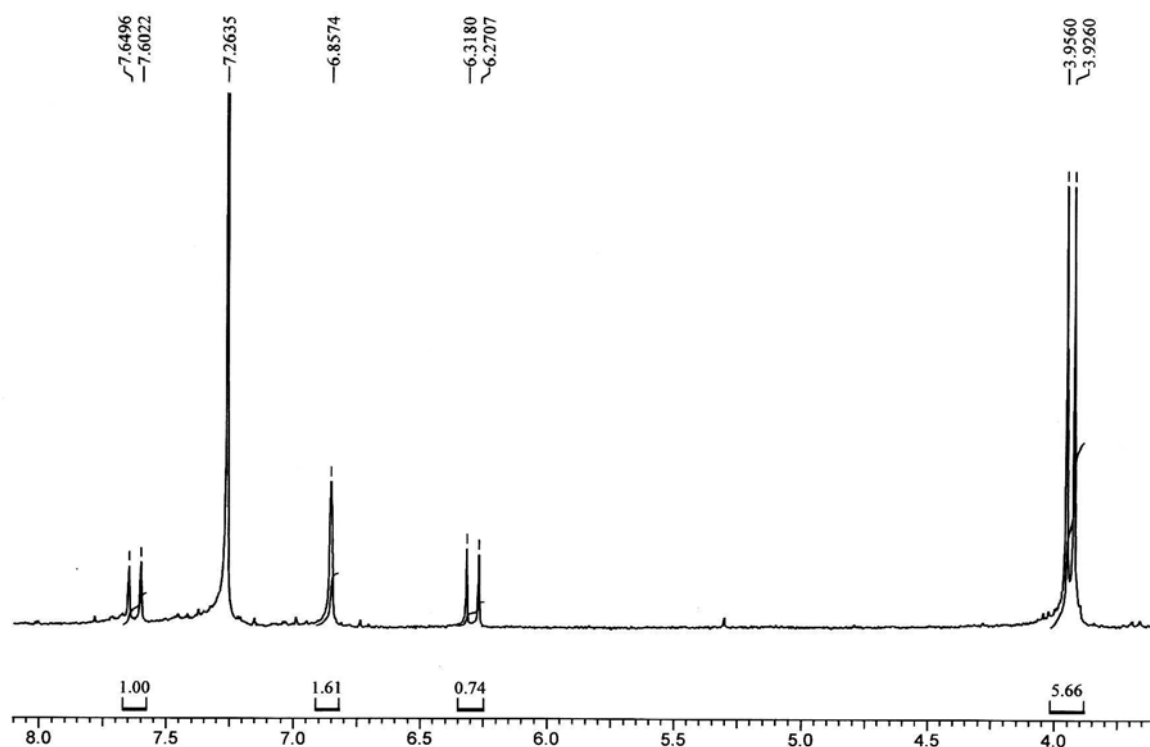


FIGURA 3.96. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da escoparona (**23**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



FIGURA 3.97. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da escoparona (**23**).

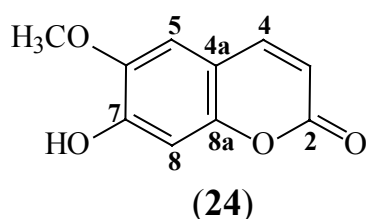
TABELA 3.24. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da escoparona.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
3	6,29 <i>d</i> (9,5 Hz)	6,30 <i>d</i> (9,5 Hz)
4	7,63 <i>d</i> (9,5 Hz)	7,63 <i>d</i> (9,5 Hz)
5	6,86 <i>s</i>	6,86 <i>s</i>
8	6,86 <i>s</i>	6,85 <i>s</i>
6-OCH <sub>3</sub>	3,96 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>
7-OCH <sub>3</sub>	3,93 <i>s</i>	3,93 <i>s</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  da escoparona ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (MAFEZOLI, 2001).

### 3.7.2. Identificação da escopoletina

A cumarina **24** também foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 214-216) e identificada por EM e RMN  $^1\text{H}$ .



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.98) da substância **24** mostrou-se bastante similar ao da cumarina **23**. Foram observados os dois dubletos ( $J = 9,4$  Hz) característicos de H-3 e H-4 de uma cumarina, em 6,27 e 7,60  $\delta$ . Dois singletos, em 6,92 e 6,85  $\delta$ , sugeriram a presença de H-5 e H-8 e a substituição das posições C-6 e C-7. A existência de somente mais um sinal no espectro, especificamente de um singlete relativo a metoxila em 3,96  $\delta$ , sugeriu que a outra posição estivesse substituída por um grupo hidroxila.

Desta forma, a cumarina **24** foi identificada como a 7-hidroxi-6-metoxicumarina, vulgarmente denominada escopoletina, que já havia sido isolada de *Almeidea rubra* (JANUÁRIO, 1995). Seus dados de RMN  $^1\text{H}$  (TABELA 3.25) foram atribuídos por comparação com a literatura (JANUÁRIO, 1995).

O espectro de massas de **24** (FIGURA 3.99) confirmou a estrutura proposta através do pico do íon molecular em  $m/z$  192 daltons, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$  da escopoletina. A análise deste espectro também permitiu a confirmação da identidade de **24** como a escopoletina e não como seu isômero isoescopoletina, já que a intensidade do pico em  $m/z$  177 daltons era de aproximadamente 60 %. A abundância relativa deste pico é um diferencial entre esses isômeros, sendo que para a isoescopoletina esse pico tem intensidade menor (SHAPIRO e DJERASSI, 1965).

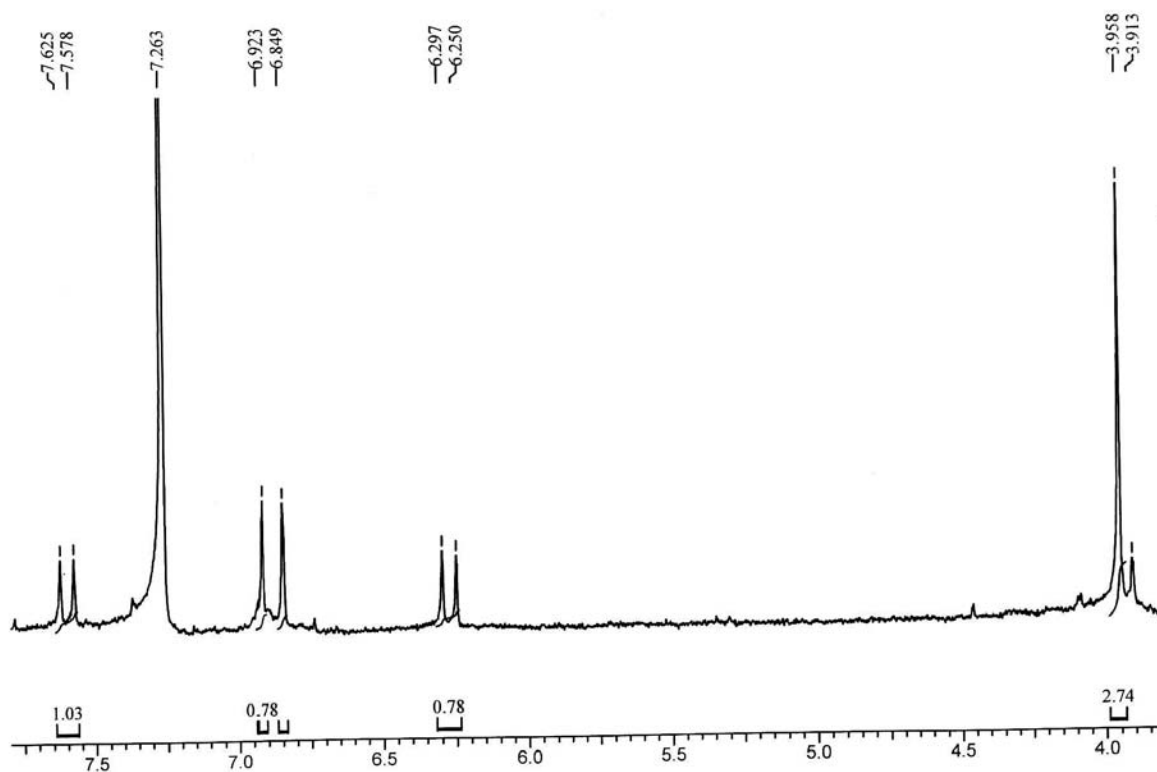


FIGURA 3.98. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da escopoletina (**24**) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

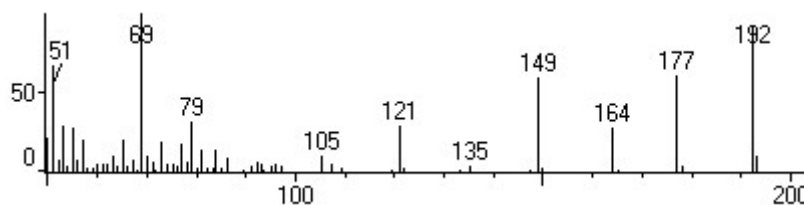


FIGURA 3.99. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da escopoletina (**24**).

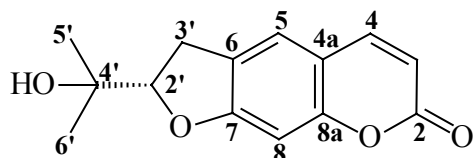
TABELA 3.25. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da escopoletina.

H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$
3	6,27 <i>d</i> (9,4 Hz)	6,27 <i>d</i> (9,2 Hz)
4	7,60 <i>d</i> (9,4 Hz)	7,61 <i>d</i> (9,6 Hz)
5	6,92 <i>s</i>	6,92 <i>s</i>
8	6,85 <i>s</i>	6,85 <i>s</i>
6-OCH <sub>3</sub>	3,96 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>
OH	-	6,15 <i>s</i>

\*  $\delta_{\text{H}}$  da escopoletina ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (JANUÁRIO, 1995).

### 3.7.3. Identificação da marmesina

A cumarina marmesina (**25**) foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 214-216) e caracterizada por RMN, em uma e duas dimensões, e EM.



(25)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.100) de **25** apresentou os dois dubletos ( $J = 9,5$  Hz) relativos a H-4 e H-3 de uma cumarina, em 7,60 e 6,22  $\delta$ , e, assim como as cumarinas **23** e **24**, dois singletos, de hidrogênios aromáticos, em 7,23 e 6,75  $\delta$ , relativos a H-5 e H-8, indicando, portanto, que C-6 e C-7 eram posições substituídas. Observaram-se ainda: um duplodubletto ( $J = 8,9$  Hz) em 4,74  $\delta$ , relativo a um hidrogênio carbinólico; dois sinais (*ddd*) de hidrogênios benzílicos, que coalescem em 3,22  $\delta$ ; e dois singletos em 1,38 e 1,24  $\delta$ , de metilas terciárias ligadas a carbono oxigenado.

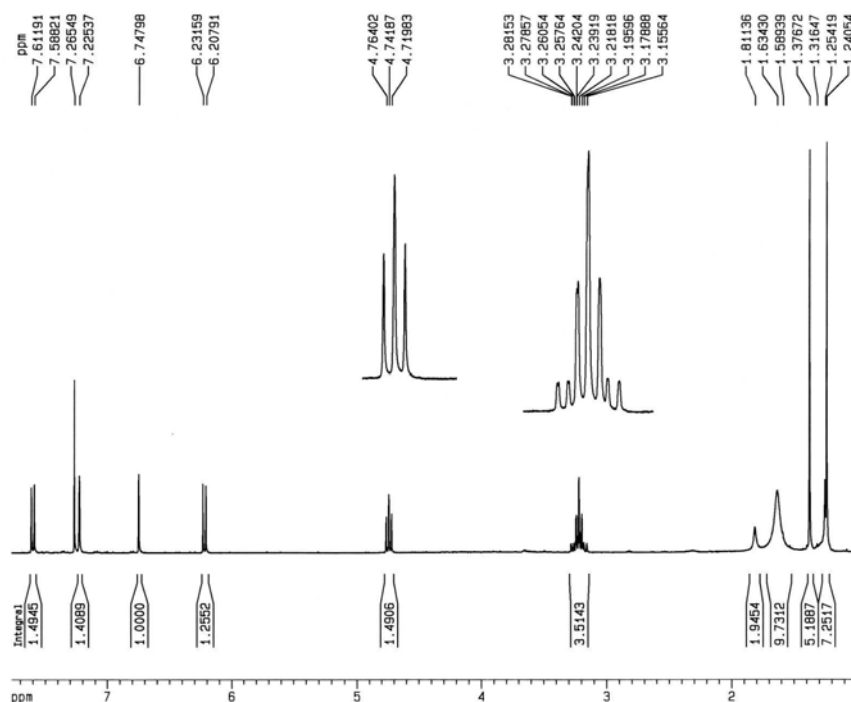


FIGURA 3.100. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da marmesina (**25**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Na família Rutaceae é bastante comum a ocorrência de furocumarinas lineares ou angulares (GRAY, 1983). Os singletos relativos a H-5 e H-8 indicaram a natureza de uma cumarina linear para **25**. Já o sistema de acoplamento entre o hidrogênio carbinólico (em 4,74  $\delta$ ) e os dois hidrogênios benzílicos (em 3,22  $\delta$ ) no espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.101), sugeriu a redução do anel furânico. Adicionalmente, a existência de duas metilas terciárias ligadas a carbono carbinólico indicou a substituição de C-2' por um grupo hidroxiisopropila. Estas suposições foram confirmadas pelos demais experimentos de RMN.

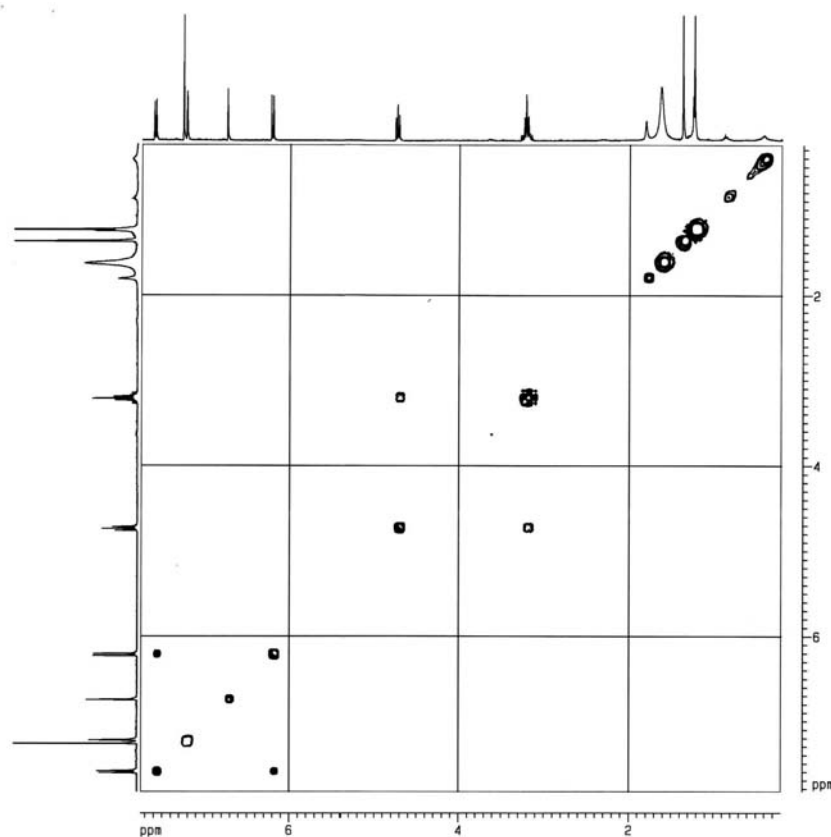


FIGURA 3.101. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da marmesina (**25**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 3.102) da cumarina **25** e a comparação com dados de literatura (MAFEZOLI, 2001) permitiram atribuir os valores de deslocamento químico de todos os carbonos hidrogenados da molécula.

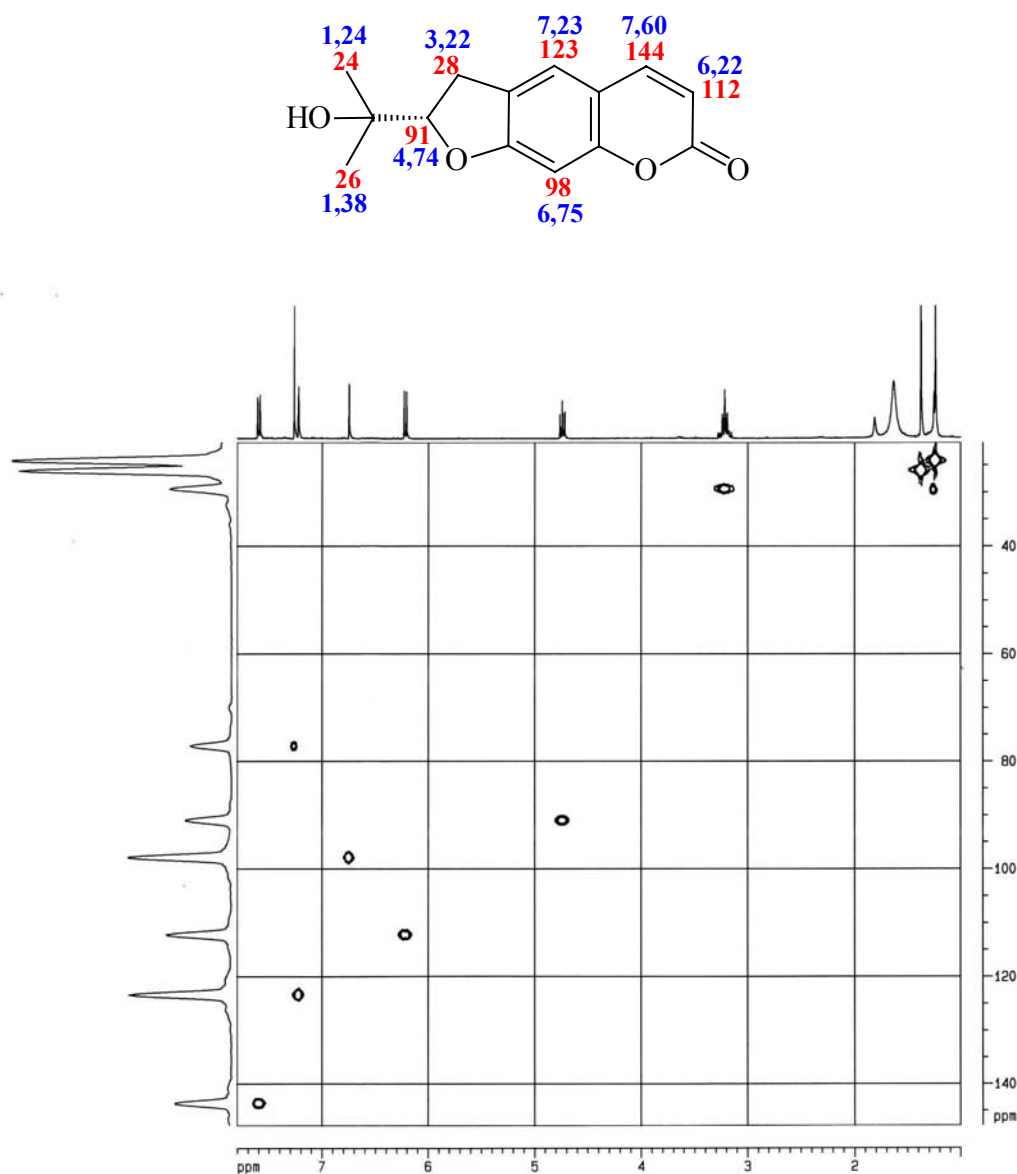


FIGURA 3.102. Mapa de contorno de HSQC da marmesina (**25**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Através da análise do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.103 – 3.104) e da comparação com dados de literatura (MAFEZOLI, 2001) foram atribuídos os carbonos quaternários da cumarina **25**.

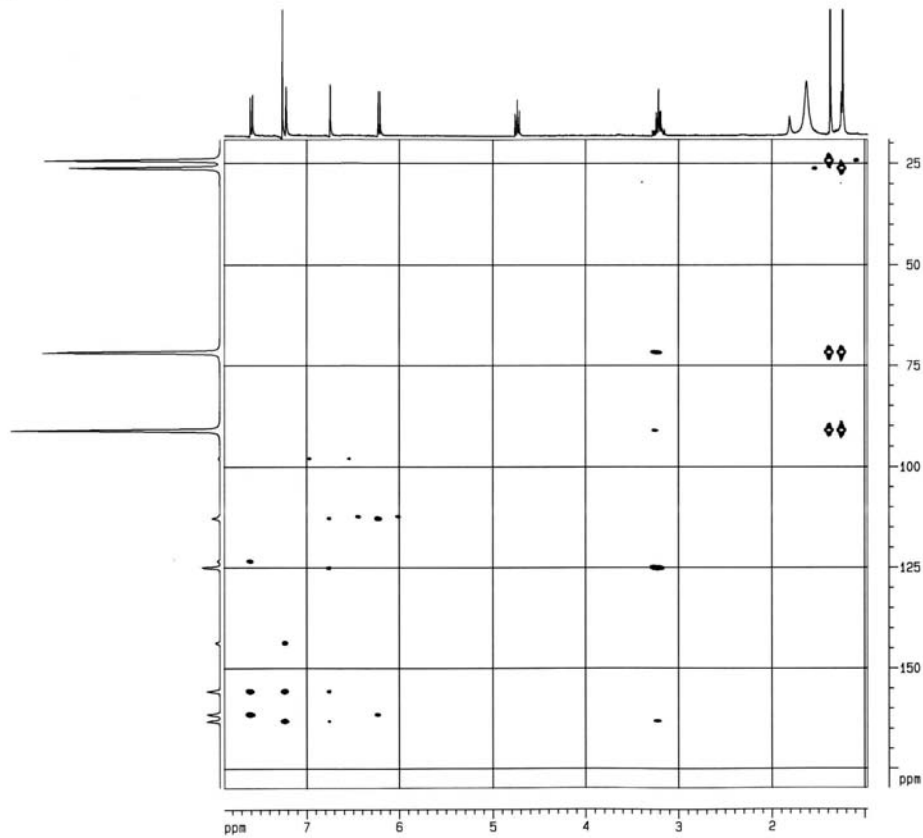


FIGURA 3.103. Mapa de contorno de HMBC da marmesina (**25**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

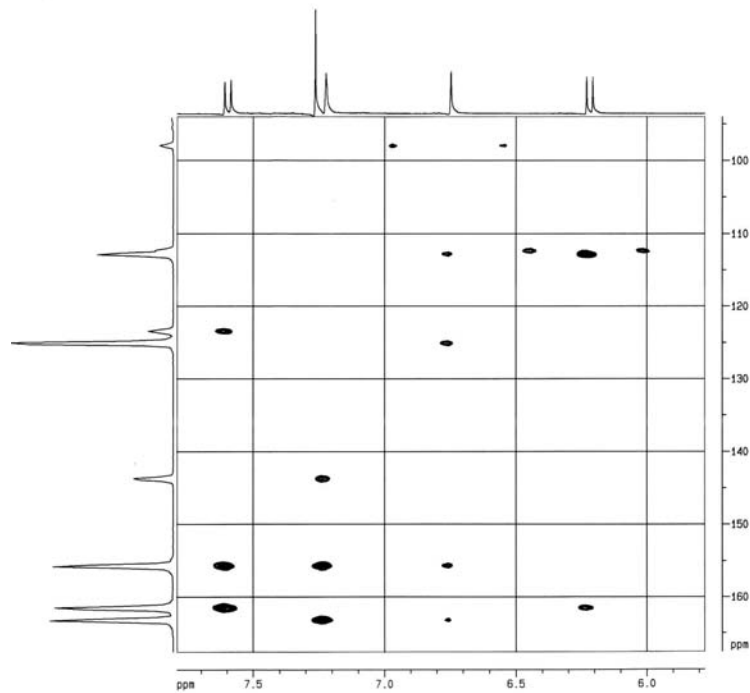
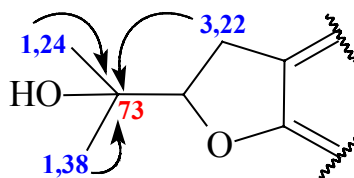
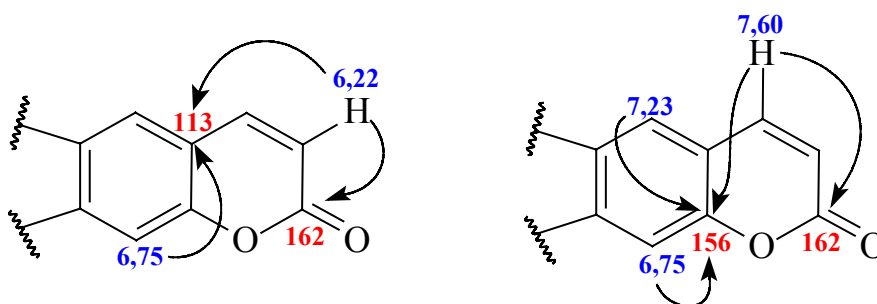


FIGURA 3.104. Ampliação do mapa de contorno de HMBC da marmesina (**25**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

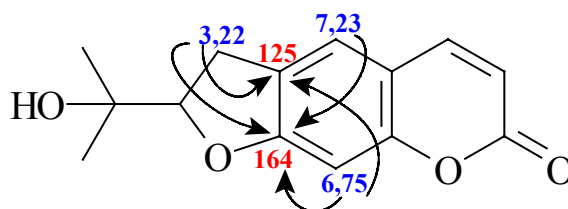
A correlação dos hidrogênios das metilas (em 1,38 e 1,24  $\delta$ ) e de H-3' (3,22  $\delta$ ) com um carbono carbinólico em 73  $\delta$  permitiu que se definisse C-4'.



A correlação de H-3 (6,22  $\delta$ ) e H-4 (7,60  $\delta$ ) com um carbono carbonílico em 162  $\delta$ , definiu C-2. H-4 (7,60  $\delta$ ) também correlacionou com um carbono em 156  $\delta$ , que correlacionava com H-5 (7,23  $\delta$ ) e H-8 (6,75  $\delta$ ), e que foi definido como C-8a. Já C-4a (113  $\delta$ ) foi atribuído através da correlação com H-3 (6,22  $\delta$ ) e H-8 (6,75  $\delta$ ).



Os carbonos 6 (125  $\delta$ ) e 7 (164  $\delta$ ) foram definidos através da correlação dos mesmos com H-5 (7,23  $\delta$ ), H-8 (6,75  $\delta$ ) e H-3'' (3,22  $\delta$ ).



Portanto, a cumarina **25** foi identificada como a marmesina, que é pela primeira vez relatada no gênero *Almeidea*, mas comumente encontrada na



família Rutaceae (GRAY, 1983). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão ilustrados na TABELA 3.26.

O espectro de massas de **25** (FIGURA 3.105) confirmou a estrutura proposta através do pico do íon molecular em  $m/z$  246 daltons, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$  da marmesina.

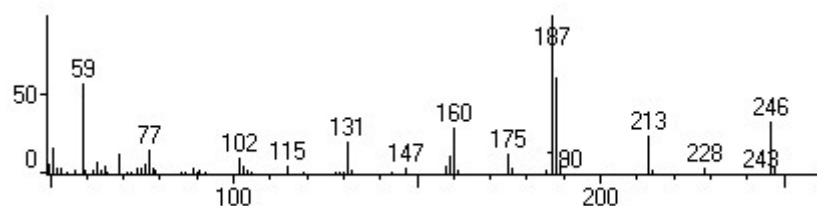


FIGURA 3.105. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da marmesina (**25**).

TABELA 3.26. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da marmesina.

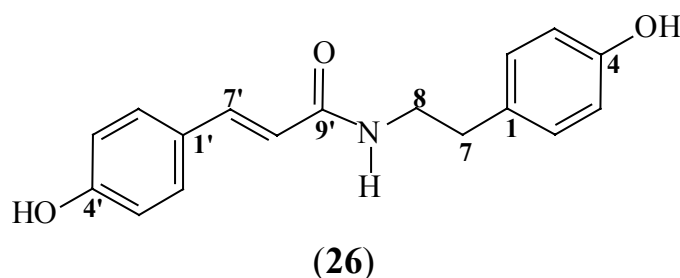
H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2			162	161,4
3	6,22 <i>d</i> ( $J = 9,5$ Hz)	6,22 <i>d</i> ( $J = 9,5$ Hz)	112	112,4
4	7,60 <i>d</i> ( $J = 9,5$ Hz)	7,60 <i>d</i> ( $J = 9,5$ Hz)	144	143,7
4a			113	112,8
5	7,23 <i>s</i>	7,22 <i>t</i> ( $J = 1,2$ Hz)	123	123,4
6			125	125,0
7			164	163,2
8	6,75 <i>s</i>	6,75 <i>s</i>	98	98,0
8a			156	155,7
2'	4,74 <i>dd</i> ( $J = 8,9$ Hz)	4,74 <i>dd</i> ( $J = 9,5$ e 8,5 Hz)	91	91,1
3'	3,22	3,25 <i>ddd</i> ( $J = 15,8, 8,5$ e 1,2 Hz) 3,19 <i>ddd</i> ( $J = 15,9, 9,5$ e 1,2 Hz)	28	29,5
4'			73	71,7
5'	1,24 <i>s</i>	1,38 <i>s</i>	24	24,3
6'	1,38 <i>s</i>	1,24 <i>s</i>	26	26,1
<u>OH</u>	1,81 <i>sl</i>	1,79 <i>sl</i>		

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  da marmesina ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) (MAFEZOLI, 2001).

### 3.8. Identificação das amidas

#### 3.8.1. Identificação da paprazina

A amida paprazina (**26**) foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 212-213) e identificada por EM e RMN, em uma e duas dimensões.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.106 – 3.107) da substância **26** apresentou: um sinal em 8,05  $\delta$  (1H); dois dubletos ( $J = 8,3$  Hz), integrados para 2H cada um, em 7,38 e 6,79  $\delta$ ; outros dois dubletos ( $J = 8,1$  Hz), também relativos a 2H cada, em 7,01 e 6,68  $\delta$ ; mais dois dubletos ( $J = 15,7$  Hz) em 7,31 e 6,39  $\delta$ ; e, dois tripletos ( $J = 7,1$  Hz) em 3,31 e 2,64  $\delta$ .

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.108) de **26**, os acoplamentos entre os hidrogênios em 7,38 (2H) e 6,79  $\delta$  (2H), e entre 7,01 (2H) e 6,68  $\delta$  (2H), sugeriram a presença de dois anéis aromáticos *para*-substituídos, em sistemas  $AA'XX'$  típicos. O acoplamento entre os hidrogênios 7,30 e 6,39  $\delta$  indicou a presença de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, no qual os hidrogênios da dupla estariam em relação *trans*. O acoplamento entre o sinal em 8,05  $\delta$  (N-H) e um dos metilenos (em 3,31  $\delta$ ), determinou que este era vicinal ao nitrogênio.

As informações dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  indicaram, portanto, a natureza de **26** como uma amida, com dois anéis aromáticos *para*-substituídos, dois metilenos vicinais num sistema isolado, e uma dupla ligação  $\alpha$

à carbonila. Sugeriu-se que grupos hidroxila fossem os substituintes dos anéis, já que não foram observados outros sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Todas essas suposições foram confirmadas através da análise dos demais espectros de RMN.

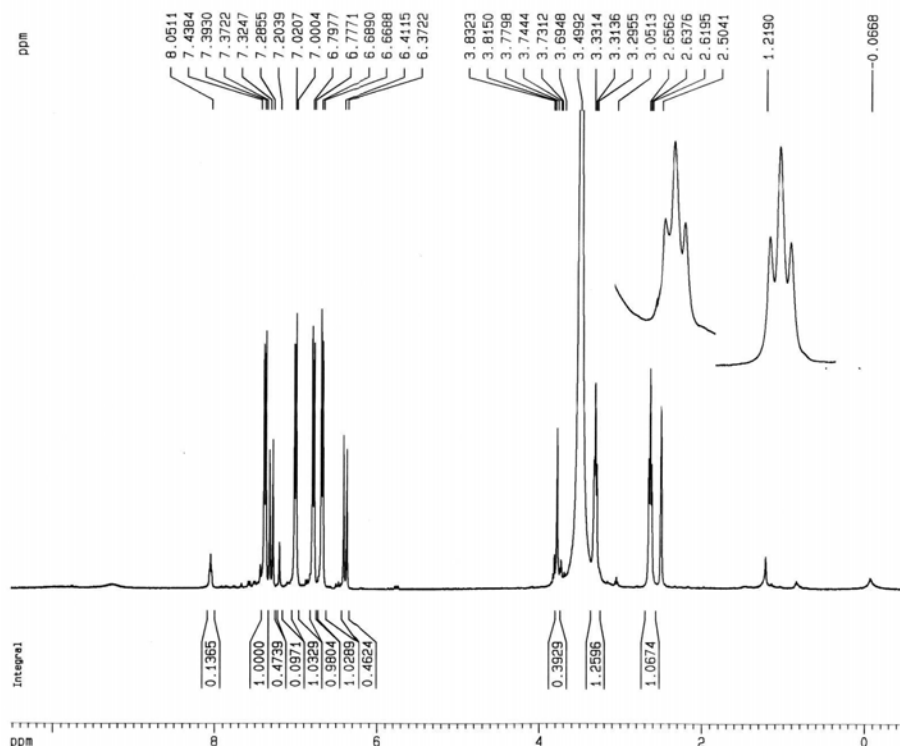


FIGURA 3.106. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

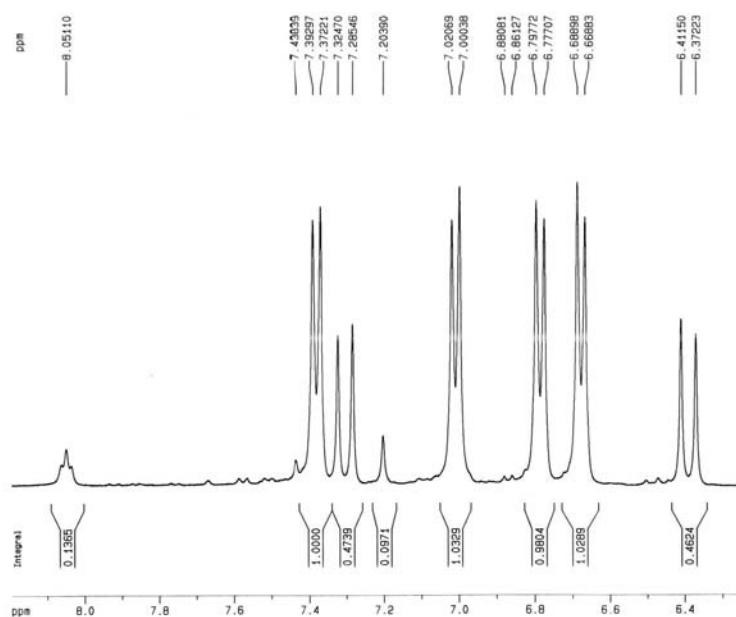


FIGURA 3.107. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

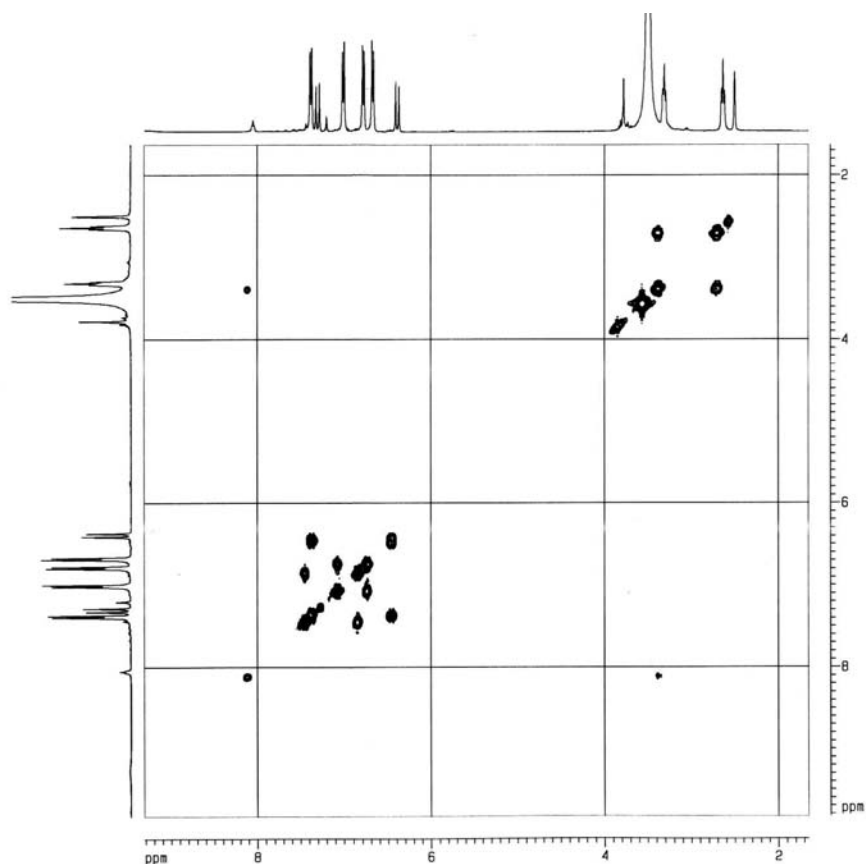
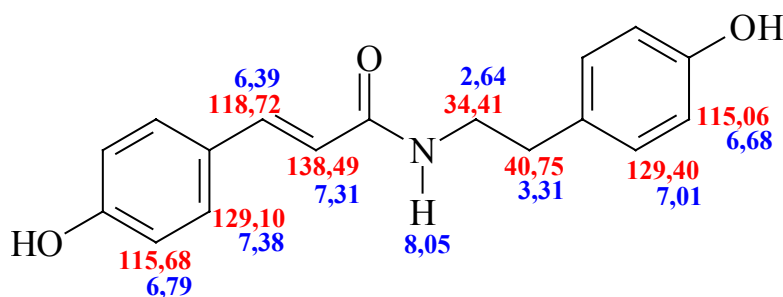


FIGURA 3.108. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.109) e do mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.110 – 3.111) da substância **26**, em conjunto com dados de literatura (RAHMAN et al., 1992), permitiu que fossem atribuídos os deslocamentos químicos de todos os carbonos hidrogenados e fossem definidos cinco carbonos quaternários na molécula em 165,23, 158,73, 155,57, 129,49 e 125,89  $\delta$ .



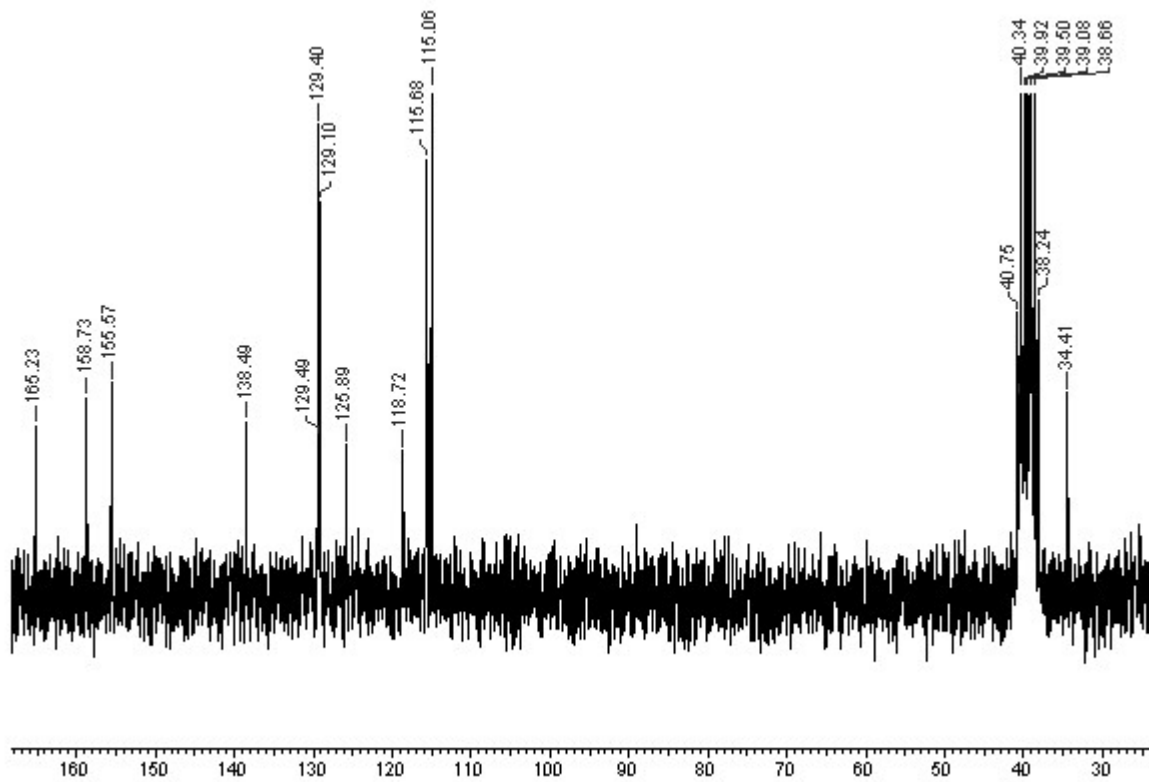


FIGURA 3.109. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da paprazina (**26**) (DMSO, 50 MHz).

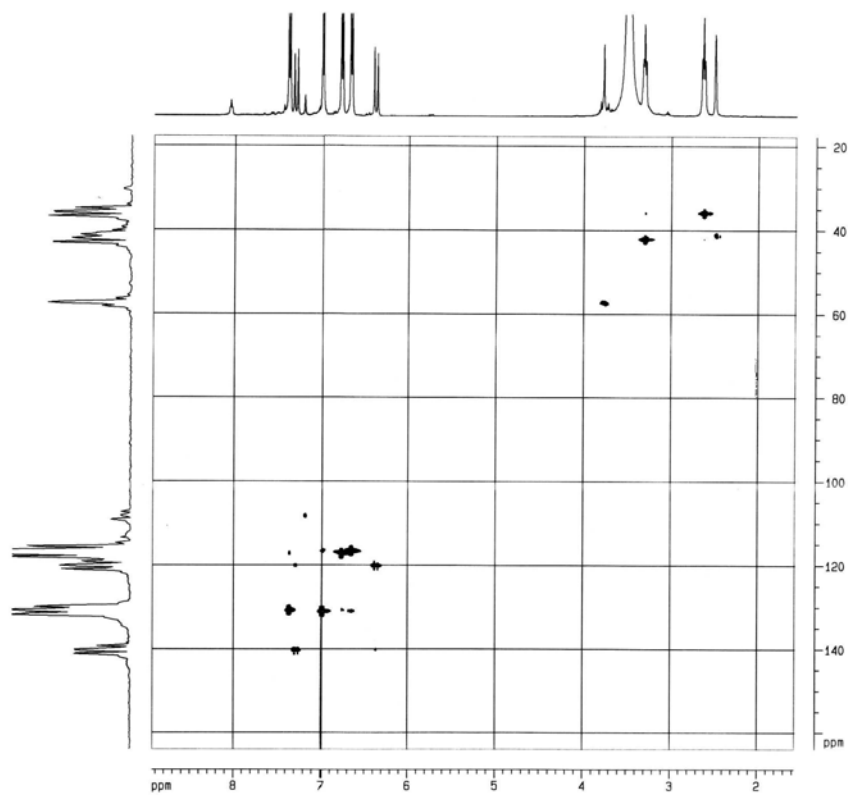


FIGURA 3.110. Mapa de contorno de HSQC da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

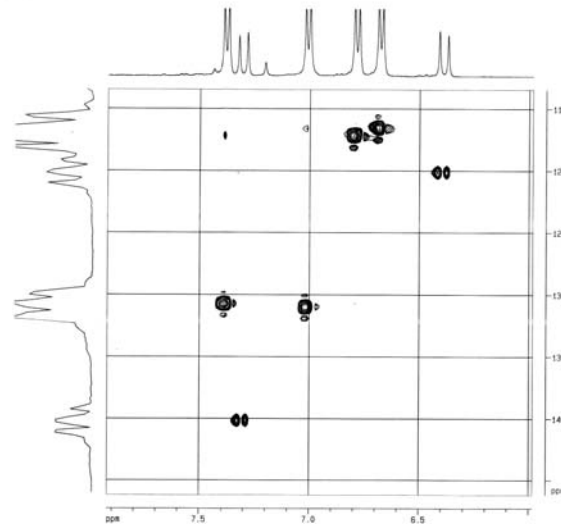


FIGURA 3.111. Ampliação do mapa de contorno de HSQC da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

O mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.112 – 3.113) permitiu que se definissem os carbonos quaternários e que a unidade derivada do ácido cinâmico na amida **26** fosse atribuída corretamente.

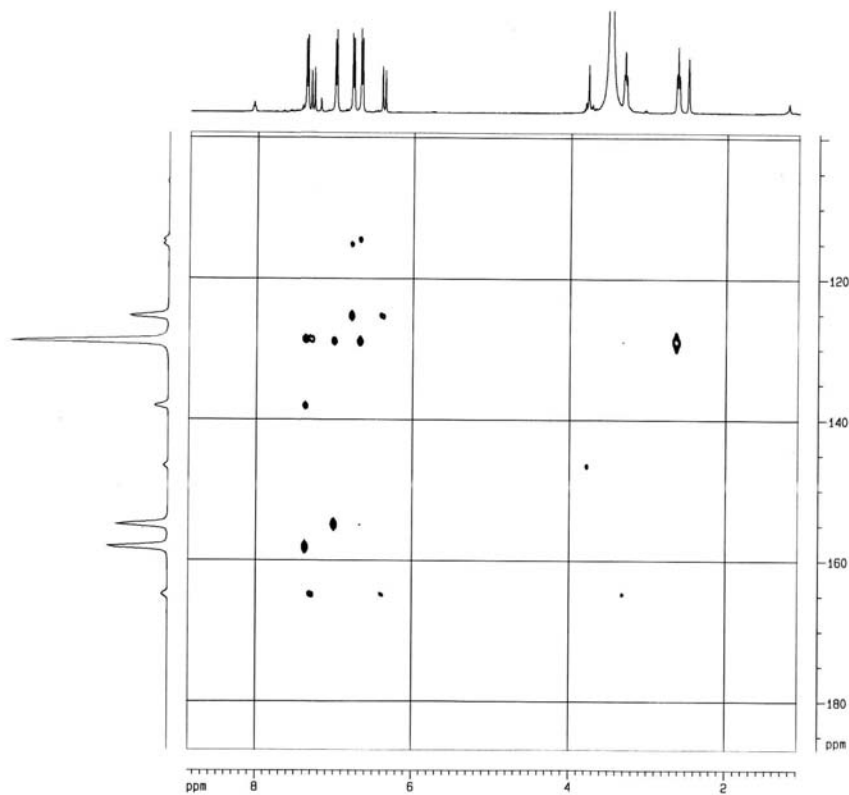


FIGURA 3.112. Mapa de contorno de HMBC da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

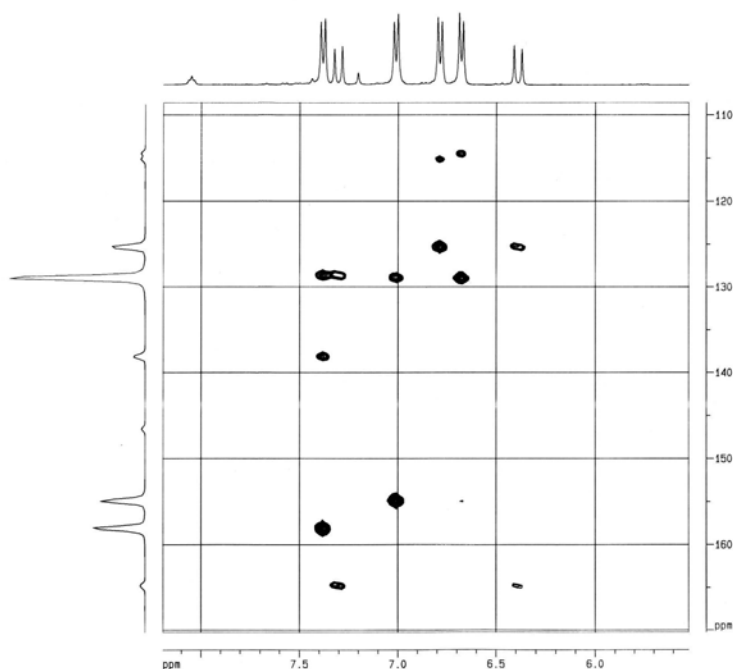
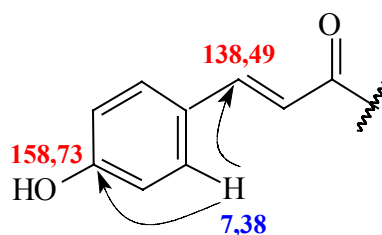
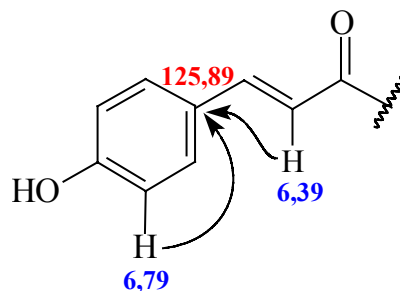


FIGURA 3.113. Ampliação do mapa de contorno de HMBC da paprazina (**26**) (DMSO, 400 MHz).

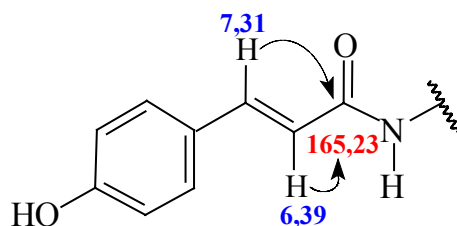
A correlação de H-2' e H-6' (7,38  $\delta$ ) com um carbono em 158,73  $\delta$ , definiu C-4'. Esses hidrogênios também correlacionaram com o carbono olefínico em 138,49  $\delta$ , que pode, desta maneira, ser corretamente atribuído à C-7'.



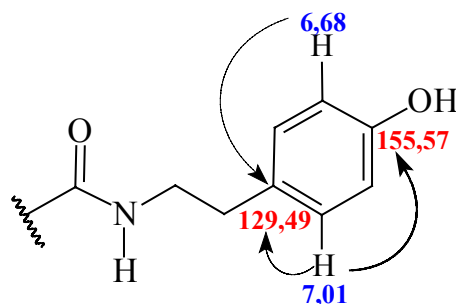
A correlação dos hidrogênios 3' e 5' (6,79  $\delta$ ) e, 8' (6,39  $\delta$ ) com um carbono em 125,89  $\delta$ , definiu C-1'.



O carbono carbonílico 9' foi definido através das correlações de H-7' (7,31  $\delta$ ) e H-8' (6,39  $\delta$ ) com o sinal em 165,23  $\delta$ .



As correlações dos hidrogênios em 6,68 (H-3 e H-5) e 7,01  $\delta$  (H-2 e H-6) com o carbono em 129,49  $\delta$  determinaram C-1. Já C-4 (155,57  $\delta$ ) foi atribuído através da correlação com H-2 e H-6.



O espectro de massas (FIGURA 3.114) confirmou a estrutura proposta para a amida **26** através dos picos  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  284 e 306 daltons, compatíveis com a fórmula molecular  $C_{17}H_{17}NO_3$ .

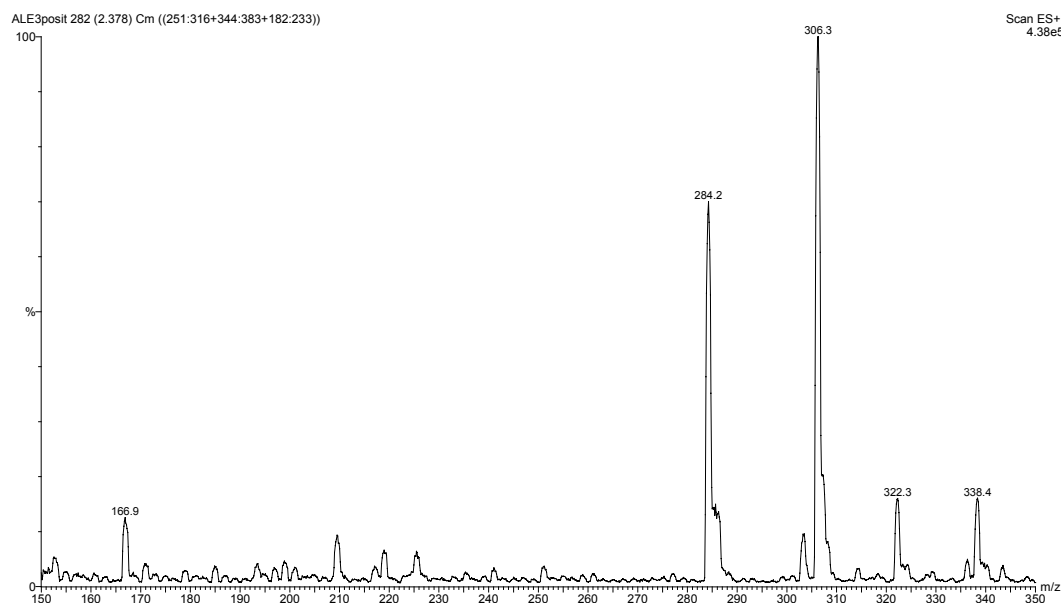


FIGURA 3.114. Espectro de massas (ES+) da paprazina (**26**).



Portanto, a amida **26** foi identificada como a paprazina, que não havia sido isolada anteriormente do gênero *Almeidea* e cujos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são descritos na TABELA 3.27.

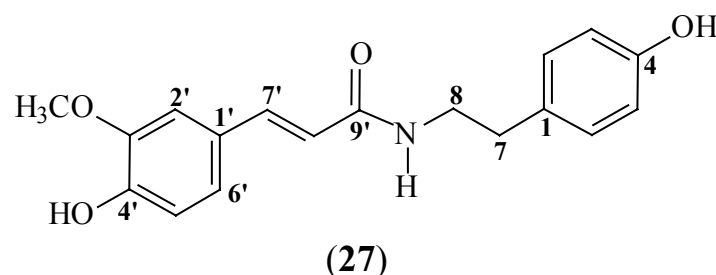
TABELA 3.27. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da paprazina.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
1			129,49	127,48
2 e 6	7,01 <i>d</i> ( $J = 8,1$ Hz)	6,71 <i>d</i> ( $J = 8,6$ Hz)	129,40	116,24
3 e 5	6,68 <i>d</i> ( $J = 8,1$ Hz)	6,78 <i>d</i> ( $J = 8,6$ Hz)	115,06	130,51
4			155,57	156,92
7	2,64 <i>t</i> ( $J = 7,1$ Hz)	2,78 <i>t</i> ( $J = 7,6$ Hz)	34,41	35,84
8	3,31 <i>t</i> ( $J = 7,1$ Hz)	3,45 <i>t</i> ( $J = 7,6$ Hz)	40,75	42,54
1'			125,89	131,34
2' e 6'	7,38 <i>d</i> ( $J = 8,3$ Hz)	7,38 <i>d</i> ( $J = 8,6$ Hz)	129,10	116,89
3' e 5'	6,79 <i>d</i> ( $J = 8,3$ Hz)	7,05 <i>d</i> ( $J = 8,6$ Hz)	115,68	130,68
4'			158,73	156,92
7'	7,31 <i>d</i> ( $J = 15,7$ Hz)	6,36 <i>d</i> ( $J = 15,7$ Hz)	138,49	118,25
8'	6,39 <i>d</i> ( $J = 15,7$ Hz)	7,44 <i>d</i> ( $J = 15,7$ Hz)	118,72	141,81
9'			165,23	169,28
<u>NH</u>	8,05 <i>tl</i>	n.d.		

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  da paprazina ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) (RAHMAN et al., 1992); n.d. = não determinado

### 3.8.2. Identificação da *N-trans-feruloiltiramina*

A amida **27** foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 212-213) e caracterizada por EM e RMN, em uma e duas dimensões.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.115 – 3.116) da substância **27** foi bastante similar ao da amida **26**. Foram observados sinais em: 8,00  $\delta$  (*tl*,  $J = 5,5$  Hz), relativo à *N*-H; dois dubletos ( $J = 15,7$  Hz) em 7,30 e 6,42  $\delta$ , de hidrogênios olefinicos em relação *trans*; dois outros dubletos ( $J = 8,5$  Hz) em 7,01 e 6,68  $\delta$ , integrados para 2H cada um, indicando a presença de um anel aromático *para* substituído, com um sistema de hidrogênios *AA'XX'*; três outros sinais de hidrogênios aromáticos em 7,10 (*sl*, 1H), 6,98 (*dd*,  $J = 8,1$  e 1,8 Hz, 1H) e 6,79  $\delta$  (*d*,  $J = 8,1$  Hz, 1H), sugerindo a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído; dois tripletos ( $J = 7,5$  Hz) em 3,32 e 2,64  $\delta$ , relativos a hidrogênios metilênicos vicinais num sistema isolado; e, um singletto em 3,79  $\delta$  (3H), relativo a uma metoxila aromática.

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.117) de **27** confirmou a presença de um anel aromático *para*-substituído através do acoplamento dos dois hidrogênios em 7,01  $\delta$  com os hidrogênios em 6,68  $\delta$ , que por comparação com a amida **26** foram atribuídos a H-2 e H-6 e, H-3 e H-5, respectivamente. Já, o anel 1,3,4-trissubstituído foi definido através dos acoplamentos entre os hidrogênios em 6,98 e 6,79  $\delta$  em *orto* ( $J$  grande), e entre o primeiro e o hidrogênio em 7,10  $\delta$ , com uma constante  $J$  pequena *meta*. Desta forma, foi definido o padrão de substituição do anel da unidade derivada do ácido ferúlico. Neste espectro, também se observou, assim como para a amida **26**, o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em 3,32  $\delta$  com o *N*-H (em 8,00  $\delta$ ), determinando a relação vicinal dos mesmos.

Desta forma, a diferença observada entre os espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **26** e **27** foi a presença de um grupo metoxila aromática e de um anel 1,3,4-trissubstituído para **27**. Portanto, sugeriu-se a natureza de **27** como uma amida derivada do ácido ferúlico e da tiramina. Estas suposições foram confirmadas pelos demais espectros de RMN.

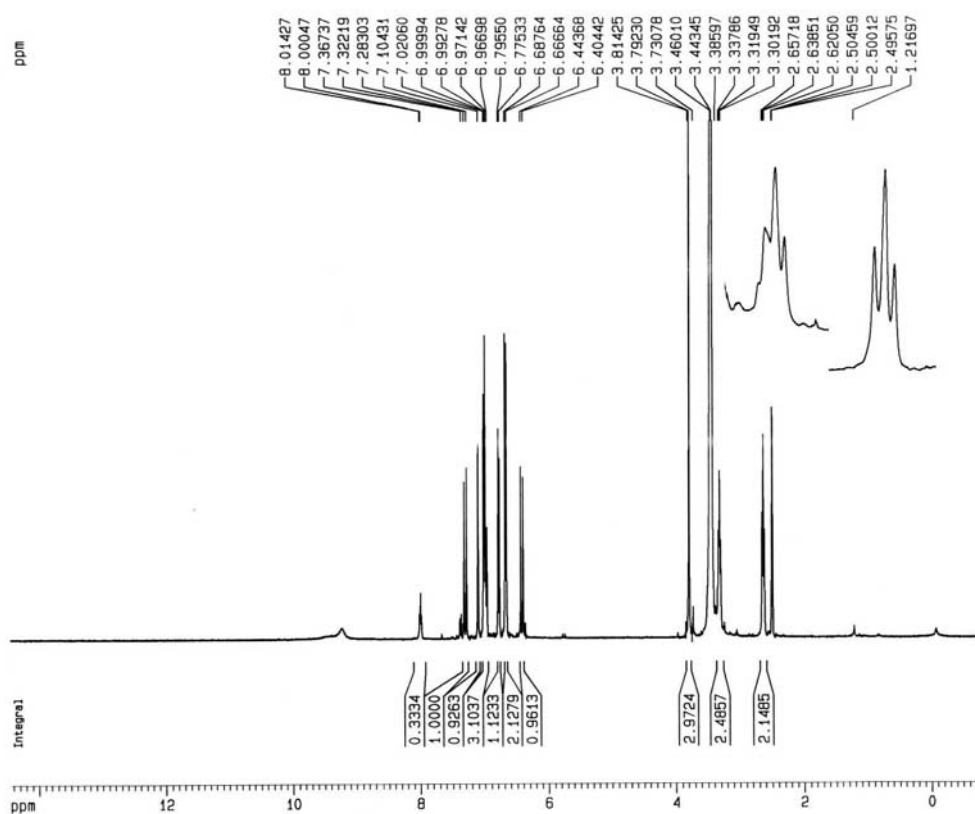


FIGURA 3.115. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 400 MHz).

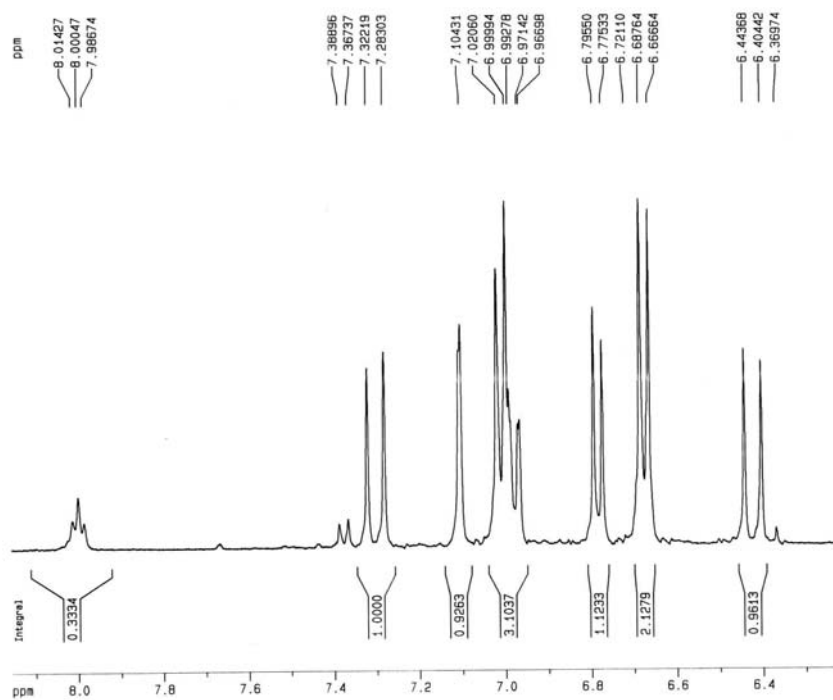


FIGURA 3.116. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 400 MHz).

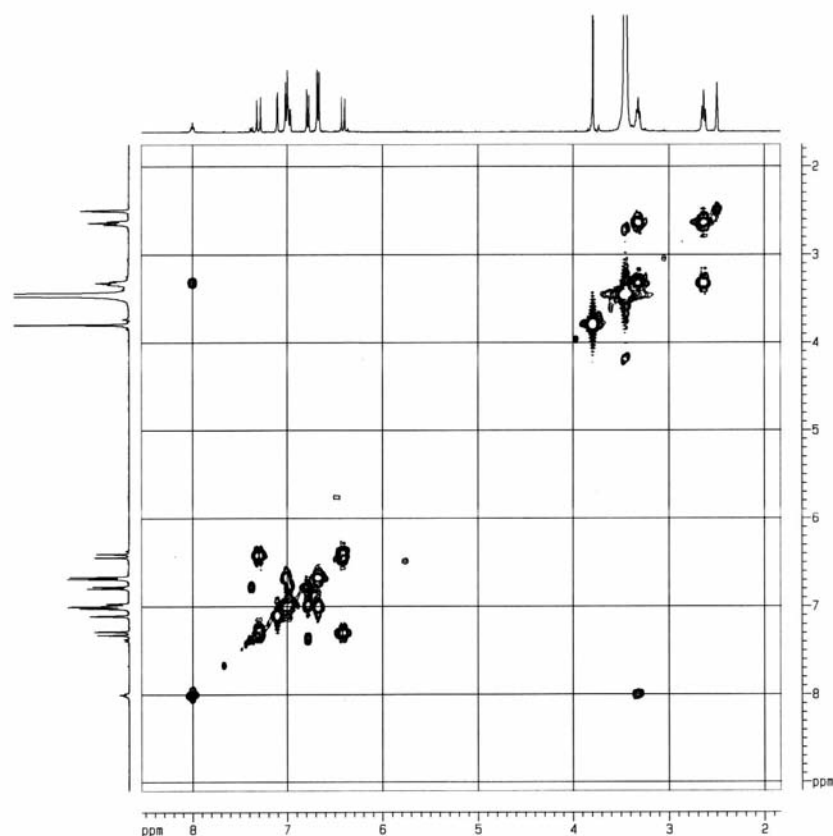
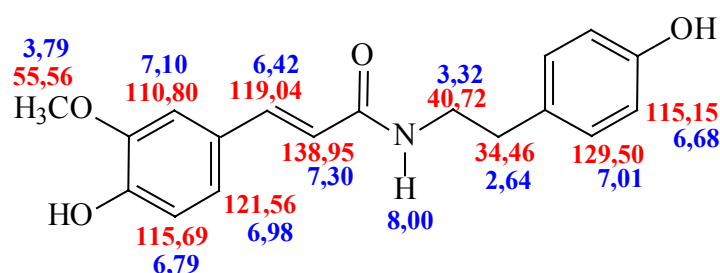


FIGURA 3.117. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 400 MHz).

Através da comparação com dados de literatura (SARKER et al., 2000) e da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.118) e do mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.119 – 3.120) foram determinados os deslocamentos químicos de todos os carbonos hidrogenados da molécula e seis carbonos quaternários (165,40, 155,66, 148,27, 147,85, 129,56 e 126,46  $\delta$ ).



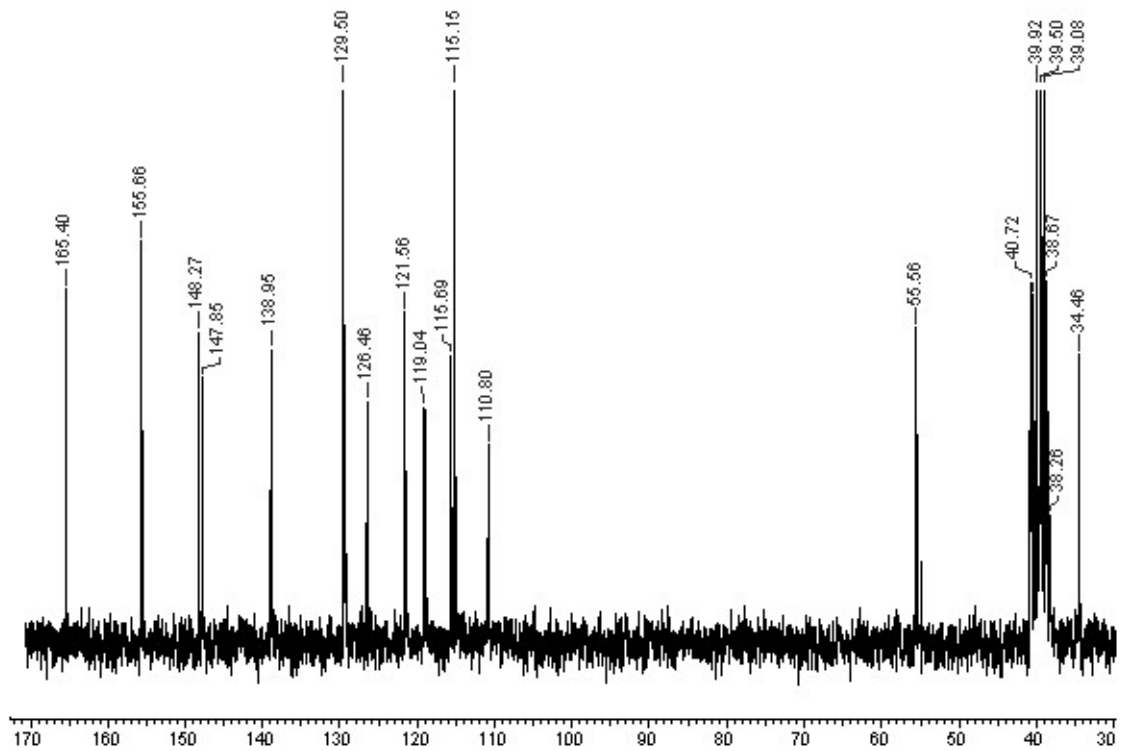


FIGURA 3.118. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 50 MHz).

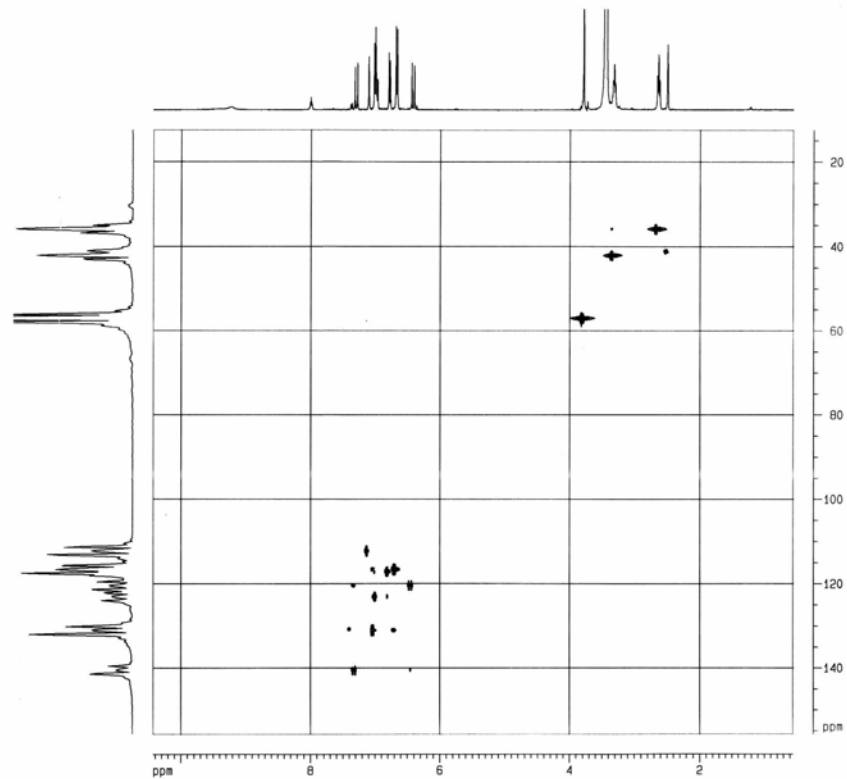


FIGURA 3.119. Mapa de contorno de HSQC da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 400 MHz).

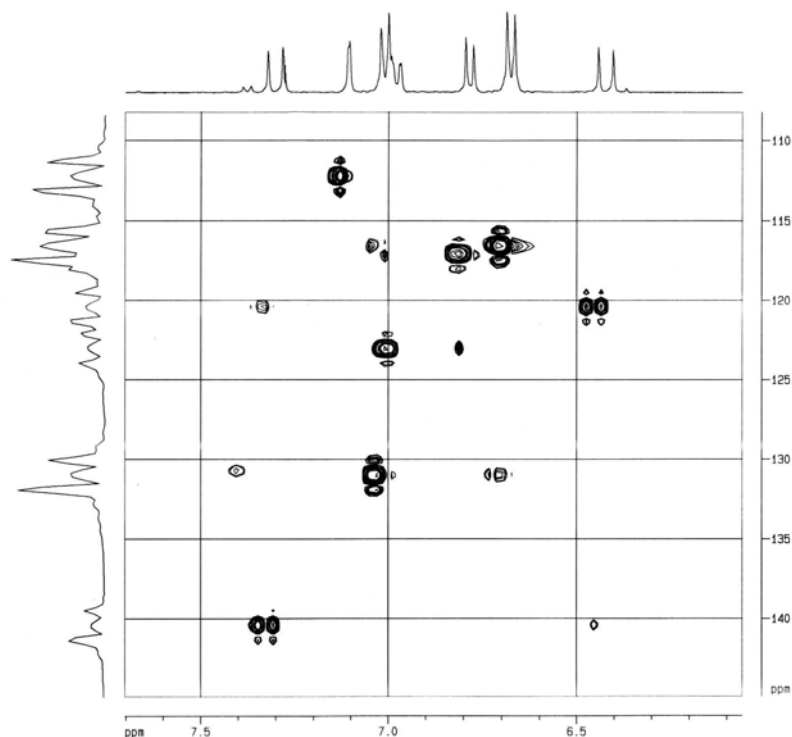
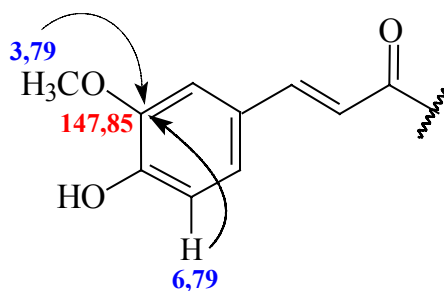


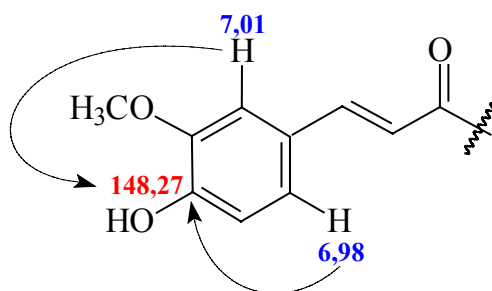
FIGURA 3.120. Ampliação do mapa de contorno de HSQC da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 400 MHz).

As atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários da amida **27** e a correção dos valores atribuídos a 7' e 8' da unidade do ácido ferúlico foram feitos através da análise do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.121 – 3.122).

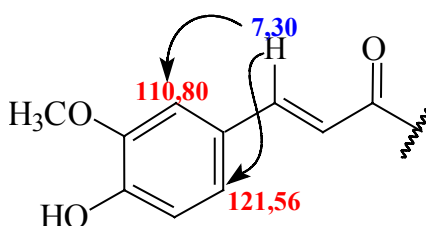
A correlação entre os hidrogênios da metoxila, em 3,79  $\delta$ , e de H-5' (6,79  $\delta$ ) com um carbono, em 147,85  $\delta$ , permitiu que se definisse C-3'.



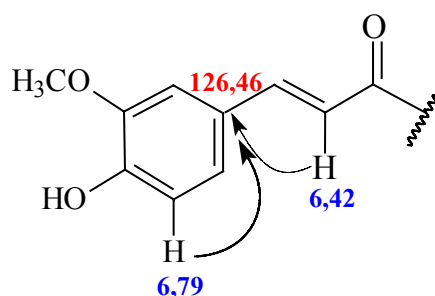
As correlações entre H-2' (7,10  $\delta$ ) e H-6' (6,98  $\delta$ ) e um carbono em 148,27  $\delta$ , determinaram C-4'.



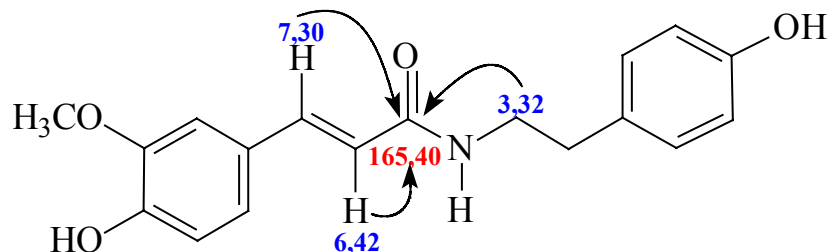
Através da correlação de C-2' (110,80  $\delta$ ) e C-6' (121,56  $\delta$ ) com o hidrogênio em 7,30  $\delta$ , pode-se atribuir corretamente este a H-7' e o hidrogênio em 6,42  $\delta$  a H-8'.



C-1' (126,46  $\delta$ ) foi determinado através da correlação com H-5' (6,79  $\delta$ ) e H-8' (6,42  $\delta$ ).



O carbono carbonílico C-9' (165,40  $\delta$ ) foi atribuído através das correlações com os hidrogênios 8 (3,32  $\delta$ ), 7' (7,30  $\delta$ ) e 8' (6,42  $\delta$ ).



C-1 (129,56  $\delta$ ) e C-4 (155,66  $\delta$ ) foram definidos através das correlações com os hidrogênios em 7,01 (H-2 e H-6) e 6,68  $\delta$  (H-3 e H-5). Entretanto, vale

ressaltar que a atribuição de C-1 foi confirmada através das correlações com os hidrogênios metilênicos 7 (2,64  $\delta$ ) e 8 (3,32  $\delta$ ).

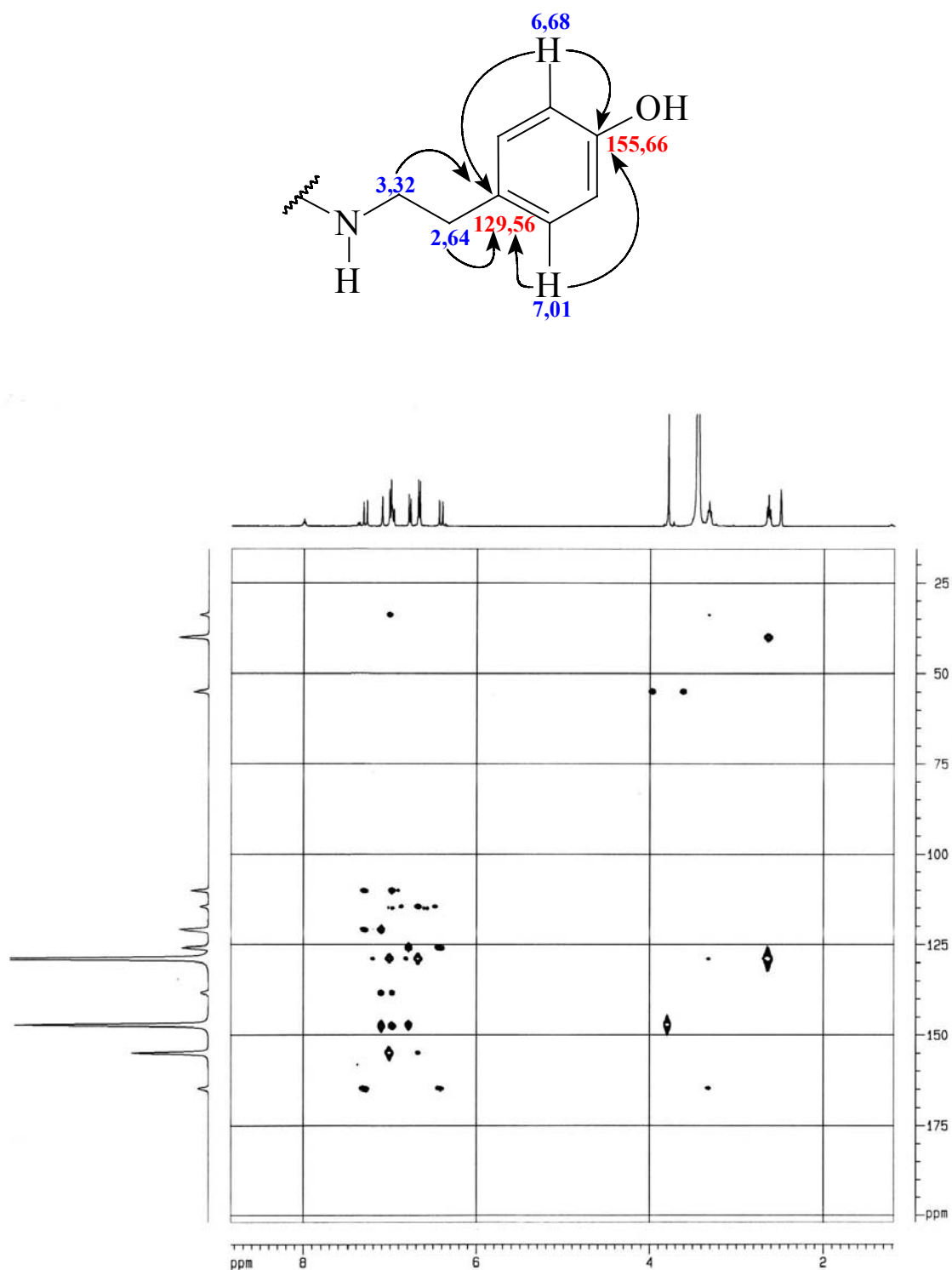


FIGURA 3.121. Mapa de contorno de HMBC da *N-trans*-feruloiltiramina (27) (DMSO, 400 MHz).



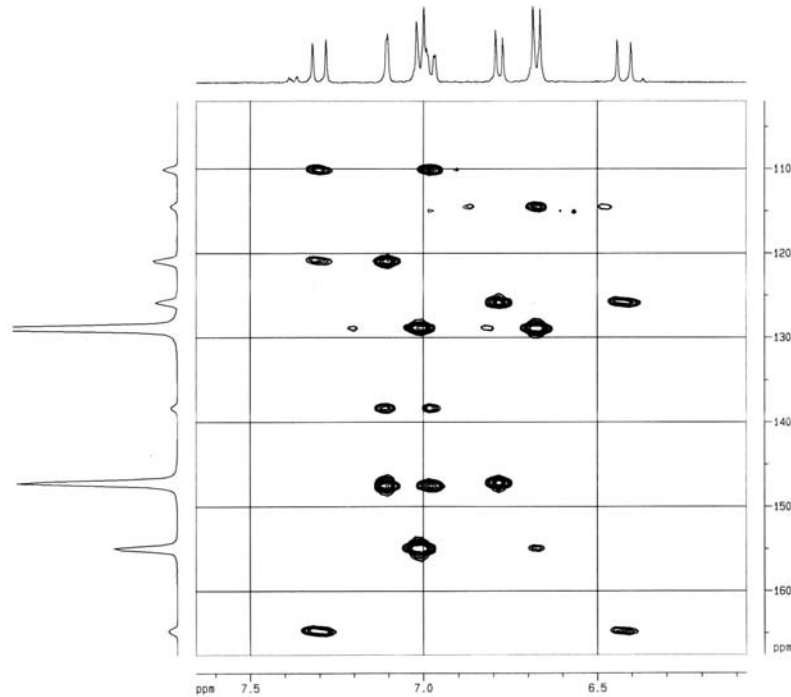


FIGURA 3.122. Ampliação do mapa de contorno de HMBC da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) (DMSO, 400 MHz).

O espectro de massas (FIGURA 3.123) confirmou a estrutura proposta para a amida **27** através dos picos  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$  em  $m/z$  314, 336 e 352 daltons, compatíveis com a fórmula molecular  $C_{18}H_{19}NO_4$ .

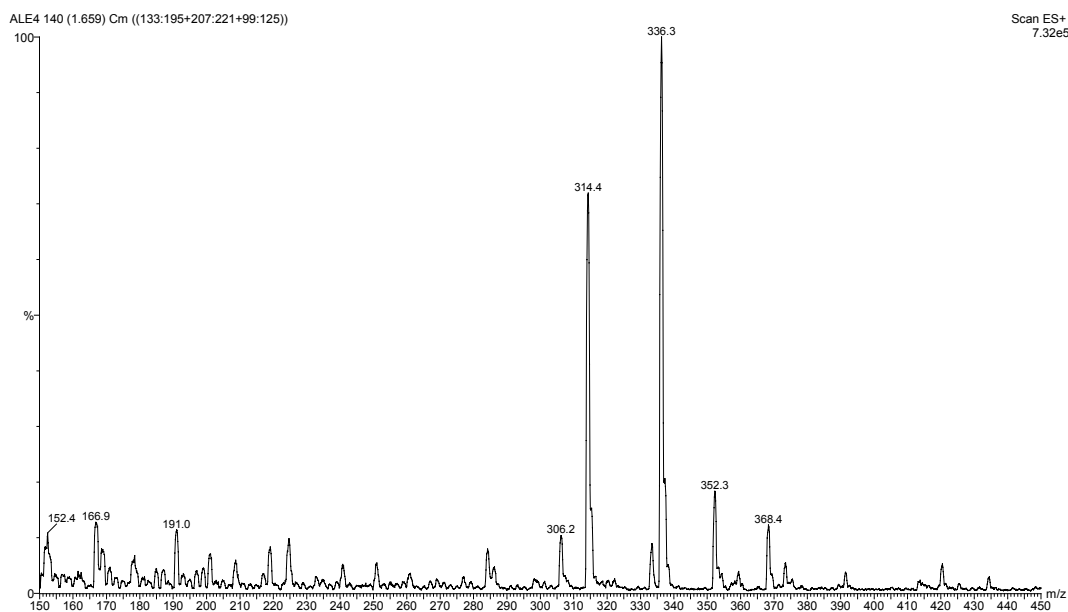


FIGURA 3.123. Espectro de massas (ES+) da *N-trans*-feruloiltiramina (**27**).

Portanto, através da análise dos dados espectroscópicos a amida **27** foi identificada como a *N-trans*-feruloiltiramina, que não havia sido isolada anteriormente do gênero *Almeidea*. Seus dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão descritos na TABELA 3.28.

TABELA 3.28. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da *N-trans*-feruloiltiramina.

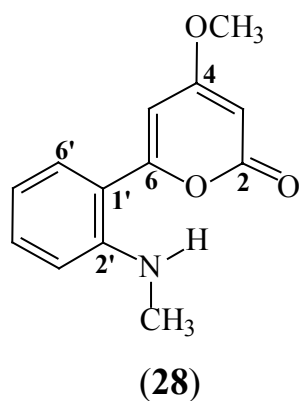
H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
1			129,56	131,7
2 e 6	7,01 <i>d</i> ( $J = 8,5$ Hz)	6,74 <i>d</i> ( $J = 8,4$ Hz)	129,50	116,7
3 e 5	6,68 <i>d</i> ( $J = 8,5$ Hz)	7,06 <i>d</i> ( $J = 8,4$ Hz)	115,15	131,1
4			155,66	157,3
7	2,64 <i>t</i> ( $J = 7,5$ Hz)	2,77 <i>t</i> ( $J = 7,5$ Hz)	34,46	36,2
8	3,32 <i>tl</i> ( $J = 7,5$ Hz)	3,48 <i>t</i> ( $J = 7,5$ Hz)	40,72	42,9
1'			126,46	128,7
2'	7,10 <i>sl</i>	7,12 <i>d</i> ( $J = 1,7$ Hz)	110,80	112,1
3'			147,85	149,7
4'			148,27	150,2
5'	6,79 <i>d</i> ( $J = 8,1$ Hz)	6,81 <i>d</i> ( $J = 8,1$ Hz)	115,69	116,9
6'	6,98 <i>dd</i> ( $J = 8,1$ e 1,8 Hz)	7,02 <i>dd</i> ( $J = 8,1$ e 1,7 Hz)	121,56	123,6
7'	7,30 <i>d</i> ( $J = 15,7$ Hz)	6,42 <i>d</i> ( $J = 15,5$ Hz)	138,95	142,4
8'	6,42 <i>d</i> ( $J = 15,7$ Hz)	7,45 <i>d</i> ( $J = 15,5$ Hz)	119,04	119,2
9'			165,40	169,6
3'-OCH <sub>3</sub>	3,79 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>	55,56	56,9
NH	8,00 <i>tl</i> ( $J = 5,5$ Hz)	n.d.		

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  da *N-trans*-feruloiltiramina (MeOD, 500 e 125 MHz) (SARKER et al., 2000); n.d. = não determinado

### 3.9. Identificação das outras classes de metabólitos

#### 3.9.1. Identificação do derivado do ácido antranílico

A substância **28** foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Almeidea rubra* (ALFMA) (p. 217-218) e identificada através de EM, difração de raios-X e RMN.



A estrutura molecular da substância **28** foi determinada principalmente através de difração de raios-X (FIGURA 3.124). Para isso, realizou-se a cristalização de **28** em MeOH. Nos cristais obtidos formaram-se duas moléculas em cada unidade cristalográfica, sendo que estas possuíam interações inter e intramoleculares.

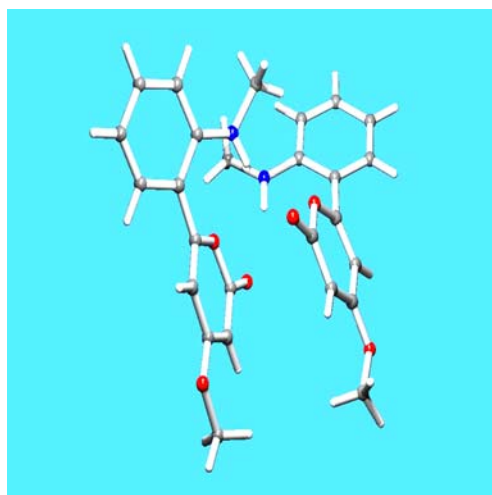


FIGURA 3.124. Estrutura cristalográfica do derivado do ácido antranílico **28**.

Anteriormente, descreveu-se que as principais classes de alcalóides encontradas na família Rutaceae derivam do ácido antranílico através da incorporação de uma ou mais unidades acetato e a posterior ciclização através do ataque nucleofílico do nitrogênio a carbonila (FIGURA 3.51) (WATERMAN, 1999). Entretanto, para a substância **28** uma possível rota biogenética (FIGURA 3.125) envolveria a incorporação de duas unidades

acetato e a posterior ciclização através do ataque nucleofílico do oxigênio, levando a formação de uma  $\alpha$ -pirona. Este tipo de ciclização para substâncias derivadas do ácido antranílico não foi encontrada na literatura e, portanto, o metabólito **28** está sendo pela primeira vez relatado.

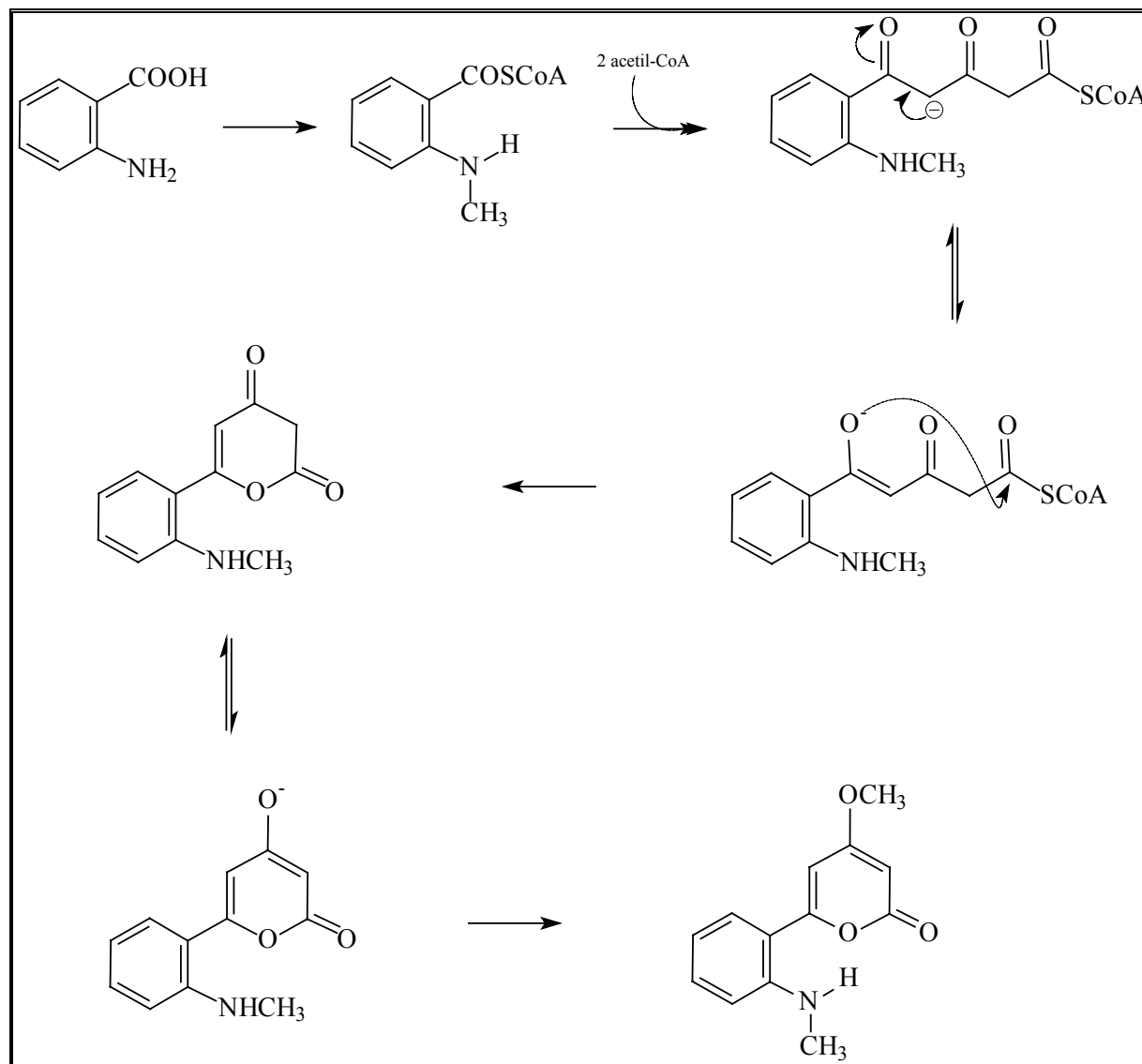
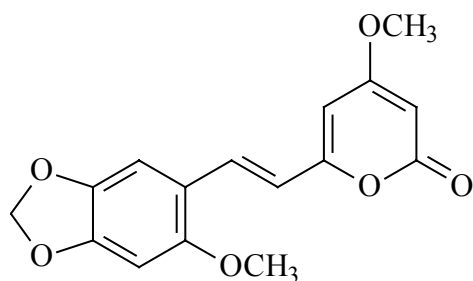


FIGURA 3.125. Proposta biogênica para a formação do derivado do ácido antranílico **28**.

As atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram feitas através da análise dos espectros de RMN. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.126) de **28** observaram-se: dois multipletos em 7,33 e 6,70  $\delta$ , relativos aos quatro hidrogênios aromáticos; dois dubletos ( $J = 2,2$  Hz) em 6,23 e 5,49  $\delta$ , que

foram atribuídos por comparação com a estililpirona (**G**) (PIZZOLATTI et al., 2000), como H-5 e H-3, respectivamente; um sinal largo em 5,36  $\delta$ , referente ao N-H; o singlete da metoxila em 3,85  $\delta$ ; e, um singlete largo em 2,87  $\delta$  relativo à N-metila.



(G)

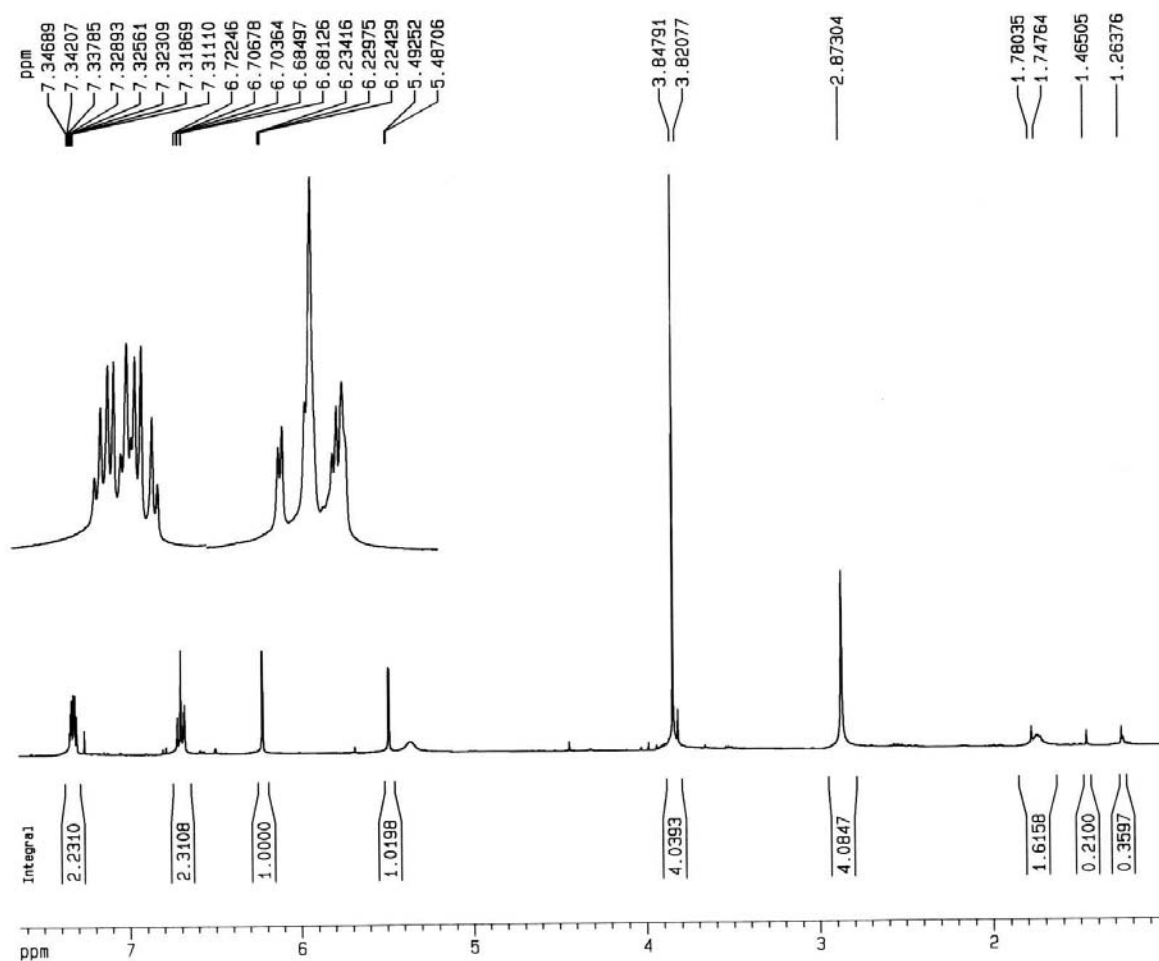


FIGURA 3.126. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado do ácido antranílico **28** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.127) mostrou o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos, entre os hidrogênios 3 (5,49  $\delta$ ) e 5 (6,23  $\delta$ ) da  $\alpha$ -pirona, e entre a *N*-metila (2,87  $\delta$ ) e o *N*-H (5,36  $\delta$ ).

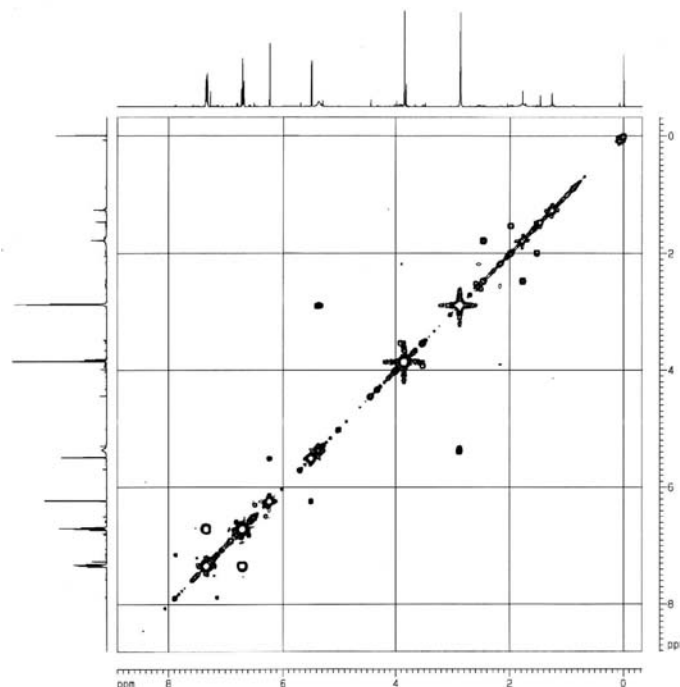
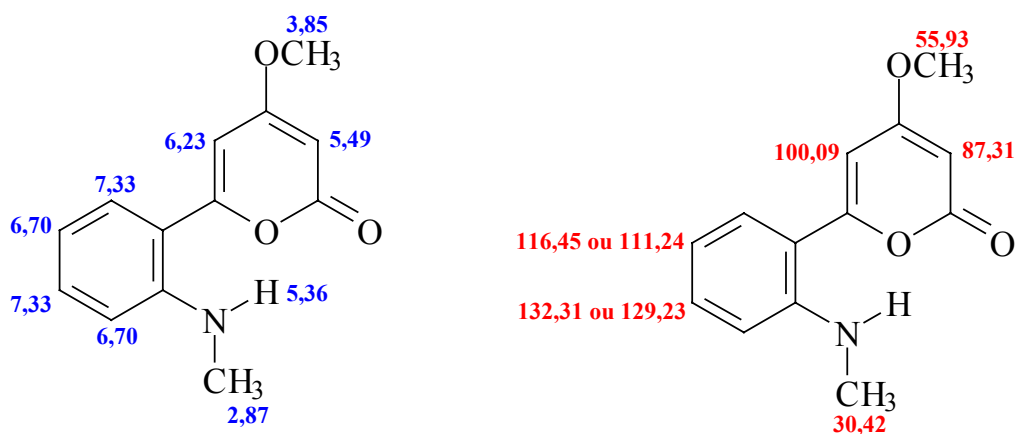


FIGURA 3.127. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do derivado do ácido antranílico **28** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Através da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.128), do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 3.129) e da comparação com dados de literatura para a  $\alpha$ -pirona **G** (PIZZOLATTI et al., 2000) foram determinados alguns deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados e 5 carbonos quaternários (171,65, 164,03, 162,81, 147,55, 115,97  $\delta$ ) no derivado **28**.



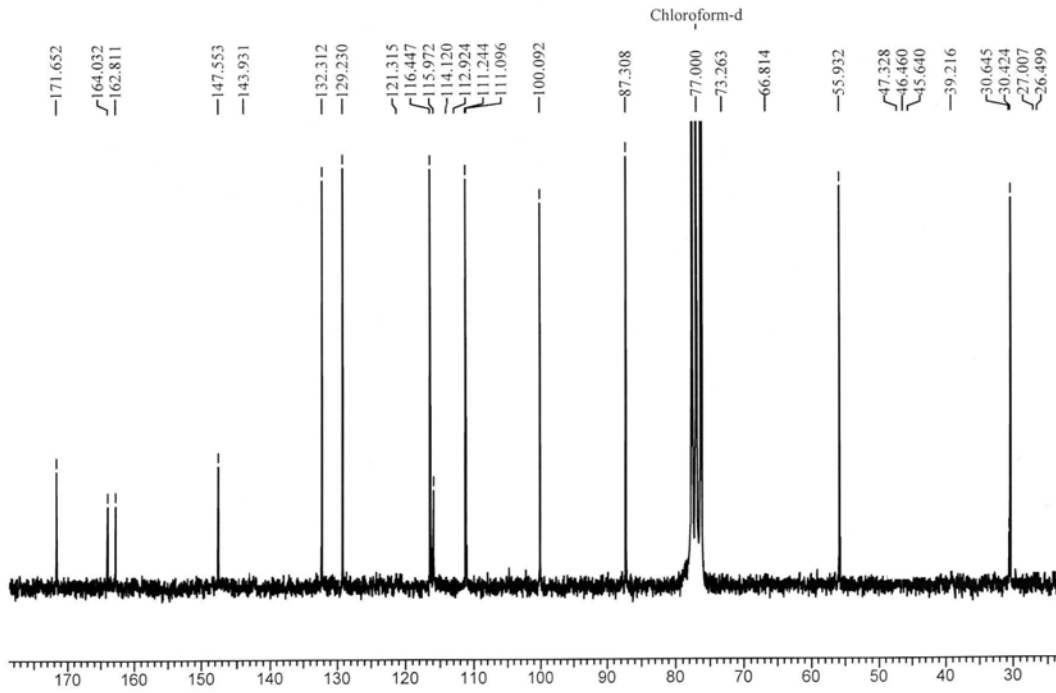


FIGURA 3.128. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado do ácido antranílico **28** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

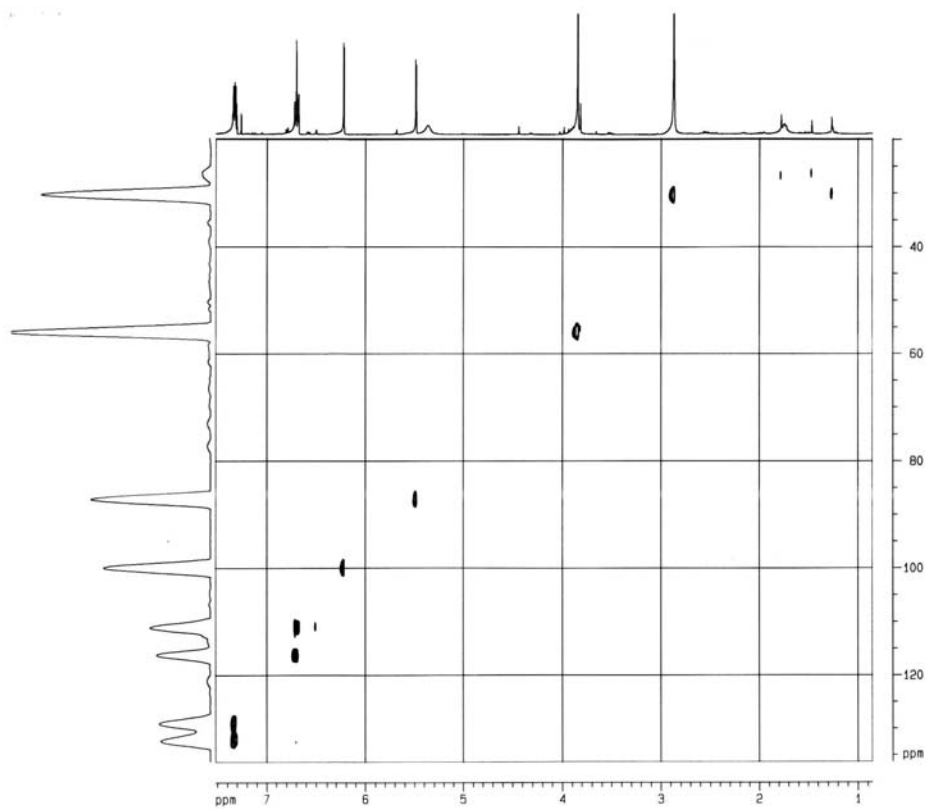
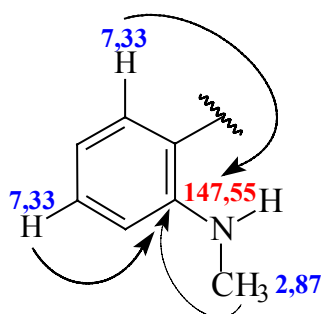


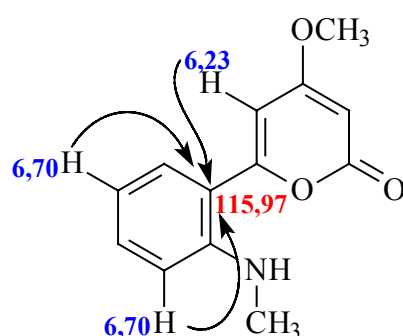
FIGURA 3.129. Mapa de contorno de HSQC do derivado do ácido antranílico **28** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários do derivado **28** foram atribuídos através do mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 3.130 – 3.131).

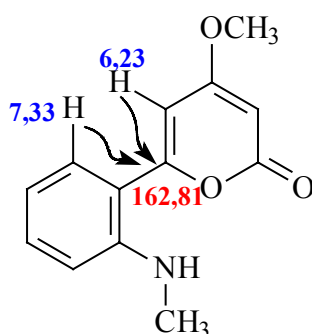
Neste mapa, C-2' (147,55  $\delta$ ) foi definido através da sua correlação com a *N*-metila (2,87  $\delta$ ) e com H-4' e H-6' (7,33  $\delta$ ).



A correlação de um carbono em 115,97  $\delta$  com os hidrogênios 5 (6,23  $\delta$ ), 3' e 5' (6,70  $\delta$ ) permitiu a atribuição de C-1'.



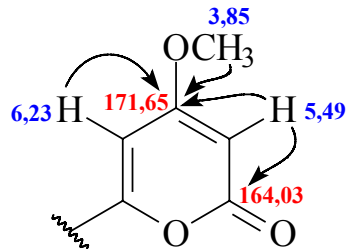
C-6 (162,81  $\delta$ ) foi determinado através da correlação com H-5 (6,23  $\delta$ ) e H-6' (7,33  $\delta$ ).



O carbono mais desblindado, em 171,65  $\delta$ , foi atribuído a C-4 através da sua correlação com H-3 (5,49  $\delta$ ), H-5 (6,23  $\delta$ ) e com os hidrogênios da metoxila (3,85  $\delta$ ). Essas correlações permitiram a correção do valor de deslocamento



químico descrito por PIZZOLATTI et al. (2000), que atribuíam este carbono a C-2. Adicionalmente, a correlação de H-3 (5,49  $\delta$ ) com o carbono em 164,03  $\delta$  definiu C-2.



O espectro de massas da substância **28** (FIGURA 3.132) confirmou a fórmula molecular  $C_{13}H_{13}NO_3$  através do pico do íon molecular em  $m/z$  231 daltons.

Portanto, através da análise dos dados espectroscópicos, a substância **28** foi identificada como um derivado do ácido antranílico denominada de 6-(2'-*N*-metil)fenil-4-metoxipirona, que é pela primeira vez descrita na literatura e cujos dados espectroscópicos estão listados na TABELA 3.29.

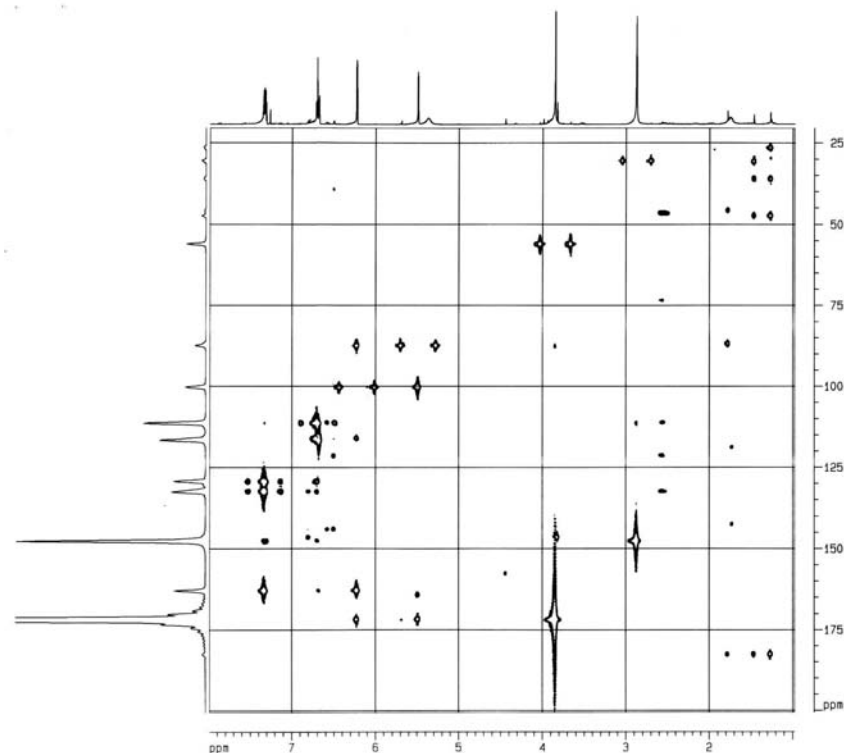


FIGURA 3.130. Mapa de contorno de HMBC do derivado do ácido antranílico **28** ( $CDCl_3$ , 400 MHz).

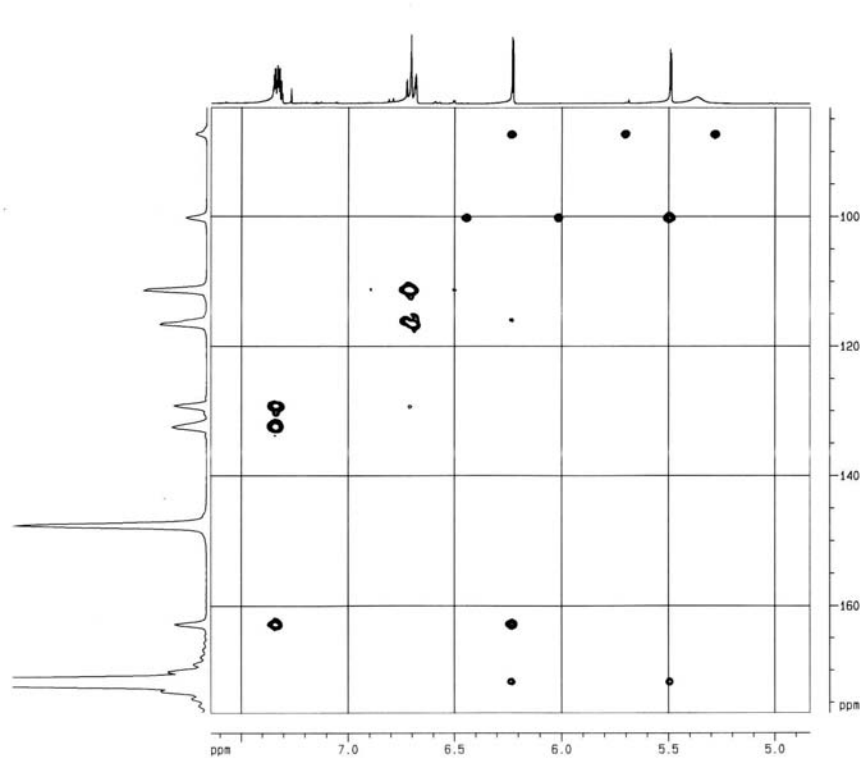


FIGURA 3.131. Ampliação do mapa de contorno de HMBC do derivado do ácido antranílico **28** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

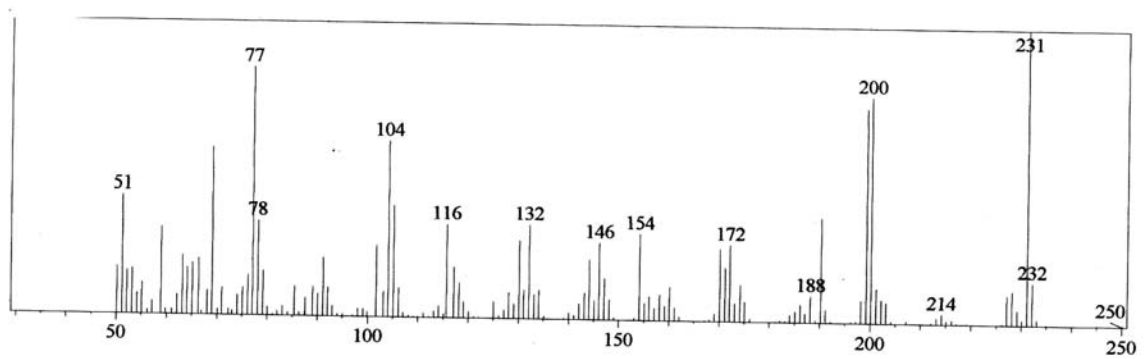


FIGURA 3.132. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) do derivado do ácido antranílico **28**.

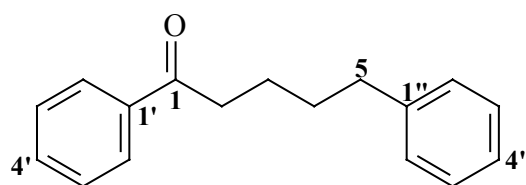
TABELA 3.29. Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do derivado do ácido antranílico.

H / C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$ de G *	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ de G *
2			164,03	171,3
3	5,49 <i>d</i> ( $J = 2,2$ Hz)	5,46 <i>d</i> ( $J = 2,2$ Hz)	87,31	88,1
4			171,65	164,4
5	6,23 <i>d</i> ( $J = 2,2$ Hz)	5,89 <i>d</i> ( $J = 2,2$ Hz)	100,09	100,2
6			162,81	159,6
1'			115,97	-
2'			147,55	-
3' e 5'	6,70 <i>m</i>	-	116,45 ou 111,24	-
4' e 6'	7,33 <i>m</i>	-	132,31 ou 129,23	-
OCH <sub>3</sub>	3,85 <i>s</i>		55,93	55,8
NCH <sub>3</sub>	2,87 <i>s</i>	-	30,42	-
NH	5,36 <i>sl</i>	-		

\*  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  de G (CDCl<sub>3</sub>, 300 e 75 MHz) (PIZZOLATTI et al., 2000).

### 3.9.2. Identificação da 1,5-difenil-1-pentanona

A substância **29** foi isolada da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMD) (p. 208-209) e identificada por EM e RMN, em uma e duas dimensões.



(29)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.133 – 3.134) de **29** apresentou sinais relativos a dez hidrogênios aromáticos em: 7,95 (*m*, 2H), 7,55 (*tt*,  $J = 8,0$  e 1,3 Hz, 1H), 7,46 (*m*, 2H), 7,28 (*m*, 2H) e 7,19  $\delta$  (*m*, 3H). Mostrou também: dois tripletos ( $J = 7,6$  Hz) em 2,99 e 2,68  $\delta$ , de hidrogênios metilênicos  $\alpha$ -carbonílicos e benzílicos, respectivamente; e, dois multipletos, relativos a dois hidrogênios cada, em 1,81 e 1,73  $\delta$ .

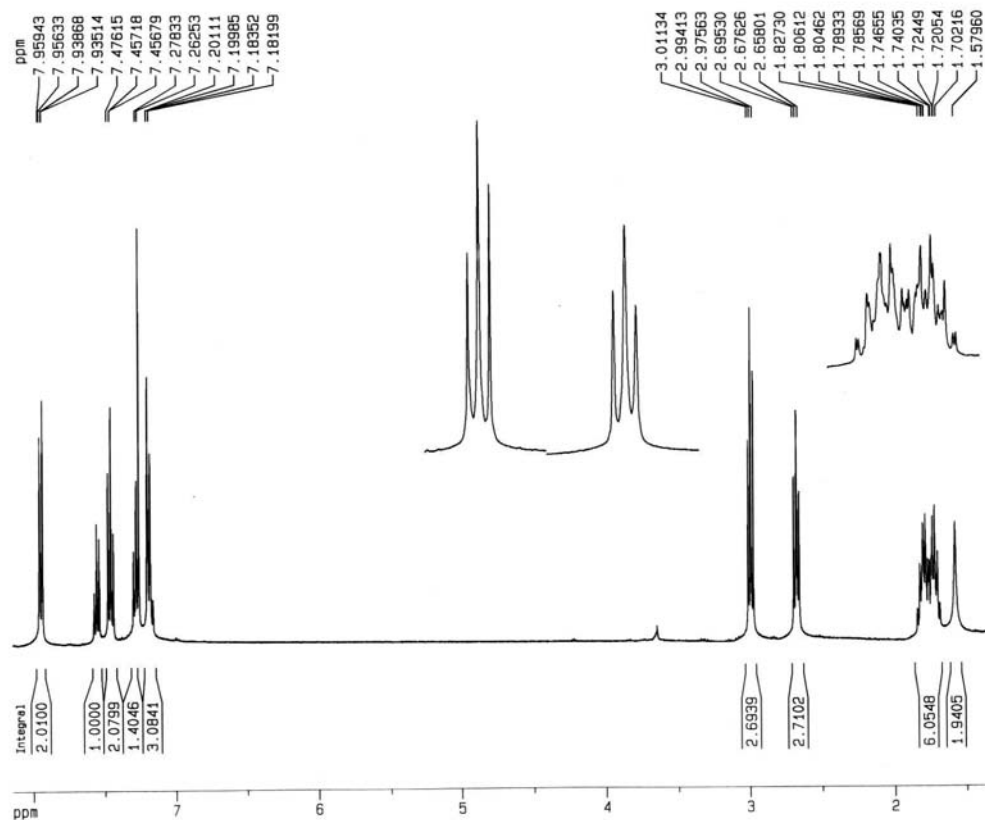


FIGURA 3.133. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

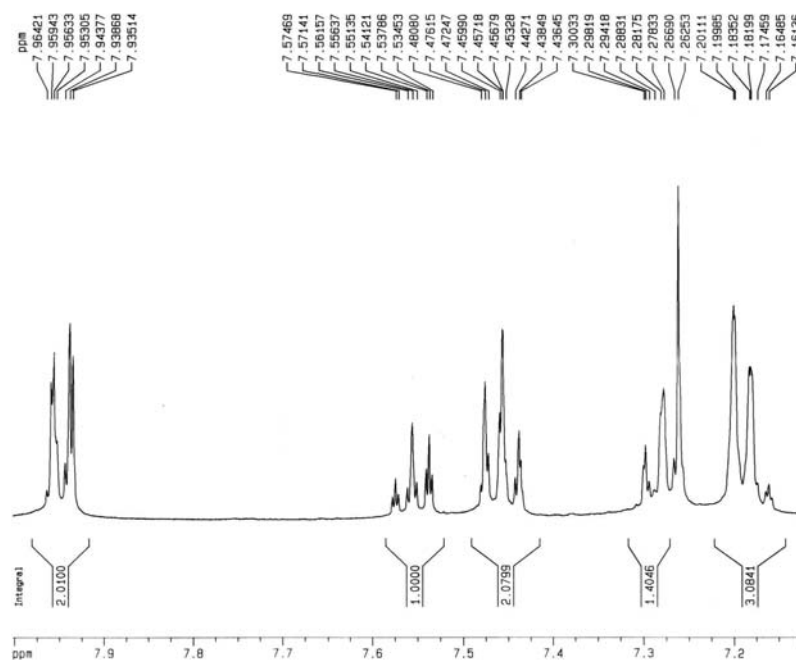


FIGURA 3.134. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 3.135) de **29** definiu a presença de uma cadeia com quatro grupos metilênicos ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ) através do acoplamento entre os hidrogênios em 2,99 e 1,81  $\delta$ , e entre os hidrogênios em 1,73 e 2,68  $\delta$ . Entretanto, não foi observado o acoplamento entre os metilênicos em 1,81 e 1,73  $\delta$ , provavelmente por estes serem quase equivalentes e ocorrerem muito próximos no espectro. Também se determinou, através deste espectro, a relação *orto* entre os hidrogênios aromáticos em 7,95 e 7,46  $\delta$ , 7,46 e 7,55  $\delta$ , e 7,28 e 7,19  $\delta$ .

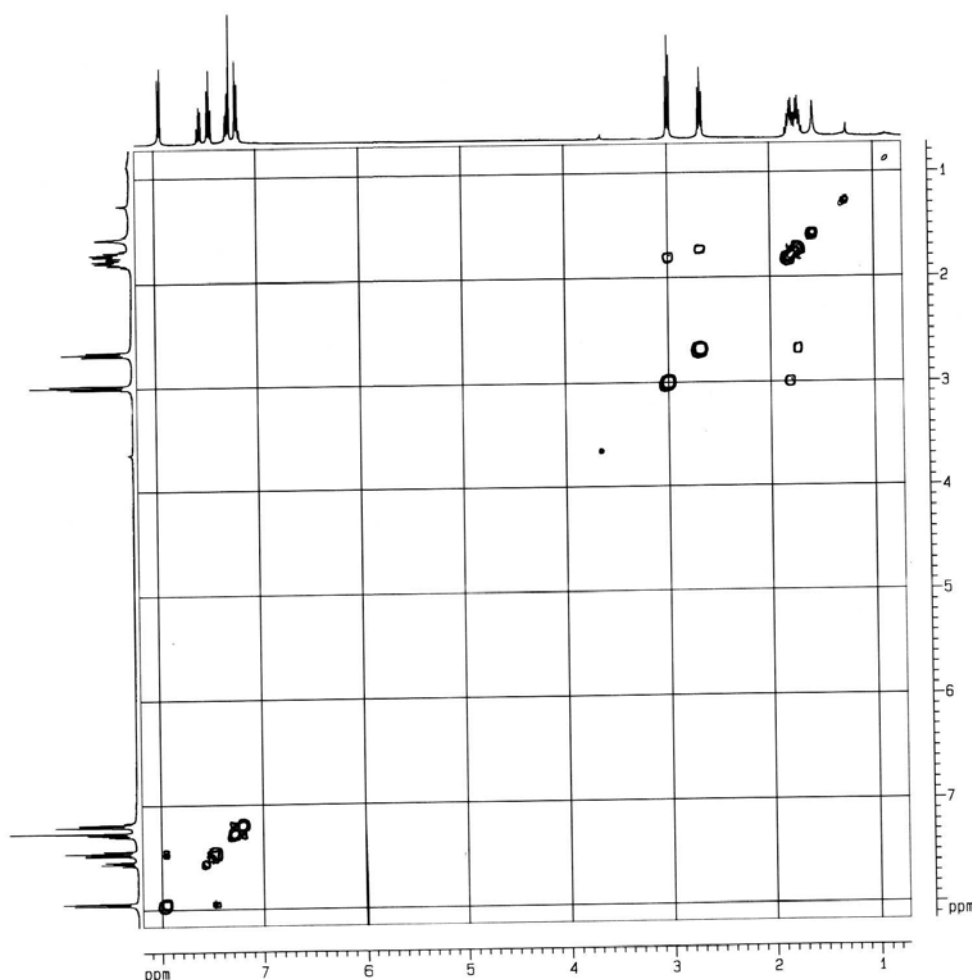


FIGURA 3.135. Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  indicou a natureza de **29** como uma difenilcetona, ilustrada anteriormente. Essa indicação foi confirmada através dos demais experimentos de RMN.

A partir do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.136) e do mapa de contorno de HSQC (FIGURAS 3.137 – 3.138), foram definidos os três carbonos quaternários da molécula (200,25, 142,24 e 137,10  $\delta$ ) e todas as correlações dos carbonos hidrogenados.

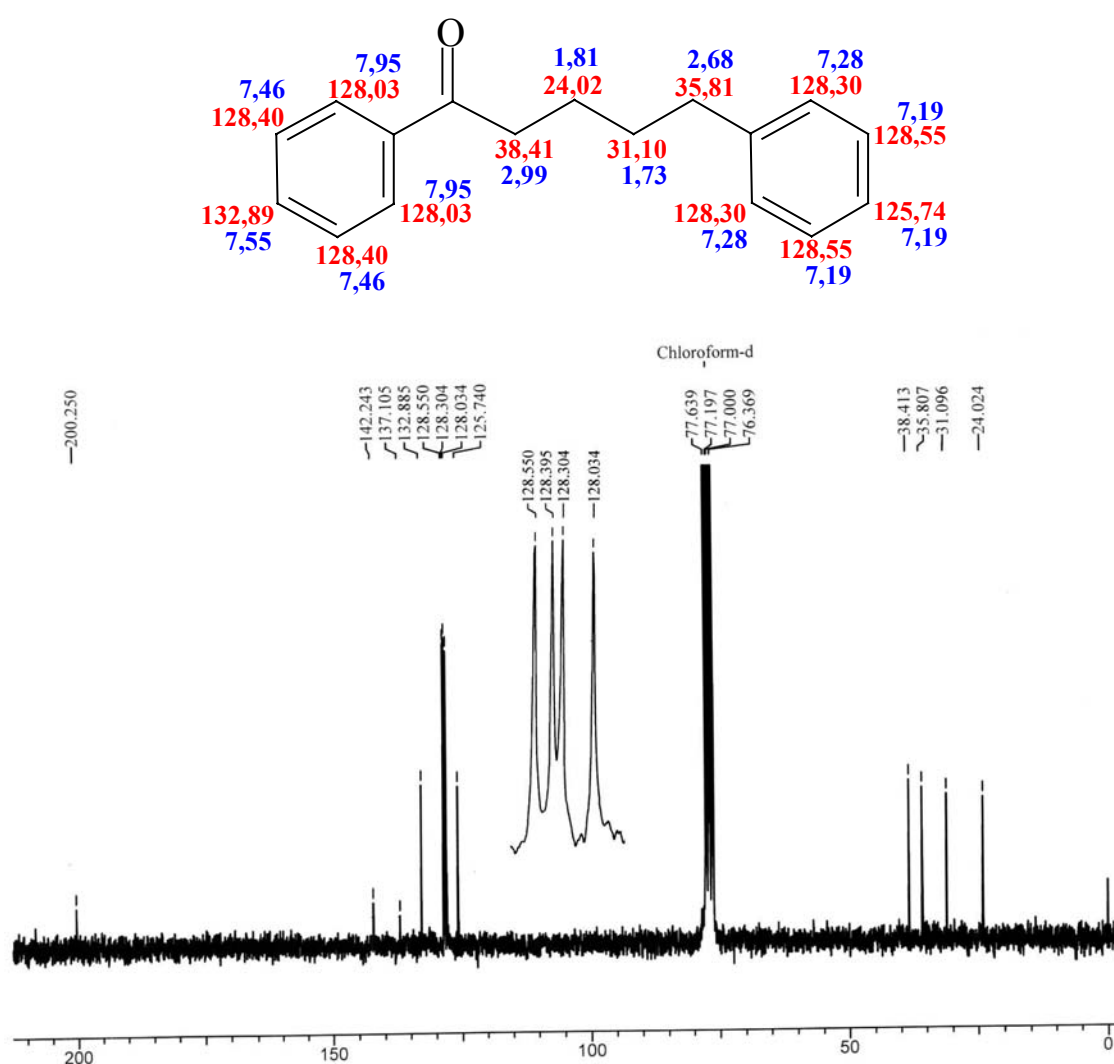


FIGURA 3.136. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

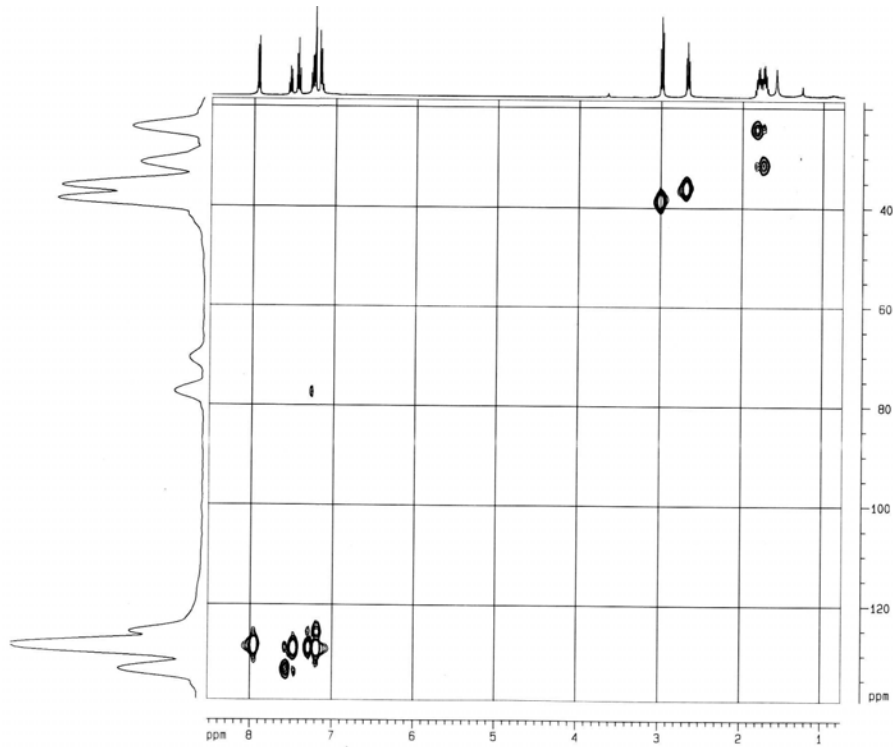


FIGURA 3.137. Mapa de contorno de HSQC da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

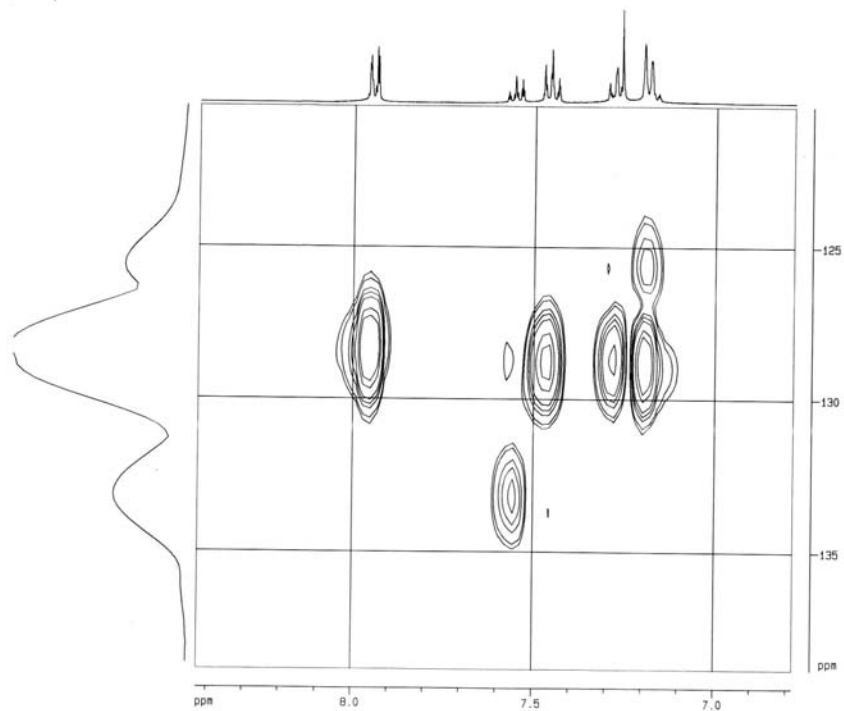
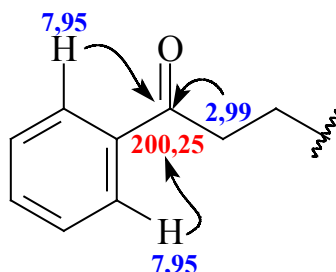
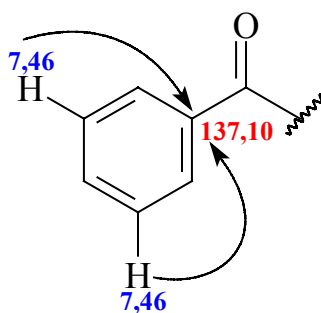


FIGURA 3.138. Ampliação do mapa de contorno de HSQC da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

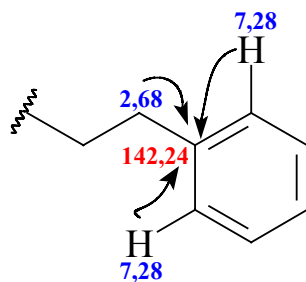
O mapa de contorno de HMBC (FIGURA 3.139) permitiu que fossem atribuídos os carbonos quaternários da substância **29**. Neste mapa, a correlação do carbono carbonílico, em 200,25  $\delta$ , com os hidrogênios 2 (2,99  $\delta$ ), 2' e 6' (7,95  $\delta$ ) definiu C-1.



O carbono quaternário 1' (137,10  $\delta$ ) foi definido através de sua correlação com H-3' e H-5' (7,46  $\delta$ ).



A correlação dos hidrogênios 5 (2,68  $\delta$ ), 2'' e 6'' (7,28  $\delta$ ) com um carbono em 142,24  $\delta$  determinou C-1''.





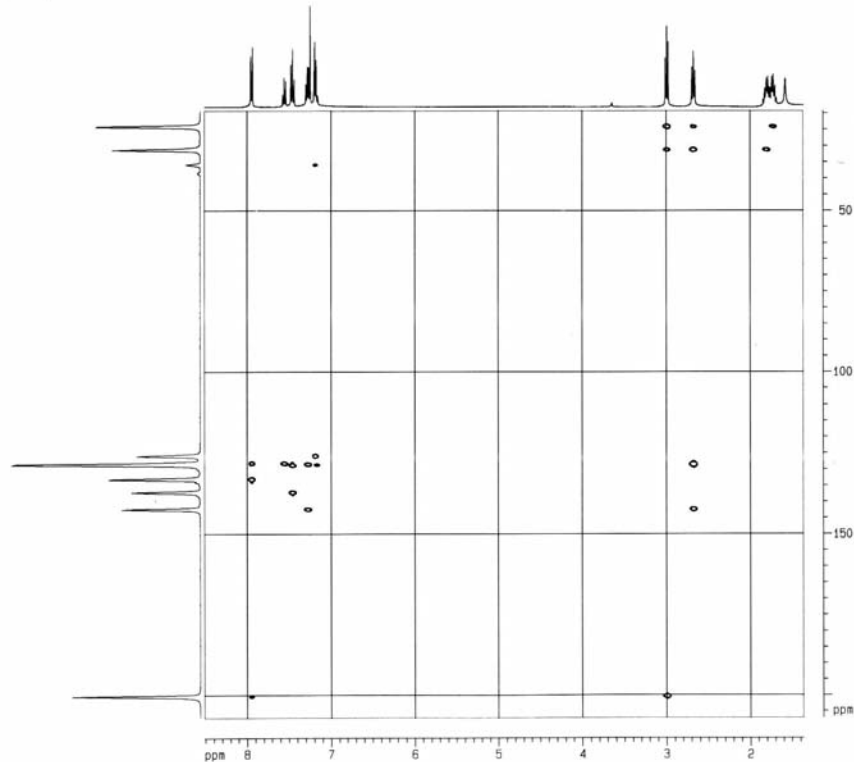


FIGURA 3.139. Mapa de contorno de HMBC da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

O espectro de massas (FIGURA 3.140) da substância **29** apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  238 daltons, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}$ .

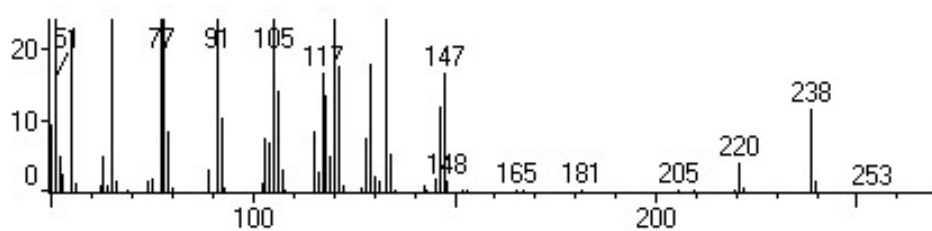


FIGURA 3.140. Espectro de massas (IE = 70 e.V.) da 1,5-difenil-1-pentanona (**29**).

Portanto, através da análise dos dados espectroscópicos a estrutura da substância **29** foi elucidada e é pela primeira vez citada na literatura.

Essa substância é bastante similar aos 1,5-difenilpentanos que foram isolados de *Flindersia laevicarpa* (Rutaceae) (FIGURA 3.141) e que são citados como possíveis precursores das cromonas (GRAY, 1983).

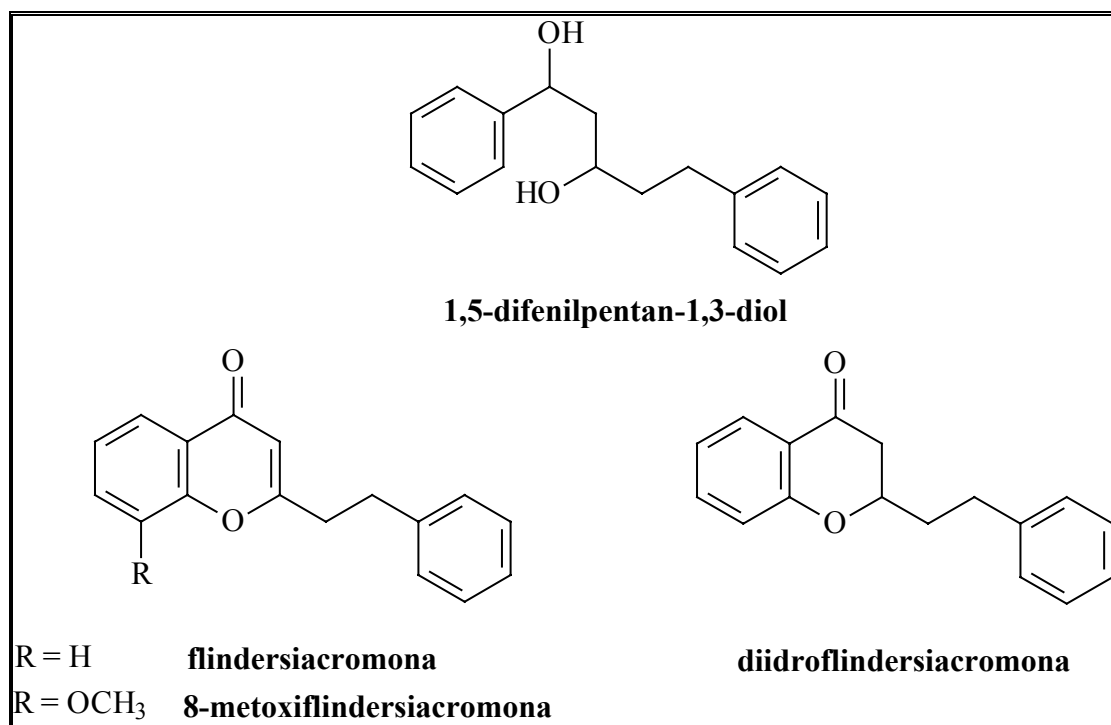


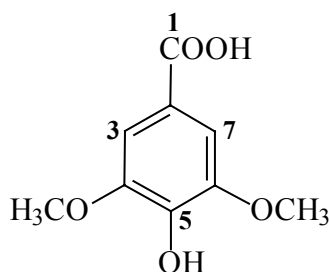
FIGURA 3.141. Substâncias isoladas de *Flindersia laevicarpa* (GRAY, 1983).

TABELA 3.30. Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da 1,5-difenil-1-pentanona.

H / C	$\delta_H$	$\delta_C$
1		200,25
2	2,99 <i>t</i> ( <i>J</i> = 7,6 Hz)	38,41
3	1,81 <i>m</i>	24,02
4	1,73 <i>m</i>	31,10
5	2,68 <i>t</i> ( <i>J</i> = 7,6 Hz)	35,81
1'		137,10
2' e 6'	7,95 <i>m</i>	128,03
3' e 5'	7,46 <i>m</i>	128,40
4'	7,55 <i>tt</i> ( <i>J</i> = 8,0 e 1,3 Hz)	132,89
1''		142,24
2'' e 6''	7,28 <i>m</i>	128,30
3'' e 5''	7,19 <i>m</i>	128,55
4''	7,19 <i>m</i>	125,74

### 3.9.3. Identificação do ácido siríngico

A substância **30** foi isolada da fração acetato de etila do extrato metanólico dos galhos de *Almeidea coerulea* (AGMA) (p. 212-213) e caracterizada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

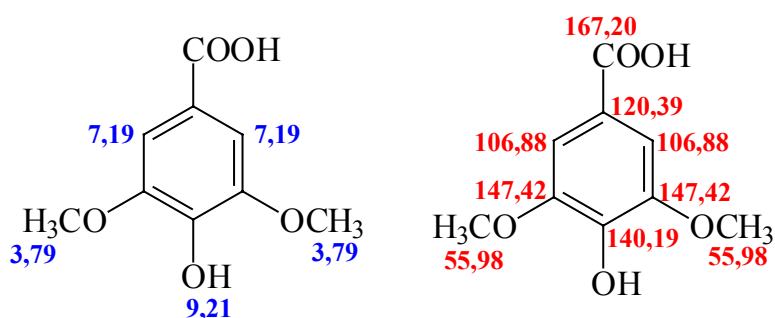


(30)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.142) de **30** apresentou apenas três singletos em 9,21 (1H), 7,19 (2H) e 3,79  $\delta$  (6H), que indicaram a presença de um anel aromático totalmente simétrico, substituído por dois grupos metoxilas e uma hidroxila.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.143) de **30**, a simetria da molécula foi confirmada através dos sinais de dois C-H aromáticos (em 106,88  $\delta$ ), de dois carbonos metoxílicos (em 55,98  $\delta$ ) e de dois carbonos quaternários ligados a  $\text{OCH}_3$  (em 147,42  $\delta$ ). Já a substituição do anel por um grupo hidroxila foi confirmada pelo carbono quaternário em 140,19  $\delta$ . No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foram observados ainda dois carbonos quaternários em 167,20 e 120,39  $\delta$ , que indicaram a presença de uma carboxila substituindo o anel.

Portanto, a substância **30** foi identificada como ácido siríngico e é pela primeira vez descrita no gênero *Almeidea*.



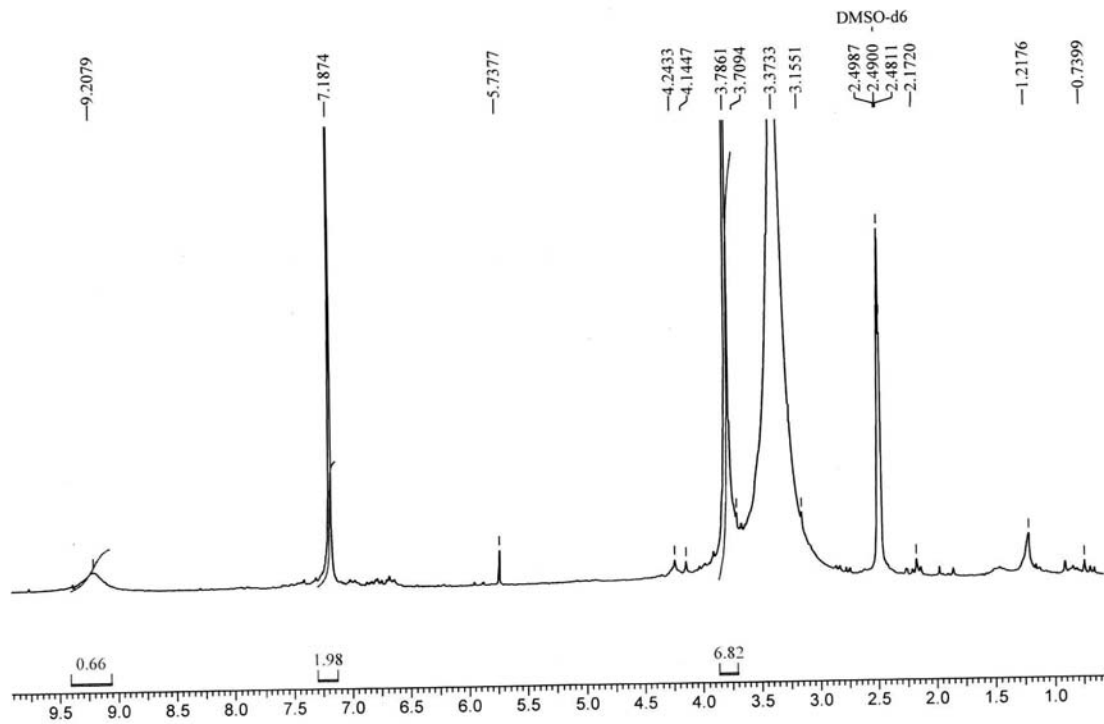


FIGURA 3.142. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido sirínico (**30**) (DMSO, 200 MHz).

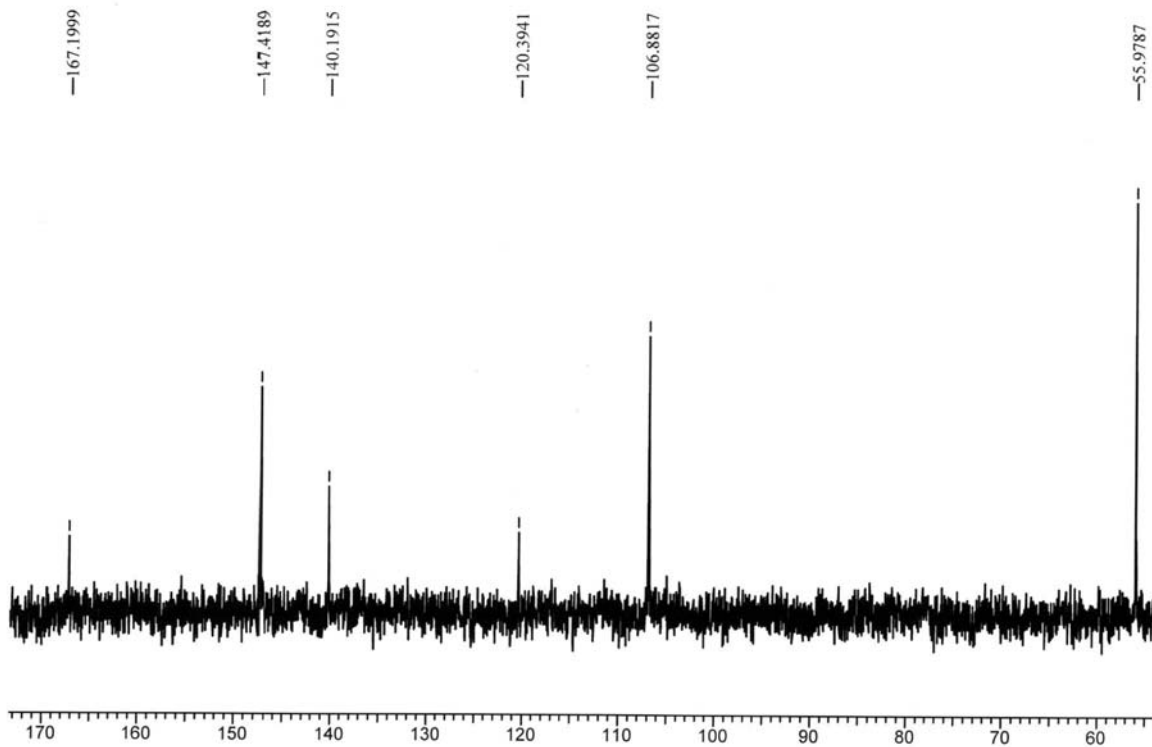


FIGURA 3.143. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido sirínico (**30**) (DMSO, 50 MHz).

### 3.10. Atividades biológicas dos extratos vegetais

Os extratos vegetais foram preparados a partir de folhas, caules e/ou galhos das espécies *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus*, *Galipea carinata* e *Trichilia ramalhoi*. Foram obtidos extratos hexânicos e metanólicos, perfazendo um total de 22 extratos brutos (p. 204-205), que então foram submetidos aos três ensaios biológicos propostos.

#### 3.10.1. Atividade inibitória da enzima gGAPDH

Os ensaios de inibição da atividade da enzima gGAPDH (gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase) foram realizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do IFSC-USP, segundo a metodologia descrita na seção *Procedimento Experimental* (p. 226-228).

Os extratos vegetais foram avaliados numa concentração de 100 µg/mL. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 3.31 e são expressos em porcentagem de atividade inibitória (% A.I.). Os extratos com valor de A.I. igual ou superior a 50 % foram considerados ativos. Segundo este critério, apenas a espécie *Trichilia ramalhoi* apresentou um potencial inibitório promissor, especialmente seus extratos TRFH, TRFM e TRGM.

TABELA 3.31. Efeito dos extratos vegetais sobre a atividade da enzima gGAPDH.

espécie	parte vegetal	extrato	código do extrato	% A.I.
<i>A. coerulea</i>	galhos	hexânico	AGH	0
		metanólico	AGM	0
<i>A. rubra</i>	folhas	hexânico	ALFH	0
		metanólico	ALFM	0
	caule	hexânico	ALCH	0
		metanólico	ALCM	0
<i>C. heterophyllus</i>	folhas	hexânico	AHFH	0
		metanólico	AHFM	8,16
	caule	hexânico	AHCH	0
		metanólico	AHCM	8,16
<i>G. carinata</i> *	folhas	hexânico	GFH	0
		metanólico	GFM	0
	caule	hexânico	GCH	0
		metanólico	GCM	10,9
<i>G. carinata</i>	folhas	hexânico	GCFH	0
		metanólico	GCFM	0
	caule	hexânico	GCCH	0
		metanólico	GCCM	0
<i>T. ramalhoi</i>	folhas	hexânico	TRFH	73,5
		metanólico	TRFM	92,4
	galhos	hexânico	TRGH	9,7
		metanólico	TRGM	95,3

\* espécime coletada em 18/01/1993

### 3.10.2. Atividade inibitória da enzima APRT

Os ensaios de inibição da atividade da enzima APRT (adenina fosforribosiltransferase) também foram realizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do IFSC-USP, segundo a metodologia descrita na seção *Procedimento Experimental* (p. 228-229).

Assim como para a enzima GAPDH, os extratos vegetais foram avaliados numa concentração de 100 µg/mL e os resultados são expressos em porcentagem de atividade inibitória (% A.I.) (TABELA 3.32), sendo considerados ativos os extratos com valor de A.I. igual ou superior a 50 %.

TABELA 3.32. Efeito dos extratos vegetais sobre a atividade da enzima APRT.

espécie	parte vegetal	extrato	código do extrato	% A.I.
<i>A. coerulea</i>	galhos	hexânico	AGH	0
		metanólico	AGM	23,2
<i>A. rubra</i>	folhas	hexânico	ALFH	1,1
		metanólico	ALFM	26,9
	caule	hexânico	ALCH	9,2
		metanólico	ALCM	15,5
<i>C. heterophyllus</i>	folhas	hexânico	AHFH	37,0
		metanólico	AHFM	0
	caule	hexânico	AHCH	0
		metanólico	AHCM	0
<i>G. carinata</i> *	folhas	hexânico	GFH	0
		metanólico	GFM	20,8
	caule	hexânico	GCH	33,0
		metanólico	GCM	32,1
<i>G. carinata</i>	folhas	hexânico	GCFH	36,8
		metanólico	GCFM	25,5
	caule	hexânico	GCCH	0
		metanólico	GCCM	0
<i>T. ramalhoi</i>	folhas	hexânico	TRFH	0
		metanólico	TRFM	0
	galhos	hexânico	TRGH	0
		metanólico	TRGM	68,3

\* espécime coletada em 18/01/1993

Os resultados da TABELA 3.32 mostram que dos 22 extratos testados, apenas o extrato metanólico dos galhos de *Trichilia ramalhoi* (TRGM)

ocasionou uma diminuição significativa na atividade da enzima APRT e que alguns extratos apresentaram inibições na faixa de 20-30%.

Apesar de poucos extratos inibirem significativamente a atividade das enzimas GAPDH e APRT, os resultados foram considerados promissores, já que os ensaios bioquímicos sobre essas enzimas são bastante específicos, limitando a possível ação dos componentes testados, o que não acontece em sistemas biológicos mais complexos, onde os extratos podem atuar das mais diversas formas. Além disso, foi utilizada uma amostragem relativamente pequena (22 extratos).

Entretanto, era de interesse desse trabalho realizar esses ensaios como forma de se encontrar novos compostos protótipos para a doença de Chagas e para as Leishmanioses, pois se acredita que estas enzimas sejam essenciais aos protozoários causadores dessas doenças e que a inibição das mesmas possa causar algum dano a esses parasitas. Adicionalmente, esses ensaios são uma abordagem bastante moderna na procura de novos fármacos, além de serem uma forma de *screening* biológico bastante rápida.

### **3.10.3. Atividade tripanocida**

Os ensaios *in vitro* sobre as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* foram realizados no Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da FCFRP-USP, segundo metodologia descrita na seção *Procedimento Experimental* (p. 229-230).

Os extratos vegetais foram avaliados numa concentração de 4 mg/mL. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 3.33 e são expressos em porcentagem de lise parasitária (% L.P.). Os extratos com valor de L.P. igual ou superior a 50 % foram considerados ativos. Segundo este critério, 16 dos 22 extratos foram ativos, destacando-se AHFH de *C. heterophyllus* e TRGH e TRGM de *T. ramalhoi*. Estes resultados também demonstraram a grande



potencialidade de plantas da família Rutaceae e Meliaceae para a busca de compostos tripanocidas.

TABELA 3.33. Atividade tripanocida dos extratos vegetais.

espécie	parte vegetal	extrato	código do extrato	% L.P.
<i>A. coerulea</i>	galhos	hexânico	AGH	29,91
		metanólico	AGM	55,11
<i>A. rubra</i>	folhas	hexânico	ALFH	35,43
		metanólico	ALFM	54,33
	caule	hexânico	ALCH	40,94
		metanólico	ALCM	55,90
<i>C. heterophyllus</i>	folhas	hexânico	AHFH	99,22
		metanólico	AHFM	59,44
	caule	hexânico	AHCH	71,65
		metanólico	AHCM	68,89
<i>G. carinata</i> *	folhas	hexânico	GFH	61,42
		metanólico	GFM	64,56
	caule	hexânico	GCH	51,97
		metanólico	GCM	44,09
<i>G. carinata</i>	folhas	hexânico	GCFH	54,33
		metanólico	GCFM	20,47
	caule	hexânico	GCCH	50,00
		metanólico	GCCM	62,99
<i>T. ramalhoi</i>	folhas	hexânico	TRFH	59,44
		metanólico	TRFM	47,63
	galhos	hexânico	TRGH	84,25
		metanólico	TRGM	81,89

\* espécime coletada em 18/01/1993

### 3.11. Atividades biológicas das frações

Alguns dos extratos vegetais foram fracionados (p. 205-208), levando à obtenção de 43 frações.

Adotou-se como metodologia de trabalho testar todas as frações sobre os três modelos biológicos, mesmo que elas fossem oriundas de extratos não ativos sobre um determinado ensaio.

### 3.11.1. Atividade inibitória da enzima gGAPDH

As frações foram testadas sobre a enzima GAPDH na concentração de 100 µg/mL. Os resultados da TABELA 3.34 mostraram que, assim como para os extratos, apenas as frações de *T. ramalhoi* inibiram significativamente a atividade enzimática, principalmente as mais polares. Desta forma, pode-se concluir que essa espécie, a única Meliaceae testada, poderia ser a mais promissora para se isolar compostos inibidores da enzima GAPDH.

TABELA 3.34. Efeito das frações sobre a atividade da enzima gGAPDH.

espécie	código do extrato	fração	código da fração	% A.I.
<i>A. coerulea</i>	AGM	diclorometânica	AGMD	0
		acetato de etila	AGMA	5,7
		metanólica	AGMM	4,0
<i>A. rubra</i>	ALFM	diclorometânica	ALFMD	0
		acetato de etila	ALFMA	19,2
		metanólica	ALFMM	6,3
	ALCM	diclorometânica	ALCMD	0
		acetato de etila	ALCMA	22,6
		metanólica	ALCMM	12,6
<i>C. heterophyllus</i>	AHFH	hexânica	AHFHH	16,3
		diclorometânica	AHFHD	0
		acetato de etila	AHFHA	0
	AHFM	metanólica	AHFHM	0
		hexânica	AHFMH	0
		diclorometânica	AHFMD	0
		acetato de etila	AHFMA	0
	AHCM	metanólica	AHFMM	11,0
		acetato de etila	AHCMA	0
		metanólica	AHCMM	6,3

Continuação da TABELA 3.34.

<i>G. carinata</i> *	GFM	diclorometânica	GFMD	12,5
		acetato de etila	GFMA	12,0
		metanólica	GFMM	0
<i>G. carinata</i>	GCFH	hexânica	GCFHH	0
		diclorometânica	GCFHD	0
		acetato de etila	GCFHA	0
		metanólica	GCFHM	0
		diclorometânica	GCCMD	9,7
		acetato de etila	GCCMA	6,2
		metanólica	GCCMM	10,4
<i>T. ramalhoi</i>	TRFH	hexânica	TRFHH	0
		diclorometânica	TRFHD	0
		acetato de etila	TRFHA	0
	TRFM	metanólica	TRFHM	0
		hexânica	TRFMH	76,8
		diclorometânica	TRFMD	47,4
		acetato de etila	TRFMA	59,8
	TRGM	metanólica	TRFMM	83,1
		butanólica	TRFMB	91,0
		hexânica	TRGMH	89,1
		diclorometânica	TRGMD	0
		acetato de etila	TRGMA	72,4
		metanólica	TRGMM	83,5
	butanólica	TRGMB	93,7	

\* espécime coletada em 18/01/1993

### 3.11.2. Atividade inibitória da enzima APRT

As frações foram ensaiadas frente à enzima APRT na concentração de 100 µg/mL. Os resultados da TABELA 3.35 mostraram que das 43 frações testadas 11 ocasionaram a inibição da atividade dessa enzima. Eles também demonstraram a importância de se ensaiar frações oriundas de extratos inativos quando se faz um estudo biomonitorado por esta enzima.

Dentre as frações ativas destacaram-se a fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *A. rubra* (ALFMA), que apresentou a maior A.I (90,7

%). Outras frações bastante ativas foram AHFHA e AHFMD de *C. heterophyllus* e TRFMA de *T. ramalhoi*.

TABELA 3.35. Efeito das frações sobre a atividade da enzima APRT.

espécie	código do extrato	fração	código da fração	% A.I.
<i>A. coerulea</i>	AGM	diclorometânica	AGMD	2,7
		acetato de etila	AGMA	6,4
		metanólica	AGMM	21,9
<i>A. rubra</i>	ALFM	diclorometânica	ALFMD	0
		acetato de etila	ALFMA	90,7
		metanólica	ALFMM	20,3
	ALCM	diclorometânica	ALCMD	52,7
		acetato de etila	ALCMA	51,5
		metanólica	ALCMM	9,0
<i>C. heterophyllus</i>	AHFH	hexânica	AHFHH	10,3
		diclorometânica	AHFHD	0
		acetato de etila	AHFHA	80,1
	AHFM	metanólica	AHFHM	6,2
		hexânica	AHFMH	20,7
		diclorometânica	AHFMD	80,9
		acetato de etila	AHFMA	0
		metanólica	AHFMM	0
		acetato de etila	AHCMA	0
	AHCM	metanólica	AHCMM	24,5
		diclorometânica	GFMD	0
		acetato de etila	GFMA	41,8
<i>G. carinata</i> *	GFM	metanólica	GFMM	7,4
		hexânica	GCFHH	0
		diclorometânica	GCFHD	0
<i>G. carinata</i>	GCFH	acetato de etila	GCFHA	0
		metanólica	GCFHM	17,6
		diclorometânica	GCCMD	0
		acetato de etila	GCCMA	8,4
		metanólica	GCCMM	3,5

Continuação da TABELA 3.35.

<i>T. ramalhoi</i>	TRFH	hexânica	TRFHH	0
		diclorometânica	TRFHD	19,0
		acetato de etila	TRFHA	0
	TRFM	metanólica	TRFHM	33,7
		hexânica	TRFMH	57,5
		diclorometânica	TRFMD	56,4
		acetato de etila	TRFMA	85,9
		metanólica	TRFMM	72,7
		butanólica	TRFMB	62,8
	TRGM	hexânica	TRGMH	19,0
		diclorometânica	TRGMD	28,5
		acetato de etila	TRGMA	52,3
		metanólica	TRGMM	32,5
		butanólica	TRGMB	47,6

\* espécime coletada em 18/01/1993

### 3.11.3. Atividade tripanocida

As frações foram avaliadas sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi* numa concentração de 2 mg/mL. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 3.36 e demonstram que foram obtidas frações mais ou tão ativas quanto os extratos vegetais (TABELA 3.33), inclusive com cinco delas (AGMD, AHFHA, AHCMA, GCFHH e GCCMD) ocasionando 100 % de lise parasitária. Estes dados também confirmaram o grande potencial das espécies escolhidas para busca de compostos tripanocidas.

TABELA 3.36. Atividade tripanocida das frações.

espécie	código do extrato	fração	código da fração	% L.P.
<i>A. coerulea</i>	AGM	diclorometânica	AGMD	100 ± 0
		acetato de etila	AGMA	68,6 ± 4,0
		metanólica	AGMM	12,9 ± 8,2

Continuação da TABELA 3.36.

<i>A. rubra</i>	ALFM	diclorometânica	ALFMD	41,4 ± 6,1	
		acetato de etila	ALFMA	62,9 ± 12,1	
		metanólica	ALFMM	40,0 ± 12,1	
	ALCM	diclorometânica	ALCMD	65,7 ± 8,1	
		acetato de etila	ALCMA	80,0 ± 4,0	
		metanólica	ALCMM	17,1 ± 4,0	
<i>C. heterophyllus</i>	AHFH	hexânica	AHFHH	25,7 ± 14,2	
		diclorometânica	AHFHD	45,0 ± 1,0	
		acetato de etila	AHFHA	100 ± 0	
		AHFM	metanólica	AHFHM	7,1 ± 0
			hexânica	AHFMH	97,1 ± 2,0
			diclorometânica	AHFMD	25,6 ± 11,1
		AHCM	acetato de etila	AHFMA	56,4 ± 5,0
			metanólica	AHFMM	98,6 ± 2,0
			acetato de etila	AHCMA	100 ± 0
		GFM	metanólica	AHCMM	37,0 ± 10,2
			diclorometânica	GFMD	82,6 ± 2,0
			acetato de etila	GFMA	96,4 ± 5,0
<i>G. carinata</i> *	GCFH	metanólica	GFMM	50,0 ± 2,0	
		hexânica	GCFHH	100 ± 0	
		diclorometânica	GCFHD	9,3 ± 8,4	
<i>G. carinata</i>		acetato de etila	GCFHA	11,3 ± 3,1	
		metanólica	GCFHM	65,6 ± 3,7	
		diclorometânica	GCCMD	100 ± 0	
		GCCMA	acetato de etila	GCCMA	44,4 ± 18,7
			metanólica	GCCMM	31,1 ± 7,5
			hexânica	TRFHH	49,7 ± 18,7
<i>T. ramalhoi</i>	TRFH	diclorometânica	TRFHD	8,6 ± 1,9	
		acetato de etila	TRFHA	28,5 ± 8,7	
		metanólica	TRFHM	15,2 ± 2,5	
		TRFM	hexânica	TRFMH	12,6 ± 1,2
			diclorometânica	TRFMD	25,8 ± 2,5
			acetato de etila	TRFMA	21,9 ± 1,9
		TRGM	metanólica	TRFMM	31,1 ± 0
			butanólica	TRFMB	29,8 ± 10,6
			hexânica	TRGMH	68,2 ± 0
		TRGMD	diclorometânica	TRGMD	76,2 ± 3,5
			acetato de etila	TRGMA	13,9 ± 9,4
			metanólica	TRGMM	23,2 ± 11,2
	TRGMB	butanólica	TRGMB	12,6 ± 7,2	

\* espécie coletada em 18/01/1993

### 3.12. Atividades biológicas das substâncias isoladas

As frações (ou extratos) ativos foram selecionados para estudo químico e isolamento do(s) possível(eis) princípio(s) ativo(s) de acordo com a potente atividade em um dos modelos biológicos ou segundo a atividade comum em dois deles.

Assim, as frações AGMD e AGMA de *A. coerulea*, ALFMA e ALCMD de *A. rubra*, AHFHD, AHFHA, AHFMD, AHCMA e os extratos AHCH de *C. heterophyllus* e TRGH de *T. ramalhoi* foram escolhidos para estudo químico.

Vale ressaltar, que as frações mais polares de *T. ramalhoi*, que inibiram significativamente a atividade da enzima GAPDH (TABELA 3.34) também foram trabalhadas, mas não possibilitaram o isolamento de nenhuma substância.

#### 3.12.1. Atividade inibitória da enzima gGAPDH

As substâncias isoladas foram testadas sobre a enzima gGAPDH em concentrações variadas. Os resultados de A.I. obtidos são descritos na TABELA 3.37 e mostram que dentre as substâncias testadas a que ocasionou maior inibição da atividade enzimática foi a cumarina marmesina (**25**), que apresenta grande semelhança estrutural com a chalepina (MAFEZOLI, 2001; PAVÃO et al., 2002), que foi a mais ativa dentre as cumarinas ensaiadas por VIEIRA et al. (2001). Entretanto, as atividades das substâncias estão aquém das expectativas, pois o que se almeja é um inibidor enzimático que atue em concentrações nanomolares.

TABELA 3.37. Efeito das substâncias isoladas sobre a atividade da enzima gGAPDH.

substância	isolada da fração (ou extrato)	C / $\mu\text{mol/L}$	% A.I.
flavona (7)	AHFHA, AHFMD e AHCMA	450	9,7
7-metoxiflavona (8)	AHFHA e AHCMA	397 198	78,3 17,5
5-hidroxi flavona (9)	AHFHA	210	20,1
dictamina (11)	AGMA	503	9,8
kokusagina (12)	ALFMA	412	12,1
esquimianina (13)	ALFMA E AHCMA	200	0
$\delta$ -fagarina (14)	AGMA	200	35,7
isokokusagina (15)	ALFMA	206	47,2
isoesquimianina (16)	ALFMA	193	17,4
isodutaduprina (17)	ALFMA	356	63,4
		178	46,7
alcalóide tetrahydroquinolínico 18	ALFMA	284	0
haplotusina (19)	AHCMA	200	23,8
alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (20)	AHCMA	200	0
arborinina (21)	ALFMA e ALCMD	351	0
escoparona (23)	AGMA	200	48,5
escopoletina (24)	AGMA e AHFMD	200	0
marmesina (25)	AGMA	200	72,2
paprazina (26)	AGMA	353	8,4
<i>N-trans</i> -feruloiltiramina (27)	AGMA	319	17,6
derivado do ácido antranílico 28	ALFMA	433	4,6
1,5-difenil-1-pentanona (29)	AGMD	420	0
ácido siríngico (30)	AGMA	505	0

### 3.12.2. Atividade inibitória da enzima APRT

As substâncias isoladas foram ensaiadas sobre a enzima APRT em concentrações variadas. Os resultados de A.I. obtidos estão descritos na TABELA 3.38 e mostraram que os metabólitos mais ativos foram os alcalóides furoquinolônicos isokokusagina (15), isoesquimianina (16) e isodutaduprina



(17), que inclusive foram muito mais ativos que seus isômeros kokusagina (12) e esquimianina (13). Outro metabólito que ocasionou a inibição moderada dessa enzima foi a 5-hidroxi flavona (9). Essas substâncias provavelmente são as responsáveis pelas atividades observadas para as frações ALFMA e AHFHA, das quais foram isoladas.

TABELA 3.38. Efeito das substâncias isoladas sobre a atividade da enzima APRT.

substância	isolada da fração (ou extrato)	C / $\mu\text{mol/L}$	% A.I.
flavona (7)	AHFHA, AHFMD e AHCMA	45,0	4,3
7-metoxiflavona (8)	AHFHA e AHCMA	99,0	0
5-hidroxi flavona (9)	AHFHA	105	62,6
		42,0	16,6
dictamina (11)	AGMA	251	1,6
kokusagina (12)	ALFMA	412	2,2
esquimianina (13)	ALFMA E AHCMA	100	7,0
$\delta$ -fagarina (14)	AGMA	100	0
isokokusagina (15)	ALFMA	41,2	44,6
isoesquimianina (16)	ALFMA	38,6	39,1
isodutaduprina (17)	ALFMA	35,6	21,6
alcalóide tetraidrofurquinolínico 18	ALFMA	142	10,4
haplotusina (19)	AHCMA	100	0
alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (20)	AHCMA	100	55,9
arborinina (21)	ALFMA e ALCMD	35,1	16,6
escoparona (23)	AGMA	100	6,5
escopoletina (24)	AGMA e AHFMD	100	10,6
marmesina (25)	AGMA	100	0
paprazina (26)	AGMA	177	19,8
<i>N-trans</i> -feruloiltiramina (27)	AGMA	158	9,9
derivado do ácido antranílico 28	ALFMA	216	28,8
1,5-difenil-1-pentanona (29)	AGMD	210	0
ácido siríngico (30)	AGMA	252	33,9

### 3.12.3. Atividade tripanocida

As substâncias isoladas foram testadas sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi* nas concentrações de 500, 250 e 100 µg/mL e os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir dos valores de % de lise parasitária obtidos nessas concentrações. Tais resultados estão descritos na TABELA 3.39.

TABELA 3.39. Atividade tripanocida das substâncias isoladas.

substância	isolada da fração (ou extrato)	C / µg/mL	% L.P.	IC <sub>50</sub> / mmol/L
β-sitosterol e estigmasterol (1) *	AHCH e TRGH	100	19,10	-
		250	20,90	
		500	40,00	
sitostenona (2)	AGMD	100	28,56	1,218
		250	42,86	
		500	48,21	
benzoato de β-sitosterila (3)	AHFHD	100	26,33	0,748
		250	27,23	
		500	64,73	
lupeol (5) *	TRGH	100	50,83	0,1948
		250	59,50	
		500	62,39	
sesquiterpeno eudesmano 6	AGMA	100	24,55	0,716
		250	70,53	
		500	100	
flavona (7)	AHFHA, AHFMD e AHCMA	100	34,5	9,531
		250	38,6	
		500	48,6	
7-metoxiflavona (8)	AHFHA e AHCMA	100	23,65	1,084
		250	52,67	
		500	77,68	
piranoflavonas 10	AHFHD	100	26,33	-
		250	44,20	
		500	61,61	
dictamina (11) *	AGMA	100	16,66	17,65
		250	17,59	
		500	28,70	

Continuação TABELA 3.39.

kokusagina ( <b>12</b> ) *	ALFMA	100	46,58	0,5596
		250	57,13	
		500	58,38	
esquimianina ( <b>13</b> )	ALFMA E AHCMA	100	25,44	1,455
		250	30,35	
		500	65,17	
$\delta$ -fagarina ( <b>14</b> )	AGMA	100	26,33	1,412
		250	33,48	
		500	75,00	
alcalóide tetraidrofuroquinolínico <b>18</b>	ALFMA	100	28,12	0,977
		250	44,20	
		500	58,93	
haplotusina ( <b>19</b> )	AHCMA	100	29,01	0,1369
		250	49,55	
		500	72,32	
alcalóide 2-fenil-1-metil-4- quinolona ( <b>20</b> )	AHCMA	100	26,78	0,1449
		250	33,92	
		500	70,09	
arborinina ( <b>21</b> ) *	ALFMA e ALCMD	100	24,00	1,231
		250	42,39	
		500	57,99	
escoparona ( <b>23</b> ) *	AGMA	100	37,87	2,160
		250	48,45	
		500	49,33	
escopoletina ( <b>24</b> ) *	AGMA e AHFMD	50	47,20	0,719
		400	52,20	
		800	63,10	
		4000	100	
marmesina ( <b>25</b> ) *	AGMA	100	48,53	0,528
		250	52,94	
		500	90,44	
paprazina ( <b>26</b> )	AGMA	100	24,55	2,021
		250	37,94	
		500	45,08	
<i>N-trans</i> -feruloiltiramina ( <b>27</b> )	AGMA	100	9,37	1,211
		250	28,12	
		500	69,19	
derivado do ácido antranílico <b>28</b>	ALFMA	100	27,23	1,271
		250	45,08	
		500	74,10	

Continuação da TABELA 3.39.

1,5-difenil-1-pentanona ( <b>29</b> )	AGMD	100	28,12	1,095
		250	53,57	
		500	91,52	
ácido siríngico ( <b>30</b> )	AGMA	100	30,35	2,076
		250	33,02	
		500	58,47	

\* substâncias testadas por MAFEZOLI (2001).

Os resultados da TABELA 3.39 mostram que os alcalóides 2- e 4-quinolônicos (**19** e **20**) e o triterpeno lupeol (**4**), isolados das frações ativas AHCMA e TRGH, foram os que apresentaram maior atividade tripanocida dentre os metabólitos ensaiados. Seus  $IC_{50}$  são significativos, principalmente quando comparados aos valores de  $EC_{50}$  (0,150-0,300 mmol/L) dos alcalóides 2-*R*-quinolínicos (FOURNET et al., 1993b; GANTIER et al., 1996), que são os produtos naturais mais promissores na terapêutica específica das leishmanioses.

Além destes metabólitos, o sesquiterpeno eudesmano **6**, o alcalóide kokusagina (**12**), e as cumarinas escopoletina (**24**) e marmesina (**25**) também foram moderadamente ativos sobre o *T. cruzi*. As atividades tripanocida e inibitória da enzima GAPDH da cumarina **25** são bastante valiosas, pois podem indicar o possível modo de ação dessa substância.

Entretanto, as substâncias testadas não mostraram ser potentes agentes tripanocidas, principalmente quando comparadas ao quimioprolifático violeta de genciana, cujo  $IC_{50}$  é de 0,083 mM, e com a lignana (-)-metilpluviatolídeo, que na concentração de 67,5  $\mu$ M ocasionou 99 % de lise parasitária (BASTOS et al., 1999).

Apesar deste fato, os resultados dos testes tripanocidas com as substâncias foram considerados promissores, já que estimulam o estudo sistemático de algumas classes de substâncias, como as dos alcalóides 2- e 4-quinolônicos e triterpenos lupânicos, a fim de se determinar a relação estrutura-atividade e também para se constatar se os metabólitos mais ativos deste trabalho, na verdade, não são os menos ativos de uma classe de compostos.

## **4. Procedimento experimental**

### **4.1. Materiais e métodos**

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

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

#### Solventes para cromatografia:

Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar.

#### Cromatografia em coluna:

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

#### Cromatografia em camada delgada comparativa:

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

#### Cromatografia em camada delgada preparativa:

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

Solventes para obtenção de espectros de RMN:

- deuterados da Merck e Aldrich

## **4.2. Equipamentos**

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:

- Brüker DRX 200 MHz
- Brüker ARX 400 MHz

CG-EM:

⇒ GC-17A Shimadzu, GCMS-QP5000 Shimadzu

- coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm)
- ionização por impacto eletrônico a 70 e.V.

⇒ condições utilizadas para análise do alcalóide **15** e das flavonas **7, 8 e 9**:

- rampa de temperatura: 80 °C (1 min)/ 6 °C/min/ 250 °C (20 min)
- temperatura do injetor: 250 °C
- temperatura do detector: 280 °C
- razão de *split*: 20

⇒ condições utilizadas para análise da mistura de esteróides **1** e dos triterpenos **4 e 5**:

- rampa de temperatura: 150 °C (1 min)/ 6 °C/min/ 280 °C (15 min)
- temperatura do injetor: 250 °C
- temperatura do detector: 280 °C
- razão de *split*: 20

⇒ condições utilizadas para análise dos alcalóides **11**, **12**, **13**, **14** e **18**, das cumarinas **23**, **24** e **25**, do derivado **28**, da cetona **29** e do sesquiterpeno **6**:

- rampa de temperatura: 80 °C (1 min)/ 6 °C/min/ 250 °C (20 min)
- temperatura do injetor: 250 °C
- temperatura do detector: 280 °C
- razão de *split*: 15

ES-MS:

MICROMASS Quattro LC

### **4.3. Coleta e identificação do material botânico**

As espécies vegetais foram coletadas pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, juntamente com o prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica da USP-São Paulo, que foi o responsável pela sua identificação. Exemplares de todas elas são mantidos em tal Departamento, com códigos de identificação mostrados na TABELA 4.1.

TABELA 4.1. Informações relativas às coletas das plantas.

espécie	data de coleta	local de coleta	coletado por	identificação
<i>Almeidea coerulea</i> A. St.-Hil.	06/02/93	Município de Itacaré, BA	Pirani/ Kallunki	Pirani & Kallunki 2747
<i>Almeidea rubra</i> A. St.-Hil.	19/05/00	Morro do H, Piuma, ES	Pirani	Pirani et al. 4746
<i>Conchocarpus heterophyllus</i> (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani	28/01/93	Serra São José, Fazenda Boa Vista, Município Feira de Santana, BA	Pirani/ Kallunki	Pirani & Kallunki 2693
<i>Galipea carinata</i> Pirani (sp nov.)*	18/01/93	Estrada do Sol, Guarapari, ES	Kallunki/ Pirani	Kallunki & Pirani 336
<i>Galipea carinata</i> Pirani (sp nov.)	18/05/00	Fazenda Bonanza, Guarapari, ES	Pirani	Pirani et al. 4722
<i>Trichilia ramalhoi</i> Rizzini	15/01/85	Estrada de Linhares, Colatina, ES	Pirani/ Kallunki	Pirani & Kallunki 2632

\*originalmente, denominada de *Galipea* sp

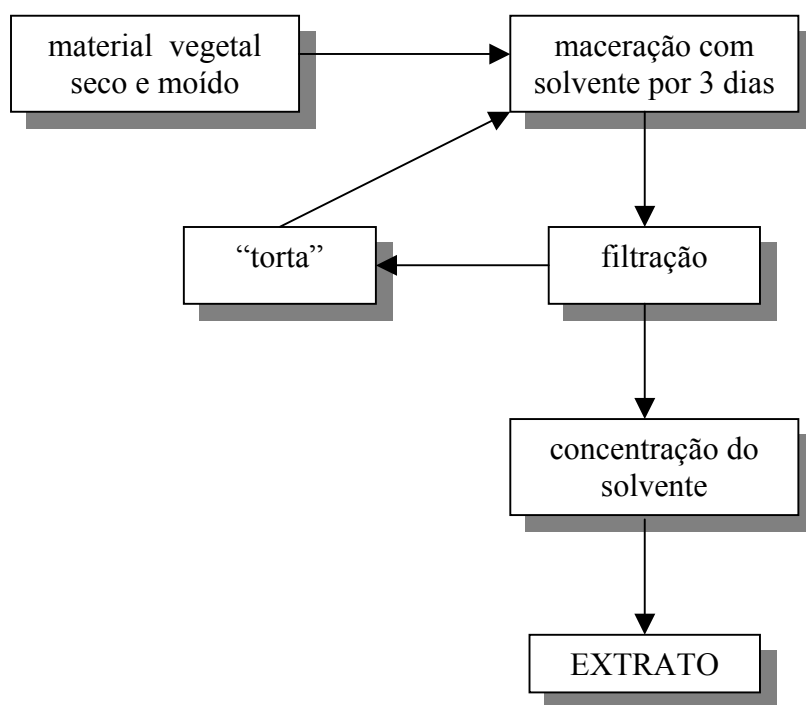
#### 4.4. Preparação dos extratos vegetais

As diversas partes vegetais foram secas em estufa de circulação de ar, a 40 °C, e, pulverizadas em moinho tipo Willey.

A extração do material moído foi realizada por maceração nos solventes hexano e metanol, à temperatura ambiente, durante três dias, em geral, por duas vezes.

A preparação dos extratos é ilustrada a seguir:





Desta forma, foram obtidos os extratos hexânicos e metanólicos de folhas, galhos e caules das diversas plantas, num total de 22 extratos (TABELA 4.2).

TABELA 4.2. Massas dos extratos vegetais preparados.

espécie	parte vegetal	massa vegetal / kg	massa do extrato hexânico / g	código do extrato hexânico	massa do extrato metanólico / g	código do extrato metanólico
<i>Almeidea coerulea</i>	galhos	1,1133	0,7963	AGH	266,3	AGM
<i>Almeidea rubra</i>	folhas	0,3135	0,81	ALFH	32,9	ALFM
	caule	0,2302	0,6	ALCH	28,3	ALCM
<i>Conchocarpus heterophyllus</i>	folhas	1,332	11,9	AHFH	175,0	AHFM
	caule	2,1129	8,2	AHCH	38,0	AHCM
<i>Galipea carinata*</i>	folhas	0,1597	0,606	GFH	13,1	GFM
	caule	1,9201	0,76	GCH	23,5	GCM
<i>Galipea carinata</i>	folhas	0,4628	6,6	GCFH	7,8	GCFM
	caule	1,53	3,7	GCCH	15,6	GCCM
<i>Trichilia ramalhoi</i>	folhas	1,020	3,5	TRFH	46,7	TRFM
	galhos	615,7	2,3	TRGH	47,7	TRGM

\* espécime coletada em 18/01/1993

#### 4.5. Obtenção das frações

Os extratos vegetais foram fracionados utilizando-se diferentes técnicas cromatográficas. Dez deles (AGM, ALFM, ALCM, AHFH, AHFM, AHCM,

GFM, GCFH, GCCM e TRFH) foram submetidos à cromatografia líquida a vácuo (CLV), dois à partição líquido-líquido (TRFM e TRFM), e três (AHCH, GFH e TRGH) à cromatografia líquida em coluna.

A cromatografia líquida a vácuo foi realizada em funil de placa sinterizada, com dimensões variadas, e tendo como suporte sílica 70-230 mesh e eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Portanto, cada extrato originou quatro frações (TABELA 4.3).

TABELA 4.3. Frações obtidas por CLV.

espécie	código do extrato	massa usada / g	código da fração	massa / g
<i>Almeidea coerulea</i>	AGM	13,2	AGMH	0,0048
			AGMD	0,4359
			AGMA	2,8045
			AGMM	9,7644
<i>Almeidea rubra</i>	ALFM	15,1	ALFMH	0,0248
			ALFMD	0,7404
			ALFMA	3,3208
			ALFMM	9,8289
	ALCM	7,9	ALCMH	0,0049
			ALCMD	0,1001
			ALCMA	0,2169
			ALCMM	7,3417
<i>Conchocarpus heterophyllus</i>	AHFH	11,0	AHFHH	0,2061
			AHFHD	2,1682
			AHFHA	7,4193
			AHFHM	0,5464
	AHFM	27,4	AHFMH	0,2594
			AHFMD	4,6816
			AHFMA	3,5697
			AHFMM	18,6334
	AHCM	27,4	AHCMH	0,0044
			AHCMD	0,1041
			AHCMA	7,43032
			AHCMM	19,6754

continuação da TABELA 4.3

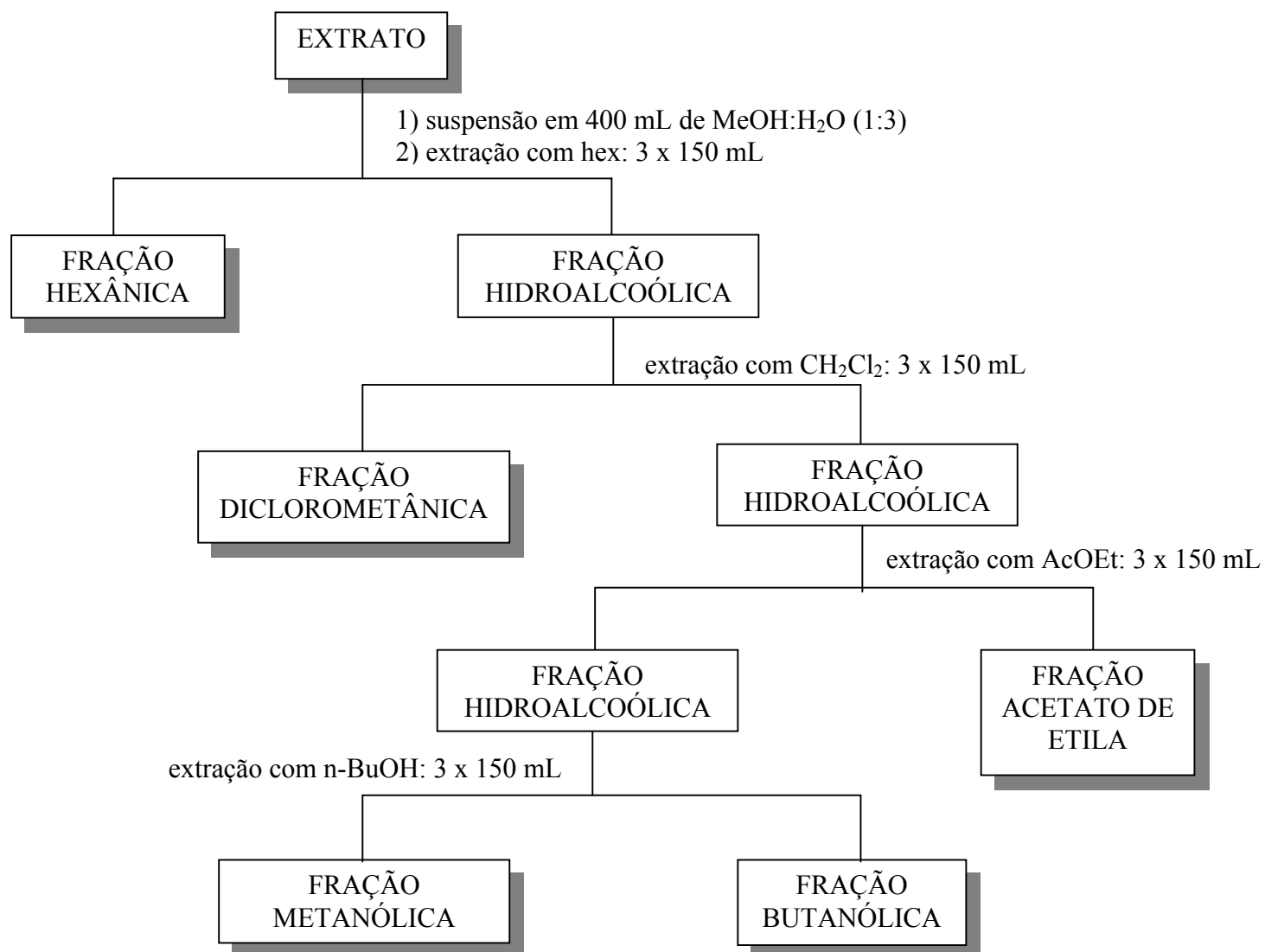
<i>Galipea carinata</i> *	GFM	12,8	GFMH	0,0125
			GFMD	0,4192
			GFMA	3,2409
			GFMM	9,0257
<i>Galipea carinata</i>	GCFH	5,1	GCFHH	0,1809
			GCFHD	1,7977
			GCFHA	2,297
			GCFHM	0,5357
	GCCM	14,1	GCCMH	0,0296
			GCCMD	0,3717
			GCCMA	4,8794
			GCCMM	9,0027
<i>Trichilia ramalhoi</i>	TRFH	3,5	TRFHH	0,4076
			TRFHD	2,2536
			TRFHA	0,3447
			TRFHM	0,4543

\* espécime coletada em 18/01/1993

As partições líquido-líquido dos extratos TRFM e TRGM de *T. ramalhoi* foram realizadas como esquematizado a seguir. Destas originaram-se 10 frações, descritas na TABELA 4.4.

TABELA 4.4. Frações obtidas por partição líquido-líquido.

espécie	código do extrato	massa usada / g	código da fração	massa / g
<i>Trichilia ramalhoi</i>	TRFM	41,0	TRFMH	14,9
			TRFMD	0,4858
			TRFMA	4,1701
			TRFMM	13,2
	TRGM	42,0	TRFMB	7,8
			TRGMH	1,6647
			TRGMD	0,3268
			TRGMA	12,3
			TRGMM	18,0
			TRGMB	9,4



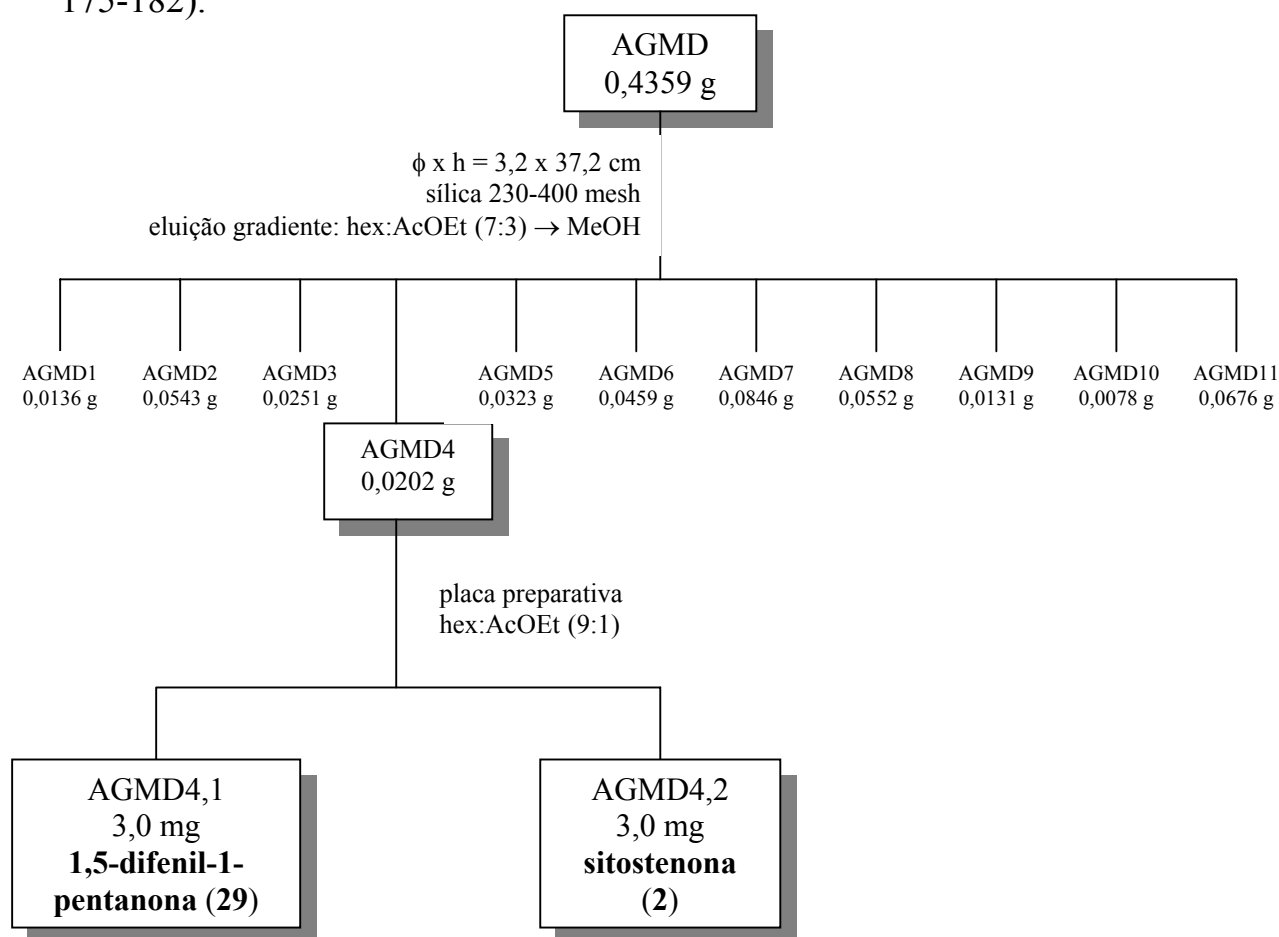
## 4.6. Isolamento dos constituintes de *Almeidea coerulea*

### 4.6.1. Estudo químico da fração AGMD

O estudo da fração diclorometânica do extrato metanólico dos galhos de *A. coerulea* (AGMD), que ocasionou 100 % de lise do *T. cruzi* (p. 193), permitiu o isolamento do esteróide sitostenona (2) e da 1,5-difenil-1-pentanona inédita (29).

Essas substâncias foram isoladas através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh, e por cromatografia em camada delgada preparativa.

A sitostenona (**2**) foi identificada por EM e RMN  $^1\text{H}$  (p. 37-38) e a substância **29** foi caracterizada por EM e RMN, em uma e duas dimensões (p. 175-182).



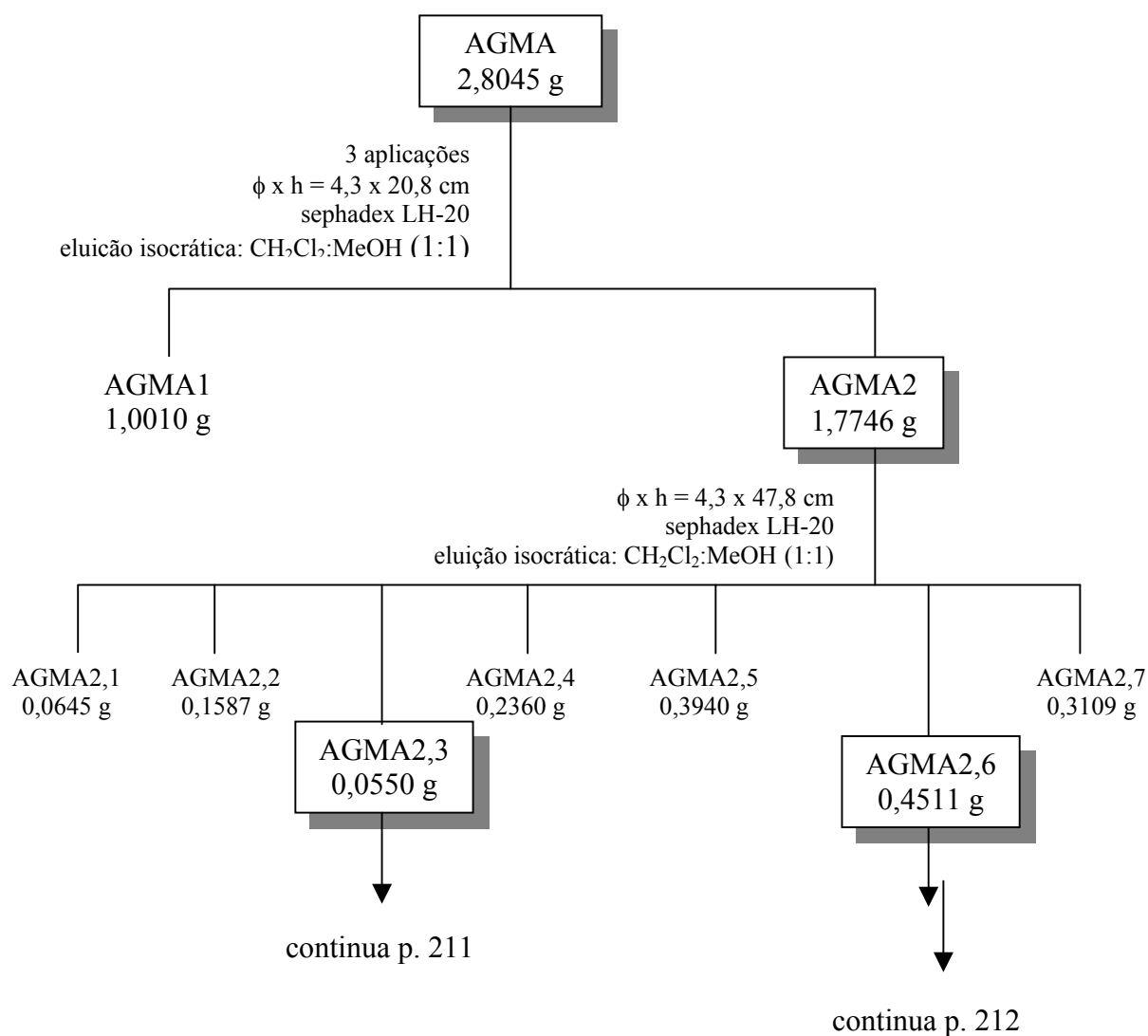
#### 4.6.2. Estudo químico da fração AGMA

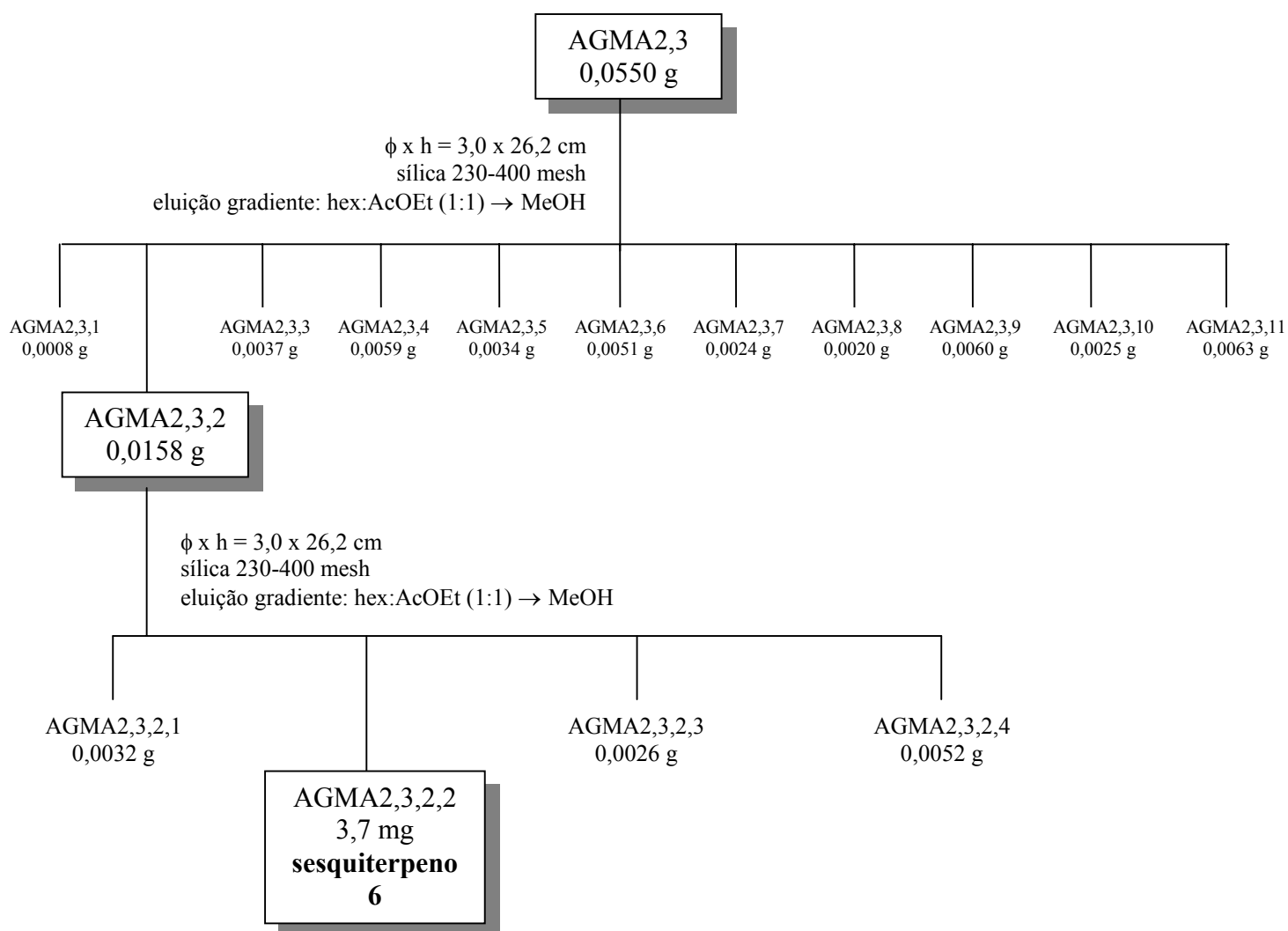
Estudou-se também a fração acetato etila do extrato metanólico dos galhos de *A. coerulea* (AGMA), que ocasionou 68,6 % de lise parasitária (p. 193). Nesse estudo, foram isolados: os alcalóides furoquinolínicos dictamina (**11**) e  $\delta$ -fagarina (**14**); o alcalóide indolopiridoquinazolínico inédito **22**; as cumarinas escoparona (**23**), escopoletina (**24**) e marmesina (**25**); as amidas

paprazina (**26**) e *N-trans*-feruloitiramina (**27**); o ácido siríngico (**30**); e, o sesquiterpeno eudesmano inédito **6**.

### Isolamento do sesquiterpeno **6**

O sesquiterpeno **6** foi isolado através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20 como fases estacionárias. Ele foi identificado por EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135°, e experimentos de correlação homo- e heteronuclear (p. 50-62).



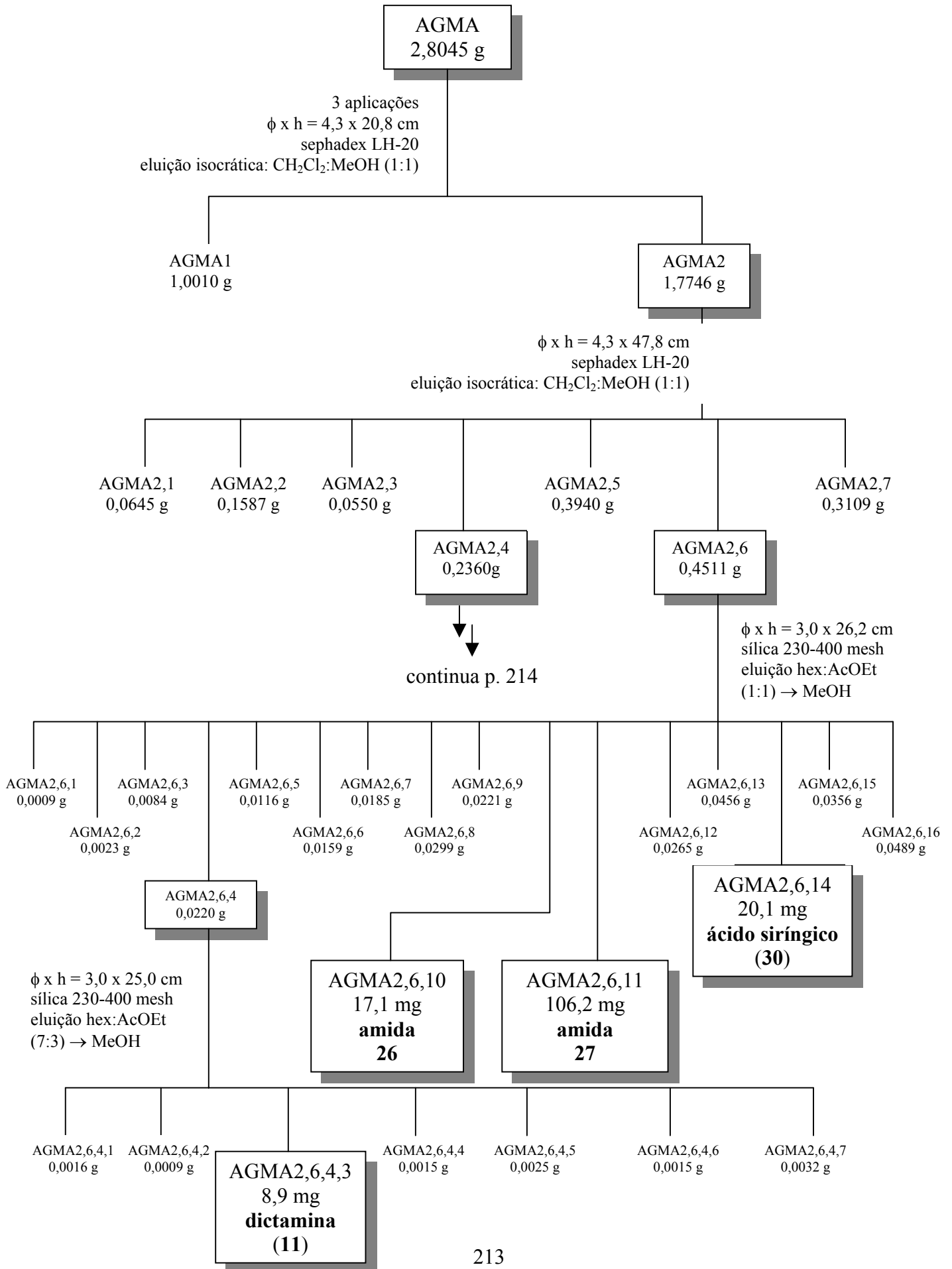


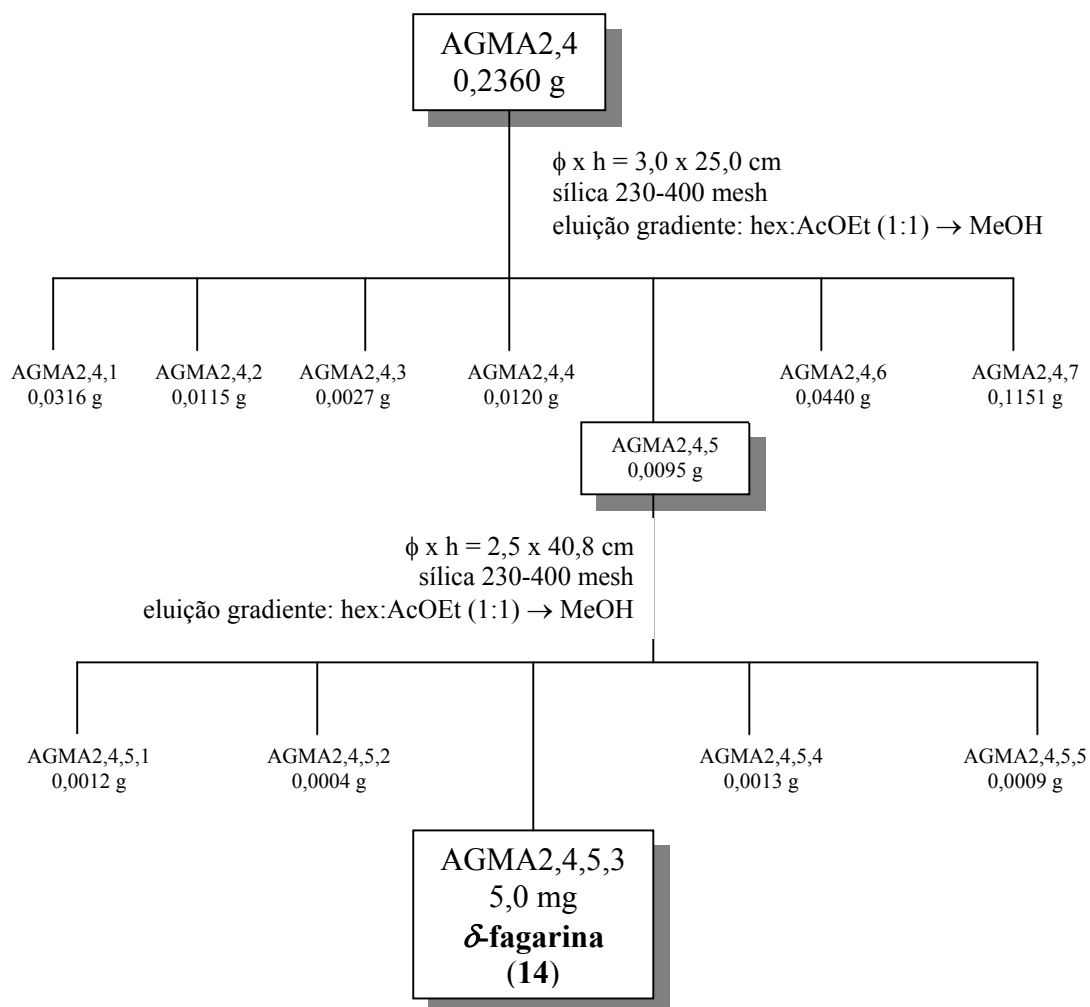
### Isolamento do alcalóide indolopiridoquinazolínico **22**

O alcalóide indolopiridoquinazolínico **22** foi isolado através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20. Ele foi identificado por RMN em experimentos de correlação homo- e heteronuclear (p. 130-139).



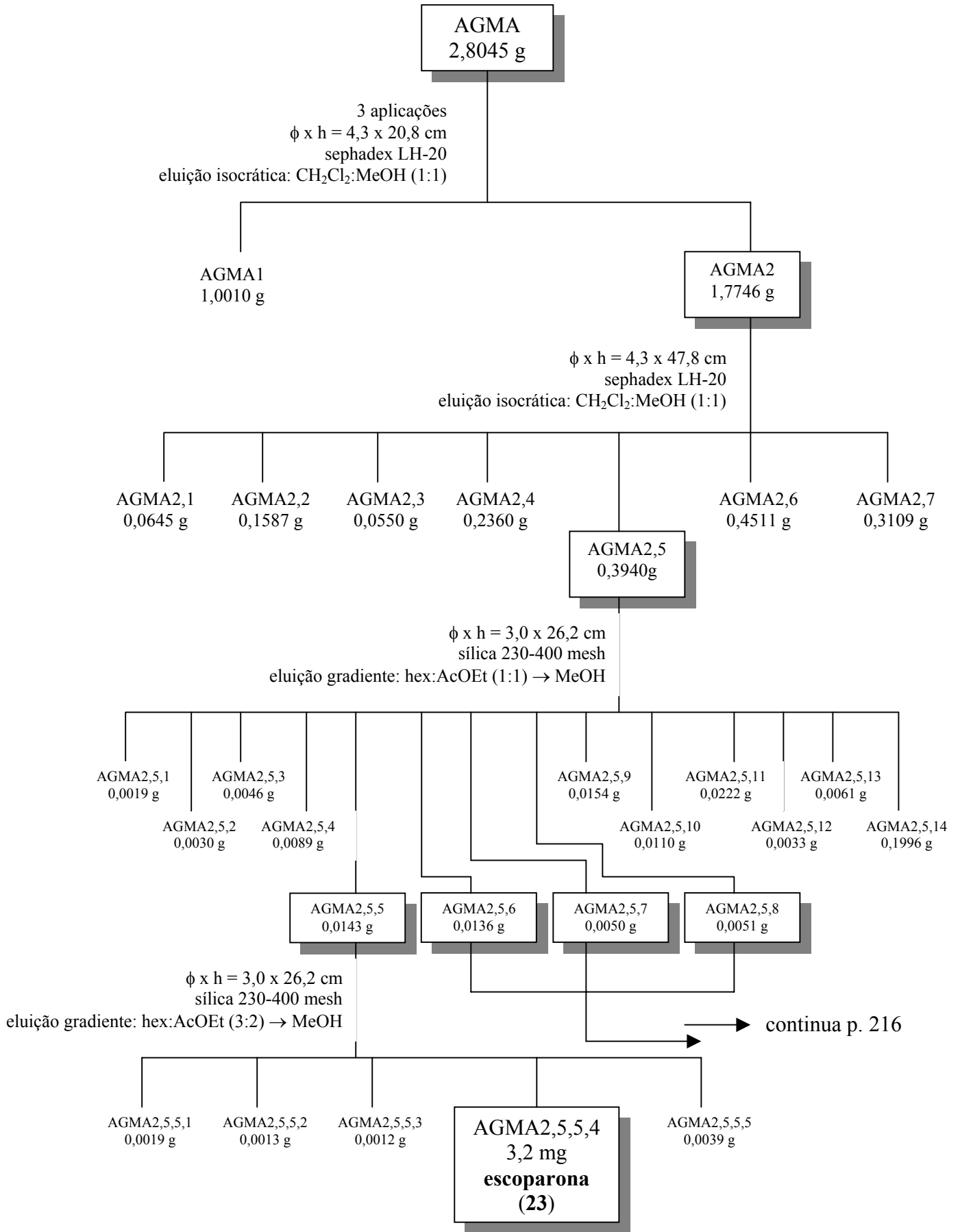


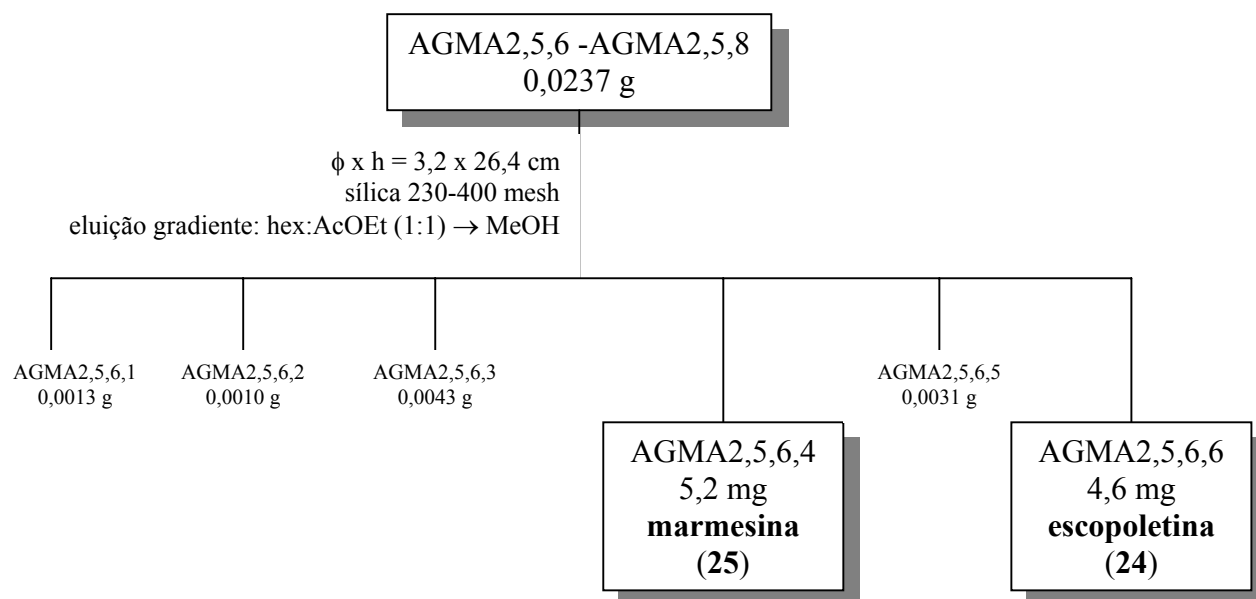




### Isolamento das cumarinas **23**, **24** e **25**

As cumarinas **23**, **24** e **25** foram isoladas por cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20. As primeiras foram identificadas por EM e RMN  $^1\text{H}$  (p. 140-143). Já a cumarina **25** foi caracterizada por EM e RMN, em experimentos de correlação homo- e heteronuclear (p. 144-149).





## 4.7. Isolamento dos constituintes de *Almeidea rubra*

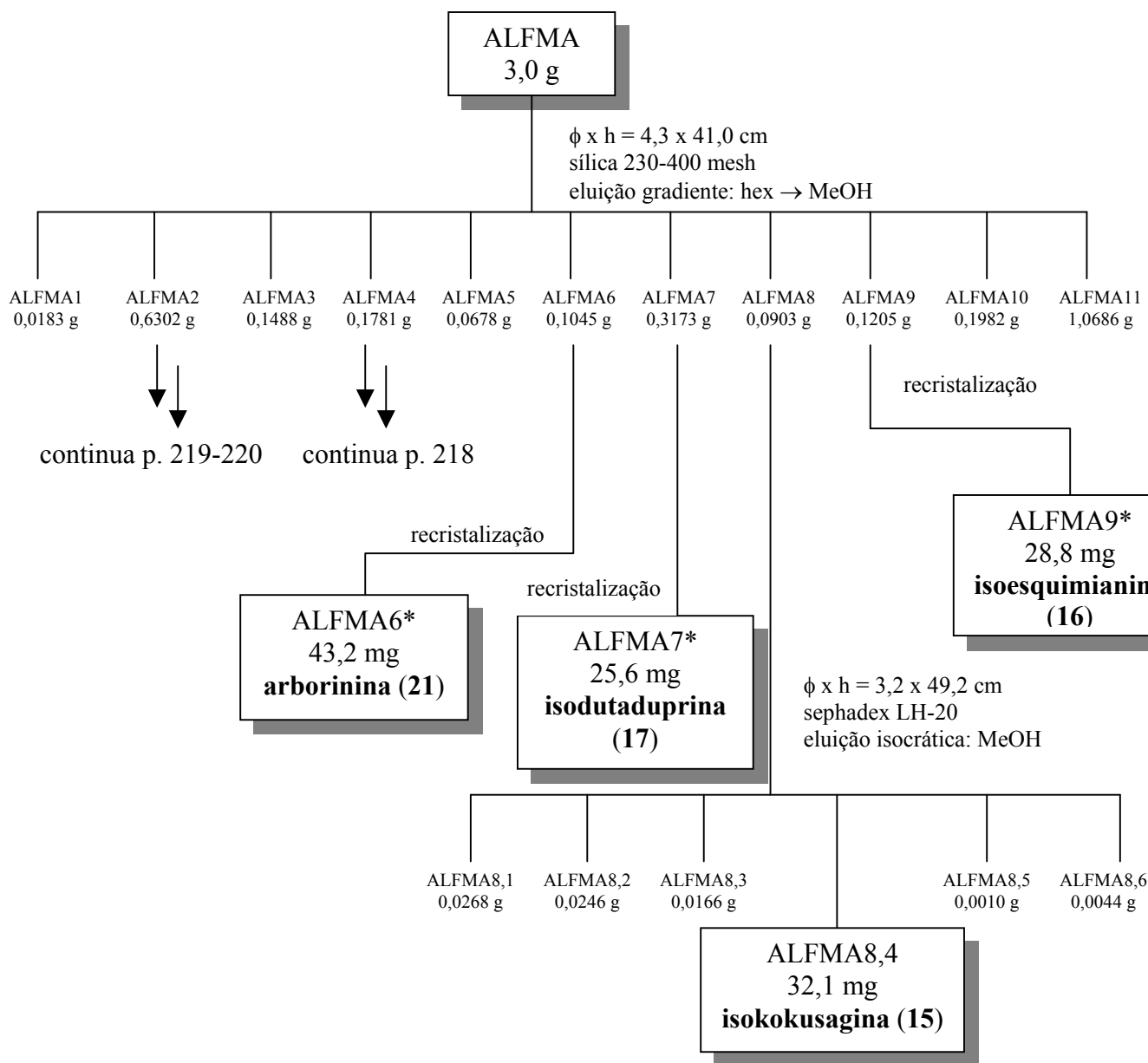
### 4.7.1. Estudo químico da fração ALFMA

O estudo da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *A. rubra* (ALFMA), que ocasionou 90,7 % de inibição da enzima APRT e 62,9 % de lise parasitária (p. 192 e 194), permitiu o isolamento: dos alcalóides furoquinolínicos kokusagina (**12**) e esquimianina (**13**); de três alcalóides furoquinolônicos [isokokusagina (**15**), isoesquimianina (**16**) e isodutaduprina (**17**)]; do alcalóide acridônico arborinina (**21**); do alcalóide tetraidrofuroquinolínico inédito **18**; e do derivado do ácido antranílico inédito **28**.

#### Isolamento dos alcalóides **15**, **16**, **17** e **21**

Os alcalóides **16**, **17** e **21** foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh, e por recristalização. Já a substância **15** foi isolada por cromatografia em coluna, com sílica gel 230-400 mesh e

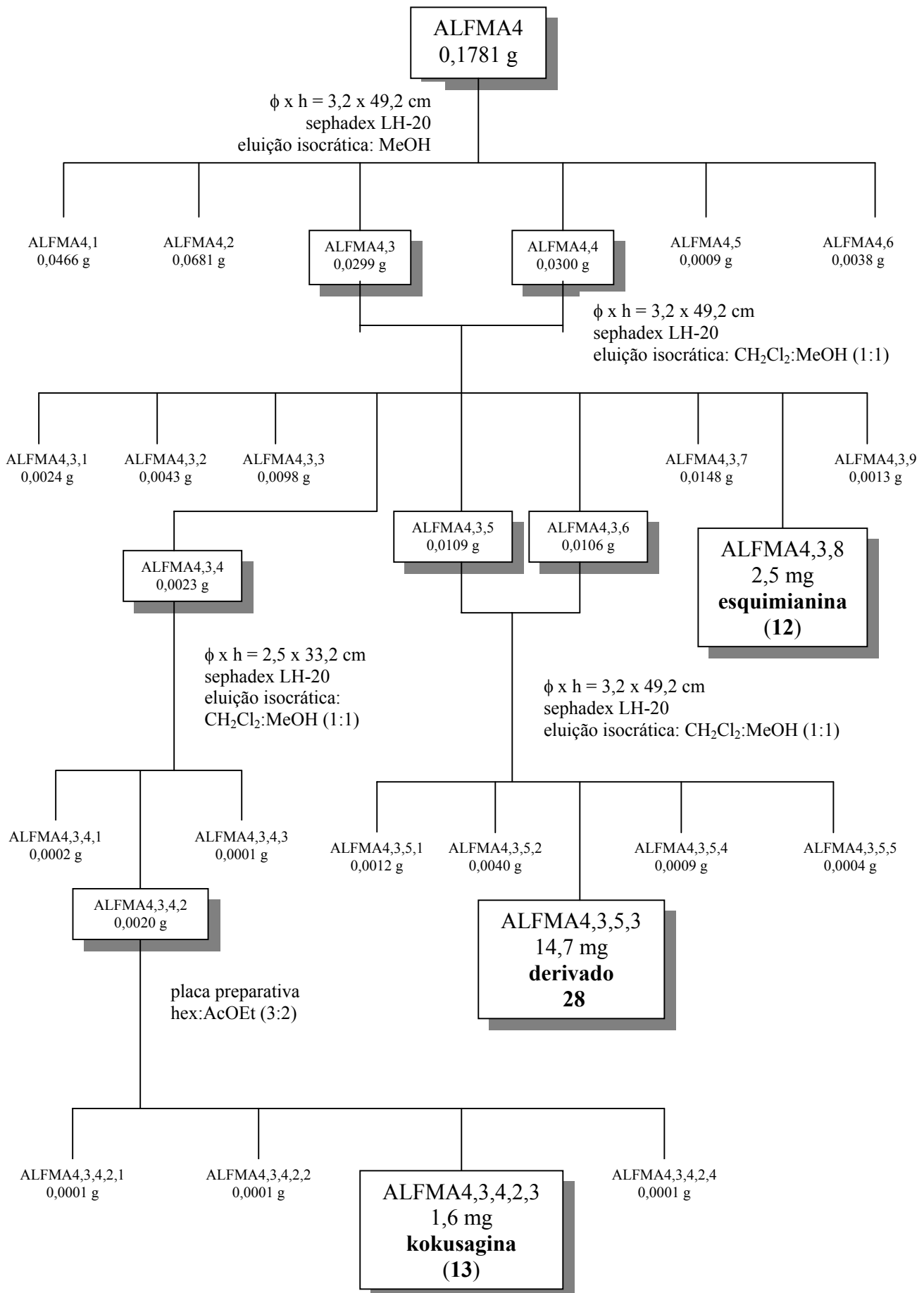
sephadex LH-20. Eles foram identificados por EM e RMN (p. 96-104 e 128-130).



### Isolamento dos alcalóides 12 e 13 e do derivado 28

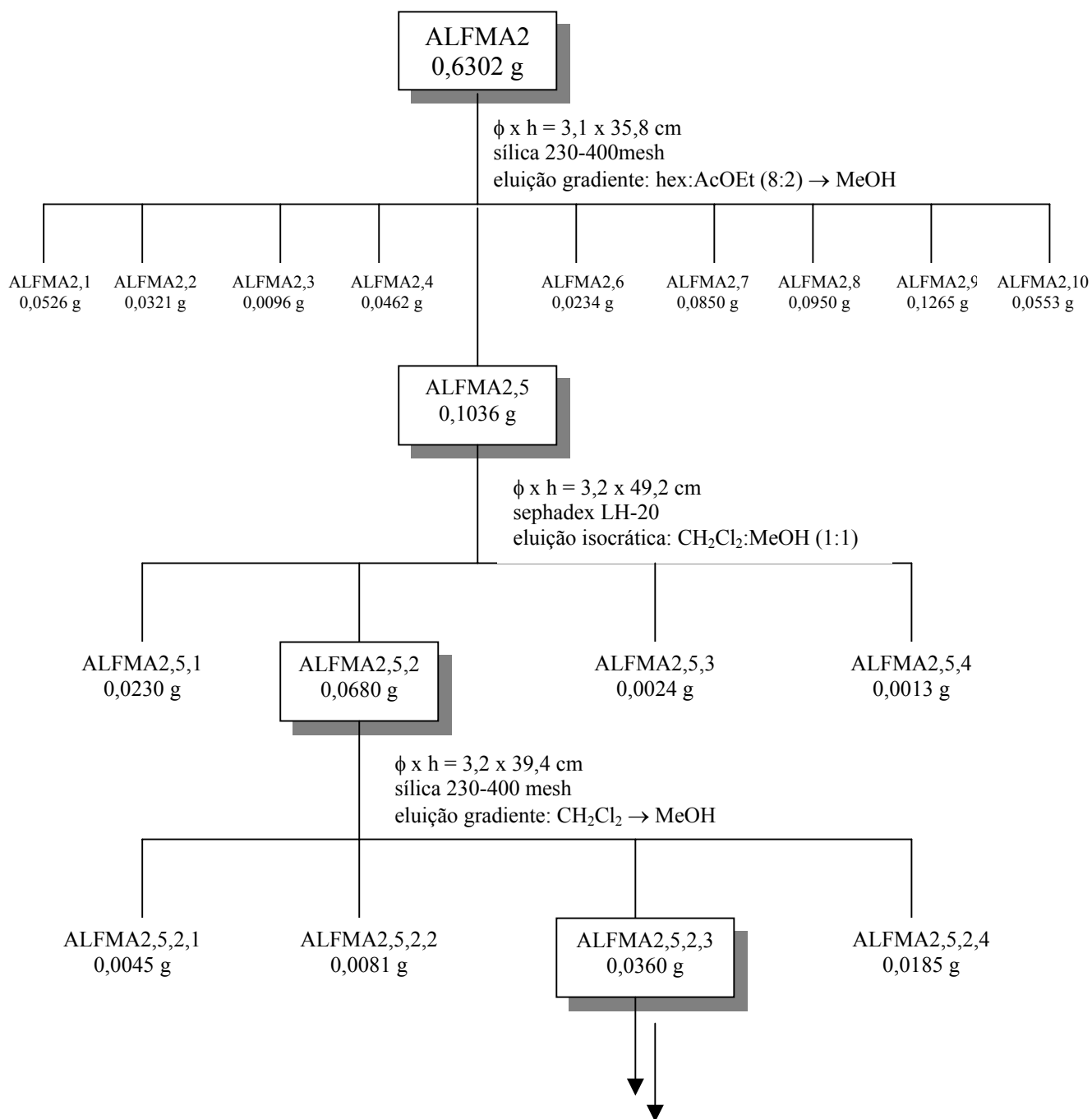
As substâncias **12**, **13** e **28** foram isoladas através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh ou sephadex LH-20, e por cromatografia em camada delgada preparativa.

O derivado inédito **28** foi caracterizado por EM, difração de raios-X, e RMN, através de experimentos de correlação homo e heteronuclear (p. 166-175). Já os alcalóides **12** e **13** foram identificados por EM e RMN (p. 88-93).

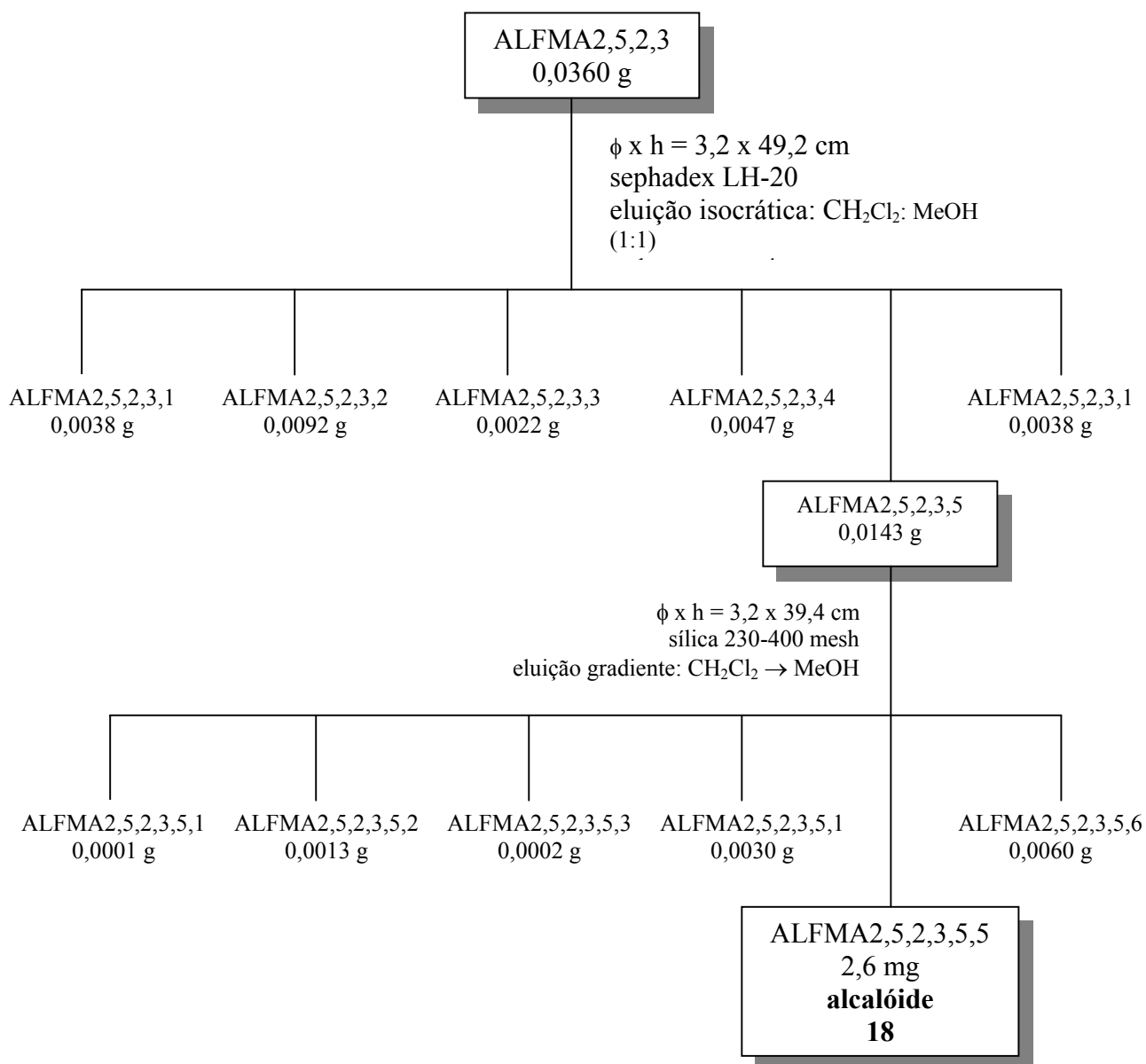


Isolamento do alcalóide 18

O alcalóide **18** foi isolado através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh ou sephadex LH-20, e por cromatografia em camada delgada preparativa. Ele foi identificado por EM e RMN (p. 104-112).



continua p. 220



## 4.8. Isolamento dos constituintes de *Conchocarpus heterophyllus*

### 4.8.1. Estudo químico da fração AHFHD

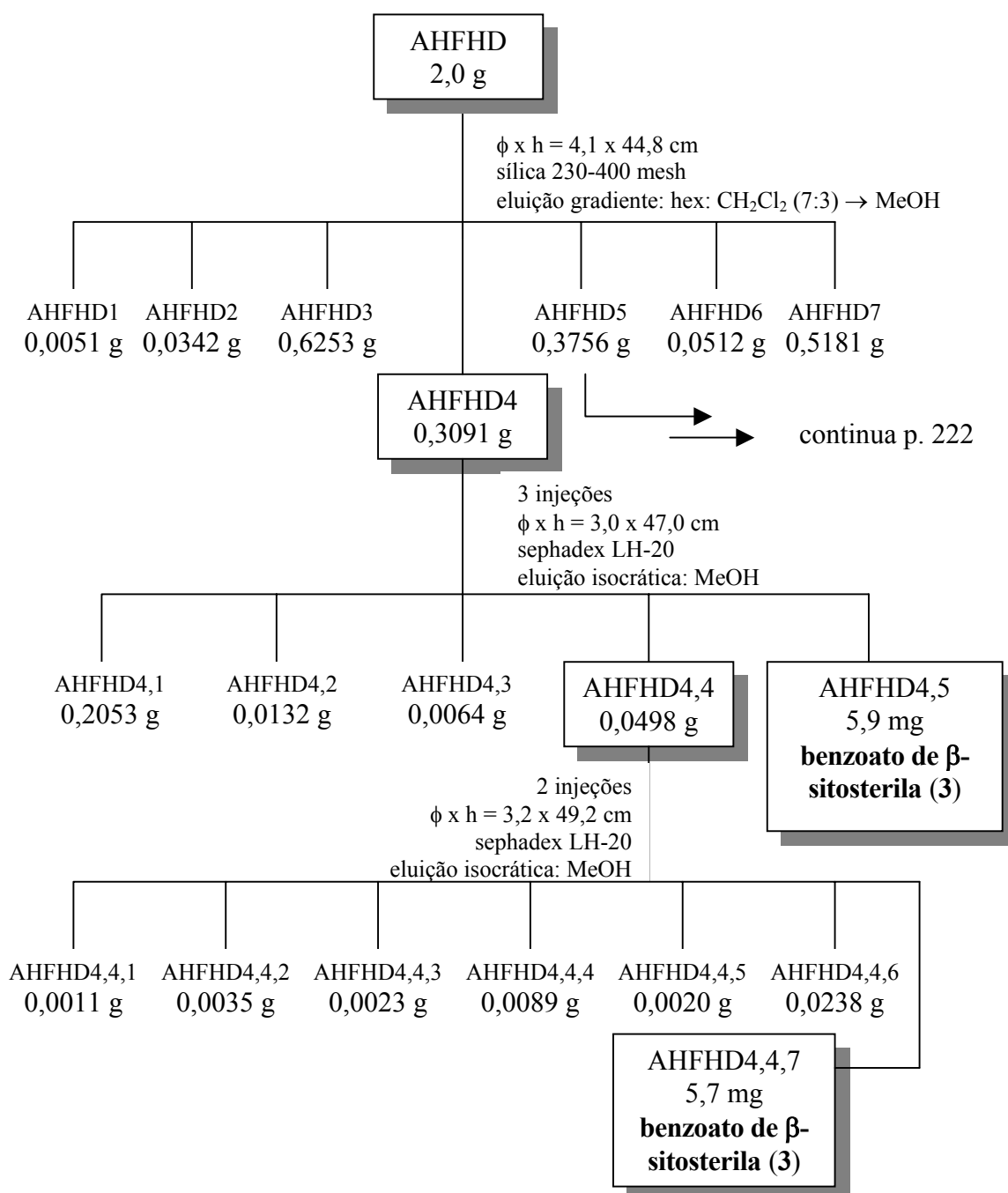
A fração diclorometânica do extrato hexânico das folhas de *C. heterophyllus* (AHFHD), que ocasionou 45,0 % de lise parasitária (p. 194), foi



submetida a diversos fracionamentos, permitindo a obtenção do benzoato de  $\beta$ -sitosterila (**3**) e das piranoflavonas inéditas **10**.

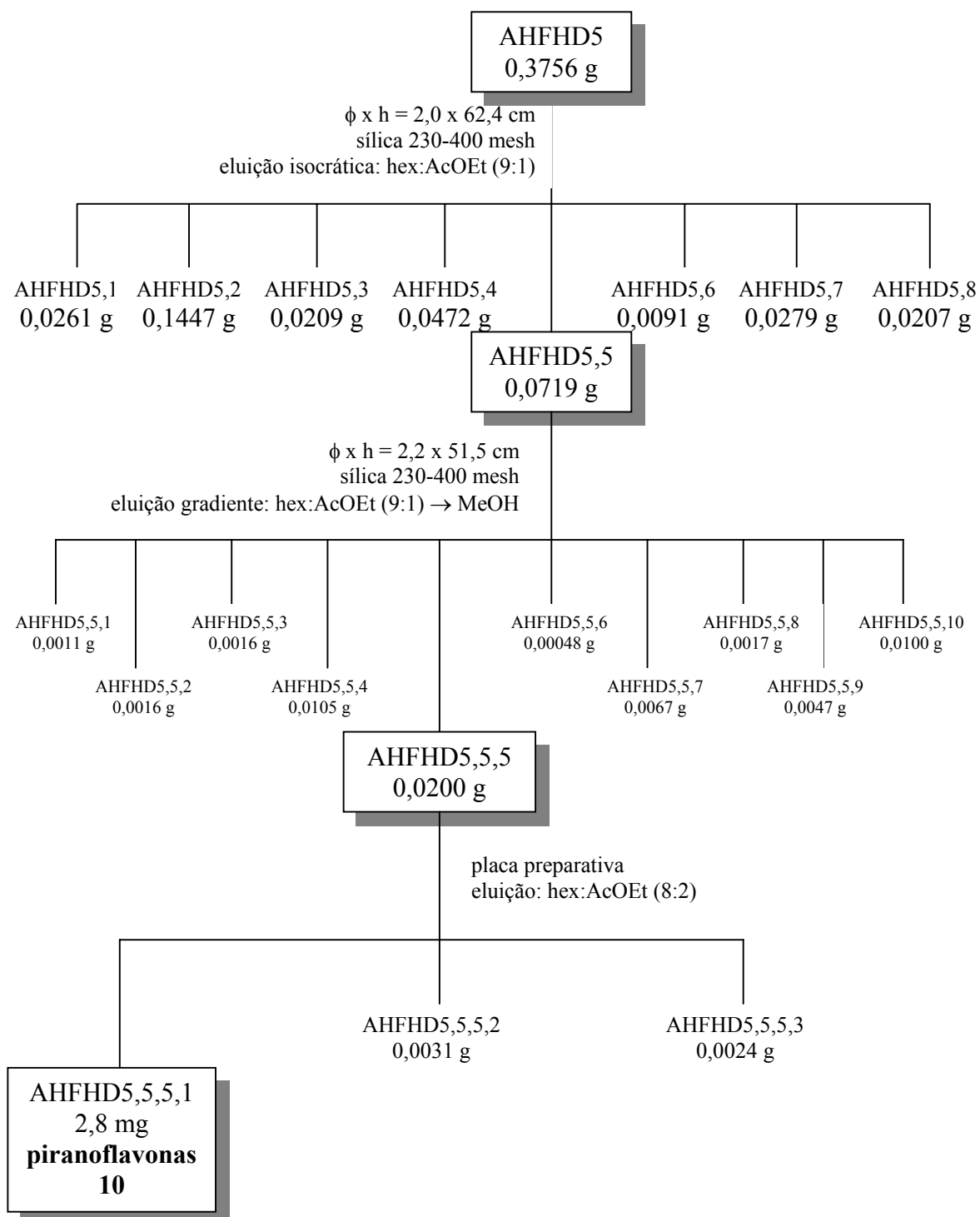
### Isolamento do benzoato de $\beta$ -sitosterila (**3**)

O esteróide **3** foi isolado através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20. Ele foi identificado por RMN (p. 38-45).



Obtenção das piranoflavonas 10

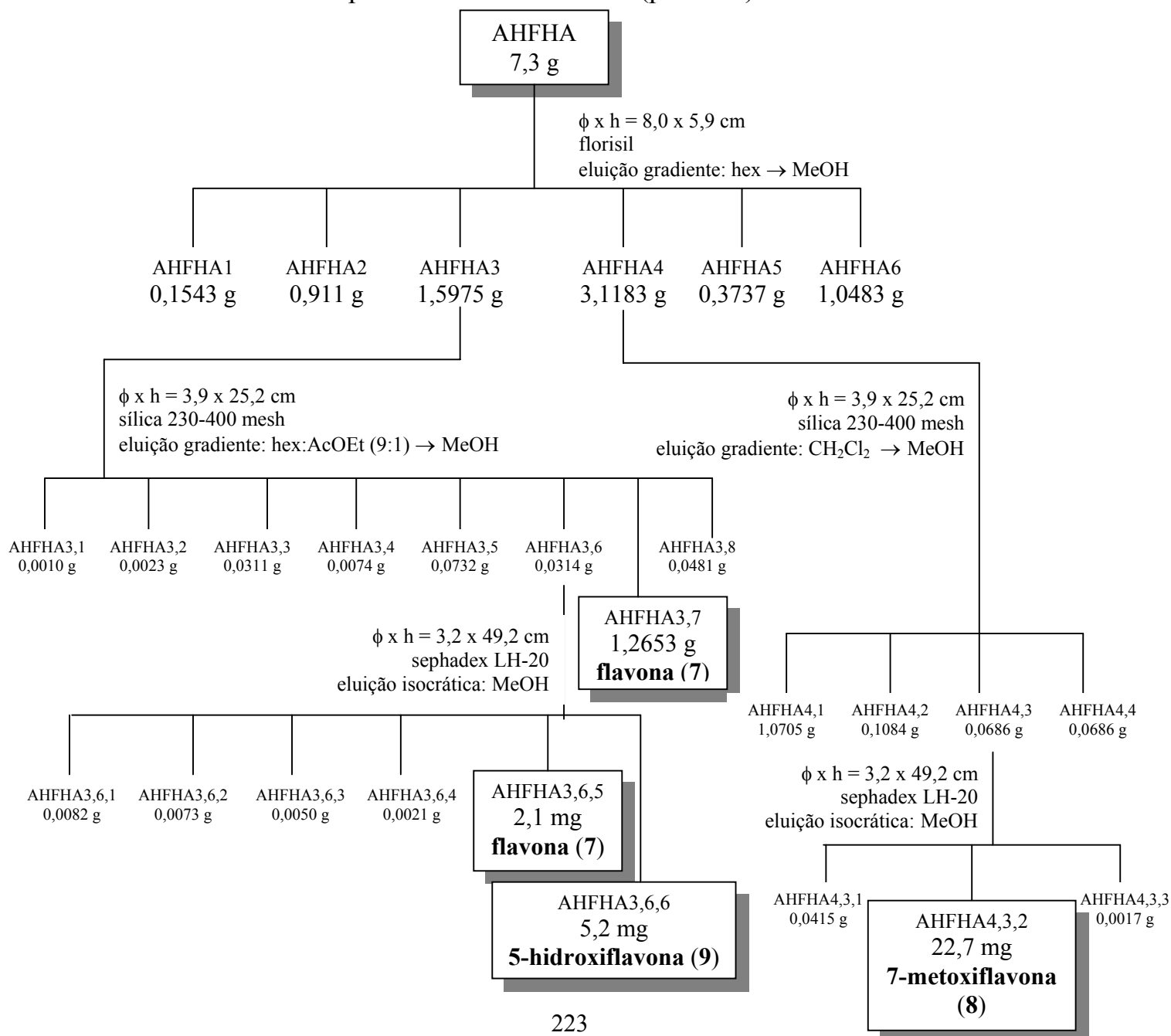
A mistura de piranoflavonas 10 foi obtida através da utilização de cromatografia líquida em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa. Ela foi identificada por EM e através de RMN, em experimentos de correlação homo- e heteronucleares (p. 72-83).



### 4.8.2. Estudo químico da fração AHFHA

A fração acetato de etila do extrato hexânico das folhas de *C. heterophyllus* (AHFHA), quando testada, ocasionou 80,1 % de inibição na atividade da enzima APRT e 100 % de lise do *T. cruzi* (p. 192 e 194). Desta forma, essa fração foi estudada e é constituída principalmente pela flavona (7), 7-metoxiflavona (8) e 5-hidroxiavona (9).

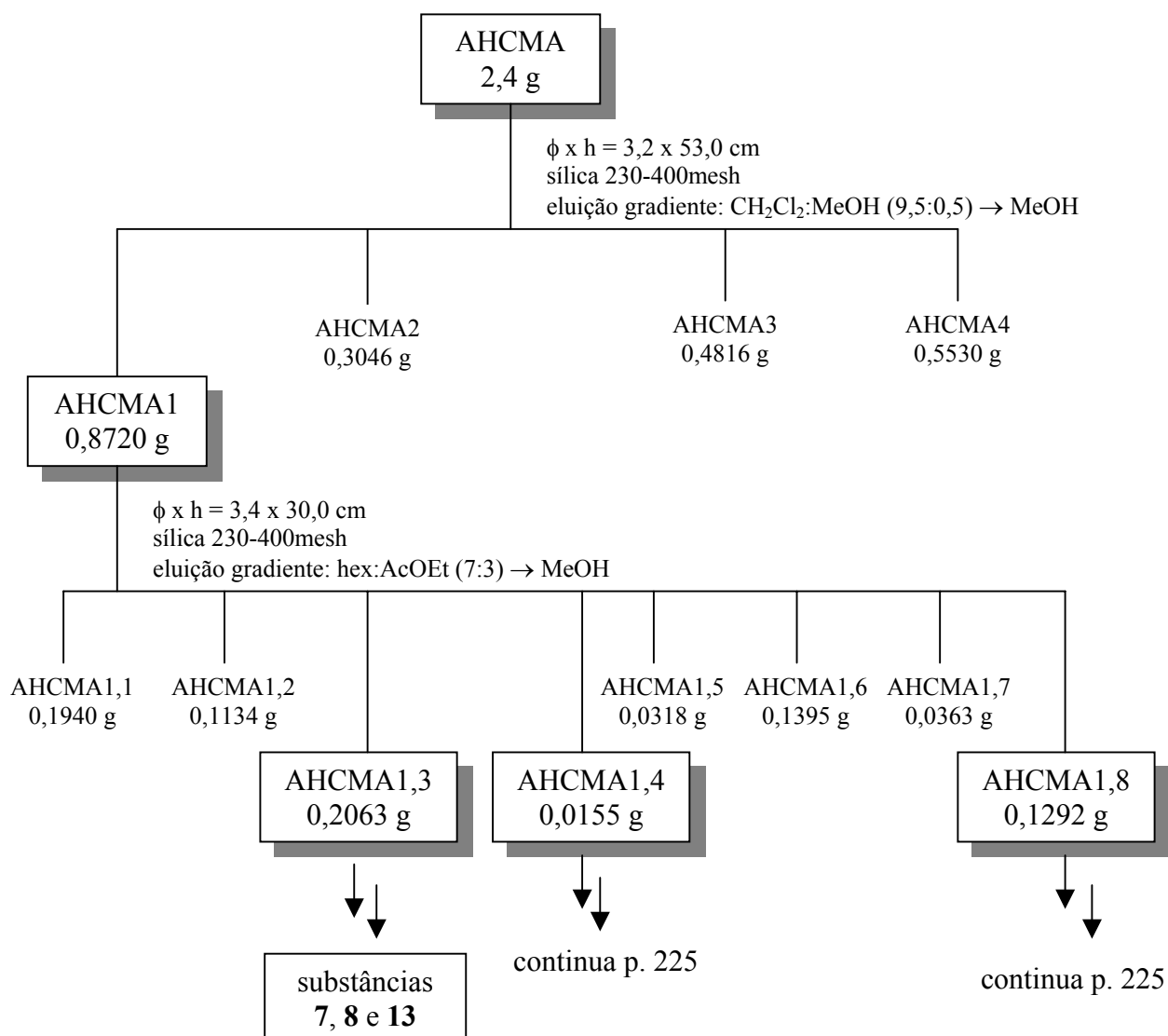
Essas substâncias foram isoladas através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se florisil, sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20, e foram caracterizadas por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (p. 63-72).

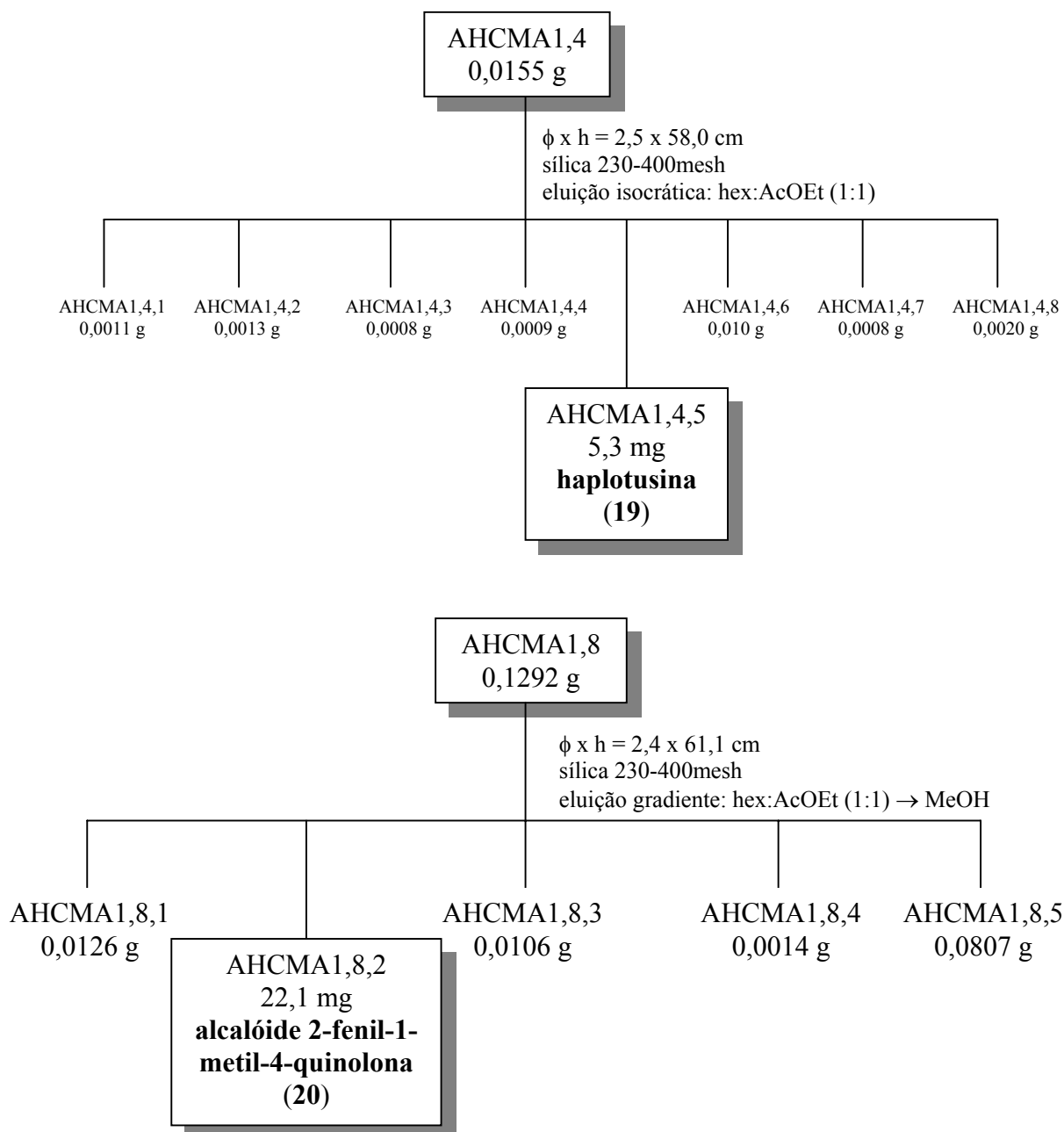


### 4.8.3. Estudo químico da fração AHCMA

O estudo da fração acetato de etila do extrato metanólico do caule de *C. heterophyllus* (AHCMA), 100 % ativa sobre o *T. cruzi* (p. 194), conduziu ao isolamento: da flavona (**7**) e da 7-metoxiflavona (**8**), que já tinham sido obtidas da fração AHFHA; do alcalóide esquimianina (**13**), anteriormente isolado de *A. rubra*; e dois alcalóides: haplotusina (**19**) e 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**20**).

Os alcalóides **19** e **20** foram isolados através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se como suporte sílica 230-400 mesh. Eles foram identificados por EM e RMN, em experimentos de correlação homo- e heteronuclear (p. 113-127).



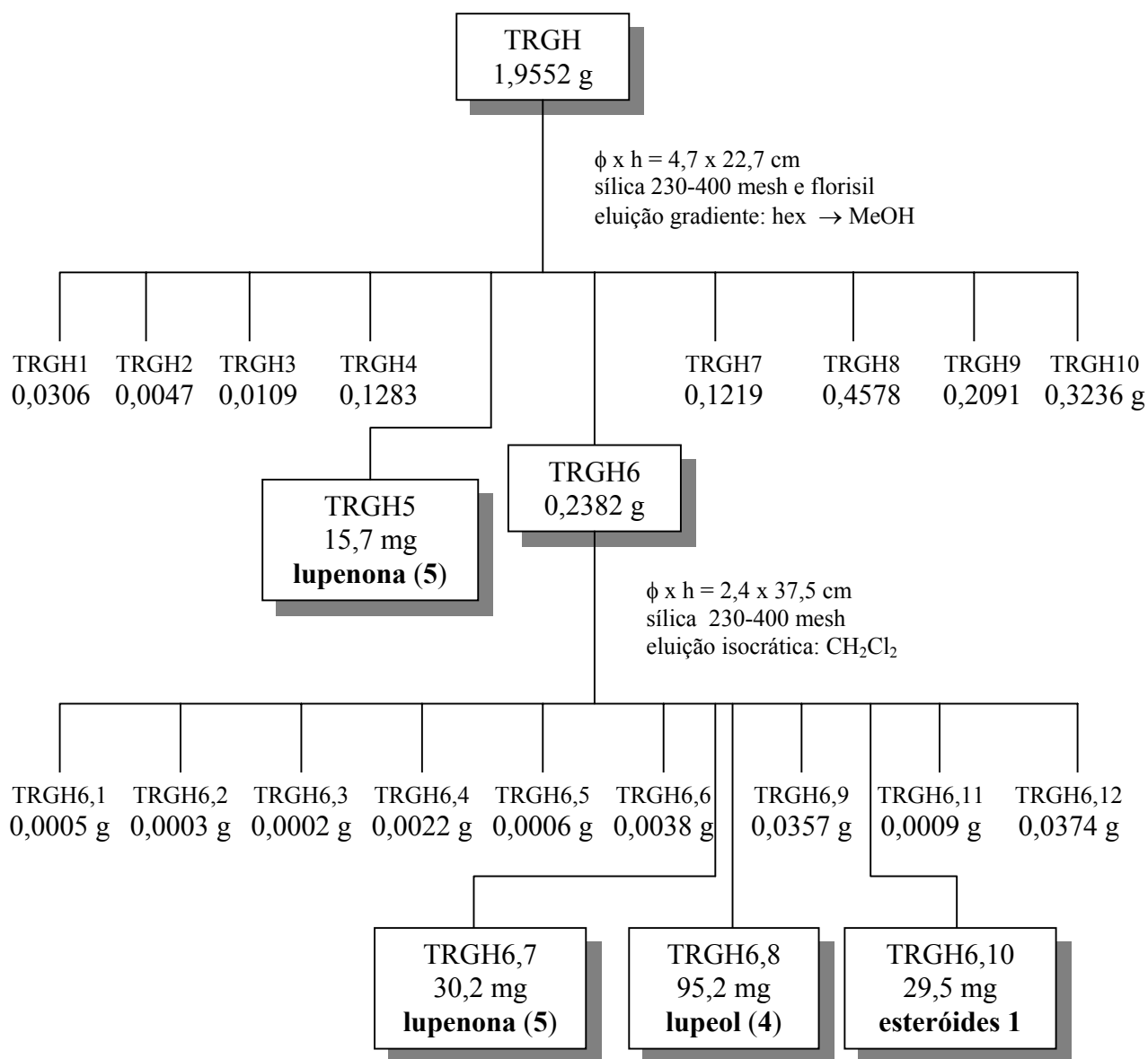


## 4.9. Isolamento dos constituintes de *Trichilia ramalhoi*

### 4.9.1. Estudo químico do extrato TRGH

Parte do extrato hexânico dos galhos de *T. ramalhoi* (TRGH), ativo sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (84,25 % de lise parasitária, p. 189), foi cromatografado em sílica 230-400 mesh e florisil, permitindo a obtenção dos

esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (1), e dos triterpenos lupeol (4) e lupenona (5), que foram caracterizados por EM e RMN  $^1\text{H}$  (p. 35-36 e 46-49).



## 4.10. Metodologia dos ensaios biológicos

### 4.10.1. Ensaio com a enzima gGAPDH de *T. cruzi*

A enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (gGAPDH) é uma enzima recombinante, obtida em um sistema de expressão de *Escherichia*

*coli*. A preparação e purificação da mesma são feitas rotineiramente no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), de acordo com procedimentos estabelecidos por SOUZA et al. (1998).

Essa enzima catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-difosfoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e do cofator  $\text{NAD}^+$  (FIGURA 1.4, p. 8). Os ensaios de inibição enzimática estão baseados nesta reação, e nestes são feitas medidas espectrofotométricas de NADH formado, durante 30 s, a 340 nm.

O teste baseia-se no procedimento desenvolvido por BARBOSA e NAKANO (1987) e descrito em VIEIRA et al. (2001). A mistura reacional (1 mL) contém 50 mM de tampão tris-HCl (pH 8,6) com 1mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e EDTA, 30 mM de arseniato de sódio, 2,5 mM de  $\text{NAD}^+$ , 4-9  $\mu\text{g}$  de GAPDH e 0,3 mM de G3P (que é adicionado por último).

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

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

Onde:

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

$\Delta t$  = tempo de leitura; 0,5 min

$V_{cubeta}$  = volume da cubeta, em mL

$V_{enzima}$  = volume de enzima na cubeta, em mL

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

$6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = \epsilon_{\text{NADH}}$

\* para a construção dessa reta, os valores de absorbância são a média dos três valores lidos, ponto a ponto. Isto é realizado para o branco (enzima em presença de DMSO) e para o inibidor.

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

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

As medidas do potencial inibitório dos extratos e frações testados foram realizadas na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , considerando-se como inibição satisfatória valores iguais ou superiores à 50%; e das substâncias em concentrações variadas.

#### **4.10.2. Ensaio com a enzima APRT de *L. tarentolae***

A enzima adenina fosforribosiltransferase (APRT) foi obtida de *Leishmania tarentolae*. Essa espécie de *Leishmania* foi isolada de lagartos e não é capaz de infectar seres humanos (CROAN et al., 1997; NOYES et al., 1997). Entretanto, estudos envolvendo sequenciamento do gene de APRT de *L. tarentolae* revelaram grande identidade com o gene da proteína homóloga de *L. donovani* (PHILLIPIS et al., 1999). A identidade de 85% nas sequências de aminoácidos dessas duas APRTs permite presumir que as estruturas tridimensionais também sejam similares, e que as informações obtidas com a APRT de *L. tarentolae* poderão ser utilizadas na busca de novos fármacos contra a Leishmaniose humana.



A APRT é expressa em *Escherichia coli* e purificada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do IFSC-USP.

Ela catalisa a reação nucleofílica entre a adenina e o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), com a formação de adenosina-monofosfato (AMP) (FIGURA 1.10, p. 15). Os ensaios de inibição enzimática estão baseados nesta reação, e nestes são feitas medidas espectrofotométricas de AMP formado, durante 60 s, a 259 nm.

O ensaio baseia-se no procedimento descrito por TUTTLE e KRENITSKY (1980), com algumas modificações.

A mistura reacional (0,5 mL) contém 0,01 mM de adenina, 0,5 mM de PRPP, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 100 mM de tampão tris-HCl (pH 7,4). Para cada teste são usados 475 µL da mistura reacional e 25 µL das soluções dos inibidores.

As medidas são feitas em triplicata e os valores de absorbância obtidos são avaliados como anteriormente descrito para a enzima GAPDH. Entretanto, o valor de  $\epsilon$  (do AMP) na fórmula para o cálculo da AE é de 1,24 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Assim como para a enzima GAPDH, as medidas de atividade inibitória dos extratos e frações foram realizadas na concentração de 100 µg/mL, considerando-se como inibição significativa valores iguais ou superiores à 50%; e das substâncias em concentrações variadas.

#### **4.10.3. Ensaio com as formas tripomastigotas de *T. cruzi***

Os ensaios com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* são realizados no Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da FCFRP-USP, segundo procedimento descrito em VIEIRA et al. (2001).

Para os ensaios são utilizadas cepas “Y” de *T. cruzi*, que são mantidas através de passagens seriadas em camundongos, por meio de repiques semanais, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências da Saúde da FCFRP-USP.

Os ensaios biológicos de misturas e substâncias puras são realizados utilizando-se sangue de camundongos albinos *Swiss*, infectados pela cepa “Y” do *T. cruzi*, o qual é obtido por punção cardíaca no pico da parasitemia (sétimo dia). Esse sangue é diluído em sangue de animal sadio, de forma a se obter uma concentração final de  $2 \times 10^6$  formas tripomastigotas por mL de sangue. Os ensaios são realizados em microplacas de titulação (96 poços), onde o sangue infectado e as misturas (ou substâncias) a serem avaliadas, são solubilizados (em triplicata), e o material é incubado por 24 h a 4 °C. Após este tempo, a contagem das formas tripomastigotas é realizada segundo a técnica descrita por BRENER (1962). Como controles, são utilizados: 1) sangue de camundongo infectado, sem a adição de nenhuma substância; 2) sangue infectado contendo a mesma concentração de DMSO utilizada no preparo das soluções; e, 3) sangue infectado contendo violeta genciana (controle positivo), na concentração de 1:4.000.

Os extratos foram ensaiados a 4 mg/mL, frações a 2 mg/mL e substâncias nas concentrações de 500, 250 e 100 µg/mL, para a obtenção dos valores de  $IC_{50}$ .

Os resultados obtidos são expressos em porcentagem de lise parasitária (% L.P.), sendo que são considerados ativos os extratos ou frações que apresentam  $L.P. \geq 50 \%$ .

## 5. Conclusões

O estudo fitoquímico de *Almeidea coerulea*, *A. rubra*, *Conchocarpus heterophyllus*, *Galipea carinata* (Rutaceae) e *Trichilia ramalhoi* (Meliaceae), biomonitorado por ensaios bioquímicos nas enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae* e ensaios biológicos sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, permitiu o isolamento de 30 substâncias, das mais variadas classes químicas, e a avaliação das atividades biológicas sobre os modelos escolhidos de 22 extratos vegetais, 43 frações e das substâncias isoladas.

Em concordância com as expectativas iniciais do trabalho, os resultados biológicos de extratos e frações mostraram que as plantas selecionadas são bastante promissoras na busca de novos compostos antichagásicos e antileishmanioses.

Dos 22 extratos ensaiados, 16 foram ativos sobre o *T. cruzi*, 3 inibiram a atividade da enzima gGAPDH e 1 da enzima APRT; já das 43 frações testadas, 18 apresentaram ação tripanocida, 8 inibiram a atividade da enzima gGAPDH e 11 da APRT.

O estudo químico das frações ativas levou ao isolamento de 30 substâncias, das quais 6 estão sendo pela primeira vez relatadas na literatura. A identificação de tais metabólitos contribuiu ao conhecimento do perfil químico da família Rutaceae.

Os testes biológicos das substâncias indicaram que: os alcalóides furoquinolônicos isokokusagina, isoesquimianina e isodutaduprina e a 5-hidroxi-flavona foram os melhores inibidores da atividade da enzima APRT; a cumarina marmesina foi a mais ativa sobre a enzima gGAPDH; e os alcalóides haplotusina e 2-fenil-1-metil-4-quinolona e o triterpeno lupeol foram os que apresentaram maior atividade tripanocida.

As atividades biológicas das substâncias estimulam estudos sistemáticos posteriores que avaliem a relação estrutura-atividade de uma determinada classe

química, como a dos alcalóides, a fim de se conseguir uma molécula, que sendo bastante ativa, possa servir de protótipo no desenvolvimento de novos quimioproláticos ou quimioterápicos para a doença de Chagas e para as leishmanioses.

## 6. Referências bibliográficas

- ACHMAD, S. A.; HAKIM, E. H.; JULIAWATY, L. D.; MAKMUR, L.; SUYATNO; AIMI, N. & GHISALBERTI, E. L. "A new prenylated flavone from *Artocarpus champeden*". *J. Nat. Prod.*, **59**(9): 878-879, 1996.
- AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. "Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products". *Parasite*, **6**(1): 3-8, 1999.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. "Revisão das Rutaceae do estado do Amazonas". *Acta Amazônica*, **6**(3)supll: 1-67, 1976.
- AYAFOR, J. F.; SONDEGAM, B. L. & NGADJUI, B. T. "Quinoline and indolopyridoquinazoline alkaloids from *Vepris louisii*". *Phytochemistry*, **21**(11): 2733-2736, 1982.
- BAKHTIAR, A.; GLEYS, J.; MOULIS, C. & FOURASTE, I. "O-glycosyl-C-glycosylflavones from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **35**(6): 1593-1594, 1994.
- BAKHTIAR, A.; GLEYS, J.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. & STANISLAS, E. "C-glycosylflavones from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **29**(4): 1339-1340, 1990.
- BAKKER, B. M.; WESTERHOFF, H. V.; OPPERDOES, F. R. & MICHELS, P. A. M. "Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs". *Mol. Biochem. Parasit.*, **106**(1): 1-10, 2000.
- BARBOSA, V. M. & NAKANO, M. "Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas* sp. 1. Purification and properties of the enzyme". *Comp. Biochem. Phys. B*, **88**(2): 563-568, 1987.
- BARRERO, A. F.; SANCHEZ, J. F.; ALVAREZ-MANZANEDA, E. J.; DORADO M. M. & HAIDOUR, A. "Terpenoids and sterols from the wood of *Abies pinsapo*". *Phytochemistry*, **32**(5): 1261-1265, 1993.
- BASTOS, J. K.; DE ALBUQUERQUE, S. & SILVA, M. L. A. "Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*". *Planta Med.*, **65**(6): 541-544, 1999.
- BERINZAGHI, B.; DEULOFEU, V.; LABRIOLA, R. & MURUZABAL, A. "Alkoxy interchange by  $\gamma$ -alkoxyquinoline derivatives in alcoholic alkali". *J. Am. Chem. Soc.*, **65**(7): 1357-1359, 1943.
- BERMAN, J. D. "Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies". *Rev. Infect. Dis.*, **10**(3): 560-586, 1998.

- BLAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES DA SILVA, M. F. das G.; FERNANDES, J. B.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; DE ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I. & SCHPECTOR, J. Z. "Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersiamine". *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(1): 66-70, 2002.
- BIOMANIA, site <http://www.biomania.com.br/protista/chagas.php>, acessado em janeiro/2004.
- BRENER, Z. "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **4**(6): 389-396, 1962.
- BROCHINI, C. B.; NUNEZ, C. V.; MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CHAVES, M. H. & MARTINS, D. "Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos". *Quim. Nova*, **22**(1): 37-40, 1999.
- CLARKSON, A. B. & BROHN, F. H. "Trypanosomiasis: approach to chemotherapy by inhibition of carbohydrate catabolism". *Science*, **194**(4261): 204-206, 1976.
- CHAN-BACAB, M. J. & PENA-RODRIGUEZ, L. M. "Plant natural products with leishmanicidal activity". *Nat. Prod. Rep.*, **18**(6): 674-688, 2001.
- CORTEZ, L. E. R. *Estudo Fitoquímico de Conchocarpus gaudichaudianus subsp. bahiensis e Almeidaa coerulea. A busca de Compostos Biologicamente Ativos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002. Tese de doutorado.
- COURA, J. R. & DE CASTRO, S. L. "A critical review on Chagas disease chemotherapy". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97**(1): 3-24, 2002.
- CRAIG III, S. P. & EAKIN, A. E. "Purine salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design". *Parasitol. Today*, **13**(6): 238-241, 1997.
- CROAN, D. G.; MORRISON, D. A. & ELLIS, J. T. "Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **89**(2): 149-159, 1997.
- CUCA S., L. E.; MARTINEZ V., J. C. & MONACHE, F. D. "Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*". *Rev. Colomb. Quim.*, **27**(1): 23-30, 1998.
- DAHLGREEN, R. M. T. "A revised system of classification of the Angiosperms". *Botan. J. Linn. Soc.*, **80**(2): 91-124, 1980.
- DA SILVA, M. F. das G. F.; GOTTLIEB, O. R. & DREYER, D. L. "Evolution of limonoids in the Meliaceae". *Biochem. Syst. Ecol.*, **12**(3): 299-310, 1984.
- DA SILVA, M. F. das G. F.; GOTTLIEB, O. R. & EHRENDORFER, F. "Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family". *Plant Syst. Evol.*, **16**(1-2): 97-134, 1988.

- DE TORANZO, E. G. D.; CASTRO, J. A.; DE CAZZULO, B. M. F. & CAZZULO, J. J. "Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*". *Experientia*, **44**(10): 880-883, 1988.
- DENISE, H.; MATTHEWS, K.; LINDERGARD, G.; CROFT, S. & BARRETT, M. P. "Trypanosomiasis and leishmaniasis: between the idea and the reality of control". *Parasitol. Today*, **15**(2): 43-45, 1999.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. England, John Wiley & Sons, 1997, p. 172-173.
- DO CAMPO, R. "Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease". *Curr. Pharm. Design*, **7**(12): 1157-1164, 2001.
- DO CAMPO, R. & MORENO, S. N. J. "Free radical metabolism of antiparasitic agents". *Faseb. J.*, **45**(10): 2471-2476, 1986.
- FIOCRUZ, site <http://www.fiocruz.br/ccs/estetica/chagas.htm>, acessado em janeiro/2004.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A. A. & MUNOZ, V. "Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants". *J. Ethnopharmacol.*, **41**(1-2): 19-37, 1994a.
- 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**(3): 174-178, 1994b.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, A. R.; ORTIZ, S. T.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. & HOCQUEMILLER, R. "In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of New World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*". *Antimicrob. Agents Ch.*, **40**(11): 2447-2451, 1996.
- FOURNET, A.; GANTIER, J. C.; GAUTHERET, A.; LEYSALLES, L.; MUNOS, M. H.; MAYRAGUE, J.; MOSKOWITZ, H.; CAVÉ, A. & HOCQUEMILLER, R. "The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*". *J. Antimicrob. Chemoth.*, **33**(3): 537-544, 1994c.
- FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; BARRIOS, A. A.; MUNOZ, V.; CAVÉ, A. & BRUNETON, J. "2-substituted quinolines alkaloids as potential antileishmanial drugs". *Antimicrob. Agents Ch.*, **37**(4): 859-863, 1993a.
- FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P. & BRUNETON, J. "Les chimanines, nouvelles quinoleines substituees en 2, isolees d'une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*". *J. Nat. Prod.*, **56**(9): 1547-1552, 1993b.

- FOURNET, A.; VAGNEUR, B.; RICHOMME, P. & BRUNETON, J. "Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*". *Can. J. Chem.*, **67**(12): 2116-2118, 1989.
- GARNIER, T. & CROFT, S. L. "Topical treatment for cutaneous leishmaniasis". *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **3**(4): 538-544, 2002.
- GANTIER, J. C.; FOURNET, A.; MUNOS, M. H.; HOCQUEMILLER, R. "The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice". *Planta Med.*, **62**(3): 285-286, 1996.
- GELB, M. H. & HOL, W. G. J. "Parasitology - Drugs to combat tropical protozoan parasites". *Science*, **297**(5580): 343-344, 2002.
- GRAY, A. I. "Structural diversity and distribution of coumarins and chromones in the Rutales". IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). Nova Iorque, Academic Press, 1983, p. 97-146.
- HOUGHTON, P. J.; WOLDERMARIAM, T. Z.; WATANABE, Y. & YATES, M. "Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloid constituents of *Angostura* bark, *Galipea officinalis*". *Planta Med.*, **65**(3): 250-254, 1999.
- IKUTA, A.; URABE, H. & NAKAMURA, T. "A new indolopyridoquinazoline-type alkaloid from *Phellodendron amurense* callus tissues". *J. Nat. Prod.*, **61**(8): 1012-1014, 1998.
- IWU, M. M.; JACKSON, J. E. & SCHUSTER, B. G. "Medicinal plants in the fight against leishmaniasis". *Parasitol. Today*, **10**(2): 65-68, 1994.
- JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHE, S.; FABRE, N.; FOURASTE, I. & MOULIS, C. "Two tetrahydroquinoline alkaloids from *Galipea officinalis*". *Phytochemistry*, **51**(8): 1167-1169, 1999.
- JANUÁRIO, A. H. *Estudo Fitoquímico de Esenbeckia grandiflora e Almeidea rubra (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de doutorado.
- JAY, M.; GLEYE, J.; BOUILLANT, M. L.; STANISLAS, E. & MORETTI, C. "Nouvelles C-arabinosyl flavones extraites de *Almeidea guyanensis* (Rutaceae)". *Phytochemistry*, **18**(1): 184-185, 1979.
- KALLUNKI, J. A. & PIRANI, J. R. "Synopsis of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae)". *Kew Bulletin*, **53**: 257-334, 1998.
- KAMINSKY, R. "Miltefosine Zentaris", *Curr. Opin. in Invest. Drugs*, **3**(4): 550-554, 2002.
- KINGSBURY, C. A. & LOOKER, J. H. "Carbon-13 spectra of methoxyflavones". *J. Org. Chem.*, **40**(8): 1120-1124, 1975.
- LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M. & BALDERRAMA, L. "4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*". *Phytochemistry*, **40**(1): 317-320, 1995.



- LI, X. C.; DUNBAR, D. C.; ELSOHLY, H. N.; WALKER, L. A. & CLARK, A. M. "Indolopyridoquinazoline alkaloid from *Leptothyrsa sprucei*". *Phytochemistry*, **58**(4): 627-629, 2001.
- LIN, C. N.; CHIU, P. H.; FANG, S. C.; SHIEH, B. J. & WU, R. R. "Revised structure of brousoflavonol G and the 2D NMR spectra of some related prenylflavonoids". *Phytochemistry*, **41**(4): 1215-1217, 1996.
- LIN, C. N. & SHIEH, W. L. "Prenylflavonoids and a pyranodihydrobenzoxanthone from *Artocarpus communis*". *Phytochemistry*, **30**(5): 1669-1671, 1991.
- LIN, C. N. & SHIEH, W. L. "Pyranoflavonoids from *Artocarpus communis*". *Phytochemistry*, **31**(8): 2922-2924, 1992.
- LÓPEZ, J. A.; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; MARTIN, G. E.; AL-REHAILY, A. J.; ZEMAITIS, M. A. & SCHIFF Jr, P. L. "Granulosin, a new chromone from *Galipea granulosa*". *J. Nat. Prod.*, **60**(1): 24-26, 1997.
- LÓPEZ, J. A.; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; MARTIN, G. E.; LIN, F. T.; AL-REHAILY, A. J.; ZEMAITIS, M. A. & SCHIFF Jr, P. L. "Galiposin: a new  $\beta$ -hydroxychalcone from *Galipea granulosa*". *Planta Med.*, **64**(1): 76-77, 1998.
- LU, C. M. & LIN, C. N. "Flavonoids and 9-hydroxytridecyl docosanoate from *Artocarpus heterophyllus*". *Phytochemistry*, **35**(3): 781-783, 1994.
- LUQUETTI, A. O. "Etiological treatment for Chagas disease". *Parasitol. Today*, **13**(4): 127-128, 1997.
- MAFEZOLI, J. *Atividade Tripanocida e Antimicrobiana de Plantas da Família Rutaceae*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de doutorado.
- MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. das G. F. & DE ALBUQUERQUE, S. "In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*". *J. Ethnopharmacol.*, **73**(1-2): 335-340, 2000.
- MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRAWAT, H.; PISUTJAROENPONG, S.; ENGPRASERT, S.; CHUMSRI, P.; TENGCHAI SRI, T.; SIRISINHA, S. & PICHA, P. "Biodiversity and natural product drug discovery". *Pure Appl. Chem.*, **70**(11): 2065-2072, 1998.
- MESTER, I. "Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rurales". IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rurales*. WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). Nova Iorque, Academic Press, 1983, p. 31-96.

- MORAES, V. R. de S.; TOMAZELA, D. M.; FERRACIN, R. J.; GARCIA, C. F.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. del P. C.; DA SILVA, M. F. das G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; PIMENTA, E. F.; DE SOUZA, D. H. F. & OLIVA, G. "Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae)". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**(3): 380-387, 2003.
- MOULIS, C; WIRASUTISNA, K. R.; GLEYE, J.; LOISEAU, P.; STANISLAS, E. & MORETTI, C. "A 2-quinolone alkaloid from *Almeidea guyanensis*". *Phytochemistry*, **22**(9): 2095-2096, 1983.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu Editora, 8<sup>a</sup> ed., 1991, p. 28-72.
- NOYES, H. A.; ARANA, B. A.; CHANCE, M. L. & MAINGON, R. "The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania* Endotrypanum clade". *J. Eukaryot. Microbiol.*, **44**(5): 511-517, 1997.
- PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. das G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C. & OLIVA, G. "Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution". *FEBS Lett.*, **520**(1-3): 13-17, 2002.
- PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. T. "A generic monograph of the Meliaceae". *Blumea*, **22**(3): 419, 1975.
- Pesquisa FAPESP*, (84): 36-40, 2003.
- Pesquisa FAPESP*, (95): 51, 2004.
- PHILLIPS, C. L.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R. G. & HILL, C. P. "Crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*". *Embo. Journal*, **18**(13): 3533-3545, 1999.
- PHILLIPSON, J. D. & WRIGHT, C. W. "Medicinal plants in tropical medicine: medicinal plants against protozoal diseases". *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.*, **85**(1): 18-21, 1991a.
- PHILLIPSON, J. D. & WRIGHT, C. W. "Antiprotozoal agents from plant sources". *Planta Med.*, **57**suppl.1: S53-S59, 1991b.
- PIZZOLATTI, M. G.; LUCIANO, C. & MONACHE, F. D. "Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*". *Phytochemistry*, **55**: 819-822, 2000.
- POLAK, A. & RICHLER, R. "Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benzimidazole". *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **72**(1): 45-54, 1978.
- RAHMAN, A. U.; BHATTI, M. K.; AKHTAR, F. & CHOUDHARY, M. I. "Alkaloids of *Fumaria indica*". *Phytochemistry*, **31**(8): 2869-2872, 1992.

- RAKOTOSON, J. H.; FABRE, N.; JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHE, S.; FOURASTÉ, I. & MOULIS, C. "Alkaloids from *Galipea officinalis*". *Planta Med.*, **64**(8): 762-763, 1998.
- RAMIREZ, L. E.; LAGES SILVA, E.; PIANETTI, G.M; RABELO, R. M. C.; BORDIN, J. O. & MORAES SOUZA, H. "Prevention of transfusion-associated Chagas disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi*-infected blood with gentian-violet, ascorbic acid, and light". *Transfusion*, **35**(3): 226-230, 1995.
- RASAKOVA, D. M.; BESSANOVA, I. A. & YUNUSOV, S. Y. "Components of *Haplophyllum obtusifolium*". *Khim. Prir. Soedin.*, **5**: 635-636, 1984.
- RODRIGUEZ, J. B. "Specific molecular targets to control tropical diseases". *Curr. Pharm. Design*, **7**(12): 1105-1116, 2001.
- RODRÍGUEZ-GAMBOA, T.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E.; DA SILVA, M. F. das G. F.; VIEIRA, P. C.; BARRIOS Ch., M.; CASTRO-CASTILHO, O.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. "Triterpene benzoates from the bark of *Picramia teapensis* (Simaroubaceae)". *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**(3): 386-390, 2001.
- RÓZSA, Zs.; RÁBIK, M.; SZENDREI, K.; KÁLMÁN, A.; ARGAY, Gy.; PELCZER, I.; AYNECHI, M.; MESTER, I. & REISCH, J. "Dihydroperfamane, an alkaloid from *Haplophyllum glabrinum*". *Phytochemistry*, **25**(8): 2005-2007, 1986.
- SALLES, L. R. V. O. *Evolução de Limonóides em Meliaceae e Estudo Fitoquímico de Khaya senegalensis (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de doutorado, 2-277 p.
- SANTOS, C. S. *Estudo dos Constituintes Químicos de Almeidea coerulea*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1998. Dissertação de mestrado.
- SANTOS, C. S.; JANUÁRIO, A. H.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. das G. F. & PIRANI, J. R. "Cycloartane triterpenoid and alkaloids from *Almeidea* spp". *J. Braz. Chem. Soc.*, **9**(1): 39-42, 1998.
- SARKER, S. D.; BARTHOLOMEW, B. & NASH, R. J. "Alkaloids from *Balanites aegyptiaca*". *Fitoterapia*, **71**(3): 328-330, 2000.
- SARTOR, C. F. P. *Estudo Fitoquímico de Dictyoloma vandellianum (Rutaceae): uma Contribuição à Quimiosistemática da Subfamília Dictylomatoideae e à Busca de Compostos Biologicamente Ativos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de doutorado, 67-68 p.
- SEPÚLVEDA-BOZA, S. & CASSELS, B. K. "Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*". *Planta Med.*, **62**(2): 98-105, 1996.
- SHAPIRO, R. H. & DJERASSI, C. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXVI. Mass spectral fragmentation of 6,7-dimethoxycoumarin". *J. Org. Chem.*, **30**(3): 955, 1965.

- SILVA, M. *Estudos de Biologia Molecular e Estrutural da Enzima Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) de Leishmania tarentolae*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – IQSC-USP, 2001. Dissertação de mestrado.
- SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V. & OLIVA, G. “*Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design”. *FEBS Lett.*, **424**(3): 131-135, 1998.
- TERNAI, B. & MARKHAM, K. R. “Carbon-13 NMR studies of flavonoids. I. Flavones and flavonols”. *Tetrahedron*, **32**(5): 565-569, 1976.
- TOMAZELA, D. M. *Estudo Fitoquímico de Neoraputia magnifica e Neoraputia paraensis e suas Substâncias Ativas frente a Enzima Gliceradeído-3-Fosfato-Desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001. Dissertação de mestrado, 56-58 p.
- TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; DA SILVA, M. F. das G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E.; OLIVA, G. & PIRANI, J. R. “Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities”. *Phytochemistry*, **55**(6): 643-651, 2000.
- TUTTLE, J. V. & KRENITSKY, T. A. “Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*”. *J. Biol. Chem.*, **255**(3): 909-916, 1980.
- UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E. A.; KIM, D. J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G. & EIBL, H. “Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*”. *Acta Oncol.*, **28**(2): 213-217, 1989.
- VELOSO, E. S. *Fitoquímica Comparada dos Gêneros Angostura, Almeidea e Rauia (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de doutorado.
- VERONESI, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 8<sup>a</sup> ed., 1991, p. 674-705 e 706-717.
- VIEIRA, P. C. & KUBO, I. “Molluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*”. *Phytochemistry*, **29**(3): 813-815, 1990.
- VIEIRA, P. C.; KUBO, I.; KUJIME, H.; YAMAGIWA, Y. & KAMIKAWA, T. “Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures, and synthesis”. *J. Nat. Prod.*, **55**(8): 1112-1117, 1992.
- VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. das G. F.; DE ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G. & PAVÃO, F. “Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales”. *Pure Appl. Chem.*, **73**(3): 617-622, 2001.

- WATERMAN, P. G. "Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance". *Biochem. Syst. Ecol.*, **3**(3): 149-180, 1975.
- WATERMAN, P. G. "Phytochemical diversity in the ordem Rutales". IN: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. DOWNUM, K. R.; ROMEO, J. T. & STAFFORD, H. (Eds.). Nova Iorque, Plenum Press, 1993, p. 203-233.
- WATERMAN, P. G. "The chemical systematic of alkaloids: a review emphasising the contribution of Robert Hegnauer". *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**(4): 395-406, 1999.
- WIRASUTISNA, K. R.; GLEYE, J.; MOULIS, C; STANISLAS, E. & MORETTI, C. "Flavone C-glycosides of *Almeidea guyanensis*". *Phytochemistry*, **25**(2): 558-559, 1986.
- WIRASUTISNA, K. R.; GLEYE, J.; MOULIS, C.; STANISLAS, E. & MORETTI, C. "Galipein, a coumarin from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **26**(12): 3372, 1987.
- WU, T. S.; LI, C. Y.; LEU, Y. L. & HU, C. Q. "Limonoids and alkaloids of the root bark of *Dictamnus angustifolius*". *Phytochemistry*, **50**(3): 509-512, 1999.