

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

ALCALÓIDES DE RUTACEAE: QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

MÁRCIO ROBERTO DE ANDRADE

**Tese apresentada ao programa de
pós-graduação em química como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS (área de
concentração QUÍMICA ORGÂNICA)**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

SÃO CARLOS – SP

2003

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

A553ar

Andrade, Márcio Roberto de.

Alcalóides de Rutaceae: química e atividade biológica /
Márcio Roberto de Andrade . -- São Carlos : UFSCar, 2003.
200 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2003.

1. Química orgânica. 2. Rutaceae. 3. Alcalóides. 4.
Galipea bracteata. 5. *Ravenia infelix*. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

Agradeço a Deus e aos meus pais Manoel e Wanilda, pela oportunidade de vida.

DEDICO ESTE TRABALHO

À Ruth, sinônimo de afeição profunda, companheirismo, dedicação, compreensão, renúncia, incitação sempre disponíveis em todos os momentos.

Aos meus lindos filhos, Luciana e André, que vieram alegrar mais as nossas vidas, sempre nos mostrando que é preciso continuar a caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela oportunidade, orientação, amizade e compreensão para realização deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Química pelos exemplos de vida, convívio, amizade e colaboração.

A todos os companheiros do Laboratório de Produtos Naturais, o meu agradecimento especial pela oportunidade de conquistar o convívio com amizade, carinho, simpatia, troca de conhecimento e respeito.

Aos técnicos do Departamento de Química que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos amigos Emerson, Eduardo, Conceição, Jair, Paulo e Valéria.

Ao Prof. Dr. Eduardo Fausto de Almeida Neves, um agradecimento especial, pela compreensão, amizade, incentivo e orientação rodoviária.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque pelos ensaios tripanocidas realizados na USP/Ribeirão Preto.

Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva pelos ensaios enzimáticos realizados na USP/São Carlos.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acet.	Acetona
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE-R	Cromatografia líquida de alta eficiência reciclante
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
COSY	Correlation spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
ddd	Duplo-duplo-dubleto
dl	Dubleto largo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
Gb	<i>Galipea bracteata</i>
GbFE	Extrato em éter de petróleo das folhas de <i>Galipea bracteata</i>
GbFD	Extrato em diclorometano das folhas de <i>Galipea bracteata</i>
GbFM	Extrato em metanol das folhas de <i>Galipea bracteata</i>
Hex.	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IE	Impacto eletrônico
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
m	Multiplete
m/z	Relação massa/carga
OMe	Metoxila
p.	Página

ppm	Partes por milhão
Ri	<i>Ravenia infelix</i>
RiGM	Extrato metanólico dos galhos de <i>Ravenia infelix</i>
RiGDM	Extrato diclorometânico da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de <i>Ravenia infelix</i>
RiGAM	Extrato em acetato de etila da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de <i>Ravenia infelix</i>
RiGHM	Extrato hexânico da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de <i>Ravenia infelix</i>
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
δ	Deslocamento químico, em partes por milhão

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Posição taxonômica da subtribo Cuspariinae e seus gêneros, segundo Engler.	6
FIGURA 1.2 – Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Ravenia</i>	17
FIGURA 1.3 – Estrutura química da violeta de genciana.	18
FIGURA 1.4 – Estruturas químicas do benznidazol e nifurtimox.	20
FIGURA 1.5 - Estruturas químicas da glucantima, pentostam e miltefosina.	23
FIGURA 3.1 – Estrutura química do alcalóide Gb-9-1.	51
FIGURA 3.2 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-9-1 (200 MHz, CDCl ₃).	53
FIGURA 3.3 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide Gb-9-1 (50 MHz, CDCl ₃).	53
FIGURA 3.4 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-9-1 (50 MHz, CDCl ₃).	54
FIGURA 3.5 – Espectro de massas do alcalóide Gb-9-1 (IE – 70 eV).	54
FIGURA 3.6 – Estrutura química do Alcalóide Gb-6-2.	57
FIGURA 3.7 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-6-2 (400 MHz, CDCl ₃).	58
FIGURA 3.8 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide Gb-6-2 (100 MHz, CDCl ₃).	58
FIGURA 3.9 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-6-2 (50 MHz, CDCl ₃).	59
FIGURA 3.10 – Espectro de massas do alcalóide Gb-6-2 (IE – 70 eV).	59
FIGURA 3.11 – Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do alcalóide Gb-6-2 (400 MHz, CDCl ₃).	60
FIGURA 3.12 – Ampliação do mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do alcalóide Gb-6-2 (400 MHz, CDCl ₃) – região aromática.	61
FIGURA 3.13 – Ampliação do mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do alcalóide Gb-6-2 (400 MHz, CDCl ₃) – cadeia lateral.	62
FIGURA 3.14 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide Gb-6-2 (400 MHz, CDCl ₃). ...	63
FIGURA 3.15 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide Gb-6-2 (400 MHz, CDCl ₃). ...	64
FIGURA 3.16 - Estrutura química do alcalóide Gb-9-3.	67
FIGURA 3.17 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-9-3 (200 MHz, CDCl ₃).	68
FIGURA 3.18 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide Gb-9-3 (50 MHz, CDCl ₃).	68
FIGURA 3.19 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-9-3 (50 MHz, CDCl ₃).	69
FIGURA 3.20 – Espectro de massas do alcalóide Gb-9-3 (IE – 70 eV).	69
FIGURA 3.21 – Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do alcalóide Gb-9-3 (400 MHz, CDCl ₃).	70
FIGURA 3.22 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide Gb-9-3 (400 MHz, CDCl ₃). ...	71

FIGURA 3.23 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide Gb-9-3 (400 MHz, CDCl ₃)...	72
FIGURA 3.24 – Estruturas químicas dos alcalóides Gb-9-4 e Gb-9-5.	74
FIGURA 3.25 – Espectro de RMN ¹ H da mistura dos alcalóides Gb-9-4 e Gb-9-5 (200 MHz, CDCl ₃).....	75
FIGURA 3.26 – Cromatograma da mistura dos alcalóides Gb-9-4 e Gb-9-5.	75
FIGURA 3.27 – Espectro de massas do alcalóide Gb-9-4 (IE – 70 eV).	76
FIGURA 3.28 – Espectro de massas do alcalóide Gb-9-5 (IE – 70 eV).	76
FIGURA 3.29 – Cromatograma da mistura dos esteróides campesterol Gb-9-6, estigmasterol Gb-9-7 e β-sitosterol Gb-9-8.	78
FIGURA 3.30 – Estruturas químicas do campesterol Gb-9-6, estigmasterol Gb-9-7 e β-sitosterol Gb-9-8.	79
FIGURA 3.31 – Espectro de RMN ¹ H da mistura dos esteróides campesterol Gb-9-6, estigmasterol Gb-9-7 e β-sitosterol Gb-9-8 (200 MHz, CDCl ₃ , TMS).	79
FIGURA 3.32 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura dos esteróides campesterol Gb-9-6, estigmasterol Gb-9-7 e β-sitosterol Gb-9-8 (50 MHz, CDCl ₃).....	80
FIGURA 3.33 – Espectro de massas do campesterol Gb-9-6 (IE – 70 eV).....	80
FIGURA 3.34 – Espectro de massas do estigmasterol Gb-9-7 (IE – 70 eV).	81
FIGURA 3.35 – Espectro de massas do β-sitosterol Gb-9-8 (IE – 70 eV).....	81
FIGURA 3.36 – Estrutura química do alcalóide Gb-8-9.....	84
FIGURA 3.37 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-8-9 (400 MHz, CDCl ₃).	85
FIGURA 3.38 – Espectro de RMN ¹³ C do Alcalóide Gb-8-9 (50 MHz, CDCl ₃).	85
FIGURA 3.39 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-8-9 (50 MHz, CDCl ₃).	86
FIGURA 3.40 – Espectro de massas do alcalóide Gb-8-9.	86
FIGURA 3.41 – Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do alcalóide Gb-8-9 (400 MHz, CDCl ₃).	87
FIGURA 3.42 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide Gb-8-9 (400 MHz, CDCl ₃). ...	88
FIGURA 3.43 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do alcalóide Gb-8-9 (400 MHz, CDCl ₃) – região aromática.	89
FIGURA 3.44 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide Gb-8-9 (400 MHz, CDCl ₃)...	90
FIGURA 3.45 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do alcalóide Gb-8-9 (400 MHz, CDCl ₃) – região aromática.	91
FIGURA 3.46 - Estrutura química do triterpeno arborinol Gb-8-10.....	94
FIGURA 3.47 - Espectro de RMN ¹ H do arborinol Gb-8-10 (400 MHz, CDCl ₃ , TMS).	94
FIGURA 3.48 – Espectro de RMN ¹³ C do arborinol Gb-8-10 (50 MHz, CDCl ₃).	95

FIGURA 3.49 - Espectro DEPT 135° do arborinol Gb-8-10 (50 MHz, CDCl ₃).	95
FIGURA 3.50 – Espectro de massas do arborinol Gb-8-10 (IE – 70 eV).	96
FIGURA 3.51 - Estrutura química do alcalóide Gb-10-11.	99
FIGURA 3.52 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-10-11 (400 MHz, CDCl ₃). ...	100
FIGURA 3.53 – Espectro de RMN ¹³ C da substância Gb-10-11 (50 MHz, CDCl ₃)..	101
FIGURA 3.54 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-10-11 (50 MHz, CDCl ₃).	102
FIGURA 3.55 – Espectro de massas do alcalóide Gb-10-11 (IE – 70 eV).	103
FIGURA 3.56 – Estruturas químicas dos alcalóides Gb-10-11 e Gb-10-12.	106
FIGURA 3.57 – Cromatograma dos alcalóides Gb-10-11 e Gb-10-12.	107
FIGURA 3.58 – Espectro de massas do alcalóide (Gb-10-11) (IE – 70 eV).	108
FIGURA 3.59 - Espectro de massas do alcalóide (Gb-10-12) (IE – 70 eV).	108
FIGURA 3.60 – Espectro de RMN ¹ H da mistura dos alcalóides Gb-10-11 e Gb-10-12 (200 MHz, CDCl ₃).	109
FIGURA 3.61 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da mistura dos alcalóides Gb-10-11 e Gb-10-12 (200 MHz, CDCl ₃).	109
FIGURA 3.62 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura dos alcalóides Gb-10-11 e Gb-10-12 (100 MHz, CDCl ₃).	110
FIGURA 3.63 – Expansão do espectro de RMN ¹³ C da mistura dos alcalóides Gb-10-11 e Gb-10-12 (100 MHz, CDCl ₃).	110
FIGURA 3.64 – Estrutura química do alcalóide Gb-10-13.	113
FIGURA 3.65 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-10-13 (200 MHz, CDCl ₃). ...	114
FIGURA 3.66 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide Gb-10-13 (50 MHz, CDCl ₃).	114
FIGURA 3.67 – Espectro DEPT 135 do alcalóide Gb-10-13 (50 MHz, CDCl ₃).	115
FIGURA 3.68– Espectro de massas do alcalóide Gb-10-13 (IE – 70 eV).	115
FIGURA 3.69 – Estrutura química do alcalóide Gb-15-14.	118
FIGURA 3.70 – Espectro de RMN ¹ H do alcalóide Gb-15-14 (200 MHz, CDCl ₃). ...	118
FIGURA 3.71 – Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide Gb-15-14 (125 MHz, CDCl ₃)...	119
FIGURA 3.72 – Espectro de massas do alcalóide Gb-15-14 (IE – 70 eV).	119
FIGURA 3.73 – Estrutura química da substância Gb-18-15 evolitrina.	121
FIGURA 3.74 – Espectro de massas da evolitrina Gb-18-15 (IE – 70 eV).	122
FIGURA 3.75 – Espectro de RMN ¹ H da evolitrina Gb-18-15 (200 MHz, CDCl ₃). ...	122
FIGURA 3.76 - Estruturas químicas dos alcalóides Gb-19-16 e Gb-19-17.	125
FIGURA 3.77 - Espectro de massas dos alcalóides Gb-19-16 e Gb-19-17 (IE – 70 eV).	125

FIGURA 3.78 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos alcalóides Gb-19-16 e Gb-19-17.....	126
FIGURA 3.79 – Estrutura química do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastima-6,7-dien-9-ona Gb-20-18.....	129
FIGURA 3.80 – Espectro de massas do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dien-9-ona Gb-20-18 (IE – 70 eV).....	130
FIGURA 3.81 – Espectro de RMN ^1H do norsesquiterpeno Gb-20-18 (400 MHz, CDCl_3 , TMS).	130
FIGURA 3.82 – Espectro de RMN ^{13}C do norsesquiterpeno Gb-20-18 (100 MHz, CDCl_3).....	131
FIGURA 3.83 – Estruturas químicas dos alcalóides Gb-5/6-19, Gb-6-2 e Gb-5/6-21.	133
FIGURA 3.84 – Espectro de massas do alcalóide Gb-5/6-19 (IE – 70 eV).	134
FIGURA 3.85 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide Gb-5/6-19 (200 MHz, CDCl_3). ...	135
FIGURA 3.86 – Expansão do espectro de RMN ^1H do alcalóide Gb-5/6-19 (200 MHz, CDCl_3).....	135
FIGURA 3.87 – Estrutura química do alcalóide Gb-5/6-20.....	138
FIGURA 3.88 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide Gb-5/6-20 (400 MHz, CDCl_3). ...	139
FIGURA 3.89 – Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide Gb-5/6-20 (400 MHz, CDCl_3).....	139
FIGURA 3.90 – Expansão do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide Gb-5/6-20 (400 MHz, CDCl_3) – região aromática.	140
FIGURA 3.91 – Expansão do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide Gb-5/6-20 (400 MHz, CDCl_3) – cadeia lateral.	141
FIGURA 3.92 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide Gb-5/6-20 (50 MHz, CDCl_3)....	142
FIGURA 3.93 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-5/6-20 (50 MHz, CDCl_3).	142
FIGURA 3.94 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide Gb-5/6-20 (400 MHz, CDCl_3).	143
FIGURA 3.95 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide Gb-5/6-20 (400 MHz, CDCl_3).	144
FIGURA 3.96 – Espectro de massas do alcalóide Gb-5/6-20 (IE – 70eV).	145
FIGURA 3.97 – Estrutura química do alcalóide Gb-5/6-21.....	148
FIGURA 3.98 – Espectro de massas do alcalóide Gb-5/6-21 (IE – 70 eV).	149
FIGURA 3.99 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide Gb-5/6-21 (400 MHz, CDCl_3). ...	149

FIGURA 3.100 – Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide Gb-5/6-21 (400 MHz, CDCl_3).	150
FIGURA 3.101 – Expansão do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide Gb-5/6-21 (400 MHz, CDCl_3) – região de aromático.	151
FIGURA 3.102 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide Gb-5/6-21 (50 MHz, CDCl_3).	152
FIGURA 3.103 – Espectro DEPT 135° do alcalóide Gb-5/6-21 (50 MHz, CDCl_3).	152
FIGURA 3.104 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide Gb-5/6-21 (400 MHz, CDCl_3).	153
FIGURA 3.105 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide Gb-5/6-21 (400 MHz, CDCl_3).	154
FIGURA 3.106 - Estrutura química do 3-metil-carbazol Ri-22.	158
FIGURA 3.107 - Espectro de RMN ^1H do 3-metil-carbazol Ri-22 (400 MHz, CDCl_3).	159
FIGURA 3.108 - Ampliação da região aromática do espectro de RMN ^1H do 3-metil-carbazol Ri-22 (400 MHz, CDCl_3 , TMS).	159
FIGURA 3.109 – Espectro de RMN ^{13}C do 3-metil-carbazol Ri-22 (50 MHz, CDCl_3).	160
FIGURA 3.110 - Espectro de massas do 3-metil-carbazol Ri-22 (IE – 70 eV).	160
FIGURA 3.111 – Estrutura química da girinimbina 23.	162
FIGURA 3.112 – Espectro de RMN ^1H da girinimbina Ri-23 (400 MHz, CDCl_3 , TMS).	163
FIGURA 3.113 – Ampliação da região aromática do espectro de RMN ^1H da girinimbina Ri-23 (400 MHz, CDCl_3 , TMS).	163
FIGURA 3.114 - Estruturas químicas do 7-oxo-estigmasterol Ri-24 e 7-oxo- β -sitosterol Ri-25.	166
FIGURA 3.115 - Cromatograma da mistura de 7-oxo-estigmasterol Ri-24 e 7-oxo- β -sitosterol Ri-25.	166
FIGURA 3.116 - Espectro de RMN ^1H da mistura de 7-oxo-estigmasterol Ri-24 e 7-oxo- β -sitosterol Ri-25 (400 MHz, CDCl_3 , TMS).	167
FIGURA 3.117 - Espectro de RMN ^{13}C da mistura de 7-oxo-estigmasterol Ri-24 e 7-oxo- β -sitosterol Ri-25 (50 MHz, CDCl_3).	168
FIGURA 3.118 - Espectro DEPT 135° da mistura de 7-oxo-estigmasterol Ri-24 e 7-oxo- β -sitosterol Ri-25 (50 MHz, CDCl_3).	168
FIGURA 3.119 - Espectro de massas do 7-oxo-estigmasterol Ri-24 (IE – 70 eV).	169

FIGURA 3.120 - Espectro de massas do 7-oxo- β -sitosterol Ri-25 (IE – 70 eV).	169
FIGURA 3.121 - Estrutura química da substância 26.....	171
FIGURA 3.122 – Espectro de massas da substância Ri-26 (IE – 70 eV).....	172
FIGURA 3.123 – Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da substância Ri-26. ...	173
FIGURA 3.124 – Estruturas químicas das amidas N- <i>trans</i> -feruloiltiramina Ri-27 e N- <i>cis</i> -feruloiltiramina Ri-28.....	177
FIGURA 3.125 – Espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias Ri-27 e Ri-28 (400 MHz, CD_3OD).....	177
FIGURA 3.126 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura das substâncias Ri-27 e Ri-28 (100 MHz, CD_3OD).....	178
FIGURA 3.127 – Estruturas químicas das amidas N- <i>trans</i> -p-cumaroiltiramina Ri-29 e N- <i>cis</i> -p-cumaroiltiramina Ri-30.....	182
FIGURA 3.128 – Espectro de RMN ^1H da mistura das amidas Ri-29 e Ri-30 (400 MHz, CD_3OD).....	182
FIGURA 3.129 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura das amidas Ri-29 e Ri-30 (100 MHz, CD_3OD).....	183
FIGURA 3.130 – Espectro de DEPT 135° da mistura das amidas Ri-29 e Ri-30 (50 MHz, CD_3OD).....	183

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Metabólitos secundários de Rutaceae com atividade farmacológica...	7
TABELA 1.2 – Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Galipea</i>	9
TABELA 2.3.1.1 – Extratos obtidos por maceração das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	30
TABELA 3.1 – Metabólitos secundários isolados de <i>Galipea bracteata</i>	47
TABELA 3.2 - Comparação dos dados de RMN ¹ H (δ) de Gb-9-1 com a literatura...	51
TABELA 3.3 - Comparação dos dados de RMN ¹³ C (δ) de Gb-9-1 com a literatura.	52
TABELA 3.4 – Dados espectrais de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz), RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e DEPT 135° (CDCl ₃ , 50 MHz) da substância Gb-6-2.	56
TABELA 3.5 – Correlações de ¹ H e ¹³ C para a substância Gb-6-2.	57
TABELA 3.6 – Dados espectrais de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50,3 MHz) e DEPT 135° (CDCl ₃ , 50,3 MHz) da substância Gb-9-3.	66
TABELA 3.7 – Correlações de ¹ H e ¹³ C para a substância Gb-9-3.	67
TABELA 3.8 - Comparação dos dados de RMN ¹ H (δ) de Gb-9-4 com a literatura...	74
TABELA 3.9 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) dos esteróides campesterol Gb-9-6, estigmasterol Gb-9-7 e β-sitosterol Gb-9-8.	78
TABELA 3.10 – Dados espectrais de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz), RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50,3 MHz) e DEPT 135° (CDCl ₃ , 50,3 MHz) da substância Gb-8-9.	83
TABELA 3.11 – Correlações de ¹ H e ¹³ C para a substância Gb-8-9.	84
TABELA 3.12 - Comparação dos dados de RMN ¹³ C (δ) para o triterpeno arborinol Gb-8-10 isolado e o seu éter metílico, arundoin, da literatura (BLUNT & MUNRO, 1980).	93
TABELA 3.13 - Comparação dos dados de RMN ¹³ C (δ) e DEPT 135° da substância Gb-10-11 com a literatura.	98
TABELA 3.14 - Comparação dos dados de RMN ¹ H (δ) do alcalóide Gb-10-11 com a literatura.	99
TABELA 3.15 - Comparação dos dados de RMN ¹ H (δ) dos alcalóides Gb-10-12, o Gb-9-3 e a literatura 2-(1', 2'- <i>trans</i> -epoxipropil)quinolina.	105
TABELA 3.16 - Comparação dos dados de RMN ¹³ C (δ) dos alcalóides Gb-10-12, o Gb-9-3 e a literatura 2-(1', 2'- <i>trans</i> -epoxipropil)quinolina.	106
TABELA 3.17 – Dados de RMN ¹³ C (δ) e DEPT 135° do alcalóide Gb-10-13.....	112

TABELA 3.18 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) do alcalóide Gb-10-13 com a literatura.	113
TABELA 3.19 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) do alcalóide 2-quinolínico 2- <i>n</i> -pentilquinolina (Gb-15-14) isolado com a literatura.....	117
TABELA 3.20 - Comparação dos dados de RMN ^1H do alcalóide evolitrina Gb-18-15 isolado com a literatura.	121
TABELA 3.21 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) dos alcalóides Z-dimetilrhoifolinato (Gb-19-16) e o E-dimetilrhoifolinato (Gb-19-17) isolados com a literatura.	124
TABELA 3.22 - Comparação dos dados de RMN ^1H do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dien-9-ona Gb-20-18 isolado com a literatura.	128
TABELA 3.23 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dien-9-ona Gb-20-18 isolado com a literatura.	129
TABELA 3.24 - Dados de RMN ^1H (δ) dos alcalóides 2-quinolínicos 2-(propan-1'-ona)quinolina isolado (Gb-5/6-19), o 2-(pentan-1'-ona)quinolina (Gb-5/6-21) isolado e o 4-metoxi-2-(propan-1'-ona)quinolina (Gb-6-2) isolado.	133
TABELA 3.25 – Dados espectrais de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e DEPT 135° (CDCl_3 , 50 MHz) da substância Gb-5/6-20.	137
TABELA 3.26 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância Gb-5/6-20.	138
TABELA 3.27 – Dados espectrais de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e DEPT 135° (CDCl_3 , 50 MHz) da substância Gb-5/6-21.	147
TABELA 3.28 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância Gb-5/6-21.	148
TABELA 3.29 – Metabólitos secundários isolados de <i>Ravenia infelix</i>	155
TABELA 3.30 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) para o 3-metil-carbazol Ri-22 isolado com a literatura.	158
TABELA 3.31 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) do alcalóide pirano carbazol girinimbina Ri-23 isolado com a literatura.	162
TABELA 3.32 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (δ) para os 7-oxo-estigmasterol Ri-24 e 7-oxo- β -sitosterol Ri-25 isolados com a literatura.	165
TABELA 3.33 – Dados de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD , TMS, ppm) e RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD , ppm) da substância Ri-26.	171
TABELA 3.34 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina Ri-27 isolada com a literatura.	175

TABELA 3.35 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida N- <i>cis</i> -feruloiltiramina Ri-28 isolada e com a literatura.	176
TABELA 3.36 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida N- <i>trans</i> -p-cumaroiltiramina Ri-29 isolada com a literatura.	180
TABELA 3.37 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida N- <i>cis</i> -p-cumaroiltiramina Ri-30 isolada com a literatura.	181
TABELA 3.38 – Resultados dos ensaios biológicos “ <i>in vitro</i> ” dos extratos brutos de <i>Galipea bracteata</i> e <i>Ravenia infelix</i> sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> ..	184
TABELA 3.39 – Atividade tripanocida das substâncias isoladas de <i>Galipea bracteata</i> e <i>Ravenia infelix</i> sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	185
TABELA 3.40 – Atividade tripanocida das substâncias isoladas de <i>G. bracteata</i> e <i>R. infelix</i> na inibição da atividade da enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i>	187
TABELA 3.41 – Atividade leishmanicida das substâncias isoladas de <i>G. bracteata</i> e <i>R. infelix</i> na inibição da atividade da enzima APRT de <i>L. tarantolae</i>	188

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 2.3.1.1 - Obtenção dos extratos brutos das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	31
ESQUEMA 2.3.1.2 - Fracionamento cromatográfico do extrato em éter de petróleo das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	32
ESQUEMA 2.3.1.3 - Isolamento das substâncias das frações GbFE-6, GbFE-7, GbFE-8, GbFE-9 e GbFE-10 do extrato em éter de petróleo das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	33
ESQUEMA 2.3.1.4 - Fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	34
ESQUEMA 2.3.1.5 – Isolamento das substâncias das frações GbFD-15, GbFD-18, GbFE-19 e GbFE-20 do extrato em diclorometano das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	35
ESQUEMA 2.3.1.6 – Isolamento das substâncias Gb-5/6-19, Gb-5/6-20 e Gb-5/6-21 da reunião das frações GbFD-6 e GbFE-5 dos extratos em diclorometano e éter de petróleo das folhas de <i>Galipea bracteata</i>	36
ESQUEMA 2.3.1.7 – Obtenção do extrato metanólico bruto dos galhos de <i>Ravenia infelix</i>	37
ESQUEMA 2.3.1.8 – Partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto dos galhos de <i>Ravenia infelix</i>	38
ESQUEMA 2.3.1.9 – Fracionamento do extrato RiGDM dos Galhos de <i>Ravenia infelix</i>	40

RESUMO

ALCALÓIDES DE RUTACEAE: QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA – O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de duas espécies de plantas pertencentes à família Rutaceae, no intuito de elucidar estruturas de micromoléculas presentes nas folhas e galhos. O estudo de *Galipea bracteata* e *Ravenia infelix* (Rutaceae) está também associado à busca de metabólitos com atividades tripanocida e leishmanicida, através dos seguintes modelos experimentais selecionados para verificação da atividade biológica: atividade antiparasitária – forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* “*in vitro*”, inibição enzimática “*in vitro*” (gGAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase de *T. cruzi*) e inibição enzimática “*in vitro*” (APRT – Adenina-fosforribosil-transferase de *Leishmania tarantolae*). Dos extratos das folhas de *Galipea bracteata* foram isolados treze alcalóides quinolínicos, dentre estas substâncias sete estão sendo descritas pela primeira vez: 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)quinolina, 4-metoxi-2-(propan-1'-ona)quinolina (inérita), 4-metoxi-2-(1',2'-trans-epoxipentil)quinolina (inérita), 4-metoxi-2-n-pentilquinolina, 4-metoxi-2-n-heptilquinolina, 2-(1',2'-trans-epoxipentil)quinolina (inérita), 4-metoxi-2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)quinolina, 4-metoxi-2-(1',2'-trans-epoxipropil)quinolina (inérita), 4-metoxi-2-n-propilquinolina, 2-n-pentilquinolina, 2-(propan-1'-ona)quinolina (inérita), 4-metoxi-2-(pentan-1'-ona)quinolina (inérita), 2-(pentan-1'-ona)quinolina (inérita), mistura dos esteróides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, um alcalóide furoquinolínico evolitrina, uma mistura de alcalóides secofuroquinolínicos *E* e *Z*-rhoifolinato de dimetila, o triterpeno pentacíclico arborinol e o norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dieno-9-ona. Dos galhos de *R. infelix* foram isolados os alcalóides carbazóis: 3-metilcarbazol e girinimbina, os esteróides: 7-oxo-estigmasterol e 7-oxo- β -sitosterol, o indol: indol-3-carboxaldeído e misturas das amidas *N-trans* e *N-cis*-feruloiltiramina e *N-trans-p* e *N-cis-p*-cumaroiltiramina. Estas substâncias puras foram submetidas a testes para verificação das atividades tripanocida e leishmanicida.

ABSTRACT

ALKALOIDS OF RUTACEAE: CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITY – This work describes the phytochemical study of two plant species *Galipea bracteata* and *Ravenia infelix* belonging to the family Rutaceae, aiming the isolation and structure determination of compounds from leaves and branches of these plants. This work is also directed to the search of trypanocidal and leishmanicidal compounds from these plants. The following models were used to check the biological activities of the isolated compounds: antiparasitic activity - trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* “in vitro”, enzymatic inhibitory activity on gGAPDH (Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase) of *T. cruzi* and enzymatic inhibitory activity on APRT (Adhenine-phosphoribosyl-transferase) of *Leishmania tarentolae*. The leaves extract of *G. bracteata* afforded thirteen quinoline alkaloids. Among these compounds seven have been described for the first time: 2-(3',4'-methylenedioxyphenylethyl)quinoline, 4-methoxy-2-(propan-1'-ona)quinoline (inedit), 4-methoxy-2-(1',2'-*trans*-epoxypentyl)quinoline (inedit), 4-methoxy-2-*n*-heptylquinoline, 2-(1',2'-*trans*-epoxypentyl)quinoline (inedit), 4-methoxy-2-(3',4'-methylenedioxyphenylethyl)quinoline, 4-methoxy-2-(1',2'-*trans*-epoxypropyl)quinoline (inedit), 4-methoxy-2-*n*-propylquinoline, 2-*n*-pentylquinoline, 2-(propan-1'-one)quinoline (inedit), 4-methoxy-2-(pentan-1'-one)quinoline (inedit), 2-(pentan-1'-one)quinoline (inedit), a mixture of steroids campesterol, stigmasterol and sitosterol, one furoquinoline alkaloid evolitrine, a mixture of seco-furoquinoline alkaloids E-dimethylrhoifolate and Z-dimethylrhoifolate, a pentacyclic triterpene arborinol and norsesquiterpene 3,5-dihydromegastigma-6,7-diene-9-one. From the branches of *R. infelix* were isolated the carbazole alkaloids: 3-methylcarbazole and girinimbin, the steroids: 7-oxo-stigmasterol and 7-oxo-sitosterol, the indol 3-carboxaldehyde and mixtures of amides: *N-trans* and *N-cis*-feruloyltyramine, and *N-trans* and *cis-p*-cumaroyltyramine. The pure compounds had their trypanocidal and leishmanicidal activities determined.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ESQUEMAS.....	XIX
RESUMO.....	XX
ABSTRACT.....	XXI
SUMÁRIO.....	XXII
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. A FAMÍLIA RUTACEAE – BOTÂNICA E QUIMIOSSISTEMÁTICA.....	5
1.2. O GÊNERO <i>GALIPEA</i> (RUTACEAE) – PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	7
1.2.1. <i>Atividade Biológica de Galipea (Rutaceae)</i>	8
1.2.2. <i>Perfil Químico de Galipea (Rutaceae)</i>	9
1.3. O GÊNERO <i>RAVENIA</i> (RUTACEAE).....	16
1.4. DOENÇA DE CHAGAS.....	17
1.5. LEISHMANIOSE.....	21
1.6. OBJETIVOS.....	24
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
2.1. EQUIPAMENTOS.....	27
2.1.1. <i>Evaporadores Rotativos</i>	27
2.1.2. <i>Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear</i>	27
2.1.3. <i>Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência</i>	27
2.1.3.1. <i>Bomba</i>	27
2.1.3.2. <i>Detectores</i>	27
2.1.3.3. <i>Comunicação Detector/Computador</i>	27
2.1.3.4. <i>Coluna Cromatográfica</i>	27
2.1.4. <i>Cromatógrafo em Fase Gasosa</i>	28
2.2. MATERIAIS.....	28
2.2.1. <i>Cromatografia em Camada Delgada Analítica</i>	28
2.2.1.1. <i>Fases Estacionárias</i>	28
2.2.1.2. <i>Agentes Reveladores</i>	28
2.2.2. <i>Cromatografia em Camada Delgada Preparativa</i>	28
2.2.3. <i>Cromatografia em Coluna</i>	28
2.2.3.1. <i>Fases Estacionárias</i>	28
2.2.3.2. <i>Colunas</i>	29
2.2.4. <i>Solventes</i>	29
2.2.4.1. <i>Solventes para Cromatografia</i>	29
2.2.4.2. <i>Solventes para Análises Espectroscópicas</i>	29
2.2.5. <i>Material Botânico</i>	29
2.2.5.1. <i>Folhas de Galipea bracteata</i>	29
2.2.5.2. <i>Galhos de Ravenia infelix</i>	29
2.3. METODOLOGIAS.....	30
2.3.1. <i>Preparação de Extratos Brutos</i>	30

2.3.1.1. <i>Galipea bracteata</i>	30
2.3.1.1.1. Fracionamento Cromatográfico do Extrato GbFE.....	32
2.3.1.1.1.1. Fracionamento Cromatográfico de Frações GbFE.....	33
2.3.1.1.2. Fracionamento Cromatográfico do Extrato GbFD.....	34
2.3.1.1.2.1. Fracionamento Cromatográfico de Frações GbFD.....	35
2.3.1.1.2.2 - Fracionamento Cromatográfico da Reunião das Frações GbFE-5 e GbFD-6.....	36
2.3.1.2. <i>Ravenia infelix</i>	37
2.3.1.2.1. Particionamento do Extrato RiGM de <i>Ravenia infelix</i>	38
2.3.1.2.2. Fracionamento do Extrato RiGDM de <i>Ravenia infelix</i>	39
2.4. ENSAIO TRIPANOCIDA “ <i>IN VITRO</i> ” SOBRE A FORMA TRIPOMASTIGOTA DE <i>T. CRUZI</i>	41
2.5. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE <i>T. CRUZI</i> (TCGAPDH).....	42
2.6. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ADENINA FOSFORRIBOSIL TRANSFERASE (APRT) DE <i>LEISHMANIA TARENTOLAE</i>	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. CONSTITUENTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>GALIPEA BRACTEATA</i>	47
3.1.1. Identificação da Substância Gb-9-1.....	50
3.1.2. Identificação da Substância Gb-6-2.....	55
3.1.3. Identificação da Substância Gb-9-3.....	65
3.1.4. Identificação das Substâncias Gb-9-4 e Gb-9-5.....	73
3.1.5. Identificação das Substâncias Gb-9-6, Gb-9-7 e Gb-9-8.....	77
3.1.6. Identificação da Substância Gb-8-9.....	82
3.1.7. Identificação da Substância Gb-8-10.....	92
3.1.8. Identificação da Substância Gb-10-11.....	97
3.1.9. Identificação da Substância Gb-10-12.....	104
3.1.10. Identificação da Substância Gb-10-13.....	111
3.1.11. Identificação da Substância Gb-15-14.....	116
3.1.12. Identificação da Substância Gb-18-15.....	120
3.1.13. Identificação das Substâncias Gb-19-16 e Gb-19-17.....	123
3.1.14. Identificação da Substância Gb-20-18.....	127
3.1.15. Identificação da Substância Gb-5/6-19.....	132
3.1.16. Identificação da Substância Gb-5/6-20.....	136
3.1.17. Identificação da Substância Gb-5/6-21.....	146
3.2. CONSTITUENTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>RAVENIA INFELIX</i>	155
3.2.1. Identificação da Substância Ri-22.....	157
3.2.2. Identificação da Substância Ri-23.....	161
3.2.3. Identificação das Substâncias Ri-24 e Ri-25.....	164
3.2.4. Identificação da Substância Ri-26.....	170
3.2.5. Identificação das Substâncias Ri-27 e Ri-28.....	174
3.2.6. Identificação das Substâncias Ri-29 e Ri-30.....	179
3.3. ATIVIDADE TRIPANOCIDA DOS EXTRATOS BRUTOS E SUBSTÂNCIAS PURAS SOBRE A FORMA TRIPOMASTIGOTA DE <i>T. CRUZI</i>	184
3.4. ATIVIDADE TRIPANOCIDA DAS SUBSTÂNCIAS PURAS NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA TCGAPDH.....	187
3.5. ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS SUBSTÂNCIAS PURAS NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA APRT DE <i>LEISHMANIA TARANTOLAE</i>	188
5. CONCLUSÕES.....	191
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	194

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Ela pode ser entendida como uma associação de vários componentes hierárquicos: ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida (DOBSON, 1996). Uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativa desigual dos seus componentes no espaço geográfico, significando que a abundância de espécies é variável em um determinado ambiente e que existem gradientes geográficos da biodiversidade. A implicação óbvia disso relaciona-se com a necessidade de serem tomadas medidas urgentes para a conservação dos ecossistemas nos quais as diferentes espécies ocorrem e interagem.

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com exatidão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996) de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Considerando-se que mais da metade dessas espécies se encontra nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996), e que cerca de 75% das espécies brasileiras estão localizadas em duas principais formações de florestas: floresta tropical Atlântica e floresta Amazônica, essas regiões devem ser consideradas como prioritárias no estabelecimento de programas de conservação *in situ* de germoplasma vegetal (GUERRA et al., 1998).

Somente 8% de todas as espécies de plantas foram estudadas com relação a compostos bioativos fitoterapêuticos e 1.100 espécies foram estudadas extensivamente com relação às suas propriedades medicinais. Destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde brasileiro para fins comerciais. Finalmente, a farmacopéia brasileira lista somente 26 substâncias isoladas de plantas. (GUERRA et al., 1998).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de

propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996). Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

Cerca de 25% das drogas prescritas no mundo vêm de plantas. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992), 11% são exclusivamente de origem de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais. Exemplos de importantes drogas obtidas de plantas são a digoxina de *Digitalis spp.*, quinina e quinidina de *Chinchona spp.*, vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, morfina e codeína de *Papaver somniferum* e atropina de *Atropa belladonna*. Entretanto, o uso potencial de plantas superiores como uma fonte de novas drogas é ainda pobremente explorado. Depois da última década, têm-se visto o ressurgimento do interesse em plantas como uma fonte de novos agentes terapêuticos. Entre as aproximadamente 300.000 espécies de plantas sobre a terra, somente um pequeno percentual tem sido fitoquimicamente investigado e a fração submetida a screening é ainda menor. Além disso, um extrato de planta pode conter vários milhares de metabólitos secundários diferentes e qualquer investigação fitoquímica de uma dada planta revelará somente um pequeno espectro dos seus constituintes. Desta maneira, o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente valiosas a serem descobertas (RATES, 2001).

As informações existentes sobre a grandeza do mercado de compostos de origem vegetal são pouco precisas. Por um lado, afirma-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal é estimado em US\$ 12,4 bilhões, sendo o consumo da Europa responsável por aproximadamente 50% deste mercado. Há informações de que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (CRAGG et al., 1997). Outras estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (ROBBERS et al., 1996).

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas (GARCIA et al., 1996).

Uma vasta quantidade de espécies de plantas brasileiras permanece sem qualquer estudo químico ou biológico, e elas apresentam um potencial econômico para identificar e explorar novas drogas. A atual velocidade de extinção da biodiversidade vegetal no Brasil está causando não somente a perda de compostos com valor terapêutico e econômico, mas também a codificação de interessantes gens para enzimas com um uso potencial em melhoramento de plantas e em estudos biossintéticos de novos produtos naturais (BOLZANI et al., 1999).

1.1. A Família Rutaceae – Botânica e Quimiosistemática

A família Rutaceae compreende cerca de 150 gêneros e mais de 1600 espécies de portes variados, amplamente distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do globo, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália. Esta família é subdividida em 7 subfamílias, 10 tribos e 25 subtribos. Na subfamília Rutoideae (Fig. 1.1) encontram-se 5 tribos e 17 subtribos (ENGLER, 1964). No Brasil, são descritas aproximadamente 200 espécies (ALBUQUERQUE, 1976; PIRANI, 1982).

A família Rutaceae tem se destacado pelo fornecimento de vários metabólitos secundários, tais como: alcalóides (especialmente os derivados do ácido antranílico), cumarinas (principalmente furano e pirano cumarinas), lignanas, limonóides, flavonóides, cromenos, terpenóides (mono e triterpenos) e óleos voláteis, o que tem atraído a atenção de vários grupos de pesquisadores devido a importância química, biológica e quimiosistemática de muitos destes metabólitos (WATERMAN, 1975).

A família Rutaceae é considerada atípica na diversidade de produção de alcalóides, classificados em cinco tipos diferentes de acordo com a sua origem biogenética, no entanto a maior diversificação estrutural está nos alcalóides derivados do ácido antranílico que são tidos como eminentes marcadores quimiotaxonômicos, sendo os alcalóides do tipo furano e piranoquinolínicos os de maior ocorrência na família. Os alcalóides acridônicos são distribuídos em vários gêneros, porém os furoacridônicos são mais frequentes em *Ruta*. Os tipos quinazolínicos ocorrem principalmente no gênero *Glycosmis* e os indolopiridoquinazolínicos em *Zanthoxylum* e *Euxylophora*. Mesmo famílias próximas de Rutaceae (ordem Rutales) são praticamente incapazes de produzir estes alcalóides (WATERMAN, 1999; MESTER, 1983).

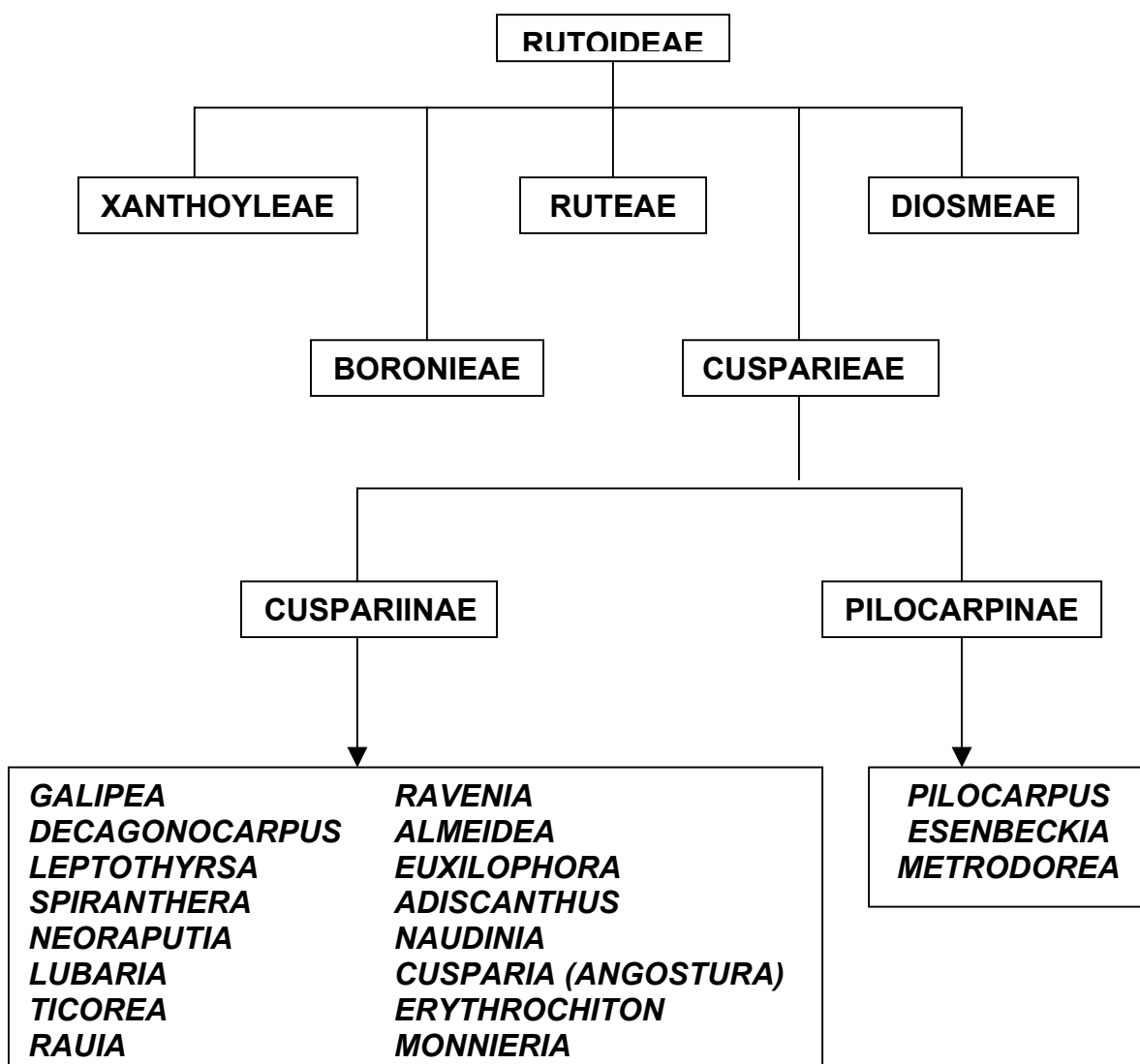


FIGURA 1.1 – Posição taxonômica da subtribo Cuspariinae e seus gêneros, segundo Engler.

A tabela 1.1 apresenta algumas classes de metabólitos secundários isoladas de espécies pertencentes à família Rutaceae, as quais tiveram relacionadas atividades biológicas (VIEIRA & KUBO, 1990; LEWIS, 1983).

TABELA 1.1 – Classes de metabólitos secundários de Rutaceae com atividade biológica

Metabólito Secundário	Atividade Biológica
ALCALÓIDES	Hipotensiva Bloqueadora de gânglio Antibacteriana Antifúngica Antiacetilcolinesterase Antiinflamatória Anestésico local Moluscicida
CUMARINAS	Analgésica Anti-helmíntica Diurética Anticoagulante Anti-HIV Fotoxidase
LIGNANAS	Sinergista de inseticidas Inibidores de germinação

1.2. O Gênero *Galipea* (Rutaceae) – Perfil Químico e Atividade Biológica

O gênero *Galipea* (Rutaceae) pertencente à tribo Cusparieae, a qual compreende 19 gêneros confinados principalmente à América do Sul tropical, é composto de aproximadamente 8 a 10 espécies, sendo estas plantas encontradas desde o sul do Brasil até a América Central (Panamá, Guatemala, Nicarágua) e norte da América do Sul (KALLUNKI & PIRANI, 1998; ALBUQUERQUE, 1976; ELIAS, 1970). Três espécies, *Galipea officinalis*, *G. longiflora* e *G. bracteata* foram estudadas quimicamente e são caracterizadas por um alto conteúdo de alcalóides quinolínicos 2-substituídos (RAKOTOSON et al., 1998; JACQUEMOND-COLLET et al., 1999; FOURNET et al., 1989; FOURNET et al., 1993a; VIEIRA & KUBO, 1990). Destas espécies, a *G. officinalis*, uma árvore arbustiva venezuelana descrita na medicina folclórica por suas várias propriedades medicinais, é a única que contém alcalóides tetraidroquinolínicos 2-substituídos. De extratos de *G. trifoliata* e *G. granulosa*, foram isoladas cumarinas, flavonas glicosiladas, cromona e chalcona,

respectivamente (WIRASUTISNA et al., 1987; BAKHTIAR et al., 1990; BAKHTIAR et al., 1994; LÓPEZ et al., 1998; LÓPEZ et al., 1997).

1.2.1. Atividade Biológica de *Galipea* (Rutaceae)

Durante investigação etnofarmacológica na Bolívia, alcalóides 2-aril e 2-alquil quinolínicos ativos contra leishmaniose foram isolados de *Galipea longiflora* fracionados por bioatividade (FOURNET et al., 1993a).

Os alcalóides 2-propenilquinolina (**3**) e 2-*trans*-epoxipropilquinolina (**5**) isolados das folhas, mostraram atividade antileishmaniose *in vitro* contra várias cepas de espécies *Leishmania* nas suas formas promastigotas com valores de IC₉₀ em torno de 25 µg mL⁻¹ (147 µM e 135 µM, respectivamente). O 2-*n*-propilquinolina (**1**) isolado das folhas e o 4-metoxi-2-fenilquinolina (**14**) isolado das cascas, raízes e folhas, são menos ativos com um valor de IC₉₀ de 50 µg mL⁻¹ (292 µM e 212 µM, respectivamente). Os outros alcalóides isolados, tais como 2-fenilquinolina (**13**), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)quinolina (**15**) e 2-*n*-pentilquinolina (**7**) mostraram atividade antileishmaniose com uma IC₉₀ em 100 µg mL⁻¹.

No modelo de pata de rato, infectada com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania venezuelensis*, animais foram tratados um dia após a infecção com o 2-*n*-propilquinolina (**1**) por via oral durante duas semanas a 100 mg kg⁻¹ dia⁻¹. A droga referência, Glucantima[®], foi administrada por injeções subcutâneas a 200 mg kg⁻¹ dia⁻¹. Sob estas condições, o 2-*n*-propilquinolina (**1**) mostrou a mesma eficácia que a droga referência na redução do tamanho da lesão e do número de parasitas. Pelo mesmo protocolo, o 2-*trans*-epoxipropilquinolina (**5**) mostrou ser um pouco mais ativo do que a Glucantima[®]. Tratamento com o 2-propenilquinolina (**3**) por via oral ou intralesional durante quatro a seis semanas pós-infecção, na mesma dose, reduziu o número de parasitas em 95%. O mais interessante, é que sobre um modelo de leishmaniose visceral, a administração via oral do 2-*n*-propilquinolina (**1**) e 2-*trans*-epoxipropilquinolina (**5**) a camundongos infectados com *Leishmania donovani* em 50 mg kg⁻¹ dia⁻¹ por cinco dias levou a redução da quantidade de parasitas em 87% e 70%, respectivamente. Este mesmo tratamento com o 2-*n*-propilquinolina (**1**) (0,54 mmol kg⁻¹) por dez dias, suprimiu em 99,9% a presença dos parasitas.

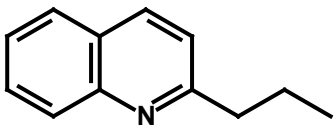
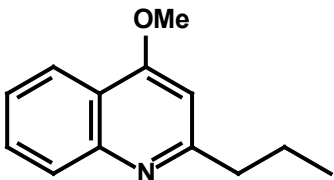
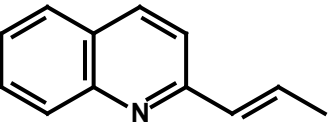
Os alcalóides 2-quinolínicos (**1**), (**3**) e (**5**) (Tabela 1.2.2) foram quase tão ativos *in vitro* quanto as drogas referência Nifurtimox ou Benznidazol contra várias cepas de *T. cruzi* (IC₅₀ = 25-50 µg mL⁻¹) (FOURNET et al., 1993b; FOURNET et al.,

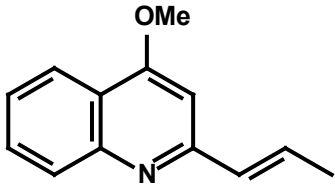
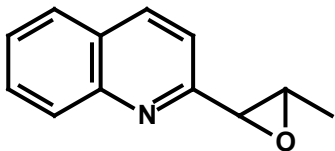
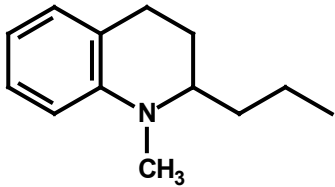
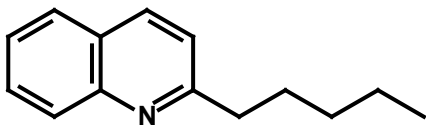
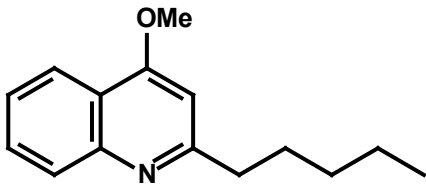
1994a; FOURNET et al., 1994b; SEPÚLVEDA-BOZA, 1996; AKENDENGUE, 1999; CHAN-BACAB, 2001).

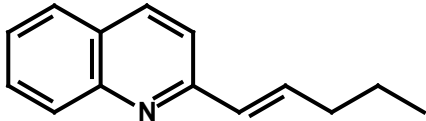
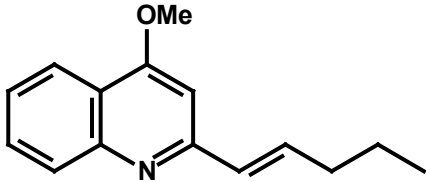
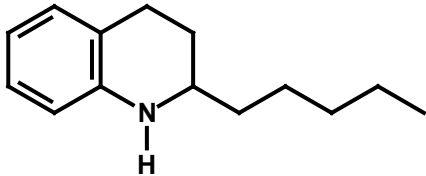
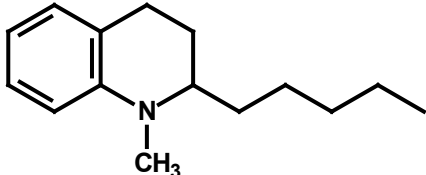
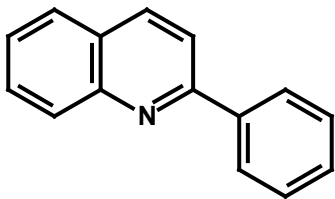
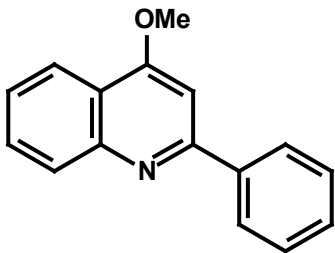
Estudo feito por VIEIRA & KUBO (1990), mostrou a atividade moluscicida dos alcalóides 2-quinolínicos, 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)quinolina (**15**), 2-(1'-pentenil)quinolina (**9**) e 2-*n*-pentilquinolina (**7**) contra o *Biomphalaria glabrata*, envolvida na transmissão da esquistossomíase. GANTIER et al. (1996), mostrou a atividade antimalarial do 2-*n*-pentilquinolina (**7**) contra o plasmódio *Vinckeï petteri*.

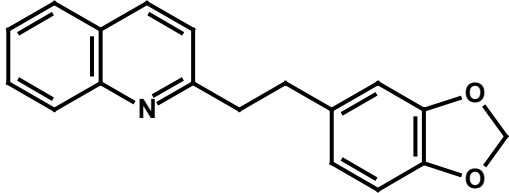
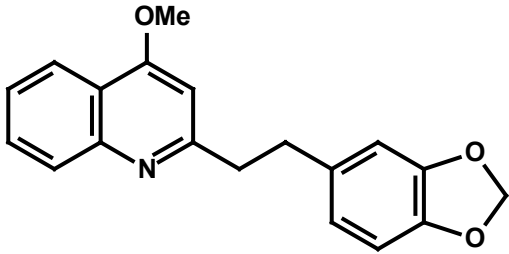
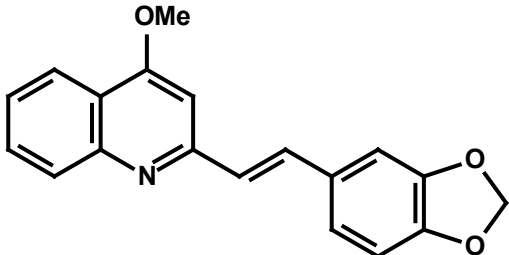
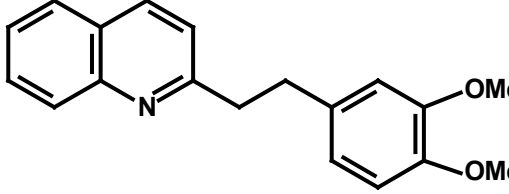
1.2.2. Perfil Químico de *Galipea* (Rutaceae)

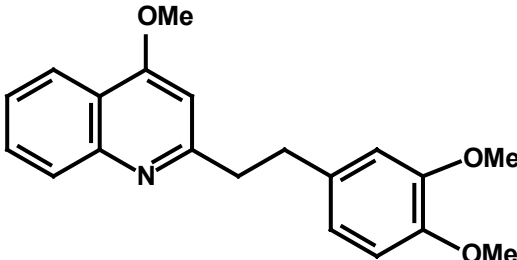
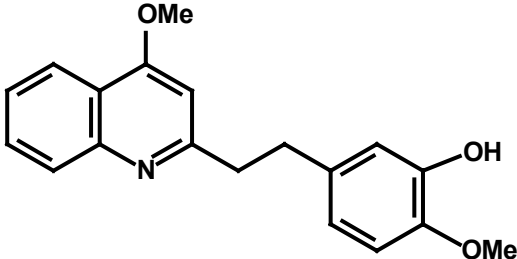
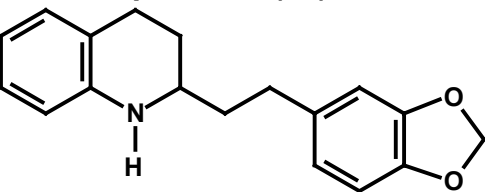
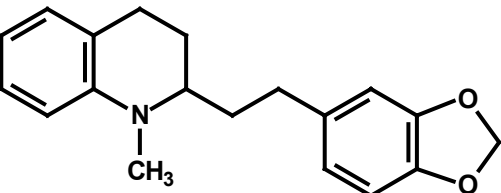
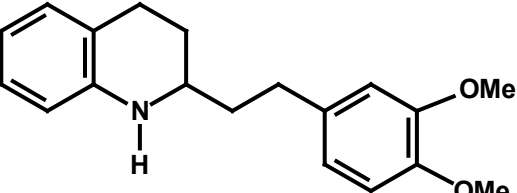
TABELA 1.2 – Metabólitos secundários isolados do gênero *Galipea*.

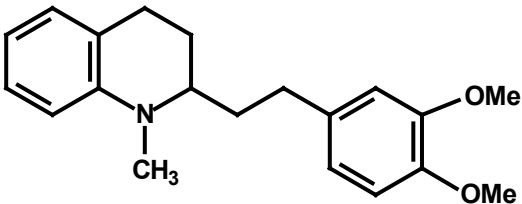
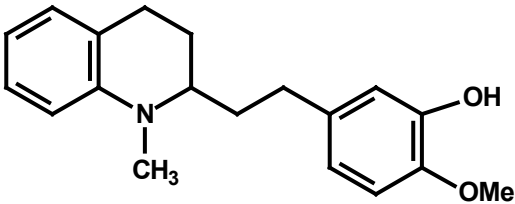
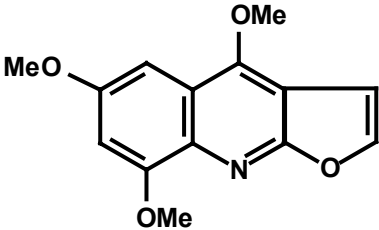
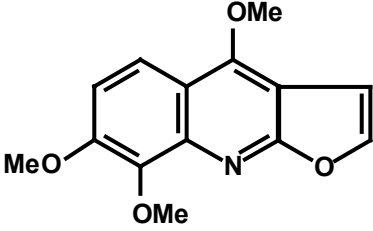
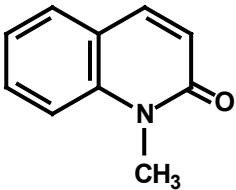
ESTRUTURA	ESPÉCIE
Alcalóides	
<p>2-<i>n</i>-propilquinolina (1)</p> 	<p><i>G. bracteata</i> (caule)^a <i>G. longiflora</i> (casca do tronco e folhas)^b</p>
<p>4-metoxi-2-<i>n</i>-propilquinolina (Chimanina A) (2)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (casca do tronco)^b</p>
<p>2-(E)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina B) (3)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (folhas)^b</p>

<p>4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina C) (4)</p>  <p>The structure shows a quinoline ring system with a methoxy group (OMe) at the 4-position and an (E)-prop-1'-enyl group at the 2-position.</p>	<p><i>G. longiflora</i> (folhas)^b</p>
<p>2-(1', 2'-trans-epoxipropil)-quinolina (Chimanina D) (5)</p>  <p>The structure shows a quinoline ring system with a trans-epoxypropyl group attached to the 2-position.</p>	<p><i>G. longiflora</i> (folhas)^b</p>
<p>2-n-propil-2,3,4-tetraidro-1-metil quinolina (6)</p>  <p>The structure shows a partially hydrogenated quinoline ring system with a methyl group on the nitrogen and a propyl group at the 2-position.</p>	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c</p>
<p>2-n-pentilquinolina (7)</p>  <p>The structure shows a quinoline ring system with a pentyl group attached to the 2-position.</p>	<p><i>G. bracteata</i> (caule)^a <i>G. longiflora</i> (casca do tronco e da raiz)^b</p>
<p>4-metoxi-2-n-pentilquinolina (8)</p>  <p>The structure shows a quinoline ring system with a methoxy group (OMe) at the 4-position and a pentyl group at the 2-position.</p>	<p><i>G. longiflora</i> (casca do tronco)^{b, c, d, e}</p>

<p>2-(1'-pentenil)quinolina (9)</p> 	<p><i>G. bracteata</i> (caule)^a</p>
<p>4-metoxi-2-(1'-pentenil)quinolina (10)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (casca do tronco)^d</p>
<p>2-n-pentil-1,2,3,4-tetraidroquinolina (11)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c</p>
<p>Angustereína (12)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, f}</p>
<p>2-fenilquinolina (13)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (folhas, casca do tronco e raiz)^{b, d}</p>
<p>4-metoxi-2-fenilquinolina (14)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (casca do tronco e da raiz)^{b, d}</p>

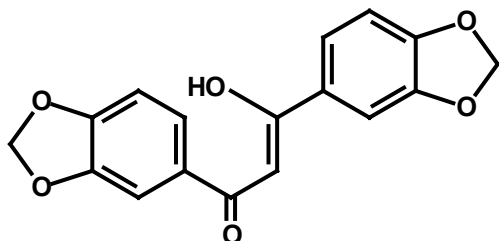
<p>2-(3',4'-metilenodioxifeniletíl) quinolina (15)</p> 	<p><i>G. bracteata</i> (caule)^a <i>G. longiflora</i> (casca do tronco e da raiz)^{b, d} <i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, g}</p>
<p>4-metoxi-2-(3', 4'metilenodioxifeniletíl) quinolina (Cusparina) (16)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (casca do tronco e da raiz)^{b, d} <i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^g</p>
<p>2-(3',4'-metilenodioxiestiril) quinolina (17)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (casca do tronco)^d</p>
<p>2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)quinolina (18)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c <i>G. longiflora</i> (casca do tronco)^{b, d}</p>

<p>Galipina (19)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, e, g}</p>
<p>4-metoxi-2-(3'-hidroxi-4'-metoxifeniletíl) quinolina (20)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c</p>
<p>2-(3',4'-metilendioxifeniletíl)-1,2,3,4-tetraidroquinolina (21)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c</p>
<p>Galipinina (22)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, e, g}</p>
<p>2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-1,2,3,4-tetraidroquinolina (23)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c</p>

<p>Cuspareina (24)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, e, f, g}</p>
<p>(3'-metoxi,4'-hidroxi-feniletil)-1,2,3,4-tetraidrometilquinolina (Galipeina) (25)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, f}</p>
<p>Maculosidina (26)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^c</p>
<p>Esquimianina (27)</p> 	<p><i>G. longiflora</i> (casca da raiz e folhas)^b</p>
<p>1-metil-2-quinolona (28)</p> 	<p><i>G. officinalis</i> (casca do tronco)^{c, e}</p>

Chalcona

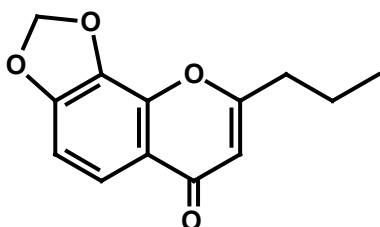
Galiposina (29)



G. granulosa
(cascas)^h

Cromona

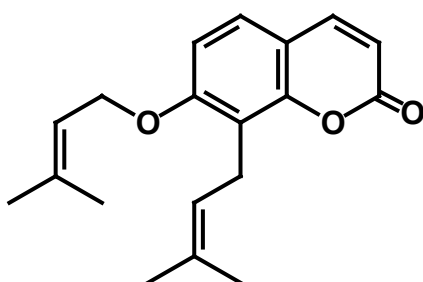
Granulosina (30)



G. granulosa
(cascas)ⁱ

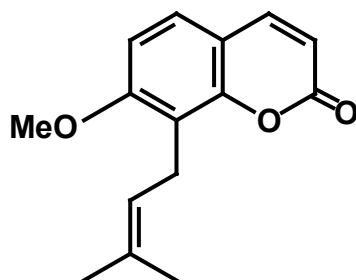
Cumarinas

Ramosina (31)

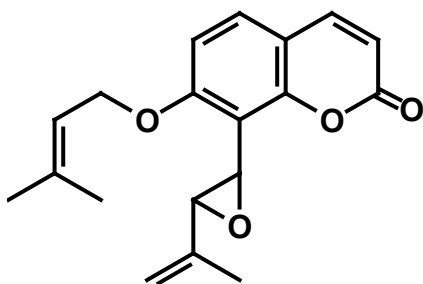


G. trifoliata
(cascas do caule e das raízes)^j

Phebalosina (32)



G. trifoliata
(cascas do caule e das raízes)^j

Galipeina (33)

G. trifoliata
(cascas do caule e das raízes)^j

^aVIEIRA & KUBO, 1990; ^bFOURNET *et al.*, 1993; ^cJACQUEMOND-COLLET *et al.*, 2001, ^dFOURNET *et al.*, 1989; ^eHOUGHTON *et al.*, 1999; ^fJACQUEMOND-COLLET *et al.*, 1999; ^gRAKOTOSON *et al.*, 1998; ^hLÓPEZ *et al.*, 1998; ⁱLÓPEZ & BARILLAS, 1997; ^jWIRASUTISNA *et al.*, 1987.

1.3. O Gênero *Ravenia* (Rutaceae)

O gênero *Ravenia* (Rutaceae) também pertencente à tribo Cusparieae e subtribo Cuspariinae, é composto de 4 espécies com distribuição desde o sudeste do Brasil até a América Central (Nicarágua e Cuba) (ALBUQUERQUE, 1976).

O estudo químico sobre o gênero *Ravenia* (subfamília Rutoideae) resume-se a uma única espécie, a *Ravenia spectabilis*, da qual foram isolados alcalóides 2-quinolônicos, furoquinolônicos e acridônicos (Figura 1.3) (BHATTACHARYYA, 1984; MESTER, 1983; PAUL & BOSE, 1969 e 1968).

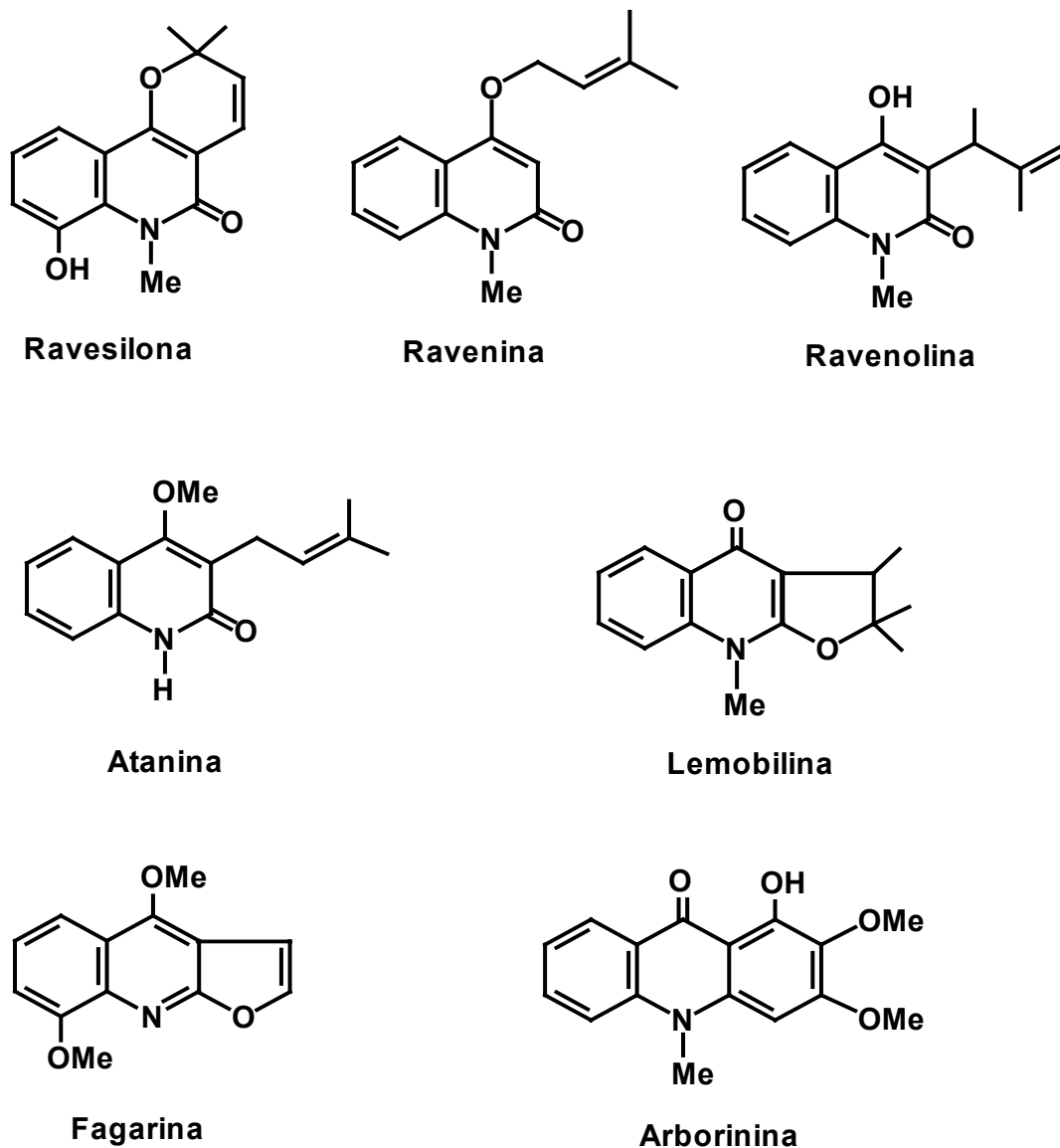


FIGURA 1.2 – Metabólitos secundários isolados do gênero *Ravenia*.

1.4. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também denominada Tripanosomíase americana, foi descrita por CHAGAS (1909) o qual, além de descobrir o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, descreveu todo ciclo do parasita, parte da patogenia e sintomatologia da doença. Esta enfermidade de natureza endêmica atinge grande parte do continente americano, principalmente a América do Sul.

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, sendo um dos parasitas de maior e mais bem sucedida distribuição na natureza (JANSEN et al., 2000).

Desde o trabalho pioneiro de NUSSENSWEIG et al. (1953), a violeta de genciana vem sendo utilizado na profilaxia do sangue infectado com *T. cruzi* utilizado em transfusões de sangue, mas devido à variação entre vários fabricantes na composição da violeta de genciana, este corante foi substituído por cristal violeta (seu principal componente) com forma quimicamente definida (Fig. 1.3), portanto mais seguro (DE CASTRO et al., 2000). No entanto, este medicamento apresenta alguns inconvenientes (PINTO et al., 1996), tais como:

- a) coloração violácea inferida ao sangue tratado, posteriormente detectada nos tecidos dos transfundidos;
- b) microaglutinação e “rouleaux” de hemácias;
- c) diferente sensibilidade entre várias cepas de *T. cruzi*;
- d) longo tempo de incubação (24h/4°C) impossibilitando transfusões emergenciais.

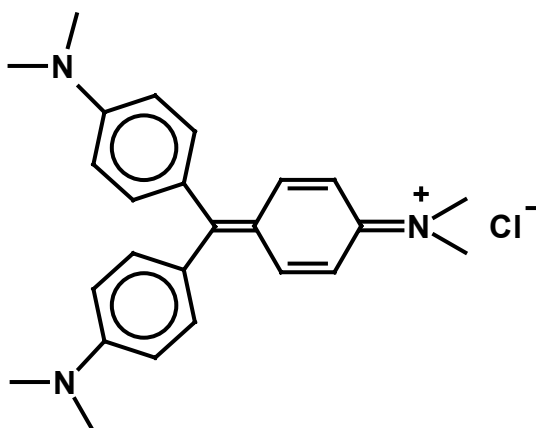


FIGURA 1.3 – Estrutura química da violeta de genciana.

O controle profilático da doença de Chagas causado por doação de sangue infectado pode ser trabalhado em duas frentes:

- a) através da melhoria na qualidade e organização dos sistemas hemoterápicos (utilização de exames sorológicos confiáveis e seleção dos candidatos a doação através de triagem clínico-epidemiológica);
- b) através da quimioprofilaxia do sangue estocado pela utilização de uma droga tripanocida (DIAS e SCHOFIELD, 1998).

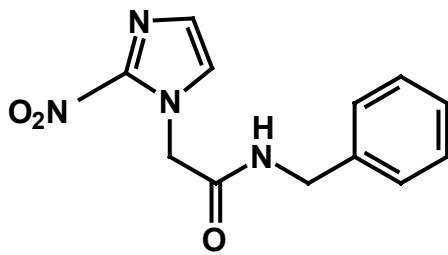
Os efeitos indesejáveis da violeta de genciana indicam a necessidade de se buscar novas substâncias que sejam mais eficientes e menos tóxicas.

Após a infecção e um período de incubação inicia-se a fase aguda da doença de Chagas, que pode durar até 2 ou 3 meses. Embora esta seja na maioria das vezes assintomática, 10% a 30% dos casos apresentam sintomas como: mal-estar, febre, anorexia, astenia e cefaléias. Os sinais de porta de entrada, quando presentes, podem ser ocular (sinal de romaña) ou cutâneo (chagoma de inoculação). Formas acentuadas de infecção, indicadas por miocardite, acompanhada de insuficiência cardíaca e alterações eletrocardiográficas, podem levar a morte (de 2% a 7%). Passada a fase aguda, 40-50% dos infectados apresentam-se na forma indeterminada da doença (forma assintomática da fase crônica), ou seja, permanecem soro-positivos, mas sem apresentar os sinais relativos a enfermidade, durante toda as suas vidas. Após um período que pode variar entre 10 a 30 anos os infectados entram no período sintomático da fase crônica, caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de cardiomiopatia, megacólon e/ou megaesôfago (WILLIAMS-BLANGERO et al., 1999; CENEPI/FNS, 1996; CANESIN & BARRETO, 1997).

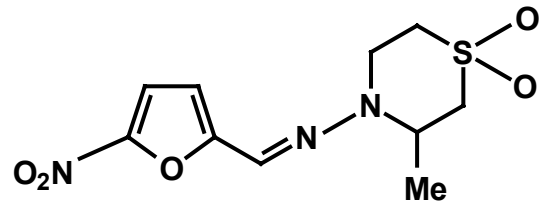
Recentemente, STOPPANI (1999) revisou os fármacos testados no tratamento da doença de Chagas classificando-os em:

- a) fármacos com utilidade clínica reconhecida: nifurtimox e benznidazol;
- b) fármacos efetivos em modelos experimentais “*in vivo*”, sem aplicação clínica generalizada: cetoconazol, itraconazol, alopurinol, anfotericina B, pirazolpirimidinas;
- c) fármacos efetivos em modelos experimentais com aplicação clínica previsível: cruzipaina, cruceína, fenotiazinas;
- d) fármacos efetivos em meio de cultura ou *in vitro*: o-naftoquinonas e outras.

No momento, somente o benznidazol e o nifurtimox (Fig.1.4) são utilizados no tratamento quimioterápico da doença de Chagas. Embora sejam eficazes na fase aguda da doença, estes medicamentos são pouco eficazes na fase crônica e não produzem a cura parasitológica, além de apresentarem efeitos colaterais indesejáveis, tais como: cefaléias, tonturas, perda de peso, polineuropatias, dentre outros (STOPPANI, 1999).



Benznidazol



Nifurtimox

FIGURA 1.4 – Estruturas químicas do benznidazol e nifurtimox.

Na busca por substâncias que possam ser empregadas no tratamento da doença de Chagas, vários metabólitos de plantas (SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996; PHILLIPSON & WRIGHT, 1991), além de outros candidatos a fármacos já foram testados contra *T. cruzi* (DE CASTRO, 1993). Das possíveis drogas que poderiam ser utilizadas no combate a doença de Chagas nenhuma delas tem sido considerada segura, completamente efetiva, conveniente ou de custo baixo para utilização em larga escala.

Uma das metodologias utilizadas na busca por substâncias que possam ser utilizadas na profilaxia do sangue infectado com *T. cruzi* é a utilização do ensaio “*in vitro*”, no qual se aplica a droga, em várias concentrações, diretamente no sangue contendo a forma infectante do parasita e verifica-se a mortalidade deste após um período de incubação de 24 horas a 4 °C. Drogas com atividade no ensaio “*in vitro*” sobre a forma tripomastigota (fase aguda) podem se tornar protótipos para utilização em estudos visando a quimioterapia da doença (fase crônica).

Outro caminho é a utilização de enzimas que atuam no processo metabólico do parasita. A forma infectante de *T. cruzi* (tripomastigota) possui uma organela especial denominada de glicossomo, na qual residem enzimas envolvidas na degradação da glicose (glicólise). Como nesta forma o parasita não possui citocromos e a mitocôndria é muito reduzida, a cadeia respiratória é suprimida deixando o protozoário altamente dependente da cadeia glicolítica (OPPERDOES, 1987). Uma das enzimas participantes da via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), foi isolada e teve sua estrutura tridimensional totalmente elucidada por raios-X, encontrando-se diferenças significativas na região de ligação da porção adenosina do cofator NAD⁺ com relação a enzima homóloga humana (SOUZA ET al., 1998). Estas características tornam a enzima GAPDH de *T. cruzi* um modelo bastante atrativo no desenvolvimento de drogas anti-chagásicas.

A busca por um fármaco que possa ser utilizado na profilaxia e/ou quimioterapia da doença de Chagas continua sendo um desafio e se faz necessária, principalmente, devido ao grave problema médico-social a qual se constitui e ao pouco interesse que desperta na indústria farmacêutica.

1.5. Leishmaniose

Protozoários parasitas estão entre os patógenos mais comuns no mundo, sendo reconhecidos como os agentes causadores de algumas das mais sérias doenças tropicais, tanto em homens quanto animais domésticos. Malária, amebíase, toxoplasmose, tripanossomíase e leishmaniose são doenças causadas por protozoários parasitas que afetam aproximadamente 25% da população mundial, a maioria em países em desenvolvimento, causando perdas de vidas e produtividade. Por isso, malária juntamente com tripanossomíase africana, doença de Chagas e leishmaniose estão entre as seis doenças tropicais consideradas prioritárias pela Organização Mundial de Saúde no seu Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

A leishmaniose é uma doença infecciosa, na maioria dos casos é transmitida zoonoticamente, causada por no mínimo 20 espécies de parasitas protozoários flagelados, biologicamente diversificado, taxonomicamente pertencentes ao gênero *Leishmania* da família *Trypanosomatidae*. As várias manifestações da doença foram usadas pela Organização Mundial da Saúde como base para classificar a leishmaniose em quatro formas clínicas: leishmaniose cutânea, mucocutânea cutânea difusa e visceral em homens, cachorros e vários hospedeiros vertebrados selvagens, amplamente distribuída nos quatro continentes, sendo considerada endêmica em 88 países, dos quais, 72 são países considerados em desenvolvimento. A doença afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas com uma estimativa de 1 a 2 milhões de novos casos por ano, atualmente considera-se que exista uma população de 350 milhões de pessoas sob risco de infecção. Os vetores da leishmaniose são dípteros da família *Psychodida*, hematófagos (somente as fêmeas) pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (RATH et al., 2003; CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; CARVALHO & FERREIRA, 2001; BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Certas espécies do parasita estão associadas com as diferentes formas clínicas da doença, e.g. a *Leishmania donovani* causa a leishmaniose visceral, enquanto a *Leishmania tropica* é conhecida por induzir lesões cutâneas no Velho Mundo e a *Leishmania mexicana* causa leishmaniose cutânea e cutânea difusa em vários países da América Latina (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; CARVALHO & FERREIRA, 2001).

Historicamente, a quimioterapia da leishmaniose está baseada no uso de metais pesados tóxicos, particularmente compostos antimoniais pentavalentes, sendo considerados os agentes leishmanicidas com o índice terapêutico mais favorável, como por exemplo, o Estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e Antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (Fig. 1.5), com uma eficácia estimada em cerca de 85%. Entretanto, os antimoniais causam sérios efeitos colaterais que incluem dor no local da injeção, rigidez articular, problemas gastrointestinais, cardiotoxicidade e, em alguns casos, insuficiência renal e hepática. Quando este tipo de tratamento não é efetivo, outras medicações usadas incluem pentamidina e anfotericina B. Todos estes medicamentos requerem administração por injeção e supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento devido à severidade dos possíveis efeitos colaterais. Mais recentemente, foi verificado que a Miltefosina (Fig. 1.5), uma droga anticâncer alquilfosfolipídica, é ativa contra *Leishmania spp.*, *in vitro* e *in vivo*, e pode vir a ser o primeiro tratamento oral para a leishmaniose visceral (RATH et al., 2003; CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; CARVALHO & FERREIRA, 2001; AKENDENGUE et al., 1999; BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

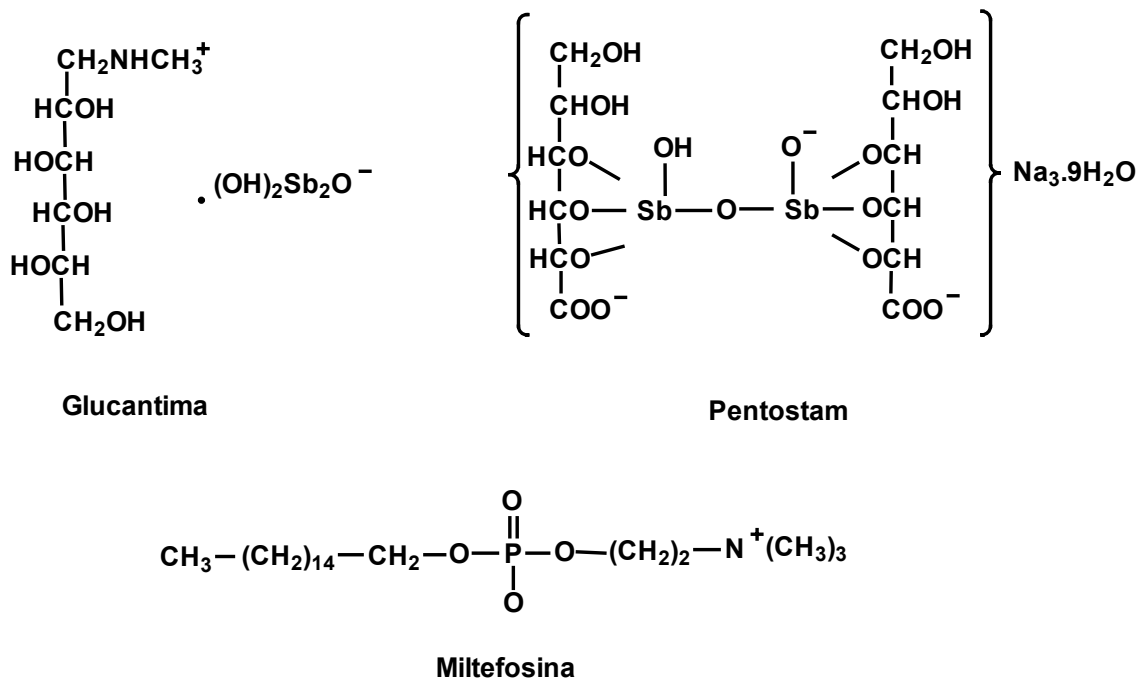


FIGURA 1.5 - Estruturas químicas da glucantima, pentostam e miltefosina.

O uso de drogas potencialmente tóxicas, a necessidade de tratamentos prolongados, aliados ao aparecimento de formas resistentes de leishmânia tem aumentado a necessidade da busca de alternativas que possam permitir o desenvolvimento de inibidores antileishmanioses.

A biossíntese de purino nucleotídeo é catalisada pelas enzimas da família das fosforribosiltransferase (PRTases). A maioria dos organismos sintetiza adenina nucleotídeos pela *via de novo* e *via de recuperação*. Por outro lado, todos os protozoários parasitas examinados até o momento são estritamente auxotróficos na aquisição de purino nucleotídeo, devido à ausência do caminho biossintético *de novo*. Da mesma forma, protozoários do gênero *Leishmania* são inteiramente dependente das fosforribosil-transferases (PRTases) no caminho reciclante de purino nucleotídeos pela *via de recuperação*, sendo elas: a adenina PRTase (APRT), hipoxantina-guanina PRTase (HGPRT) e xantina PRTase (XPRT) (THIEMANN et al., 1998; JARDIM et al., 1999). Assim, a maior promessa para o desenvolvimento racional de novas drogas antiparasitárias baseia-se na exploração dessas diferenças bioquímicas ou metabólicas fundamentais entre o parasita e o hospedeiro, na busca por substâncias inibidoras das enzimas APRT, HGPRT e XPRTases.

1.6. Objetivos

Tendo em vista a importância econômica, química, biológica e quimiossistemática da família Rutaceae, selecionamos uma espécie de cada gênero, *Galipea* e *Ravenia*, visando os seguintes objetivos:

– Estudar fitoquimicamente estas espécies de plantas pertencentes à tribo Cusparieae, no intuito de elucidar estruturas de micromoléculas presentes nas folhas e galhos, que possam ser comparadas com as classes de metabólitos normalmente encontrados neste grupo de plantas brasileiras ainda pouco estudadas;

– Ter um conhecimento maior sobre a composição química da flora nacional, em especial da família Rutaceae, permitindo a obtenção de informações que devem contribuir para arranjos taxonômicos desta tribo, montados também a partir de informações químicas;

– Obter substâncias com um alto grau de pureza através de fracionamento e purificação de extratos com solventes orgânicos, utilizando-se técnicas cromatográficas convencionais, CLAE e cromatografia de exclusão. As estruturas das substâncias isoladas serão elucidadas através de métodos físicos de determinação estrutural, tais como RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e espectrometria de massas;

– Estudar os extratos das folhas de *Galipea bracteata* e dos galhos de *Ravenia infelix*, contribuindo assim para quimiossistemática destes gêneros, mediante o fornecimento de novos dados químicos.

– Testar a atividade tripanocida de extratos e substâncias puras isoladas de *Galipea bracteata* e *Ravenia infelix*, através de ensaio “*in vitro*” sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;

– Testar a atividade inibitória de extratos e substâncias puras isoladas de *Galipea bracteata* e *Ravenia infelix*, sobre a enzima gGAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *Trypanosoma cruzi*;

– Testar a atividade inibitória de extratos e substâncias puras isoladas de *Galipea bracteata* e *Ravenia infelix*, sobre a enzima APRT (Adenina-fosforribosil-transferase) de *Leishmania tarentolae*.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Equipamentos

2.1.1. Evaporadores Rotativos

- BÜCHI, rotaevaporador R-114, equipado com banho BÜCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C, DQ – UFSCar.
- BÜCHI, rotaevaporador ELB1, equipado com banho BÜCHI 461 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C, DQ – UFSCar.

2.1.2. Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

- BRUKER modelo DRX 400, DQ – UFSCar.
- BRUKER modelo ARX 200, DQ – UFSCar.

2.1.3. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

2.1.3.1. Bomba

- SHIMADZU modelo LC-8A, DQ – UFSCar.

2.1.3.2. Detectores

- Espectrofotômetro UV-VIS modelo SPD-8AV, SHIMADZU, DQ – UFSCar.

2.1.3.3. Comunicação Detector/Computador

- Módulo CBM-10A, SHIMADZU.
- Programa de Computação Class-VP, SHIMADZU.

2.1.3.4. Coluna Cromatográfica

- Coluna de Sílica Gel (15,0 mm x 35,0 cm; 5 µm) empacotada no DQ – UFSCar.

2.1.4. Cromatógrafo em Fase Gasosa

- CG/EM GC-17A SHIMADZU modelo QP 5000, DQ – UFSCar.
- Coluna Capilar DB5 (J & W), (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m).

2.2. Materiais

2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada Analítica

2.2.1.1. Fases Estacionárias

- Sílica Gel 60 GF₂₅₄ MERCK em placas de vidro preparadas no laboratório (3 x 10 cm; 0,25 mm de espessura).
- Sílica Gel 60 GF₂₅₄ MERCK em placas de alumínio.

2.2.1.2. Agentes Reveladores

- Radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 360 nm.
- Iodo MERCK.
- Vanilina em Ácido Sulfúrico: A vanilina (3,0 g) foi dissolvida em uma solução contendo: 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução foi estocada em um frasco escuro e a baixa temperatura (aproximadamente 10 °C).
- Solução de Dragendorff para alcalóides (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1972)

2.2.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

- Placas de vidro com sílica gel 60 GF₂₅₄ (0,25 mm) – MACHEREY-NAGEL

2.2.3. Cromatografia em Coluna

2.2.3.1. Fases Estacionárias

- Sílica Gel 60 (70-230 mesh ASTM) – ALDRICH.
- Sílica Gel GF₂₅₄ (70-230 mesh ASTM) – MERCK.
- Sílica Gel (230-400 mesh ASTM) – MERCK.
- SEPHADEX LH-20 – SIGMA

2.2.3.2. Colunas

- As colunas utilizadas nas análises por CC foram confeccionadas na vidradria do DQ – UFSCar.

2.2.4. Solventes

2.2.4.1. Solventes para Cromatografia

- Solventes P. A. MERCK, VETEC, SINTH, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do DQ – UFSCar.
- Solventes grau cromatográfico/espectroscópico ALDRICH e MERCK.

2.2.4.2. Solventes para Análises Espectroscópicas

- Solventes grau cromatográfico/espectroscópico ALDRICH e MERCK.
- Solventes deuterados MERCK e ALDRICH: CDCl_3 , CD_3OD .

2.2.5. Material Botânico

2.2.5.1. Folhas de *Galipea bracteata*

As folhas foram coletadas de uma arvoreta de 7m de altura, em janeiro de 1985, no interior da mata pluvial tropical, na encosta de morro no município de Cachoeiro do Itapemirim - BR 482 no Estado do Espírito Santo, pelos Profs. Drs. João Batista Fernandes e José Rubens Pirani. A identificação foi feita pelo botânico Prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica – Instituto de Biociências – USP/SP.

2.2.5.2. Galhos de *Ravenia infelix*

Os galhos foram coletados em fevereiro de 1988 na estrada Praia do Sol, litoral do Estado do Espírito Santo. A coleta e identificação foram feitas pelo botânico, Prof. Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica – Instituto de Biociências – USP/SP.

2.3. Metodologias

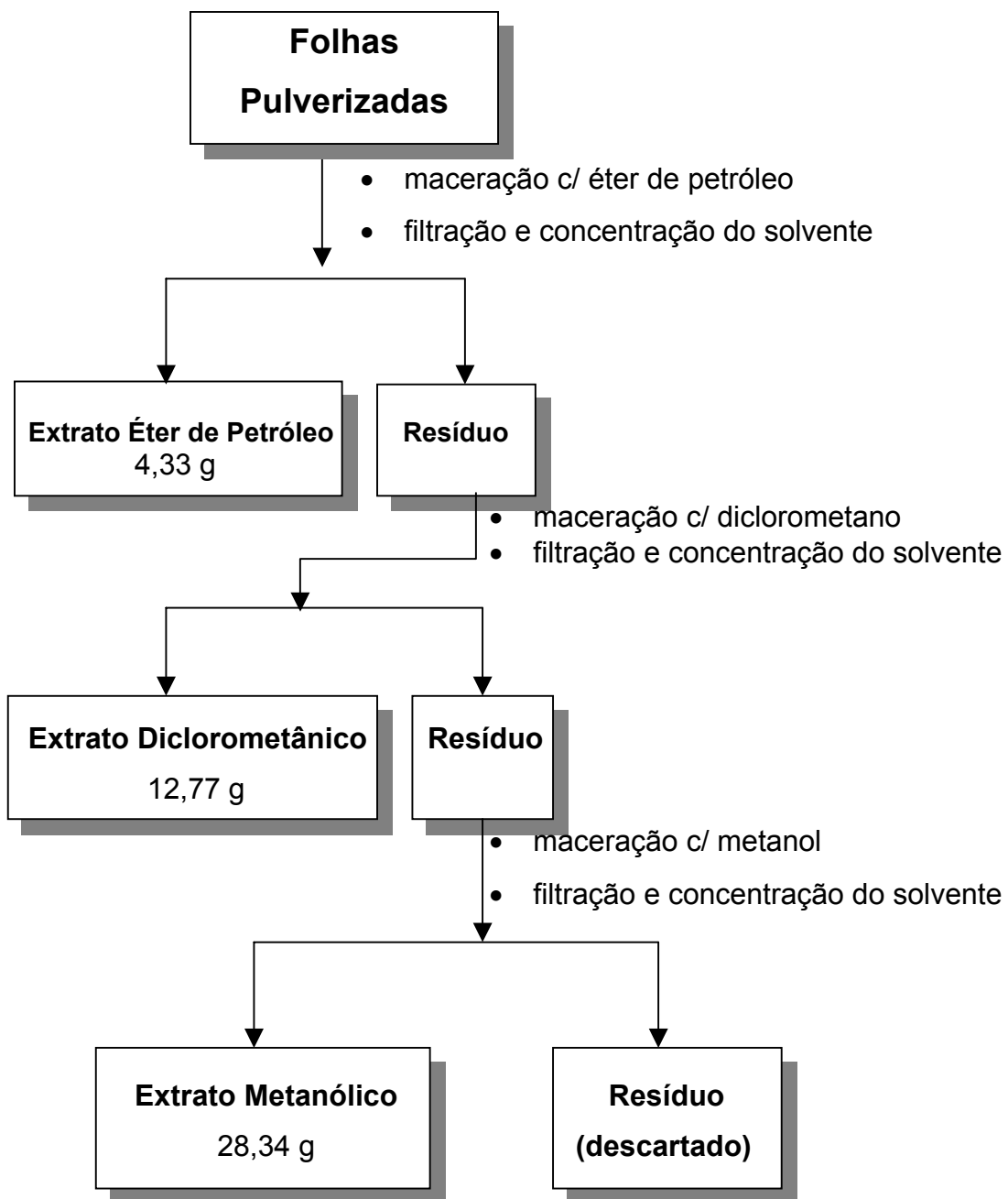
2.3.1. Preparação de Extratos Brutos

2.3.1.1. *Galipea bracteata*

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 45 °C. Em seguida, foram pulverizadas em moinho do tipo WILLEY. Os extratos brutos foram obtidos por processo de maceração com éter de petróleo, diclorometano e metanol, deixando o material vegetal em contato com 2 L de cada solvente durante cinco dias, repetindo-se o processo por três vezes (Tabela 2.3.1.1; Esquema 2.3.1.1). Os extratos foram concentrados por destilação do solvente sob pressão reduzida, em evaporadores rotativos.

TABELA 2.3.1.1 – Extratos obtidos por maceração das folhas de *Galipea bracteata*.

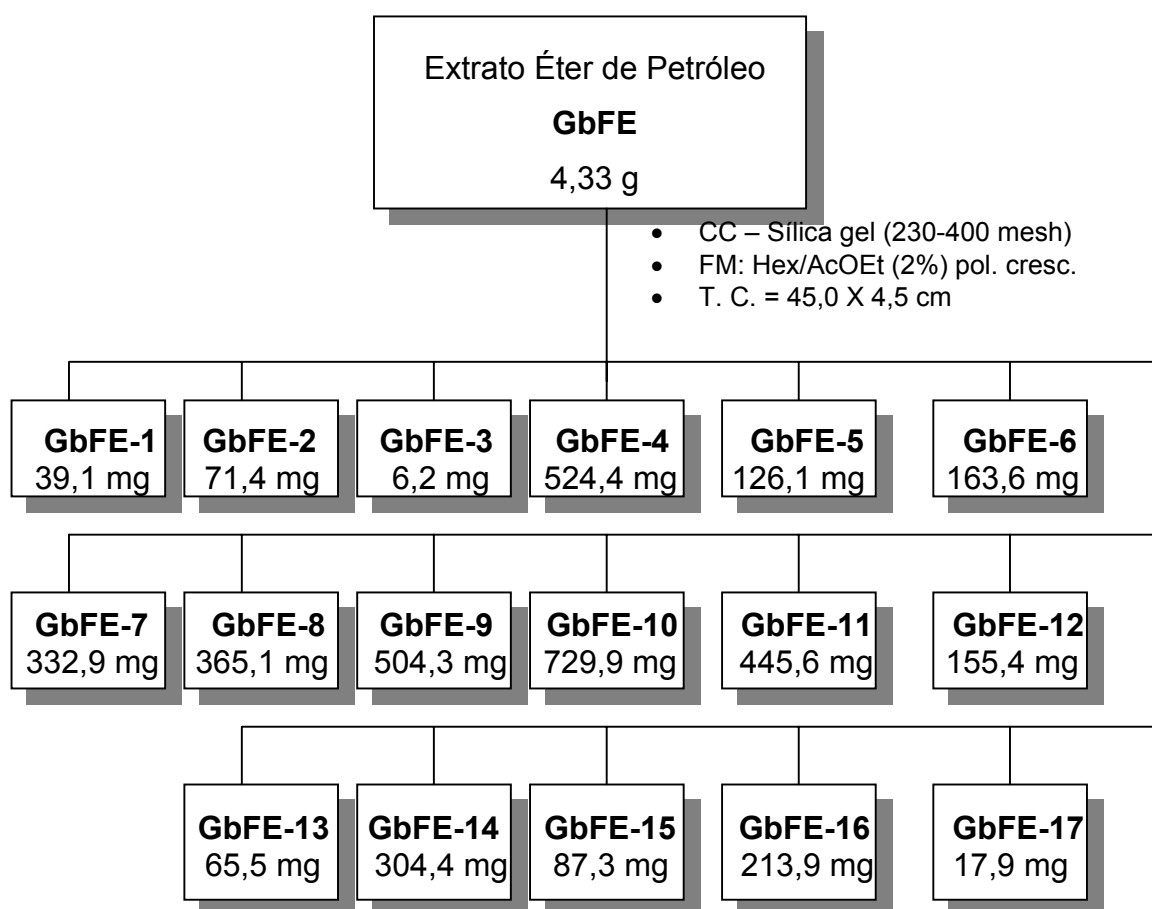
<i>Galipea bracteata</i>	Peso Seco	Extratos Obtidos	
		Código dos Extratos	(%)
Folhas	727 g		
Éter de Petróleo	4,33 g	GbFE	0,6
Diclorometano	12,77 g	GbFD	1,8
Metanol	28,34 g	GbFM	3,9



ESQUEMA 2.3.1.1 - Obtenção dos extratos brutos das folhas de *Galipea bracteata*.

2.3.1.1.1. Fracionamento Cromatográfico do Extrato GbFE

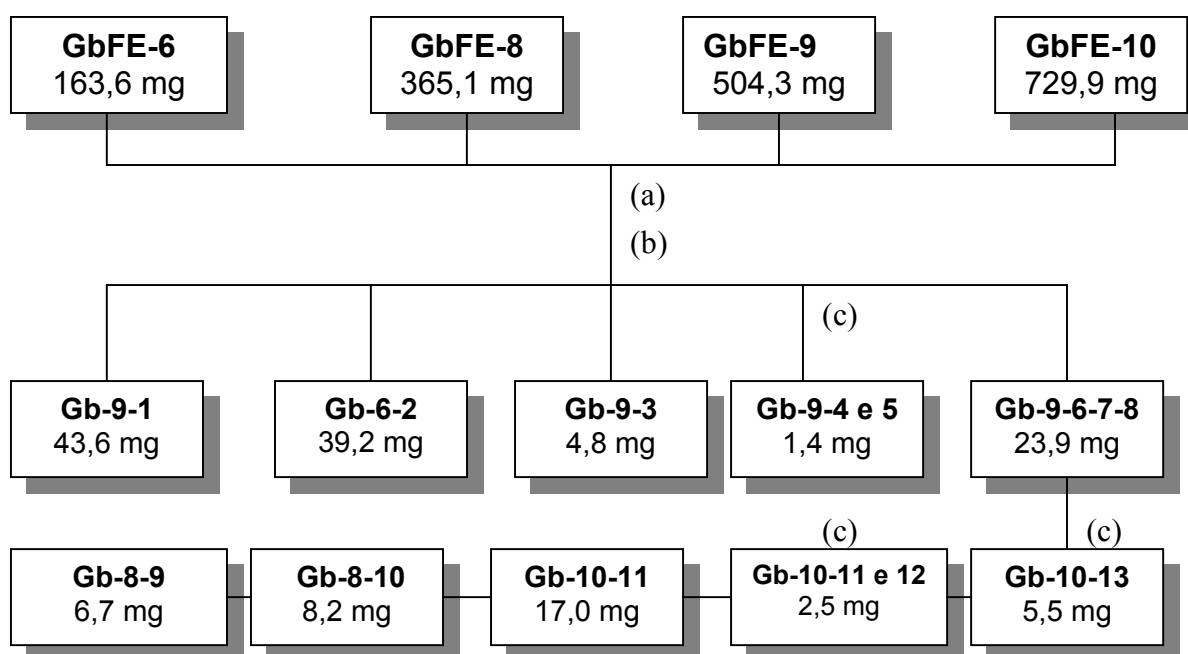
O extrato GbFE, originado do processo de maceração das folhas de *Galipea bracteata* em éter de petróleo, foi cromatografado em sílica gel (230 – 400 mesh), utilizando como eluente hexano-acetato de etila com polaridade crescente, onde todas as frações obtidas foram reunidas após análise em CCDA, conforme o esquema 2.3.1.1.



ESQUEMA 2.3.1.2 - Fracionamento cromatográfico do extrato em éter de petróleo das folhas de *Galipea bracteata*.

2.3.1.1.1. Fracionamento Cromatográfico de Frações GbFE

As frações GbFE (6, 8, 9 e 10) originadas do processo de fracionamento cromatográfico do extrato em éter de petróleo das folhas de *Galipea bracteata*, foram fracionadas por CC através de sílica gel (230 – 400 mesh) utilizando como eluente hexano-diclorometano em polaridade crescente, CC através de SEPHADEX LH-20 utilizando como eluente metanol e CCDP (gel de sílica 60 F₂₅₄, $\phi = 2,0$ mm) utilizando como eluente diclorometano-acetato de etila (5%), obtendo-se as substâncias puras, conforme o esquema 2.3.1.3. As demais frações do extrato GbFE foram monitoradas através de CG-EM, as quais continham os mesmos constituintes aqui isolados.



(a) CC – Sílica gel (230-400 mesh) – Eluentes: Hex:CH₂Cl₂ (80%) polar. cresc.
CH₂Cl₂:AcOEt pol. cresc.
AcOEt:MeOH (5%)

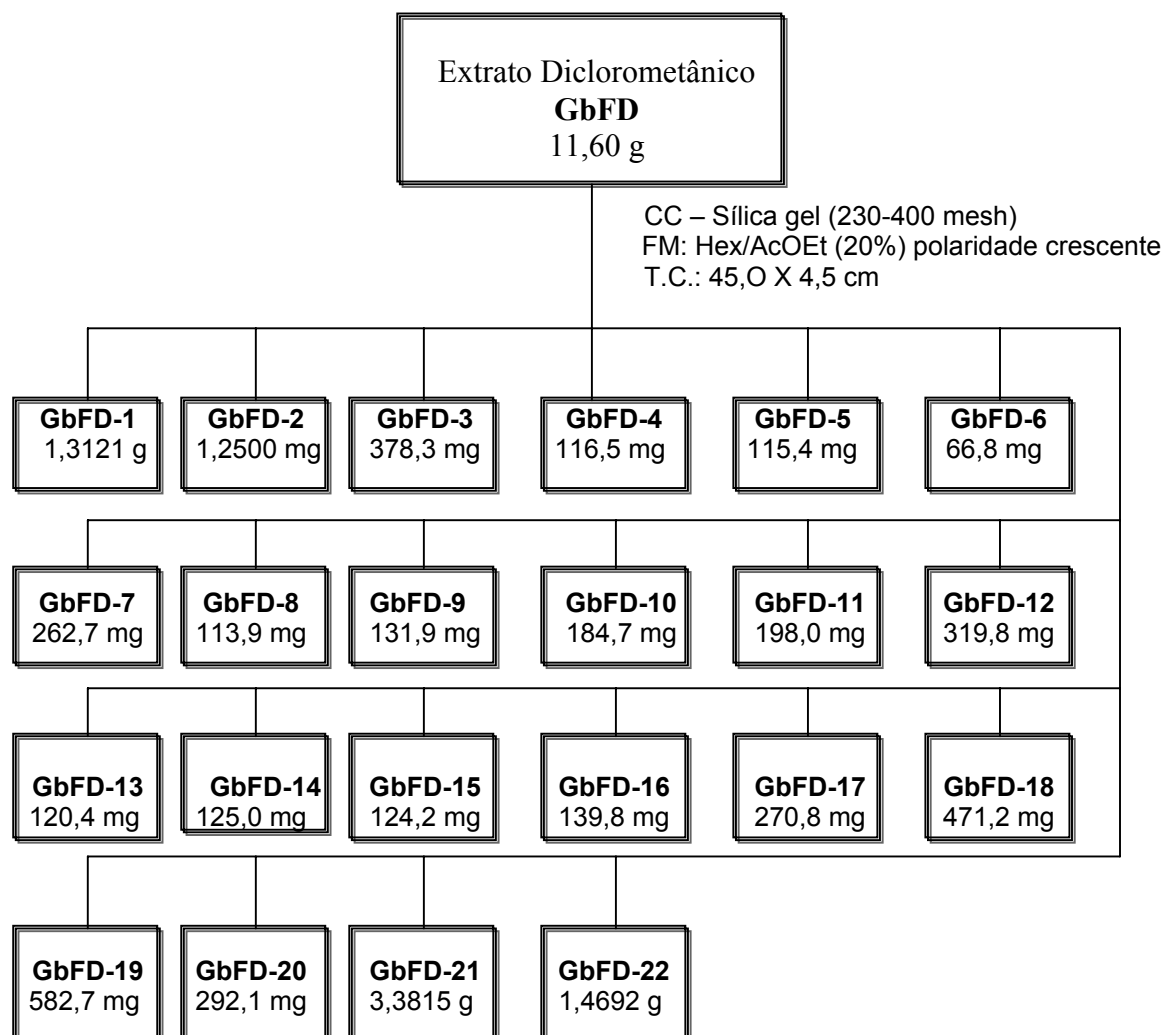
(b) CC – SEPHADEX LH-20 – Eluente: MeOH

(c) CCDP – Sílica gel – Eluente: CH₂Cl₂:AcOEt (5%)

ESQUEMA 2.3.1.3 - Isolamento das substâncias das frações GbFE-6, GbFE-7, GbFE-8, GbFE-9 e GbFE-10 do extrato em éter de petróleo das folhas de *Galipea bracteata*.

2.3.1.1.2. Fracionamento Cromatográfico do Extrato GbFD

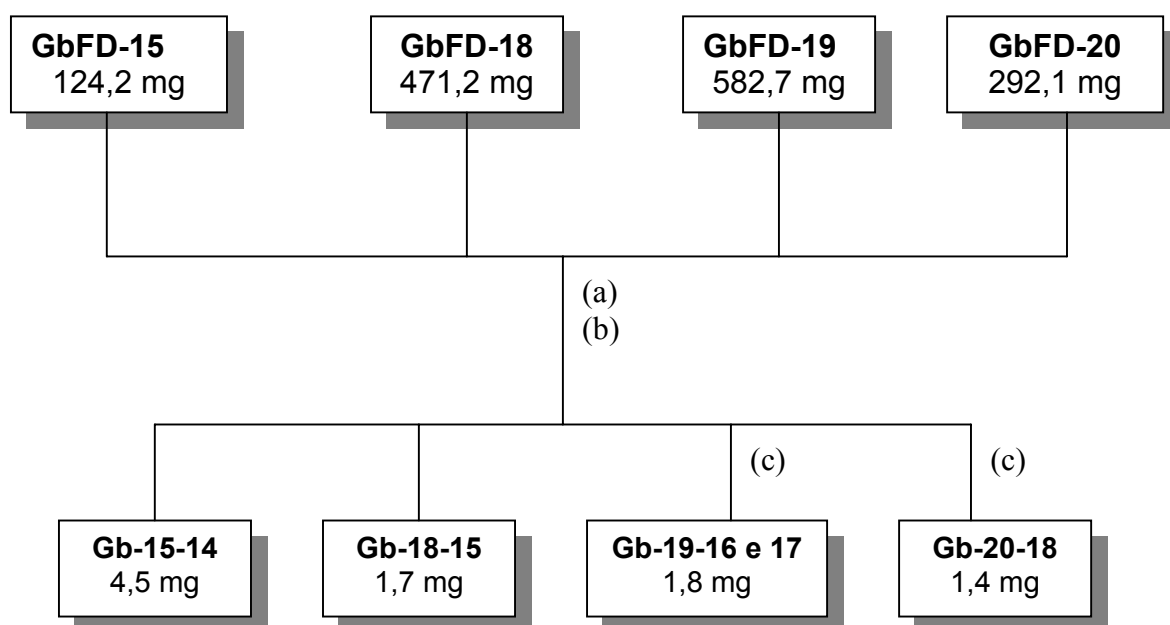
O extrato GbFD, originado do processo de maceração das folhas de *Galipea bracteata* em diclorometano, foi cromatografado em sílica gel (230 – 400 mesh), utilizando como eluente hexano-acetato de etila (20%) com polaridade crescente, onde todas as frações obtidas foram reunidas após análise em CCDA, conforme o esquema 2.3.1.4.



ESQUEMA 2.3.1.4 - Fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano das folhas de *Galipea bracteata*.

2.3.1.1.2.1. Fracionamento Cromatográfico de Frações GbFD

As frações GbFE (15, 18, 19 e 20) originadas do processo de fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano das folhas de *Galipea bracteata*, foram fracionadas por CC através de sílica gel (230 – 400 mesh) utilizando como eluente hexano-diclorometano (20%) em polaridade crescente, CC através de SEPHADEX LH-20 utilizando como eluente metanol e CCDP (gel de sílica 60 F₂₅₄, $\phi = 2,0$ mm) utilizando como eluente hexano-diclorometano-acetona (2:2:1), obtendo-se as substâncias puras, conforme o esquema 2.3.1.5. As demais frações do extrato GbFE foram monitoradas através de CG-EM, as quais continham os mesmos constituintes aqui isolados e também nas frações GbFE.



(a) CC – Sílica gel (230-400 mesh) – Eluente: Hex:CH₂Cl₂ (20%) polaridade crescente
CH₂Cl₂:AcOEt polaridade crescente
AcOEt:MeOH (5%)

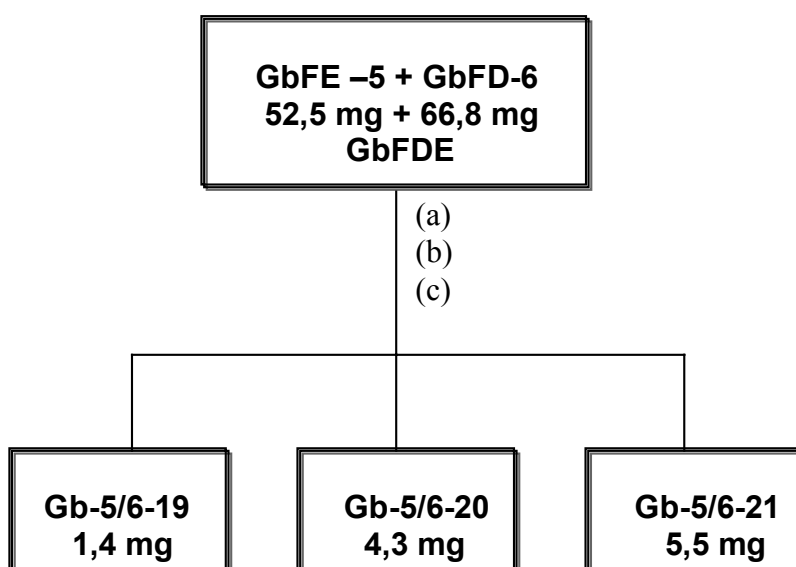
(b) CC – SEPHADEX LH-20 – Eluente: MeOH

(c) CCDP – Sílica gel (70-230 mesh) – Eluente: Hex:CH₂Cl₂:Acet. (2:2:1)

ESQUEMA 2.3.1.5 – Isolamento das substâncias das frações GbFD-15, GbFD-18, GbFE-19 e GbFE-20 do extrato em diclorometano das folhas de *Galipea bracteata*.

2.3.1.1.2.2 - Fracionamento Cromatográfico da Reunião das Frações GbFE-5 e GbFD-6

Após verificação através de CG-EM de que as frações GbFE-5 e GbFD-6 continham os mesmos constituintes, ambas foram reunidas e submetidas a CC em sílica gel (230 – 400 mesh) utilizando como eluentes hexano-dicloro (20%) com polaridade crescente, CC através de SEPHADEX LH-20 utilizando como eluente metanol e CLAE-R utilizando uma coluna polimérica e metanol como eluente a um fluxo de 4 mL/min. Desta maneira, obteve-se as substâncias puras **Gb-5/6-19**, **Gb-5/6-20** e **Gb-5/6-21**, conforme esquema 2.3.1.6.



(a) CC – Sílica gel (230-400 mesh) – Eluente: Hex:CH₂Cl₂ (20%) polaridade crescente
CH₂Cl₂:AcOEt polaridade crescente
AcOEt:MeOH (5%)

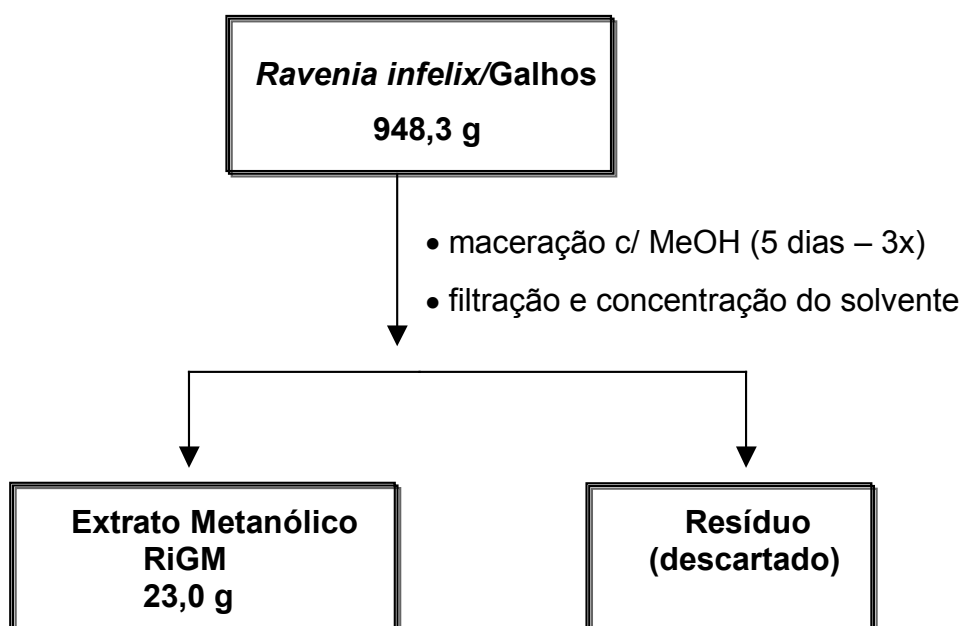
(b) CC – SEPHADEX LH-20 – Eluente: MeOH

(c) CLAE-R; Coluna polimérica; Detector UV: 254 nm; Eluente: MeOH; Fluxo: 4 mL/min

ESQUEMA 2.3.1.6 – Isolamento das substâncias **Gb-5/6-19**, **Gb-5/6-20** e **Gb-5/6-21** da reunião das frações GbFD-6 e GbFE-5 dos extratos em diclorometano e éter de petróleo das folhas de *Galipea bracteata*.

2.3.1.2. *Ravenia infelix*

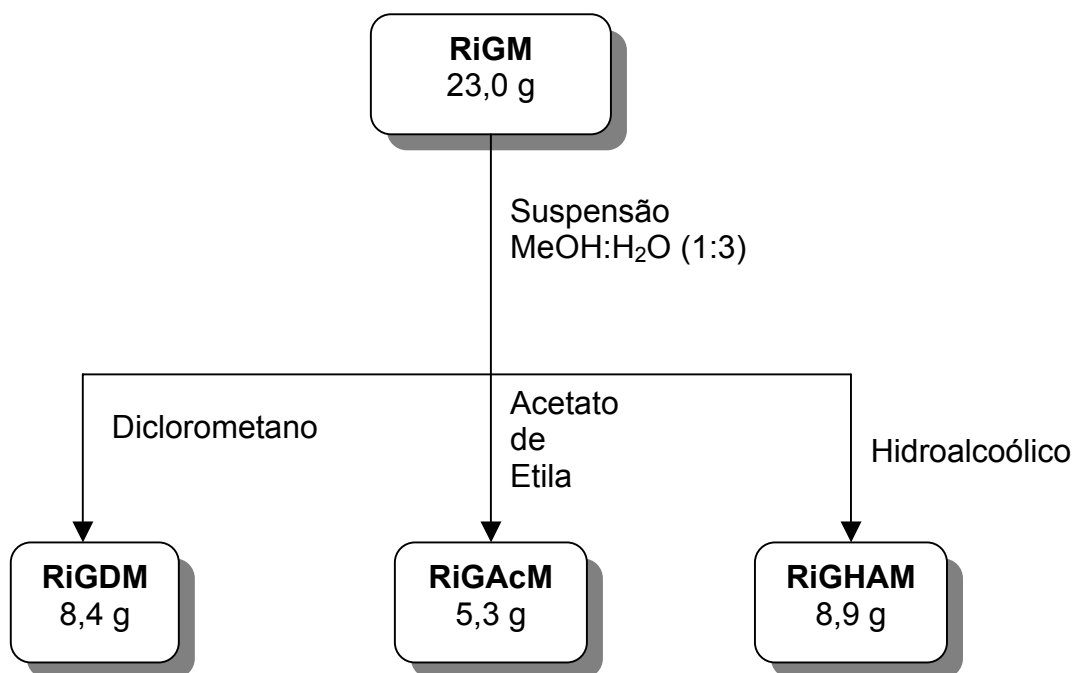
Os galhos foram secos em estufa com circulação de ar a 45 °C. Em seguida, foram pulverizados em moinho do tipo WILLEY. O extrato bruto foi obtido por processo de maceração com metanol, deixando o material vegetal em contato com o solvente durante cinco dias, repetindo-se o processo por três vezes (Esquema 2.3.1.7). O extrato foi concentrado por destilação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo.



ESQUEMA 2.3.1.7 – Obtenção do extrato metanólico bruto dos galhos de *Ravenia infelix*.

2.3.1.2.1. Particionamento do Extrato RiGM de *Ravenia infelix*

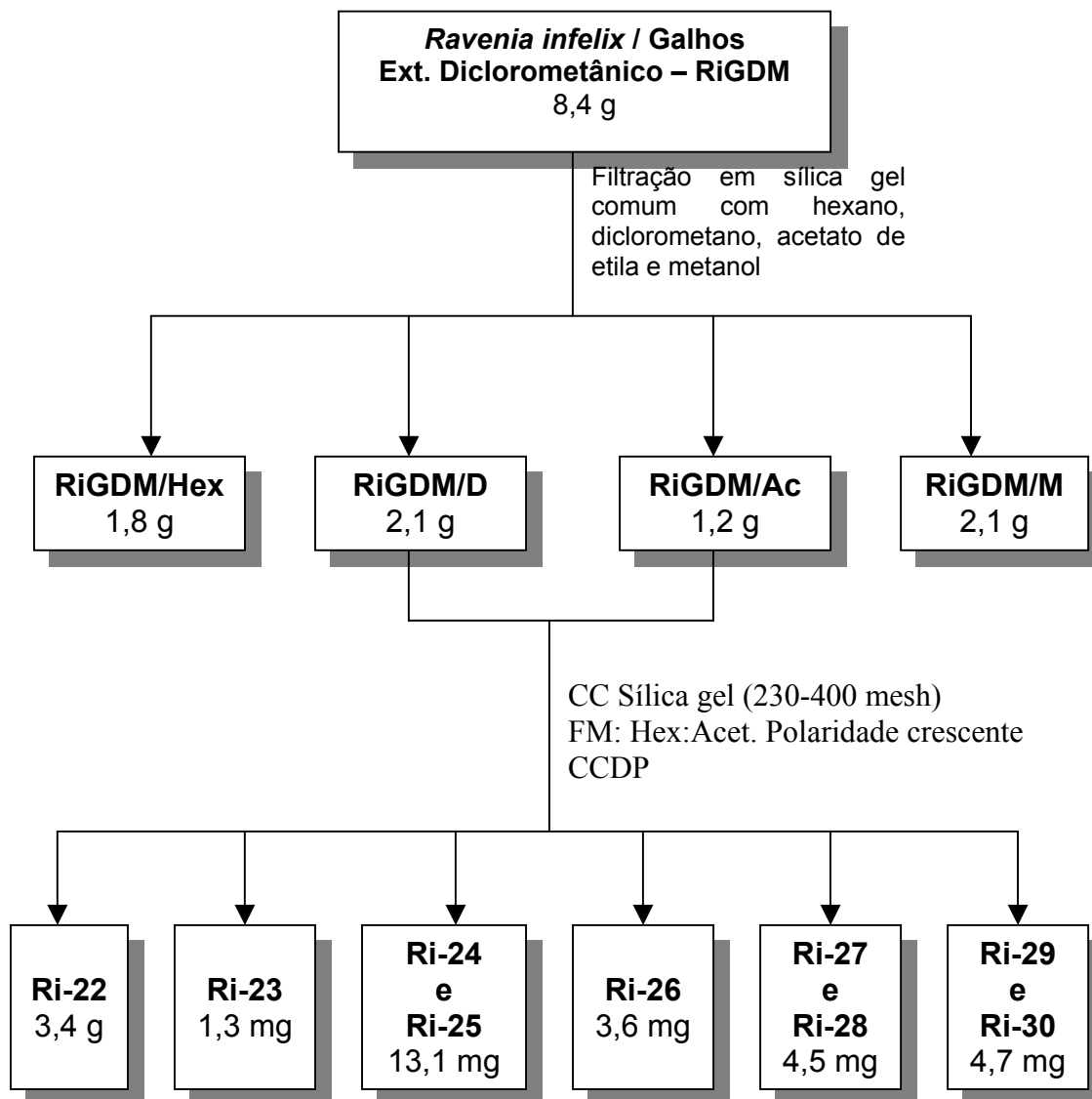
O extrato metanólico bruto dos galhos foi fracionado inicialmente por partição líquido-líquido. Os solventes utilizados foram: metanol, água, diclorometano, acetato de etila. O procedimento adotado para o fracionamento do extrato metanólico dos galhos está representado no esquema 2.3.1.8.



ESQUEMA 2.3.1.8 – Partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto dos galhos de *Ravenia infelix*.

2.3.1.2.2. Fracionamento do Extrato RiGDM de *Ravenia infelix*

O extrato RiGDM, oriundo da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de *Ravenia infelix*, foi submetido a uma CC em sílica comum (70-230 mesh) utilizando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol obtendo-se 4 subfrações. As substâncias puras foram originadas das subfrações RiGDM/D e RiGDM/Ac, através da aplicação de CC em sílica gel (230 – 400 mesh) utilizando como eluentes hexano-acetona com polaridade crescente, bem como CCDP (gel de sílica 60 F₂₅₄, $\phi = 2,0$ mm) utilizando como eluente hexano-diclorometano-acetona (2:2:1), conforme esquema 2.3.1.9.



ESQUEMA 2.3.1.9 – Fracionamento do extrato RiGDM dos Galhos de *Ravenia infelix*.

2.4. Ensaio Tripanocida “*in vitro*” Sobre a Forma Tripomastigota de *T. cruzi*

Os ensaios foram realizados no Departamento de Análises Clínicas, Toxológicas e Bromatológicas da USP – Ribeirão Preto. Para a realização do ensaio foi utilizado o sangue infectado com o *Trypanosoma cruzi*, obtido através de punção cardíaca de camundongos albinos Swiss infectados experimentalmente com a cepa Y do parasita. Esta cepa é originária de um caso humano da doença de Chagas isolado por NUSSENZWEIG et al. (1953) e vem sendo mantida por passagens sucessivas em camundongos, bem como através da criação do próprio hospedeiro (triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*). O sangue dos camundongos foi retirado após sete dias do contágio, onde ocorre o pico da parasitemia. O sangue do camundongo infectado foi misturado com sangue de camundongo não infectado para se atingir uma população de 50 a 100 formas tripomastigotas em 50 campos microscópicos, resultando numa concentração de 2×10^6 formas tripomastigotas/mL. Como anticoagulante foi utilizado citrato de sódio ($C_6H_8O_7$) a 3,8% e pH 7,3 na proporção de um volume de citrato para três de sangue infectado. Em uma placa de microtitulação com 96 poços foram colocados 0,8 mg de extrato bruto em 195 μ L de sangue infectado e 5 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido), sendo este último usado para aumentar a dissolução da amostra no sangue, resultando em uma concentração de 4 mg de extrato bruto por 1mL de sangue (4 mg /mL). Em seguida, todo material foi incubado a uma temperatura de 4°C por 24 horas. Como controle positivo e negativo foi utilizado o sangue infectado e o sangue infectado com violeta de genciana a uma concentração de 250 μ g/mL, respectivamente. Após o período de incubação, o número de parasitas foi determinado colocando-se uma alíquota de 5 μ L de sangue sobre uma lâmina coberta com uma lamínula de 22 x 22 mm e contando-se os parasitas em 50 campos microscópicos, segundo a técnica descrita por BRENER (1962). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para substâncias puras utilizou-se as concentrações de 100, 250 e 500 μ g/mL. O resultado do ensaio foi expresso em porcentagem de lise.

2.5. Ensaio de Inibição da Atividade da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *T. cruzi* (TcGAPDH)

Os ensaios foram realizados no Instituto de Física da USP/São Carlos. A TcGAPDH usada no ensaio de inibição enzimática é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*. A preparação e purificação da enzima TcGAPDH segue procedimento descrito por SOUZA et al. (1998). A atividade da enzima tem sido determinada de acordo com a modificação de um procedimento já descrito na literatura (BARBOSA & NAKANO, 1987), através da medida espectrofotométrica da formação do NADH em 30 s a 340 nm.

A mistura reacional contém (volume final de 1,0 mL): 50 mM de tampão tris-HCl pH 8,6 com 1 mM de EDTA e 1 mM de β -mercapto-etanol; 30 mM de arseniato de sódio ($\text{Na}_3 \text{AsO}_3$); 2,5 mM de NAD^+ ; 0,3 mM de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e 5 μL (4-9 μg) da enzima (concentração segundo BRADFORD, 1976). A reação inicia-se após a adição da enzima. O resultado da reação enzimática, acompanhada no espectrofotômetro a 340 nm, é obtido pela diferença de absorbância entre os tempos $t = 30 \text{ s}$ e $t = 0 \text{ s}$. A atividade específica da enzima (U) é calculada pela fórmula:

$$U/\text{mg} = \left[\frac{\left(\frac{\Delta \text{absorbância}}{\Delta t (\text{min})} \right) \times \text{volume da cubeta}}{\epsilon \text{NADH} \times \text{volume de enzima} \times [\text{enzima}]} \right]$$

onde: $\Delta t = 0,5 \text{ min}$; volume da cubeta = 1,0 mL; $\epsilon \text{NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; volume de enzima = 0,005 mL; [enzima] = concentração da enzima em mg/mL.

Para os ensaios com extratos de plantas, bem como substâncias puras, soluções são preparadas (extratos 10 mg/mL e substâncias puras 1,0 mg/mL) e adicionadas a mistura reacional. A concentração final de DMSO no ensaio é de 10% e não interfere na atividade da enzima. Os extratos são testados nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e as substâncias puras a 100 $\mu\text{g/mL}$, inicialmente. Se a inibição observada for superior a 50%, a substância pura é ensaiada novamente em

concentrações menores até a inibição de 50% (IC₅₀). Todas as medidas são tomadas em triplicata e o valor médio é calculado. Como controle positivo realiza-se um experimento em branco com 10% de DMSO adicionado ao meio reacional. A atividade inibitória é calculada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ atividade inibitória} = 100 - \left[\frac{\text{U/mg substância pura ou extrato} \times 100}{\text{U/mg controle}} \right]$$

2.6. Ensaio de Inibição da Atividade da Enzima Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*

Os ensaios foram realizados no Instituto de Física da USP/São Carlos. A APRT usada no ensaio de inibição enzimática é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*. A preparação e purificação da enzima APRT segue procedimento descrito por LAEMMLI (1970). A atividade da enzima tem sido determinada de acordo com a modificação de um procedimento já descrito na literatura (TUTTLE & KRENITSKY, 1980), através da medida espectrofotométrica da formação do AMP em 60 s a 259 nm.

A mistura reacional contém: 250 µL do MIX [2,5 mL (1 M) de tampão tris-HCl pH 7,4; 1,4 mL (10 mM) de PRPP; 50 µL (5 M) de MgCl₂; 7,5 mL de água e 1,0 mL (2,5 mM) da enzima adenina], 250 µL de água e 3,7 µL de APRT. A reação inicia-se após a adição da enzima. O resultado da reação enzimática, acompanhada no espectrofotômetro a 259 nm, é obtido pela diferença de absorbância entre os tempos t = 60 s e t = 0 s. A atividade específica da enzima (U) é calculada pela fórmula:

$$U/mg = \left[\frac{\left(\frac{\Delta \text{ absorb\~{a}ncia}}{\Delta t \text{ (min)}} \right) \times \text{volume da cubeta}}{\epsilon_{AMP} \times \text{volume de enzima} \times [\text{enzima}]} \right]$$

onde: $\Delta t = 1 \text{ min}$; volume da cubeta = 0,5 mL; $\epsilon_{AMP} = 1,24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; volume de enzima = 3,7 μL ; [enzima] = concentraç~{a}o da enzima em mg/mL.

Para os ensaios com extratos de plantas, bem como subst~{a}ncias puras, soluç~{o}es s~{a}o preparadas (extratos 10 mg/mL e subst~{a}ncias puras 1,0 mg/mL) e adicionadas a mistura reacional. A concentraç~{a}o final de DMSO no ensaio ~{e} de 10% e n~{a}o interfere na atividade da enzima. Os extratos s~{a}o testados nas concentraç~{o}es de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e as subst~{a}ncias puras a 100 $\mu\text{g/mL}$, inicialmente. Se a inibiç~{a}o observada for superior a 50%, a subst~{a}ncia pura ~{e} ensaiada novamente em concentraç~{o}es menores at~{e} a inibiç~{a}o de 50% (IC_{50}). Todas as medidas s~{a}o tomadas em triplicata e o valor m~{e}dio ~{e} calculado. Como controle positivo realiza-se um experimento em branco com 10% de DMSO adicionado ao meio reacional. A atividade inibit~{o}ria ~{e} calculada pela f~{o}rmula abaixo:

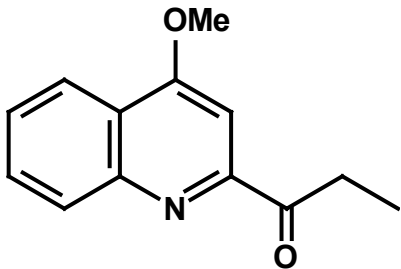
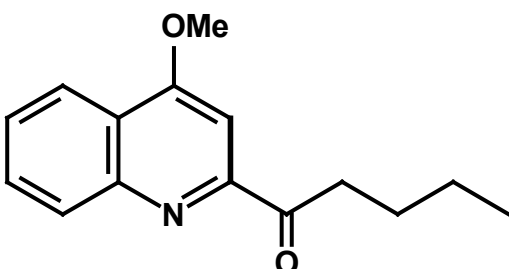
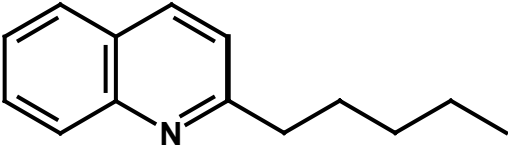
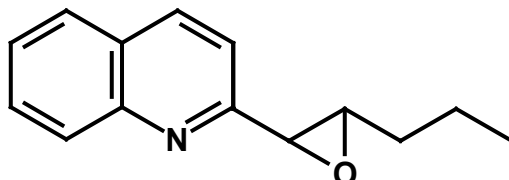
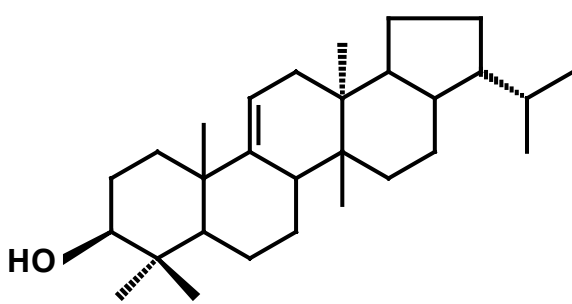
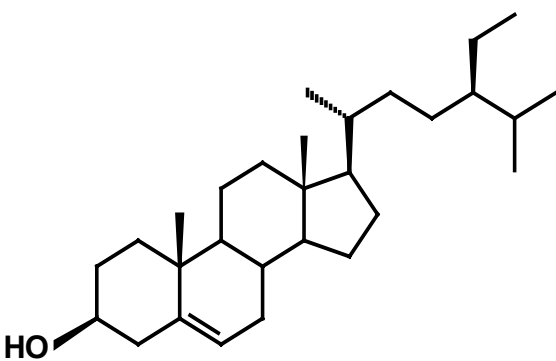
$$\% \text{ atividade inibit~{o}ria} = 100 - \left[\frac{U/mg \text{ subst\~{a}ncia pura ou extrato} \times 100}{U/mg \text{ controle}} \right]$$

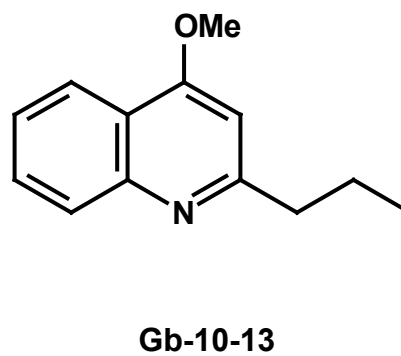
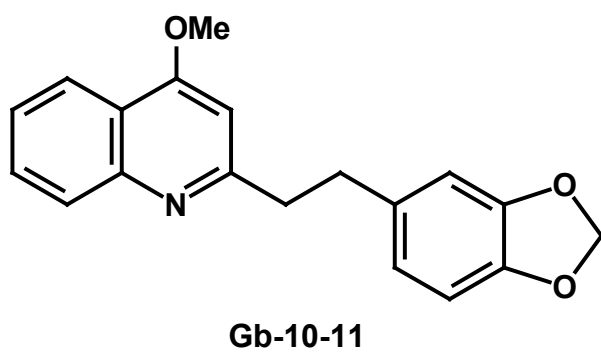
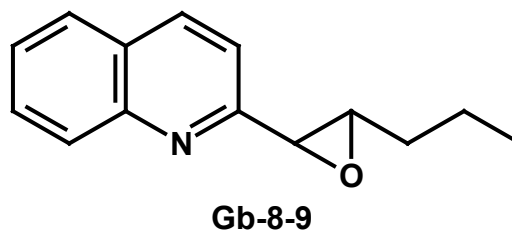
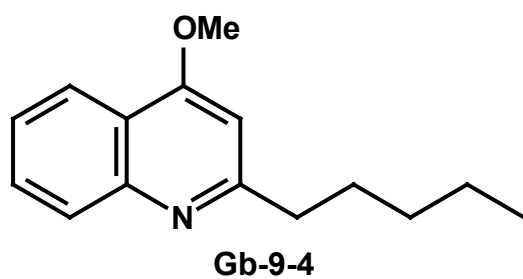
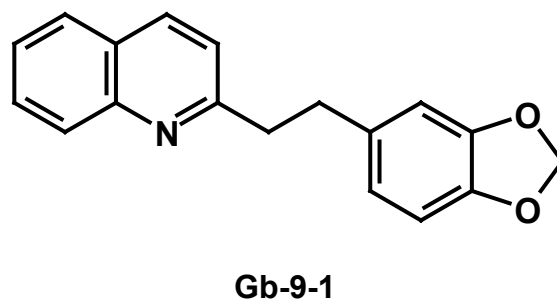
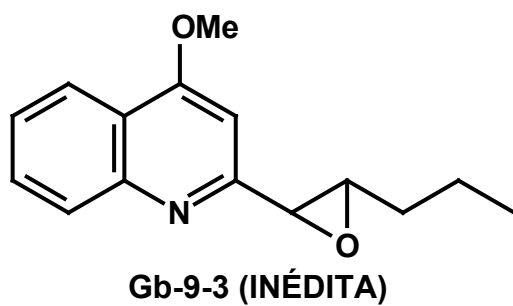
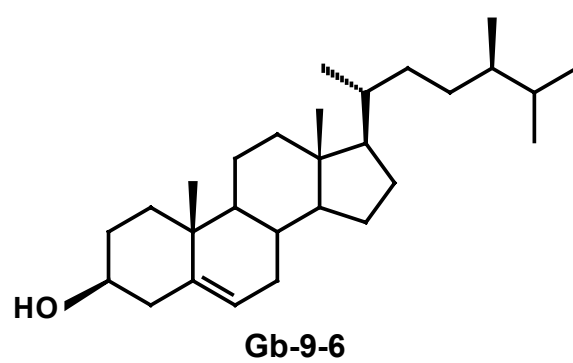
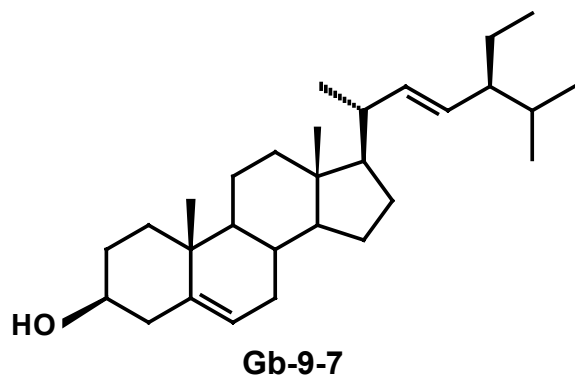
RESULTADOS E DISCUSSÃO

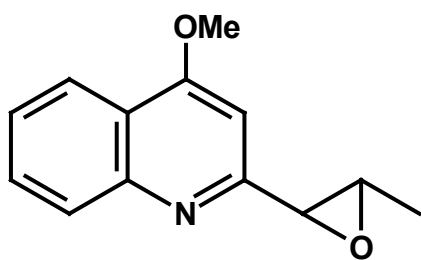
3. Resultados e Discussão

3.1. Constituintes Químicos Isolados de *Galipea bracteata*

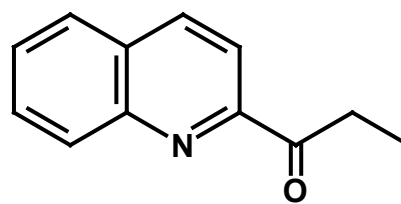
TABELA 3.1 – Metabólitos secundários isolados de *Galipea bracteata*.

 <p>Gb-6-2 (INÉDITA)</p>	 <p>Gb-5/6-20 (INÉDITA)</p>
 <p>Gb-15-14</p>	 <p>Gb-8-9 (INÉDITA)</p>
 <p>Gb-8-10</p>	 <p>Gb-9-8</p>

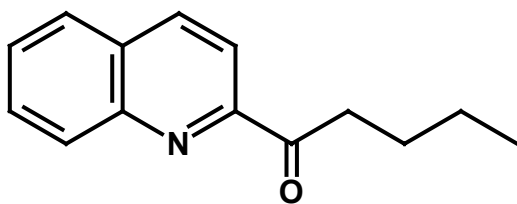




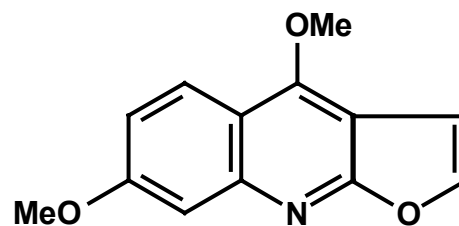
Gb-10-12 (INÉDITA)



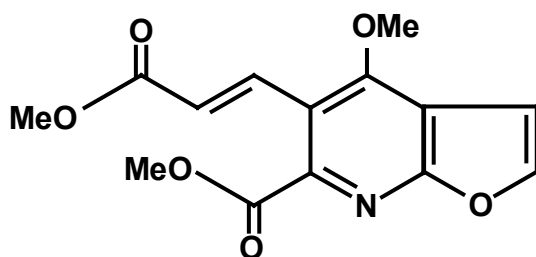
Gb-5/6-19 (INÉDITA)



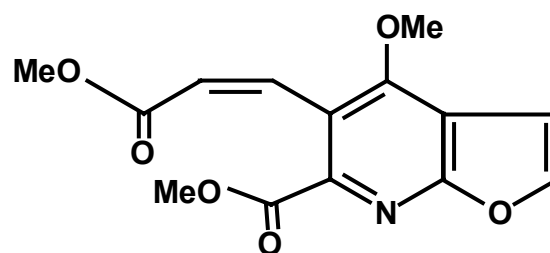
Gb-5/6-21 (INÉDITA)



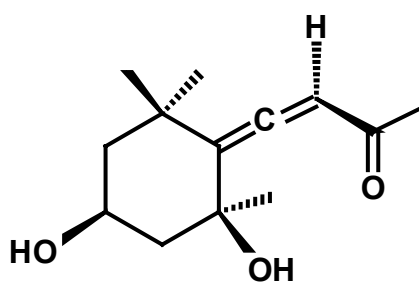
Gb-18-15



Gb-19-17



Gb-19-16



Gb-20-18

3.1.1. Identificação da Substância Gb-9-1

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **Gb-9-1** (Fig. 3.2) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,08 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); δ 7,77 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,2$ Hz); δ 7,70 (1H, ddd, $J = 8,2$; $7,0$ e $1,2$ Hz) e δ 7,49 (1H, ddd, $J = 8,2$; $7,0$ e $1,2$ Hz) foram relacionados a um anel aromático *orto* dissustituído; os sinais em δ 7,21 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) e δ 8,04 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) foram associados aos hidrogênios nas posições 3 e 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 6,76 (1H, d, $J = 1,5$ Hz); δ 6,70 (1H, d, $J = 0,6$ Hz) e δ 6,67 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,5$ Hz) e os sinais em δ 3,23 (2H, m) e δ 3,07 (2H, m) foram relacionados a um grupo feniletil e o sinal em δ 5,91 (2H, s) foi associado aos hidrogênios de um anel metilenodioxí.

O espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz) da substância **Gb-9-1** (Fig. 3.3) apresentou 18 sinais. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig. 3.4) revelou a presença de 6 carbonos não hidrogenados (C), 9 carbonos metínicos (CH), 3 carbonos metilênicos (CH_2) (Tab. 3.2).

O espectro de massas da substância **Gb-9-1** (Fig. 3.5) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z em 277 daltons, indicando a presença de nitrogênio na molécula e estando compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2$.

A análise dos dados espectroscópicos discutidos permitiu sugerir a estrutura do alcalóide 2-(3', 4'-metilenodioxifeniletil)quinolina para a substância **Gb-9-1** (Fig. 3.1). A comparação com dados da literatura (VIEIRA & KUBO, 1990; FOURNET et al., 1989), confirmou a estrutura proposta para a substância **Gb-9-1** (Tab. 3.3).

TABELA 3.2 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) de **Gb-9-1** com a literatura.

2-(3', 4'-metilenodioxifeniletil)quinolina (Gb-9-1)		
Hidrogênio	Gb-9-1^(a) δ (ppm), J (Hz)	Literatura^(b) δ (ppm), J (Hz)
3	7,21 d (8,4)	7,20 d (8,5)
4	8,04 d (8,4)	8,03 d (8,5)
5	7,77 dd (8,2 e 1,2)	7,76 dd (7,8; 1,2)
6	7,49 ddd (8,2; 7,0 e 1,2)	7,47 td (7,8; 7,8 e 1,2)
7	7,70 ddd (8,2; 7,0 e 1,2)	7,67 td (7,8; 7,8 e 1,2)
8	8,08 d (8,5)	8,01 d (7,8)
2'	6,76 d (1,5)	6,72 d (1,2)
5'	6,70 d (0,6)	6,69 d (7,8)
6'	6,67 dd (8,0 e 1,5)	6,65 dd (7,8 e 1,2)
7'	3,07 m	3,08 t (7,8)
8'	3,23 m	3,23 t (7,8)
O ₂ CH ₂	5,91 s	5,90 s

(a) CDCl₃, 200 MHz, (b) CDCl₃, 500 MHz

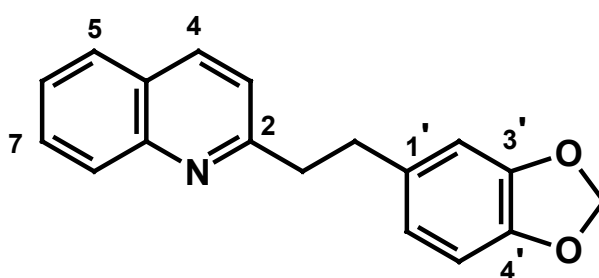


FIGURA 3.1 – Estrutura química do alcalóide **Gb-9-1**.

TABELA 3.3 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (δ) de **Gb-9-1** com a literatura.

2-(3', 4'-metilenodioxifeniletil)quinolina (Gb-9-1)				
Carbono	Padrão de Hidrogenação	Gb-9-1^(a) δ (ppm)	Literatura^(b) δ (ppm)	
2	C	161,8	161,7	
3	CH	121,7	121,3	
4	CH	136,4	136,2	
5	CH	126,9	126,8	
6	CH	127,7	127,5	
7	CH	126,0	125,8	
8	CH	129,6	129,4	
9	C	128,9	128,9	
10	C	148,0	148,0	
1'	C	135,5	135,4	
2'	CH	108,3	108,1	
3'	C	147,7	147,6	
4'	C	145,9	145,7	
5'	CH	109,1	109,0	
6'	CH	121,4	121,2	
7'	CH ₂	35,7	35,6	
8'	CH ₂	41,2	41,2	
O ₂ CH ₂	CH ₂	100,9	100,7	

(a) CDCl₃, 50,3 MHz, (b) CDCl₃, 125 MHz

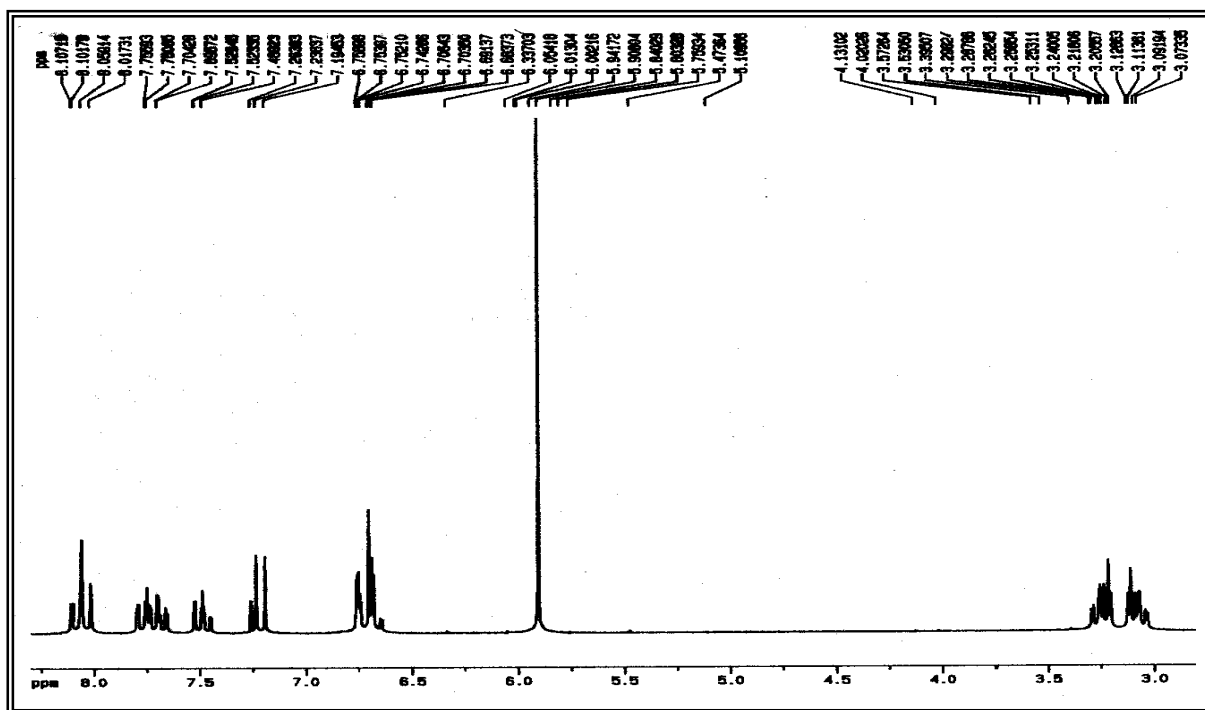


FIGURA 3.2 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-9-1** (200 MHz, CDCl_3).

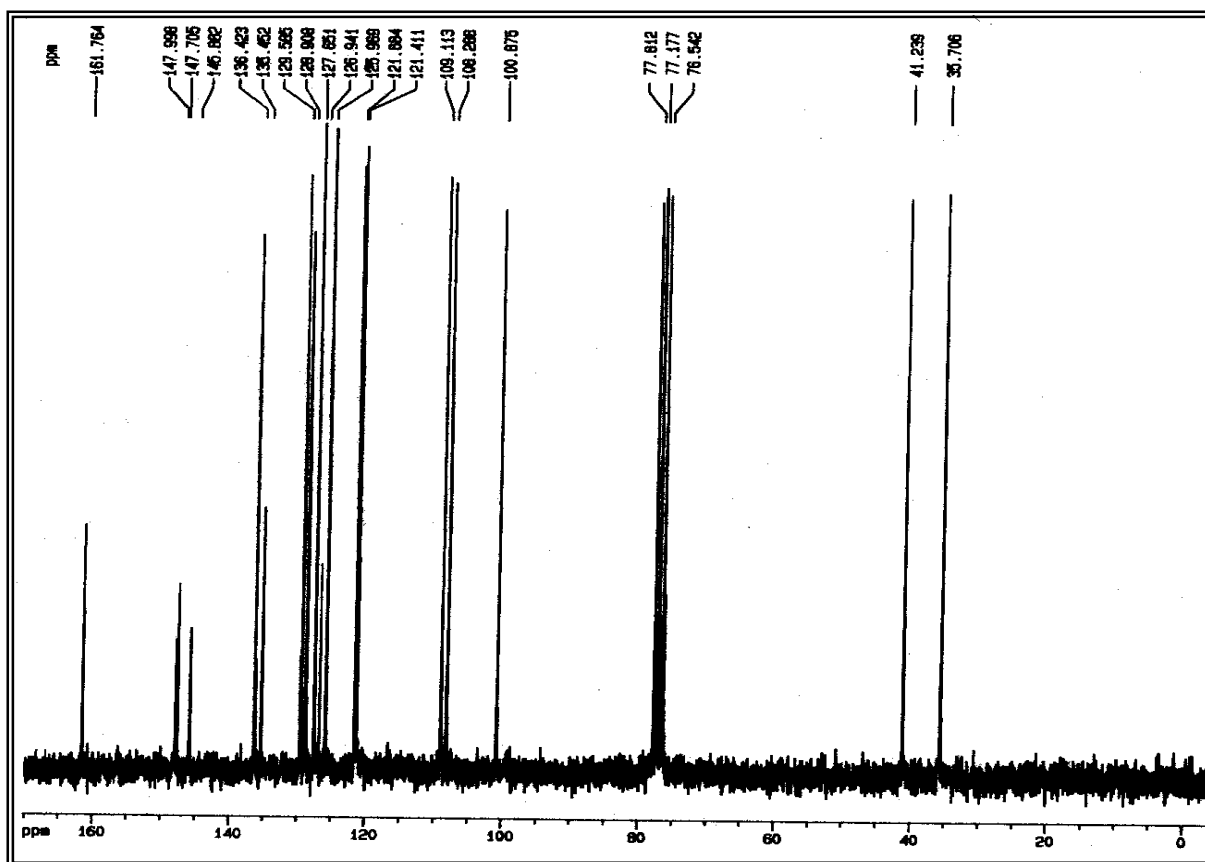


FIGURA 3.3 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-9-1** (50 MHz, CDCl_3).

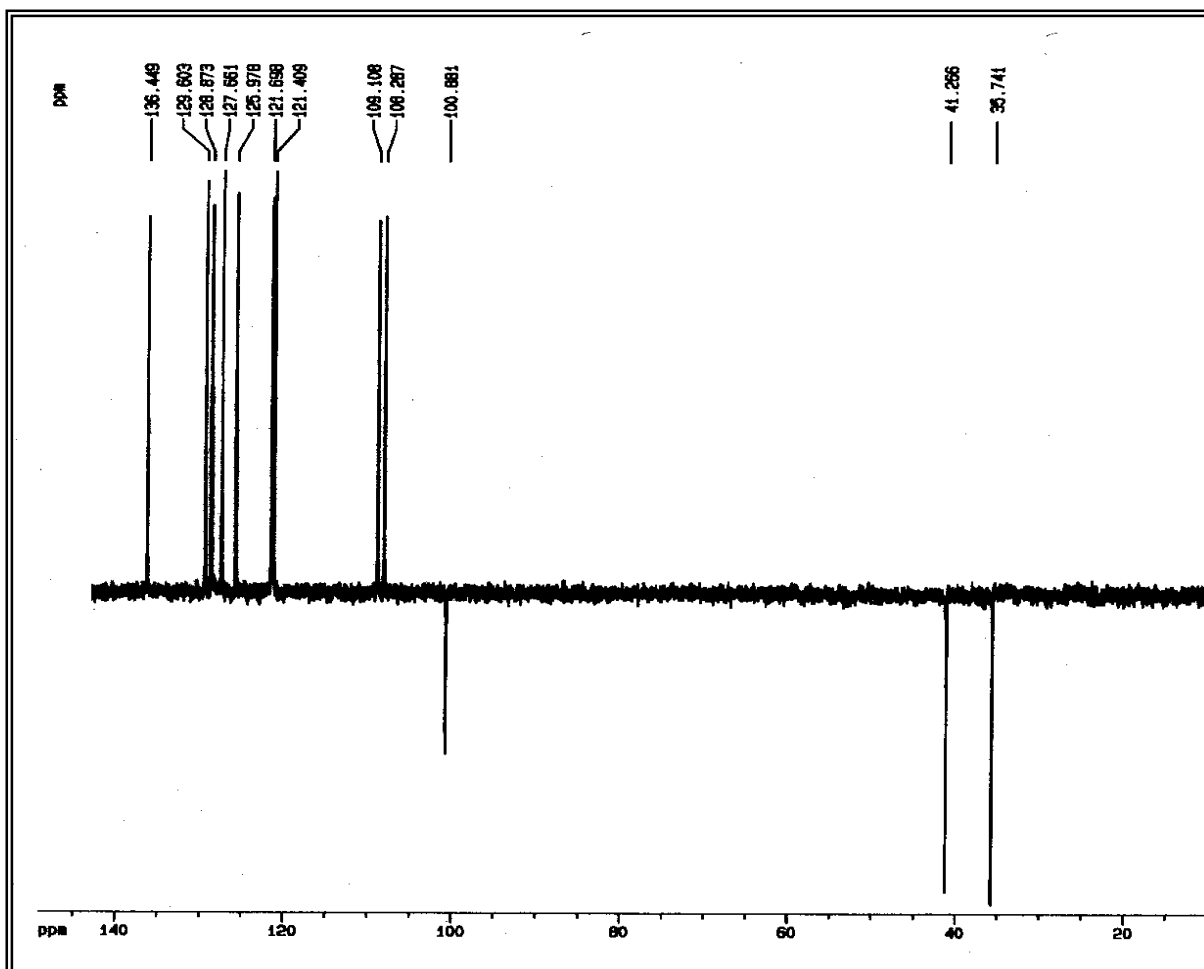


FIGURA 3.4 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-9-1** (50 MHz, CDCl₃).

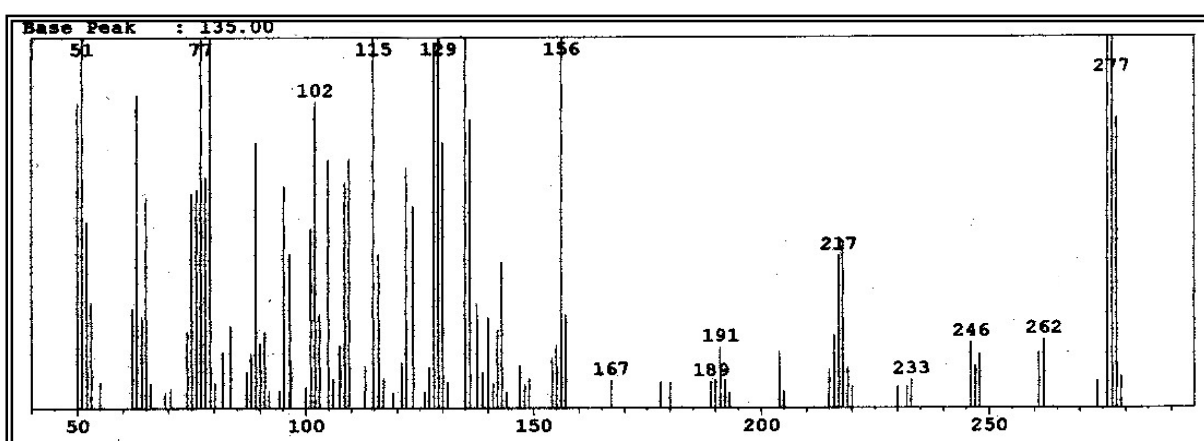


FIGURA 3.5 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-9-1** (IE – 70 eV).

3.1.2. Identificação da Substância Gb-6-2

A substância **Gb-6-2** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.10) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 215 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{13}NO_2$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) da substância **Gb-6-2** (Fig. 3.7) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,22 (1H, ddd, $J = 8,5; 1,5$ e $0,7$ Hz), δ 8,11 (1H, ddd, $J = 8,5; 1,5$ e $0,7$ Hz), δ 7,75 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,5$ Hz), δ 7,59 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; o sinal em δ 7,51 (1H, s) foi associado a um hidrogênio na posição 3; o sinal em δ 4,11 (3H, s) foi relacionado a grupo metila ligado a heteroátomo; os sinais em δ 3,41 (2H, q, $J = 7,3$ Hz) e em δ 1,27 (3H, t, $J = 7,3$ Hz) associados a hidrogênios metilênicos e metílicos terminais, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-6-2** (Fig. 3.8) apresentou 13 sinais, os quais, comparados com o espectro DEPT 135° (Fig. 3.9) e o mapa de contorno HSQC (Fig. 3.14), mostrou as correlações entre os hidrogênios e carbonos a uma ligação (Tab. 3.4), revelando a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), cinco carbonos metínicos (CH), um carbono metilênico (CH_2) e dois carbonos metílicos (CH_3). O sinal em δ 203,5 sugeriu a presença de uma carbonila de cetona na posição 1' da cadeia lateral. O sinal em δ 56,0 está associado à metoxila aromática na posição 4 do anel piridínico. Os sinais em δ 30,8, δ 8,1 estão relacionados aos carbonos metilênico e metílico terminal da cadeia lateral propan-1'-ona da substância **Gb-6-2**.

O mapa de contorno COSY 1H - 1H da substância **Gb-6-2** (Fig. 3.11) mostrou as correlações entre os hidrogênios δ 8,22, δ 8,11, δ 7,75 e δ 7,59 confirmando a presença do anel aromático *orto* dissubstituído.

O mapa de contorno HMBC da substância **Gb-6-2** (Fig. 3.15) mostrou as correlações dos hidrogênios aromáticos em δ 8,22 com os carbonos em δ 130,1, δ 148,2 e δ 163,0 (J^3); em δ 8,11 com δ 122,5 e δ 127,4 (J^3); em δ 7,75 com δ 121,9 e δ 148,2 (J^3); em δ 7,59 com δ 122,5 e δ 129,9 (J^3), confirmando a estrutura de um anel aromático *orto* dissubstituído; do hidrogênio em δ 7,51 com os carbonos em δ

122,5 e δ 203,5 (J^3) e δ 163,0 (J^2); dos hidrogênios da metoxila em δ 4,11 com o carbono em δ 163,0 (J^3); dos hidrogênios alifáticos em δ 3,41 com os carbonos em δ 8,1 e δ 203,5 (J^2); em δ 1,27 com os carbonos em δ 30,8 (J^2) e δ 203,5 (J^3). Estas correlações permitiram deduzir o esqueleto 2-quinolínico para a substância **Gb-6-2** (Tab. 3.5).

A substância **Gb-6-2** (Fig. 3.6), alcalóide 2-quinolínico, trata-se do 4-metoxi-2-(propan-1'-ona)quinolina, inédita na literatura.

TABELA 3.4 – Dados espectrais de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) e DEPT 135° (CDCl_3 , 50 MHz) da substância **Gb-6-2**.

Substância Gb-6-2		
Hidrogênio/carbono	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	163,0 (C)
3	7,51 s	96,9 (CH)
4	-	154,4 (C)
5	8,22 ddd (8,5; 1,5 e 0,7)	121,9 (CH)
6	7,59 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	127,4 (CH)
7	7,75 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	129,9 (CH)
8	8,11 ddd (8,5; 1,5 e 0,7)	130,1 (CH)
9	-	122,5 (C)
10	-	148,2 (C)
1'	-	203,5 (C)
2'	3,41 q (7,3)	30,8 (CH_2)
3'	1,27 t (7,3)	8,1 (CH_3)
4-OCH ₃	4,11 s	56,0 (OCH_3)

TABELA 3.5 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância **Gb-6-2**.

Carbono	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
2	163,0			
3	96,9	7,51	163,0 e 203,5	122,5
4	154,4			
5	121,9	8,22		130,1; 148,2 e 163,0
6	127,4	7,59		122,5 e 129,9
7	129,9	7,75		121,9 e 148,2
8	130,1	8,11		122,5 e 127,4
9	122,5			
10	148,2			
1'	203,5			
2'	30,8	3,41	8,1 e 203,5	
3'	8,1	1,27	30,8	203,5
4-OCH ₃	56,0	4,11		163,0

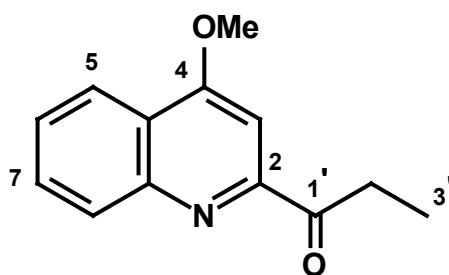


FIGURA 3.6 – Estrutura química do Alcalóide **Gb-6-2**.

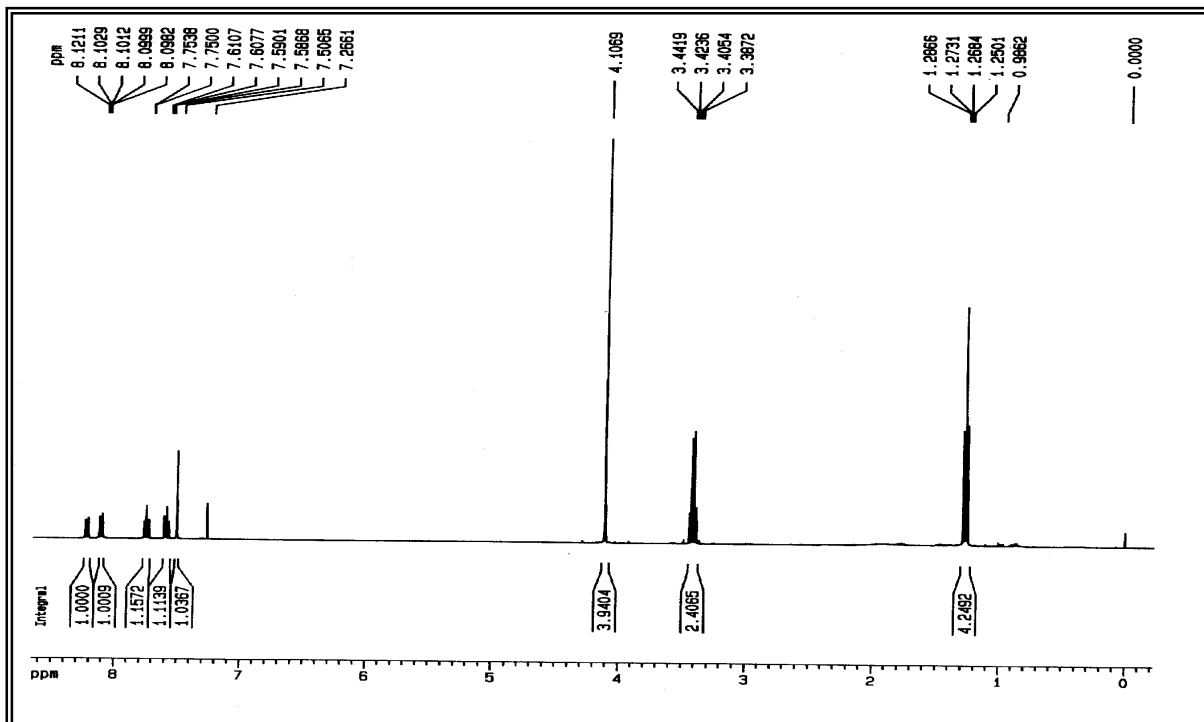


FIGURA 3.7 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-6-2** (400 MHz, CDCl_3).

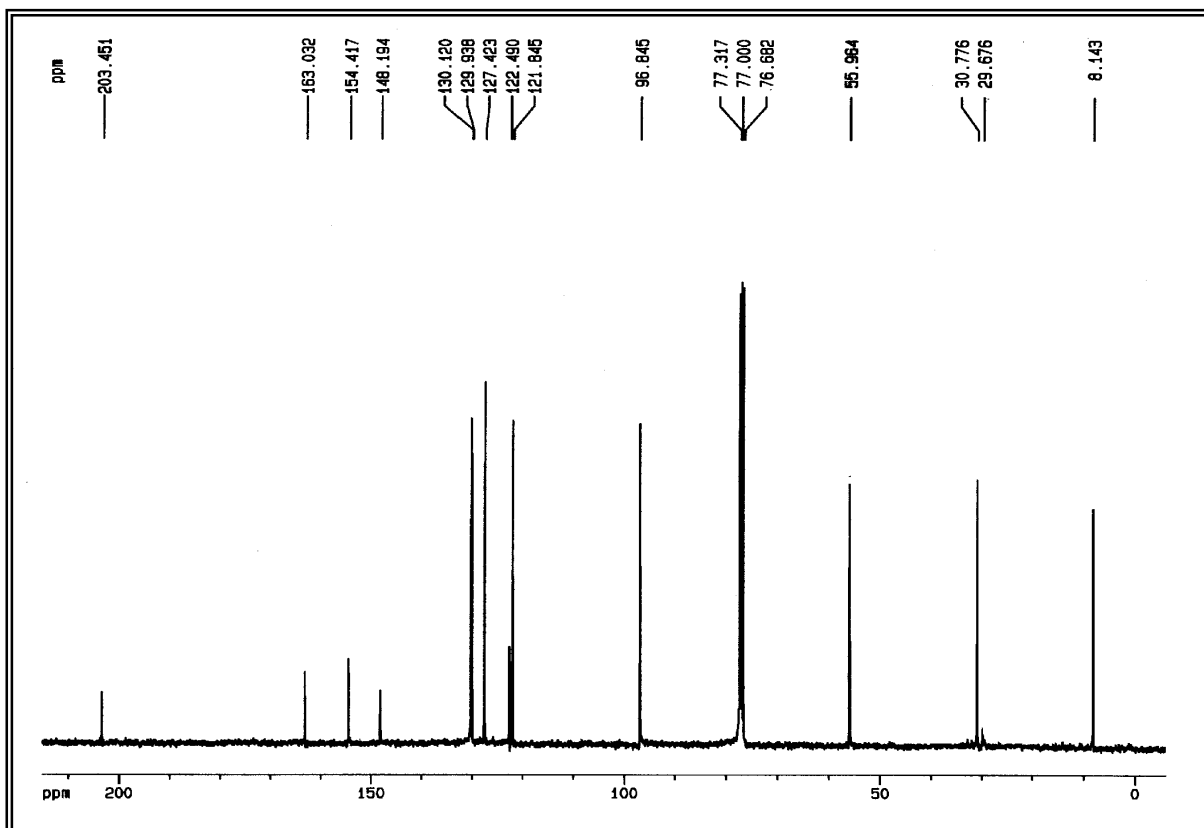


FIGURA 3.8 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-6-2** (100 MHz, CDCl_3).

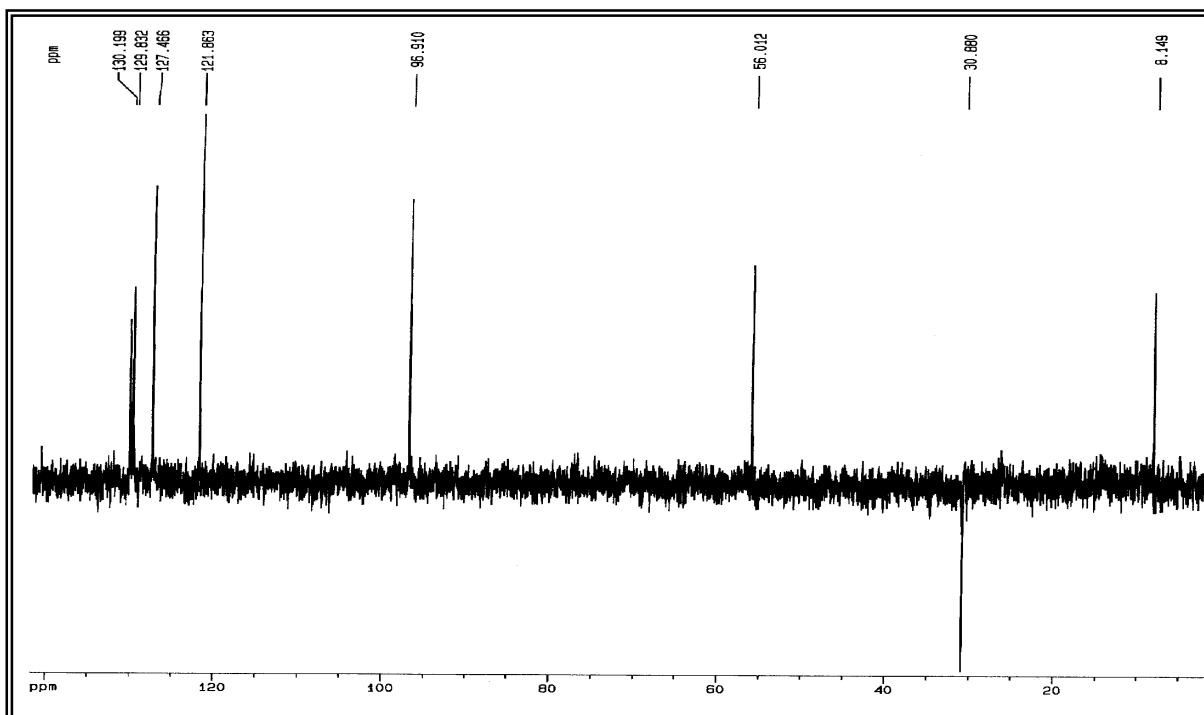


FIGURA 3.9 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-6-2** (50 MHz, CDCl₃).

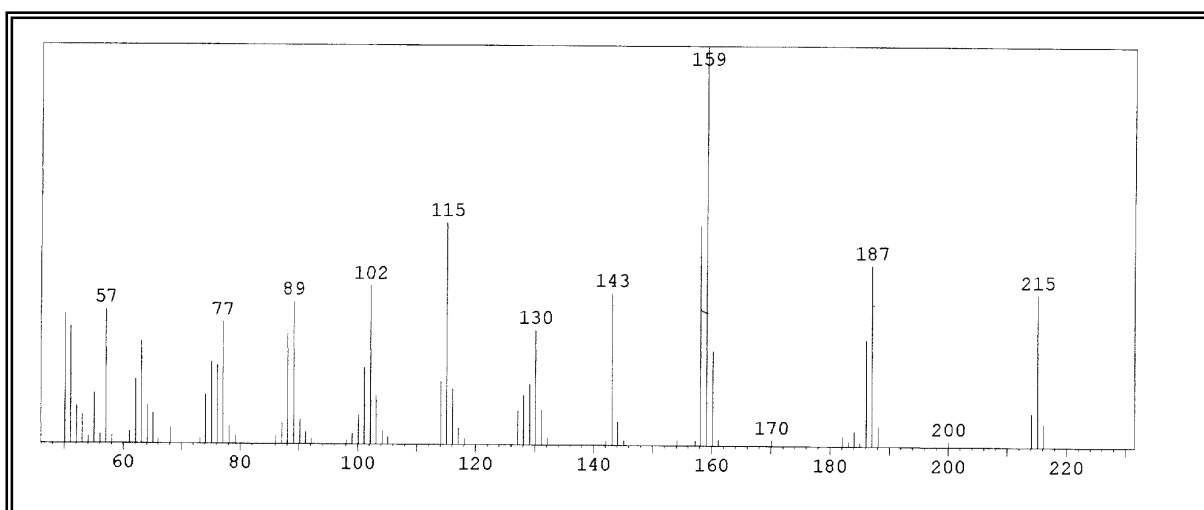


FIGURA 3.10 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-6-2** (IE – 70 eV).

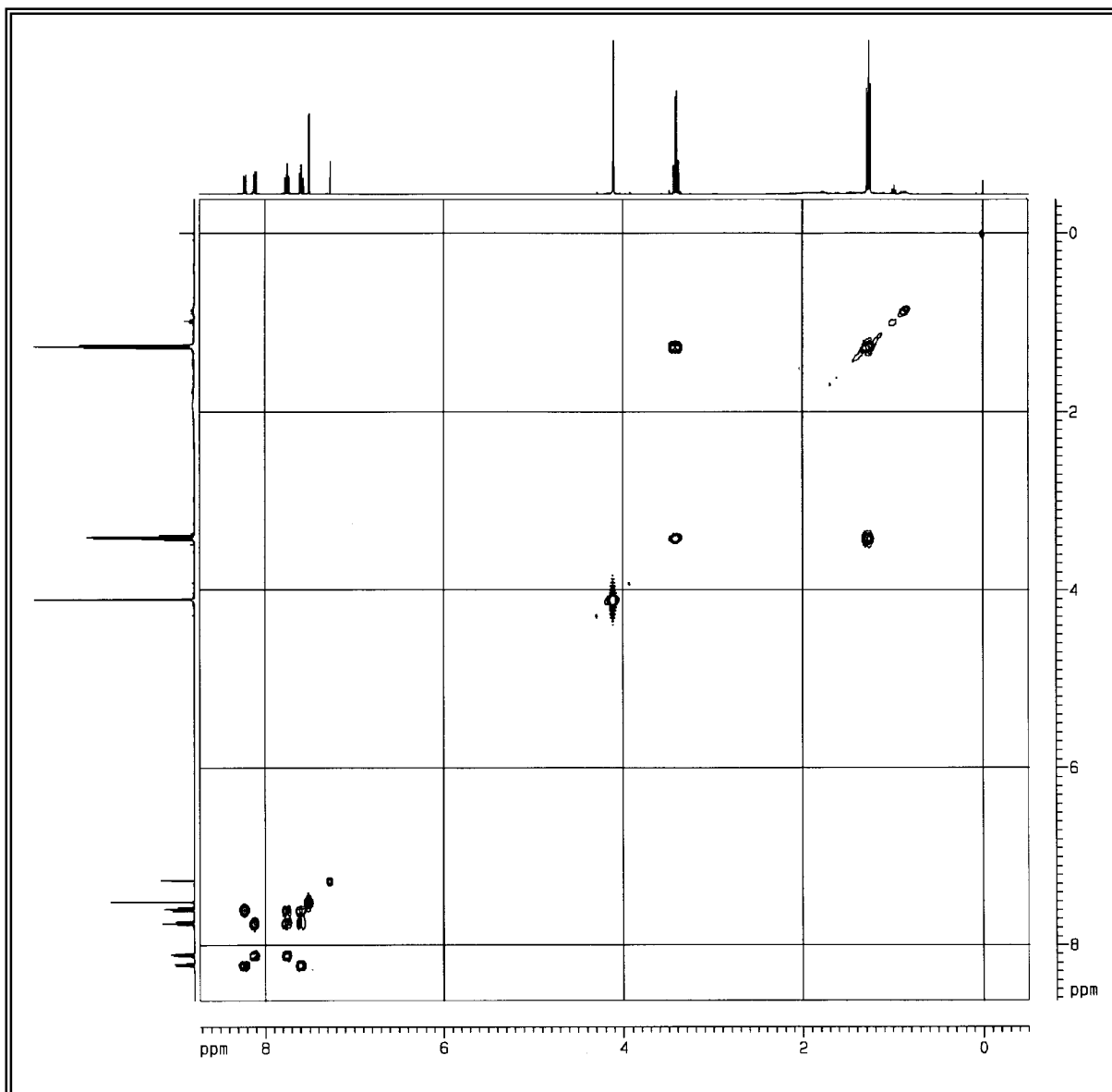


FIGURA 3.11 – Mapa de contorno COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ do alcalóide **Gb-6-2** (400 MHz, CDCl_3).

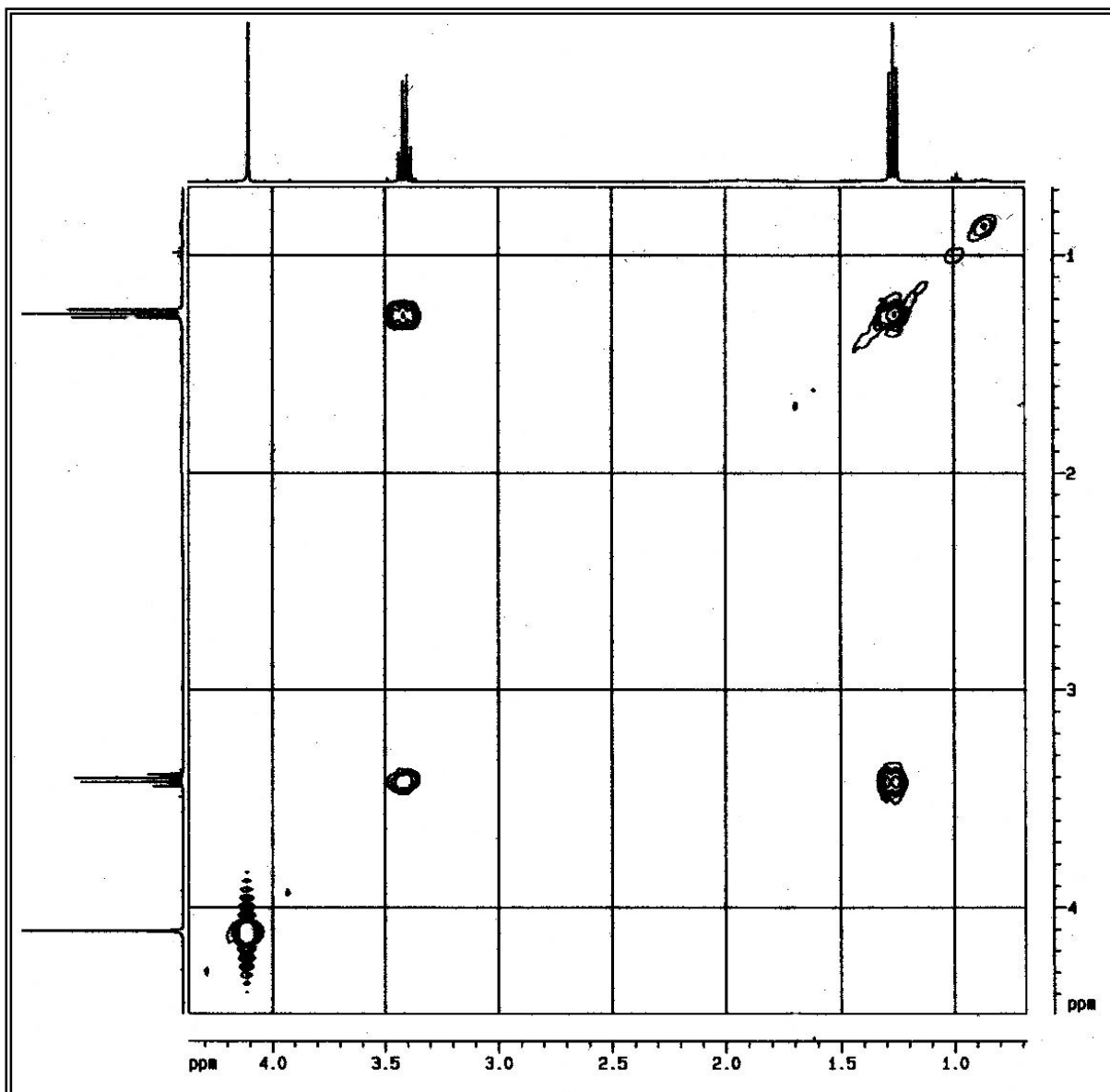


FIGURA 3.13 – Ampliação do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide **Gb-6-2** (400 MHz, CDCl_3) – cadeia lateral.

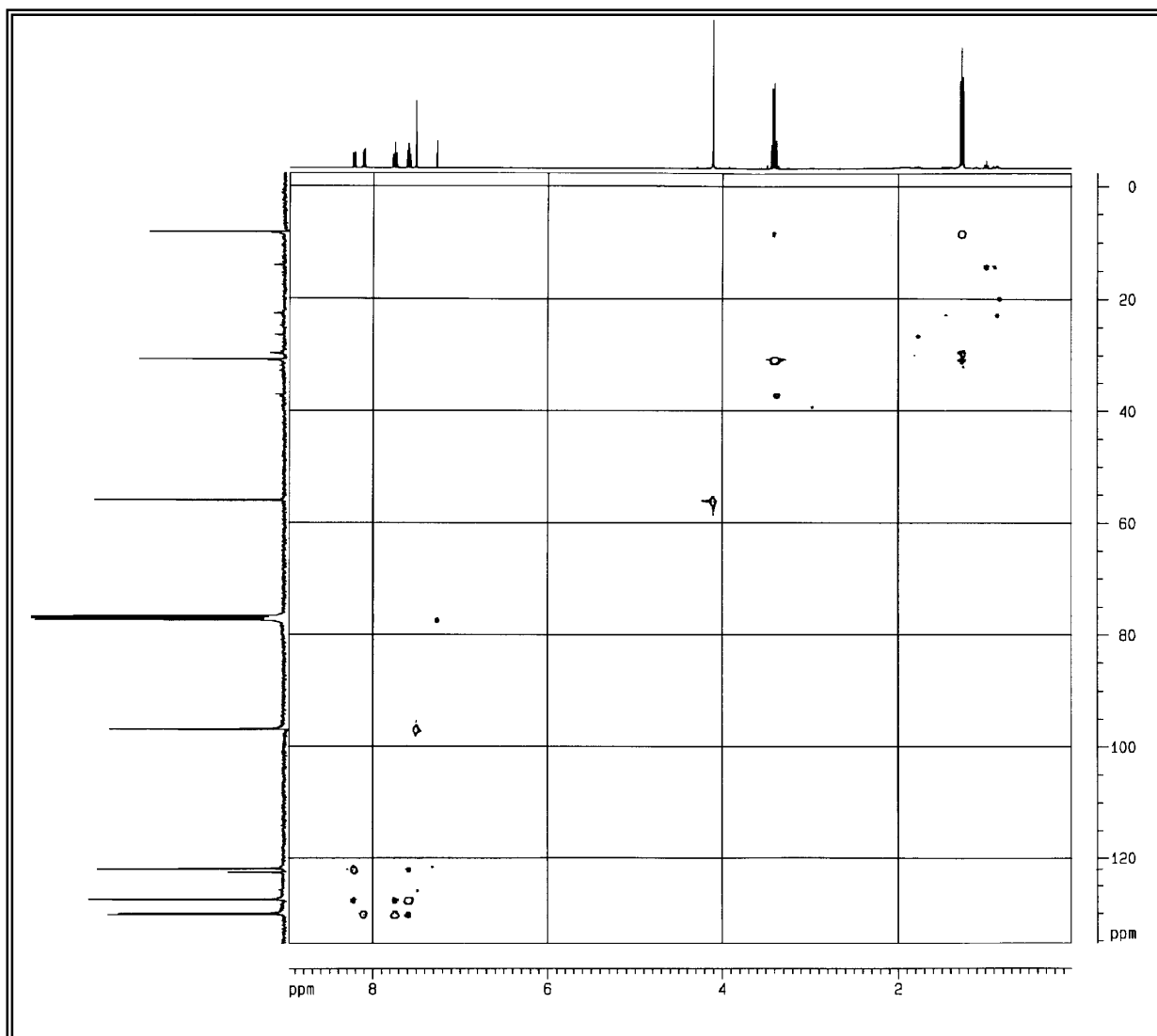


FIGURA 3.14 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide **Gb-6-2** (400 MHz, CDCl₃).

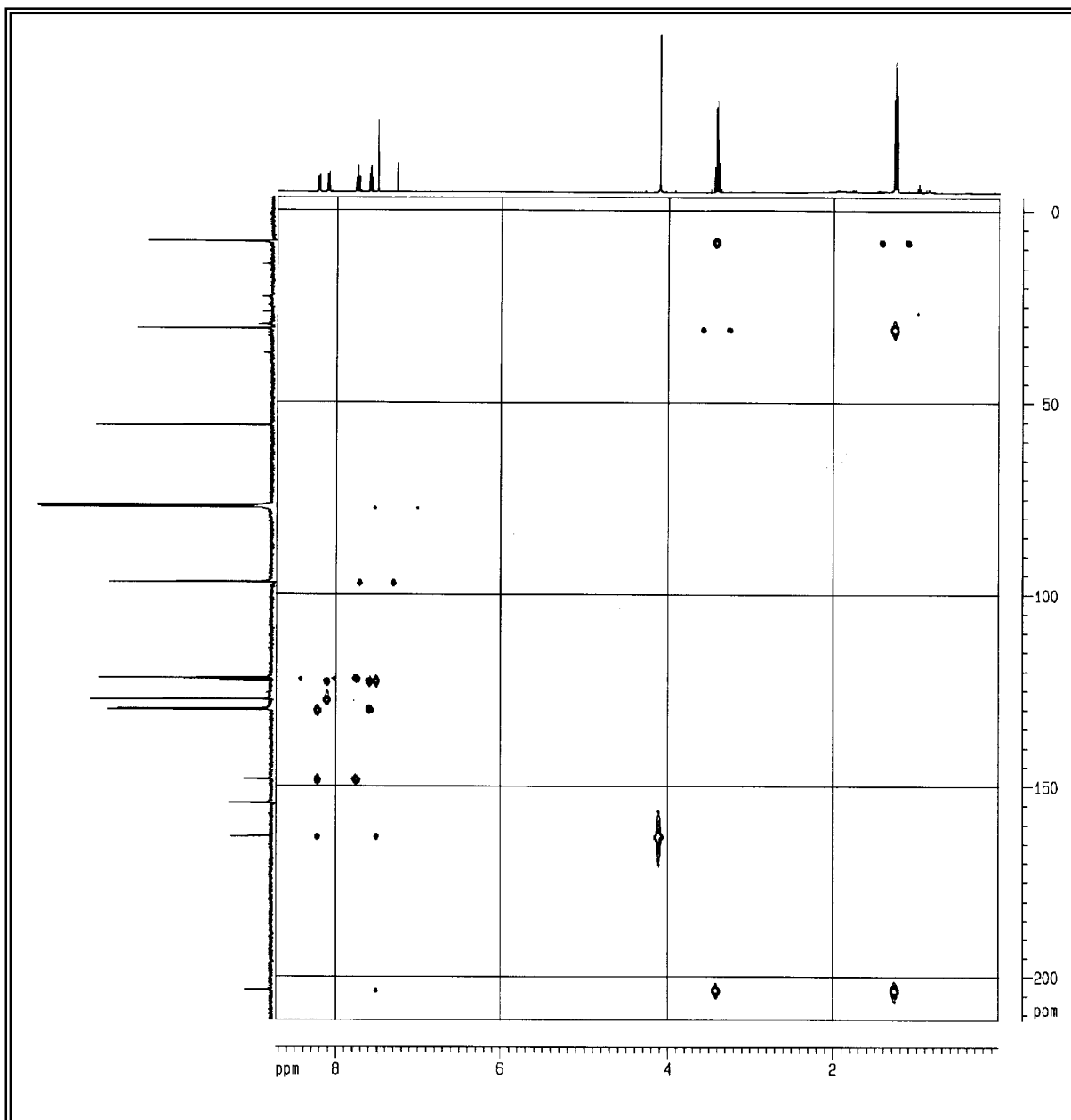


FIGURA 3.15 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide **Gb-6-2** (400 MHz, CDCl_3).

3.1.3. Identificação da Substância Gb-9-3

A substância **Gb-9-3** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.20) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 243 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{17}NO_2$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) da substância **Gb-9-3** (Fig. 3.17) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,16 (1H, dd, $J = 8,5$ e $1,2$ Hz), δ 7,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,69 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,2$ Hz) e δ 7,48 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,2$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissustituído; os sinais em δ 6,64 (1H, s) e em δ 4,04 (3H, s) foram associados a um hidrogênio na posição 3 e a um grupo metila ligado a heteroátomo na posição 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 3,97 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ 3,09 (1H, m), δ 1,79 (2H, m), δ 1,58 (2H, m) e em δ 1,02 (3H, t, $J = 7,0$ Hz) associados a hidrogênios da cadeia lateral epoxipentila, onde a estereoquímica do grupo epóxido é *trans* devido a constante de acoplamento de 2 Hz entre os hidrogênios 1' e 2'.(Tab. 3.6).

O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-9-3** (Fig. 3.18) apresentou 15 sinais, os quais, comparados com o DEPT 135° (Fig. 3.19) e HSQC (Fig. 3.22), mostrou as correlações entre os hidrogênios e carbonos a uma ligação (Tab. 3.6), revelando a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), sete carbonos metínicos (CH), dois carbonos metilênicos (CH_2) e um carbono metílico (CH_3).

O mapa de contorno COSY 1H - 1H da substância **Gb-9-3** (Fig. 3.21) mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ 8,16, δ 7,99, δ 7,69 e δ 7,48 confirmando a presença do anel aromático *orto* dissustituído; entre os hidrogênios em δ 3,97, δ 3,09, δ 1,79, δ 1,59 e δ 1,02, confirmando a presença da cadeia lateral epoxipentila.

O mapa de contorno HMBC da substância **Gb-9-3** (Fig. 3.23) mostrou as correlações dos hidrogênios aromáticos em δ 8,16 com os carbonos em δ 130,2 e δ 148,8 (J^3); em δ 7,99 com δ 121,2, δ 125,7 (J^3); em δ 7,69 com δ 122,0 e δ 148,8 (J^3); em δ 7,48 com δ 121,2 e δ 128,5 (J^3), confirmando a estrutura de um anel aromático *orto* dissustituído; dos hidrogênios em δ 6,64 com o carbonos em δ 121,2 (J^3) e δ 163,5 (J^2); em δ 4,04 com o carbono em δ 163,5 (J^3) confirmando a estrutura do anel piridínico; dos hidrogênios em δ 3,97 com o carbono em δ 159,8 (J^2); em δ 1,79 com

os carbonos em δ 62,4 e δ 19,5 (J^2); em δ 1,58 com os carbonos em δ 14,1 (J^2); em δ 1,02 com os carbonos em δ 19,6 (J^2) e δ 34,4 (J^3) confirmando a estrutura da cadeia lateral epoxipentila. Estas correlações (Tab. 3.7) permitiram deduzir o esqueleto 2-quinolínico para a substância **Gb-9-3**.

A substância **Gb-9-3**, alcalóide 2-quinolínico, trata-se do 4-metoxi-2-(1', 2' -trans-epoxipentil)quinolina, inédita na literatura (Fig. 3.16).

TABELA 3.6 – Dados espectrais de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz) e DEPT 135° (CDCl_3 , 50,3 MHz) da substância **Gb-9-3**.

Hidrogênio/carbono	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2		159,8 (C)
3	6,64 s	95,3 (CH)
4		163,5 (C)
5	8,16 dd (8,5 e 1,2)	122,0 (CH)
6	7,48 ddd (8,5; 6,9 e 1,2)	125,7 (CH)
7	7,69 ddd (8,5; 6,9 e 1,2)	130,2 (CH)
8	7,99 d (8,5)	128,5 (CH)
9		121,2 (C)
10		148,8 (C)
1'	3,97 d (2,0)	59,9 (CH)
2'	3,09 m	62,4 (CH)
3'	1,79 m	34,4 (CH_2)
4'	1,58 m	19,5 (CH_2)
5'	1,02 t (7,0)	14,1 (CH_3)
4-OCH ₃	4,04 s	56,0 (CH_3)

TABELA 3.7 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância **Gb-9-3**.

Carbono	HSQC			HMBC
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
2	159,8			
3	95,3	6,64	163,5	121,2
4	163,5			
5	122,0	8,16		130,2 e 148,8
6	125,7	7,48		121,2 e 128,5
7	130,2	7,69		122,0 e 148,8
8	128,5	7,99		121,2 e 125,7
9	121,2			
10	148,8			
1'	59,9	3,97	159,8	
2'	62,4	3,09		
3'	34,4	1,79	62,4 e 19,5	
4'	19,5	1,58	14,1	
5'	14,1	1,02	19,6	34,4
4-OCH ₃	56,0	4,04		163,5

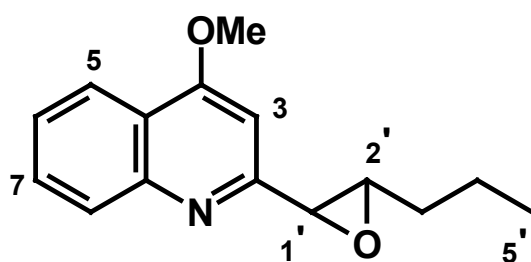


FIGURA 3.16 - Estrutura química do alcalóide **Gb-9-3**.

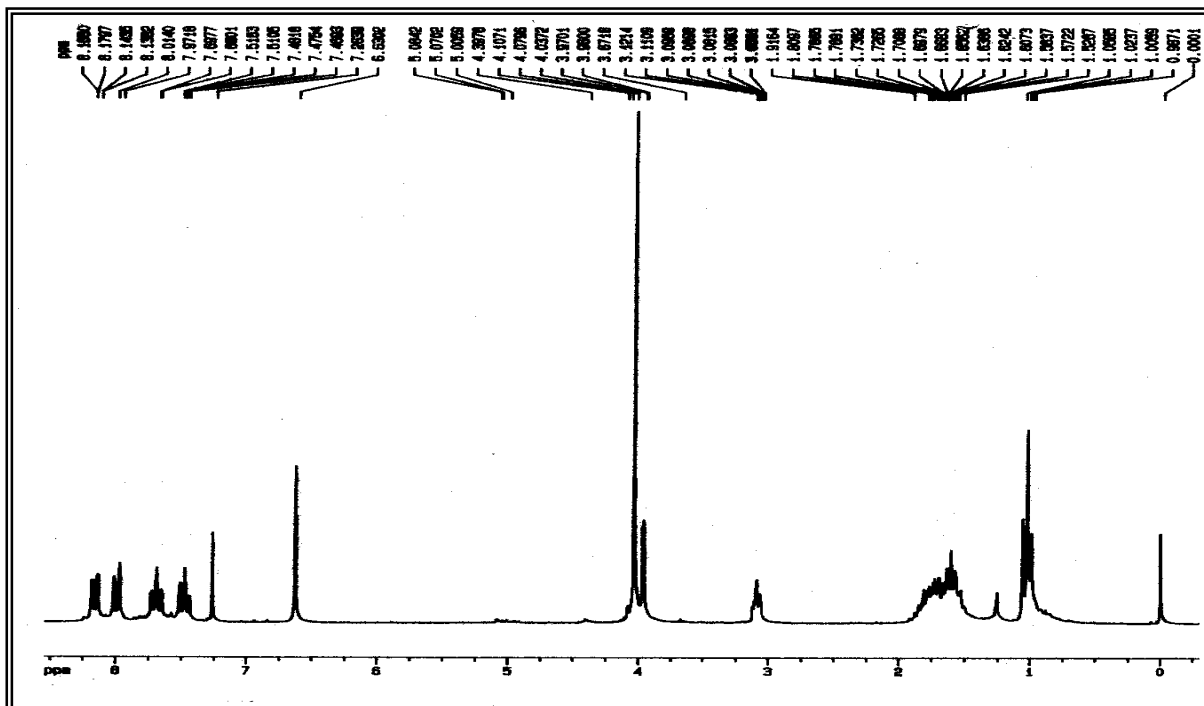


FIGURA 3.17 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-9-3** (200 MHz, CDCl_3).

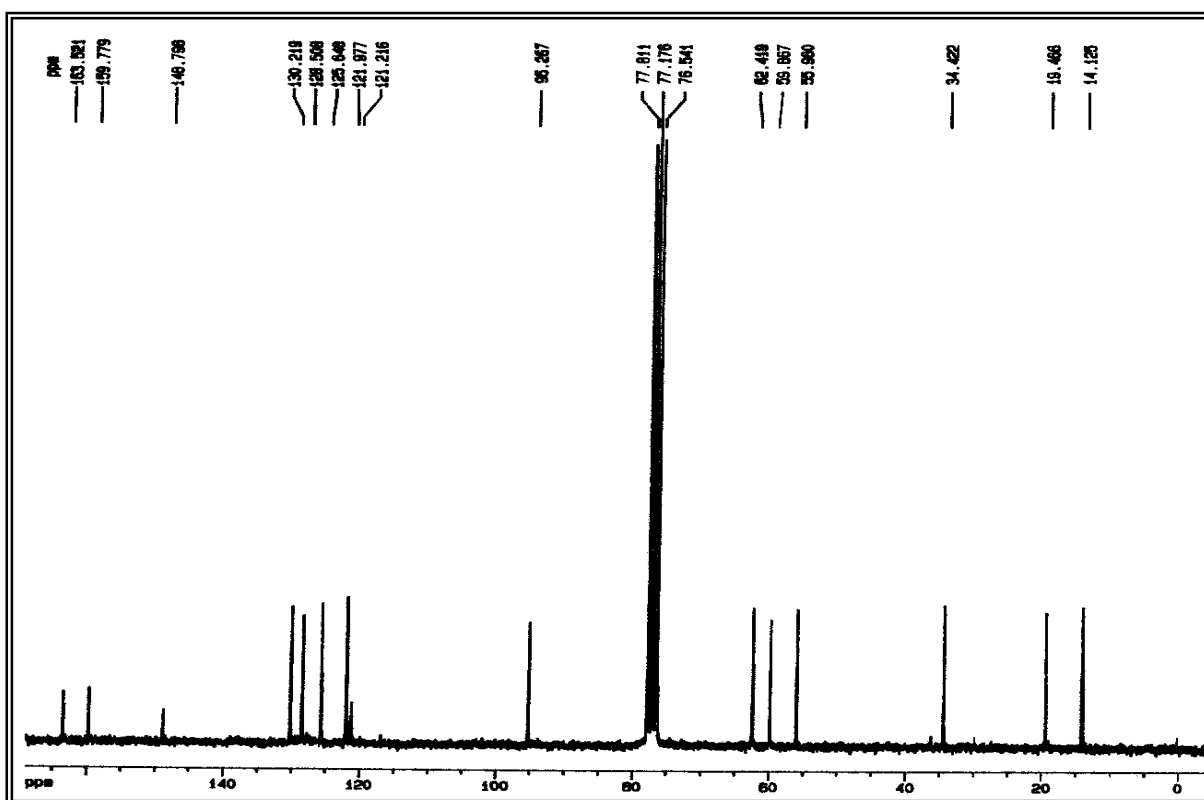


FIGURA 3.18 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-9-3** (50 MHz, CDCl_3).

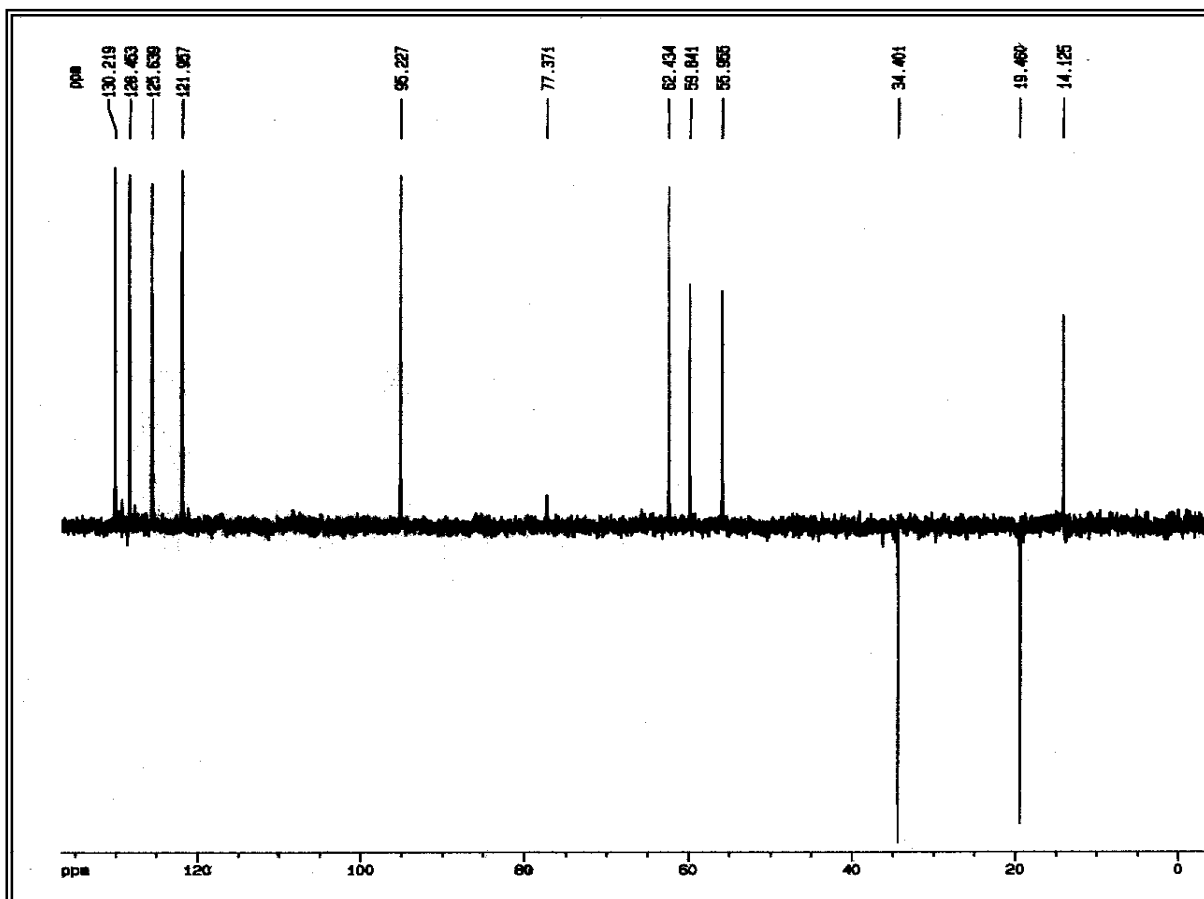


FIGURA 3.19 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-9-3** (50 MHz, CDCl₃).

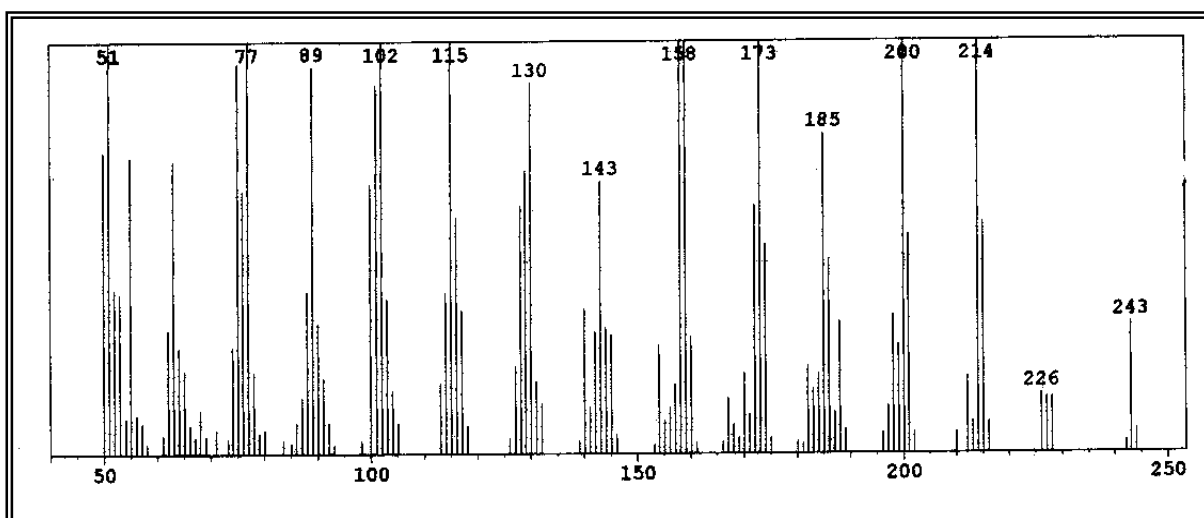


FIGURA 3.20 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-9-3** (IE – 70 eV).

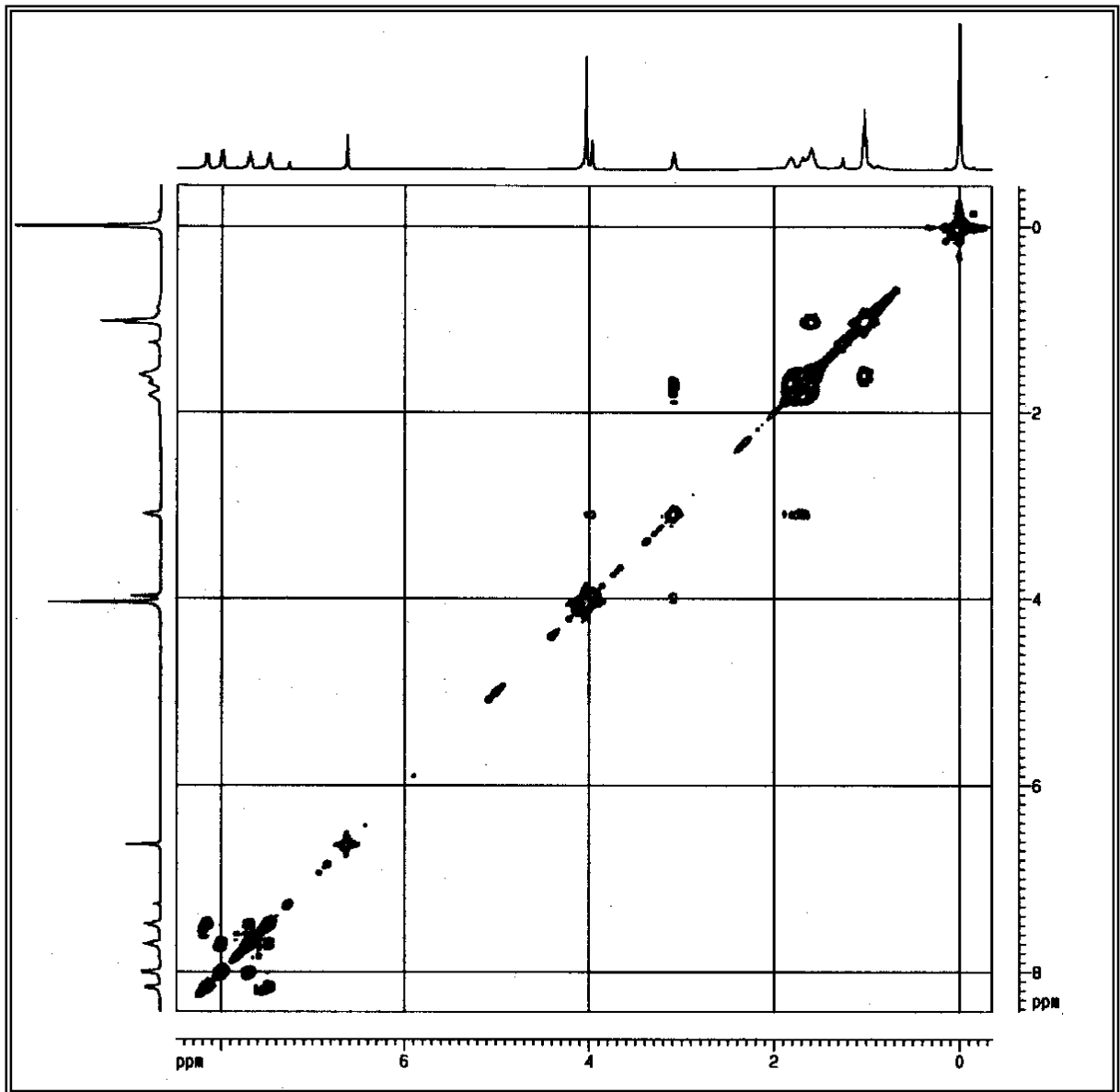


FIGURA 3.21 – Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide **Gb-9-3** (400 MHz, CDCl_3).

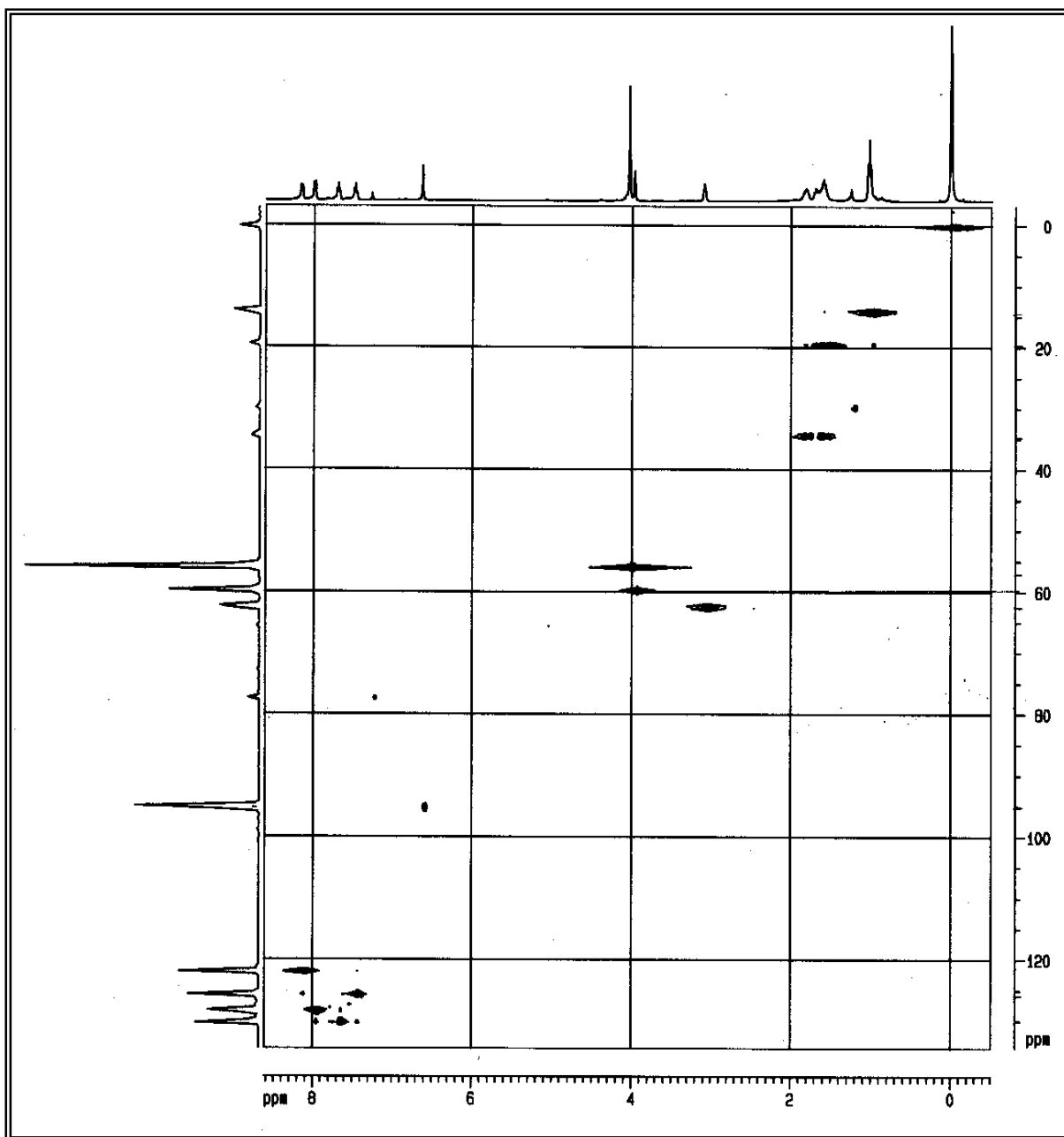


FIGURA 3.22 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide **Gb-9-3** (400 MHz, CDCl₃).

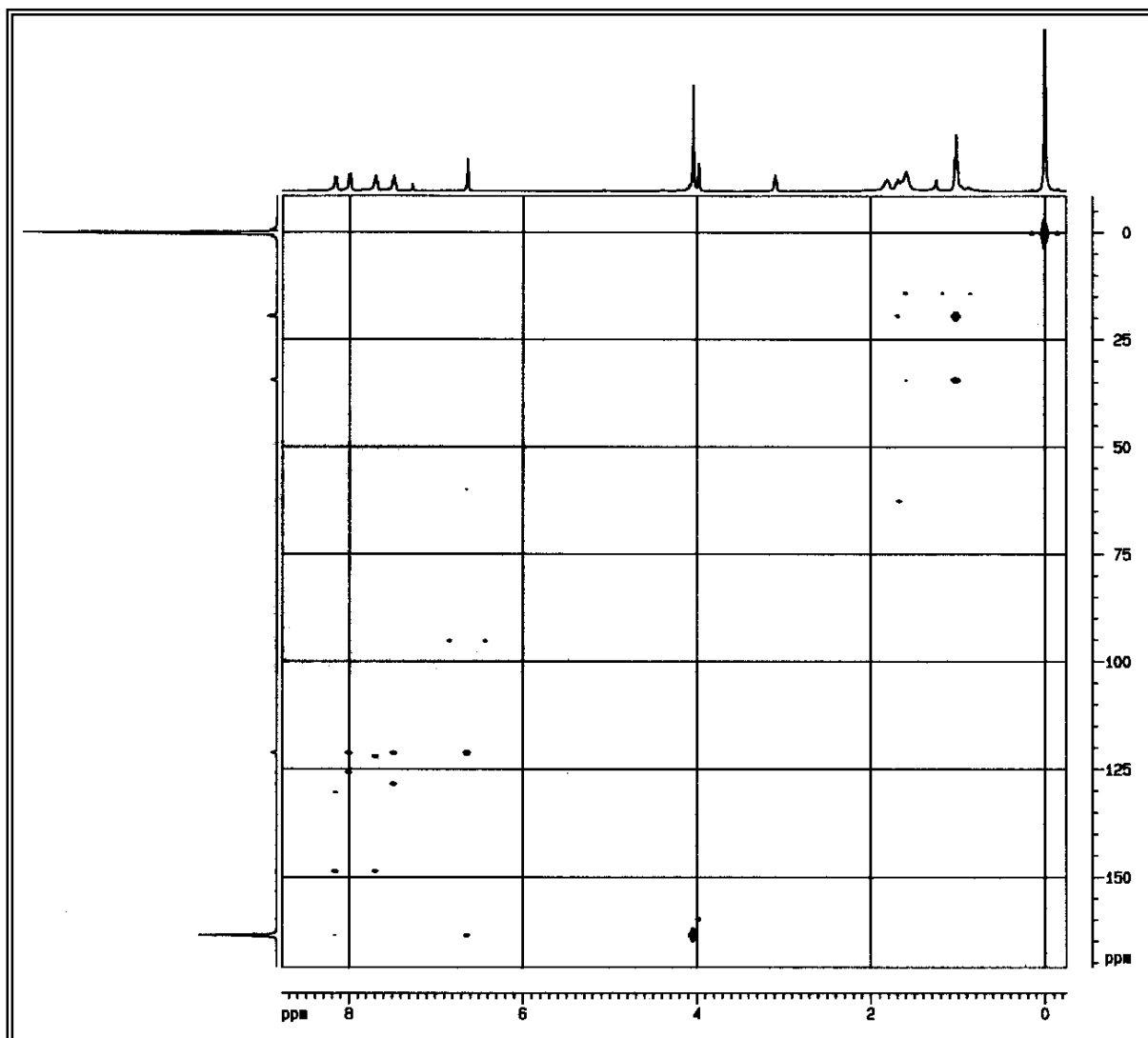


FIGURA 3.23 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide **Gb-9-3** (400 MHz, CDCl₃).

3.1.4. Identificação das Substâncias Gb-9-4 e Gb-9-5

As substâncias **Gb-9-4** e **Gb-9-5** mostraram uma única mancha fluorescente em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de alcalóide. Porém, a análise do CG/EM, revelou dois alcalóides numa proporção de 4:1. Desta maneira, o alcalóide **Gb-9-5** é considerado como contaminante do alcalóide **Gb-9-4** (Fig. 3.26). Os seus espectros de massas (Figs. 3.27 e 3.28) mostraram os picos do íon molecular com razão m/z igual a 229 e 257 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com as fórmulas moleculares $C_{15}H_{19}NO$ e $C_{17}H_{23}NO$ para as substâncias **Gb-9-4** e **Gb-9-5**, respectivamente.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) da substância **Gb-9-4** e **Gb-9-5** (Fig. 3.25) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,14 (1H, dd, $J = 8,3$ e $1,5$ Hz), δ 7,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,65 (1H, ddd, $J = 8,5$; $6,9$ e $1,5$ Hz) e δ 7,43 (1H, ddd, $J = 8,3$; $6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; os sinais em δ 6,64 (1H, s) e em δ 4,06 (3H, s) foram associados a um hidrogênio na posição 3 e a um grupo metila ligado a heteroátomo na posição 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 2,92 (2H, t, $J = 7,9$ Hz), δ 1,80 (2H, m), δ 1,43 (2H, m), δ 1,43 (2H, m) e em δ 0,91 (3H, t, $J = 7,0$ Hz) associados a hidrogênios da cadeia lateral saturada *n*-pentila e *n*-heptila.

Com os dados obtidos pode-se sugerir para as substâncias **Gb-9-4** e **Gb-9-5** as estruturas dos alcalóides quinolínicos 2-substituído, 4-metoxi-2-*n*-pentilquinolina e 4-metoxi-2-*n*-heptilquinolina, respectivamente (Fig. 3.24). Comparação dos dados de RMN 1H para o alcalóide 4-metoxi-2-*n*-pentilquinolina **Gb-9-4**, isolado e da literatura (FOURNET et al., 1989; FOURNET et al., 1993), confirmou tratar-se da mesma substância (Tab. 3.8).

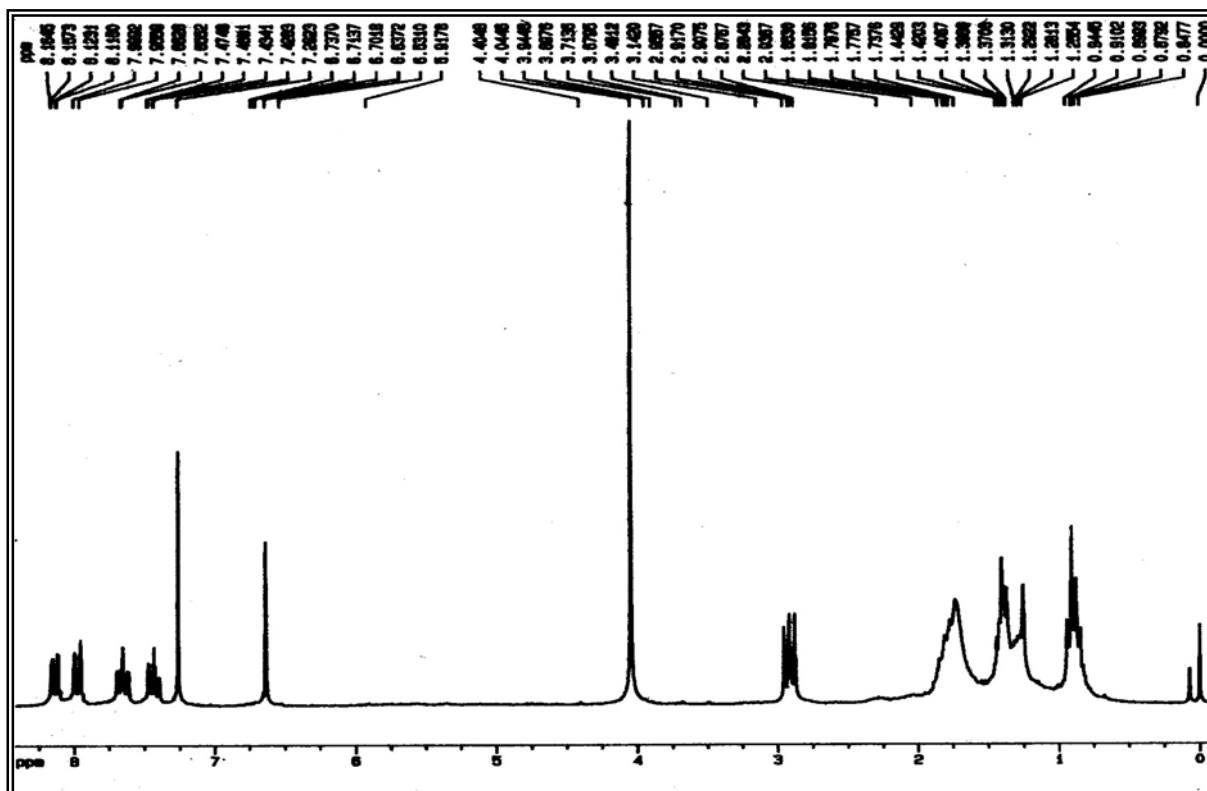


FIGURA 3.25 – Espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides **Gb-9-4** e **Gb-9-5** (200 MHz, CDCl_3).

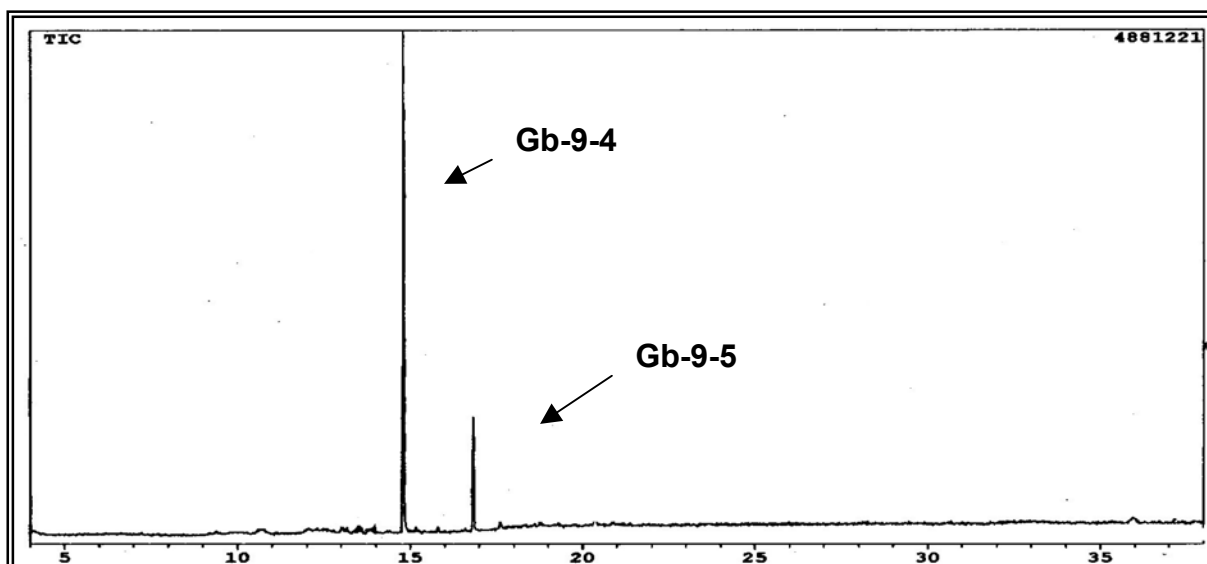


FIGURA 3.26 – Cromatograma da mistura dos alcalóides **Gb-9-4** e **Gb-9-5**.

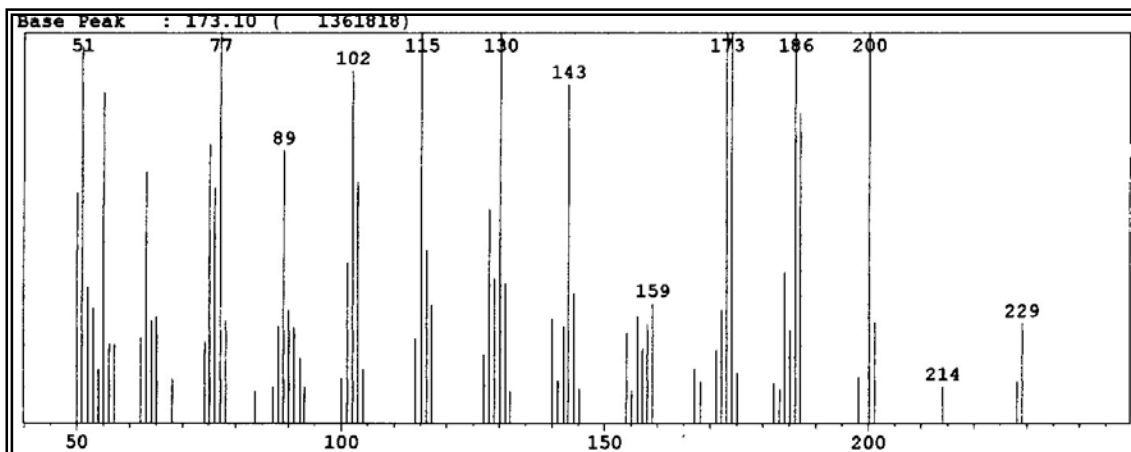


FIGURA 3.27 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-9-4** (IE – 70 eV).

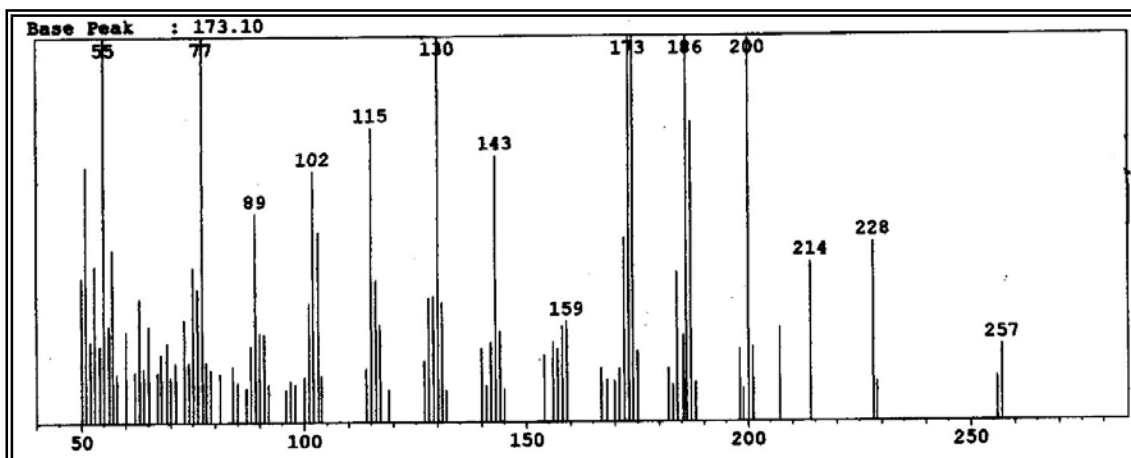


FIGURA 3.28 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-9-5** (IE – 70 eV).

3.1.5. Identificação das Substâncias **Gb-9-6**, **Gb-9-7** e **Gb-9-8**

A mistura das substâncias **Gb-9-6**, **Gb-9-7** e **Gb-9-8**, apresentou-se como um sólido cristalino em forma de agulhas, onde a análise de CCDA mostrou uma mancha com coloração azulada após revelação com vanilina sulfúrica, sendo identificada como uma mistura dos esteróides comumente encontrados em plantas, campesterol (**Gb-9-6**), estigmasterol (**Gb-9-7**) e β -sitosterol (**Gb-9-8**), baseado na análise dos dados de RMN ^1H , de ^{13}C e CG/EM.

No espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) (Fig. 3.31), a presença da mistura dos esteróides **Gb-9-6**, **Gb-9-7** e **Gb-9-8** é ressaltada pela presença dos sinais em δ 5,35 (d, $J = 5,04$ Hz) e δ 3,52 (m) relativos aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente, e um grande número de sinais intensos na região de δ 0,68 – 2,35, atribuídos a vários grupos de hidrogênios metílicos e metilênicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. As diferenças espectrais restringem-se essencialmente à cadeia lateral, pela presença da ligação dupla entre C-22 e C-23 no estigmasterol **Gb-9-7**, e são notadas pelas absorções dos hidrogênios vinílicos adicionais em δ 5,01 (dd, $J = 8,1$ e 15,2 Hz, H-22) e δ 5,16 (dd, $J = 8,1$ e 15,2 Hz, H-23).

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Fig. 3.32, Tab. 3.9) da mistura esteroidal apresentou os sinais em δ 140,8 e δ 121,7 característicos da ligação dupla entre C-5 e C-6, bem como do sinal em δ 71,8 atribuído ao carbono carbinólico C-3 comum aos três esteróides, campesterol (**Gb-9-6**), estigmasterol (**Gb-9-7**) e β -sitosterol (**Gb-9-8**); os sinais em δ 138,3 e δ 129,3 característicos da ligação dupla entre C-22 e C-23 do estigmasterol (**Gb-9-7**). O campesterol (**Gb-9-6**) e β -sitosterol (**Gb-9-8**) apresentam cadeia lateral pouco diferenciável por RMN ^1H e ^{13}C , sendo somente percebida a presença de **Gb-9-6** através de CG/EM.

A mistura de esteróides foi submetida a CG/EM para confirmação dos esteróides propostos, onde a análise por CG revelou a presença de três componentes na mistura (Fig. 3.29). Os espectros de massas (Figs. 3.33, 3.34 e 3.35), mostraram os picos dos íons moleculares com razão m/z iguais a 400, 412 e 414 daltons, estando compatíveis com as fórmulas moleculares $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ do campesterol **Gb-9-6**, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ do estigmasterol **Gb-9-7** e $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ do β -sitosterol **Gb-9-8**, respectivamente.

As informações espectrais estão de acordo com os dados das misturas de esteróides já conhecidos na literatura (GOULART et al., 1993; RODRIGUES, 1992).

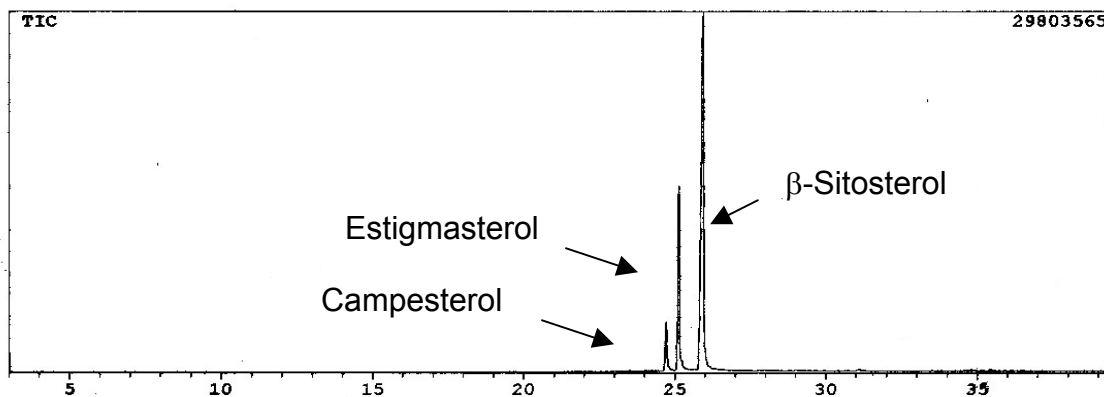


FIGURA 3.29 – Cromatograma da mistura dos esteróides campesterol **Gb-9-6**, estigmasterol **Gb-9-7** e β -sitosterol **Gb-9-8**.

TABELA 3.9 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) dos esteróides campesterol **Gb-9-6**, estigmasterol **Gb-9-7** e β -sitosterol **Gb-9-8**.

Carbono	Campesterol (6)	Estigmasterol (7)	β - Sitosterol (8)
1	37,3 (CH ₂)	37,3 (CH ₂)	37,3 (CH ₂)
2	31,7 (CH ₂)	31,7 (CH ₂)	31,7 (CH ₂)
3	71,8 (CH)	71,8 (CH)	71,8 (CH)
4	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)
5	140,8 (C)	140,8 (C)	140,8 (C)
6	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)
7	31,9 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)
8	31,9 (CH)	31,9 (CH)	31,9 (CH)
9	50,2 (CH)	50,2 (CH)	50,2 (CH)
10	36,5 (C)	36,5 (C)	36,5 (C)
11	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)
12	39,8 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)
13	42,3 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)
14	56,8 (CH)	56,8 (CH)	56,8 (CH)
15	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)
16	28,2 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)
17	56,1 (CH)	56,1 (CH)	56,1 (CH)
18	11,9 (CH ₃)	11,9 (CH ₃)	11,9 (CH ₃)
19	19,4 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)
20	36,2 (CH)	39,8 (CH)	36,2 (CH)
21	19,1 (CH ₃)	21,1 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)
22	34,0 (CH ₂)	138,3 (CH)	31,9 (CH ₂)
23	26,2 (CH ₂)	129,3 (CH)	29,7 (CH ₂)
24	45,9 (CH)	51,2 (CH)	39,7 (CH)
25	29,2 (CH)	31,9 (CH)	31,7 (CH)
26	18,8 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	21,1 (CH ₃)
27	19,1 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)
28	23,1 (CH ₃)	26,2 (CH ₂)	18,8 (CH ₂)
29		12,0 (CH ₃)	12,2 (CH ₃)

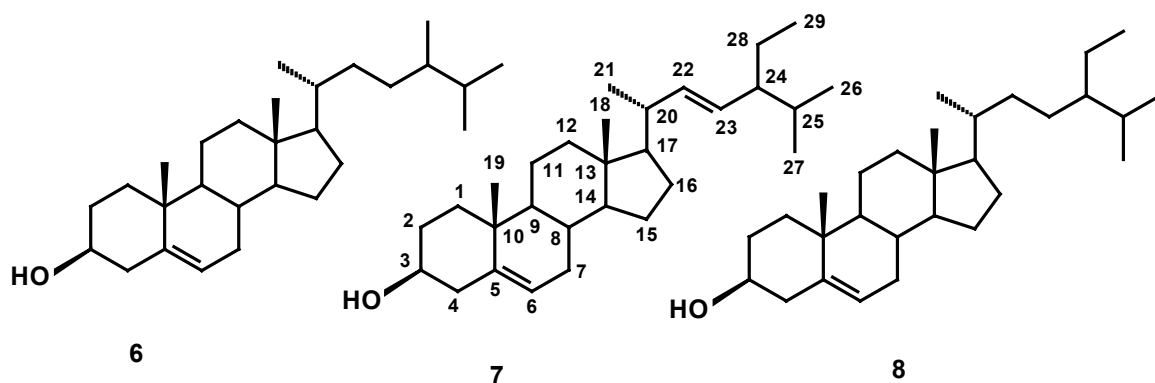


FIGURA 3.30 – Estruturas químicas do campesterol **Gb-9-6**, estigmasterol **Gb-9-7** e β -sitosterol **Gb-9-8**.

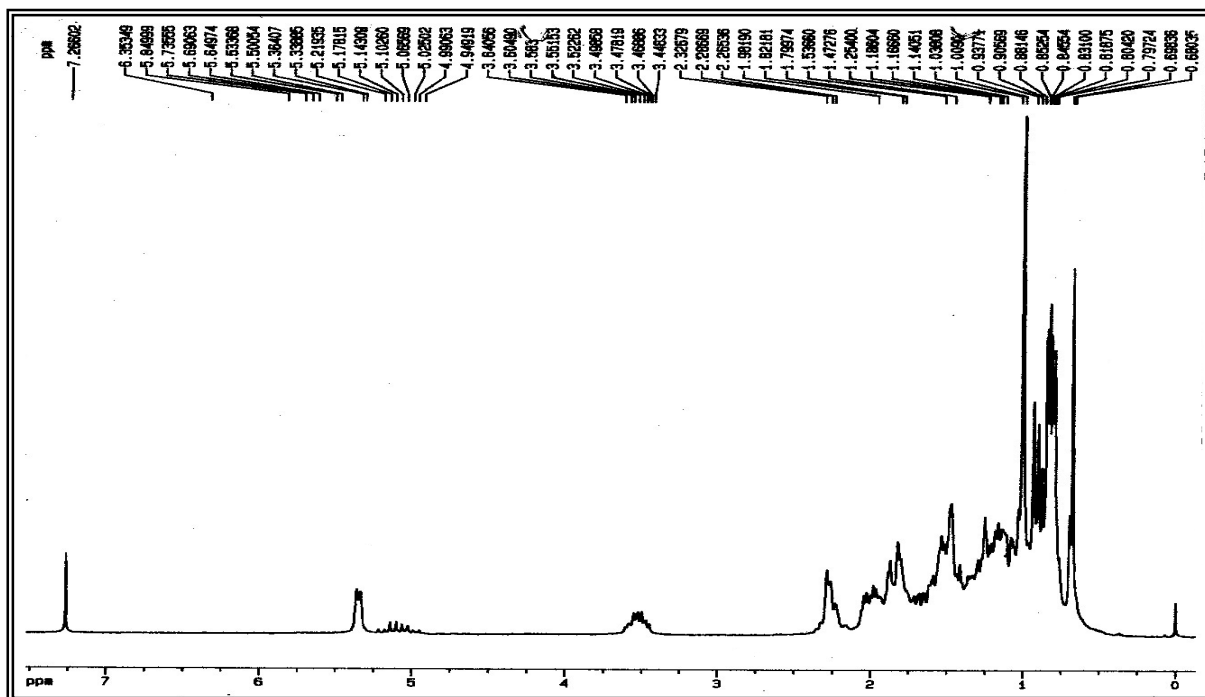


FIGURA 3.31 – Espectro de RMN ^1H da mistura dos esteróides campesterol **Gb-9-6**, estigmasterol **Gb-9-7** e β -sitosterol **Gb-9-8** (200 MHz, CDCl_3 , TMS).

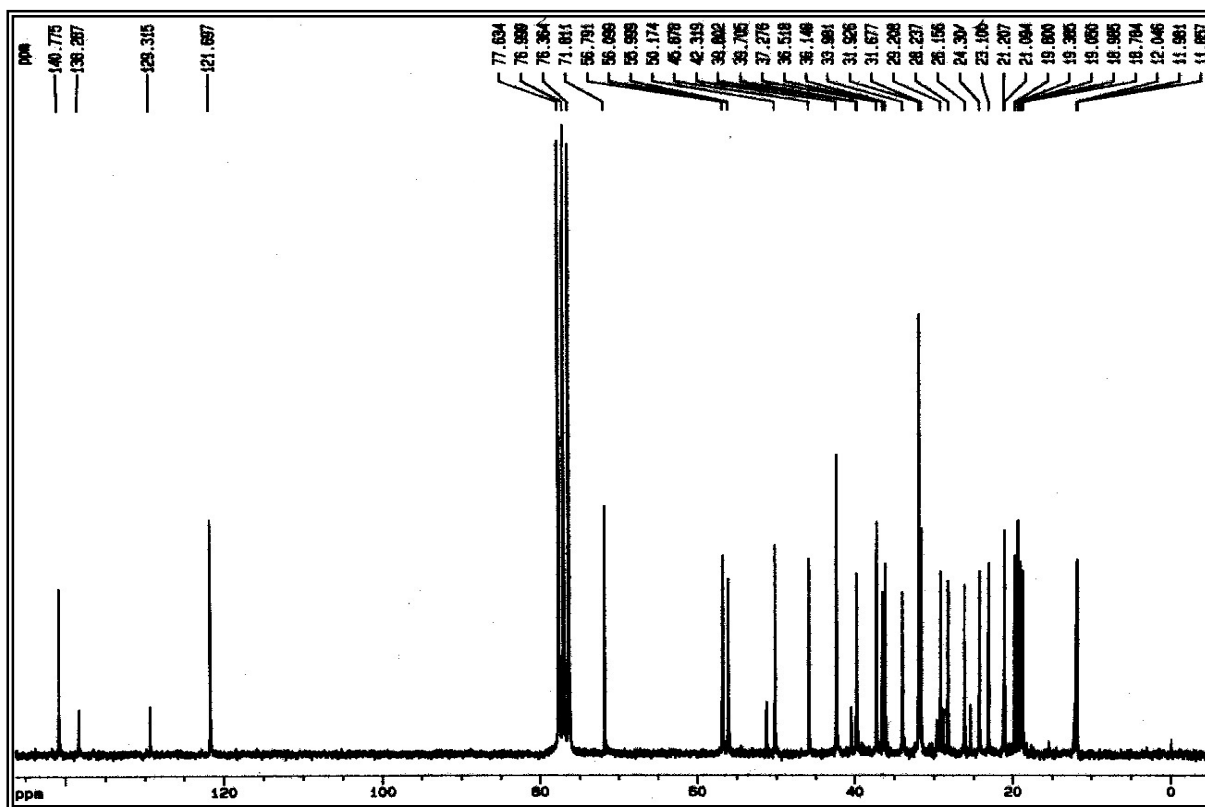


FIGURA 3.32 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura dos esteróides campesterol **Gb-9-6**, estigmasterol **Gb-9-7** e β -sitosterol **Gb-9-8** (50 MHz, CDCl_3).

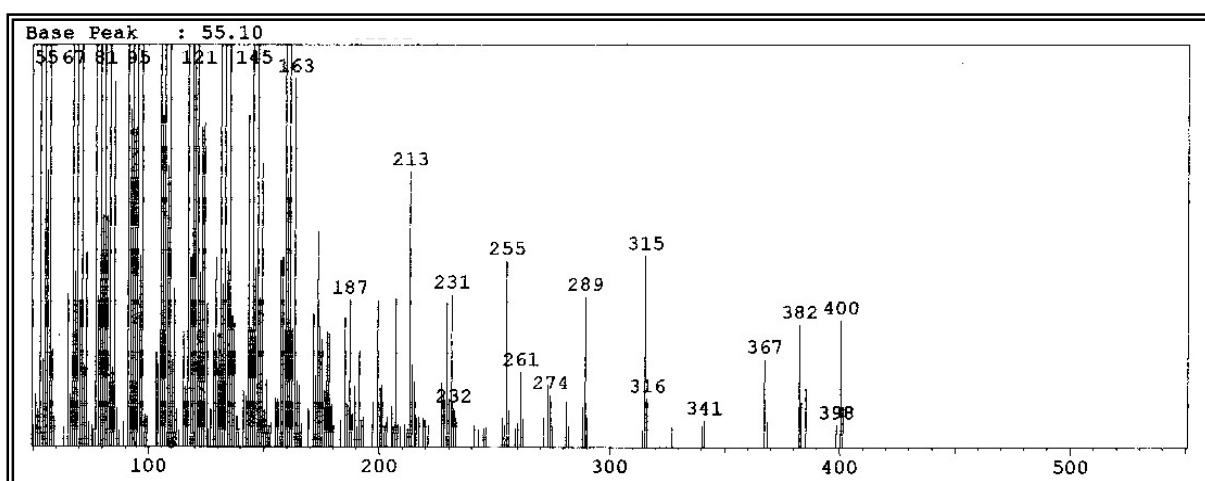


FIGURA 3.33 – Espectro de massas do campesterol **Gb-9-6** (IE – 70 eV).

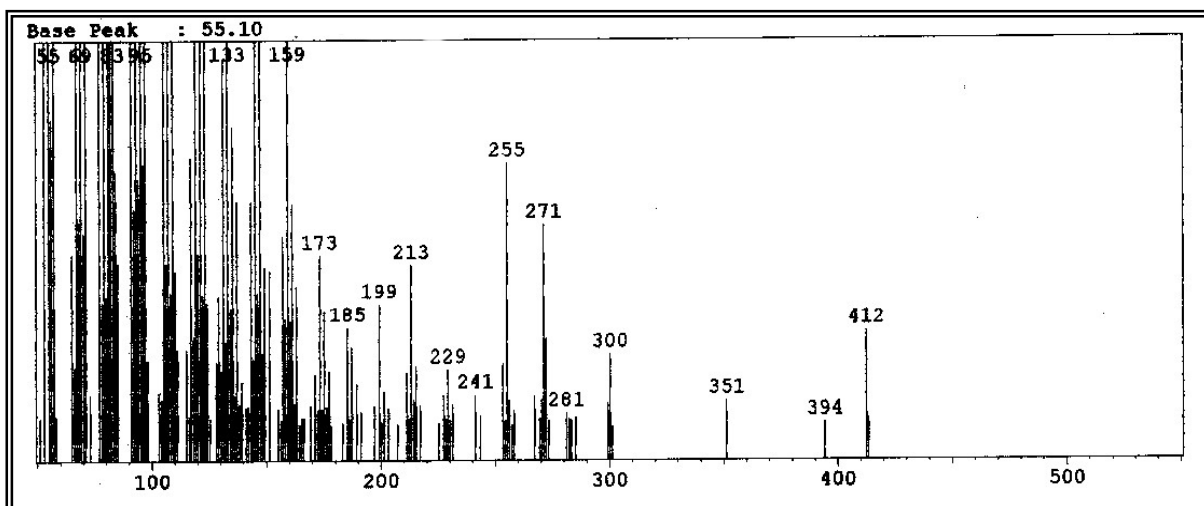


FIGURA 3.34 – Espectro de massas do estigmasterol **Gb-9-7** (IE – 70 eV).

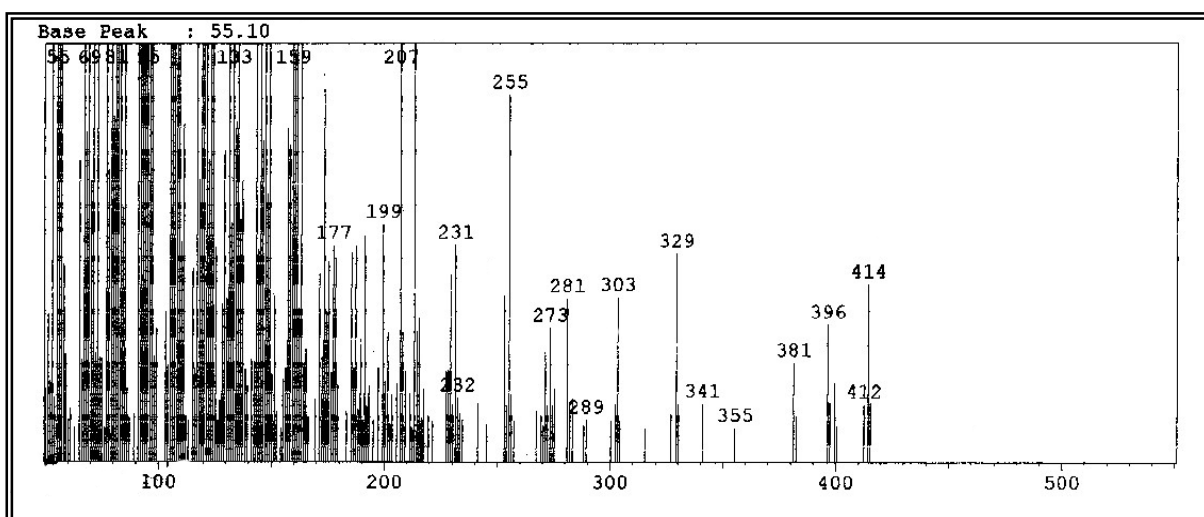


FIGURA 3.35 – Espectro de massas do β -sitosterol **Gb-9-8** (IE – 70 eV).

3.1.6. Identificação da Substância Gb-8-9

A substância **Gb-8-9** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.38) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 213 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{14}H_{15}NO$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) da substância **Gb-8-9** (Fig. 3.37) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,09 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,81 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,5$ Hz), δ 7,72 (1H, ddd, $J = 8,5$; $6,9$ e $1,5$ Hz) e δ 7,53 (1H, ddd, $J = 8,2$; $6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; os sinais em δ 7,28 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) e δ 8,15 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), foram associados aos hidrogênios nas posições 3 e 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 4,0 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ 3,15 (1H, m), δ 1,79 (2H, m), δ 1,59 (2H, m) e em δ 1,02 (3H, t, $J = 7,0$ Hz) associados a hidrogênios metilênicos e metílicos terminais da cadeia lateral epoxipentila, respectivamente. A estereoquímica do grupo epóxido é *trans* devido a constante de acoplamento de 2 Hz entre os hidrogênios 1' e 2'

O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-8-9** (Fig. 3.38) apresentou 14 sinais, os quais, comparados com o DEPT 135° (Fig. 3.39) e HSQC (Fig. 3.42), mostrou as correlações entre os hidrogênios e carbonos a uma ligação (Tab. 3.10), revelando a presença de três carbonos não hidrogenados (C), oito carbonos metínicos (CH), dois carbonos metilênicos (CH_2) e um carbono metílico (CH_3).

O mapa de contorno COSY 1H - 1H da substância **Gb-8-9** (Fig. 3.41) mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ 8,09, δ 7,81, δ 7,72 e δ 7,53 confirmando a presença do anel aromático *orto* dissubstituído, entre os hidrogênios em δ 4,0, δ 3,15, δ 1,79, δ 1,59 e δ 1,02, confirmando a presença da cadeia lateral epoxipentila.

O mapa de contorno HMBC da substância **Gb-8-9** (Fig. 3.44) mostrou as correlações dos hidrogênios aromáticos em δ 8,09 com os carbonos em δ 126,6 e δ 128,0 (J^3); em δ 7,81 com δ 130,0, δ 137,2 e δ 147,8 (J^3); em δ 7,72 com δ 127,8 e δ 147,8 (J^3); em δ 7,53 com δ 129,1 e δ 128,0 (J^3), confirmando a estrutura de um anel aromático *orto* dissubstituído; do hidrogênio em δ 7,28 com o carbono em δ 158,3 (J^2) e do hidrogênio em δ 8,15 com os carbonos em δ 158,3, δ 147,8 δ 203,5 (J^3) e δ 163,0 (J^2) confirmando a estrutura do anel piridínico; dos hidrogênios em δ 4,00 com

os carbonos em δ 116,9 (J^2) e δ 158,3 (J^3); em δ 3,15 com o carbono em δ 34,4 (J^2); em δ 1,79 com os carbonos em δ 62,5 e δ 19,4 (J^2), e δ 59,6 (J^3); em δ 1,59 com os carbonos em δ 14,1 e δ 34,4 (J^2), e δ 62,5 (J^3); em δ 1,02 com os carbonos em δ 19,4 e δ 34,4 (J^2) confirmando a estrutura da cadeia lateral epoxipentila. Estas correlações (Tab. 11) permitiram deduzir o esqueleto 2-quinolínico para a substância **Gb-8-9**.

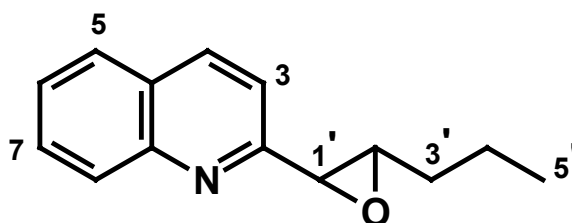
A substância **Gb-8-9**, alcalóide 2-quinolínico, trata-se do 2-(1', 2' -trans-epoxipentil)quinolina, inédita na literatura (Fig. 3.36).

TABELA 3.10 – Dados espectrais de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz) e DEPT 135° (CDCl_3 , 50,3 MHz) da substância **Gb-8-9**.

Hidrogênio/carbono	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	158,3 (C)
3	7,28 d (8,5)	116,9 (CH)
4	8,15 d (8,5)	137,2 (CH)
5	7,81 dd (8,2 e 1,5)	127,8 (CH)
6	7,53 ddd (8,2; 6,9 e 1,2)	126,6 (CH)
7	7,72 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	130,0 (CH)
8	8,09 d (8,5)	129,1 (CH)
9	-	128,0 (C)
10	-	147,8 (C)
1'	4,00 d (2,0)	59,6 (CH)
2'	3,15 m	62,5 (CH)
3'	1,79 m	34,4 (CH_2)
4'	1,59 m	19,4 (CH_2)
5'	1,02 t (7,0)	14,1 (CH_3)

TABELA 3.11 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância **Gb-8-9**.

Carbono	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
2	158,3			
3	116,92	7,28	158,34	
4	137,2	8,15		158,3 e 147,8
5	127,8	7,81		130,0; 137,2 e 147,8
6	126,6	7,53		129,1 e 128,0
7	130,0	7,72		127,8 e 147,8
8	129,1	8,09		126,6 e 128,0
9	128,0			
10	147,8			
1'	59,6	4,00	158,3	116,9
2'	62,5	3,15	34,4	
3'	34,4	1,79	62,5 e 19,4	59,6
4'	19,4	1,59	14,1 e 34,4	62,5
5'	14,1	1,02	19,4	34,4



Gb-8-9

FIGURA 3.36 – Estrutura química do alcalóide **Gb-8-9**.

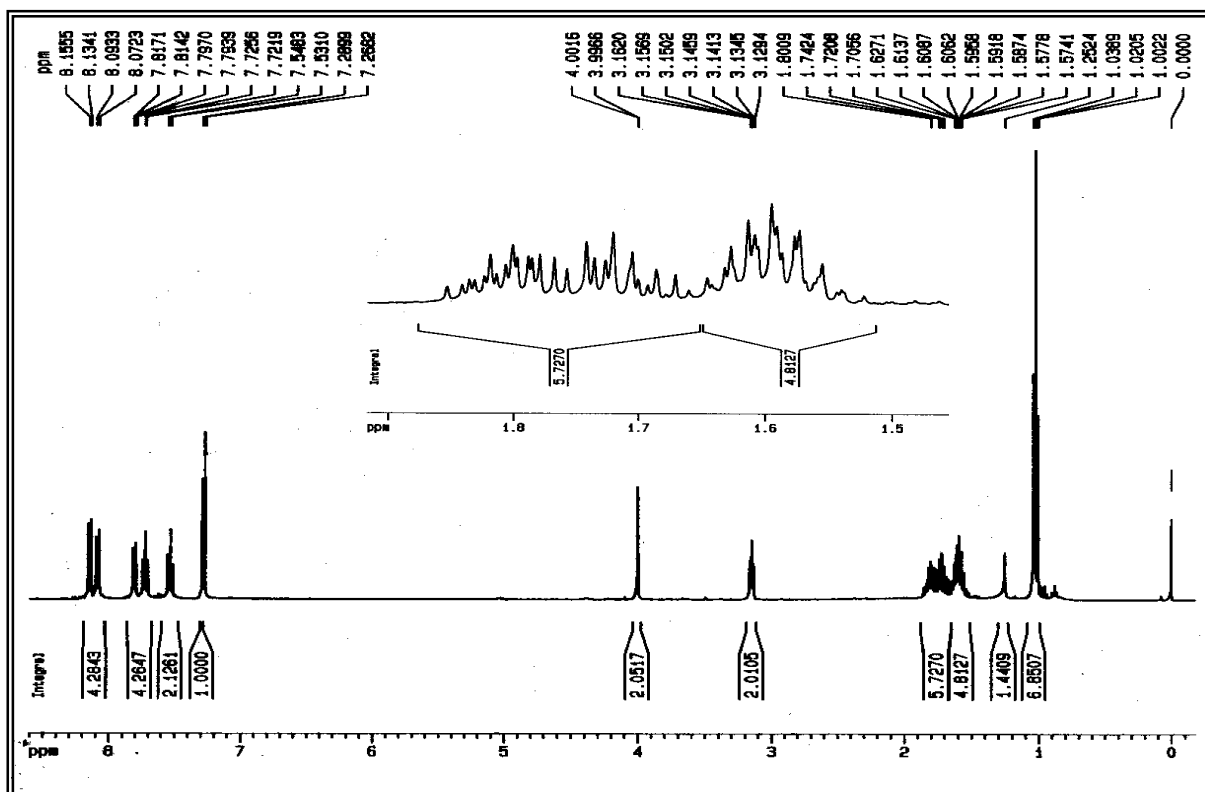


FIGURA 3.37 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-8-9** (400 MHz, CDCl_3).

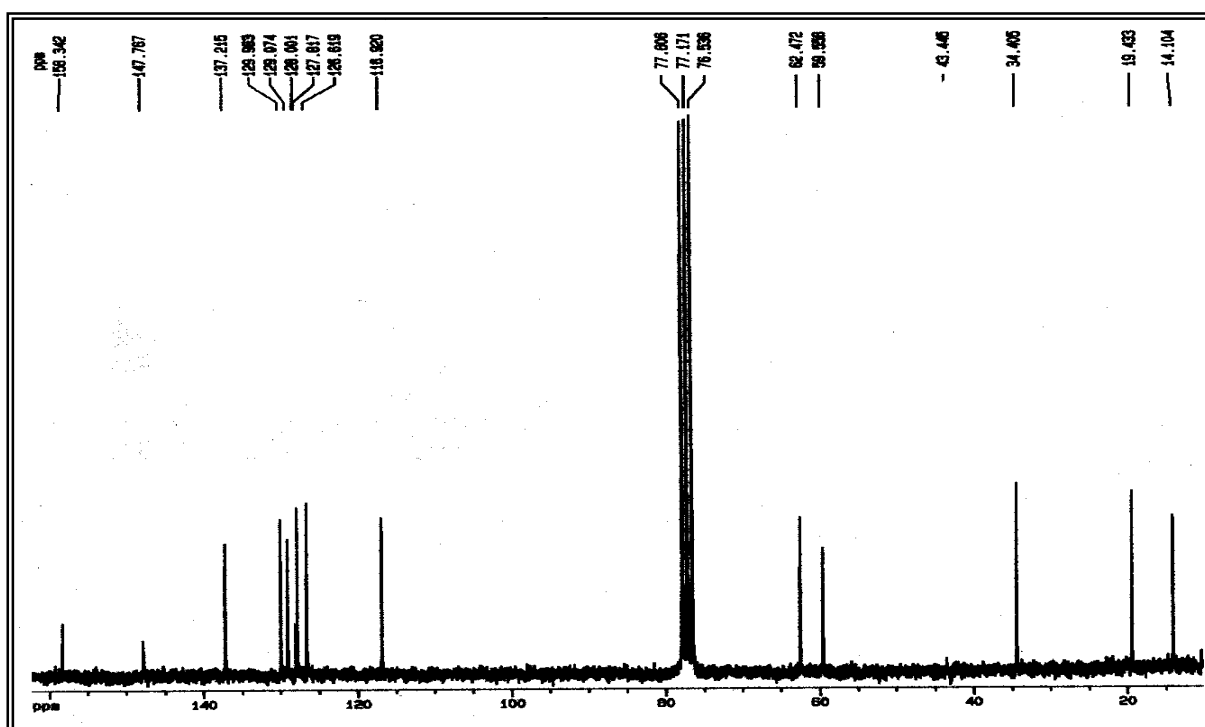


FIGURA 3.38 – Espectro de RMN ^{13}C do Alcalóide **Gb-8-9** (50 MHz, CDCl_3).

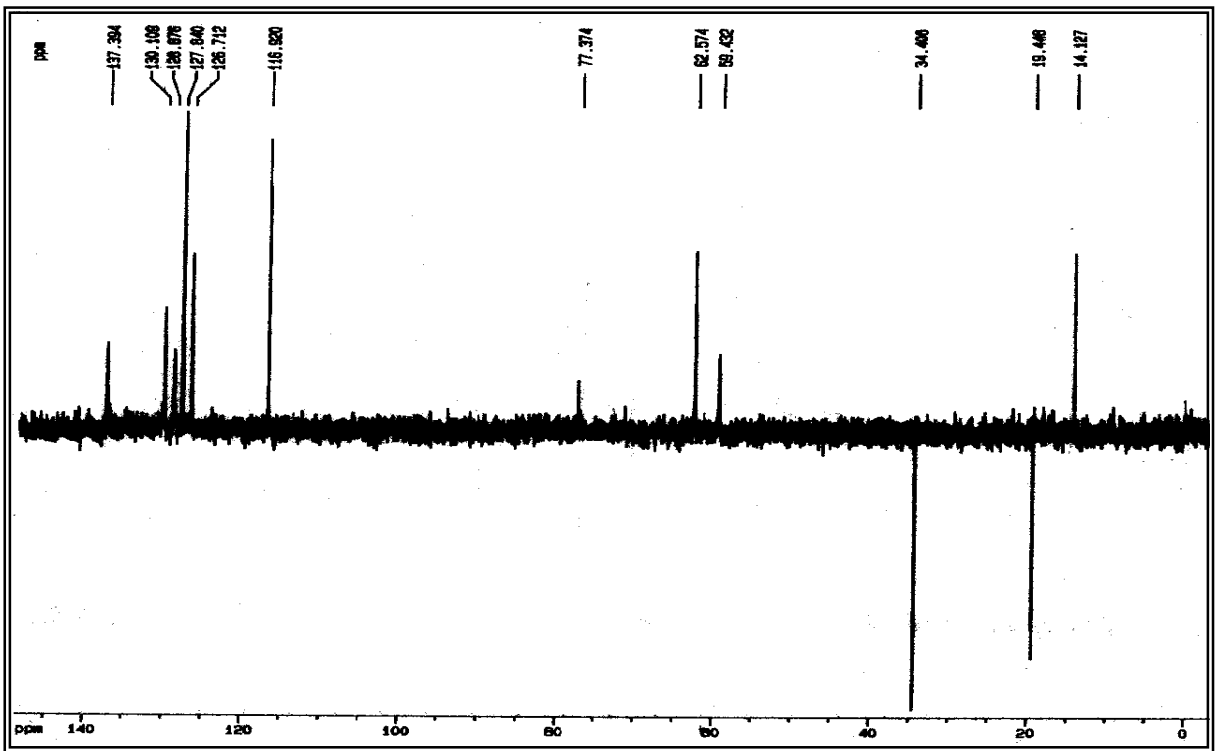


FIGURA 3.39 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-8-9** (50 MHz, CDCl₃).

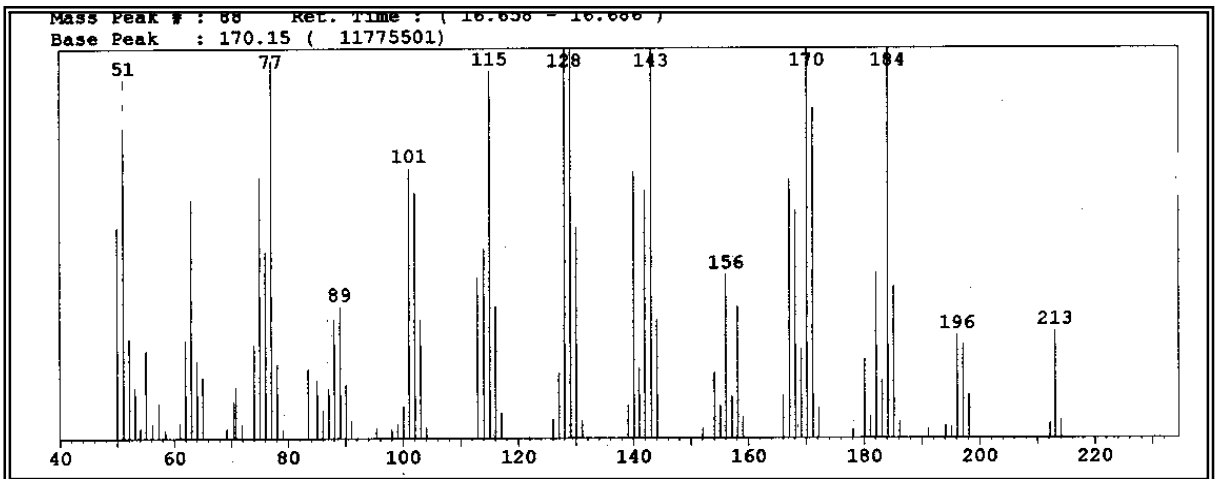


FIGURA 3.40 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-8-9**.

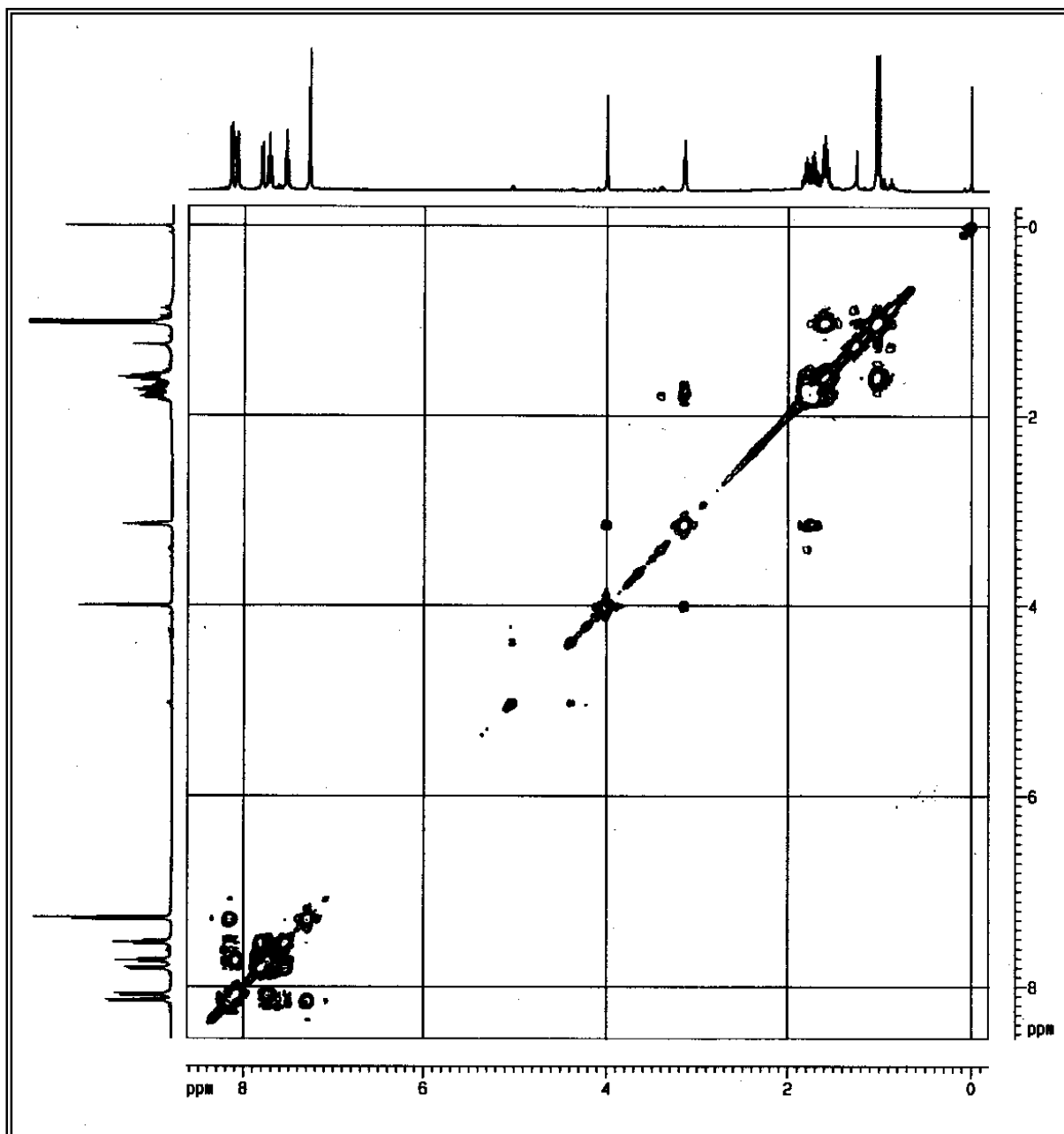


FIGURA 3.41 – Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide **Gb-8-9** (400 MHz, CDCl_3).

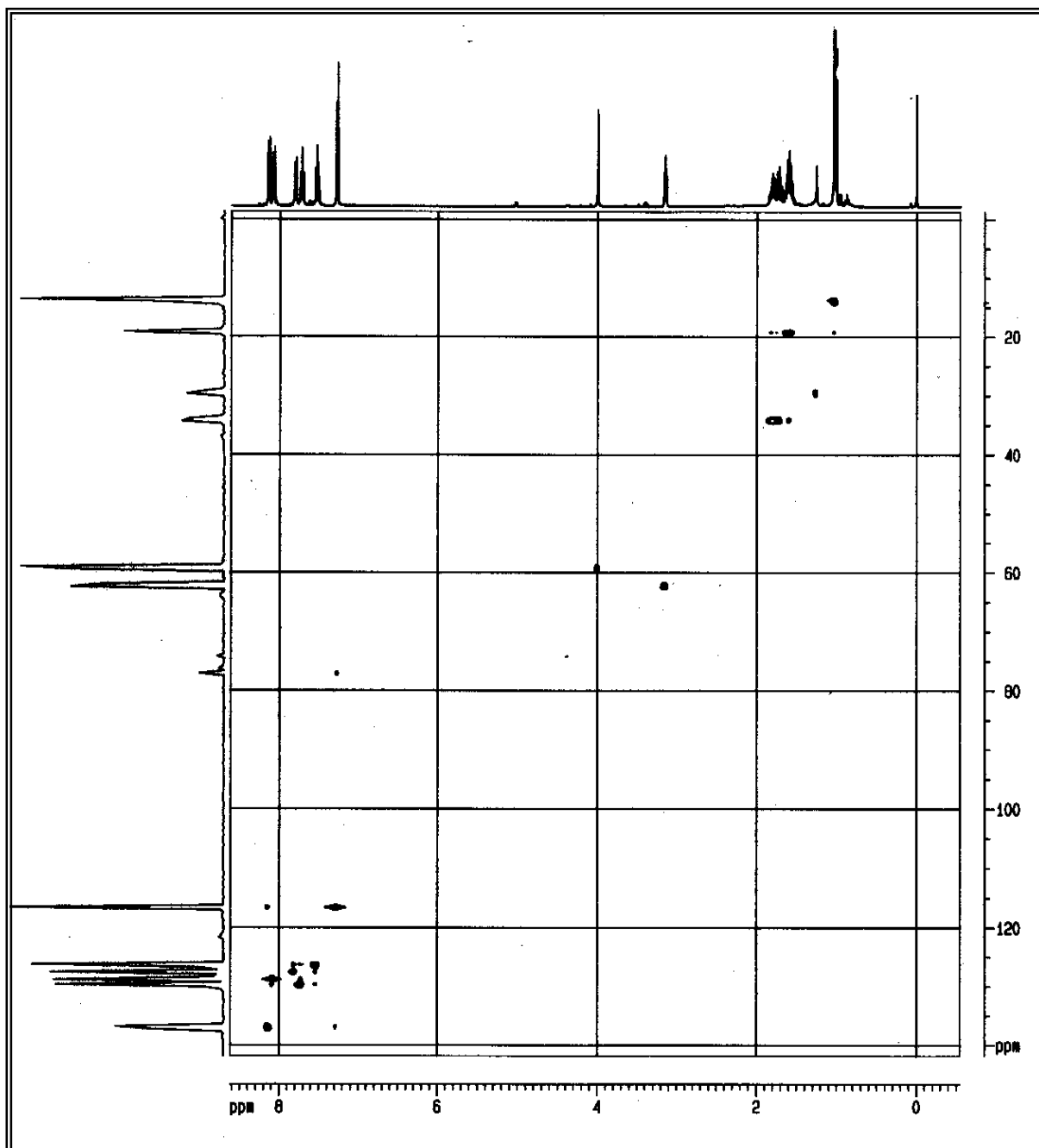


FIGURA 3.42 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide **Gb-8-9** (400 MHz, CDCl₃).

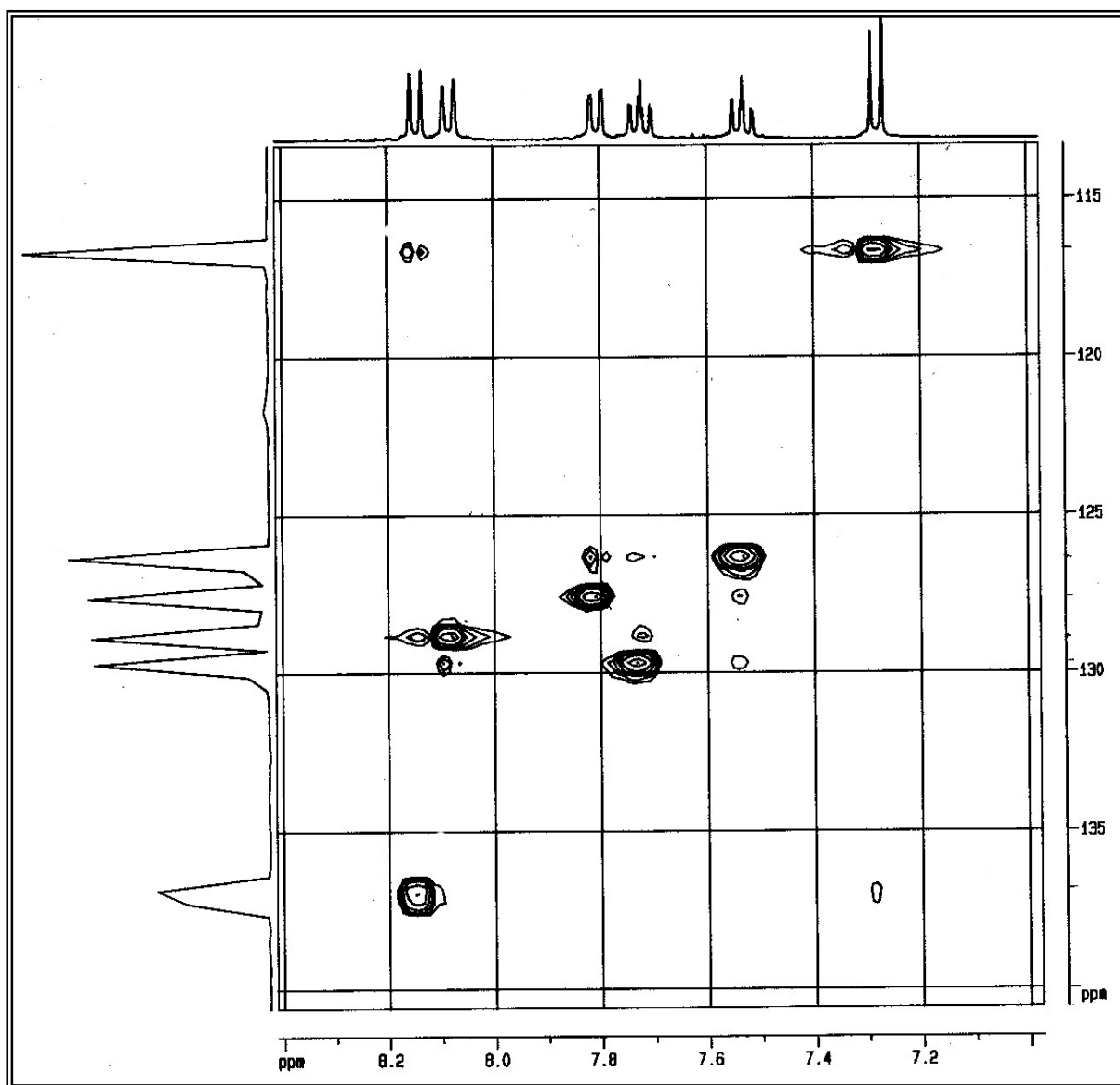


FIGURA 3.43 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do alcalóide **Gb-8-9** (400 MHz, CDCl₃) – região aromática.

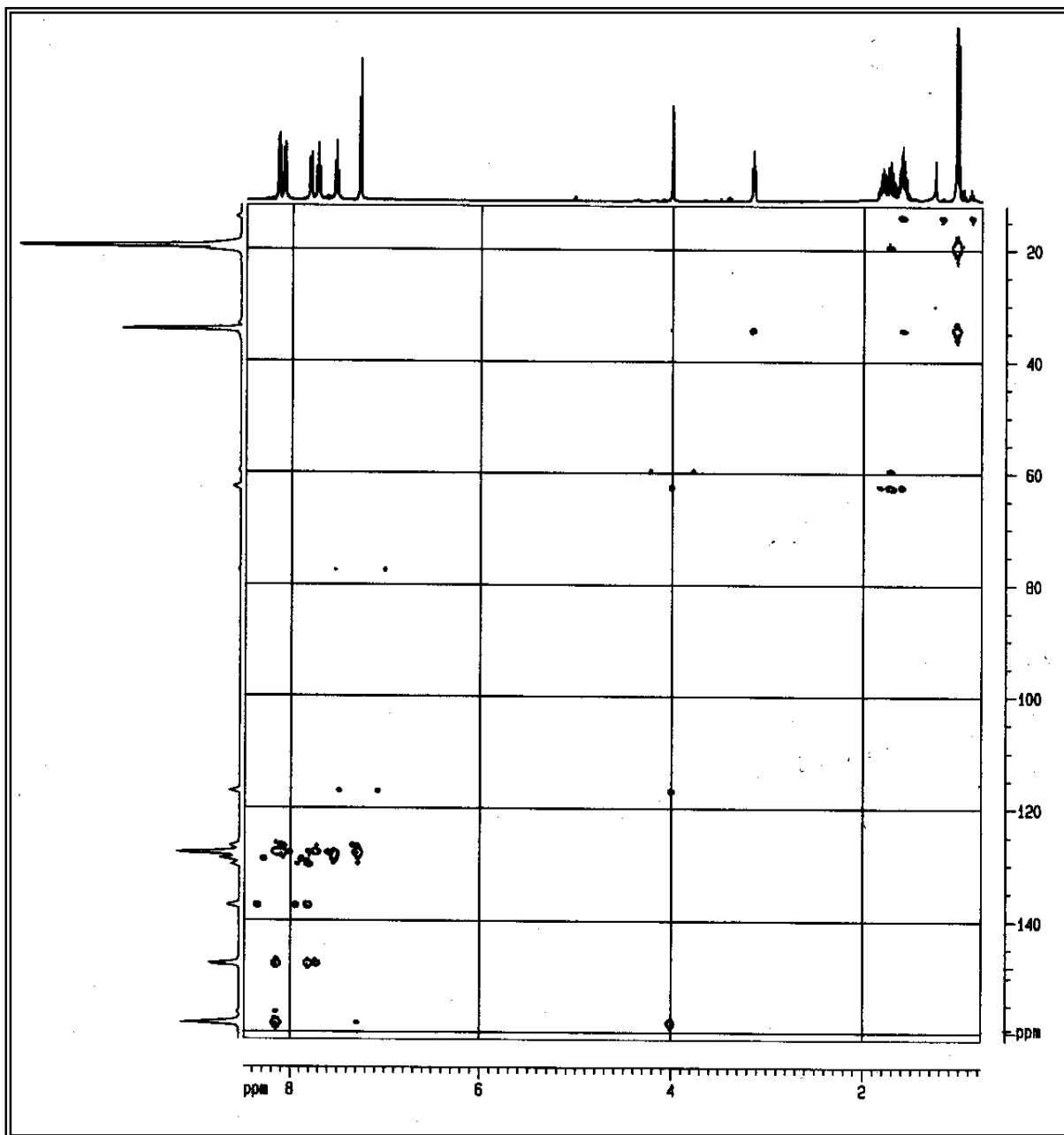


FIGURA 3.44 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide **Gb-8-9** (400 MHz, CDCl₃).

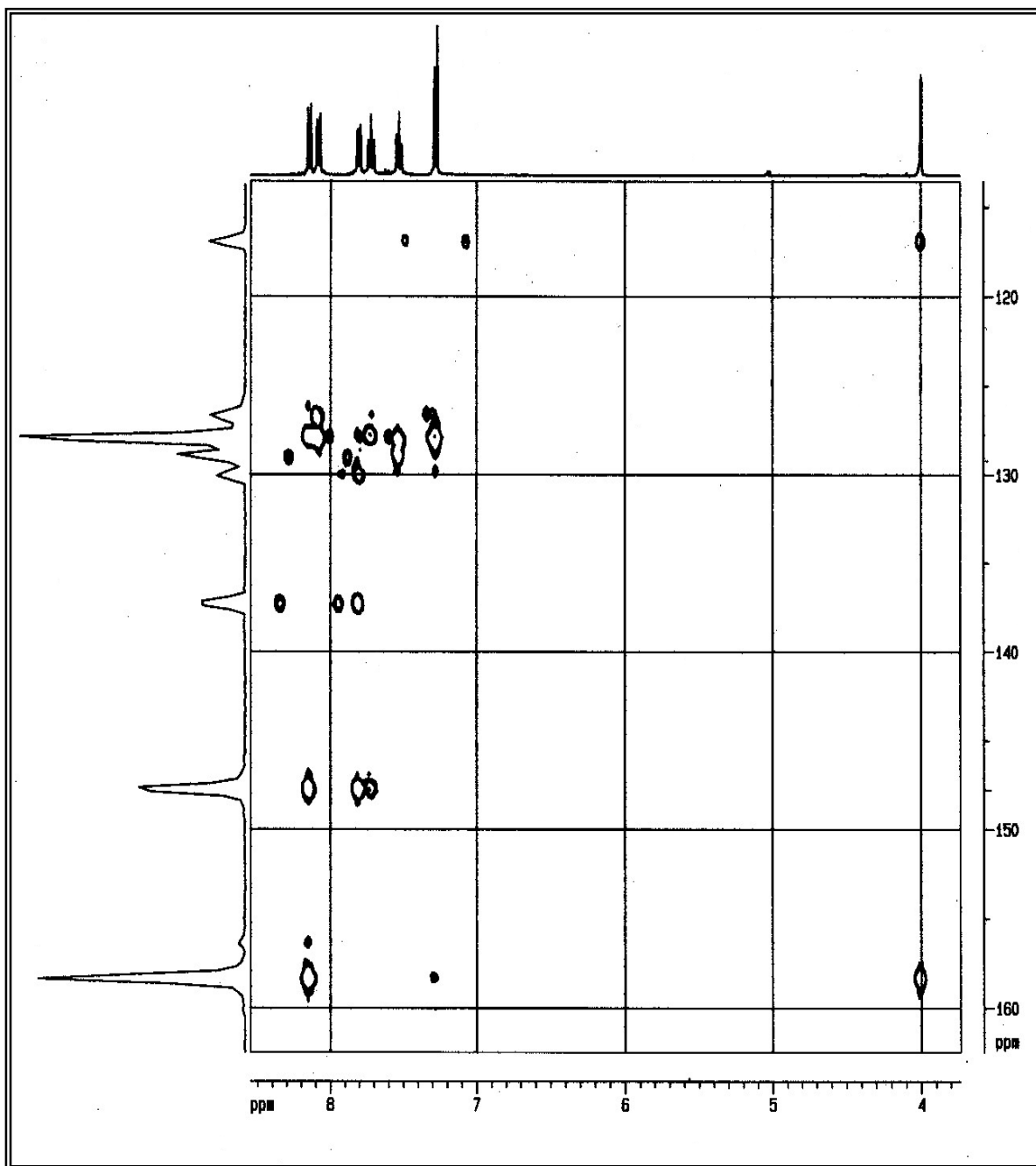


FIGURA 3.45 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do alcalóide **Gb-8-9** (400 MHz, CDCl₃) – região aromática.

3.1.7. Identificação da Substância Gb-8-10

A substância **Gb-8-10** apresentou-se como um sólido branco e quando submetida à CCDA mostrou apenas uma mancha com coloração violeta quando revelada em vanilina sulfúrica.

O espectro de RMN ^1H de **Gb-8-10** (400 MHz, CDCl_3 , TMS) (Fig. 3.47) apresentou oito sinais em δ 0,66 (3H, s); δ 0,69 (3H, s); δ 0,74 (3H, s); δ 0,76 (3H, d, $J = 6,5$ Hz); δ 0,80 (3H, s); δ 0,82 (3H, d, $J = 6,5$ Hz); 0,89 (3H,s) e δ 0,99 (3H, s), associados a grupos metílicos ligados a carbonos sp^3 ; uma região complexa de sinais em δ 1,98-1,13 (m) referentes a hidrogênios metínicos e metilênicos; um sinal em δ 3,14 (1H, dd, $J = 10,6$ e $5,0$ Hz) relacionado a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico metínico e um sinal em δ 5,22 (1H, t, $J = 2,6$ Hz) associado ao hidrogênio olefínico, sugerindo um esqueleto triterpênico. A análise da constante de acoplamento do hidrogênio carbinólico sugere a posição β para o grupo hidroxila.

O espectro de RMN ^{13}C de **Gb-8-10** (Fig. 3.48) apresentou 30 sinais, os quais comparados com os sinais do espectro DEPT 135° (Fig. 3.49) revelaram a presença de 6 carbonos não hidrogenados (C), 7 carbonos metínicos (CH), 9 carbonos metilênicos (CH_2) e 8 carbonos metílicos (CH_3), sendo os deslocamentos químicos de carbono sp^2 em δ 151,1 e δ 116,2 atribuídos aos átomos de carbono da ligação dupla e o sinal em δ 79,2 ao carbono carbinólico em equatorial (Tab. 3.12).

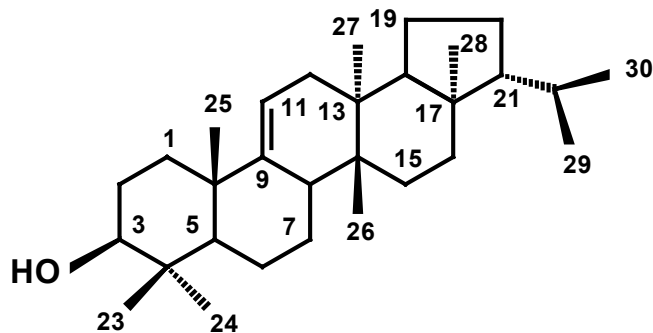
A comparação dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos da ligação dupla e carbinólico com valores característicos para estes carbonos em várias classes de triterpenos (MAHATO & KUNDU, 1994; OLEA & ROQUE, 1990; WILKINS et al., 1987) permitiu associar **Gb-8-10** a um triterpeno pentacíclico do tipo arborano. Levantamento bibliográfico dos valores de RMN ^{13}C para este tipo de triterpeno nos levou a sugerir para **Gb-8-10** a estrutura química do álcool triterpeno pentacíclico arborinol (Fig. 3.46), quando comparamos com o modelo triterpênico arborano, arundoim, um éter metílico do arborinol (Tab. 3.11) (BLUNT & MUNRO, 1980).

O espectro de massas de **Gb-8-10** (Fig. 3.50) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z igual a 426 daltons, estando compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

TABELA 3.12 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (δ) para o triterpeno arborinol **Gb-8-10** isolado e o seu éter metílico, arundoin, da literatura (BLUNT & MUNRO, 1980).

Carbono	Padrão de Hidrogenação	Arborinol Isolado Gb-8-10 ^(a)	Arundoin (Modelo) ^(b)
1	CH ₂	39,3	39,4
2	CH ₂	28,1	23,0
3	CH	79,2	88,9
4	C	37,7	37,7
5	CH	44,3	44,8
6	CH ₂	18,0	18,0
7	CH ₂	19,2	19,0
8	CH	40,0	40,1
9	C	151,1	151,3
10	C	39,3	39,2
11	CH	116,2	116,1
12	CH ₂	36,7	36,8
13	C	36,7	36,8
14	C	37,8	37,7
15	CH ₂	29,3	29,3
16	CH ₂	36,2	36,2
17	C	42,9	43,0
18	CH	52,0	52,1
19	CH ₂	20,1	20,1
20	CH ₂	28,2	28,2
21	CH	59,7	59,7
22	CH	30,8	30,8
23	CH ₃	27,5	27,6
24	CH ₃	15,9	15,8
25	CH ₃	25,2	25,1
26	CH ₃	15,4	15,8
27	CH ₃	15,1	15,4
28	CH ₃	14,0	14,0
29	CH ₃	22,1	22,1
30	CH ₃	23,0	23,0
3-OCH ₃			57,5

(a) 50 MHz, CDCl₃; (b) 22,5 MHz, CDCl₃



Gb-8-10

FIGURA 3.46 - Estrutura química do triterpeno arborinol **Gb-8-10**.

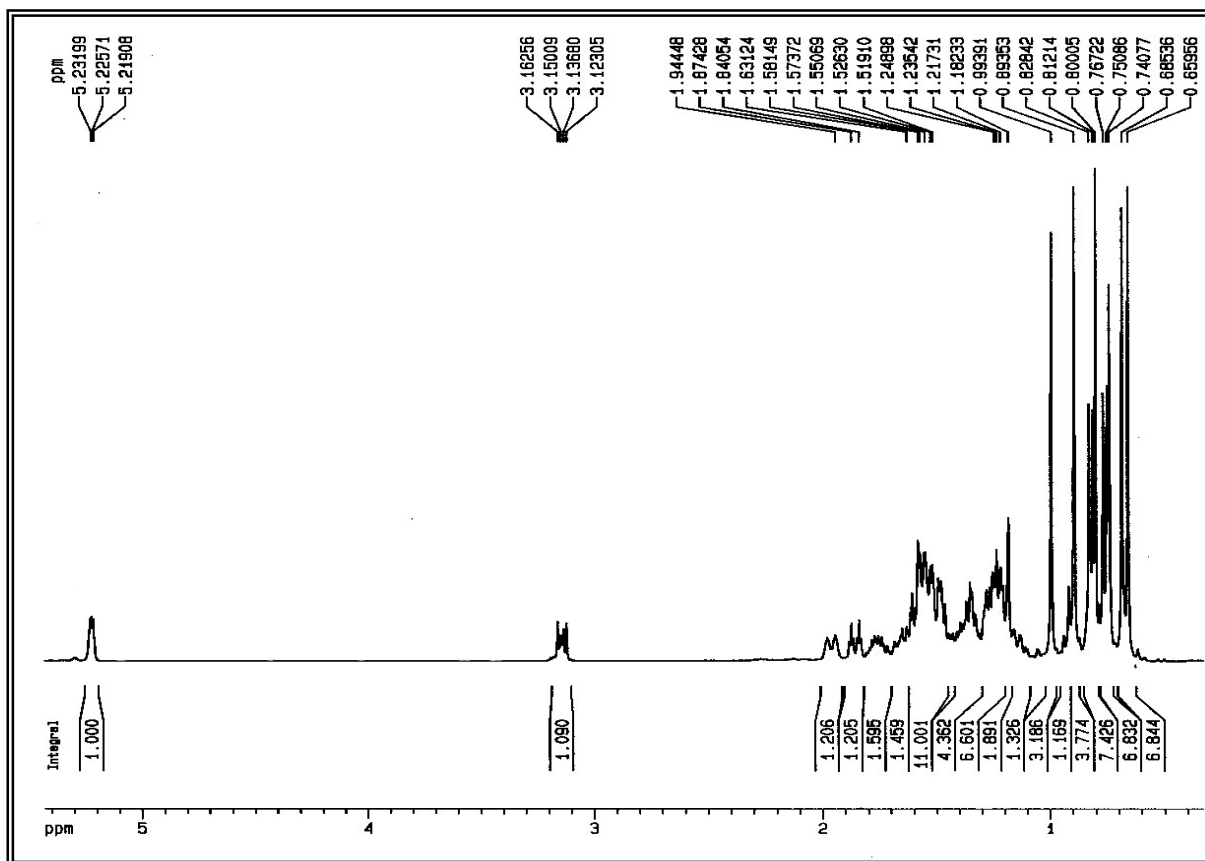


FIGURA 3.47 - Espectro de RMN ^1H do arborinol **Gb-8-10** (400 MHz, CDCl_3 , TMS).

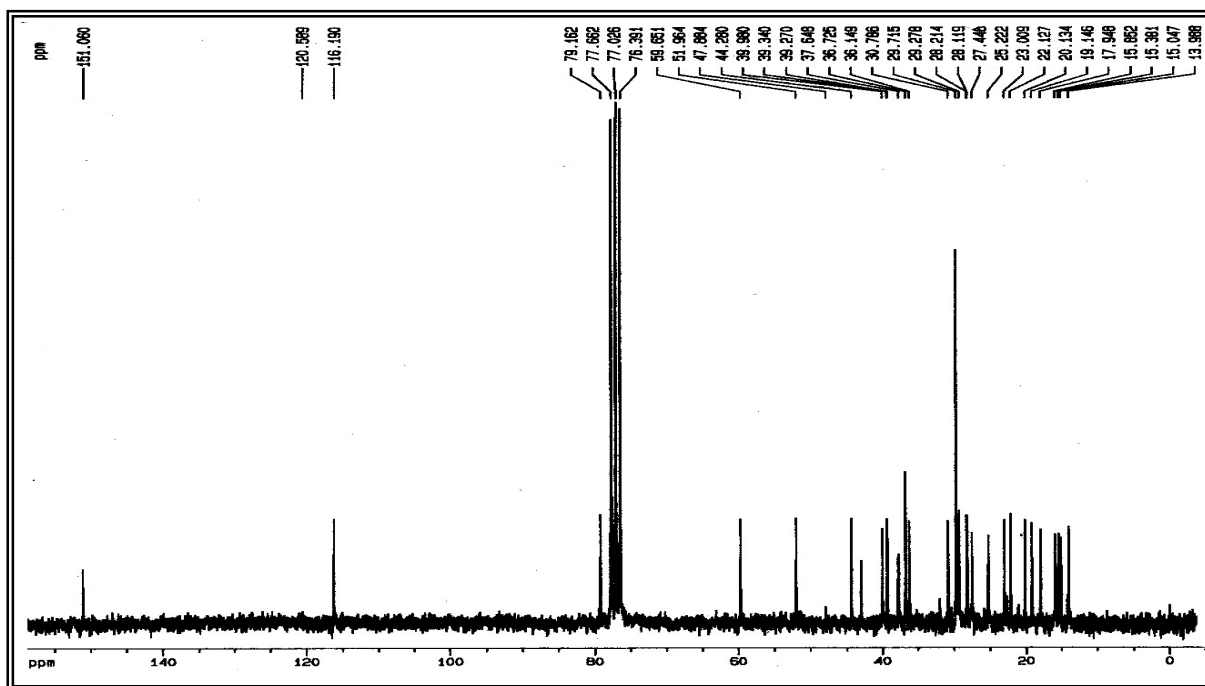


FIGURA 3.48 – Espectro de RMN ^{13}C do arborinol **Gb-8-10** (50 MHz, CDCl_3).

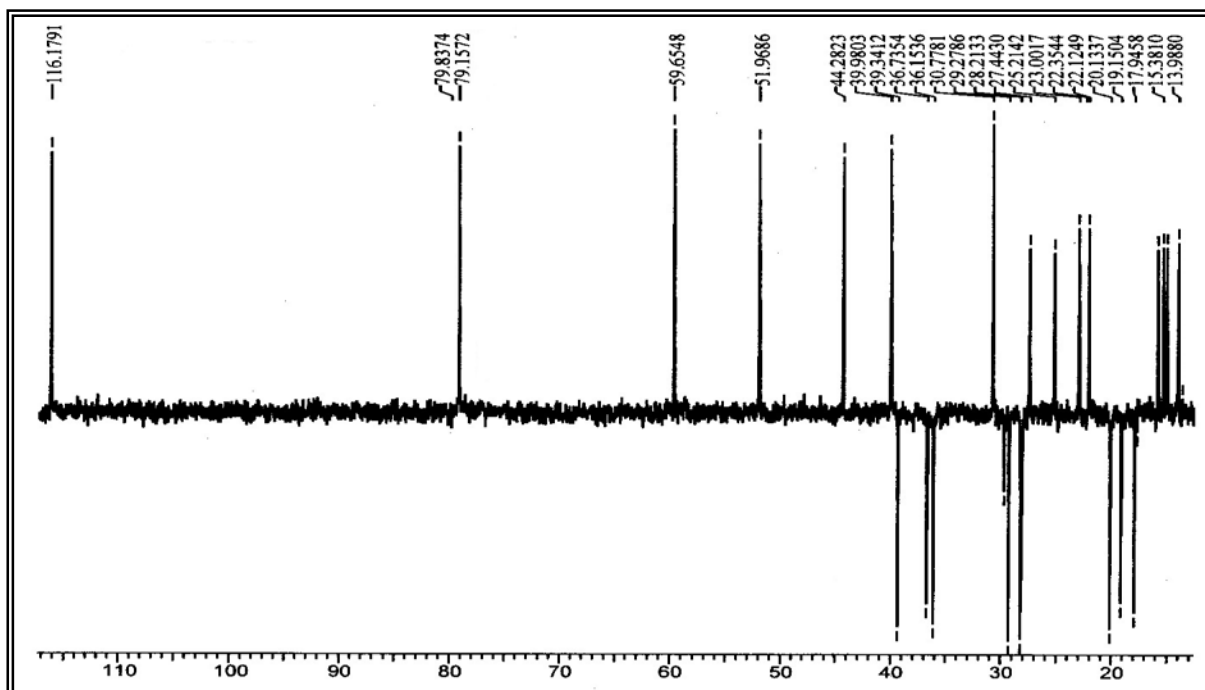


FIGURA 3.49 - Espectro DEPT 135° do arborinol **Gb-8-10** (50 MHz, CDCl_3).

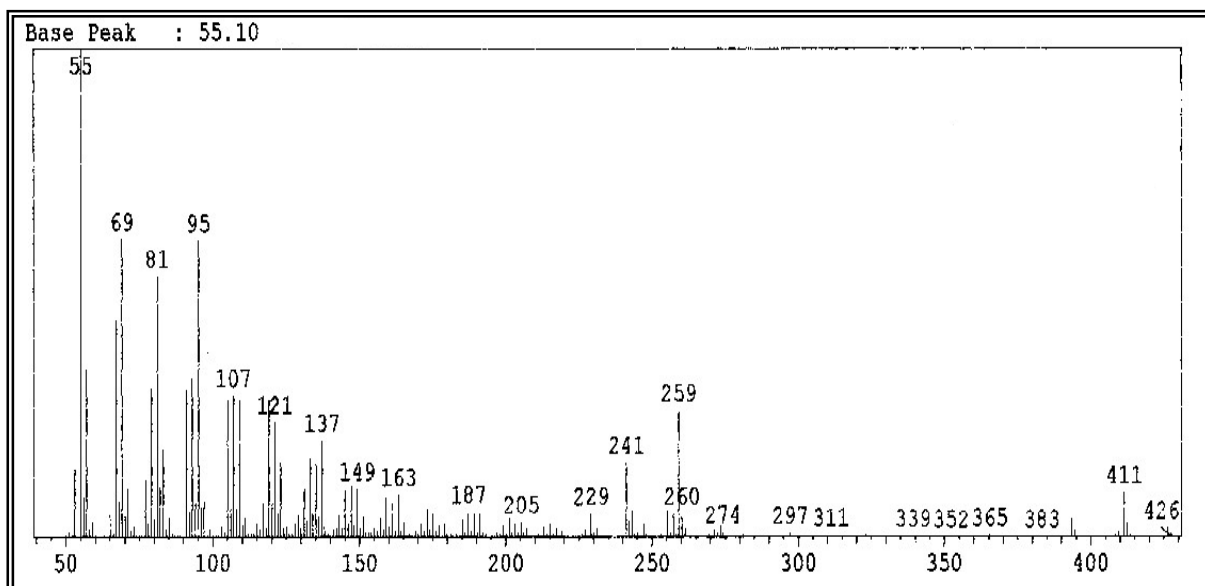


FIGURA 3.50 – Espectro de massas do arborinol **Gb-8-10** (IE – 70 eV).

3.1.8. Identificação da Substância Gb-10-11

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **Gb-10-11** (Fig. 3.52) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,15 (1H, dd, $J = 8,3$ e $1,1$ Hz); δ 8,05 (1H, d, $J = 8,4$ Hz); δ 7,69 (1H, ddd, $J = 8,4$; $7,0$ e $1,1$ Hz); δ 7,47 (1H, ddd, $J = 8,2$; $7,0$ e $1,1$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; o sinal em δ 6,53 (1H, s) foi associado a um hidrogênio na posição 3; o sinal em δ 3,99 (3H, s) foi relacionado a grupo metila ligado a heteroátomo; os sinais em δ 6,77 (1H, d, $J = 1,4$ Hz); δ 6,73 (1H, d, $J = 7,4$ Hz) e δ 6,69 (1H, dd, $J = 7,9$ e $1,6$ Hz) bem como os sinais em δ 3,21 (2H, m) e δ 3,07 (2H, m) foram relacionados a um grupo feniletil e o sinal em δ 5,92 (2H, s) foi associado a hidrogênios metilênicos de um anel metilenodioxí.

O espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz) da substância **Gb-10-11** (Fig. 3.53) apresentou 19 sinais. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig. 3.54) revelou a presença de 7 carbonos não hidrogenados (C), 8 carbonos metínicos (CH), 3 carbonos metilênicos (CH_2) e 1 carbono metílico (CH_3) (Tab. 3.13).

O espectro de massas da substância **Gb-10-11** (Fig. 3.55) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z em 307 daltons, indicando a presença de nitrogênio na molécula e estando compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3$.

A análise dos dados espectroscópicos discutidos permitiu sugerir a estrutura do alcalóide 4-metoxi-2-(3', 4'-metilenodioxifeniletil)quinolina (cusparina) para a substância **Gb-10-11** (Fig. 3.47). A comparação com dados da literatura (FOURNET et al., 1989; RAKOTOSON et al., 1998) confirmou a estrutura proposta para a substância **Gb-10-11** (Tab. 3.14).

TABELA 3.13 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (δ) e DEPT 135° da substância **Gb-10-11** com a literatura.

Carbono	Gb-10-11 ^(a) δ (ppm)	Literatura ^(b) δ (ppm)
2	162,4 (C)	162,4
3	100,7 (CH)	100,8
4	162,8 (C)	162,9
5	121,6 (CH)	121,7
6	128,1 (CH)	128,2
7	135,4 (CH)	135,5
8	125,0 (CH)	125,0
9	120,1 (C)	120,1
10	145,7 (C)	145,7
1'	129,8 (C)	129,8
2'	109,0 (CH)	109,1
3'	148,6 (C)	148,8
4'	147,6 (C)	147,6
5'	108,1 (CH)	108,2
6'	121,3 (CH)	121,4
7'	35,6 (CH ₂)	35,8
8'	41,7 (CH ₂)	41,8
OCH ₃	55,6 (CH ₃)	55,6
O ₂ CH ₂	100,2 (CH ₂)	100,3

(a) CDCl₃, 50 MHz; (b) CDCl₃, 100 MHz

TABELA 3.14 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) do alcalóide **Gb-10-11** com a literatura.

Hidrogênio	Gb-10-11 ^(a)	Literatura ^(b)
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
3	6,53 s	6,53 s
5	8,15 dd (8,3 e 1,1)	8,14 ddd (8,3; 1,5 e 0,6)
6	7,47 ddd (8,3; 7,0 e 1,1)	7,45 ddd (8,3; 7,7 e 1,2)
7	7,69 ddd (8,4; 7,0 e 1,1)	7,68 ddd (8,5; 7,7 e 1,5)
8	8,05 d (8,4)	7,99 ddd (8,5; 1,2 e 0,4)
2'	6,77 d (1,4)	6,77 dd (1,6 e 0,4)
5'	6,73 d (7,8)	6,73 dd (8,0 e 0,4)
6'	6,69 dd (7,8 e 1,6)	6,68 dd (8,0 e 1,6)
7'	3,07 m	3,07 m
8'	3,21 m	3,18 m
4-OCH ₃	3,99 s	3,98 s
O ₂ CH ₂	5,92 s	5,89 s

(a) CDCl₃, 400 MHz, (b) CDCl₃, 300 MHz

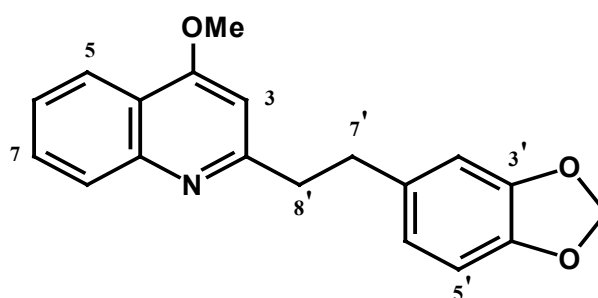


FIGURA 3.51 - Estrutura química do alcalóide **Gb-10-11**.

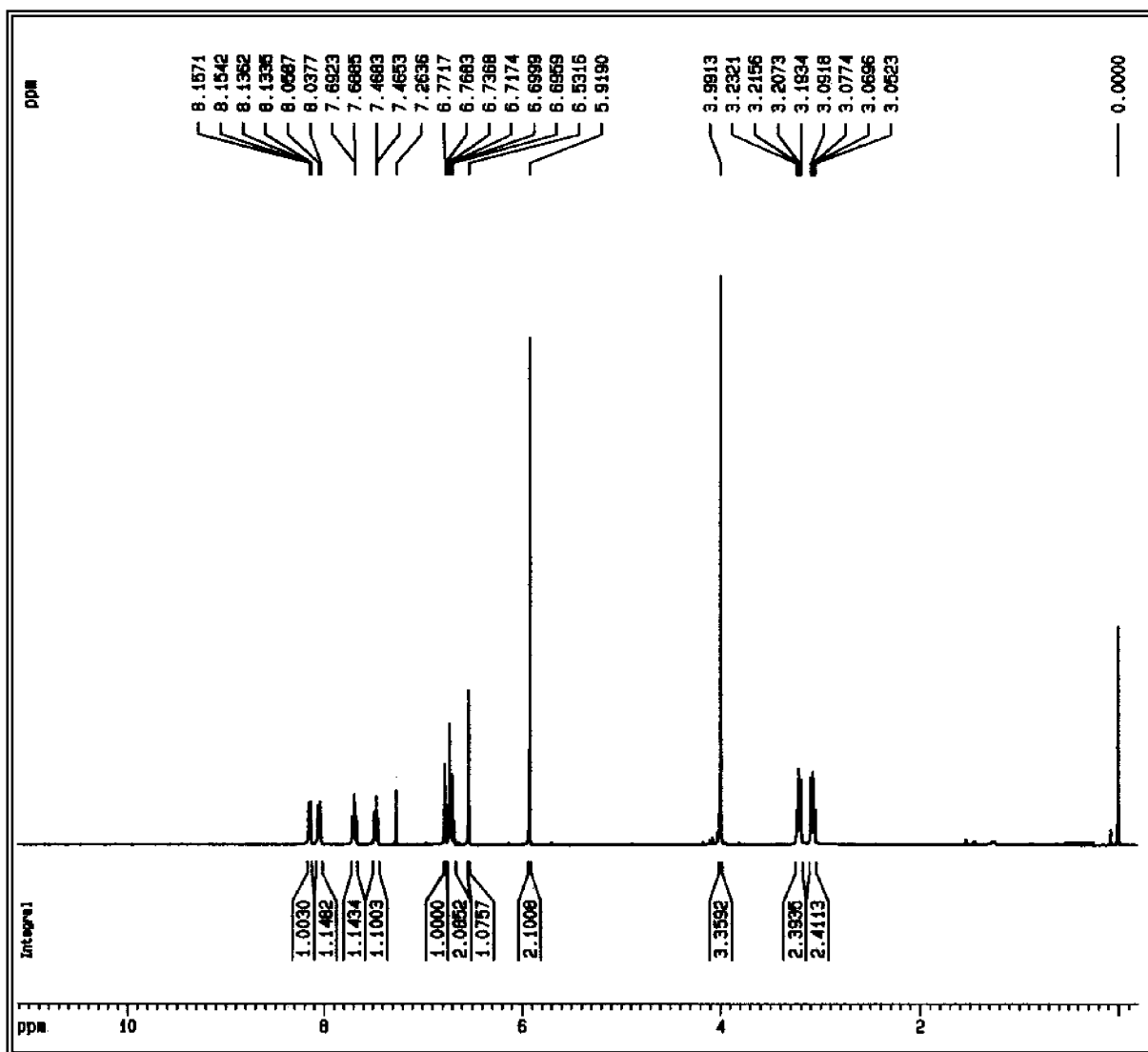


FIGURA 3.52 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-10-11** (400 MHz, CDCl_3).

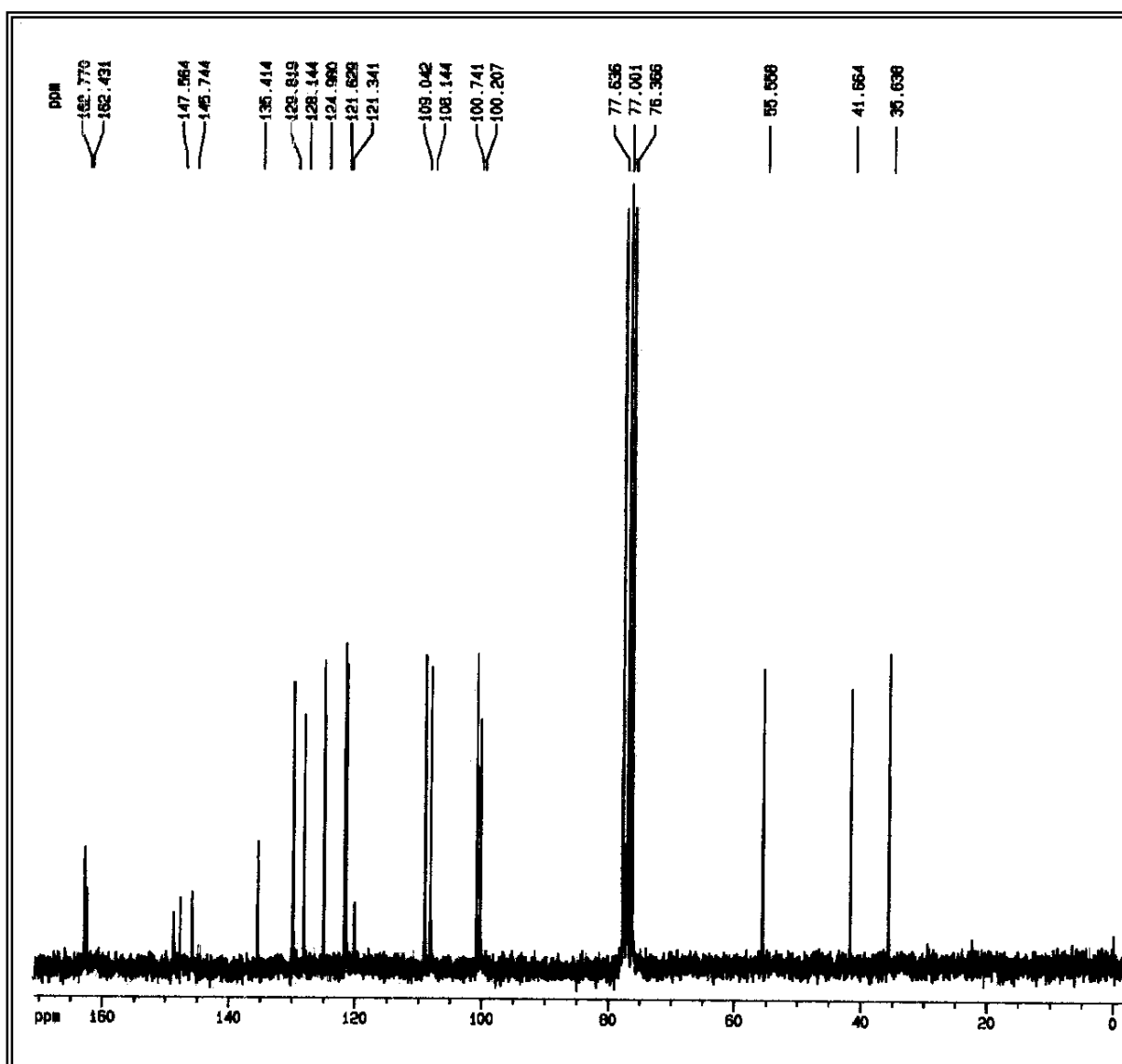


FIGURA 3.53 – Espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-10-11** (50 MHz, CDCl_3).

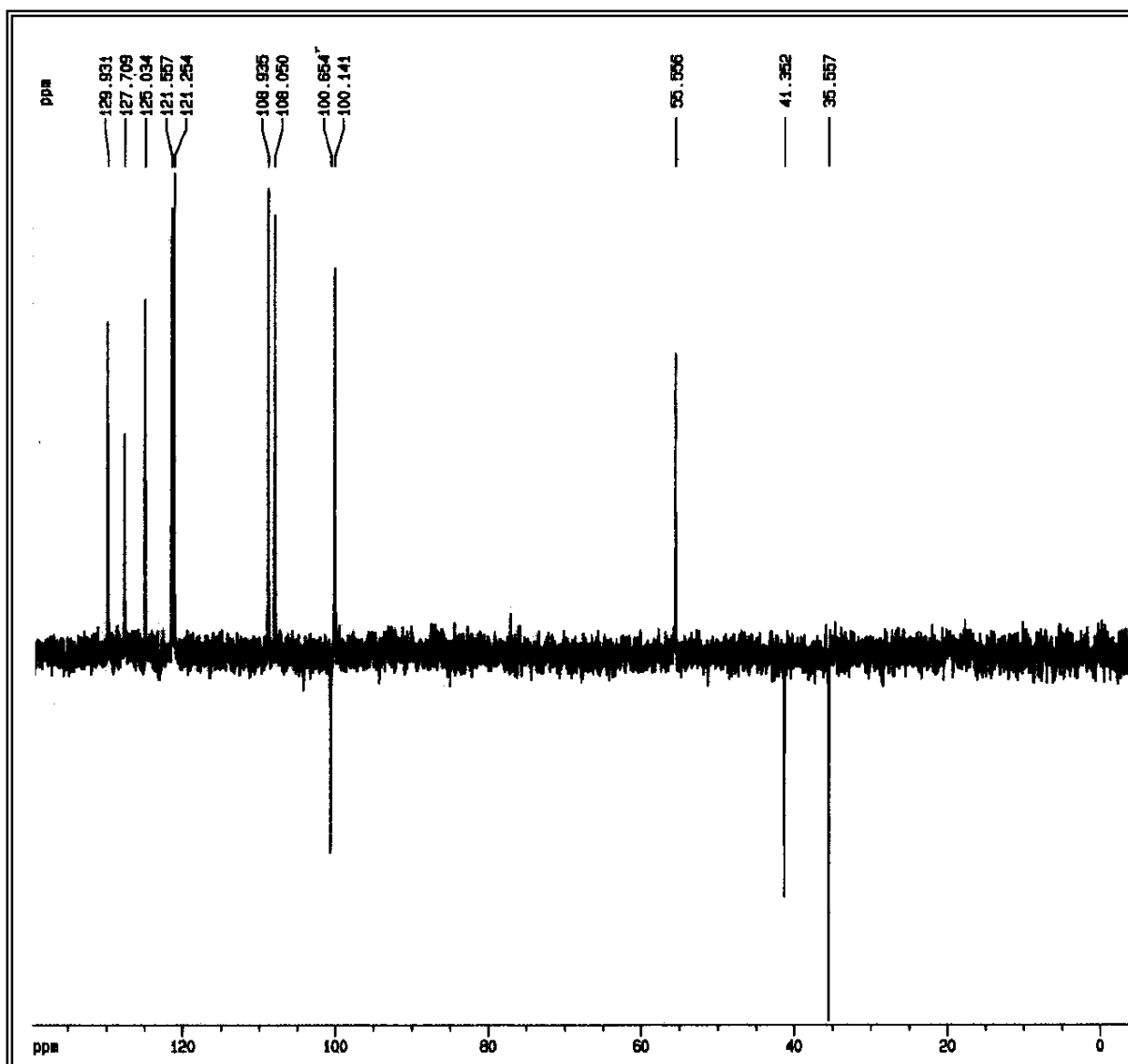


FIGURA 3.54 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-10-11** (50 MHz, CDCl₃).

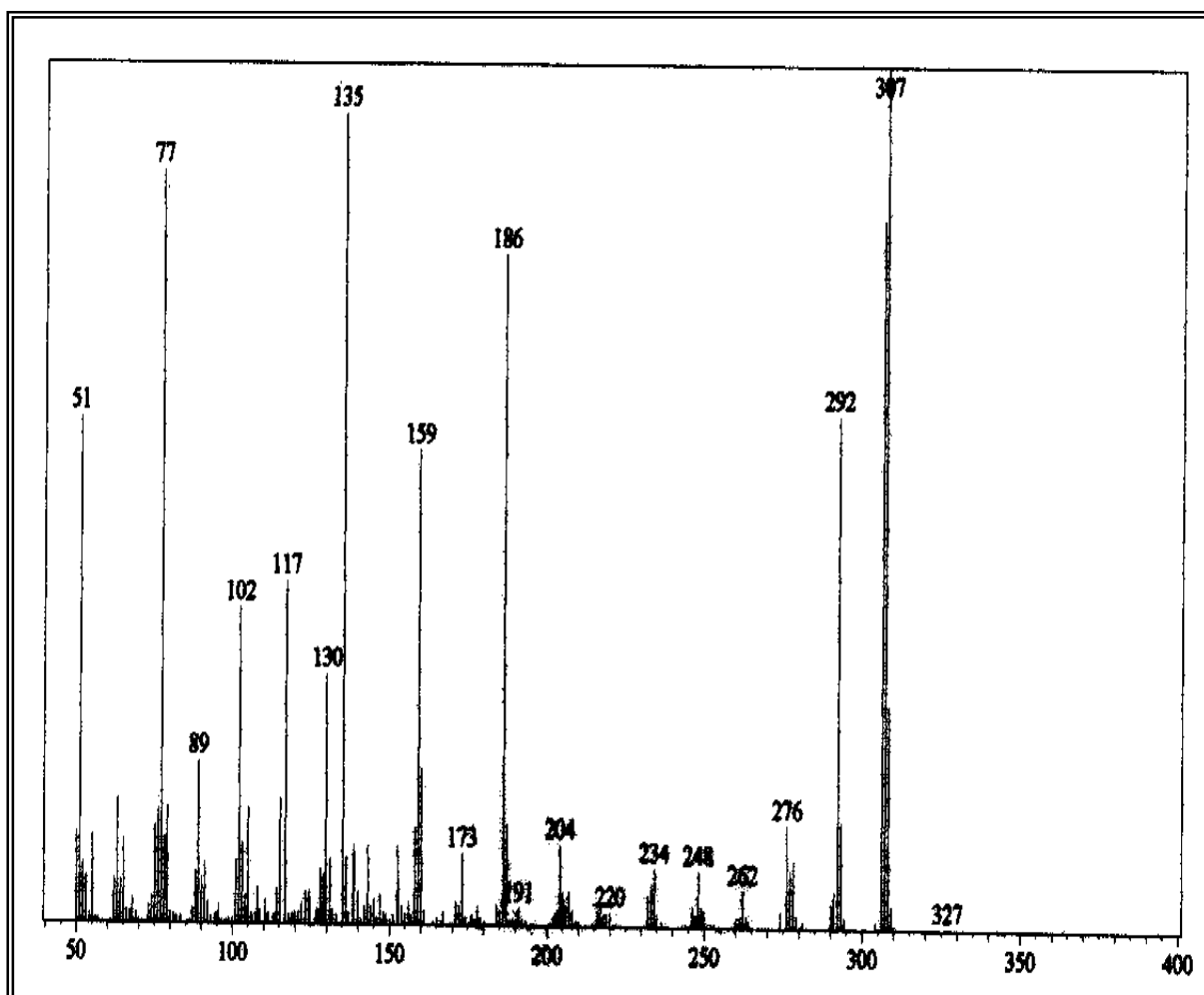


FIGURA 3.55 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-10-11** (IE – 70 eV).

3.1.9. Identificação da Substância Gb-10-12

A mistura das substâncias **Gb-10-11** e **Gb-10-12** mostrou apenas uma mancha fluorescente em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de alcalóide. No entanto, a análise da fração no CG/EM, revelou tratar-se de uma mistura pura de dois alcalóides (**Gb-10-11**) e (**Gb-10-12**) numa proporção de 2:1, respectivamente (Fig. 3.57). Os espectros de massas (Figs. 3.58 e 3.59) mostraram os picos dos íons moleculares com razão m/z igual a 215 e 307 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatíveis com as fórmulas moleculares $C_{13}H_{13}NO_2$ (**Gb-10-12**) e $C_{19}H_{17}NO_3$ (**Gb-10-11**), respectivamente. A análise do CG/EM e RMN 1H do alcalóide com o pico do íon molecular com razão m/z de 307 daltons, revelou tratar-se do mesmo alcalóide (**Gb-10-11**), descrito anteriormente.

O espectro de RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) da mistura pura dos alcalóides **Gb-10-12** e **Gb-10-11** (Fig. 3.60 e 3.61) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,17 (1H, dd, $J = 8,3$ e $0,9$ Hz), δ 8,0 (1H, d, $J = 8,3$ e $0,9$ Hz), δ 7,69 (1H, ddd, $J = 8,3$ e $1,5$ Hz) e δ 7,48 (1H, ddd, $J = 8,3$; $6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; os sinais em δ 6,64 (1H, s) e em δ 4,04 (3H, s) foram associados a um hidrogênio na posição 3 e a um grupo metila ligado a heteroátomo na posição 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 3,94 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ 3,06 (1H, m), e em δ 1,53 (3H, d, $J = 5,0$ Hz) associados a hidrogênios da cadeia lateral epoxipropila. Com as informações obtidas no CG/EM, RMN 1H , RMN ^{13}C (Figs. 3.62 e 3.63) e comparação com dados do alcalóide (**Gb-9-3**) descrito anteriormente, bem como dados descritos na literatura sobre o alcalóide Chimanina D (FOURNET et al., 1993) (Tabs. 3.15 e 3.16), sugeriu-se para o alcalóide (**Gb-10-12**) a estrutura do 4-metoxi-2-(1', 2'-trans-epoxipropil)quinolina, inédita na literatura (Fig. 3.56).

TABELA 3.15 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) dos alcalóides **Gb-10-12**, o **Gb-9-3** e a literatura 2-(1', 2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

H	Gb-10-12 ^(a)	Gb-9-3 ^(a)	Literatura ^(a)
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
3	6,64 s	6,64 s	7,24 d (8,5)
4			8,10 d (8,5)
5	8,17 dd (8,3 e 0,9)	8,16 dd (8,5 e 0,9)	7,76 dd (8,5 e 0,8)
6	7,48 ddd (8,3; 6,9 e 1,5)	7,48 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	7,49 ddd (8,5; 6,9 e 0,8)
7	7,69 dd (8,3 e 1,5)	7,69 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	7,69 ddd (8,5; 6,9 e 0,8)
8	8,0 dd (8,3 e 0,9)	7,99 d (8,4)	8,06 dd (8,5 e 0,8)
1'	3,94 d (2,0)	3,97 d (2,0)	3,95 d (2,0)
2'	3,06 m	3,09 m	3,18 qd
3'	1,53 d (5,0)	1,79 m	1,51 d (5,0)
4'		1,58 m	
5'		1,02 t (7,0)	
4-OCH ₃	4,04 s	4,04 s	

(a) 200 MHz, CDCl₃

TABELA 3.16 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (δ) dos alcalóides **Gb-10-12**, o **Gb-9-3** e a literatura 2-(1', 2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

C	Gb-10-12 ^(a)	Gb-9-3 ^(a)	Literatura ^(a)
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
2	159,1 (C)	159,9 (C)	157,8
3	95,2 (CH)	95,3 (CH)	116,5
4	161,2 (C)	163,5 (C)	136,8
5	121,8 (CH)	122,0 (CH)	127,5
6	126,5 (CH)	125,7 (CH)	126,3
7	131,5 (CH)	130,2 (CH)	129,6
8	128,2 (CH)	128,5 (CH)	128,7
9	119,4 (C)	121,2 (C)	127,6
10	146,4 (C)	148,8 (C)	147,4
1'	59,1 (CH)	59,9 (CH)	60,2
2'	57,4 (CH)	62,5 (CH)	58,1
3'	17,8 (CH ₃)	34,7 (CH ₂)	17,7
4'		19,5 (CH ₂)	
5'		14,1 (CH ₃)	
4-OCH ₃	56,4	56,0	

(a) 50 MHz, CDCl₃

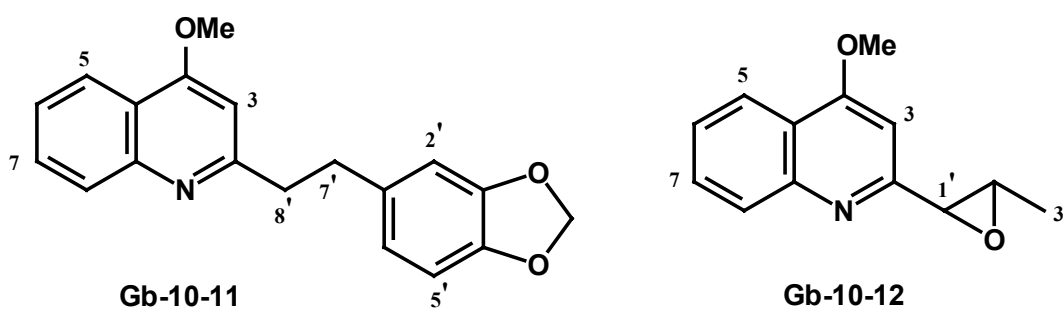


FIGURA 3.56 – Estruturas químicas dos alcalóides **Gb-10-11** e **Gb-10-12**.

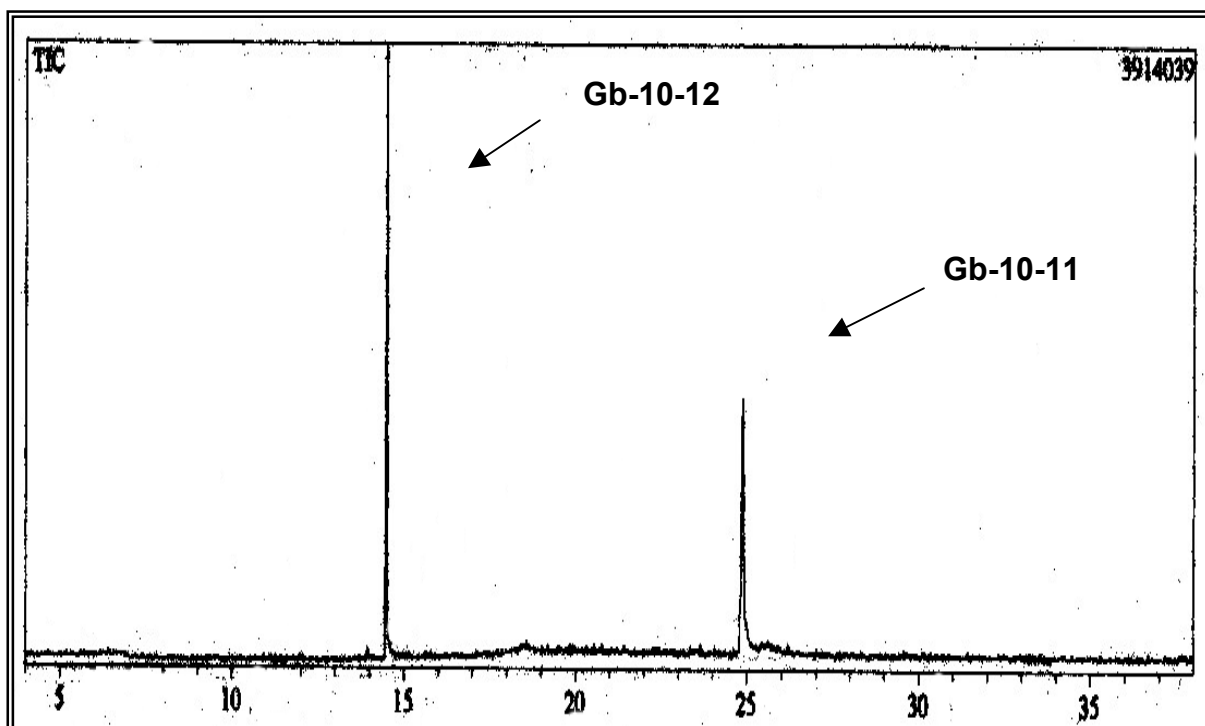


FIGURA 3.57 – Cromatograma dos alcalóides **Gb-10-11** e **Gb-10-12**.

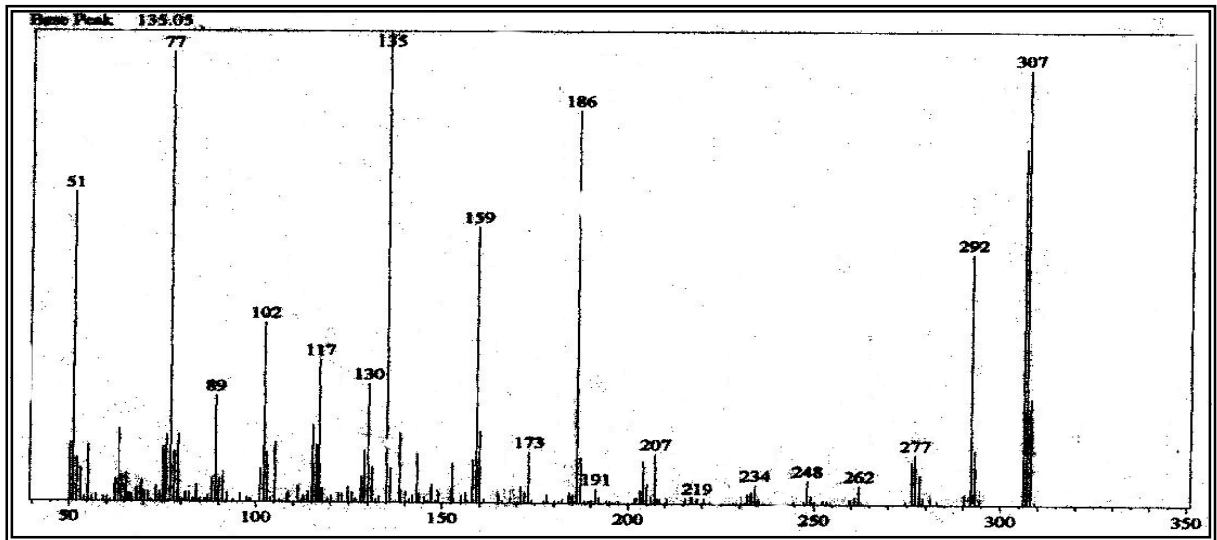


FIGURA 3.58 – Espectro de massas do alcalóide (**Gb-10-11**) (IE – 70 eV).

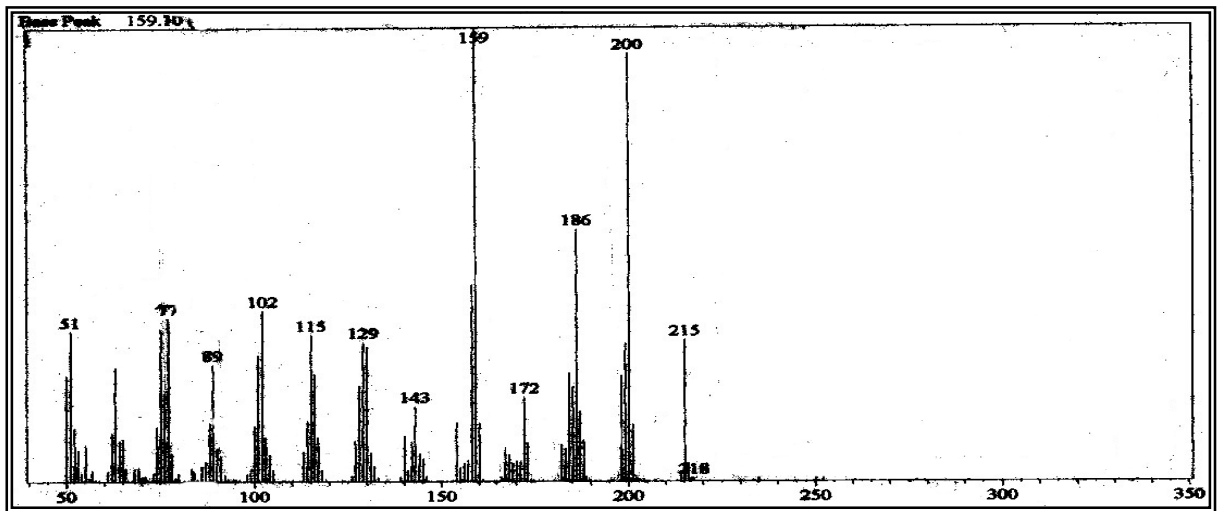


FIGURA 3.59 - Espectro de massas do alcalóide (**Gb-10-12**) (IE – 70 eV).

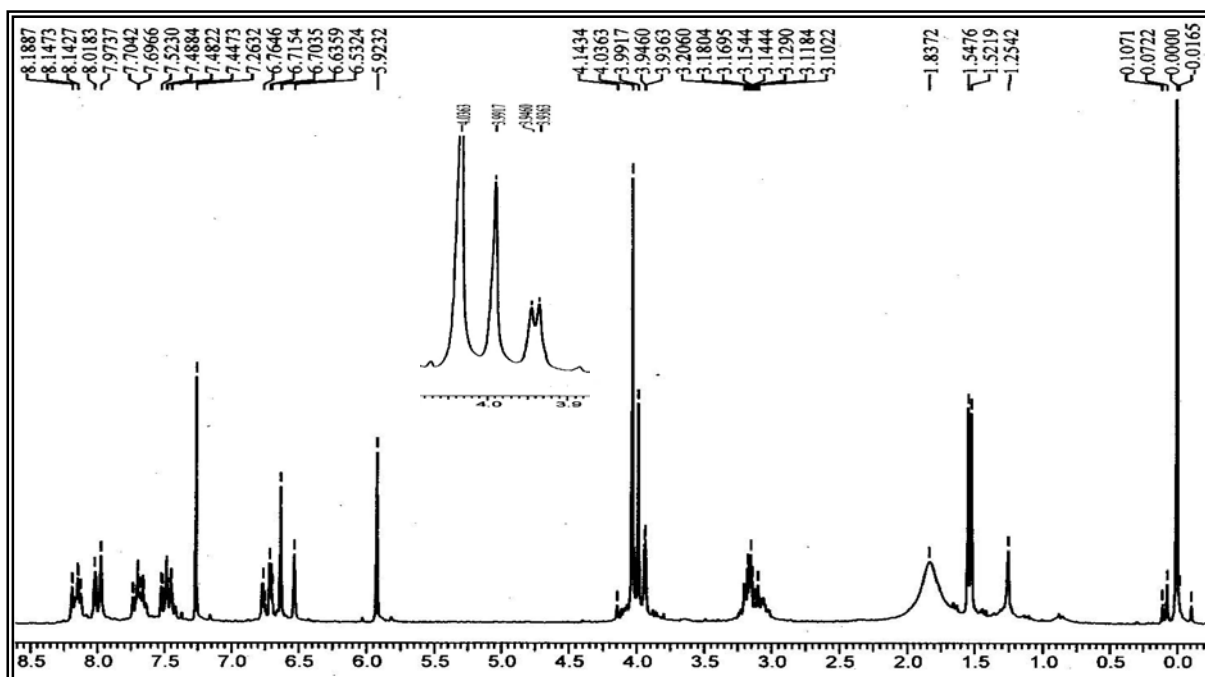


FIGURA 3.60 – Espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides **Gb-10-11** e **Gb-10-12** (200 MHz, CDCl_3).

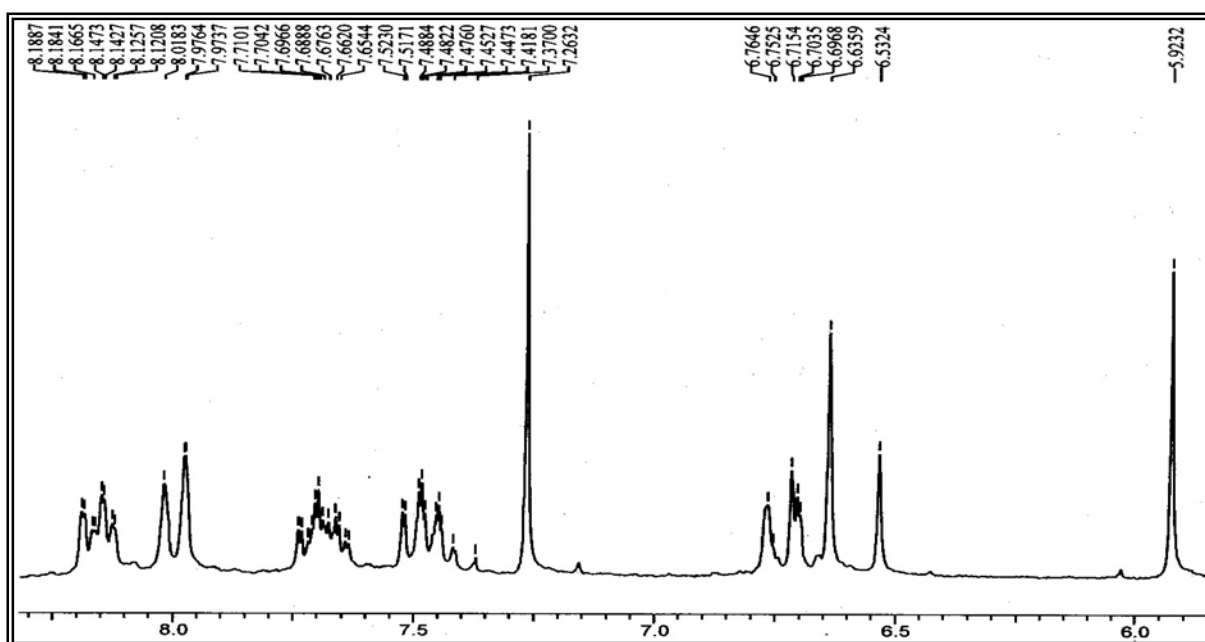


FIGURA 3.61 – Expansão do espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides **Gb-10-11** e **Gb-10-12** (200 MHz, CDCl_3).

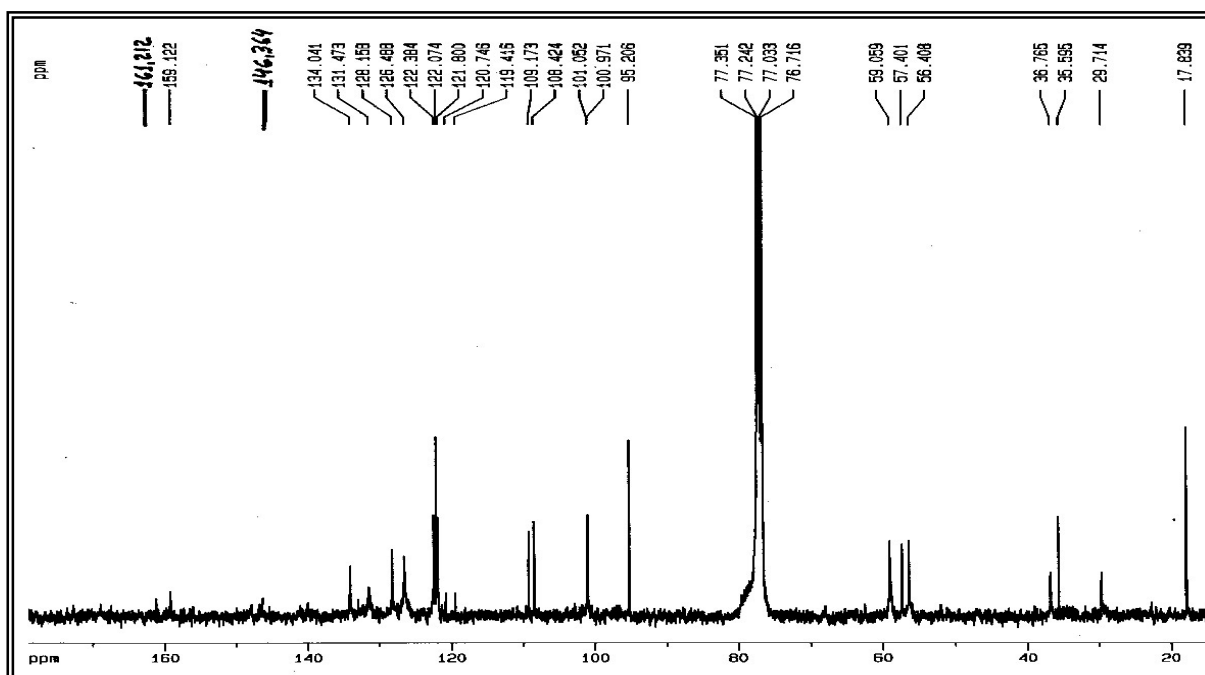


FIGURA 3.62 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura dos alcalóides **Gb-10-11** e **Gb-10-12** (100 MHz, CDCl_3).

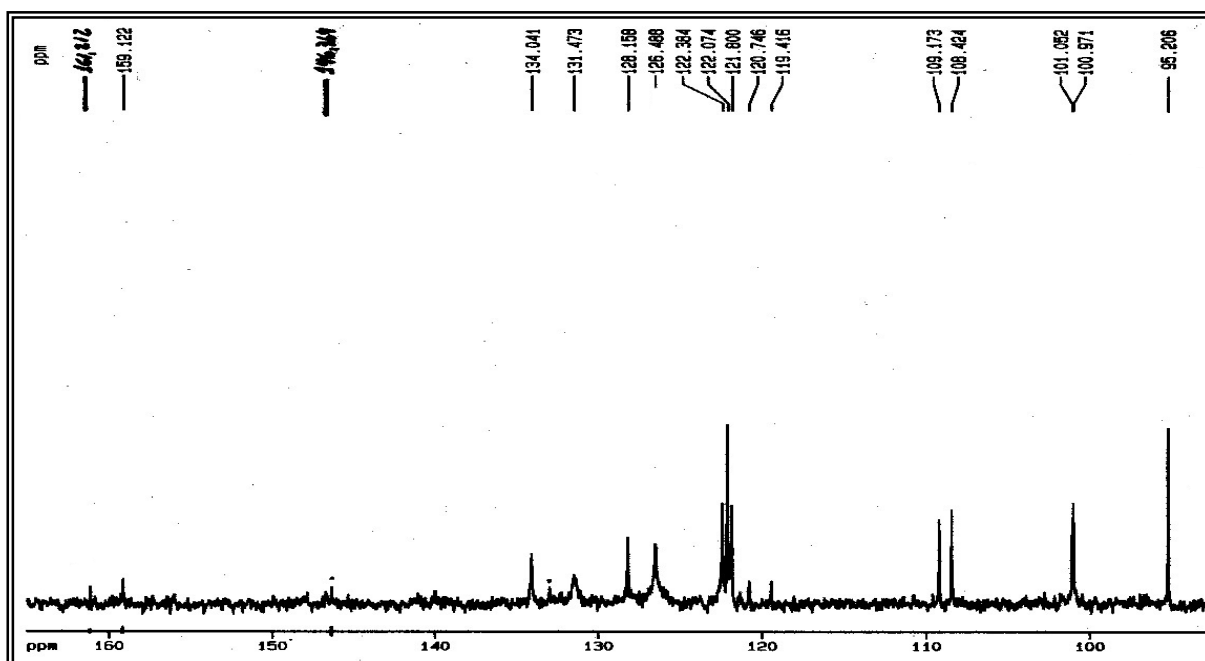


FIGURA 3.63 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura dos alcalóides **Gb-10-11** e **Gb-10-12** (100 MHz, CDCl_3).

3.1.10. Identificação da Substância Gb-10-13

A substância **Gb-10-13** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.68) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 201 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{15}NO$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) da substância **Gb-10-13** (Fig. 3.65) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,14 (1H, dd, $J = 8,3$; e $1,2$ Hz), δ 7,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,66 (1H, ddd, $J = 8,5$; $6,9$ e $1,2$ Hz), δ 7,44 (1H, ddd, $J = 8,3$; $6,9$ e $1,2$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; o sinal em δ 6,64 (1H, s) foi associado a um hidrogênio na posição 3; o sinal em δ 4,04 (3H, s) foi relacionado a grupo metila ligado a heteroátomo; os sinais em δ 2,91 (2H, t, $J = 7,6$ Hz); δ 1,85 (2H, m) e em δ 1,03 (3H, t, $J = 7,3$ Hz) associados a prótons metilênicos e metílicos terminais da cadeia lateral propílica.

O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-10-13** (Fig. 3.66) apresentou 13 sinais, os quais, comparados com o espectro DEPT 135° (Fig. 3.66), revelou a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), cinco carbonos metínicos (CH), dois carbonos metilênicos (CH_2) e dois carbonos metílicos (CH_3) (Tab. 3.17). Os sinais em δ 55,5, δ 41,8, δ 23,3, δ 14,01 estão associados a metoxila aromática, carbonos metilênicos e carbono metílico terminal, respectivamente.

A análise dos dados espectroscópicos discutidos permitiu sugerir a estrutura do alcalóide 4-metoxi-2-*n*-propilquinolina (Chimanina A) para a substância **Gb-10-13** (Fig. 3.64). A comparação com dados da literatura (FOURNET et al., 1993) confirmou a estrutura proposta para a substância **Gb-10-13** (Tab. 3.18).

TABELA 3.17 – Dados de RMN ^{13}C (δ) e DEPT 135° do alcalóide **Gb-10-13**.

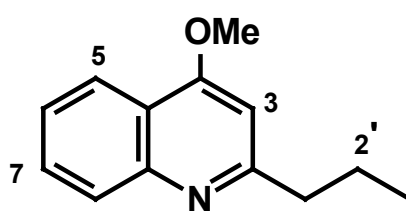
Gb-10-13^(a)	
Carbono	δ (ppm)
2	162,4 (C)
3	99,8 (CH)
4	164,0 (CH)
5	121,6 (CH)
6	124,8 (CH)
7	128,2 (CH)
8	129,7 (CH)
9	120,0 (C)
10	148,7 (C)
1'	41,8 (CH ₂)
2'	23,3 (CH ₂)
3'	14,0 (CH ₃)
4-OCH ₃	55,5 (OCH ₃)

(a) CDCl₃, 50 MHz

TABELA 3.18 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) do alcalóide **Gb-10-13** com a literatura.

4-metoxi-2-n-propilquinolina (Gb-10-13)				
Gb-10-13 ^(a)		Literatura ^(b)		
H/C	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
2		162,4		163,6*
3	6,64 s	99,8	6,65 s	100,0
4		164,05		163,8*
5	8,14 dd (8,3 e 1,2)	121,6	8,15 dd	121,7
6	7,44 ddd (8,3; 6,9 e 1,2)	124,8	7,45 td	125,7
7	7,66 ddd (8,5; 6,9 e 1,2)	128,2	7,67 td	126,4
8	7,99 d (8,5)	129,7	7,99 dd	130,8
9		120,0		119,8
10		148,7		148,5
1'	2,91 t (7,6)	41,8	2,91 t	40,3
2'	1,87 m	23,3	1,86 sext	23,3
3'	1,03 t (7,3)	14,0	1,05 t	13,9
4-OCH ₃	4,04 s	55,5	4,04 s	56,0

(a) CDCl₃, 200 e 50 MHz, (b) CDCl₃, 200 e 50 MHz / *Permutáveis



Gb-10-13

FIGURA 3.64 – Estrutura química do alcalóide **Gb-10-13**.

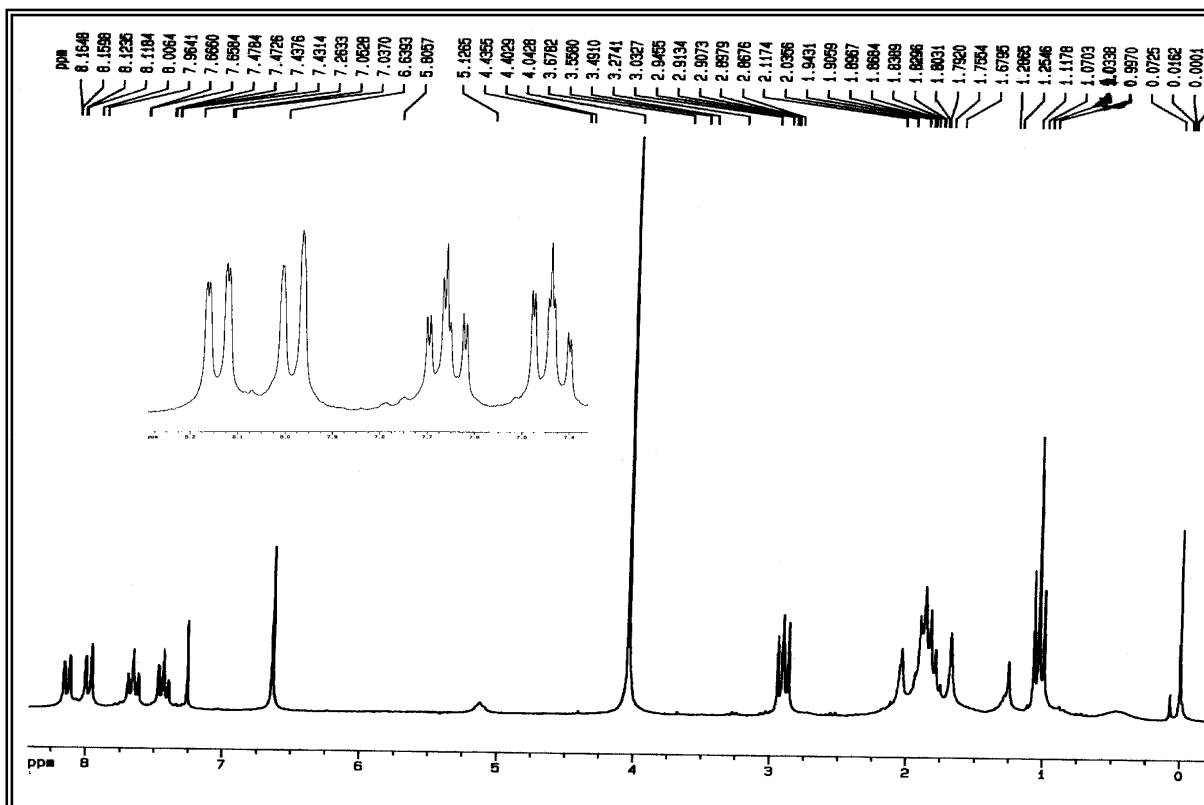


FIGURA 3.65 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-10-13** (200 MHz, CDCl_3).

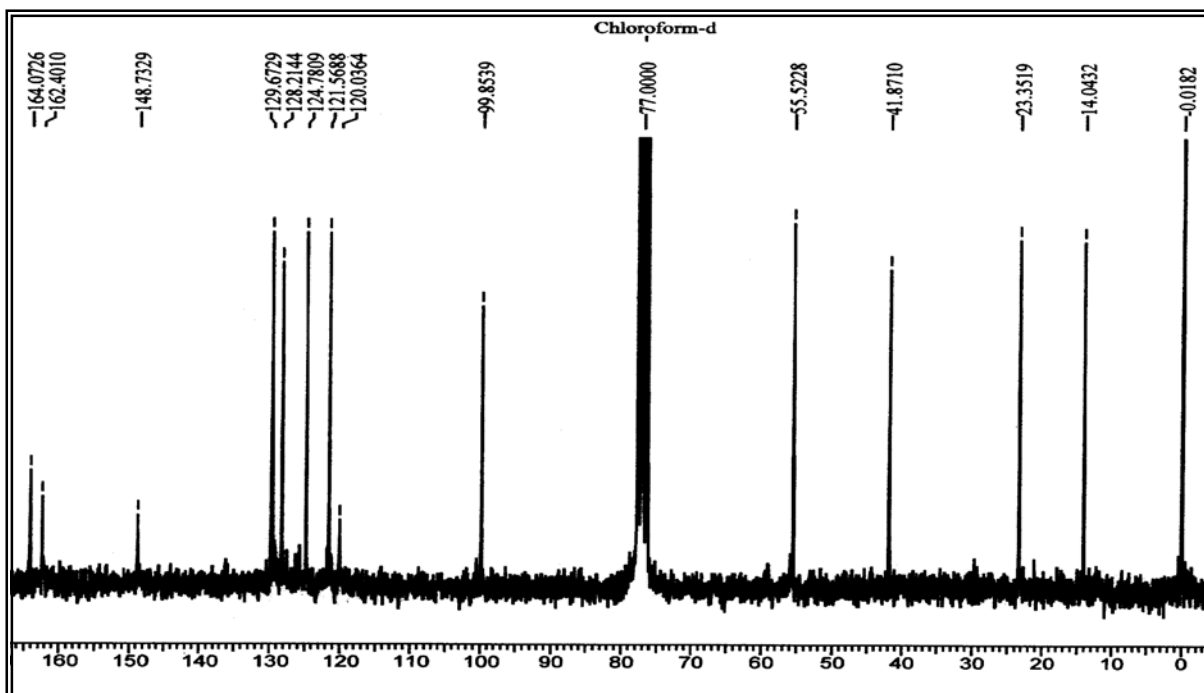


FIGURA 3.66 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-10-13** (50 MHz, CDCl_3).

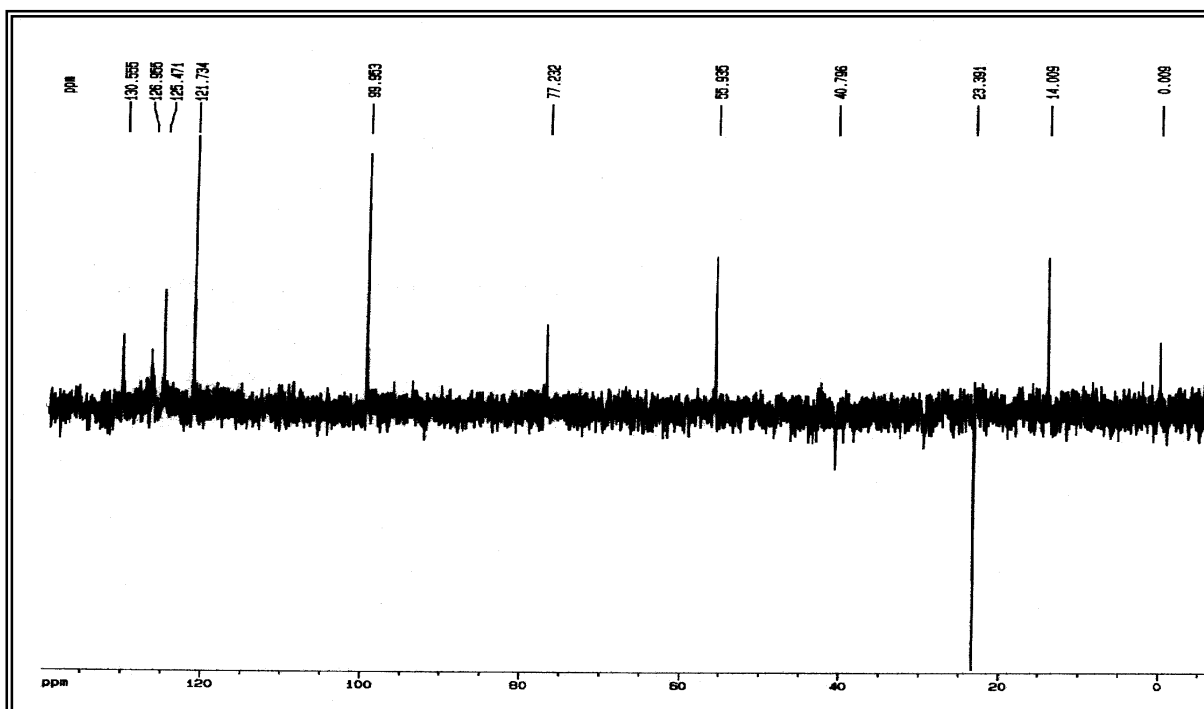


FIGURA 3.67 – Espectro DEPT 135 do alcalóide **Gb-10-13** (50 MHz, CDCl_3).

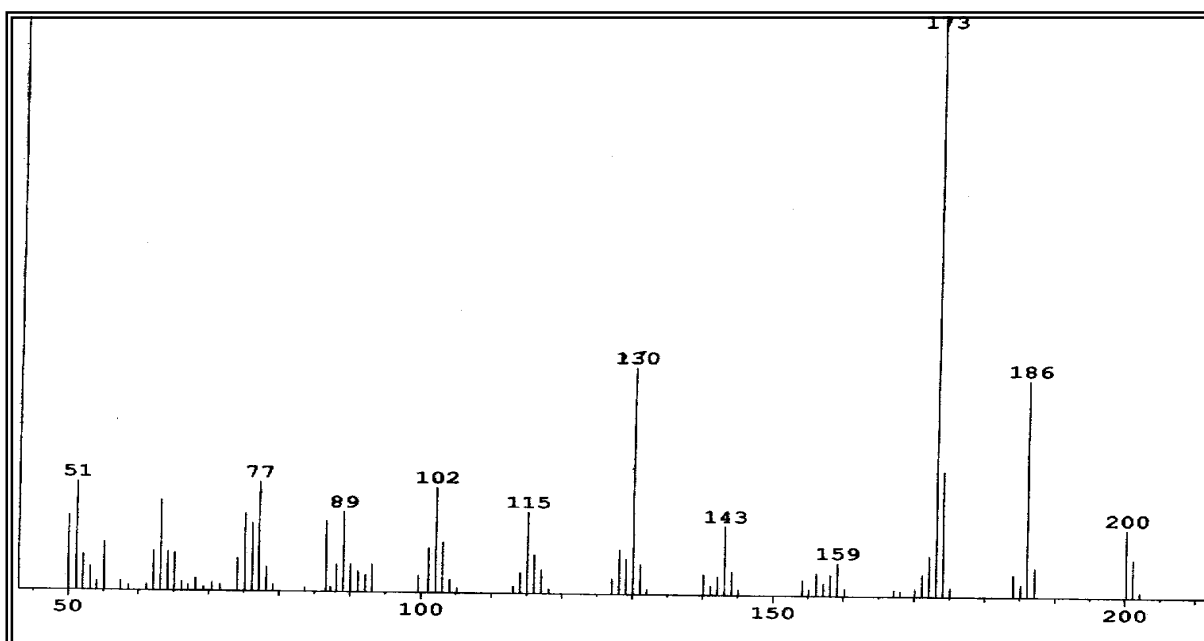


FIGURA 3.68– Espectro de massas do alcalóide **Gb-10-13** (IE – 70 eV).

3.1.11. Identificação da Substância Gb-15-14

A substância **Gb-15-14** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.72) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 199 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{14}H_{17}N$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) da substância **Gb-15-14** (Fig. 3.70) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,05 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,78 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,5$ Hz), δ 7,68 (1H, ddd, $J = 8,5$; $6,9$ e $1,5$ Hz) e δ 7,48 (1H, ddd, $J = 8,0$; $6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; os sinais em δ 7,30 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) e em δ 8,07 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) foram associados aos hidrogênios nas posições 3 e 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 2,97 (2H, t, $J = 7,8$ Hz), δ 1,83 (2H, m), δ 1,41 (2H, m), δ 1,41 (2H, m) e em δ 0,90 (3H, t, $J = 7,0$ Hz) associados a hidrogênios da cadeia lateral *n*-pentila.

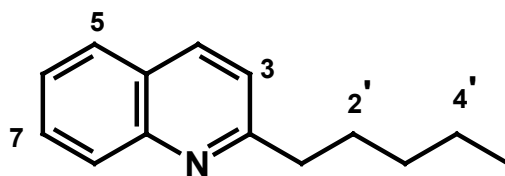
O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-15-14** (Fig. 3.71), mostrou 14 sinais. Destes, os sinais de carbonos mais blindados em δ 39,3, δ 31,8, δ 29,7, δ 22,6 e δ 14,0 estão relacionados aos carbonos metilênicos e metílico terminal da cadeia lateral *n*-pentila.

Com os dados obtidos pode-se sugerir para a substância **Gb-15-14**, a estrutura do alcalóide quinolínicos 2-substituído, 2-*n*-pentilquinolina (Fig. 3.69). Comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C para o alcalóide 2-*n*-pentilquinolina isolado e da literatura (VIEIRA & KUBO, 1990; FOURNET et al., 1989; FOURNET et al., 1993), confirmou tratar-se da mesma substância (Tab. 3.19).

TABELA 3.19 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) do alcalóide 2-quinolínico 2-*n*-pentilquinolina (**Gb-15-14**) isolado com a literatura.

2-<i>n</i>-pentilquinolina Gb-15-14						
C/H	Gb-15-14			Literatura		
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(c)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$
2			163,1 (C)			163,1
3	7,30	d (8,4)	121,4 (CH)	7,28	d (8,5)	121,4
4	8,07	d (8,4)	136,2 (CH)	8,04	d (8,5)	136,2
5	7,78	dd (8,0; 1,5)	126,7 (CH)	7,75	dd (7,8; 1,2)	126,7
6	7,48	ddd (8,0; 6,9; 1,5)	127,5 (CH)	7,46	td (7,8; 1,2)	127,5
7	7,68	ddd (8,5; 6,9; 1,5)	125,6 (CH)	7,66	td (7,8; 1,2)	125,6
8	8,05	d (8,5)	129,3 (CH)	8,02	d (8,5)	129,3
9			128,8 (C)			128,8
10			147,9 (C)			147,9
1'	2,97	t (7,0)	39,3 (CH ₂)	2,95	t (7,4)	39,3
2'	1,83	m	31,7 (CH ₂)	1,80	quint	31,7
3'	1,41	m	29,7 (CH ₂)	1,38	m	29,7
4'	1,41	m	22,6 (CH ₂)	1,38	m	22,6
5'	0,90	t (7,0)	14,0 (CH ₃)	0,88	t (7,2)	13,9

(a) 200 MHz, CDCl₃; (b) 125 MHz, CDCl₃; (c) 500 MHz, CDCl₃.



Gb-15-14

FIGURA 3.69 – Estrutura química do alcalóide **Gb-15-14**.

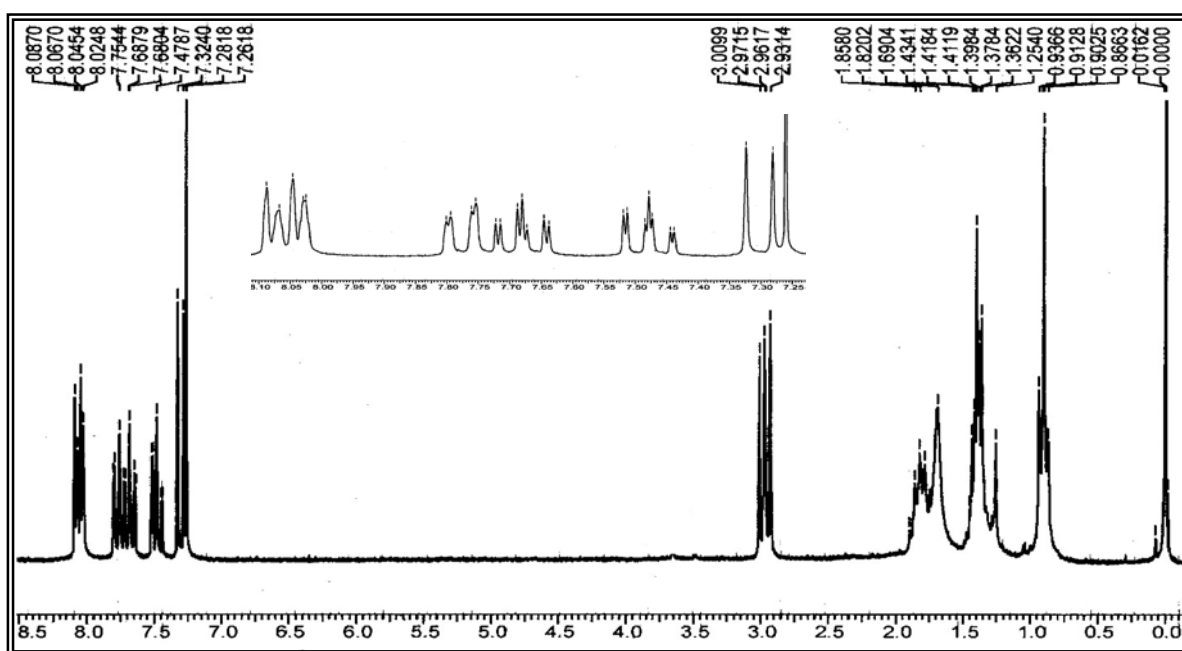


FIGURA 3.70 – Espectro de RMN ¹H do alcalóide **Gb-15-14** (200 MHz, CDCl₃).

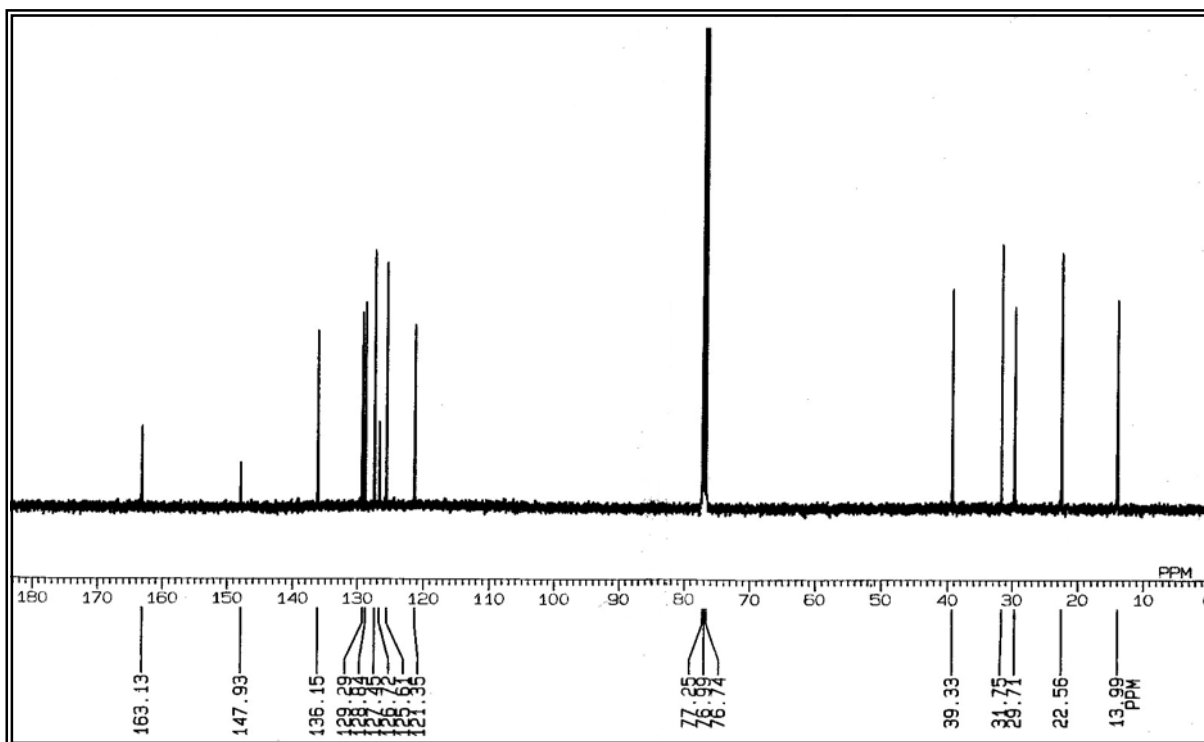


FIGURA 3.71 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-15-14** (125 MHz, CDCl_3).

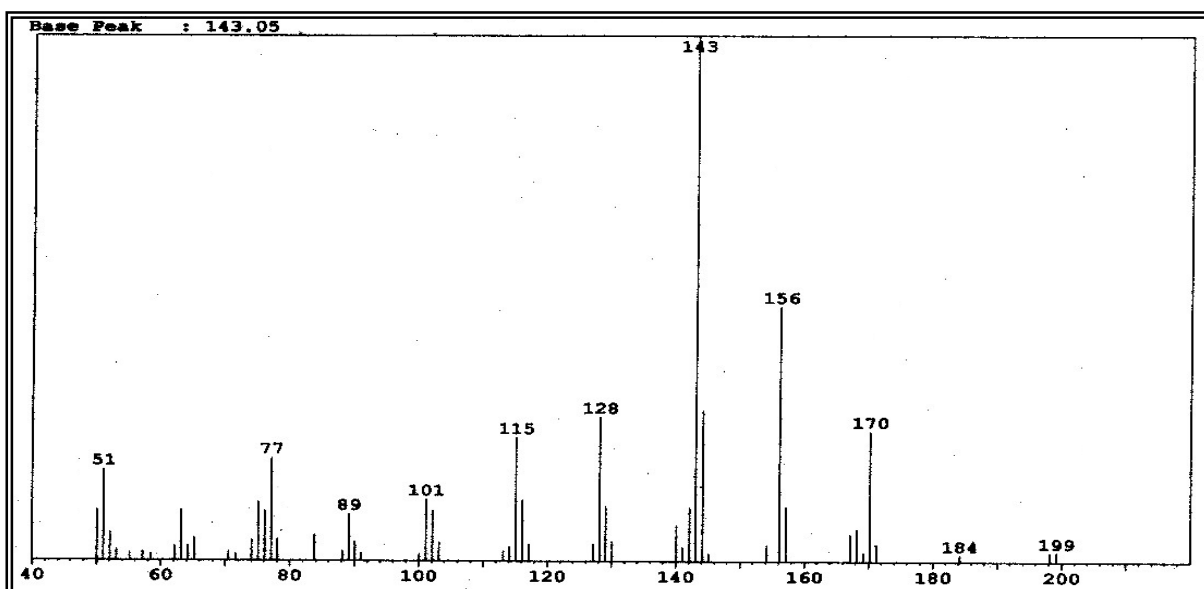


FIGURA 3.72 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-15-14** (IE – 70 eV).

3.1.12. Identificação da Substância Gb-18-15

A substância **Gb-18-15** mostrou fluorescência sob a luz UV e coloração alaranjada quando revelada com o reagente de Dragendorff em CCDA, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.74) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z igual a 229 daltons, confirmando a presença de nitrogênio na molécula, e estando compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{11}NO_3$.

O espectro de RMN 1H da substância **Gb-18-15** (Fig. 3.75), apresentou os sinais em δ 7,58 (d, $J = 2,7$ Hz) e δ 7,06 (d, $J = 2,7$ Hz) característicos de hidrogênios de um anel furano 2,3 dissustituído; os sinais em δ 8,16 (d, $J = 9,3$ Hz), δ 7,09 (dd, $J = 9,3$ e $2,5$ Hz) e δ 7,33 (d, $J = 2,5$ Hz) associados a hidrogênios aromáticos em posição *orto*, *orto/meta* e *meta*, respectivamente; os sinais em δ 4,44 (s) e δ 3,95 (s) referentes a duas metoxilas, sendo a primeira característica de alcalóides furoquinolínicos na posição C-4. Após análise dos dados obtidos, sugeriu-se a estrutura do alcalóide furoquinolínico evolitrina para a substância **Gb-18-15** (Fig. 3.72). A comparação dos dados de RMN 1H da substância **Gb-18-15** com os dados da literatura para o alcalóide furoquinolínico evolitrina (MAFEZOLI, 2002; PUSSET et al., 1991), confirmaram a estrutura proposta (Tab. 3.20).

TABELA 3.20 - Comparação dos dados de RMN ^1H do alcalóide evolitrina **Gb-18-15** isolado com a literatura.

Hidrogênio	Gb-18-15 ^(a) δ (ppm), J (Hz)	Literatura ^(a) δ (ppm), J (Hz)
2	7,58 (d, J = 2,7)	7,57 (d, J = 2,7)
3	7,06 (d, J = 2,7)	7,06 (d, J = 2,7)
5	8,16 (d, J = 9,3)	8,15 (d, J = 9,4)
6	7,09 (dd, J = 9,3 e 2,5)	7,09 (dd, J = 9,3 e 2,6)
8	7,33 (d, J = 2,5)	7,33 (d, J = 2,6)
4-OCH ₃	4,44 (s)	4,43 (s)
7-OCH ₃	3,95 (s)	3,95 (s)

(a) 200 MHz, CDCl₃.

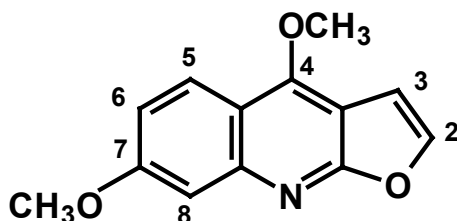


FIGURA 3.73 – Estrutura química da substância **Gb-18-15** evolitrina.

3.1.13. Identificação das Substâncias Gb-19-16 e Gb-19-17

A fração GbFD-19-5-4 mostrou fluorescência sob a luz UV e coloração alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo tratar-se de alcalóide. O espectro de massas (Fig. 3.77) apresentou o pico do íon molecular com uma razão m/z igual a 291 daltons, confirmando a presença de nitrogênio na molécula.

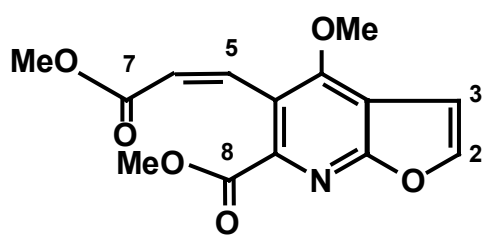
O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **Gb-19-16** e **Gb-19-17** (Fig. 3.78), apresentou os sinais em δ 7,73 (d, J = 2,7 Hz), δ 7,07 (d, J = 2,7 Hz) e δ 7,03 (d, J = 2,7 Hz) característicos de hidrogênios de um anel furano 2,3-dissubstituído. Os sinais em δ 6,16 (d, J = 11,8 Hz) e δ 7,26 (d, J = 11,8 Hz), e em δ 6,51 (d, J = 16,1 Hz) e δ 7,99 (d, J = 16,1 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-6 de ésteres Z e E- α,β -insaturados. Os sinais em δ 4,24 (s) e δ 4,35 (s) são referentes a duas metoxilas características de alcalóides furoquinolínicos na posição C-4. Os sinais em δ 3,94 (s) e δ 3,57 (s), e em δ 3,99 (s) e δ 3,82 (s) referentes a grupos metoxi ligados a carbonos carbonílicos de alcalóides furoquinolínicos seco no anel A.

Com os dados obtidos, sugeriu-se as estruturas dos alcalóides secofuroquinolínicos Z-Dimetilrhoifolinato (**Gb-19-16**) e E-Dimetilrhoifolinato (**Gb-19-17**) (Fig. 3.76). A comparação dos dados de RMN ^1H de **Gb-19-16** e **Gb-19-17** com dados da literatura para os alcalóides secofuroquinolínicos Z e E-Dimetilrhoifolinato (ARRUDA et al., 1992) confirmaram as estruturas propostas (Tab. 3.21).

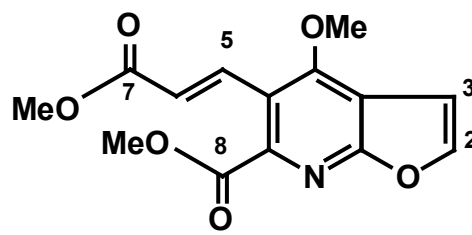
TABELA 3.21 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) dos alcalóides Z-dimetilrhoifolinato (**Gb-19-16**) e o E-dimetilrhoifolinato (**Gb-19-17**) isolados com a literatura.

Z-Dimetilrhoifolinato (Gb-19-16)		
Hidrogênio	Gb-19-16^(a) δ (ppm), J (Hz)	Literatura^(b) δ (ppm), J (Hz)
2	7,73 (d, J = 2,7)	7,72 (d, J = 2,6)
3	7,03 (d, J = 2,7)	7,03 (d, J = 2,6)
5	7,26 (d, J = 11,8)	7,26 (d, J = 11,8)
6	6,16 (d, J = 11,8)	6,16 (d, J = 11,8)
4-OCH ₃	4,24 (s)	4,24 (s)
7-CO ₂ CH ₃	3,57 (s)	3,57 (s)
8-CO ₂ CH ₃	3,94 (s)	3,94 (s)
E-Dimetilrhoifolinato (Gb-19-17)		
Hidrogênio	Gb-19-17^(a) δ (ppm), J (Hz)	Literatura^(b) δ (ppm), J (Hz)
2	7,73 (d, J = 2,7)	7,72 (d, J = 2,6)
3	7,07 (d, J = 2,7)	7,03 (d, J = 2,6)
5	7,99 (d, J = 16,1)	7,94 (d, J = 15,6)
6	6,52 (d, J = 16,1)	6,49 (d, J = 15,6)
4-OCH ₃	4,35 (s)	4,36 (s)
7-CO ₂ CH ₃	3,82 (s)	3,83 (s)
8-CO ₂ CH ₃	3,99 (s)	3,99 (s)

(a) 400 MHz, CDCl₃; (b) 200 MHz, CDCl₃



Gb-19-16



Gb-19-17

FIGURA 3.76 - Estruturas químicas dos alcalóides **Gb-19-16** e **Gb-19-17**.

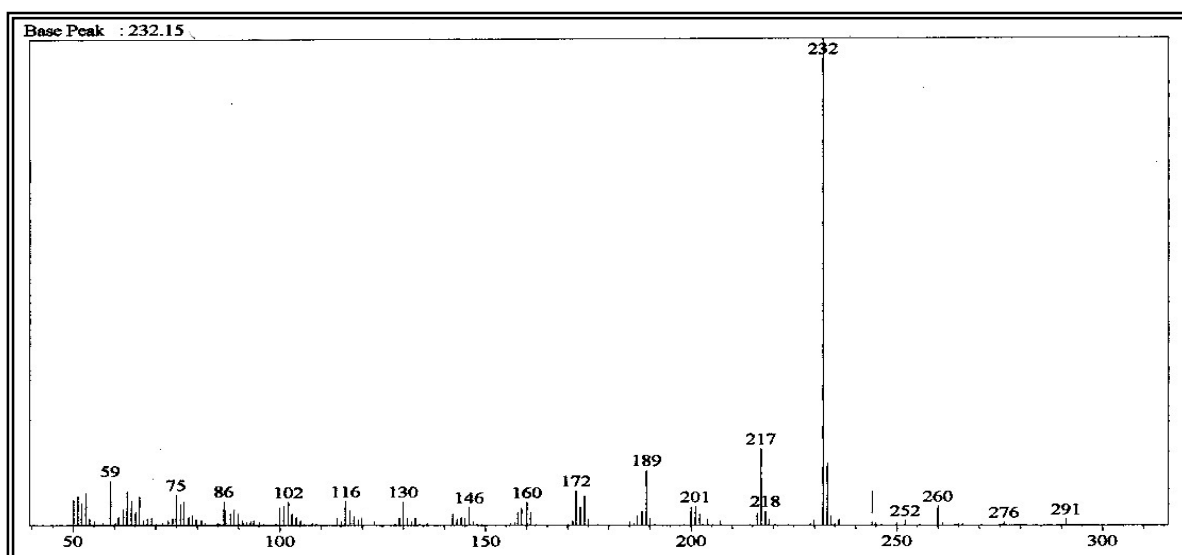


FIGURA 3.77 - Espectro de massas dos alcalóides **Gb-19-16** e **Gb-19-17** (IE – 70 eV).

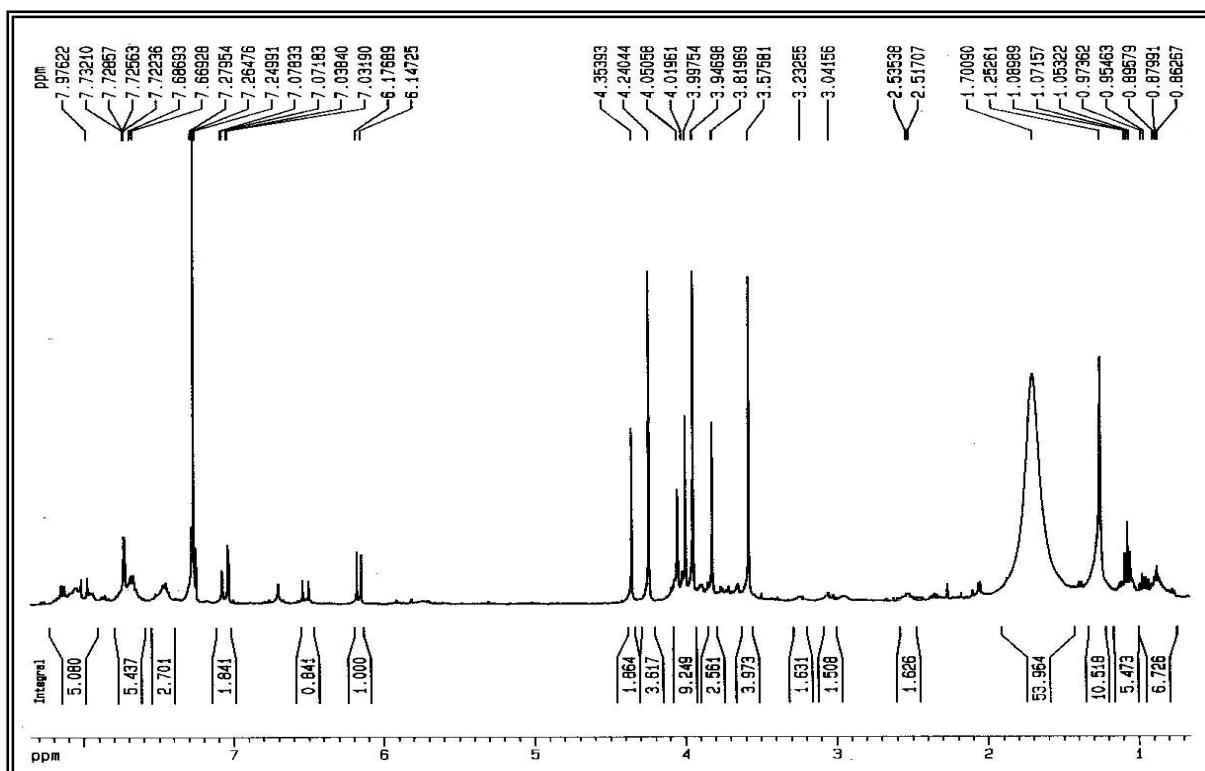


FIGURA 3.78 – Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) dos alcalóides **Gb-19-16** e **Gb-19-17**.

3.1.14. Identificação da Substância **Gb-20-18**

A substância **Gb-20-18** apresentou fluorescência sob a luz UV e coloração marrom escuro quando revelada com vanilina sulfúrica.

O espectro de massas da **Gb-20-18** (Fig. 3.80) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z em 224 daltons, estando compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{20}O_3$.

O espectro de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) da substância **Gb-20-18** (Fig. 3.81), exibiu quatro sinais de singletos metílicos em δ 1,16; δ 1,39; δ 1,44 e δ 2,18, sendo este último uma metila ligada a carbonila de cetona, um sinal de hidrogênio carbinólico em δ 4,3 (m), um sinal de hidrogênio olefínico em δ 5,86 (s) e sinais de dois duplo duplo dubletos em δ 1,99 (ddd, $J = 13,0, 4,0$ e $2,0$ Hz) e δ 2,30 (ddd, $J = 13,0, 4,0$ e $2,0$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da **Gb-20-18** (Fig. 3.82), apresentou 13 sinais, entre estes um sinal referente a carbonila de cetona com dupla conjugada em δ 209,6 e dois sinais referentes a carbonos carbinólicos em δ 63,9 e δ 72,4.

A análise dos dados espectroscópicos, permitiu sugerir a estrutura do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dien-9-ona para a substância **Gb-20-18** (Fig. 3.79). A comparação com dados da literatura (MIYASE et al., 1987; SHIRAGA et al., 1988; HASHIMOTO et al., 1991; MENEZES, 2002) confirmou a estrutura proposta para a substância **Gb-20-18** (Tabs. 3.22 e 3.23).

TABELA 3.22 - Comparação dos dados de RMN ^1H do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dien-9-ona **Gb-20-18** isolado com a literatura.

Hidrogênio	Gb-20-18^(a) δ (ppm), J (Hz)	Literatura^(b) δ (ppm), J (Hz)
1 - β - CH_3	1,16 (s)	1,16 (s)
1 - α - CH_3	1,39 (s)	1,38 (s)
2	1,99 (ddd, J = 13,0, 4,0 e 2,0)	2,00 (ddd, J = 13,0, 4,0 e 2,0)
3	4,35 (m)	4,34 (tt, J = 4,0 e 11,5)
4	2,30 (ddd, J = 13,0, 4,0 e 2,0)	2,30 (ddd, J = 13,0, 4,0 e 2,0)
5 - CH_3	1,44 (s)	1,43 (s)
8	5,86 (s)	5,85 (s)
10 - CH_3	2,18 (s)	2,18 (s)

(a) 400 MHz, CDCl_3 , TMS; (b) 200 MHz, CDCl_3 , TMS

TABELA 3.23 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastima-6,7-dien-9-ona **Gb-20-18** isolado com a literatura.

Carbono	Gb-20-18 ^(a) δ (ppm)	Literatura ^(a) δ (ppm)
1	36,1 (C)	36,2
2	49,0 (CH ₂)	49,0
3	63,9 (CH)	63,9
4	48,7 (CH ₂)	48,8
5	72,4 (C)	72,3
6	118,7 (C)	118,8
7	198,2 (C)	198,3
8	100,9 (C)	100,8
9	209,6 (C)	209,7
10	31,9 (CH ₃)	31,8
11	26,4 (CH ₃)	26,4
12	29,1 (CH ₃)	29,1
13	31,0 (CH ₃)	30,9

(a) 50 MHz, CDCl_3

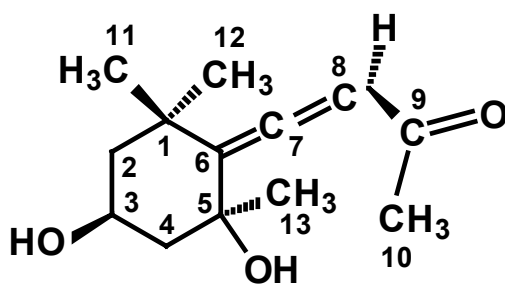


FIGURA 3.79 – Estrutura química do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastima-6,7-dien-9-ona **Gb-20-18**.

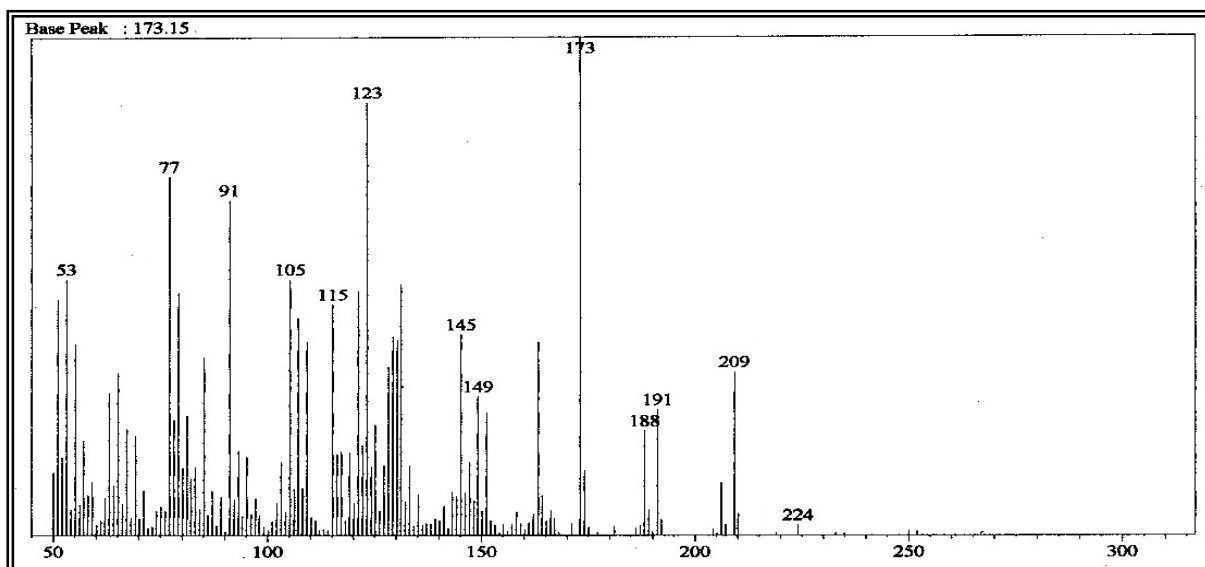


FIGURA 3.80 – Espectro de massas do norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dien-9-ona **Gb-20-18** (IE – 70 eV).

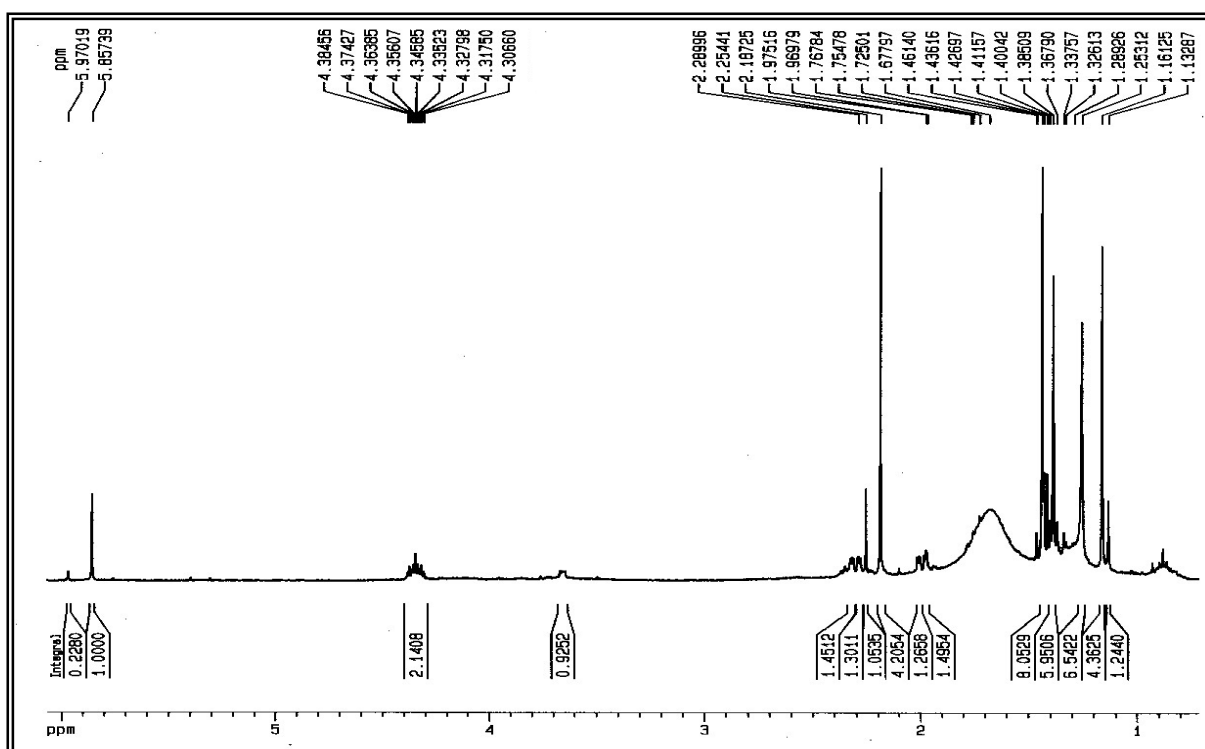


FIGURA 3.81 – Espectro de RMN ^1H do norsesquiterpeno **Gb-20-18** (400 MHz, CDCl_3 , TMS).

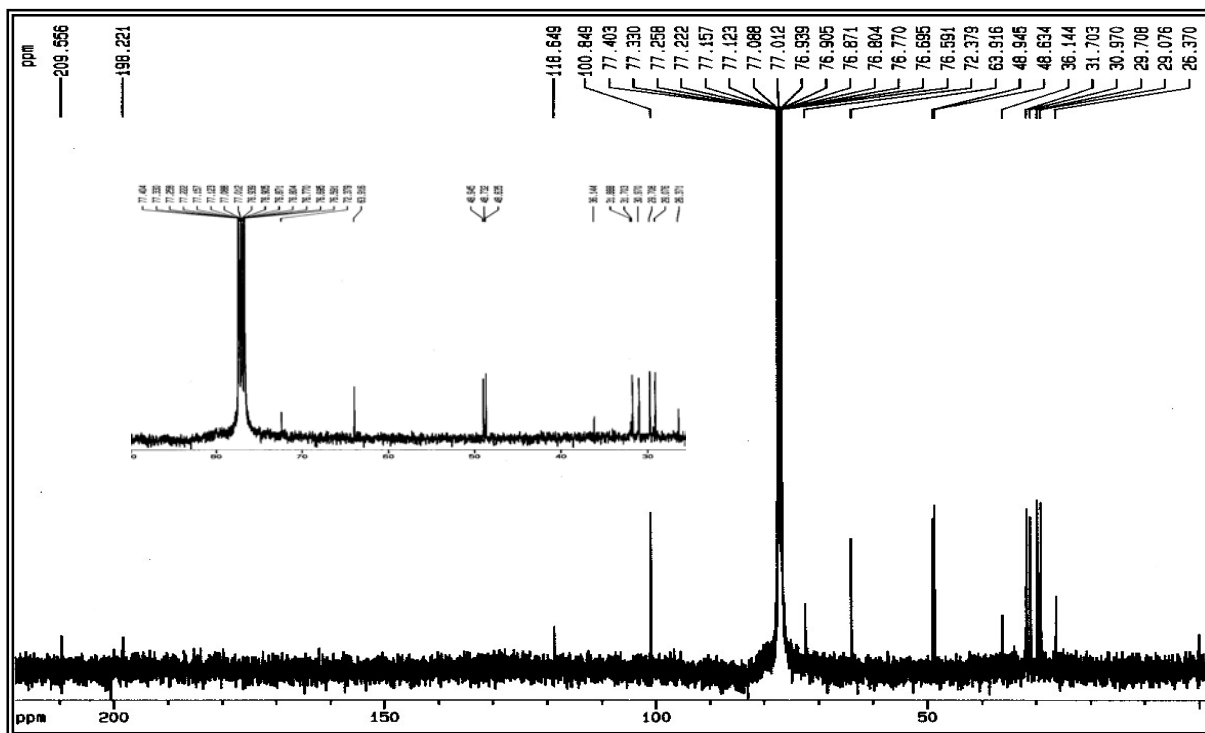


FIGURA 3.82 – Espectro de RMN ^{13}C do norsesquiterpeno **Gb-20-18** (100 MHz, CDCl_3).

3.1.15. Identificação da Substância Gb-5/6-19

A substância **Gb-5/6-19** mostrou apenas uma mancha fluorescente em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.84) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 185 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{11}NO$.

O espectro de RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) da substância **Gb-5/6-19** (Figs. 3.85 e 3.86) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,19 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 8,13 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,78 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,5$ Hz), δ 7,64 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído; os sinais em δ 7,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) e δ 8,27 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) foram associados a hidrogênios nas posições 3 e 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 3,43 (2H, q, $J = 7,3$ Hz) e em δ 1,28 (3H, t, $J = 7,3$ Hz) associados aos hidrogênios metilênicos e metílicos terminais da cadeia lateral propan-1'-ona.

A análise dos dados de RMN 1H dos alcalóides 2-quinolínicos, 2-(pentan-1'-ona)quinolina (**Gb-5/6-21**) e o 4-metoxi-2-(propan-1'-ona)quinolina (**Gb-6-2**) aqui também isolados, com os dados da substância **Gb-5/6-19** obtidos (Tab. 3.24), sugeriu-se a estrutura do 2-(propan-1'-ona)quinolina inédita na literatura, para a substância **Gb-5/6-19**.

TABELA 3.24 - Dados de RMN ^1H (δ) dos alcalóides 2-quinolínicos 2-(propan-1'-ona)quinolina isolado (**Gb-5/6-19**), o 2-(pentan-1'-ona)quinolina (**Gb-5/6-21**) isolado e o 4-metoxi-2-(propan-1'-ona)quinolina (**Gb-6-2**) isolado.

H	Isolado (Gb-5/6-19) ^(a)	Isolado (Gb-5/6-21) ^(b)	Isolado (Gb-6-2) ^(c)
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
3	7,87 d (8,5)	7,87 d (8,5)	7,51 s
4	8,27 d (8,5)	8,26 d (8,5)	
5	8,13 d (8,5)	8,13 d (8,5)	8,22 ddd (8,5; 1,5 e 0,7)
6	7,64 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	7,64 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	7,59 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)
7	7,78 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	7,78 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	7,75 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)
8	8,19 d (8,5)	8,20 d (8,5)	8,11 ddd (8,5; 1,5 e 0,7)
1'			
2'	3,43 q (7,3)	3,40 t (7,4)	3,41 q (7,3)
3'	1,28 t (7,3)	1,78 q (7,4)	1,27 t (7,3)
4'		1,48 sext	
5'		0,99 t (7,3)	
4-OCH ₃			4,11 s

(a) 200 MHz, CDCl₃; (b) 200 MHz, CDCl₃; (c) 400 MHz, CDCl₃

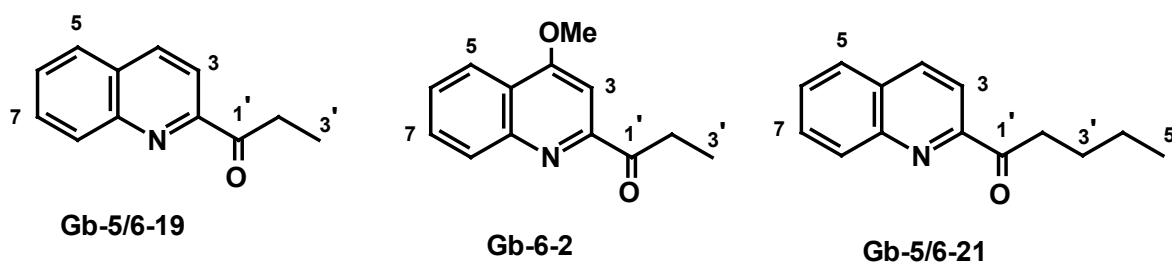


FIGURA 3.83 – Estruturas químicas dos alcalóides **Gb-5/6-19**, **Gb-6-2** e **Gb-5/6-21**.

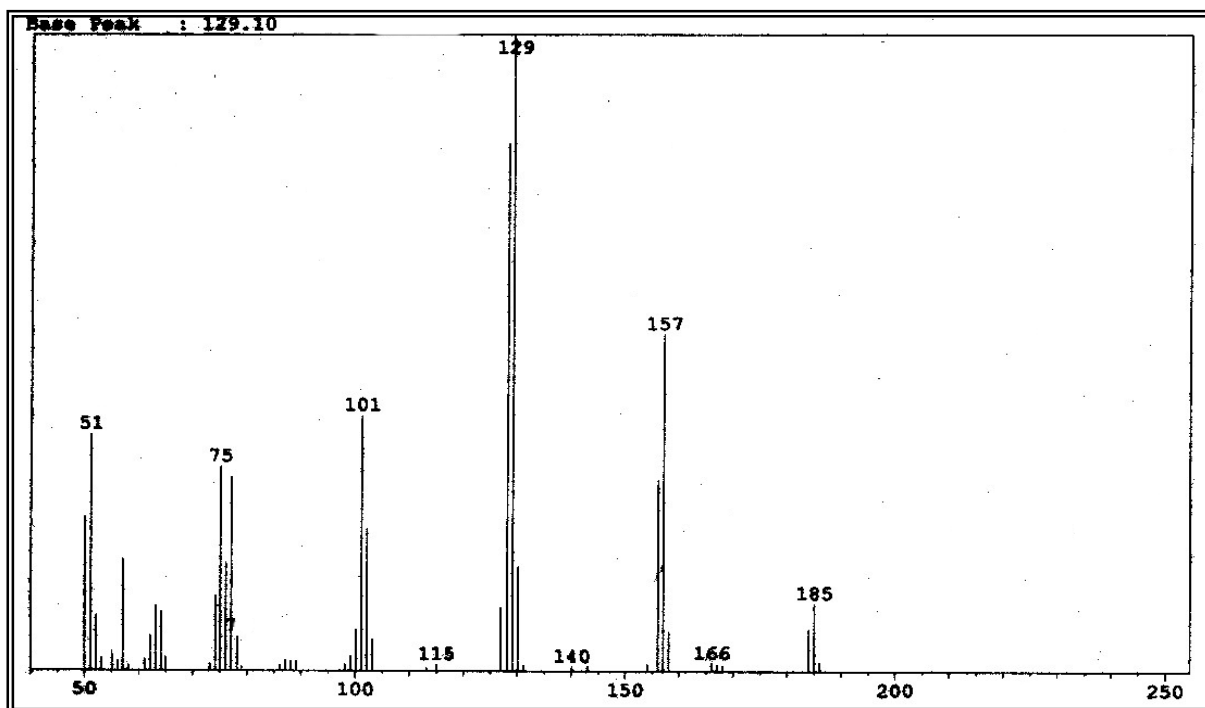


FIGURA 3.84 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-5/6-19** (IE – 70 eV).

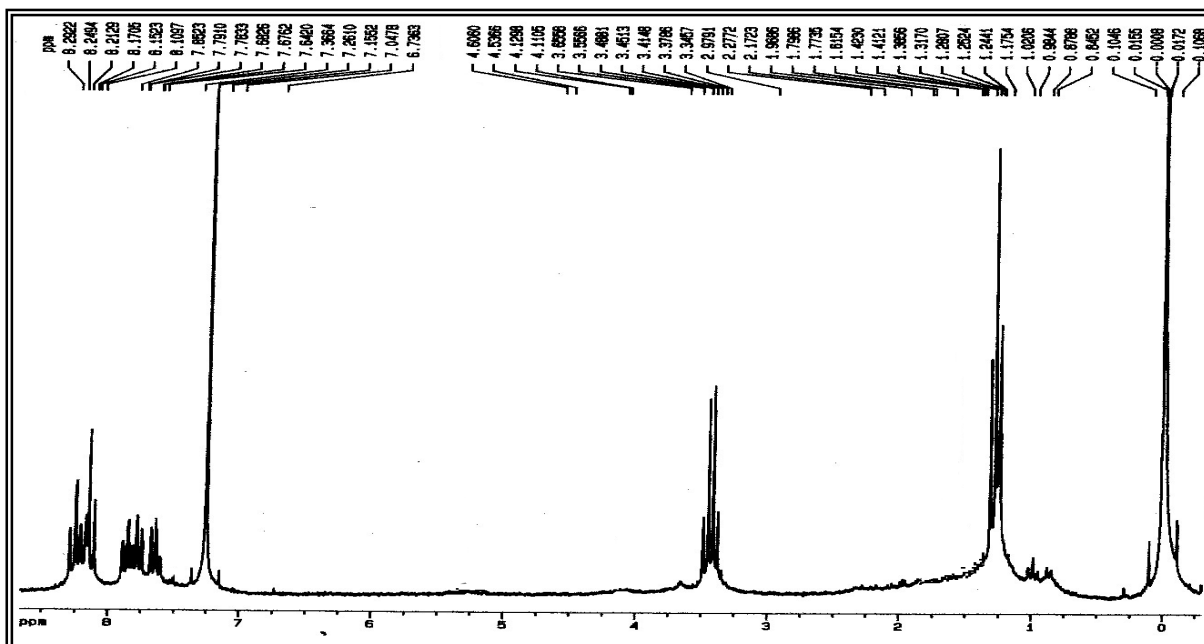


FIGURA 3.85 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-5/6-19** (200 MHz, CDCl_3).

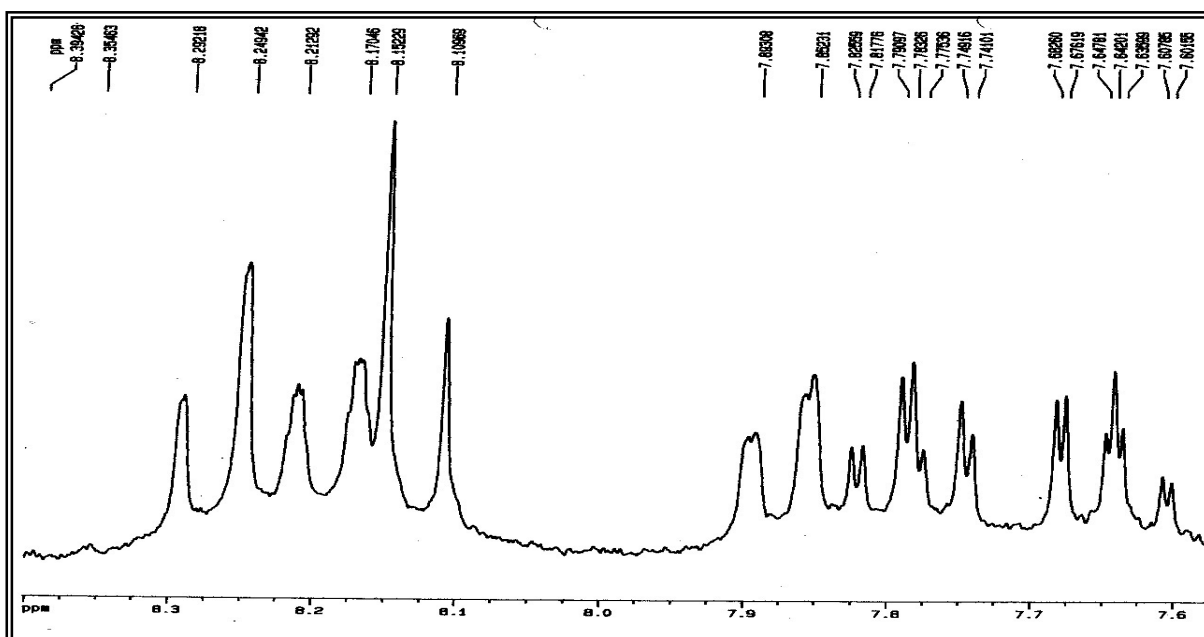


FIGURA 3.86 – Expansão do espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-5/6-19** (200 MHz, CDCl_3).

3.1.16. Identificação da Substância Gb-5/6-20

A substância **Gb-5/6-20** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.96) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 243 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{17}NO_2$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) da substância **Gb-5/6-20** (Fig. 3.88) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,23 (1H, dd, $J = 8,3$ e $1,3$ Hz), δ 8,13 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,75 (1H, ddd, $J = 8,5$; $7,0$ e $1,3$ Hz) e δ 7,59 (1H, ddd, $J = 8,3$; $7,0$ e $1,2$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissustituído; os sinais em δ 7,51 (1H, s) e em δ 4,11 (3H, s) foram associados a um hidrogênio na posição 3 e a um grupo metila ligado a heteroátomo na posição 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 3,39 (2H, t, $J = 7,4$ Hz), δ 1,77 (2H, q), δ 1,48 (2H, sext) e em δ 0,99 (3H, t, $J = 7,4$ Hz) associados a prótons da cadeia lateral pentan-1'-ona (Tab. 3.25).

O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-5/6-20** (Fig. 3.92) apresentou 15 sinais, os quais, comparados com os espectros DEPT 135° (Fig. 3.93) e HSQC (Fig. 3.94), mostrou as correlações entre os hidrogênios e carbonos a uma ligação (Tab. 3.24), revelando a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), cinco carbonos metínicos (CH), três carbonos metilênicos (CH_2) e dois carbonos metílicos (CH_3). O sinal em δ 203,3 sugeriu a presença de uma carbonila de cetona. O sinal em δ 56,0 está associado a metoxila aromática na posição 4 do anel piridínico. Os sinais em δ 37,3, δ 26,7, δ 22,7 e δ 14,2, estão relacionados aos carbonos metilênicos e metílico terminal da cadeia lateral pentan-1'-ona da substância **Gb-5/6-20**.

O mapa de contorno COSY 1H - 1H da substância **Gb-5/6-20** (Figs. 3.89, 3.90 e 3.91) mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ 8,23, δ 8,13, δ 7,75 e δ 7,59 confirmando a presença do anel aromático *orto* dissustituído; entre os hidrogênios em δ 3,39, δ 1,77, δ 1,48 e δ 0,99 confirmando a presença da cadeia lateral pentan-1'-ona.

O mapa de contorno HMBC da substância **Gb-5/6-20** (Fig. 3.95) mostrou as correlações dos hidrogênios aromáticos em δ 8,23 com os carbonos em δ 130,3 e δ 148,5 (J^3); em δ 8,13 com δ 122,7 e δ 127,6 (J^3); em δ 7,75 com δ 122,1 e δ 148,5

(J³); em δ 7,59 com δ 122,7 e δ 130,3 (J³), confirmando a estrutura de um anel aromático *orto* dissubstituído; dos hidrogênios em δ 7,51 com os carbonos em δ 122,7 (J³) e δ 163,3 (J²); em δ 4,11 com o carbono em δ 154,8 (J³) confirmando a estrutura do anel piridínico; dos hidrogênios em δ 3,39 com o carbono em δ 203,3 (J²); em δ 1,77 com o carbono em δ 14,2 (J³); em δ 0,99 com os carbonos em δ 22,8 (J²) e δ 26,7 (J³) confirmando a estrutura da cadeia lateral pentan-1'-ona. Estas correlações permitiram deduzir o esqueleto 2-quinolínico para a substância **Gb-5/6-20**.

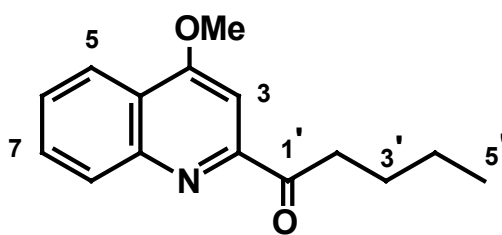
Sugeriu-se para a substância **Gb-5/6-20**, alcalóide 2-quinolínico, a estrutura do 4-metoxi-2-(pentan-1'-ona)quinolina (Fig. 3.87), inédita na literatura.

TABELA 3.25 – Dados espectrais de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) e DEPT 135° (CDCl₃, 50 MHz) da substância **Gb-5/6-20**.

Hidrogênio/carbono	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2		163,3 (C)
3	7,51 s	97,1 (CH)
4		154,8 (C)
5	8,23 dd (8,3 e 1,3)	122,1 (CH)
6	7,59 ddd (8,3; 7,0 e 1,2)	127,6 (CH)
7	7,75 ddd (8,5; 7,0 e 1,3)	130,3 (CH)
8	8,13 d (8,5)	130,3 (CH)
9		122,7 (C)
10		148,5 (C)
1'		203,3 (C)
2'	3,39 t (7,4)	37,3 (CH ₂)
3'	1,77 q	26,7 (CH ₂)
4'	1,48 sext	22,8 (CH ₂)
5'	0,99 t (7,4)	14,2 (CH ₃)
4-OCH ₃	4,11 s	56,2 (CH ₃)

TABELA 3.26 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância **Gb-5/6-20**.

Carbono	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
2	163,3			
3	97,1	7,51	163,3	122,7
4	154,8			
5	122,1	8,23		130,3; 148,5
6	127,6	7,59		122,7; 130,3
7	130,3	7,75		122,1; 148,5
8	130,3	8,13		122,7; 127,6
9	122,7			
10	148,5			
1'	203,3			
2'	37,3	3,39	203,3	
3'	26,7	1,77		14,2
4'	22,8	1,48		
5'	14,2	0,99	22,8	26,7
4-OCH ₃	56,2	4,11		



Gb-5/6-20

FIGURA 3.87 – Estrutura química do alcalóide **Gb-5/6-20**.

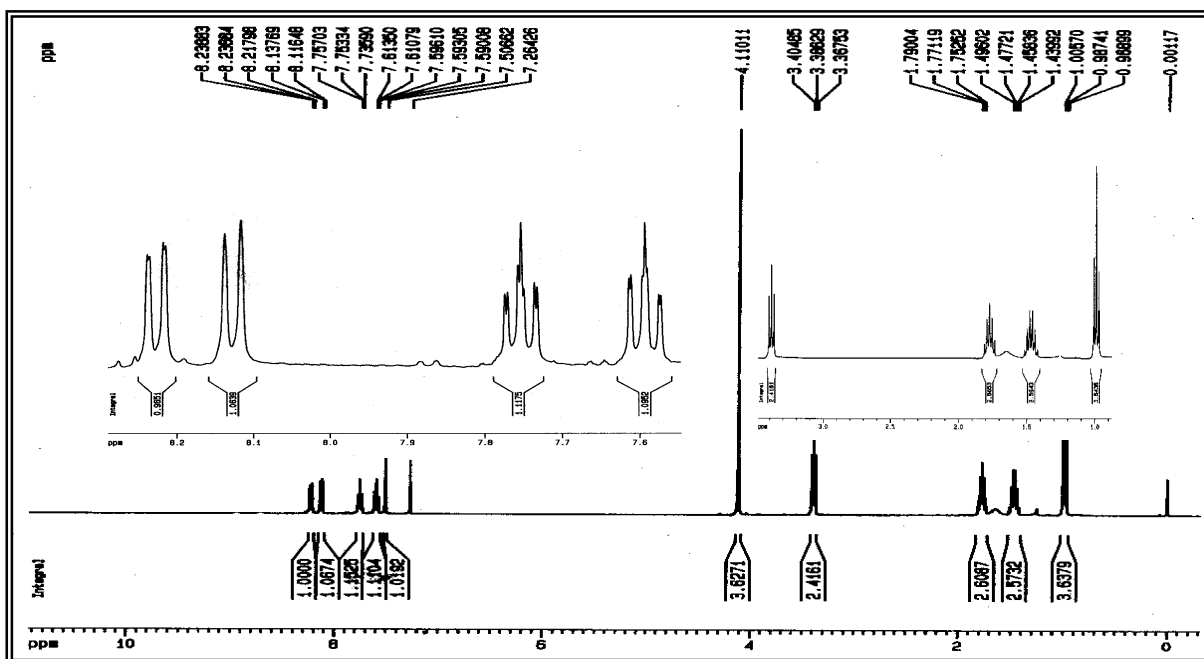


FIGURA 3.88 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-5/6-20** (400 MHz, CDCl_3).

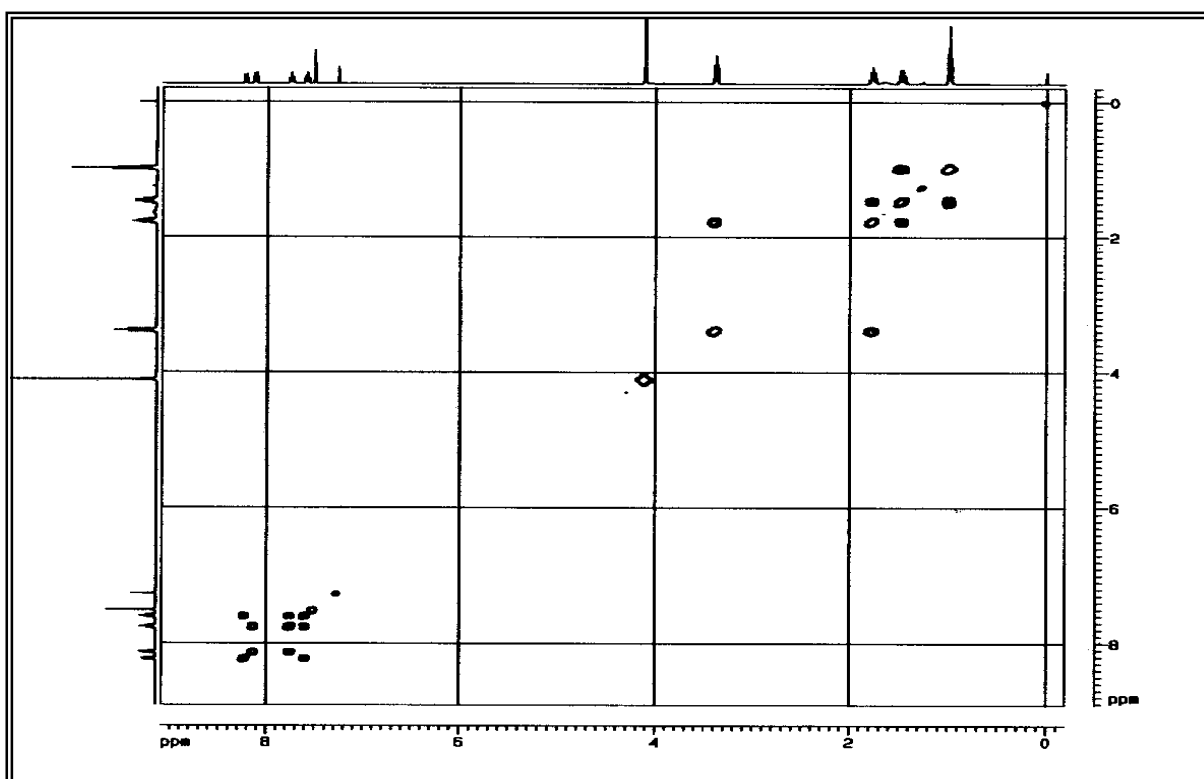


FIGURA 3.89 – Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide **Gb-5/6-20** (400 MHz, CDCl_3).

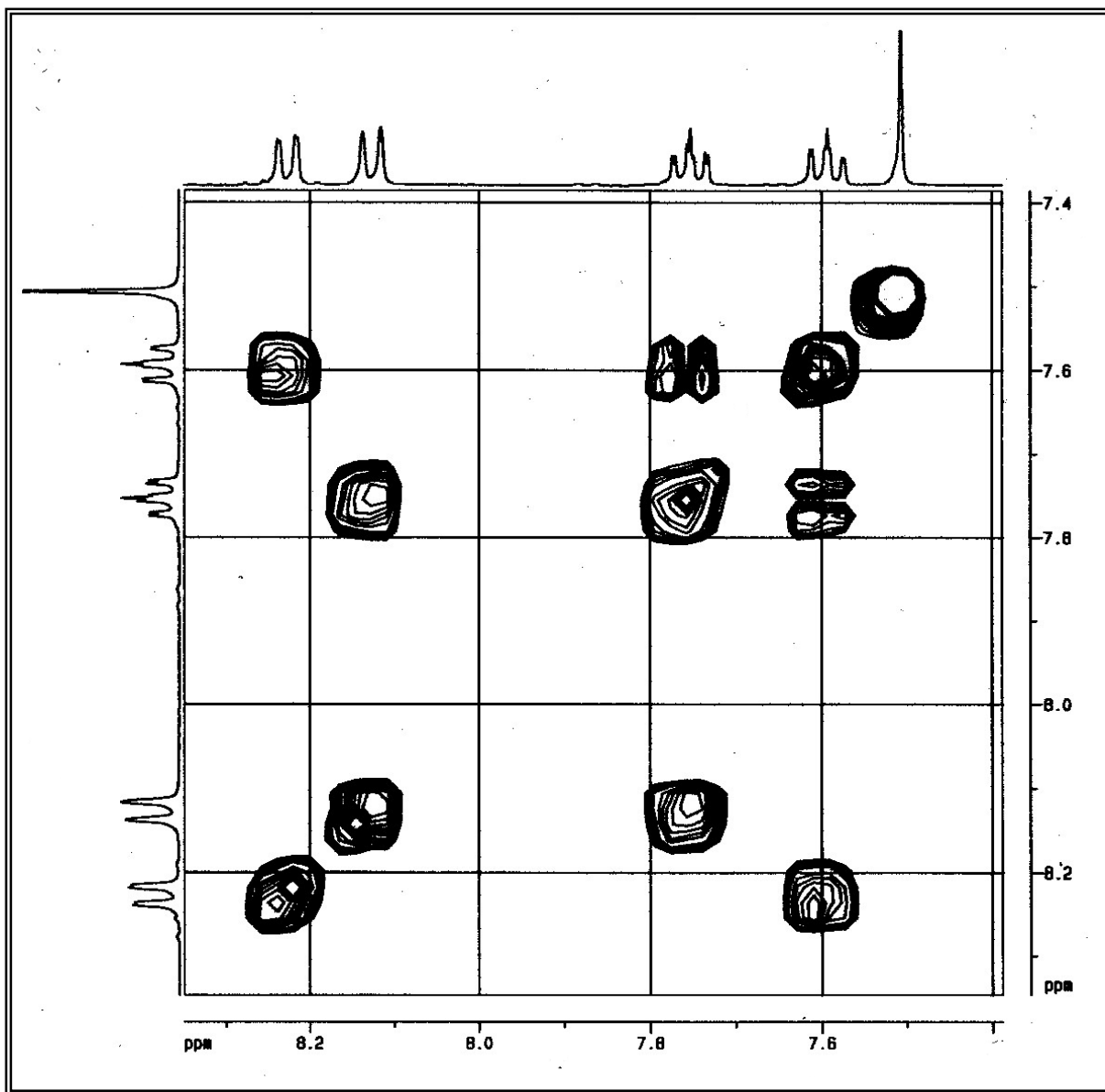


FIGURA 3.90 – Expansão do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide **Gb-5/6-20** (400 MHz, CDCl_3) – região aromática.

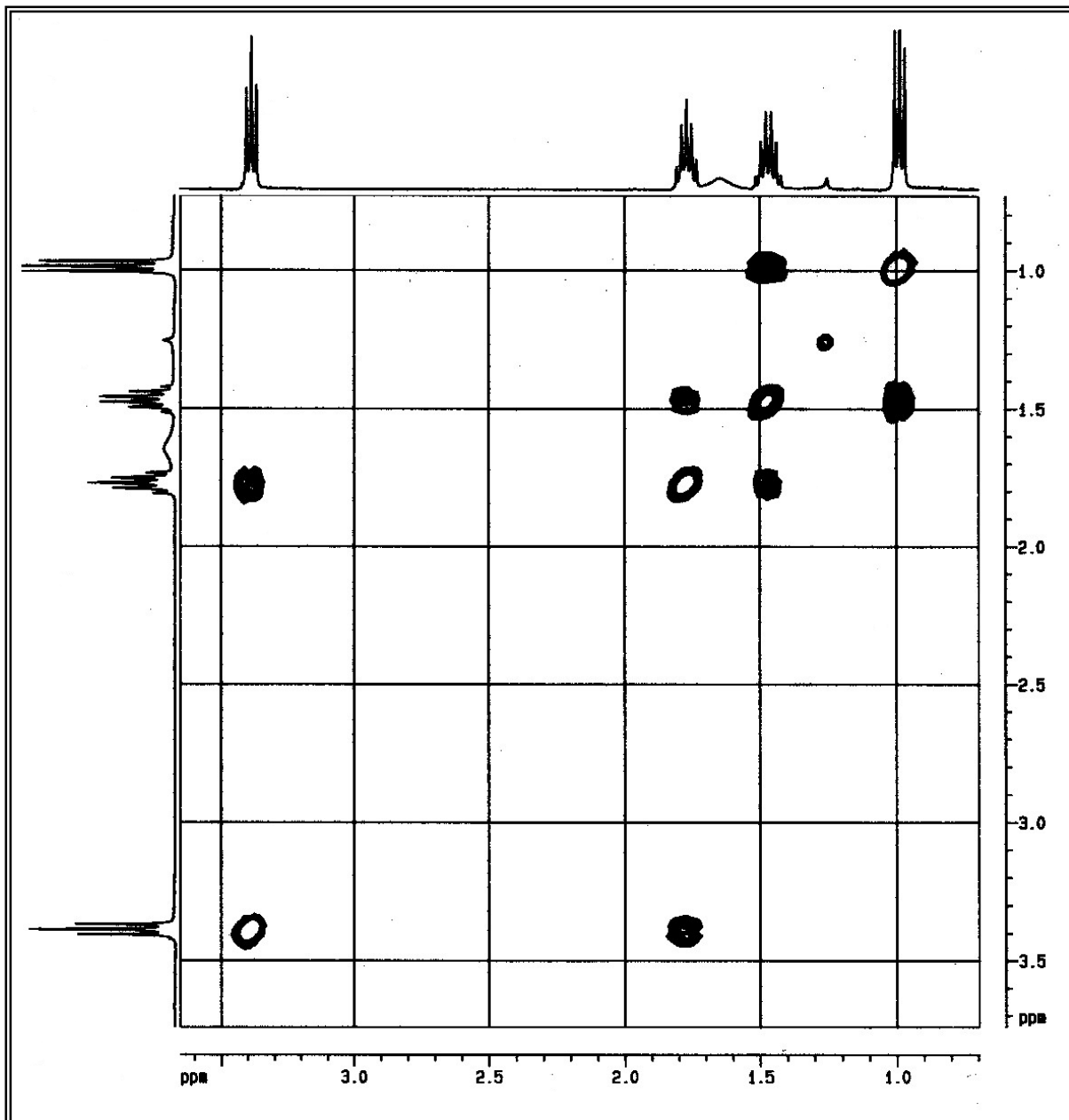


FIGURA 3.91 – Expansão do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do alcalóide **Gb-5/6-20** (400 MHz, CDCl_3) – cadeia lateral.

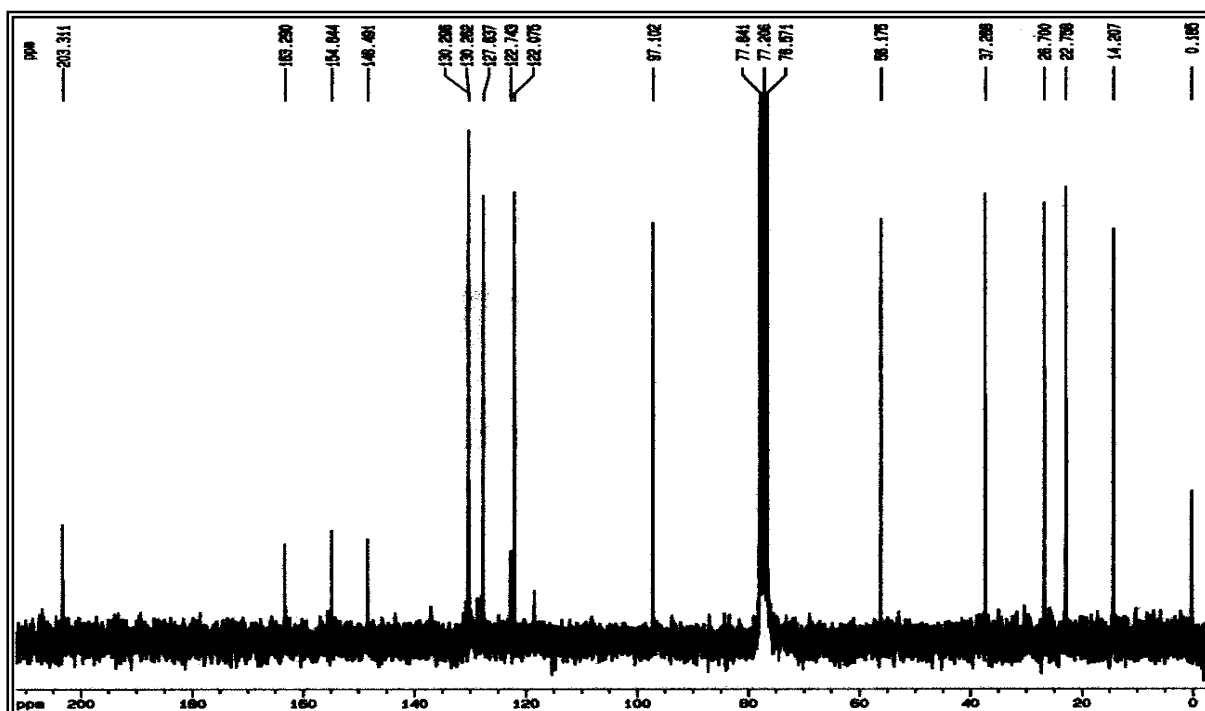


FIGURA 3.92 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-5/6-20** (50 MHz, CDCl_3).

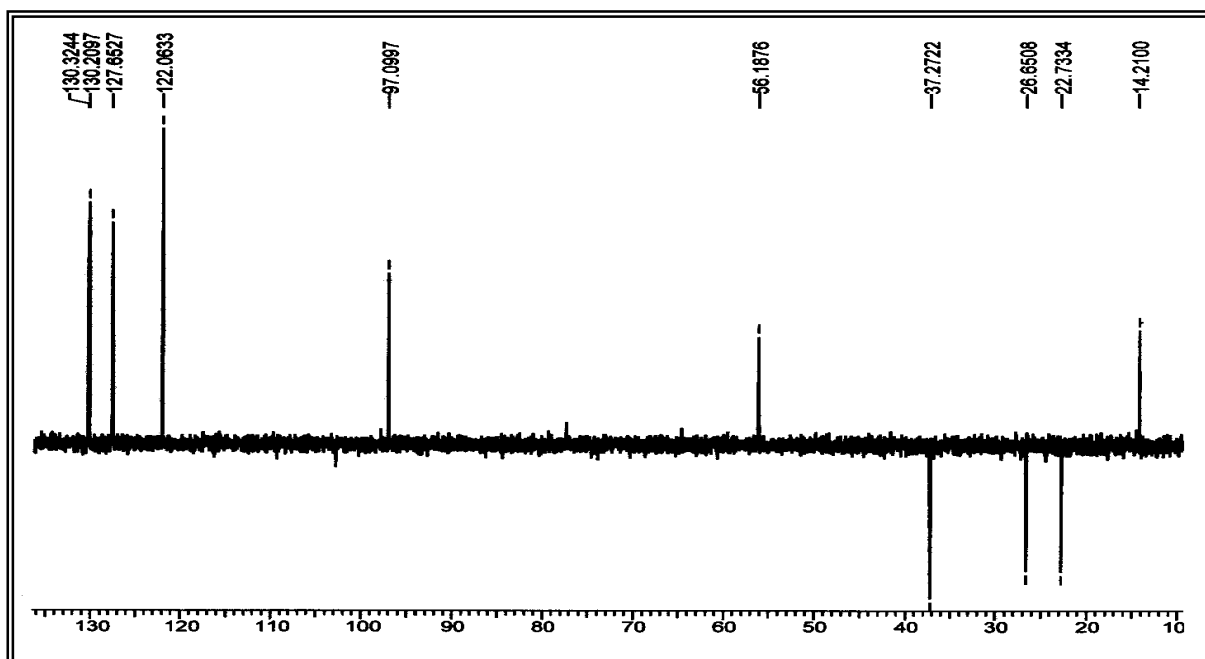


FIGURA 3.93 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-5/6-20** (50 MHz, CDCl_3).

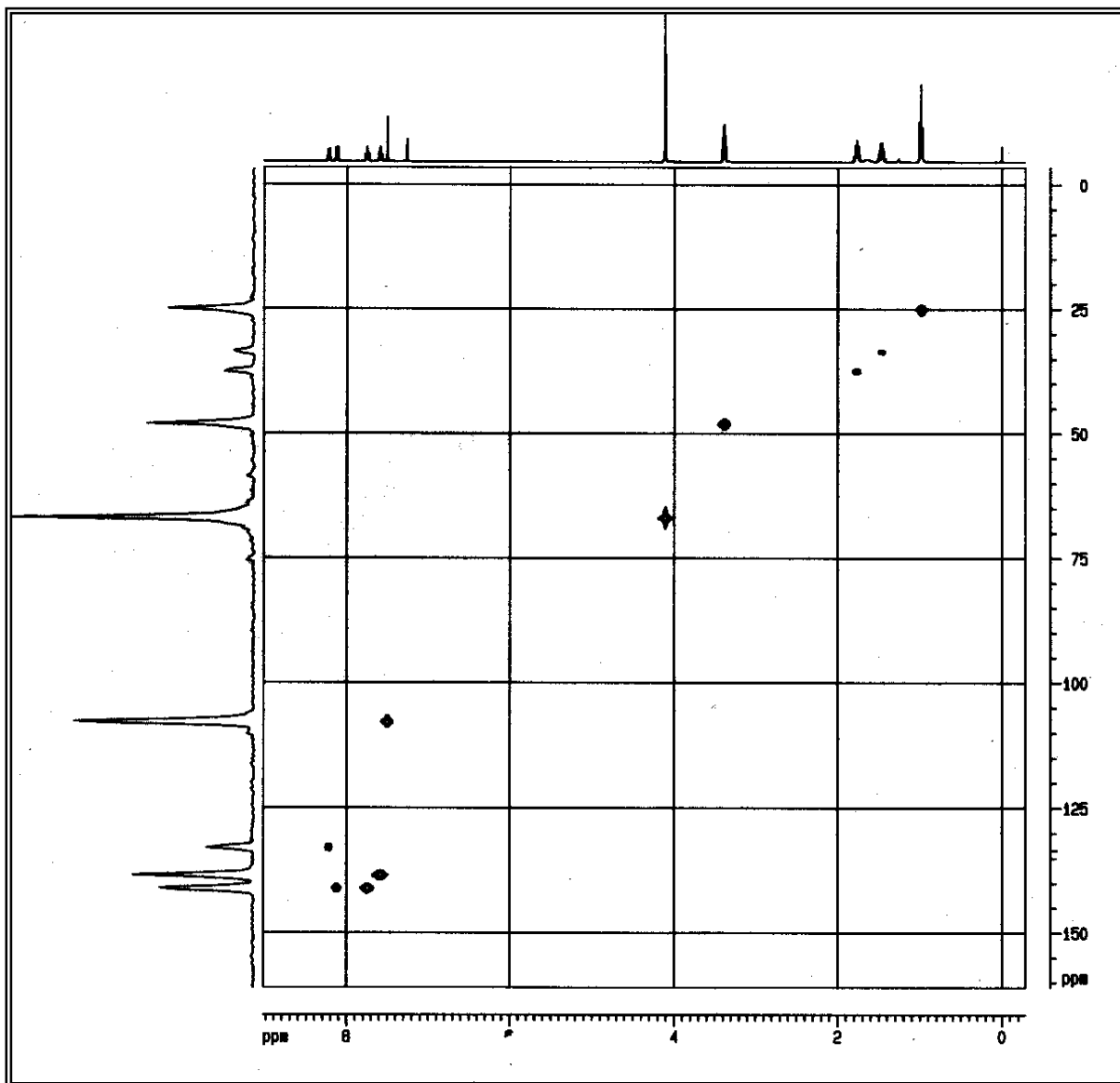


FIGURA 3.94 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide **Gb-5/6-20** (400 MHz, CDCl₃).

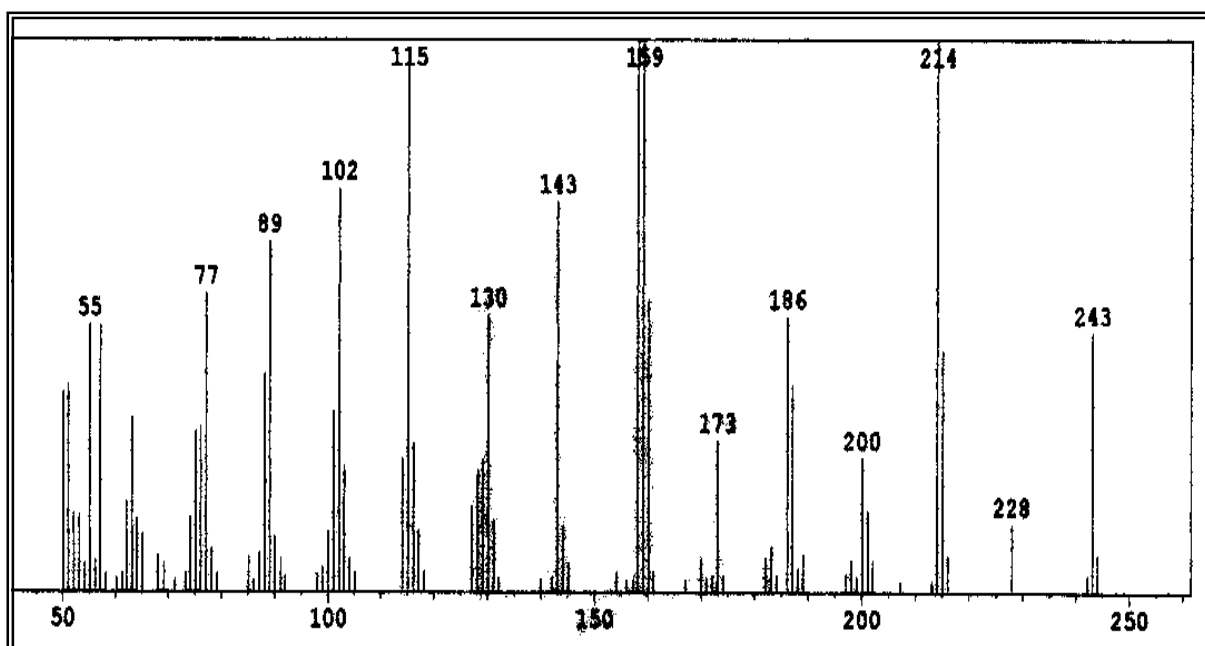


FIGURA 3.96 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-5/6-20** (IE – 70eV).

3.1.17. Identificação da Substância Gb-5/6-21

A substância **Gb-5/6-21** mostrou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.96) mostrou pico do íon molecular com razão m/z igual a 213 daltons, confirmando a presença de nitrogênio e estando compatível com a fórmula molecular $C_{14}H_{15}NO$.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) da substância **Gb-5/6-21** (Fig. 3.97) apresentou sinais característicos de alcalóides quinolínicos 2-substituídos. Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,20 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 8,13 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), δ 7,78 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,5$ Hz) e δ 7,64 (1H, ddd, $J = 8,5; 6,9$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissustituído; os sinais em δ 7,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) e δ 8,26 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), foram associados aos hidrogênios nas posições 3 e 4 do anel piridínico, respectivamente; os sinais em δ 3,40 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), δ 1,78 (2H, q), δ 1,48 (2H, sext) e em δ 0,99 (3H, t, $J = 7,3$ Hz) associados a hidrogênios metilênicos e metílicos terminais da cadeia lateral pentan-1'-ona.

O espectro de RMN ^{13}C da substância **Gb-5/6-21** (Fig. 3.100) apresentou 14 sinais, os quais, comparados com os espectros DEPT 135° (Fig. 3.101) e HSQC (Fig. 3.102), mostrou as correlações entre os hidrogênios e carbonos a uma ligação, revelando a presença de quatro carbonos não hidrogenados (C), seis carbonos metínicos (CH), três carbonos metilênicos (CH_2) e um carbono metílico (CH_3). O sinal em δ 203,0 sugeriu a presença de uma carbonila de cetona. Os sinais em δ 37,4, δ 26,6, δ 22,8 e δ 14,2, estão relacionados aos carbonos metilênicos e metílico terminal da cadeia lateral pentan-1'-ona da substância **Gb-5/6-21** (Tab. 3.27).

O mapa de contorno COSY 1H - 1H da substância **Gb-5/6-21** (Figs. 3.98 e 3.99) mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ 8,20, δ 8,13, δ 7,78 e δ 7,64 confirmando a presença do anel aromático *orto* dissustituído, entre os hidrogênios em δ 3,40, δ 1,78, δ 1,48 e δ 0,99 confirmando a presença da cadeia lateral pentan-1'-ona.

O mapa de contorno HMBC da substância **Gb-5/6-21** (Fig. 3.103) mostrou as correlações dos hidrogênios aromáticos em δ 8,20 com o carbono em δ 129,8 (J^3); em δ 7,64 com o carbono em δ 128,6 (J^3), confirmando a estrutura de um anel aromático *orto* dissustituído; do hidrogênio em δ 7,87 com o carbono em δ 129,8 (J^3) e do hidrogênio em δ 8,26 com os carbonos em δ 128,6 e δ 147,4 (J^3),

confirmando a estrutura do anel piridínico; dos hidrogênios em δ 3,40 com os carbonos em δ 26,6 (J^2) e δ 22,8 (J^3) e em δ 0,99 com os carbonos em δ 22,8 (J^2) e δ 26,6 (J^3), confirmando a estrutura da cadeia lateral pentan-1'-ona. Estas correlações (Tab. 3.28) permitiram deduzir o esqueleto 2-quinolínico para a substância **Gb-5/6-21**.

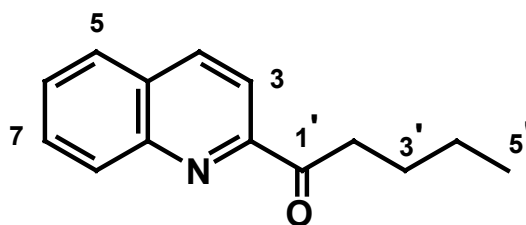
A substância **Gb-5/6-21**, alcalóide 2-quinolínico, sugeriu tratar-se do 2-(pentan-1'-ona)quinolina (Fig. 3.95), inédita na literatura.

TABELA 3.27 – Dados espectrais de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) e DEPT 135° (CDCl_3 , 50 MHz) da substância **Gb-5/6-21**.

Hidrogênio/carbono	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2		153,5 (C)
3	7,87 d (8,5)	11,4 (CH)
4	8,26 d (8,5)	137,0 (CH)
5	8,13 d (8,5)	128,6 (CH)
6	7,64 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	127,8 (CH)
7	7,72 ddd (8,5; 6,9 e 1,5)	130,1 (CH)
8	8,20 d (8,5)	130,8 (CH)
9		129,8 (C)
10	-	147,4 (C)
1'		203,0 (C)
2'	3,40 t (7,3)	37,4 (CH_2)
3'	1,78 q	26,6 (CH_2)
4'	1,48 sext	22,8 (CH_2)
5'	0,99 t (7,3)	14,2 (CH_3)

TABELA 3.28 – Correlações de ^1H e ^{13}C para a substância **Gb-5/6-21**.

Carbono	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
2	153,5			
3	118,4	7,87		129,8
4	137,0	8,26		128,6 e 147,4
5	128,6	8,13		
6	127,8	7,64	128,6	
7	130,1	7,78		
8	130,8	8,20		
9	129,8			
10	147,4			
1'	203,0			
2'	37,4	3,40	26,6	22,8
3'	26,6	1,78		
4'	22,8	1,48		
5'	14,2	0,99	22,8	26,6



Gb-5/6-21

FIGURA 3.97 – Estrutura química do alcalóide **Gb-5/6-21**.

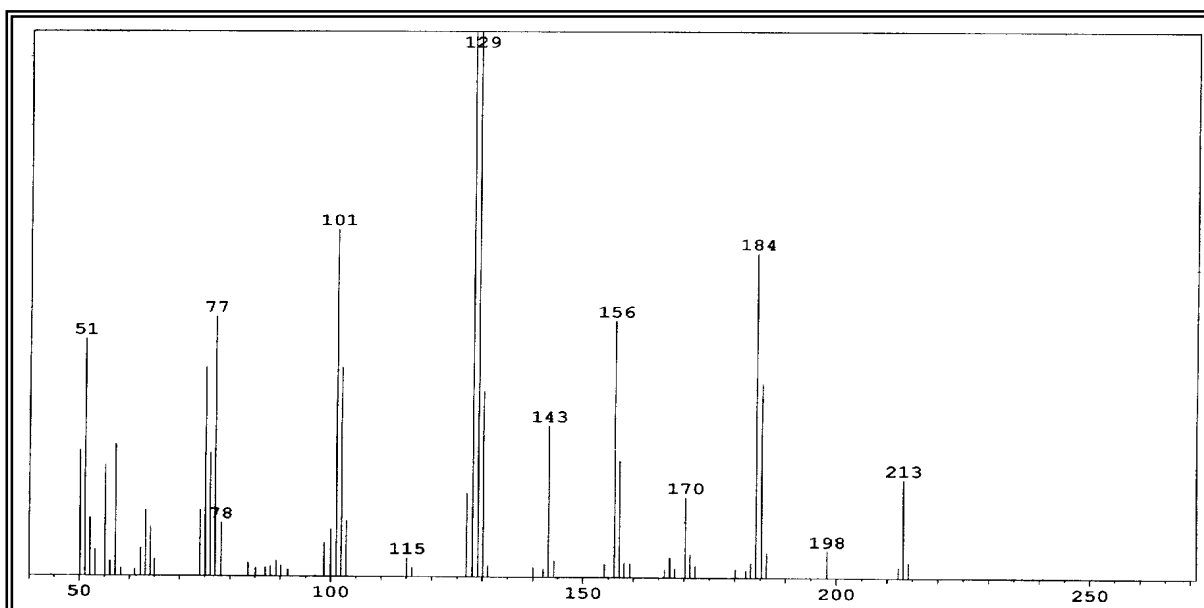


FIGURA 3.98 – Espectro de massas do alcalóide **Gb-5/6-21** (IE – 70 eV).

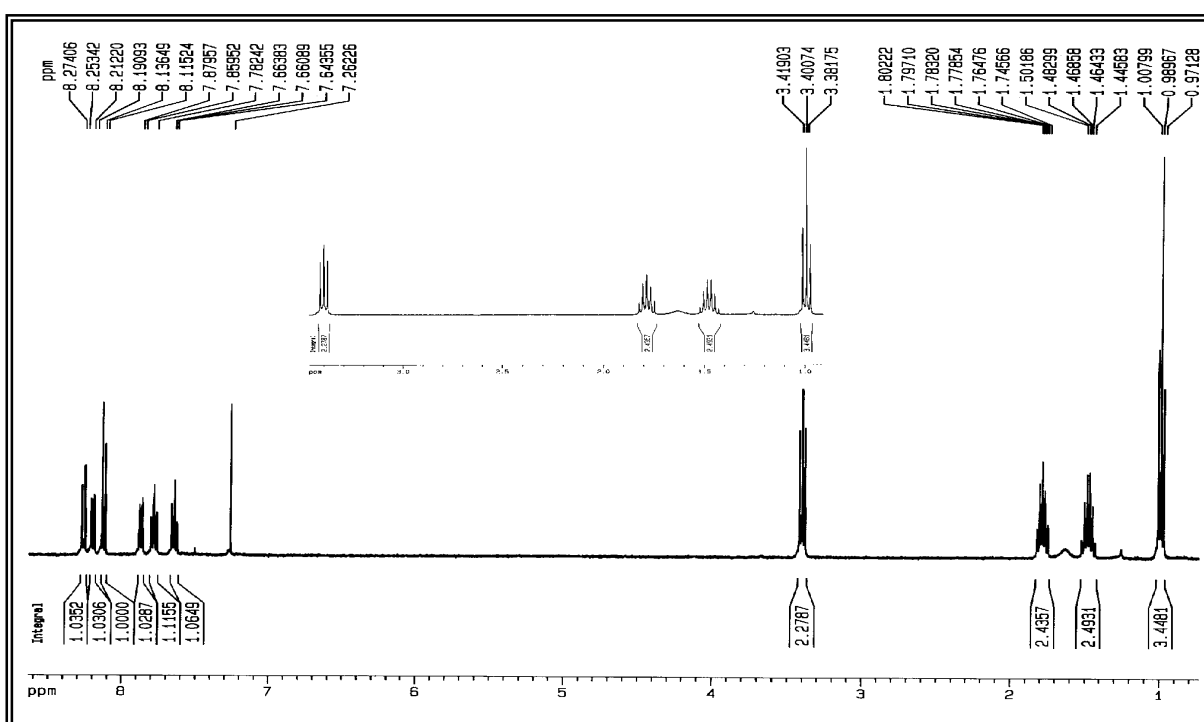


FIGURA 3.99 – Espectro de RMN ^1H do alcalóide **Gb-5/6-21** (400 MHz, CDCl_3).

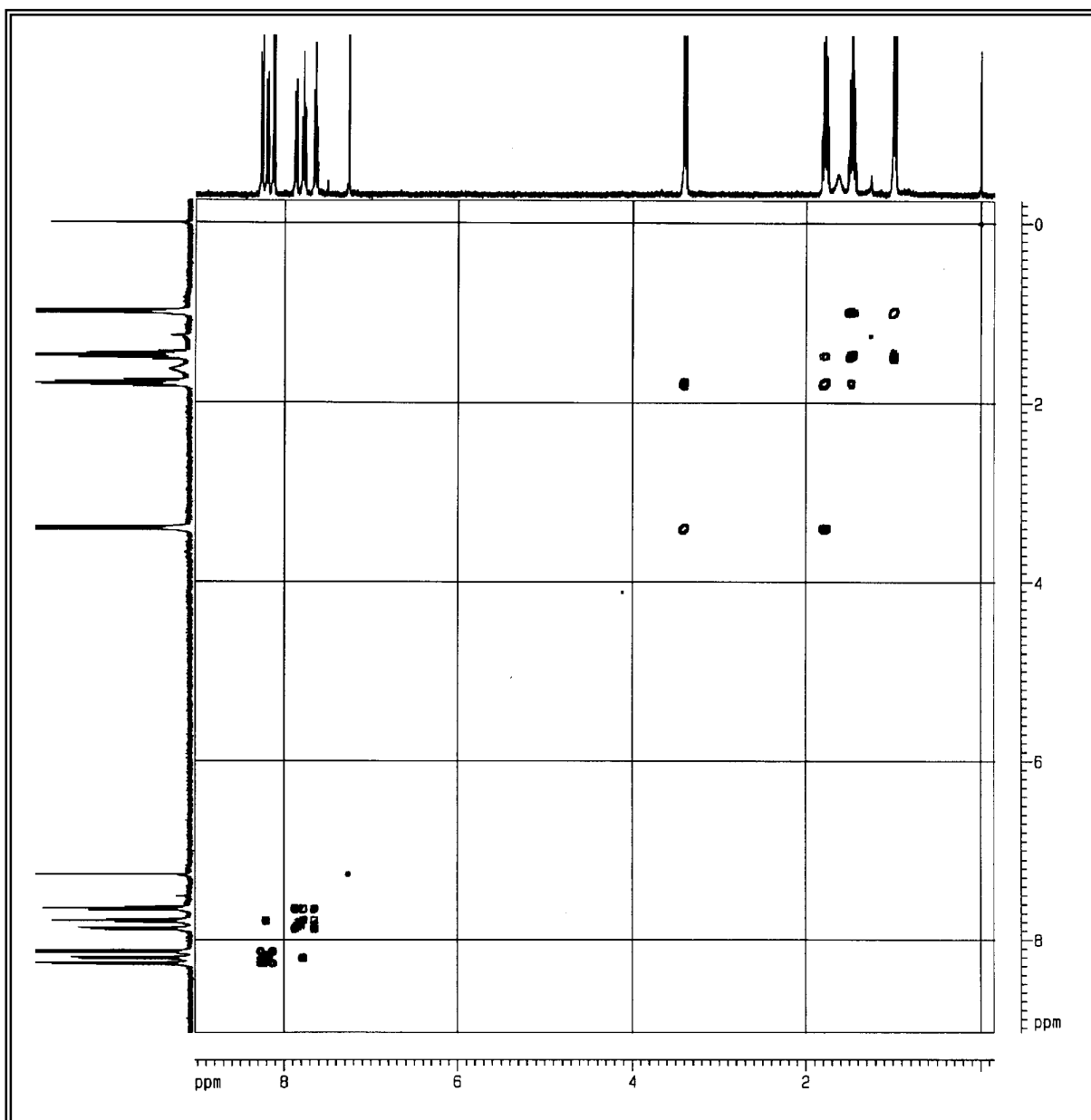


FIGURA 3.100 – Mapa de contorno COSY ¹H-¹H do alcalóide **Gb-5/6-21** (400 MHz, CDCl₃).

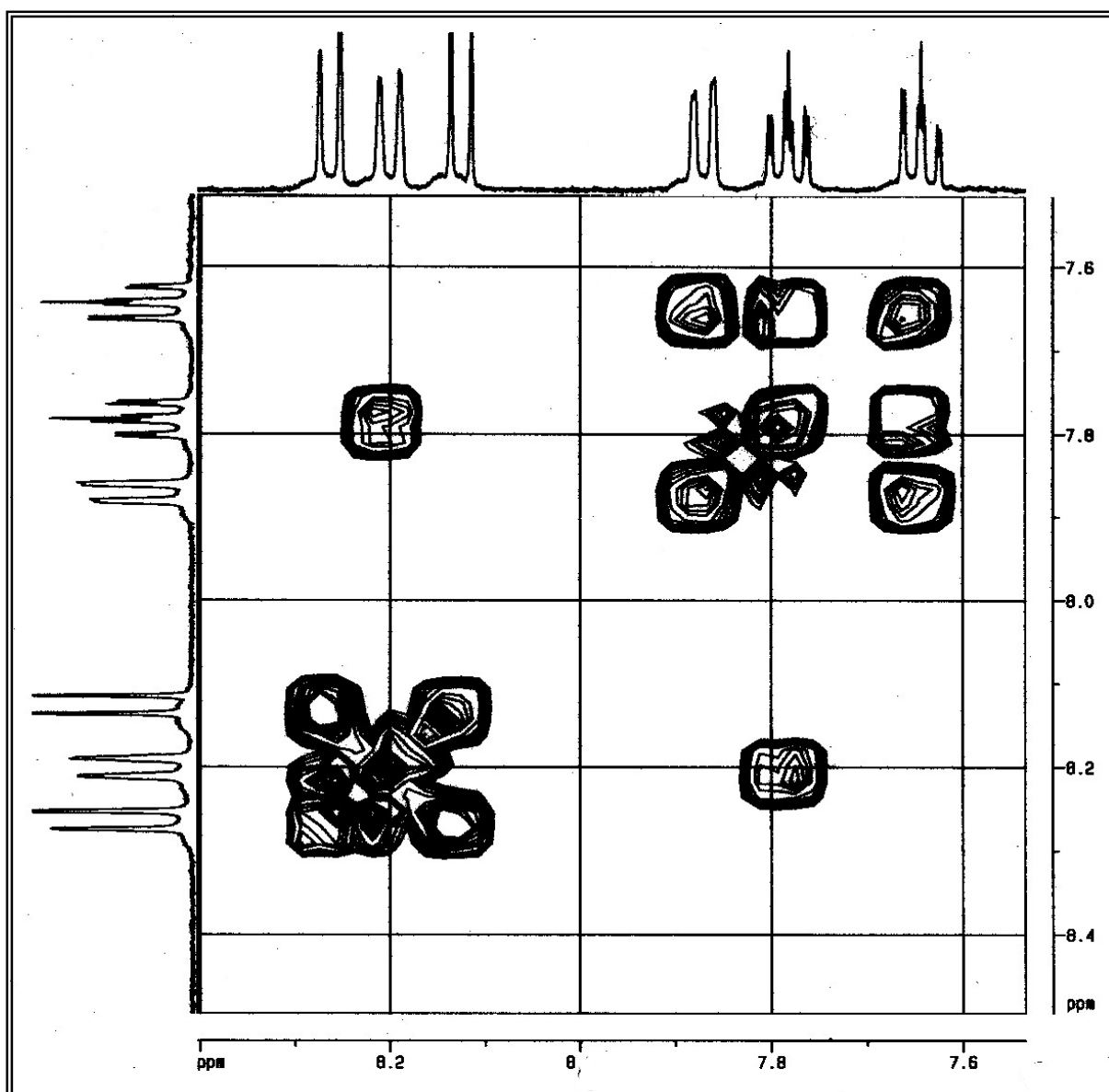


FIGURA 3.101 – Expansão do mapa de contorno COSY ¹H-¹H do alcalóide **Gb-5/6-21** (400 MHz, CDCl₃) – região de aromático.

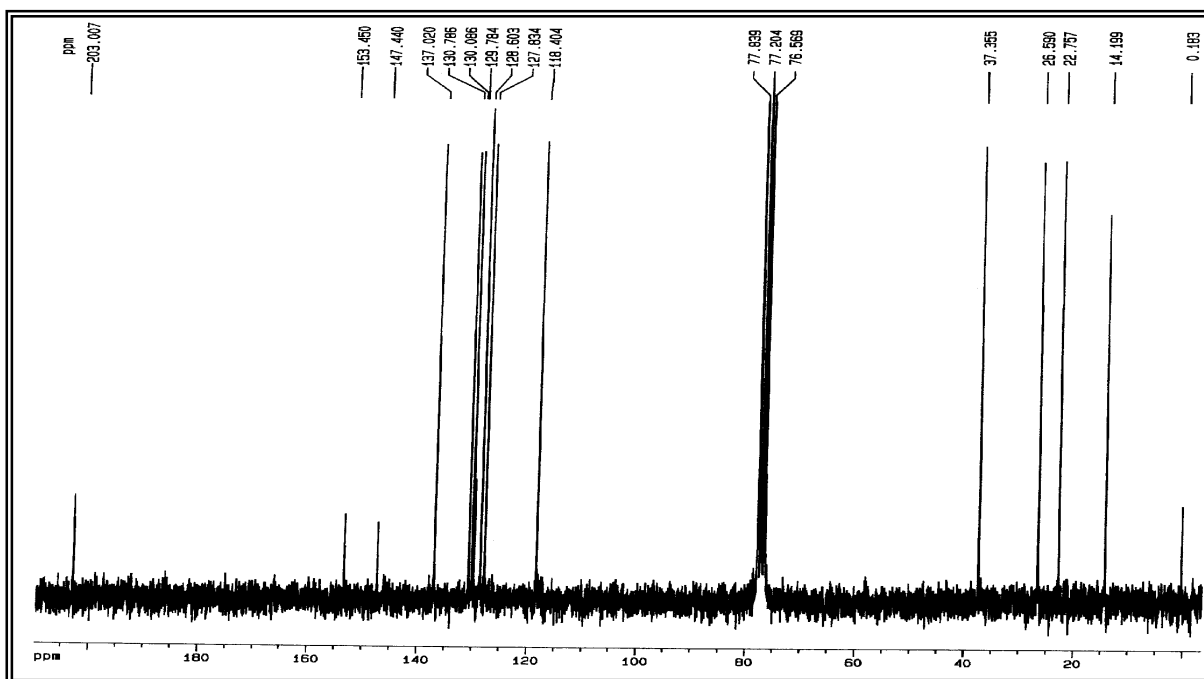


FIGURA 3.102 – Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **Gb-5/6-21** (50 MHz, CDCl_3).

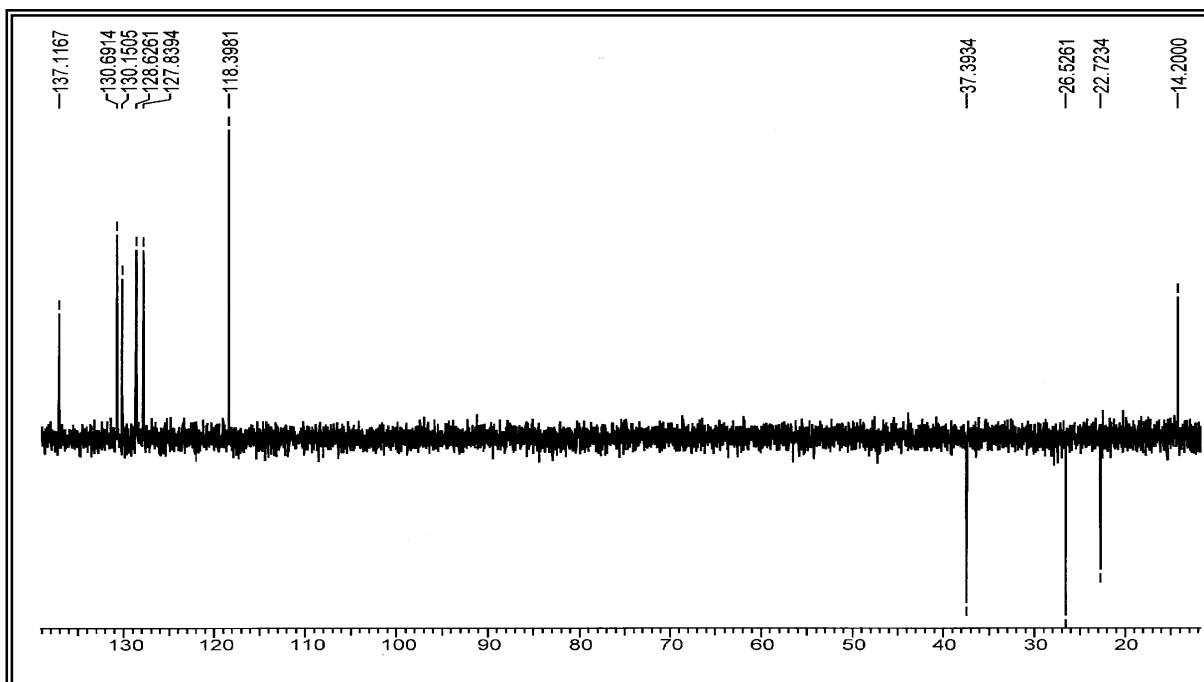


FIGURA 3.103 – Espectro DEPT 135° do alcalóide **Gb-5/6-21** (50 MHz, CDCl_3).

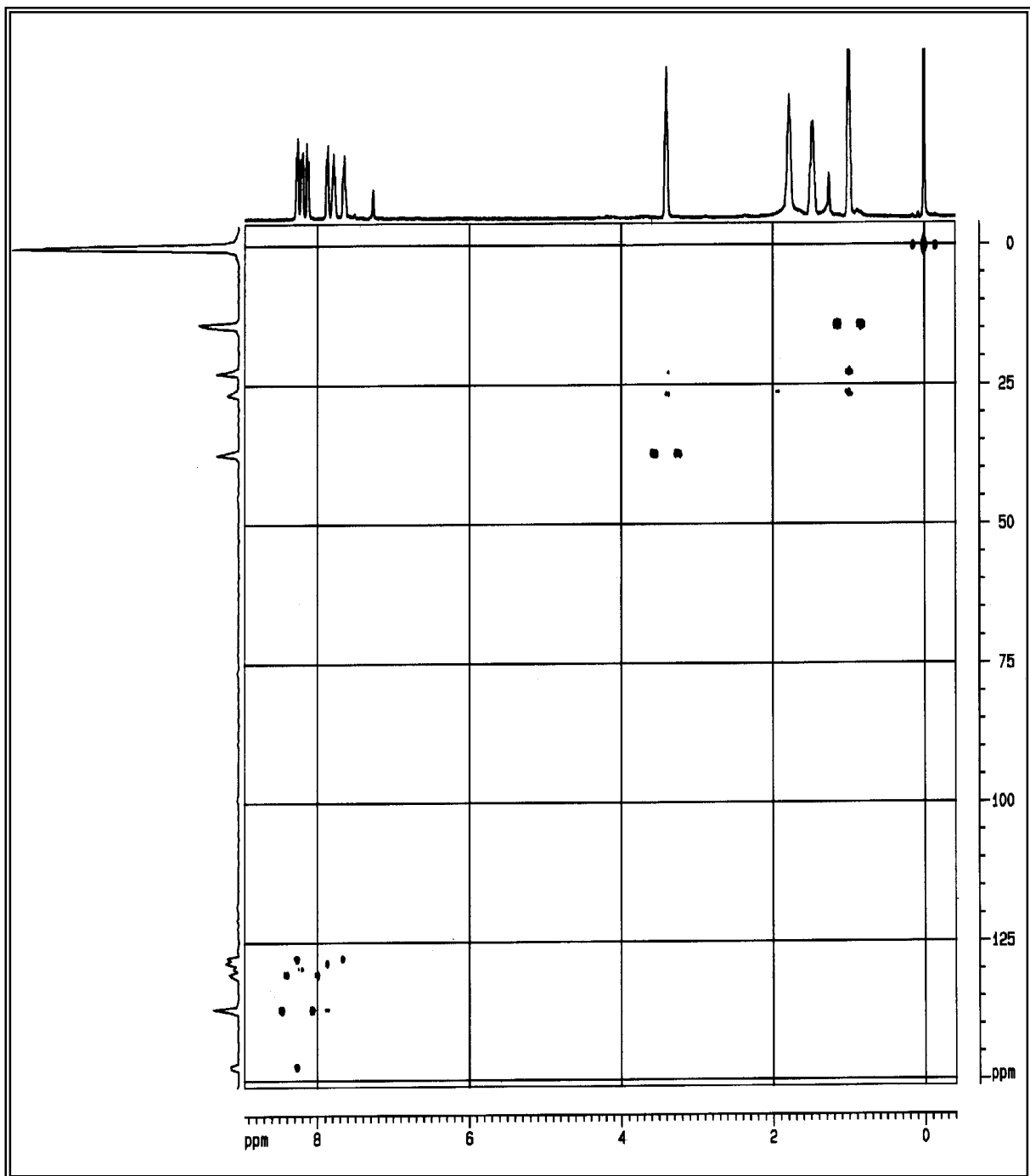


FIGURA 3.104 – Mapa de contorno HSQC do alcalóide **Gb-5/6-21** (400 MHz, CDCl_3).

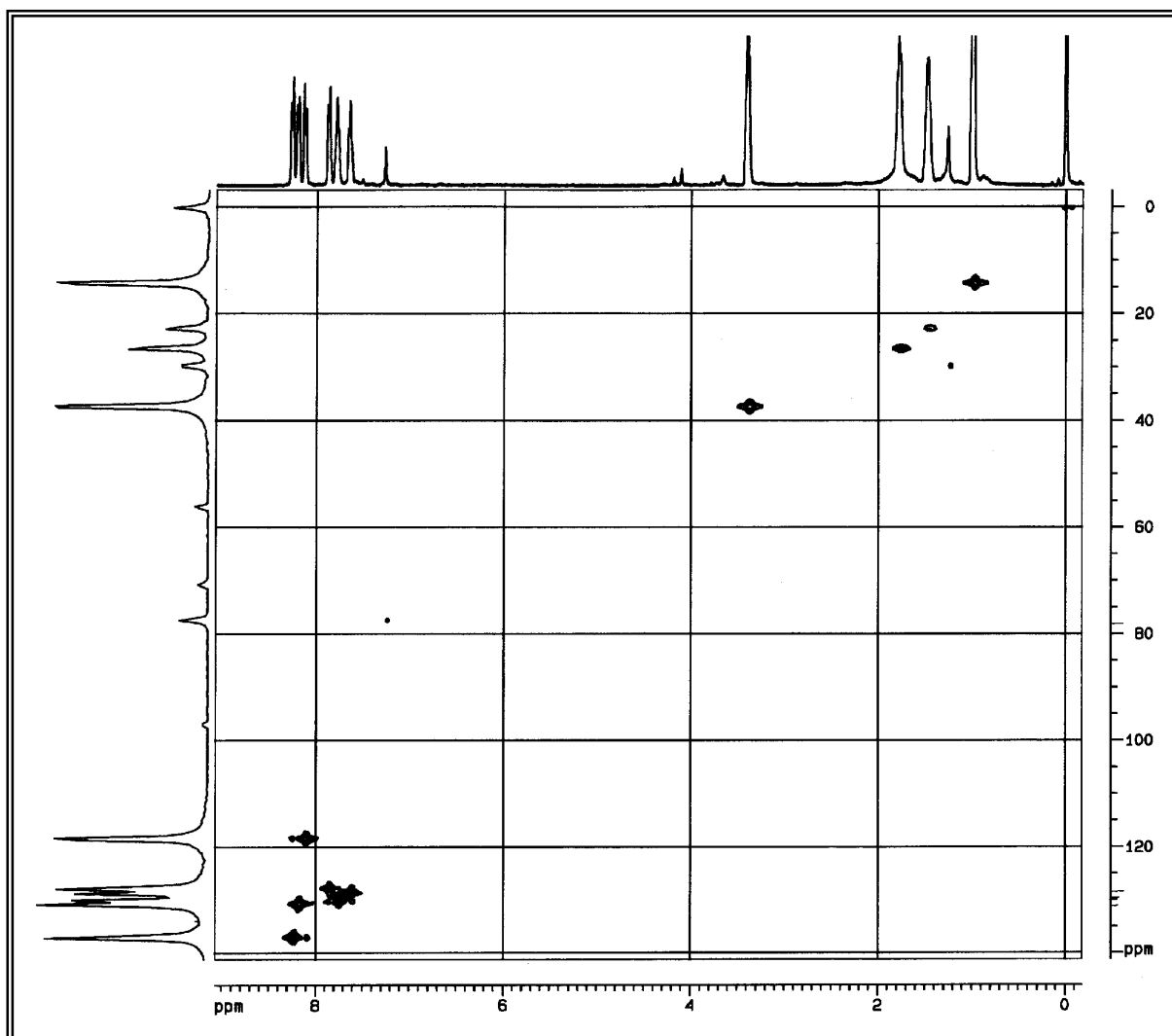
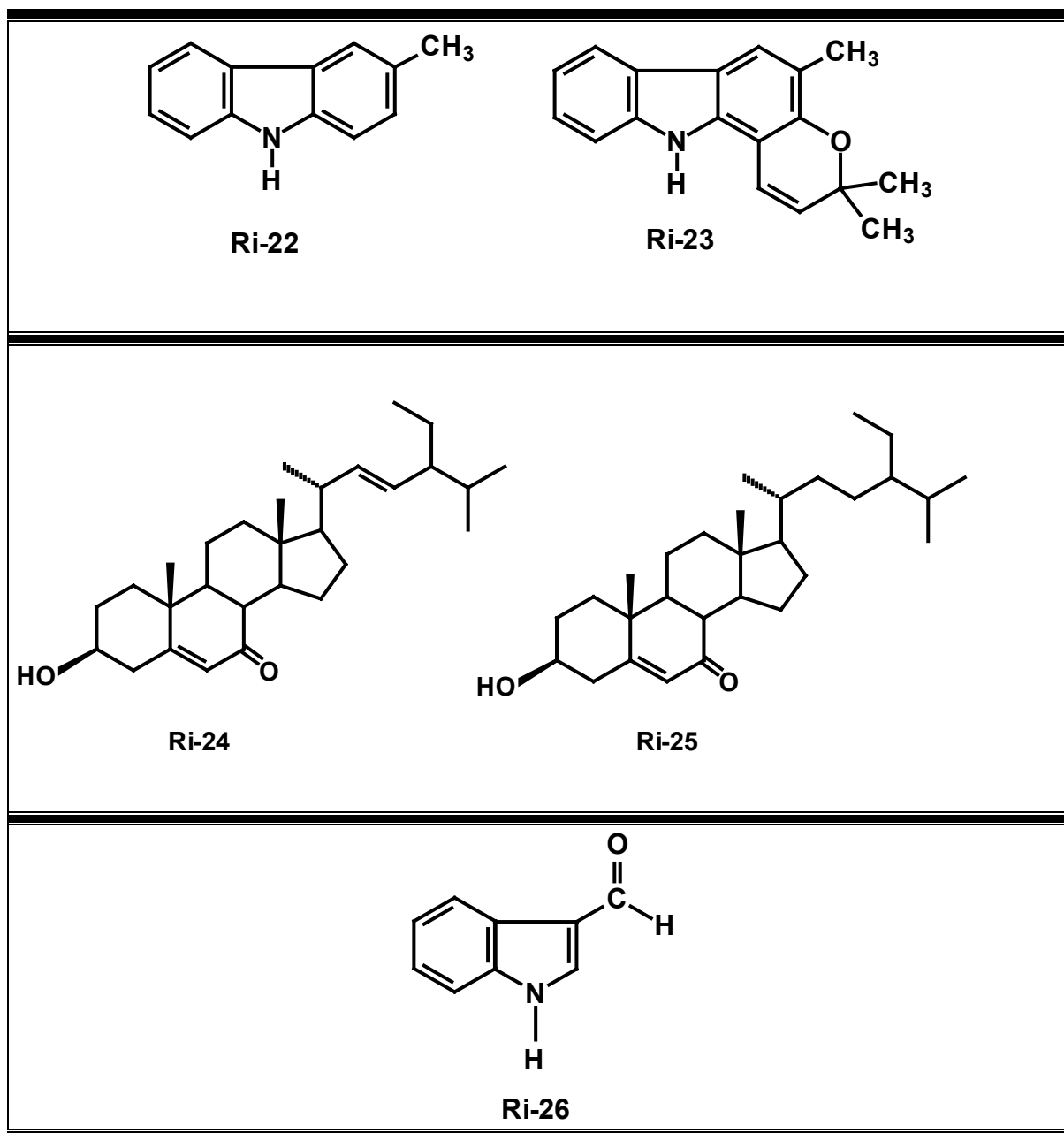
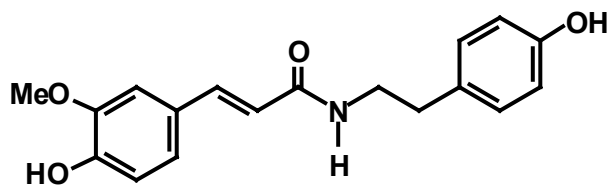


FIGURA 3.105 – Mapa de contorno HMBC do alcalóide **Gb-5/6-21** (400 MHz, CDCl₃).

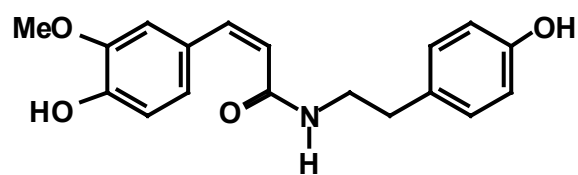
3.2. Constituintes Químicos Isolados de *Ravenia infelix*

TABELA 3.29 – Metabólitos secundários isolados de *Ravenia infelix*.

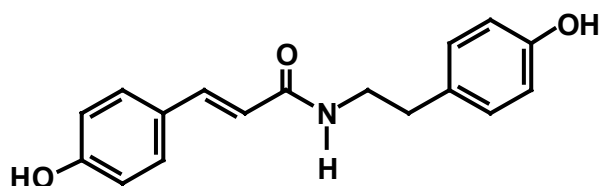




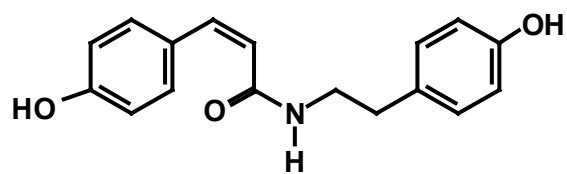
Ri-27



Ri-28



Ri-29



Ri-30

3.2.1. Identificação da Substância Ri-22

Análise da substância **Ri-22** em CCDA revelou fluorescência sob radiação UV, coloração violeta quando revelada com vanilina sulfúrica e alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide. O seu espectro de massas (Fig. 3.108) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z igual a 181 daltons, confirmando a presença de nitrogênio na molécula e estando compatível com a fórmula molecular C₁₁H₁₁N.

O espectro de RMN ¹H de **Ri-22** (Figs. 3.105 e 3.106) apresentou sinais característicos de esqueleto de alcalóide carbazol. Os sinais em δ 8,03 (1H, ddd, J = 7,6; 1,6 e 0,8 Hz); δ 7,40 –7,36 (2H, m) e δ 7,20 (1H, ddd, J = 8,0, 3,2 e 2,0 Hz) foram associados a hidrogênios de um anel aromático *orto* dissubstituído; o sinal em δ 7,93 (1H, sl) associado a um hidrogênio ligado a nitrogênio; os sinais em δ 7,87 (1H, dd, J = 1,6 e 0,8 Hz); δ 7,31 (1H, d, J = 8,0 Hz) e δ 7,23 (1H, dd, J = 7,6 e 1,6 Hz) relacionados a três hidrogênios de anel aromático trissubstituído e um sinal em e δ 2,53 (3H, s) associado a um grupo metila ligado a anel aromático.

A análise dos dados obtidos permitiu sugerir para a substância **Ri-22** a estrutura do alcalóide carbazol 3-metil-carbazol (Fig. 3.104), uma vez que, também comparando os valores de deslocamentos químicos de RMN ¹H e ¹³C (Fig. 3.107) de **Ri-22** com os valores encontrados na literatura (CHAKRABARTY et al., 1997) confirmou a identidade entre as mesmas (Tab. 3.30).

TABELA 3.30 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) para o 3-metil-carbazol **Ri-22** isolado com a literatura.

3-Metil-Carbazol Ri-22						
C/H	Ri-22			Literatura		
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(c)}$
1	7,31	d (8,0)	110,22 (CH)	7,32	d (8,0)	110,2
2	7,23	dd (7,6; 1,6)	127,16 (CH)	7,25	dd (9,0; 1,5)	127,1
3			128,74 (C)			128,6
4	7,87	dd (1,4; 0,4)	120,22 (CH)	7,89	dl (1,5)	120,2
4a			123,55 (C)			123,4
4b			123,26 (C)			123,1
5	8,03	ddd (7,6; 1,6; 0,8)	120,22 (CH)	8,06	dd (8,0; 0,8)	120,2
6	7,20	ddd (8,0; 5,2; 3,2)	119,21 (CH)	7,22	ddd (8,0; 3,5; 4,5)	119,1
7	7,40	m	125,63 (CH)	7,40	m	125,6
8	7,40	m	110,53 (CH)	7,40	m	110,5
8a			139,83 (C)			139,7
9	7,93	sl		7,95	sl	
9a			137,73 (C)			137,6
3-CH ₃	2,53	s	21,40 (CH ₃)	2,55	s	21,4

(a) 400 MHz, CDCl₃, TMS; (b) 50 MHz, CDCl₃; (c) 100 MHz, CDCl₃.

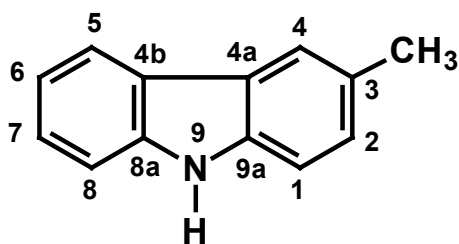


FIGURA 3.106 - Estrutura química do 3-metil-carbazol **Ri-22**.

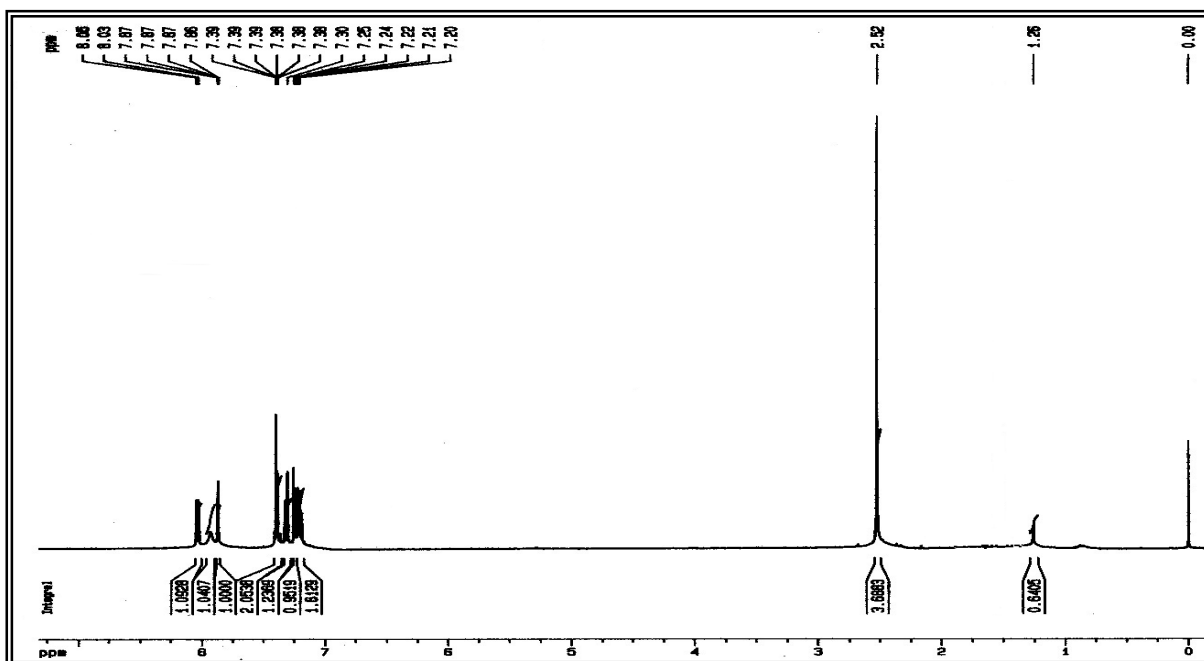


FIGURA 3.107 - Espectro de RMN ^1H do 3-metil-carbazol **Ri-22** (400 MHz, CDCl_3).

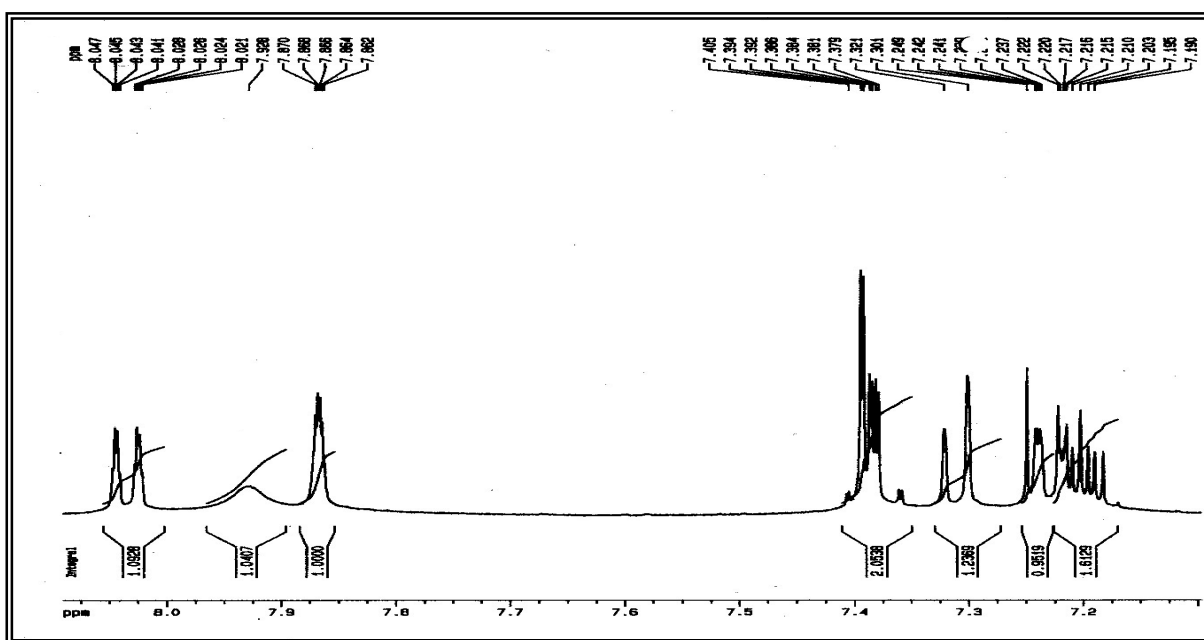


FIGURA 3.108 - Ampliação da região aromática do espectro de RMN ^1H do 3-metil-carbazol **Ri-22** (400 MHz, CDCl_3 , TMS).

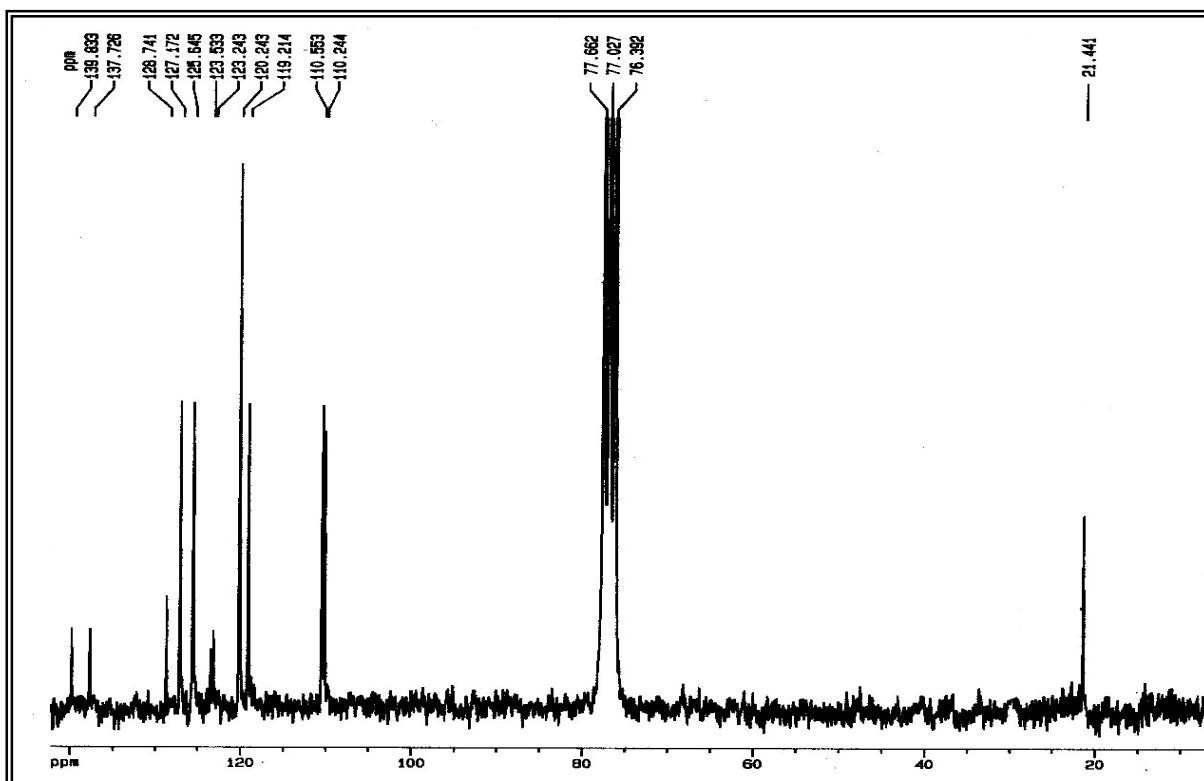


FIGURA 3.109 – Espectro de RMN ¹³C do 3-metil-carbazol **Ri-22** (50 MHz, CDCl₃).

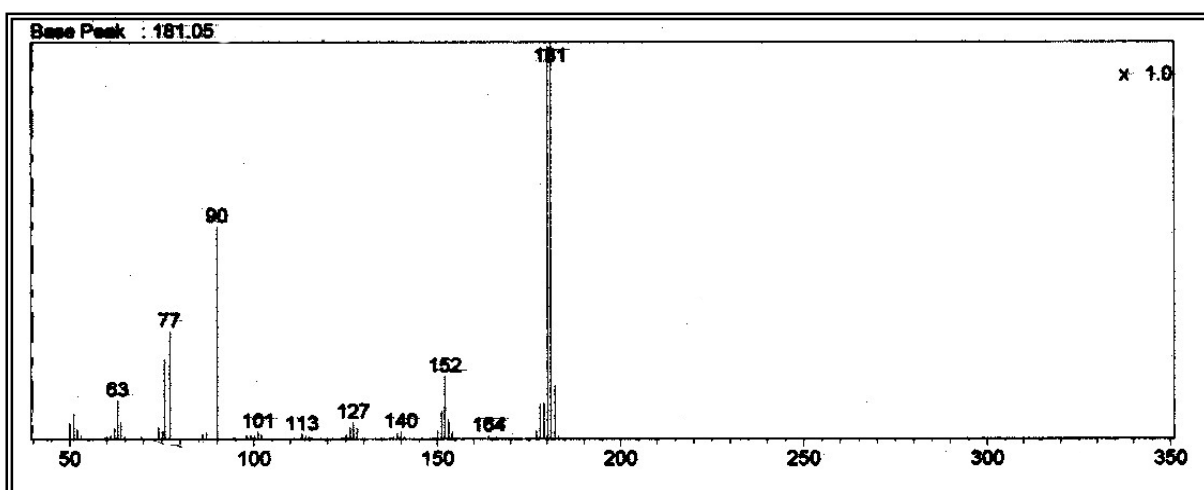


FIGURA 3.110 - Espectro de massas do 3-metil-carbazol **Ri-22** (IE – 70 eV).

3.2.2. Identificação da Substância Ri-23

A substância **Ri-23** mostrou fluorescência sob radiação UV, coloração violeta quando revelada com vanilina sulfúrica e alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide.

O espectro de RMN ^1H de **Ri-23** (Figs. 3.110 e 3.111) apresentou sinais característicos de esqueleto de alcalóide carbazol. Os sinais em δ 7,91 (d, $J = 8,0$ Hz); δ 7,37 (d, $J = 8,0$ Hz), δ 7,30 (t, $J = 7,5$ Hz) e δ 7,17 (t, $J = 7,5$ Hz) foram associados a hidrogênios de um anel aromático *orto* dissustituído; o sinal em δ 7,94 (sl) associado a um hidrogênio ligado a nitrogênio; o sinal em δ 7,67 (s) relacionado a um hidrogênio de anel aromático pentassustituído; um sinal em δ 2,33 (s) associado a um grupo metila ligado a anel aromático e os sinais em δ 6,63 (d, $J = 9,7$ Hz), δ 5,68 (d, $J = 9,7$ Hz), δ 1,49 (s) sugerem a presença de um anel (2,2-dimetilcromeno) fundido ao sistema carbazol. Com os dados obtidos sugeriu-se a estrutura do alcalóide pirano carbazol girinimbina **Ri-23** (Fig. 3.109). A comparação dos dados de RMN ^1H de **Ri-23** com dados da literatura para o alcalóide pirano carbazol girinimbina (KONG et al., 1986) confirmaram a estrutura proposta (Tab. 3.31).

TABELA 3.31 - Comparação dos dados de RMN ^1H (δ) do alcalóide pirano carbazol girinimbina **Ri-23** isolado com a literatura.

Hidrogênio	Girinimbina Ri-23	
	Ri-23 ^(a)	Literatura ^(b)
4	7,67 (s)	7,66 (s)
5	7,91 (d, J = 8,0 Hz)	7,91 (dl)
6	7,17 (t, J = 7,5 Hz)	7,14-7,37 (m)
7	7,30 (t, J = 7,5 Hz)	7,14-7,37 (m)
8	7,37 (d, J = 8,0 Hz)	7,14-7,37 (m)
9	7,86 (sl)	7,83 (sl)
3-CH ₃	2,33 (s)	2,33 (d, J = 0,7 Hz)
1'	6,63 (d, J = 9,7 Hz)	6,89 (d, J = 9,8 Hz)
2'	5,68 (d, J = 9,7 Hz)	5,68 (d, J = 9,8 Hz)
3'-(CH ₃) ₂	1,49 (s)	1,48 (s)

(a) 400 MHz, CDCl₃; (b) 250 MHz, CDCl₃.

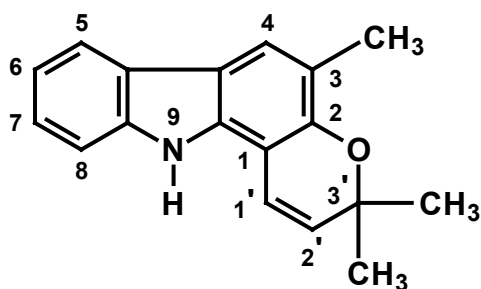


FIGURA 3.111 – Estrutura química da girinimbina **23**.

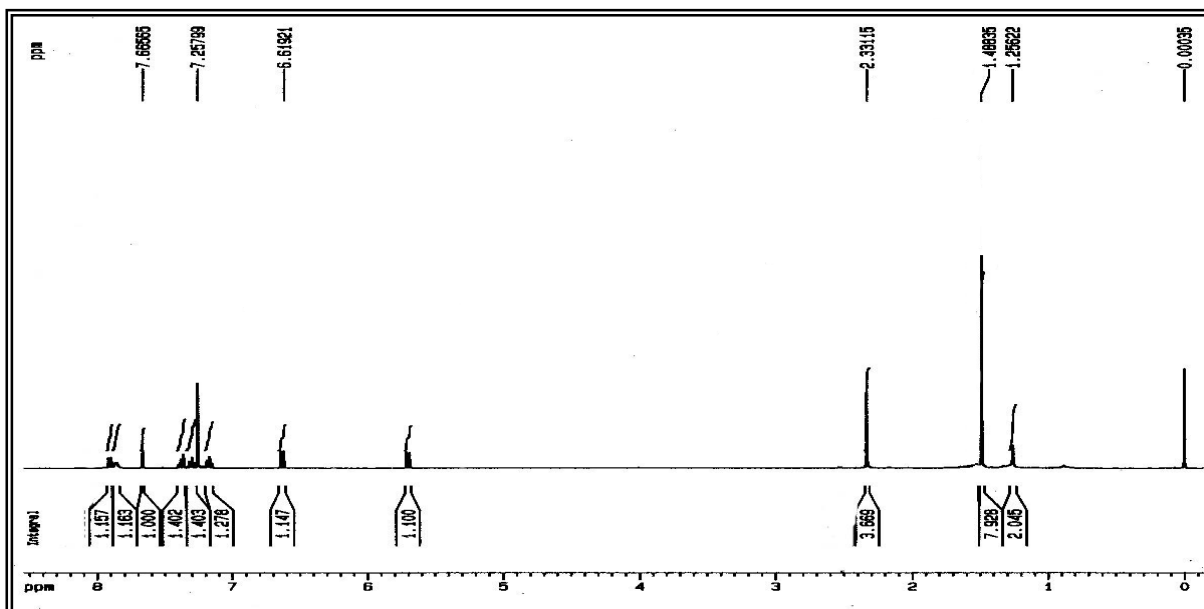


FIGURA 3.112 – Espectro de RMN ^1H da girinimbina **Ri-23** (400 MHz, CDCl_3 , TMS).

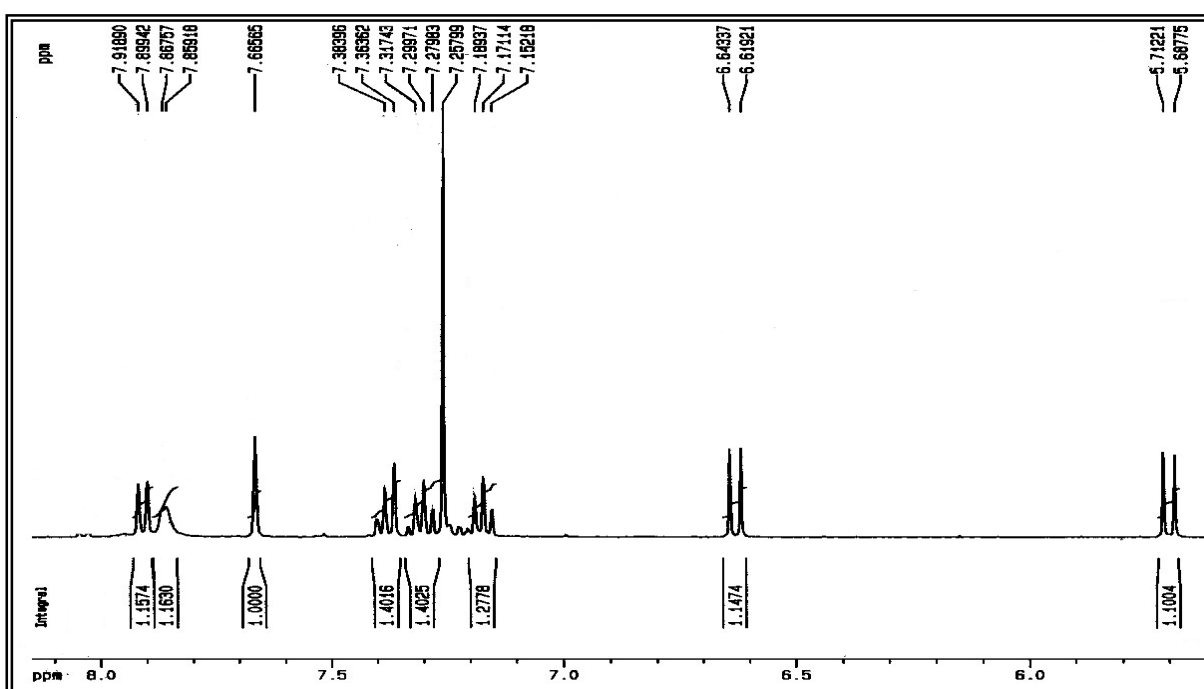


FIGURA 3.113 – Ampliação da região aromática do espectro de RMN ^1H da girinimbina **Ri-23** (400 MHz, CDCl_3 , TMS).

3.2.3. Identificação das Substâncias Ri-24 e Ri-25

A fração RMA-1-6-20-p-3-a apresentou-se como um sólido branco amorfo, onde a análise de CCDA mostrou uma fluorescência sob a luz UV e uma mancha com coloração violeta após revelação com vanilina sulfúrica, sendo identificado como uma mistura dos esteróides 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25** (Fig. 3.112), baseado na análise dos dados de RMN ^1H , de ^{13}C , DEPT 135° e CG/EM.

No espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TMS) desta mistura, a presença dos 7-oxo-esteróides **Ri-24** e **Ri-25** (Fig. 3.114), é evidenciada pela presença de seis sinais em δ 1,20 (s), δ 0,93 (d, J = 6,5 Hz), δ 0,85 (d, J = 7,5 Hz), δ 0,83 (d, J = 6,9 Hz), δ 0,81 (d, J = 6,9 Hz) e δ 0,68 (s), atribuídos a hidrogênios de grupos metila ligados a carbonos saturados; de grande número de sinais intensos na região de δ 1,57 – 2,43, atribuídos a vários grupos de hidrogênios metínicos e metilênicos; dos sinais em δ 5,70 (d, J = 1,3 Hz) e δ 3,68 (m) relativos aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente, que caracterizam o esqueleto esteroidal. As diferenças espectrais restringem-se essencialmente à cadeia lateral, pela presença da ligação dupla entre C-22 e C-23 no 7-oxo-estigmasterol **Ri-24**, e são notadas pelas absorções dos hidrogênios vinílicos adicionais em δ 5,02 (dd, J = 15,2 e 8,1 Hz, H-22) e δ 5,17 (dd, J = 15,2 e 8,1 Hz, H-23).

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 3.115, Tab. 3.30) da mistura 7-oxo-esteroidal apresentou 32 sinais, os quais comparados com os sinais do espectro DEPT 135° (Fig. 3.114) revelou a presença de 4 carbonos não hidrogenados (C), 11 carbonos metínicos (CH), 11 carbonos metilênicos (CH_2) e 6 carbonos metílicos (CH_3). O sinal em δ 202,4, referente a um carbono carbonílico de cetona α , β -insaturada C-7; os sinais em δ 165,2 e δ 126,1 característicos da ligação dupla entre C-5 e C-6; o sinal em δ 70,5 atribuído ao carbono carbinólico C-3, comuns aos dois esteróides, 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25**; os sinais em δ 138,8 e δ 129,5 característicos da ligação dupla entre C-22 e C-23 do 7-oxo-estigmasterol **Ri-24**.

A mistura de 7-oxo-esteróides foi submetida a CG/EM para confirmação das propostas, onde a análise por CG revelou a presença de dois componentes na mistura (Fig. 3.113). Os espectros de massas (Figs. 3.117 e 3.118), mostraram os picos dos íons moleculares com razão m/z iguais a 426 e 428 daltons, estando

compatíveis com as fórmulas moleculares $C_{29}H_{46}O_2$ do 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e $C_{29}H_{48}O_2$ do 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25**, respectivamente.

As informações espectrais estão de acordo com os dados de 7-oxo-esteróides já conhecidos na literatura (UMEYAMA et al., 2000; PETTIT et al., 2000; ULUBELEN et al., 1994; GRECA et al., 1990), conforme Tabela 3.32 comparativa dos valores de RMN ^{13}C para os 7-oxo-esteróides **Ri-24** e **Ri-25** isolados.

TABELA 3.32 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (δ) para os 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25** isolados com a literatura.

C	Padrão de Hidrogenação	7-oxo-estigmasterol Ri-24		7-oxo- β -sitosterol Ri-25	
		Ri-24 ^(a)	Literatura ^(b)	Ri-25 ^(a)	Literatura ^(c)
1	CH ₂	36,4	36,3	36,4	36,4
2	CH ₂	31,2	31,2	31,2	31,2
3	CH	70,5	70,5	70,5	70,5
4	CH ₂	41,8	41,8	41,8	41,8
5	C	165,2	165,1	165,2	165,2
6	CH	126,1	126,1	126,1	126,0
7	C	202,4	202,2	202,4	202,2
8	CH	45,8	45,4	45,8	45,4
9	CH	49,9	49,9	49,9	49,9
10	C	38,3	38,3	38,3	38,3
11	CH ₂	21,2	21,2	21,2	21,2
12	CH ₂	38,7	38,6	38,7	39,6
13	C	43,1	43,0	43,1	43,4
14	CH	49,9	50,0	49,9	49,9
15	CH ₂	26,3	26,4	26,3	26,4
16	CH ₂	28,5	29,2	28,5	27,8
17	CH	54,7	54,7	54,7	54,7
18	CH ₃	12,0	12,2	12,0	12,0
19	CH ₃	17,3	17,3	17,3	17,3
20	CH	40,3	40,4	36,1	36,1
21	CH ₃	18,9	21,4	18,9	18,9
22	CH ₂	138,1	139,1	33,9	34,0
23	CH ₂	129,5	127,2	26,1	26,1
24	CH	54,8	56,1	45,4	45,9
25	CH	29,2	28,5	29,2	29,2
26	CH ₃	19,0	19,2	19,0	19,0
27	CH ₃	19,8	21,7	19,8	19,9
28	CH ₂	23,1	28,5	23,1	23,1
29	CH ₃	12,2	12,6	12,2	12,0

(a) 50 MHz, CDCl₃; (b) 100 MHz, CDCl₃; (c) 75 MHz, CDCl₃

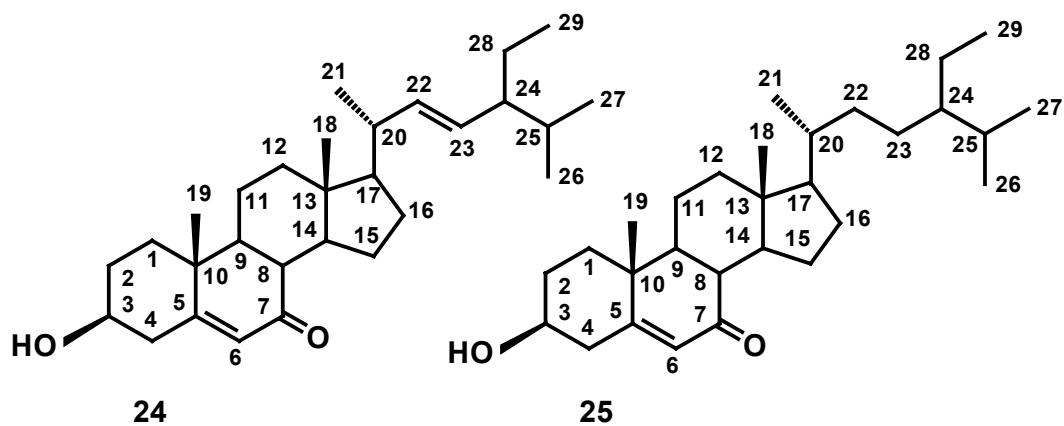


FIGURA 3.114 - Estruturas químicas do 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25**.

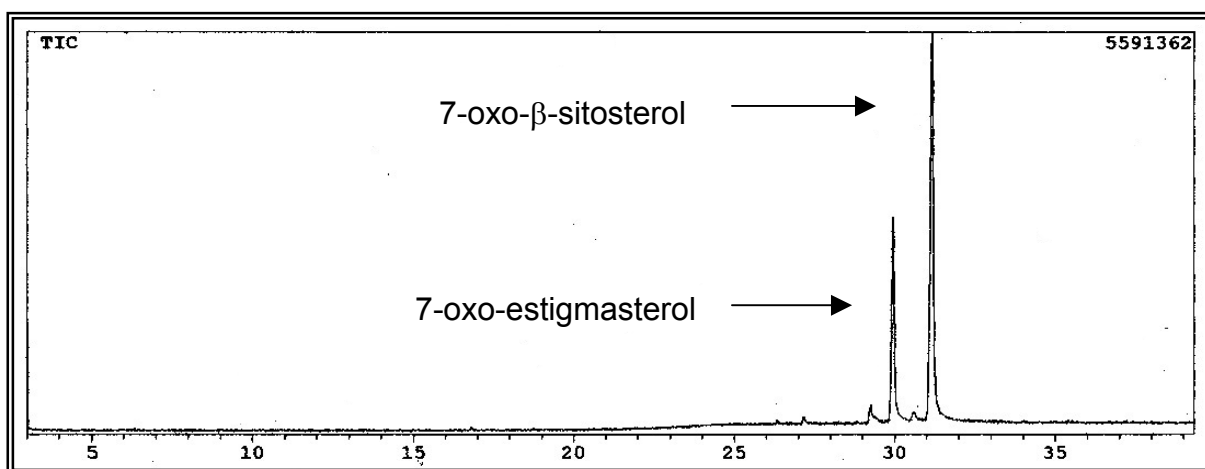


FIGURA 3.115 - Cromatograma da mistura de 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25**.

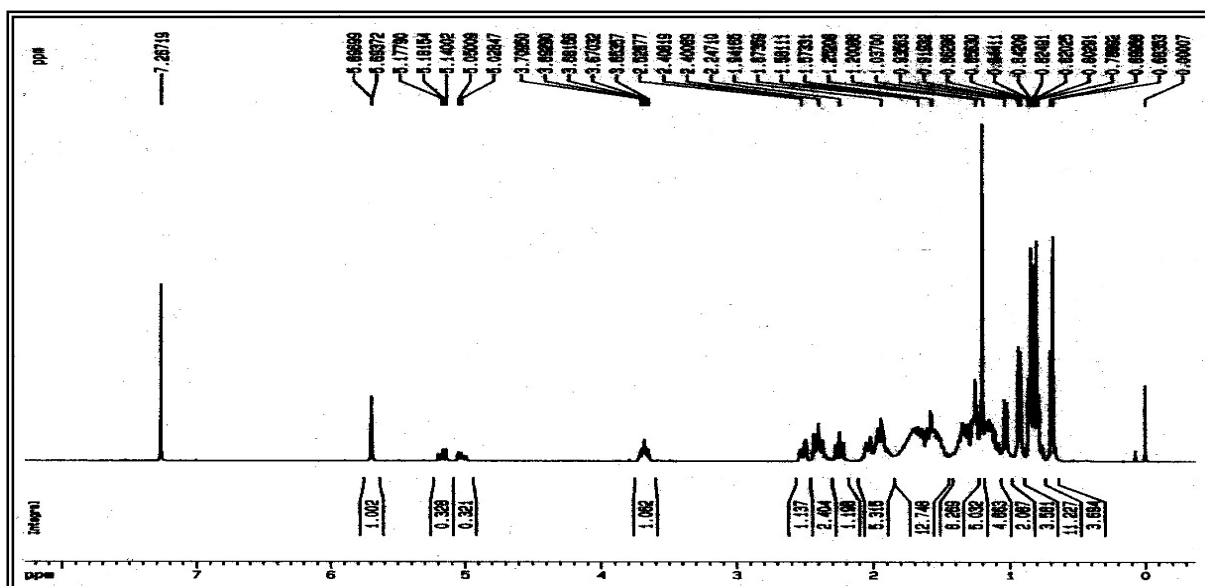


FIGURA 3.116 - Espectro de RMN ^1H da mistura de 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25** (400 MHz, CDCl_3 , TMS).

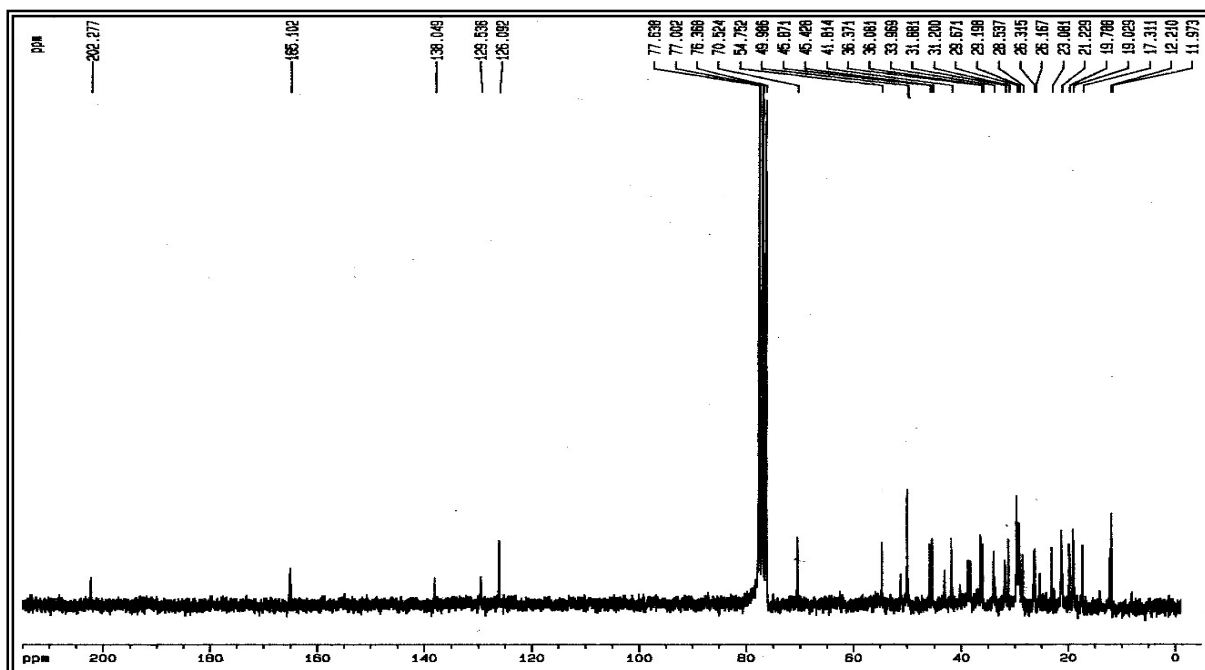


FIGURA 3.117 - Espectro de RMN ^{13}C da mistura de 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25** (50 MHz, CDCl_3).

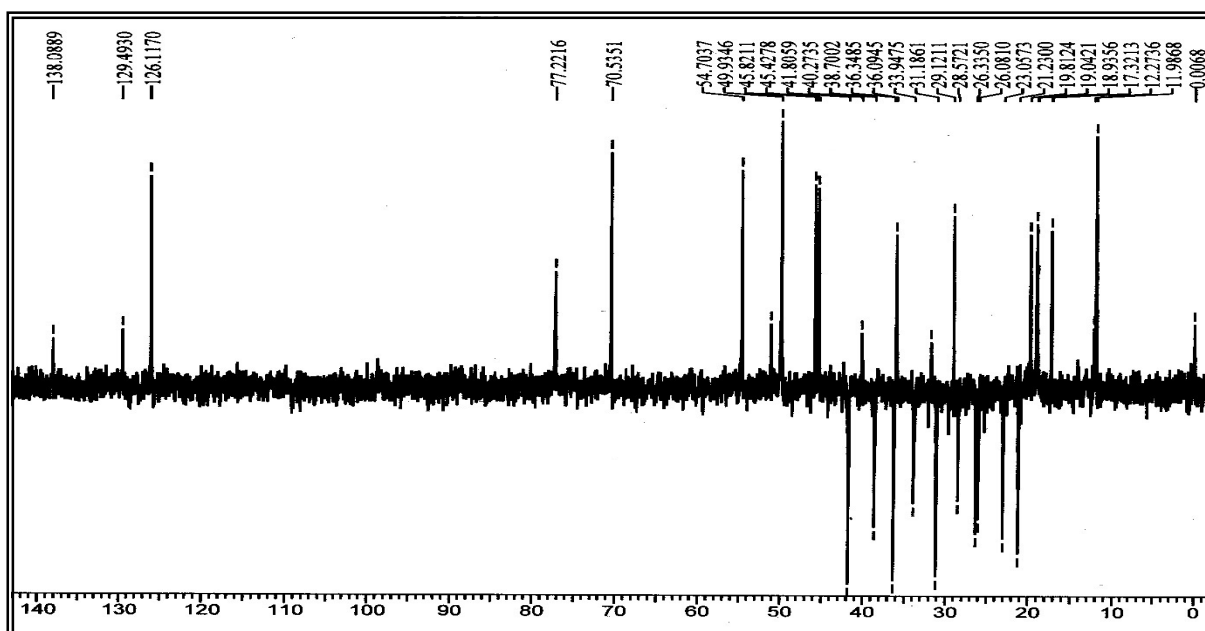


FIGURA 3.118 - Espectro DEPT 135° da mistura de 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** e 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25** (50 MHz, CDCl_3).

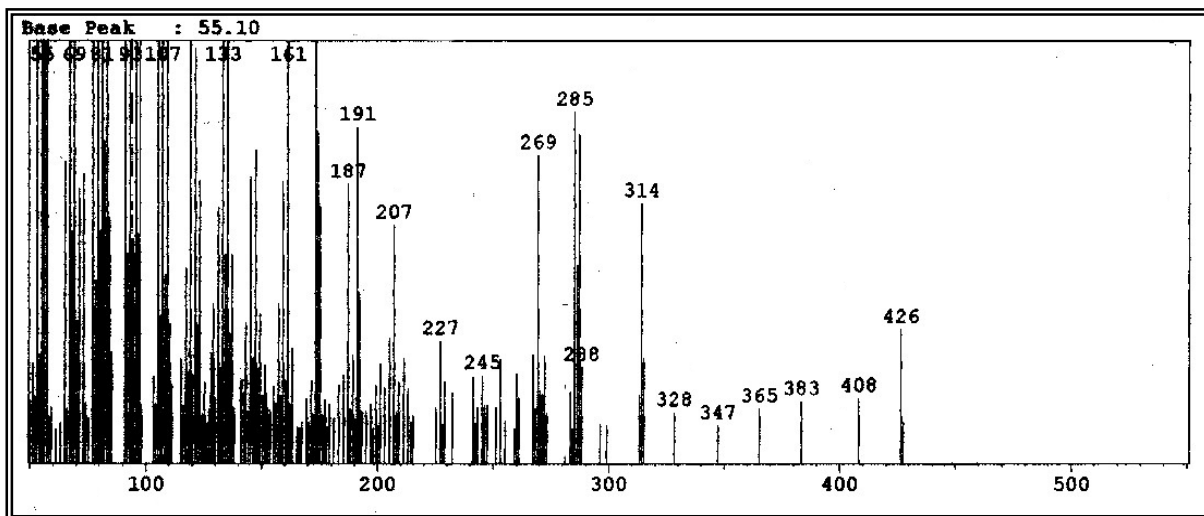


FIGURA 3.119 - Espectro de massas do 7-oxo-estigmasterol **Ri-24** (IE – 70 eV).

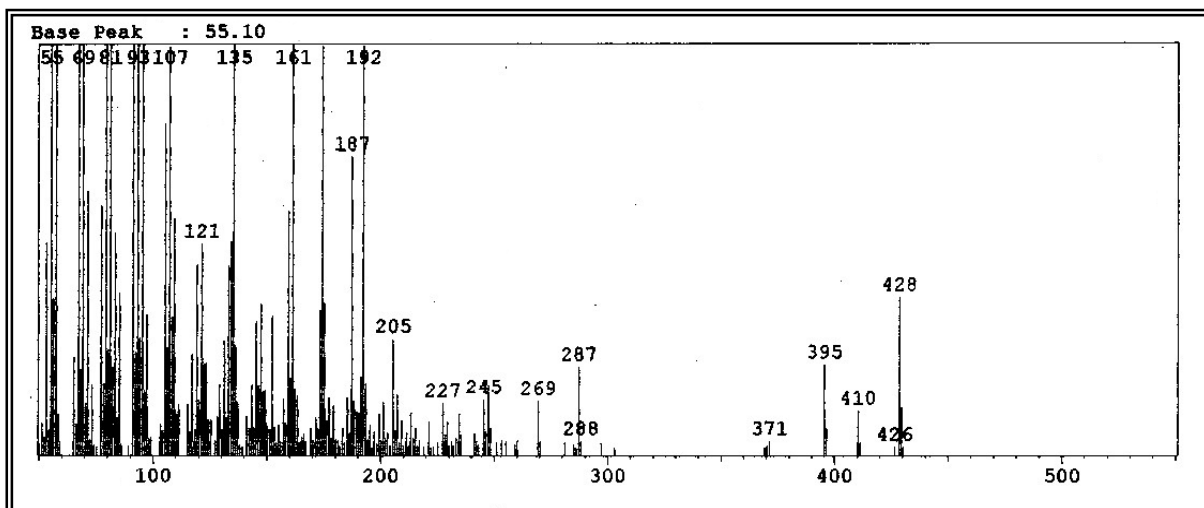


FIGURA 3.120 - Espectro de massas do 7-oxo- β -sitosterol **Ri-25** (IE – 70 eV).

3.2.4. Identificação da Substância Ri-26

A substância **Ri-26** apresentou fluorescência em CCDA quando submetida à luz UV, coloração marrom escuro quando revelada com vanilina sulfúrica, e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de alcalóide.

O espectro de massas da substância **Ri-26** (Fig. 3.120) apresentou o pico do íon molecular com razão m/z em 145 [M-1] daltons, indicando a presença de nitrogênio na molécula e estando compatível com a fórmula molecular C_9H_7NO .

O espectro de RMN 1H de **Ri-26** (Fig. 3.121, Tab. 3.31) apresentou sinais característicos de alcalóides indólicos. Os sinais de hidrogênios em δ 8,15 (1H, dd, $J = 6,0$ e $2,5$ Hz), δ 7,48 (1H, dd, $J = 6,0$ e $2,5$ Hz), δ 7,28 (1H, ddd, $J = 7,5$; $7,5$ e $1,5$ Hz), δ 7,21 (1H, dd, $J = 7,5$ e $1,5$ Hz) foram relacionados a um anel benzênico *orto* dissubstituído do núcleo indólico; o sinal em δ 8,09 (1H, s) foi associado a um hidrogênio metínico olefínico na posição 2 e o sinal em δ 9,88 (1H, s) referente a hidrogênio de aldeído.

O espectro de RMN ^{13}C de **Ri-26** (Fig. 3.122) apresentou 9 sinais (Tab. 3.33), onde a análise comparativa destes dados com a literatura (McKAY et al., 2002) indicou a presença de 4 carbonos quaternários em δ 187,4, δ 138,9, δ 125,7, δ 120,1, e 5 carbonos metínicos em δ 139,6, δ 123,6, δ 124,9, δ 122,4, e δ 113,1. Além disso, a comparação dos deslocamentos em δ_H 9,88 e δ_C 187,4, com dados da literatura (EVIDENTE, 1986; KIM et al., 1997; HU et al., 2002), sugeriu a existência de um grupo formil ligado a um anel aromático, o que nos permitiu propor a estrutura do alcalóide indol-3-carboxaldeído para a substância **Ri-26** (Fig. 3.119).

TABELA 3.33 – Dados de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD , TMS, ppm) e RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD , ppm) da substância **Ri-26**.

Carbono	δ_{H}	δ_{C}
2	8,09 (s)	139,6 (CH)
3		120,1 (C)
3a		125,7 (C)
4	8,15 (dd, J = 6,0 e 2,5 Hz)	123,6 (CH)
5	7,21 (dd, J = 7,5 e 1,5 Hz)	124,9 (CH)
6	7,28 (ddd, J = 7,5, 7,5 e 1,5 Hz)	122,4 (CH)
7	7,48 (dd, J = 6,0 e 2,5 Hz)	113,1 (CH)
7a		138,9 (C)
8-CHO	9,88 (s)	187,4 (C)

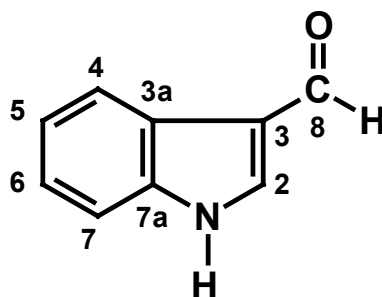


FIGURA 3.121 - Estrutura química da substância **26**.

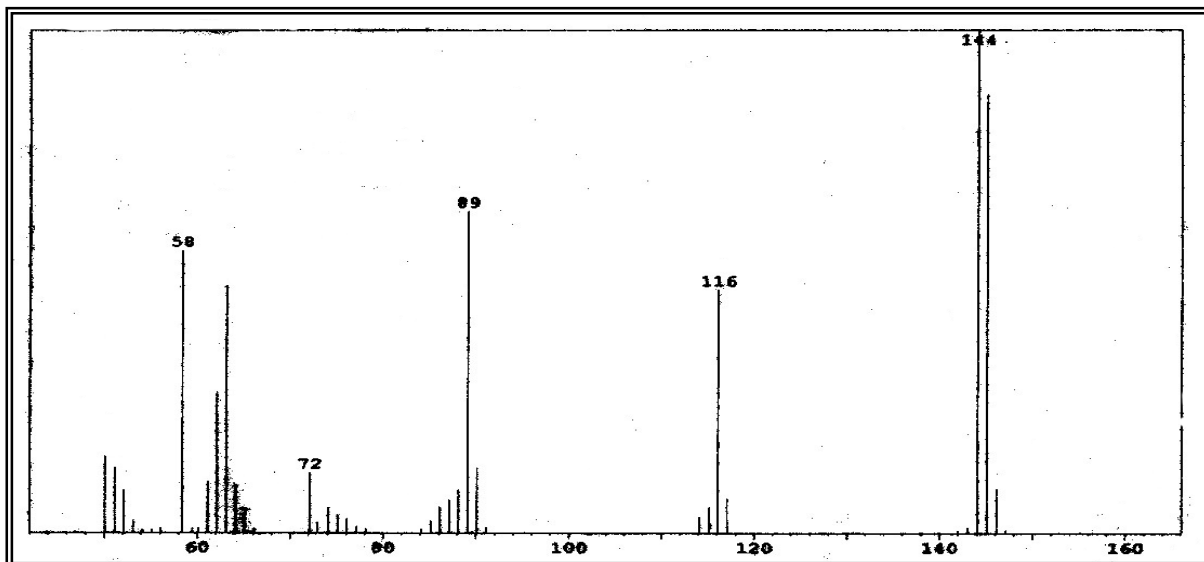


FIGURA 3.122 – Espectro de massas da substância **Ri-26** (IE – 70 eV).

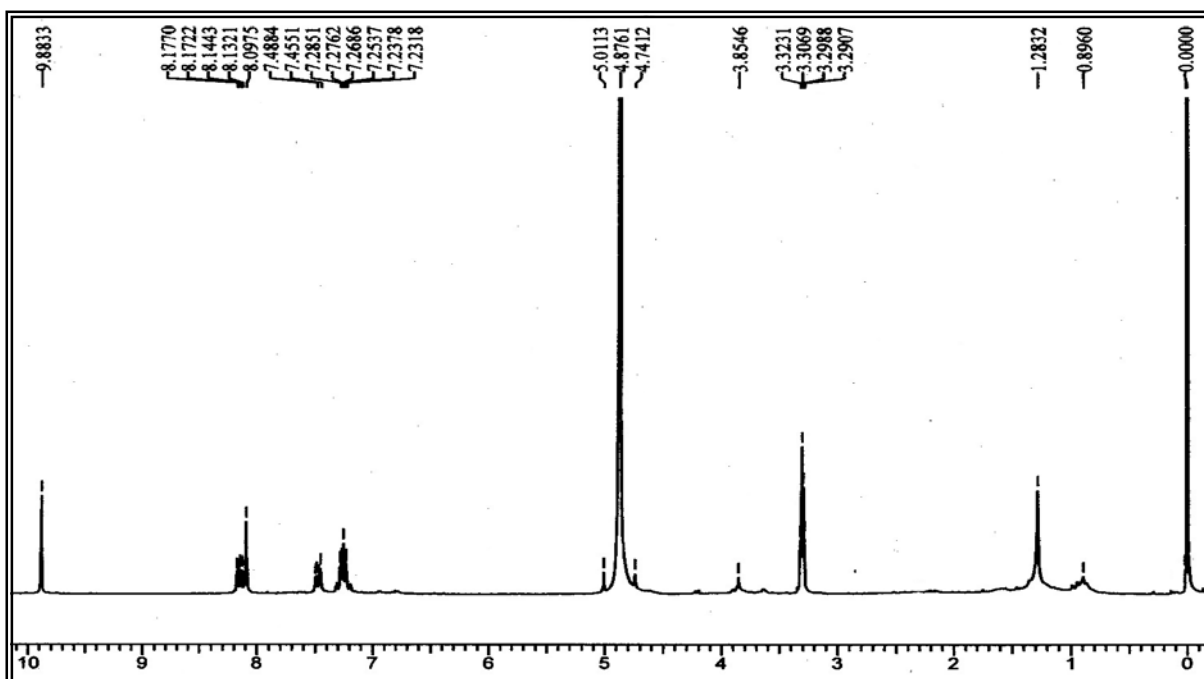


FIGURA 3.123 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD , TMS) da substância **Ri-26**.

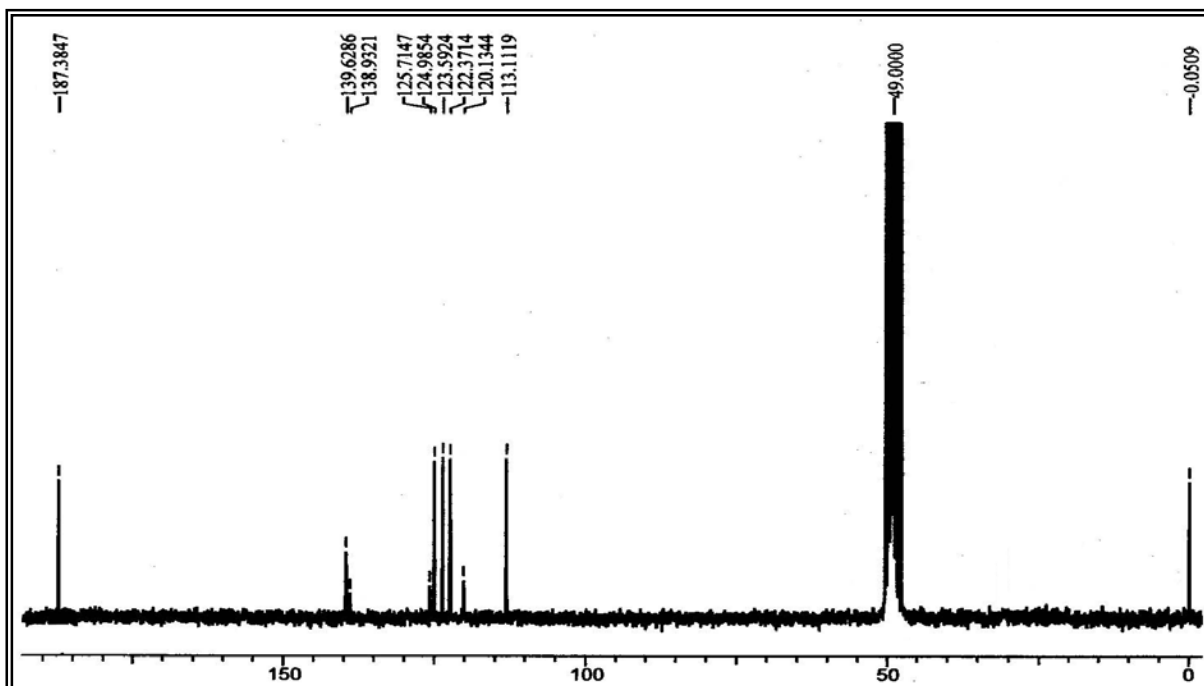


FIGURA 3.123 – Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da substância **Ri-26**.

3.2.5. Identificação das Substâncias Ri-27 e Ri-28

A mistura das substâncias **Ri-27** e **Ri-28**, apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca. A sua análise em CCDA, mostrou uma fluorescência escura quando submetida à luz UV.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 3.124) da mistura das substâncias **Ri-27** e **Ri-28**, revelou um padrão ABX em δ 7,02 (1H, d, J = 1,8 Hz), δ 6,92 (1H, dd, J = 8,2 e 2,0 Hz) e δ 6,75 (1H, d, J = 8,5 Hz) para H-2', H-6' e H-5' na parte ácida ferúlica, respectivamente para a substância **Ri-27**; um outro padrão ABX em δ 7,26 (1H, d, J = 2,0 Hz), δ 6,83 (1H, dd, J = 8,2 e 2,0 Hz) e δ 6,62 (1H, d, J = 8,5 Hz) para H-2', H-6' e H-5' na parte ácida ferúlica, respectivamente para a substância **Ri-28**. Dois dubletos em δ 7,33 (1H, J = 15,7 Hz) e δ 6,51 (1H, J = 12,5 Hz) associados aos hidrogênios olefínicos do C-8' do ácido ferúlico mostrando acoplamentos *trans* e *cis* com os hidrogênios olefínicos em C-7', os quais apareceram como dois dubletos em δ 6,30 (1H, J = 15,7 Hz) e δ 5,71 (1H, J = 12,5 Hz) e dois sinais em δ 3,78 (3H, s) e δ 3,73 (3H, s), referentes a dois grupos metila ligados a heteroátomos (O ou N) nas substâncias **Ri-27** e **Ri-28**, respectivamente. Um típico sistema AA'BB' foi observado em δ 6,96 (2H, d, J = 8,4 Hz), δ 6,69 (2H, d, J = 8,4 Hz) e δ 6,59 (2H, d, J = 8,5 Hz) para os hidrogênios H-3, 5 e H-2, 6 e dois tripletos acoplados de hidrogênios metilênicos em δ 3,36 (2H, t, J = 7,5 Hz) e δ 2,65 (2H, t, J = 7,5 Hz), e em δ 3,29 (2H, t, J = 7,5 Hz) e δ 2,59 (2H, t, J = 7,5 Hz) para H-8 e H-7, para a parte tiramina das substâncias **Ri-27** e **Ri-28**, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 3.125), revelou para a mistura das substâncias **Ri-27** e **Ri-28**, respectivamente, 18 sinais. Destes, o sinal em δ 169,3 referente ao carbono carbonílico de amida e o sinal em δ 56,5 relacionado a metoxila aromática.

Com os dados obtidos, sugeriu-se para as substâncias **Ri-27** e **Ri-28**, as estruturas das amidas N-*trans*-feruloiltiramina e N-*cis*-feruloiltiramina (Fig. 3.126), respectivamente. A confirmação das estruturas foi realizada através da comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **Ri-27** e **Ri-28** com os dados das amidas N-*trans*-feruloiltiramina e N-*cis*-feruloiltiramina encontrados na literatura (SARKER et al., 2000), descritos nas Tabelas 3.34 e 3.35.

TABELA 3.34 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida *N-trans*-feruloiltiramina **Ri-27** isolada com a literatura.

<i>N-trans</i>-feruloiltiramina 27						
C/H	Ri-27			Literatura		
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(c)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(d)}$
1'			128,4 (C)			128,7
2'	7,02	d (1,8)	111,6 (CH)	7,12	d (1,7)	112,1
3'			149,4 (C)			149,7
4'			150,0 (C)			150,2
5'	6,75	d (8,5)	116,6 (CH)	6,81	d (8,1)	116,9
6'	6,92	dd (8,2; 2,0)	123,4 (CH)	7,02	dd (8,1; 1,7)	123,6
7'	6,30	d (15,7)	142,2 (CH)	6,42	d (15,5)	142,4
8'	7,33	d (15,7)	118,9 (CH)	7,45	d (15,5)	119,2
9'			169,3 (C)			
1			131,4 (C)			131,7
2	6,69	d (8,2)	116,4 (CH)	6,74	d (8,4)	116,7
3	6,96	d (8,4)	130,9 (CH)	7,06	d (8,4)	131,1
4			157,1 (C)			157,3
5	6,96	d (8,2)	130,9 (CH)	7,06	d (8,4)	131,1
6	6,69	d (8,2)	116,4 (CH)	6,74	d (8,4)	116,7
7	2,65	t (7,5)	36,0 (CH ₂)	2,77	t (7,5)	36,2
8	3,36	t (7,5)	42,7 (CH ₂)	3,48	t (7,5)	42,9
3'-OMe	3,78	s	56,5 (CH ₃)	3,89	s	56,9

(a) 400 MHz, CD₃OD; (b) 100 MHz, CD₃OD; (c) 500 MHz, CD₃OD; (d) 125 MHz, CD₃OD.

TABELA 3.35 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida N-*cis*-feruloiltiramina **Ri-28** isolada e com a literatura.

N-<i>cis</i>-feruloiltiramina 28						
C/H	Ri-28			Literatura		
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(c)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(d)}$
1'			128,4 (C)			128,7
2'	7,26	d (1,9)	111,6 (CH)	7,24	d (1,6)	112,1
3'			149,4 (C)			149,7
4'			150,0 (C)			150,2
5'	6,62	d (8,5)	116,6 (CH)	6,62	d (8,1)	116,9
6'	6,83	dd (8,2; 2,0)	123,4 (CH)	6,81	dd (8,0; 1,6)	123,6
7'	5,70	d (12,5)	142,2 (CH)	5,70	d (12,5)	142,4
8'	6,51	d (12,5)	118,9 (CH)	6,50	d (12,5)	119,2
9'			169,3 (C)			
1			131,4 (C)			131,7
2	6,59	d (8,5)	116,4 (CH)	6,58	d (8,4)	116,7
3	6,96	d (8,4)	130,9 (CH)	6,88	d (8,4)	131,1
4			157,1 (C)			157,3
5	6,96	d (8,4)	130,9 (CH)	6,88	d (8,4)	131,1
6	6,59	d (8,5)	116,4 (CH)	6,58	d (8,4)	116,7
7	2,59	t (7,5)	36,0 (CH ₂)	2,58	t (7,0)	36,2
8	3,29	t (7,5)	42,7 (CH ₂)	3,28	t (7,0)	42,9
3'-OMe	3,73	s	56,5 (CH ₃)	3,72	s	56,9

(a) 400 MHz, CD₃OD; (b) 100 MHz, CD₃OD; (c) 500 MHz, CD₃OD; (d) 125 MHz, CD₃OD.

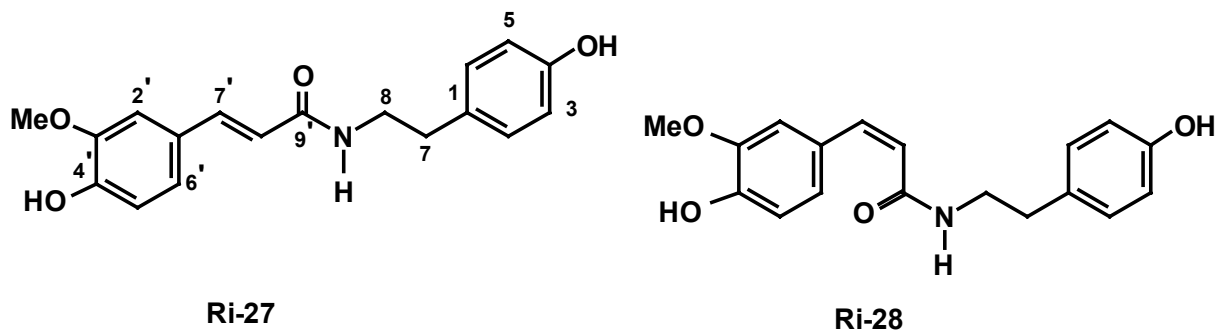


FIGURA 3.124 – Estruturas químicas das amidas *N-trans*-feruloiltiramina **Ri-27** e *N-cis*-feruloiltiramina **Ri-28**.

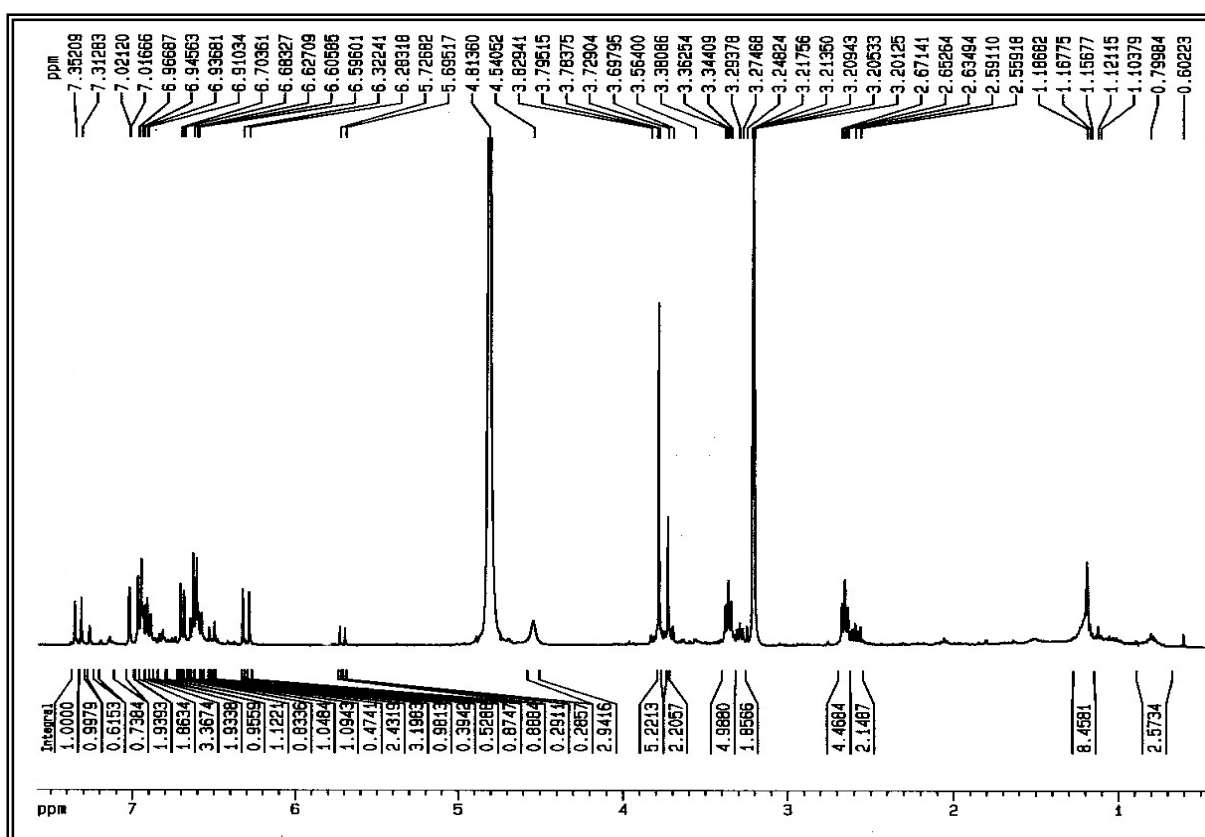


FIGURA 3.125 – Espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias **Ri-27** e **Ri-28** (400 MHz, CD_3OD).

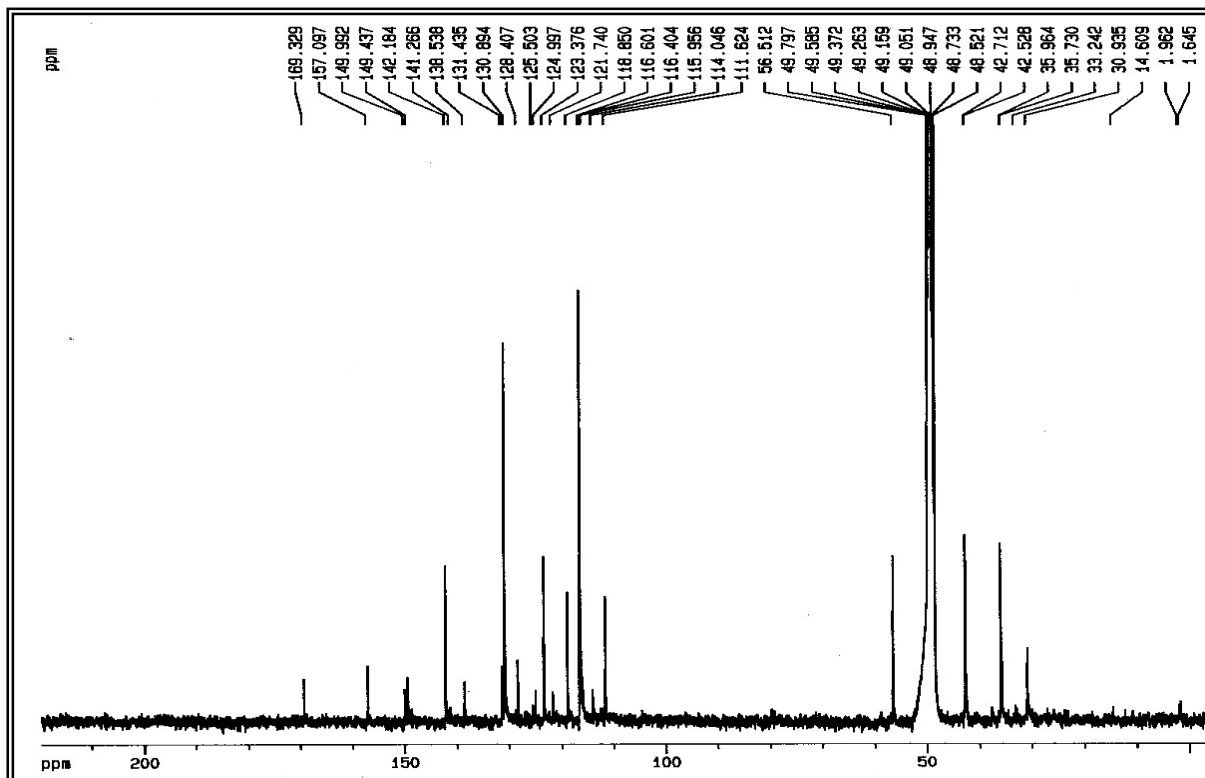


FIGURA 3.126 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura das substâncias **Ri-27** e **Ri-28** (100 MHz, CD_3OD).

3.2.6. Identificação das Substâncias Ri-29 e Ri-30

A mistura das substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca. A sua análise em CCDA, mostrou uma fluorescência escura quando submetida à luz UV.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 3.127) da mistura das substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, revelou dois sistemas típicos AA'BB' em δ 7,30 (2H, d, J = 8,5 Hz), δ 6,95 (2H, d, J = 8,5 Hz), e em δ 7,27 (2H, d, J = 8,5 Hz), δ 6,91 (2H, d, J = 8,5 Hz) para H-2', H-6' e H-3', H-5' característicos do esqueleto p-cumaroil, para as substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, respectivamente; dois outros sistemas AA'BB' em δ 6,62 (2H, d, J = 8,5 Hz), δ 6,69 (2H, d, J = 8,5 Hz) e em δ 6,62 (2H, d, J = 8,5 Hz), δ 6,69 (2H, d, J = 8,5 Hz) para H-2, H-6 e H-3, H-5, característicos do esqueleto tiramina, para as substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, respectivamente. Dois dubletos em campo baixo em δ 7,34 (1H, J = 15,7 Hz) e δ 6,51 (1H, J = 12,5 Hz) associados aos hidrogênios olefínicos do C-8' do esqueleto p-cumaroil, mostrando acoplamentos *trans* e *cis* com os hidrogênios olefínicos em C-7', os quais apareceram como dois dubletos em δ 6,28 (1H, J = 15,7 Hz) e δ 5,69 (1H, J = 12,5 Hz) nas substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, respectivamente. Quatro tripletos acoplados de hidrogênios metilênicos em δ 3,36 (2H, t, J = 7,5 Hz) e δ 2,65 (2H, t, J = 7,5 Hz), e em δ 3,28 (2H, t, J = 7,5 Hz) e δ 2,59 (2H, t, J = 7,5 Hz) para H-8 e H-7, para o esqueleto tiramina das substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, respectivamente, típico de amidas fenólicas.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 3.128), revelou para a mistura das substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, respectivamente, 17 sinais. A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig. 3.129) possibilitou determinar o padrão de hidrogenação dos carbonos, como sendo 2 carbonos metilênicos (CH_2), 10 carbonos metínicos (CH) e 5 carbonos não hidrogenados (C). Destes, o sinal em δ 169,3 referente ao carbono carbonílico de amida e os sinais em δ 141,9 e δ 118,3 relacionados a ligação dupla dissubstituída.

Com os dados obtidos sugeriu-se para as substâncias **Ri-29** e **Ri-30**, as estruturas das amidas N-*trans*-p-cumaroiltiramina e N-*cis*-p-cumaroiltiramina (Fig. 3.126), respectivamente. A confirmação das estruturas foi realizada através da comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **Ri-29** e **Ri-30** com os dados das amidas N-*trans*-cumaroiltiramina e N-*cis*-p-cumaroiltiramina encontrados

na literatura (RAHMAN et al., 1992; CHEN et al., 1998), descritos nas Tabelas 3.36 e 3.37.

TABELA 3.36 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida *N-trans-p*-cumaroiltiramina **Ri-29** isolada com a literatura.

<i>N-trans-p</i>-cumaroiltiramina Ri-29						
C/H	Ri-29			Literatura		
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(c)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(c)}$
1'			131,4 (C)			131,3
2'	7,30	d (8,5)	116,8 (CH)	7,38	d (8,6)	116,9
3'	6,95	d (8,5)	130,7 (CH)	7,05	d (8,6)	130,7
4'			156,9 (C)			156,9
5'	6,95	d (8,5)	130,7 (CH)	7,05	d (8,6)	130,7
6'	7,30	d (8,5)	116,8 (CH)	7,38	d (8,6)	116,9
7'	6,28	d (15,7)	118,5 (CH)	6,36	d (15,7)	118,3
8'	7,34	d (15,7)	141,8 (CH)	7,44	d (15,7)	141,8
9'			169,3 (C)			
1			127,8 (C)			127,5
2	6,62	d (8,5)	116,3 (CH)	6,71	d (8,6)	116,2
3	6,69	d (8,5)	130,5 (CH)	6,78	d (8,6)	130,5
4			156,9 (C)			156,9
5	6,69	d (8,5)	130,5 (CH)	6,78	d (8,6)	130,5
6	6,62	d (8,2)	116,3 (CH)	6,71	d (8,6)	116,2
7	2,65	t (7,5)	35,8 (CH ₂)	2,78	t (7,6)	35,8
8	3,36	t (7,5)	42,5 (CH ₂)	3,45	t (7,6)	42,5

(a) 400 MHz, CD₃OD; (b) 100 MHz, CD₃OD; (c) 400 MHz, CDCl₃; (d) 100 MHz, CDCl₃.

TABELA 3.37 – Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (δ) da amida N-*cis*-p-cumaroiltiramina **Ri-30** isolada com a literatura.

N-<i>cis</i>-p-cumaroiltiramina Ri-30						
C/H	Ri-30			Literatura		
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(c)}$	m (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{(d)}$
1'			131,4 (C)			131,3
2'	7,27	d (8,5)	116,8 (CH)	7,24	d (8,4)	116,9
3'	6,91	d (8,5)	130,7 (CH)	7,05	d (8,6)	130,7
4'			156,9 (C)			156,9
5'	6,91	d (8,5)	130,7 (CH)	7,05	d (8,6)	130,7
6'	7,27	d (8,5)	116,8 (CH)	7,38	d (8,6)	116,9
7'	5,69	d (12,5)	118,5 (CH)	5,70	d (12,5)	118,3
8'	6,51	d (12,5)	141,8 (CH)	6,50	d (12,5)	141,8
9'			169,3 (C)			
1			127,8 (C)			127,5
2	6,62	d (8,5)	130,5 (CH)	6,58	d (8,4)	130,5
3	6,69	d (8,5)	116,3 (CH)	6,88	d (8,4)	116,2
4			156,9 (C)			156,9
5	6,69	d (8,5)	116,3 (CH)	6,88	d (8,4)	116,2
6	6,62	d (8,5)	130,5 (CH)	6,58	d (8,4)	130,5
7	2,59	t (7,5)	35,5 (CH ₂)	2,58	t (7,0)	35,8
8	3,28	t (7,5)	42,2 (CH ₂)	3,28	t (7,0)	42,5

(a) 400 MHz, CD₃OD; (b) 100 MHz, CD₃OD; (c) 400 MHz, CDCl₃; (d) 100 MHz, CDCl₃.

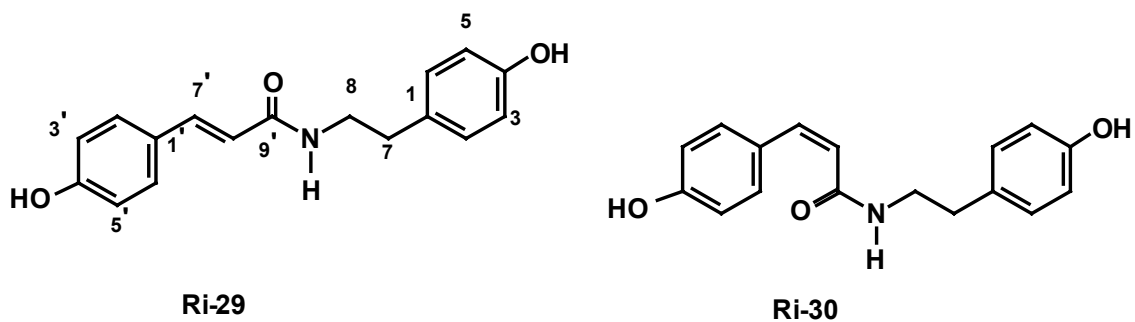


FIGURA 3.127 – Estruturas químicas das amidas *N-trans*-*p*-cumaroiltiramina **Ri-29** e *N-cis*-*p*-cumaroiltiramina **Ri-30**.

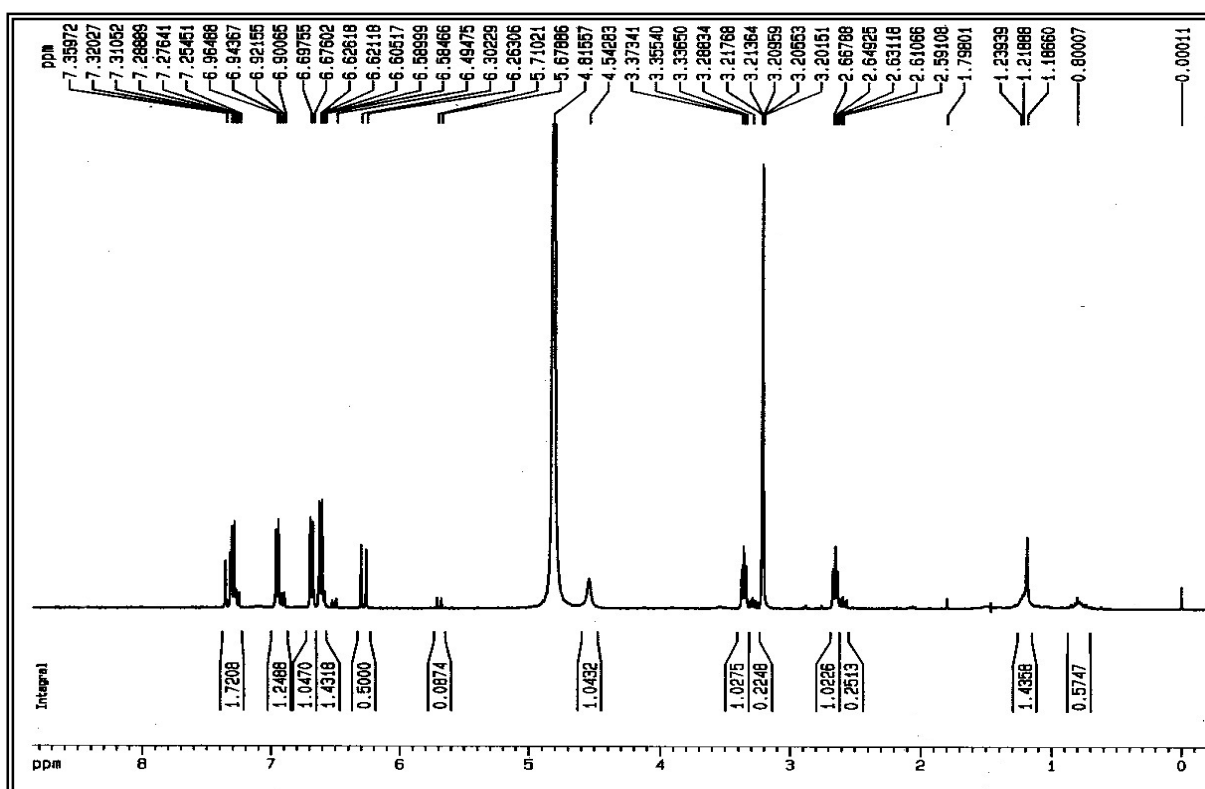


FIGURA 3.128 – Espectro de RMN ^1H da mistura das amidas **Ri-29** e **Ri-30** (400 MHz, CD_3OD).

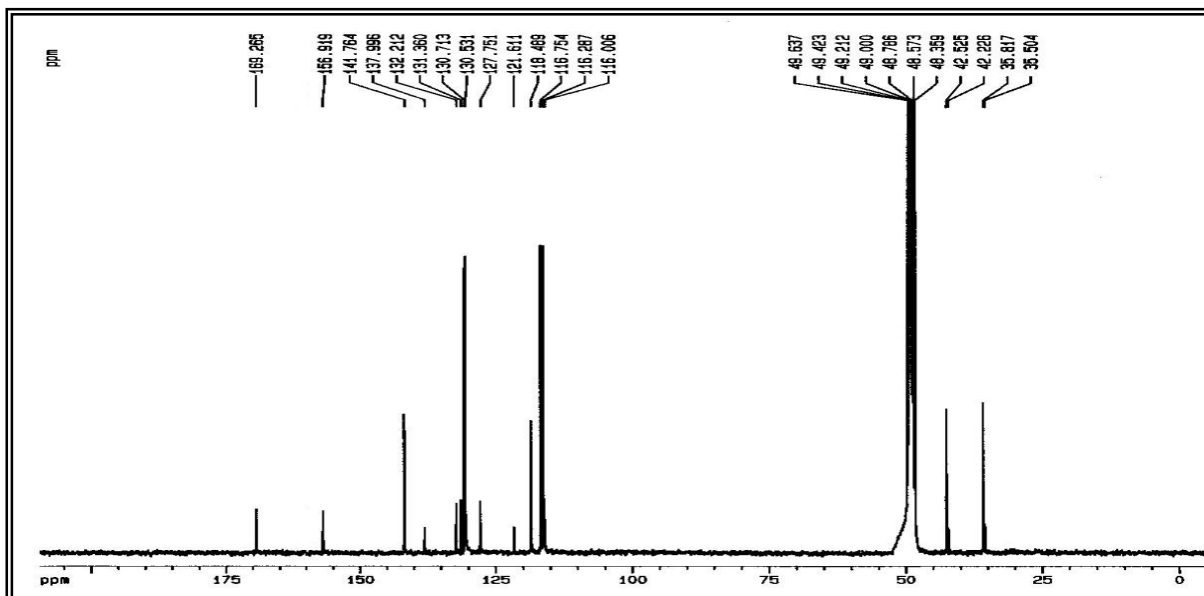


FIGURA 3.129 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura das amidas **Ri-29** e **Ri-30** (100 MHz, CD_3OD).

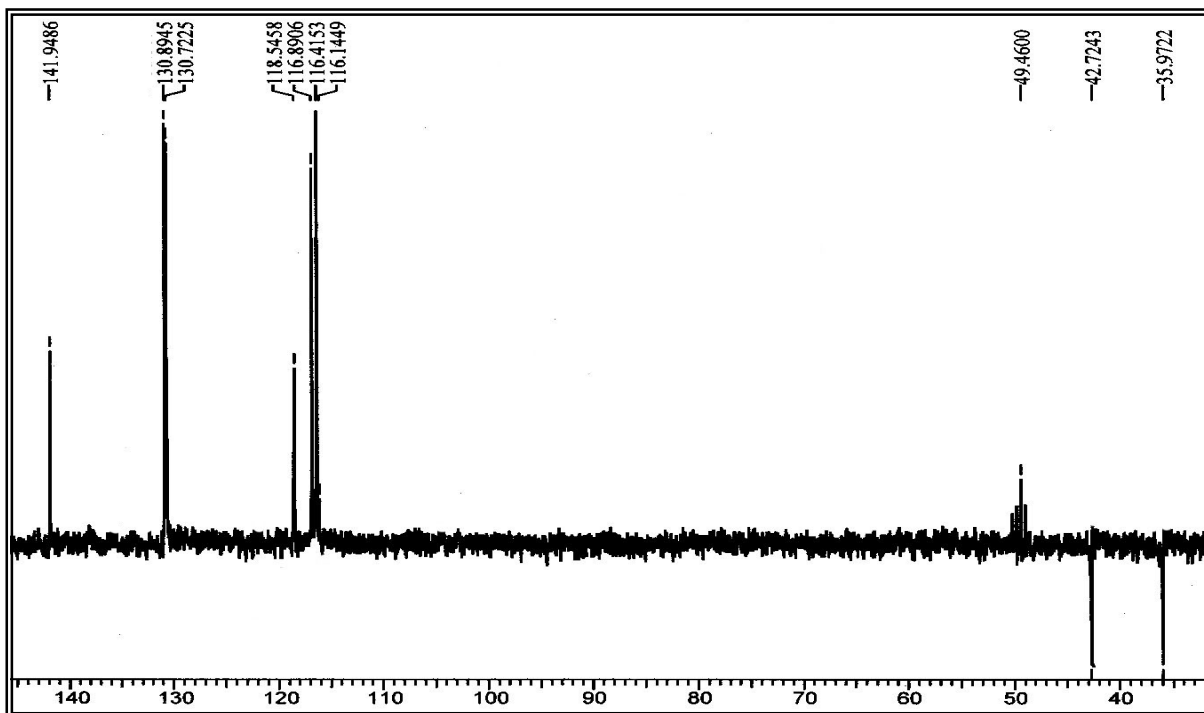


FIGURA 3.130 – Espectro de DEPT 135° da mistura das amidas **Ri-29** e **Ri-30** (50 MHz, CD_3OD).

3.3. Atividade tripanocida dos extratos brutos e substâncias puras sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*

A análise dos testes dos extratos brutos das folhas de *Galipea bracteata* e dos galhos de *Ravenia infelix*, mostra de uma forma generalizada uma baixa atividade dos extratos no modelo testado, com exceção do extrato GbFE (extrato em éter de petróleo das folhas de *Galipea bracteata*), que apresentou uma % de lise parasitária de 100% (Tab. 3.38). Todas as substâncias isoladas das frações dos extratos de *G. bracteata* e *R. infelix* foram testadas, onde também de uma forma generalizada, apresentaram uma baixa atividade biológica (Tab. 3.39). Entretanto, a substância **Gb-8-9** apresentou a melhor atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (95% de lise do parasita a 500 µg/mL), mas também apresentou 100% de lise das hemácias.

TABELA 3.38 – Resultados dos ensaios biológicos “*in vitro*” dos extratos brutos de *Galipea bracteata* e *Ravenia infelix* sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.

Espécie	Parte da planta	Solvente de extração	Sigla	% de lise parasitária
<i>Galipea bracteata</i>	Folhas	Éter de petróleo	GbFE	100,0
<i>Galipea bracteata</i>	Folhas	Diclorometano	GbFD	35,2
<i>Galipea bracteata</i>	Folhas	Metanol	GbFM	34,1
<i>Ravenia infelix</i>	Galhos	Metanol	RiGM	45,4
<i>Ravenia infelix</i>	Galhos	Diclorometano	RiGDM	36,7
<i>Ravenia infelix</i>	Galhos	Acetato de etila	RiGAM	5,9
<i>Ravenia infelix</i>	Galhos	Hidroalcoólico	RiGHAM	10,9

TABELA 3.39 – Atividade tripanocida das substâncias isoladas de *Galipea bracteata* e *Ravenia infelix* sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.

Substâncias	Concentração (mg/mL)	Lise (%)
Gb-9-1	0,100	7,57
	0,250	7,57
	0,500	12,12
Gb-6-2	0,100	6,06
	0,250	6,06
	0,500	15,15
Gb-9-3	0,100	20,27
	0,250	31,95
	0,500	43,64
Gb-9-4 + Gb-9-5	0,100	25,09
	0,250	25,77
	0,500	38,83
Gb-9-6 + Gb-9-7 + Gb-9-8	0,100	19,10
	0,250	20,90
	0,500	40,0
Gb-8-9	0,100	7,57
	0,250	26,77
	0,500	95,0
Gb-8-10	0,100	6,06
	0,250	21,21
	0,500	22,22
Gb-10-11	0,100	5,56
	0,250	22,22
	0,500	46,46
Gb-10-11 + Gb-10-12	0,100	13,75
	0,250	46,05
	0,500	70,79
Gb-10-13	0,100	2,41
	0,250	12,03
	0,500	21,64
Gb-15-14	0,100	9,53
	0,250	12,44
	0,500	19,16
Gb-18-15	0,100	15,52
	0,250	19,25
	0,500	21,72
Gb-19-16 + Gb-19-17	0,100	10,65
	0,250	29,21
	0,500	28,51
Gb-20-18	0,100	2,06
	0,250	14,43
	0,500	18,90
Gb-5/6-19	0,100	2,01
	0,250	3,41
	0,500	10,12

Gb-5/6-20	0,100	15,15
	0,250	12,12
	0,500	20,21
Gb-5/6-21	0,100	7,49
	0,250	8,51
	0,500	13,21
Ri-22	0,100	12,97
	0,250	23,66
	0,500	31,29
Ri-23	0,100	3,49
	0,250	6,32
	0,500	7,27
Ri-24 + Ri-25	0,100	3,44
	0,250	8,93
	0,500	17,52
Ri-26	0,100	14,09
	0,250	14,09
	0,500	17,53
Ri-27 + Ri-28	0,100	6,13
	0,250	8,33
	0,500	9,25
Ri-29 + Ri-30	0,100	4,81
	0,250	5,15
	0,500	10,30

3.4. Atividade tripanocida das substâncias puras na inibição da atividade da enzima TcGAPDH

De acordo com a tabela 3.40, nenhuma substância testada apresentou atividade tripanocida, através da inibição da atividade da enzima TcGAPDH. Algumas substâncias não foram testadas por não haver quantidade suficiente de material.

TABELA 3.40 – Atividade tripanocida das substâncias isoladas de *G. bracteata* e *R. infelix* na inibição da atividade da enzima GAPDH de *T. cruzi*.

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Inibição da Enzima (%)
Gb-9-1	100	8,2
Gb-6-2	100	5,6
Gb-9-3	-	NT
Gb-9-4 + Gb-9-5	-	NT
Gb-9-6 + Gb-9-7 + Gb-9-8	100	13,1
Gb-8-9	100	2,8
Gb-8-10	100	5,2
Gb-10-11	100	6,7
Gb-10-11 + Gb-10-12	100	7,3
Gb-10-13	-	NT
Gb-15-14	100	9,3
Gb-18-15	-	NT
Gb-19-16 + Gb-19-17	-	NT
Gb-20-18	-	NT
Gb-5/6-19	-	NT
Gb-5/6-20	100	3,8
Gb-5/6-21	-	NT
Ri-22	100	10,3
Ri-23	-	NT
Ri-24 + Ri-25	100	3,5
Ri-26	100	2,1
Ri-27 + Ri-28	100	5,3
Ri-29 + Ri-30	100	2,5

NT – Não Testada

3.5. Atividade leishmanicida das substâncias puras na inibição da atividade da enzima APRT de *Leishmania tarantolae*

De acordo com a tabela 3.41, nenhuma substância testada apresentou atividade leishmanicida, através da inibição da atividade da enzima APRT. Algumas substâncias não foram testadas por não haver quantidade suficiente de material.

TABELA 3.41 – Atividade leishmanicida das substâncias isoladas de *G. bracteata* e *R. infelix* na inibição da atividade da enzima APRT de *L. tarantolae*.

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Inibição da Enzima (%)
Gb-9-1	50	8,9
	25	3,2
Gb-6-2	50	41,9
	25	34,6
Gb-9-3	-	NT
Gb-9-4 + Gb-9-5	-	NT
Gb-9-6 + Gb-9-7 + Gb-9-8	50	3,2
Gb-8-9	50	15,3
	25	19,1
Gb-8-10	50	7,1
Gb-10-11	50	7,7
	25	3,9
Gb-10-11 + Gb-10-12	50	5,6
Gb-10-13	-	NT
Gb-15-14	50	7,3
Gb-18-15	-	NT
Gb-19-16 + Gb-19-17	-	NT
Gb-20-18	-	NT
Gb-5/6-19	-	NT
Gb-5/6-20	50	20,6
Gb-5/6-21	-	NT
Ri-22	50	31,8
Ri-23	-	NT
Ri-24 + Ri-25	50	7,11
Ri-26	50	5,03
Ri-27 + Ri-28	50	6,90
Ri-29 + Ri-30	50	3,30

NT – Não Testada

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÕES

- ✓ O estudo fitoquímico das folhas de *Galipea bracteata* levou ao isolamento de seis alcalóides quinolínicos já descritos: 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)quinolina, 2-n-pentil-4-metoxiquinolina, 2-n-heptil-4-metoxiquinolina, 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-4-metoxiquinolina, 2-n-propil-4-metoxiquinolina, 2-n-pentilquinolina e sete alcalóides quinolínicos que estão sendo descritos pela primeira vez na literatura: 2-(propan-1'-ona)-4-metoxiquinolina, 2-(1',2'-*trans*-epoxipentil)-4-metoxiquinolina, 2-(1',2'-*trans*-epoxipentil)quinolina, 2-(1',2'-*trans*-epoxipropil)-4-metoxiquinolina, 2-(propan-1'-ona)quinolina, 2-(pentan-1'-ona)-4-metoxiquinolina e 2-(pentan-1'-ona)quinolina; mistura dos esteróides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, um alcalóide furoquinolínicos evolitrina, uma mistura de alcalóides seco furoquinolínicos *E* e *Z*-rhoifolinato de dimetila, o triterpeno pentacíclico arborinol e o norsesquiterpeno 3,5-diidromegastigma-6,7-dieno-9-ona;
- ✓ O estudo fitoquímico dos galhos de *R. infelix* resultou no isolamento dos alcalóides carbazóis: 3-metilcarbazol e girinimbina, os esteróides: 7-oxo-estigmasterol e 7-oxo- β -sitosterol, o indol: indol-3-carboxaldeído e misturas das amidas *N-trans* e *N-cis*-feruloiltiramina e *N-trans-p* e *N-cis-p*-cumaroiltiramina, todos inéditos para o gênero;
- ✓ Nenhuma substância isolada apresentou atividade tripanocida nos modelos experimentais "*in vitro*" sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* e inibição enzimática sobre a Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase de *T. cruzi* (TcGAPDH);
- ✓ Nenhuma substância isolada apresentou atividade leishmanicida no modelo experimental de inibição enzimática "*in vitro*" sobre a APRT (Adenina-fosforribosil-transferase) de *Leishmania tarantolae*.

BIBLIOGRAFIA

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. "Recent Advances in the Fight Against Leishmaniasis with Natural Products". *Parasite*, **6**: 3-6, 1999.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. "Revisão Taxonômica das Rutaceae do Estado do Amazonas". *Acta Amazônica*, **6**(3)supl.: 1-67, 1976.
- ARRUDA, M. S. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. & PIRANI, J. R. "Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A New Secofuroquinoline Alkaloid". *Bioch. Syst. Ecol.*, **20**(2): 173-178, 1992.
- BAKHTIAR, A.; GLEYE, J.; MOULIS, C.; FOURASTÉ, I. & STANISLAS, E. "C-Glycosylflavones from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **29**(4): 1339-1340, 1990.
- BAKHTIAR, A.; GLEYE, J.; MOULIS, C. & FOURASTÉ, I. "O-Glycosyl-C-Glycosylflavones from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **35**(6): 1593-1594, 1994.
- BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C. & ORDÓÑEZ, D. "The Pharmacology of Leishmaniasis". *Gen. Pharmac.*, **30**(4): 435-443, 1998.
- BARBOSA, V. M. & NAKANO, M. "Muscle D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas sp* 1. Purification and Properties of the Enzyme". *Comp. Biochem. Physiol. B*, **88**(2): 563-568, 1987.
- BHATTACHARYYA, P. & CHOWDHURY, B. K. "Ravesilone, a Quinolone Alkaloid from *Ravenia spectabilis*". *Phytochemistry*, **23**(8): 1825-1826, 1984.
- BLUNT, J. W. & MUNRO, M. H. G. "Carbon-13 NMR Spectra of Some Tetra- and Pentacyclic Triterpene Methyl Ethers". *Org. Magn. Reson.*, **13**(1): 26-27, 1980.
- BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S. & LOPES, M. N. "Search for Antifungal and Anticancer Compounds from Native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest". *An. Acad. Bras. Ci.*, **71**(2): 181-186, 1999.
- BRENER, Z. "Therapeutic Activity and Criterion of Cure on Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Inst. Med. São Paulo*, **4**: 389-396, 1962.
- CANESIN, M. F. & BARRETO, A. C. P. "Tratamento Etiológico da Doença de Chagas: Mito ou Realidade?". *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, **7**(2): 233-239, 1997.
- CENEPE/FNS – Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 4ª ed. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1996. cap. 5.
- CHAGAS, C. "Nova Tripanosomíase Humana. Estudos sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., Agente Etiológico de Nova Entidade Mórbida do Homem". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **1**: 159-218, 1909.

- CHAKRABARTY, M., NATH, A. C., KHASNOBIS, S., CHAKRABARTY, M., KONDA, Y., HARIGAYA, Y. & KOMYAMA, K. "Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii*". *Phytochemistry*, 46(4): 751-755, 1997.
- CHAN-BACAB, M. J., PEÑA-RODRÍGUEZ, M. "Plant Natural Products with Leishmanicidal Activity". *Nat. Prod. Rep.*, **18**: 674-688, 2001.
- CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; YEN, H. F. & WU, Y. C. "Amides from Stems of *Annona cherimola*". *Phytochemistry*, **49**(5): 1443-1447, 1998.
- CRAGG, G. C.; NEWMAN, D. J. & SNADER, K. M. "Natural Products in Drug Discovery and Development". *J. Nat. Prod.*, **60**: 52-60, 1997.
- DE CASTRO, S. L. "The Challenge of Chagas' Disease Chemotherapy: an Update of Drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*". *Acta Tropica*, **53**: 83-98, 1993.
- DE CASTRO, S. L.; SANTA-RITA, R. M. & LAMAS, M. E. "Quimioterapia Experimental". In: Doença de Chagas: Manual de Experimentação Animal. ARAÚJO-JORGE, T. C. & DE CASTRO, S. L. (Orgs.). Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2000. p. 111-121.
- DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. "Controle da Transmissão Transfusional da Doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **34**(4): 373-383, 1998.
- DIAS, B. F. S. *A Implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: Desafios e Oportunidades*. Campinas: André Tosello, 1996. p. 10.
- DOBSON, A. P. *Conservation and Biodiversity*. New York: Scientific American Library, 1996. p. 264.
- ELIAS, T. S. "Notes on the Genus *Galipea* (Rutaceae) in Central America". *J. Arnold Arb.*, **51**: 427-430, 1970.
- ENGLER, A. *Syllabus der Pflanzenfamilien*. 12^a ed. Berlim, Bornträger, 1964. p.262.
- EVIDENTE, A. "Isolation of Indole-3-Aldehyde from *Pseudomonas syringae* PV. Savastanoi". *J. Nat. Prod.*, **49**(5): 938-939, 1986.
- 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**: 2116-2118, 1989.
- FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P. & BRUNETON, J. "Les Chimanimines, Nouvelles Quinoléines Substituées en 2, Isolées d'une Plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea longiflora*". *J. Nat. Prod.*, **56**(9): 1547-1552, 1993a.

- FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. & BRUNETON, J. "2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs". *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**(4): 859-863, 1993b.
- FOURNET, A.; GANTIER, J. C.; GAUTHERET, A.; LEYSALLES, L.; MUNOS, M. H.; MAYRARGUE, J.; MOSKOWITZ, H.; CAVÉ, A. & HOCQUEMILLER, R. "The Activity of 2-Substituted Quinoline Alkaloids in BALB/c Mice Infected with *Leishmania donovani*". *J. Antimicrob. Chemother.*, **33**: 537-544, 1994a.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P. & BRUNETON, J. "Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis". *Phytother. Res.*, **8**: 174-178, 1994b.
- 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**: 285-286, 1996.
- GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R. & TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, 1996. p. 17.
- GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G. & BRAZ, R. F. "Fitoconstituíntes Químicos Isolados de *Jathropa elliptica*, Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Carbono e de Hidrogênio dos Diterpenos Jatrolonas A e B". *Quím. Nova*, **16**(2): 95-100, 1993.
- GRECA, M. D.; MONACO, P. & PREVITERA, L. "Stigmasterols from *Typha latifolia*". *J. Nat. Prod.*, **53**(6): 1430-1435, 1990.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; DOS REIS, M. S. & SCHIMIDT, W. "Agriculture, Biodiversity and Appropriate Biotechnologies in Brazil". *An. Acad. Bras. Ci.*, **50**(6): 408-416, 1998.
- HASHIMOTO, T.; TORI, M. & ASAKAWA, Y. "Piscicidal Sterol Acylglucosides from *Edgeworthia chrysantha*". *Phytochemistry*, **30**(9): 2927-2931, 1991.
- HOUGHTON, P. J.; WOLDEMARIAM, T. Z.; WATANABE, Y. & YATES, M. "Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of Alkaloid Constituents of Angostura Bark, *Galipea officinalis*". *Planta Medica*, **65**: 250-254, 1999.
- HU, J. F.; SCHETZ, J. A.; KELLY, M.; PENG, J. N.; ANG, K. K. H.; FLOTOW, H.; LEONG, C. Y.; NG, S. B.; BUSS, A. D.; WILKINS, S. P. & HAMANN, M. T. "New Antiinfective and Human 5-HT₂ Receptor Binding Natural and Semisynthetic Compounds from the Jamaica Sponge *Smenospongia aurea*". *J. Nat. Prod.*, **65**(4): 476-480, 2002.
- JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHE, S.; FABRE, N.; FOURASTÉ, I. & MOULIS, C. "Two Tetrahydroquinoline Alkaloids from *Galipea officinalis*". *Phytochemistry*, **51**: 1167-1169, 1999.

- JACQUEMOND-COLLET, I.; BESSIÈRE, J. M.; HANNEDOUCHE, S.; BERTRAND, C.; FOURASTÉ, I. & MOULIS, C. "Identification of the Alkaloids of *Galipea officinalis* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry" *Phytochemical Analysis*, **12**: 312-319, 2001.
- JANSEN, A. M.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P. S.; MARCHEWSKI, R. S.; MANGIA, R. H. R.; CUPOLILLO, E. & FERNANDES, O. "A Ecologia e a Complexidade dos Ciclos de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* na Natureza". In: Doença de Chagas: Manual de Experimentação Animal. ARAÚJO-JORGE, T. C. & DE CASTRO, S. L. (Orgs.). Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2000. p. 33-38.
- JARDIM, A.; BERGESON, S. E.; SHIH, S.; CARTER, N.; LUCAS, R. W.; MERLIN, G.; MYLER, P. J.; STUART, K. & ULLMAN, B. "Xanthine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani* – Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and Genetic Analysis". *J. Biol. Chem.*, **274**(48): 34403-34410, 1999.
- KALLUNKI, J. A. & PIRANI, J. R. "Synopsis of *Angostura* Roem. & Schult. And *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae)". *Kew Bulletin*, **53**(2): 256-334, 1998.
- KIM, W. G.; LEE, I. K.; KIM, J. P.; RYOO, I. J.; KOSHINO, H. & YOO, I. D. "New Indole Derivatives with Free Radical Scavenging Activity from *Agrocybe cylindracea*". *J. Nat. Prod.*, **60**(7): 721-723, 1997.
- KONG, Y. C.; CHENG, K. F.; NG, K. H.; BUT, P. P. H.; LI, Q.; YU, S. X.; CHANG, H. T.; CAMBIE, R. C.; KINOSHITA, T.; KAN, W. S. & WATERMAN, P. G. "A Chemotaxonomic Division of *Murraya* Based on the Distribution of the Alkaloids Yuehchukene and Girinimbine". *Bioch. Syst. Ecol.*, **14**(5): 491-497, 1986.
- LAEMMLI, U. K. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- LEWIS, J. R. "Biological Activity of Some Rutaceous Compounds". IN: Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). London, Academic Press, 1983, p. 301-318.
- LÓPEZ, J. A. & BARILLAS, W. "Granulosin, a New Chromone from *Galipea granulosa*". *J. Nat. Prod.*, **60**: 24-26, 1997.
- LÓPEZ, J. A.; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; MARTÍN, G. E.; LIN, F.; AL-REHAILY, A. J.; ZEMAITIS, M. A. & SCHIFF, JR., P. L. "Galiposin: A New β -Hydroxychalcone from *Galipea granulosa*". *Planta Medica*, **64**: 76-77, 1998.
- MAFEZOLI, J. "Atividade Tripanocida e Antimicrobiana de Plantas da Família Rutaceae". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002. Tese de Doutorado, 240 p.
- MAHATO, S. B. & KUNDU, A. P. "¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features". *Phytochemistry*, **37**(6): 1517-1575, 1994.

- McKAY, M. J.; CARROLL, A. R.; QUINN, R. J. & HOOPER, J. N. A. "1,2-Bis(1H-Indol-3-yl)Ethane-1,2-Dione, An Indole Alkaloid from the Marine Sponge *Smenospongia* sp.". *J. Nat. Prod.*, **65**(4): 595-597, 2002.
- MENEZES, A. C. S. Atividade Inseticida e Tripanocida de *Trichilia casaretti* e *Azadirachta indica*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002. Tese de Doutorado, 177 p.
- MESTER, I. "Structural Diversity and Distribution of Alkaloids in the Rutales". IN: "Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales". WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). London, Academic Press, 1983. p. 31-95.
- MIYASE, T.; UENO, A.; TAKIZAWA, N.; KOBAYASHI, H. & KARASAWA, H. "Studies on the Glycosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. Var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. I". *Chem. Pharm. Bull.*, **35**(3): 1109-1117, 1987.
- MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de Soluções, Reagentes & Solventes: Padronização, Preparação e Purificação. 2ª ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1972.
- NUSSENSWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; DE FREITAS, J. L. P.; NETO, V. A. & KLOETZEL, J. "Ação dos Corantes Tri-Fenil-Metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* da Moléstia de Chagas por Transfusão de Sangue". *O Hospital*, **44**(6): 25-42, 1953.
- OLEA, R. S. G. & ROQUE, N. F. "Análise de Misturas de Triterpenos por RMN de ^{13}C ". *Quím. Nova*, **13**(4): 278-281, 1990.
- OPPERDOES, F. R. "Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes". *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**: 127-151, 1987.
- PAUL, B. D. & BOSE, P. K. "Quinolone Alkaloids from *Ravenia spectabilis* Engl.". *Indian J. Chem.*, **7**: 678-680, 1969.
- PAUL, B. D. & BOSE, P. K. "New Quinolone Alkaloids from *Ravenia spectabilis* Engl.". *J. Indian Chem. Soc.*, **45**(6): 552, 1968.
- PETTIT, G. R.; NUMATA, A.; CRAGG, G. M.; HERALD, D. L.; TAKADA, T.; IWAMOTO, C.; RIESEN, R.; SCHMIDT, J. M.; DOUBEK, D. L. & GOSWAMI, A. "Isolation and Structures of Schleicherastatins 1-7 and Schleicheols 1 and 2 from the Teak Forest Medicinal Tree *Schleichera oleosa*". *J. Nat. Prod.*, **63**(1): 72-78, 2000.
- PINTO, C. N.; QUINTAS, L. E. M.; VAHIA-LOUREIRO, A. M. & CORRÊA, A. D. "Bases da Quimioprofilaxia na Enfermidade de Chagas". *J. B. M.*, **70**(5): 140-145, 1996.
- PHILLIPSON, J. D. & WRIGHT, C. W. "Antiprotozoal Agents from Plants Sources". *Planta Med.*, **57**, Suppl. I: S53-S59, 1991.

- PIRANI, J. R. *A Ordem Rutales na Serra do Cipó*, Minas Gerais, Brasil. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Biologia – USP, 1982. Dissertação de Mestrado, 120 p.
- PUSSET, J.; LOPEZ, J. L. & PAIS, M. “Isolation and 2D NMR Studies of Alkaloids from *Comptonella sessifoliola*”. *Planta Med.*, **57**: 153-155, 1991.
- 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**: 762-763, 1998.
- RATES, S. M. K. “Plants as Source of Drugs”. *Toxicon*, **39**: 603-613, 2001.
- RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N. & MARZAL, P. C. “Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte”. *Quim. Nova*, **26**(4), 550-555, 2003.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDLE, M. K. & TYLER, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 337.
- RODRIGUES, F. E. Constituintes Químicos de *Picrolemma granatensis*, *Simarouba tulae* e *Simaba cuneata* (Simaroubaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1992. Tese de Doutorado, 221 p.
- SARKER, S. D.; BARTHOLOMEW, B. & NASH, R. J. “Alkaloids from *Balanites aegyptiaca*”. *Fitoterapia*, **71**: 328-330, 2000.
- SEPÚLVEDA-BOZA, S. & CASSELS, B. K. “Plant Metabolites Active against *Trypanosoma cruzi*”. *Planta Med.*, **62**: 98-105, 1996.
- SHIRAGA, Y.; OKANO, K.; AKIRA, T.; FUKAYA, C.; YOKOYAMA, K.; TANAKA, S.; FUKUI, H. & TABATA, M. “Structures of Potent Antiulcerogenic Compounds from *Cinnmomum cassia*”. *Tetrahedron*, **44**(15): 4703-4711, 1988.
- SOEJARTO, D. D. “Biodiversity Prospecting and Benefit Sharing: Perspectives from the Field”. *J. Ethnopharmacol.*, **51**: 1-15, 1996.
- SOUZA, D. H. F.; GARRAT, 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**: 131-135, 1998.
- STOPPANI, A. O. M. “Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas”. *Medicina*, **59**, Supl. II: 147-165, 1999.
- THIEMANN, O. H.; ALFONZO, J. D. & SIMPSON, L. “Cloning and Characterization of *Leishmania tarantolae* Adenine Phosphoribosyltransferase”. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **95**(1): 141-146, 1998.

- TUTTLE, J. V.; KRENISTSKY, T. A. "Purine Phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*". *J. Biol. Chem.*, **255**(3): 909-916, 1980.
- ULUBELEN, A.; TOPCU, G. & KAYA, Ü. "Steroidal Compounds from *Teucrium chamaedrys* Subsp. *Chamaedrys*". *Phytochemistry*, **36**(1): 171-173, 1994.
- UMEYAMA, A.; ADACHI, K.; ITO, S. & ARIHARA, S. "New 24-Isopropylcholesterol and 24-Isopropenylcholesterol Sulfate from the Marine Sponge *Epipolasis* Species". *J. Nat. Prod.*, **63**(8): 1175-1177, 2000.
- VIEIRA, P. C. & KUBO, I. "Molluscicidal Quinoline Alkaloids from *Galipea bracteata*". *Phytochemistry*, **29**(3): 813-815, 1990.
- WALL, M. E. & WANI, M. C. "Camptothecin and Taxol: from Discovery to Clinic". *J. Ethnopharmacol.*, **51**: 239-254, 1996.
- WATERMAN, P. G. "Alkaloids of the Rutaceae: their Distribution and Systematic Significance". *Bioch. Syst. Ecol.*, **3**: 149, 1975.
- WATERMAN, P. G. "The Chemical Systematics of Alkaloids: A Review Emphasizing the Contribution of Robert Hegnauer". *Bioch. Syst. Ecol.*, **27**: 395-406, 1999.
- WHO – World Health Organization. "Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials", Geneva. 1992.
- WILKINS, A. L.; BIRD, P. W. & JAGER, P. M. "Carbon-13 NMR Study of Some Triterpene Hydrocarbons of the Hopane Group". *Magn. Reson. Chem.*, **25**: 503-507, 1987.
- WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J. L. & TEIXEIRA, A. R. L. "Attitudes Towards Chagas' Disease in an Endemic Brazilian Community". *Cad. Saúde Publ.*, **15**(1): 7-13, 1999.
- WIRASUTISNA, K. R.; GLEYE, J.; MOULIS, C.; STANILAS, E. & MORETTI, C. "Galipein, a Coumarin from *Galipea trifoliata*". *Phytochemistry*, **26**(12): 3372, 1987.