



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE *Waltheria douradinha* Saint Hilaire**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa Gressler

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE *Waltheria douradinha*
Saint Hilaire**

por

Vanessa Gressler

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS – Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Waltheria douradinha Saint Hilaire**

elaborada por

Vanessa Gressler

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel - UFSM
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Ionara Irion Dalcol - UFSM

Prof^a. Dr^a. Mara Elisa Fortes Braibante - UFSM

Santa Maria, 31 de julho de 2006.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu mais sincero agradecimento e admiração. Meu muito obrigado pela sua orientação, confiança, paciência e amizade.

Aos meus amados pais Claudio e Nadir, irmã Andrea, e avó Elcita dedico esta dissertação pelo amor, carinho, incentivo e confiança.

Dedico também essa dissertação aos meus avós Kurt e Helga (*in memoriam*), onde quer que estejam, tenho certeza que sempre estarão torcendo por mim e aplaudindo as minhas conquistas.

Ao meu noivo Ricardo, pelo seu amor, amizade, compreensão, companheirismo e por sempre acreditar em nosso futuro.

AMO MUITO TODOS VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à Universidade Federal de Santa Maria e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, pelo auxílio financeiro e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Ademir Farias Morel e Dr^a. Ionara I. Dalcol, pelo ensino, incentivo, apoio, orientação e co-orientação.

Ao Prof. Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias, pela amizade, apoio e fundamentais ensinamentos durante minha Iniciação Científica.

Ao Prof. Dr. Robert A. Brown pelo auxílio e amizade.

Aos colegas, ex-colegas e amigos do laboratório: Adari, Álvaro, Anderson, Cláudia, Carolina, Caroline, Euclésio, Graciane, Graciela, Irene, Juliano, Luciana, Marcelo, Sandro, Suziane, Ubiratan, Veridiana, Vinicius e Wellington (*in memoriam*) pela amizade, auxílio e companheirismo durante estes anos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Waltheria douradinha* Saint Hilaire

Autora: Vanessa Gressler

Orientador: Ademir Farias Morel

Espécies nativas da flora do Sul do Brasil são alvo de pesquisa do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria. Uma das famílias mais estudadas é a Sterculiaceae e, dentro desta, encontra-se a espécie *Waltheria douradinha* Saint Hilaire, objetivo de estudo deste trabalho de mestrado.

W. douradinha, conhecida popularmente como “douradinha do campo”, é utilizada no tratamento de afecções pulmonares, cistite, úlceras crônicas e também para lavar feridas de origem sifilítica.

Metabólitos secundários foram isolados da casca da raiz desta espécie, dentre eles a amida (O)-metiltembamida, três alcalóides quinolônicos já conhecidos, Antidesmona, Waltheriona-A e Waltheriona-B, dois alcalóides ciclopeptídicos também já conhecidos, Waltherina-A e Chamaedrina, e um novo alcalóide quinolônico VG8. As estruturas destas substâncias foram determinadas, principalmente, por métodos espectroscópicos, como Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C (COSY, HMQC e HMBC), espectrometria de massas e através da comparação dos dados obtidos a partir do ponto de fusão e dados da literatura.

Os alcalóides Waltheriona-A (WA) e Waltheriona-B (WB) foram cristalizados e analisados por Difração de Raios-X a fim de se confirmar suas estereoquímicas relativas.

Os extratos obtidos das várias partes da espécie, as frações obtidas do particionamento do extrato bruto da raiz do material vegetal e os alcalóides puros, Waltherina-A, VG8, WA, WB e seus derivados foram submetidos a ensaios

microbiológicos (fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) pelo método de bioautografia e Concentração Inibitória Mínima (CIM). O alcalóide VG8 apresentou-se mais ativo frente aos microrganismos testados, com resultado positivo de inibição com 0,5 μg pelo método de bioautografia e de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método da CIM.

Palavras-chave: *Waltheria douradinha*, alcalóides quinolônicos e ciclopeptídicos, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Post-Graduate Program of Chemistry
Federal University of Santa Maria

PHYTOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY STUDY OF *Waltheria douradinha* Saint Hilaire

Author: Vanessa Gressler

Academic Advisor: Ademir Farias Morel

Native species of the flora from South Brazil are the aim of the research of the Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais of Federal University of Santa Maria, Brazil. One of the most studied families is the Sterculiaceae and, in that family, there is the *Waltheria douradinha* Saint Hilaire specie, study purpose of this master degree work.

W. douradinha, popularly known as “douradinha do campo”, is used to treat lung infections, cystitis, chronic ulcer and to wash syphilitic wounds.

Secondary metabolites isolated from the bark of the roots from this specie, among the amide (O)-metiltembamide, three known quinolone alkaloids, Antidesmone, Waltherione-A and Waltherione-B, two cyclopeptide alkaloids also known, Waltherine-A and Chamaedrine, and a new quinolone alkaloid VG8. The structures of these substances are determined, principally, by spectroscopics methods, like Nuclear Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C (COSY, HMQC e HMBC), mass spectrometry and by the comparison with melting point and literature data.

The alkaloids Waltherione-A (WA) and Waltherione-B (WB) are crystallized and analyzed by X-Ray Diffraction to determine their relative stereochemistries.

The extracts obtained from several parts of *W. douradinha*, the fractions obtained from the division of the crude extract of the root and the pure alkaloids, Waltherine-A, VG8, WA, WB and their derivatives were submitted to microbiologic assays (fungus and Gram-positive and Gram-negative bacteria) by bioautography

method and by Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The alkaloid VG8 was the most active upon the tested microorganisms, with a positive result of inhibition with 0.5 μg by bioautography assay and with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by MIC assay.

Keywords: *Waltheria douradinha*, quinolone and cyclopeptide alkaloids, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Waltheria douradinha</i>	3
Figura 2 -	Fracionamento do material vegetal seco	19
Figura 3 -	Aplicação da cromatoplaça com as amostras em placa de Petri para realização de bioautografia	26
Figura 4 -	Método de diluição utilizado na determinação de CIM	27
Figura 5 -	Redução do DPPH	29
Figura 6 -	Estrutura química da Antidesmona	32
Figura 7 -	Estrutura química da (<i>O</i>)-metiltembamida	34
Figura 8 -	Espectro de RMN de ¹ H de (<i>O</i>)-metiltembamida em CDCl ₃ a 400,13 MHz e 25°C	35
Figura 9 -	Espectro de RMN de ¹ H expandido (região aromática) de (<i>O</i>)-metiltembamida em CDCl ₃ a 400,13 MHz e 25°C	35
Figura 10 -	Espectro de RMN de ¹ H expandido (região de δ 3,20 a 4,40 ppm) de (<i>O</i>)-metiltembamida em CDCl ₃ a 400,13 MHz e 25°C	36
Figura 11 -	Espectro de RMN de ¹³ C de (<i>O</i>)-metiltembamida em CDCl ₃ a 400,13 MHz e 25°C	37
Figura 12 -	Estrutura da (<i>O</i>)-metiltembamida obtida por Difração de Raios-X	37
Figura 13 -	Waltherina-A	39
Figura 14 -	Estrutura química básica de Waltheriona-A e -B	40
Figura 15 -	Espectro de RMN de COSY de Waltheriona-A em CDCl ₃ a 400,13 MHz e 25°C.	41
Figura 16 -	Espectro de RMN de COSY de Waltheriona-B em CDCl ₃ a 400,13 MHz e 50°C	42
Figura 17 -	Espectro de massas de a alta resolução de Waltheriona-B (340 a 500 <i>m/z</i>)	43
Figura 18 -	Espectro de massas de a alta resolução de Waltheriona-B (100 a 1300 <i>m/z</i>)	43
Figura 19 -	Waltheriona-A e -B derivatizadas	45

Figura 20 -	Comparação dos espectros de RMN de ^1H a) WA, (CDCl_3 , 400 MHz, 25 °C); b) WAp1 (CDCl_3 , 200 MHz, 25 °C) e c) WAp2 (CDCl_3 , 200 MHz, 25 °C)	46
Figura 21 -	Comparação dos espectros de RMN de ^1H a) WB, (CDCl_3 , 400 MHz, 25 °C); b) WBp1 (CDCl_3 , 200 MHz, 25 °C) e c) WBp2 (CDCl_3 , 200 MHz, 25 °C)	47
Figura 22 -	Estrutura da Waltheriona-A obtida através de Difração de Raios-X	48
Figura 23 -	Alcalóide Waltheiona-A e sua estereoquímica	48
Figura 24 -	Estrutura do produto mais polar obtido da reação de metilação de Waltheriona-B obtida por Difração de Raios-X ..	49
Figura 25 -	Alcalóide Waltheiona-B e sua estereoquímica	49
Figura 26 -	Estrutura do produto menos polar obtido da reação de metilação de Waltheriona-A obtida por Difração de Raios-X ..	50
Figura 27 -	Estrutura de Antidesmona (a) e estrutura proposta para o alcalóide VG8 (b)	53
Figura 28 -	Espectro de massas de VG8 (300 a 375 m/z)	53
Figura 29 -	Espectro de massas de VG8 (100 a 1000 m/z)	54
Figura 30 -	Espectro de RMN de ^1H de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	55
Figura 31 -	Espectro de RMN de COSY ^1H - ^1H expandido (região de campo alto) de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	56
Figura 32 -	Espectro de RMN de COSY ^1H - ^1H de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	57
Figura 33 -	Espectro de RMN de ^{13}C de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	58
Figura 34 -	Espectro de RMN de ^{13}C expandido (região de campo alto) de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	59
Figura 35 -	Espectro de RMN HMQC de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	60
Figura 36 -	Espectro de RMN 2D HMQC expandido (região de campo alto) de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C	61
Figura 37 -	Estrutura química de Chamaedrina	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frações reunidas após comparação por CCD da coluna etérea básica da raiz de <i>W. douradinha</i>	21
Tabela 2 -	Microrganismos Indicadores	24
Tabela 3 -	Rendimentos das frações obtidas do extrato bruto de <i>Waltheria douradinha</i> Staint Hilaire	30
Tabela 4 -	Resultados dos ensaios de bioautografia dos extratos brutos e frações da raiz.....	31
Tabela 5 -	Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C obtidos com os da literatura referente ao alcalóide Antidesmona	33
Tabela 6 -	Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana obtidos pelo método de bioautografia de <i>Waltheria</i> -A e -B	51
Tabela 7 -	Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana obtidos pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de WA, WAp1, WAp2, WB, WBp1 e WBp2	52
Tabela 8 -	Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C do alcalóide Antidesmona com VG8	62
Tabela 9 -	Resultados obtidos dos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia de VG8	63
Tabela 10 -	Resultados obtidos dos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de VG8	64
Tabela 11 -	Dados cristalográficos e de distinção estrutural de RB_AM_V13	75
Tabela 12 -	Dados cristalográficos e de distinção estrutural de AM V61 ...	77
Tabela 13 -	Dados cristalográficos e de distinção estrutural de VG_WBp2	79
Tabela 14 -	Dados cristalográficos e de distinção estrutural de VG_WAp1	81

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

St. Hil.	Saint Hilaire
Sin.	Sinônimo
MHz	Mega Hertz
AGP	Angiosperm Phylogeny Group
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TMS	Tetrametilsilano
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
v	Volume
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda
EM	Espectrometria de Massa
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
°C	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
FDA	Food and Drug Administration
MTT	Metiltiazol tetrazóleo
INT	<i>p</i> -iodo tetrazóleo
TTC	Cloreto de trifetil tetrazóleo
QSA	Quantidade de Substância Ativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CLM	Concentração Letal Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima

UFC	Unidade Formadora de Colônia
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
FH	Fração hexânica neutra
FEA	Fração etérea ácida
FEB	Fração etérea básica
FAB	Fração acetato básica
NA	Não ativo
Rf	Fator de retenção
δ	Deslocamento químico
ppm	Partes por milhão
P.F.	Ponto de fusão
s	Singleto
d	Dubleto
t	Tripleto
$[\alpha]_D^{25}$	Rotação ótica a 25 °C
m/z	Relação massa/carga

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 ALCALÓIDES QUINOLÔNICOS	5
3.1.1 Estrutura química das 4(1H)-quinolonas	5
3.1.2 Mecanismo de Ação	6
3.1.3 Farmacologia	7
3.1.4 Ocorrência e isolamento de 4(1H)-quinolonas de espécies naturais....	7
3.2 ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS	10
3.2.1 Estrutura química geral dos ciclopeptídicos	10
3.2.2 Farmacologia	11
3.2.3 Ocorrência e isolamento de alcalóides ciclopeptídicos de espécies naturais da família Sterculiaceae	11
3.3 OUTROS ESTUDOS SOBRE O GÊNERO <i>Waltheria</i>	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 INSTRUMENTOS UTILIZADOS	15
4.1.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	15
4.1.2 Espectrômetro de Massas	15
4.1.3 Espectrômetro de Difração de Raios-X	15
4.1.4 Aparelho de Ponto de Fusão	15
4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS	16
4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC)	16

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Preparativa (CCDP)	16
4.3 REAGENTES E MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADOS	16
4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE <i>Waltheria douradinha</i> Saint Hilaire	17
4.5 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO	17
4.6 ANÁLISES DAS FRAÇÕES OBTIDAS	19
4.6.1 Fração Hexânica Neutra	19
4.6.1.1 Substâncias isoladas e identificadas	20
4.6.1.1.1 Antidesmona (6)	20
4.6.1.1.2 (O)-metiltembamida (7)	20
4.6.2 Fração Etérea Básica	20
4.6.2.1 Substâncias isoladas e identificadas	22
4.6.2.1.1 Waltherina-A (13)	22
4.6.2.1.2 Waltheriona-A (23)	22
4.6.2.1.3 Waltheriona-B (25)	22
4.6.2.1.4 VG8 (27b)	23
4.6.2.1.5 Chamaedrina (37)	23
4.7 DERIVATIZAÇÃO DOS ALCALÓIDES WALTHERIONA-A E WALTHERIONA-B POR REAÇÃO DE METILAÇÃO	23
4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	24
4.8.1 Método de bioautografia	24
4.8.1.1 Meios de cultura empregados	25
4.8.1.2 Método de determinação da atividade - Quantidade de Substância Ativa (QSA) por bioautografia	25
4.8.2 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição ...	26
4.8.2.1 Meios de cultura empregados	26
4.8.2.2 Método de determinação da atividade	27
4.8.3 Método da Concentração Letal Mínima (CLM)	28
4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
4.9.1 Método do Radical Livre DPPH	28
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	30
5.1 Análise dos rendimentos de fracionamentos e extratos obtidos do material vegetal coletado	30

5.2 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz, caule, folha e flor e das frações obtidas da raiz da planta	31
5.3 Atividade antioxidante dos extratos brutos da raiz, caule, folha e flor e das frações obtidas da raiz da planta	31
5.4 Metabólitos isolados da fração hexânica neutra	32
5.4.1 Alcalóide Antidesmona	32
5.4.2 (O)-metiltembamida	33
5.4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	34
5.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C	36
5.4.2.3 Análise de Difração de Raios-X	37
5.4.2.5 Atividade antimicrobiana e antioxidante	38
5.4.2.6 Dados apresentados na literatura	38
5.5 Metabólitos isolados da fração etérea básica	38
5.5.1 Waltherina-A	38
5.5.1.1 Atividade antimicrobiana	39
5.5.2 Waltheriona -A e Waltheriona -B	39
5.5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e COSY ^1H - ^1H	40
5.5.2.2 Espectrometria de massas	42
5.5.2.3 Reação de Metilação de Waltheriona-A e -B	44
5.5.2.4 Análise de RMN de ^1H	45
5.5.2.4 Análise de Difração de Raios-X	47
5.5.2.5 Atividade antimicrobiana	50
5.5.2.6 Atividade antioxidante	52
5.5.3 Alcalóide VG8	52
5.5.3.1 Espectrometria de massas	53
5.5.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	55
5.5.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H - ^1H (COSY)	55
5.5.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C	57
5.5.3.5 Ressonância Magnética Nuclear ^1H - ^{13}C (HMQC)	59
5.5.3.6 Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H de Antidesmona com o alcalóide isolado VG8	62
5.5.3.7 Atividade antimicrobiana	63
5.5.3.8 Atividade antioxidante	64

5.5.4 Chamaedrina	65
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

Encontram-se registros de que o homem pré-histórico já fazia uso de plantas na cura, tratamento e prevenção de doenças, e esses conhecimentos subsistiram durante milênios, aprofundando-se e diversificando-se, sem nunca caírem totalmente no esquecimento.^{1,2}

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta, fundamentalmente, influências da cultura indígena, africana e européia. Os índios utilizavam a fitoterapia dentro de uma visão mística e também pela observação de animais que procuravam determinadas plantas quando doentes. Os negros africanos utilizavam o exorcismo e o uso de drogas, trazidas da África, a fim de expulsar o espírito mau causador de suas doenças. A influência européia teve início no Brasil com a vinda dos primeiros padres com a finalidade de catequizar os índios e assim trouxeram ervas medicinais as quais se reproduziram espontaneamente no solo brasileiro e formando, em alguns casos, variedades distintas.²

É bem provável que das 200.000 espécies vegetais que existiam no Brasil pelo menos a metade deve ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas nem 1% dessas espécies com potencial foi estudada adequadamente quanto a suas propriedades medicinais.²

Estes dados tornam-se significantes na demonstração da importância das plantas medicinais e também serve como estímulo a sua investigação. Em vista disso, o grupo de pesquisa orientado pelo Prof. Dr. Ademir Farias Morel, desde 1985, tem estudado espécies brasileiras, especialmente as nativas do Rio Grande do Sul as quais, através da cultura popular, apresentam propriedades medicinais.

Uma das famílias estudadas é a Sterculiaceae, que compreende cerca de 68 gêneros e 1100 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 11 gêneros e 115 espécies.³

Dentro dessa família encontra-se a espécie vegetal *Waltheria douradinha* Saint Hilaire (Figura 1), conhecida popularmente como douradinha-do-campo ou douradinha. Ocorre principalmente em terrenos pedregosos e arenosos e é nativa na Argentina, no Paraguai e no Brasil, sendo que no solo brasileiro é encontrada de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul.^{4,5,6}

Essa espécie apresenta-se como subarbusto perene de 20 - 50 cm de altura, com raiz bem desenvolvida, profunda e rugosa. Seus ramos são eretos ou

decumbentes com folhas simples e com nervuras sulcadas na face superior. Suas inflorescências apresentam-se na forma de glomérulos pubescentes e densos, predominantemente terminais de cor amarelo-ouro.⁴⁻⁶

Existem, principalmente nos cerrados e nos campos, outras espécies deste gênero com características e propriedades semelhantes, das quais destacam-se: *Waltheria indica* L. (sin.: *Waltheria americana* L.), *Waltheria communis* A. St. Hil e *Waltheria viscosissima* St. Hil. Algumas dessas espécies, crescem espontaneamente em lavouras agrícolas perenes, beira de estradas, pastagens e terrenos baldios, sendo consideradas “plantas daninhas”.⁵ A espécie *W. indica* é encontrada principalmente nas Filipinas e é usada como febrífuga, emoliente, anti-rábica anti-sifilítica e purgativa. Investigações químicas mostram que essa planta produz alcalóides peptídicos, flavonóides, flavonóides glicosilados e ácido cafeico, sendo que os flavonóides apresentam atividade antifúngica.^{7,8} *W. communis*, encontra-se naturalmente na Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais e Rio Grande do Sul e é indicada como estimulante, antidesintérica, emética, diurética, contra catarro brônquico, cistites e blenorragias.⁴ Já a *W. viscosissima* cresce abundantemente no nordeste brasileiro e é conhecida como malva branca e malva viscosa. Essa espécie apresenta atividades expectorantes, antitussígenas e hipertensiva. Estudos fitoquímicos dos extratos da planta demonstraram a presença de triterpenos/esteróides, compostos polifenólicos e saponinas, mas não alcalóides.⁹

A *Waltheria douradinha* é amplamente empregada na medicina caseira como estimulante, emética, sulfurítica e diurética. É indicada contra disenteria, catarro-brônquico, afecções pulmonares, blenorragia e cistite. A tintura das cascas é utilizada como tônico cardíaco e as cascas dos ramos e folhas são consideradas diuréticas e hipotensoras. As folhas em infusão são utilizadas internamente contra afecções pulmonares, tosse e bronquite e externamente é depurativa e emoliente, sendo assim usada para lavar feridas sifilíticas e combater úlceras crônicas.⁵



Figura 1 - *Waltheria douradinha*

Na literatura há poucos registros de pesquisas efetuadas com a espécie *Waltheria douradinha* St. Hil.. Em vista disso, há aproximadamente dez anos¹⁰⁻¹⁴ esta espécie vem sendo estudada pelo Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria. Por ser uma espécie pouco estudada e sabendo-se que há a necessidade de conhecer novas substâncias que possam ser utilizadas como medicamento, houve a continuação dos estudos a fim de ampliar o conhecimento fitoquímico e biológico que comprovem o seu uso na medicina popular.

2. OBJETIVOS

O trabalho realizado com a espécie *Waltheria douradinha* Saint Hilaire tem como principais objetivos:

- a) Efetuar a extração, separação e purificação de substâncias químicas da raiz da planta;
- b) Identificar estruturalmente os metabólitos isolados, utilizando-se de dados da literatura e da aplicação de técnicas como: Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais;
- c) Isolar os alcalóides Waltheriona-A e Waltheriona-B e determinar suas estereoquímicas por Difração de Raios-X;
- d) Isolar o alcalóide Waltherina-A para posterior realização de testes para verificar atividade antimicrobiana e antioxidante;
- e) Realizar ensaios biológicos de atividade antimicrobiana e atividade antioxidante dos extratos, das frações e das substâncias isoladas neste trabalho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família Sterculiaceae pertence à Divisão das Angiospermas, classe das Dicotiledôneas. Segundo o APG (Angiosperm Phylogeny Group), as espécies desta família fazem parte da família Malvaceae, mas de acordo com sistemas de classificação tradicionais, Sterculiaceae é uma família independente.¹¹

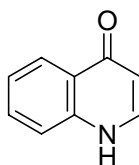
As espécies pertencentes à família Sterculiaceae são ricas em metabólitos secundários como flavonóides⁷, triterpenos, compostos polifenólicos, saponinas⁹, alcalóides^{11-14,16-23}, entre outros, mas têm despertado interesse de pesquisadores principalmente por apresentarem significativamente alcalóides do tipo quinolonas e ciclopeptídicos. A espécie *Waltheria douradinha* também apresenta estas características, sendo de importância para a medicina, e portando, alvo deste estudo.

3.1 ALCALÓIDES QUINOLÔNICOS

3.1.1 Estrutura química das 4(1H)-quinolonas

A primeira quinolona antimicrobiana, o ácido nalixídico, foi descoberta em 1962 por Leshner e colaboradores²⁴ como uma impureza da produção de um lote de agente antimalariano. Esta apresentou então atividade bactericida frente a microrganismos Gram-negativos, passando a ser comercializada posteriormente. A descoberta de novas quinolonas fez com que esse grupo de substâncias passasse a ser de elevada importância por apresentar amplo espectro antimicrobiano.^{25,26}

São conhecidos vários grupos de quinolonas, cada um deles caracterizado por sua estrutura básica, onde a 4(1H)-quinolona (1) representa uma destas estruturas.²⁵



(1)

Esta estrutura básica consiste na presença de um átomo de nitrogênio como heteroátomo de um heterociclo aromático. Apresenta também um grupo cetona na posição 4 da molécula.²⁷

Segundo o estudo realizado por Zufiaurre-Gutiérrez e colaboradores²⁶, desde 1980 chegam a mais de 10.000 o número de moléculas sintetizadas derivadas das estruturas básicas pertencentes ao grupo das quinolonas.

3.1.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo de como as quinolonas exercem sua ação ainda é motivo de muitas discussões. De modo geral, esta ação pode ocorrer por:

- a) penetração do composto no citoplasma celular;
- b) inibição da DNA-girase bacteriana;
- c) inibição na síntese de replicação do DNA;
- d) indução de uma reação de alarme e efeitos deletéreos sobre a estrutura celular e bioquímica da bactéria.

Como primeiro requisito para que um antibiótico exerça sua ação bactericida, é a penetração deste no citoplasma bacteriano, seja por difusão passiva ou transporte ativo. Após, o alvo das quinolonas é a enzima DNA-girase, também conhecida como topoisomerase II, enzima reguladora do reagrupamento e enrolamento do DNA e como consequência a formação de novas cadeias. Como a ação das quinolonas é a inibição desta enzima, gera quebras no DNA bacteriano e assim um efeito bactericida.

Uma característica das 4-quinolonas é produzir na bactéria a chamada reação de alarme (reação de resposta), a qual consiste na indução de uma síntese no DNA e inibição da divisão celular sobre toda a filamentação. Uma vez produzida esta reação, o que decide a recuperação ou a destruição da célula é a concentração e o tempo de exposição do DNA ao agente tóxico. É comprovado que todas as 4-quinolonas podem desencadear esta reação seguida de morte celular e assim uma efetiva ação bactericida.²⁸

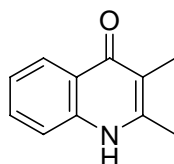
3.1.3 Farmacologia

As quinolonas apresentam amplo espectro bactericida (enterobactérias e bacilos Gram-negativos), além disso, apresentam moderada atividade sobre formas trypomastigotas (cepas Y) de *Trypanosoma cruzi*²⁹. Sua absorção no trato gastrointestinal é boa, a distribuição é excelente e apresenta uma baixa incidência de reações adversas. Sendo assim, seu uso é recomendado em infecções urinárias, enfermidades de transmissão sexual, infecções respiratórias, infecções gastrointestinais, infecções cutâneas entre outros.²⁸

3.1.4 Ocorrência e isolamento de 4(1H)-quinolonas de espécies naturais

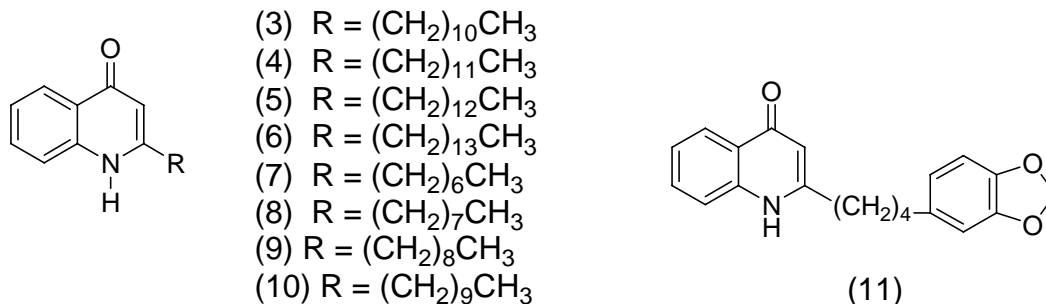
Isolamentos de alcalóides quinolônicos são registrados principalmente em espécies pertencentes às famílias Rutaceae e Sterculiaceae.

O trabalho de Werni e colaboradores³⁰, de 1963, mostra o isolamento do alcalóide 2,3-dimetil-4(1H)-quinolona (2) da espécie *Platydesma campanulata* Mann (Rutaceae).

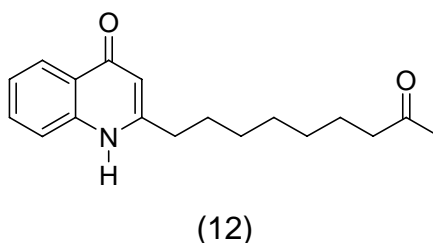


(2)

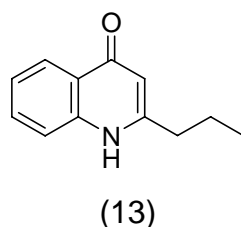
Ainda da família Rutaceae, de outro gênero, *Ruta*, foram isolados outros alcalóides 4(1H)-quinolônicos. Da espécie *Ruta graveolens*, há registros das seguintes estruturas: 2-undecil-4(1H)-quinolona (3), 2-n-dodecil-4(1H)-quinolona (4), 2-n-tridecanil-4(1H)quinolona (5), 2-n-tetradecanil-4(1H)quinolona (6)³¹, 2- 2-heptil-4(1H)-quinolona (7), 2-octil-4(1H)-quinolona (8), 2-nonil-4(1H)-quinolona (9), n-decil-4(1H)-quinolona (10).³² Desta mesma espécie, estudos realizados por Oliva e colaboradores, em 2003, determinaram a seguinte estrutura: 2-[4'-(3'',4''-metilendioxifenil)butil]-4-quinolona (11).³³



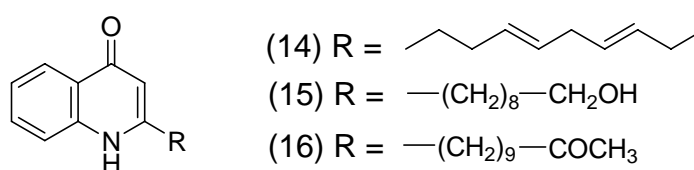
Já de *R. montana*, foi isolado por Touati e colaboradores³⁴, em 2000, outro metabólito pertencente à classe das 4(1H)-quinolonas, o 2-(nonan-8-ona)-(1H)-4-quinolona (12).



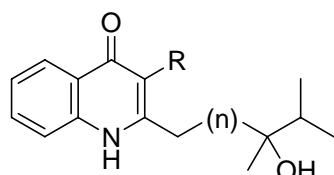
Boronia ternata Endl., também pertencente à família Rutaceae, mostrou o 2-n-propil-4-quinolona (13) como constituinte³⁵ e a *Boronia lanceolata* F. Muell., apresentou o 2,3-dimetil-4(1H)quinolona³⁶ (2).



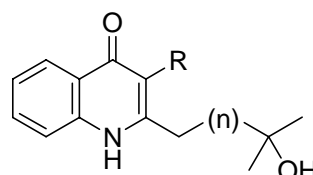
Kan-Fan e colaboradores³⁷, em 1970, relataram o isolamento de cinco alcalóides da espécie *Vepris ampody* (Rutaceae), apresentando três destes inéditos. São eles: o 2-n-(3',6'-nonadieno)-4-quinolona (14), o 2-n-(9'-nonanol)-4-quinolona (15) e o 2-n-(10-undecanona)-4-quinolona (16).



Da espécie *Dictyoloma vandellianum* (Rutaceae), foi isolado em 2003 por Sartor e colaboradores³⁸ quatro novos alcalóides, o 2-(14'-hidroxi-14',15'-dimetilhexadecanil)-4-quinolona (17) e o 2-(12'-hidroxi-12'-metiltridecanil)-3-metoxi-4-quinolona (18), 2-(12'-hidroxi-12'-metildecanil)-4-quinolona (19) e 2-(14'-hidroxi-14',15'-dimetilhexadecanil)-3-metoxi-4-quinolona (20).

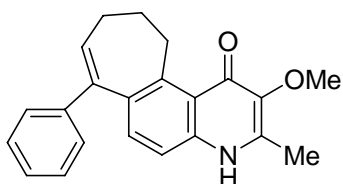


n = 12
 (17) R = H
 (20) R = OMe

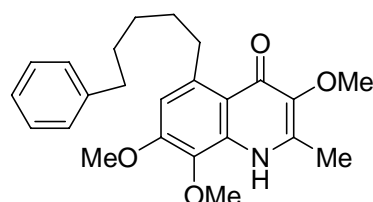


n = 10
 (18) R = OMe
 (19) R = H

A ocorrência desta classe de metabólitos na família Sterculiaceae foi registrada por Kapadia e colaboradores¹⁶ com o isolamento da Melochinona (21) da espécie *Melochia tomentosa* L.. Em seqüência, em 1978, Kapadia e colaboradores isolaram outra quinolona denominada Melovinona¹⁷ (22) a qual é considerada um análogo de cadeia aberta da melochinona.

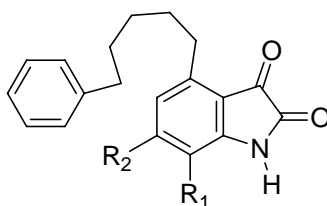


(21)



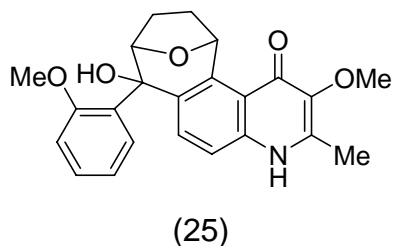
(22)

Os autores descreveram em 1980 o isolamento e caracterização de alcalóides da classe isatina¹⁸, a Melosatina-A (23) e Melosatina-B (24).



(23) R₁ = R₂ = OMe (24) R₁ = R₂ = H

Especificamente do gênero *Waltheria*, somente há registro de um alcalóide 4(1H)-quinolona isolado. Este, por sua vez, foi obtido da espécie *W. douradinha* St. Hil., o qual foi publicado pelo nosso grupo de pesquisa em 2005, denominado de Waltheriona-A (25). Neste trabalho também foi observado que o metabólito não apresenta atividade antimicrobiana frente às cepas testadas.¹²

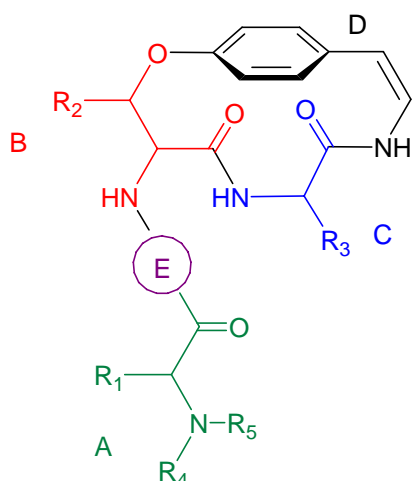


3.2 ALCALÓIDES CICLOPEPTÍDICOS

3.2.1 Estrutura química geral dos ciclopeptídicos

Esta classe de substâncias normalmente está presente na composição de várias espécies vegetais das mais variadas famílias, como Rhamnaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Urticaceae, Sterculiaceae entre outras.^{39,40}

São definidos como substâncias básicas de estrutura num sistema tipo ansa na qual estão ligados 10 ou 12 tipos de peptídios nas posições 1,3 ou 1,4 do anel benzênico.³⁹ Estas substâncias possuem em sua estrutura aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (-CONH-).⁴¹ Sua estrutura básica está representada a seguir (26).³⁹



A = aminoácido terminal
 B = β -hidroxi aminoácido
 C = aminoácido ligado ao anel
 D = unidade hidroxi estirilamina
 E = algumas vezes, entre as unidades A e B está presente um aminoácido adicional (intermediário)

(26)

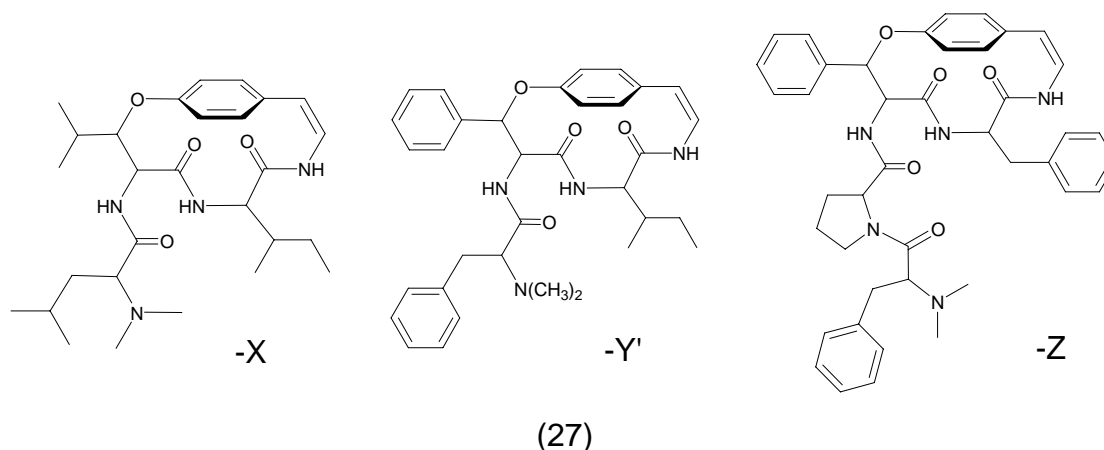
Os alcalóides ciclopeptídicos são classificados de acordo com o número de átomos que fazem parte do macrociclo, formando um anel de treze, catorze ou quinze membros, sendo o de catorze membros o mais representativo.⁴²

3.2.2 Farmacologia

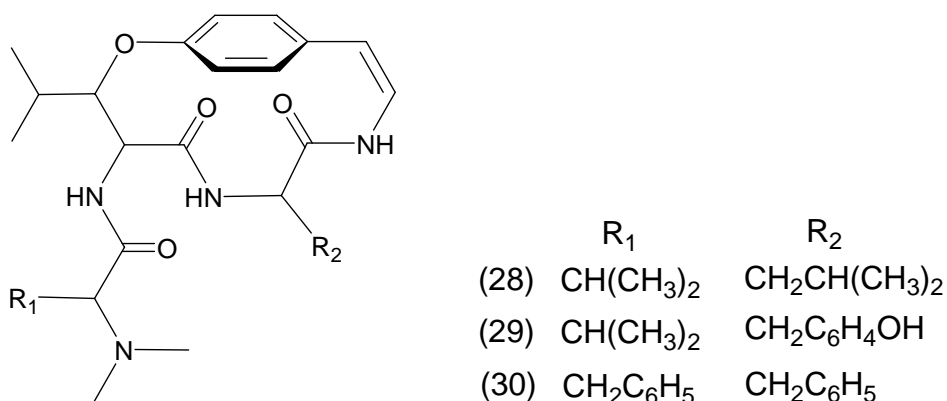
Os alcalóides ciclopeptídicos apresentam diferentes ações farmacológicas como hipotensivas, antidiarréicas, antidesintéricas, antifúngicas, antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas⁴³, antiplasmódica e atividade imunoestimulante.^{44,39} Apesar disto, nenhum dos alcalóides isolados até o momento é potente o suficiente para o desenvolvimento de um fármaco.⁴⁰

3.2.3 Ocorrência e isolamento de alcalóides ciclopeptídicos de espécies naturais da família Sterculiaceae

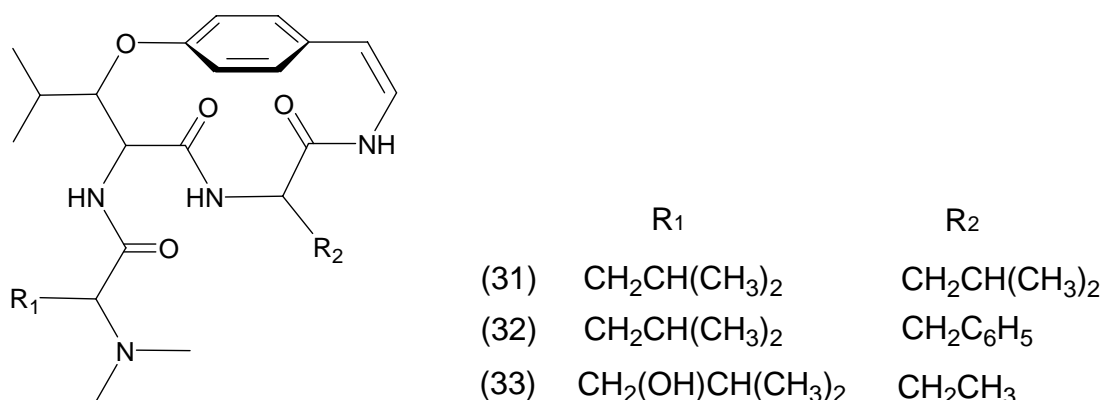
Os autores País, Mainil e Goutarel descreveram, em 1963, o isolamento dos alcalóides Adouetina-X, -Y e -Z da espécie *Waltheria americana*¹⁹ (27). As Adouetinas -Y e -Z também foram isoladas das espécies *Melochia corchorifolia* e *M. pyramidata*.^{20,21}



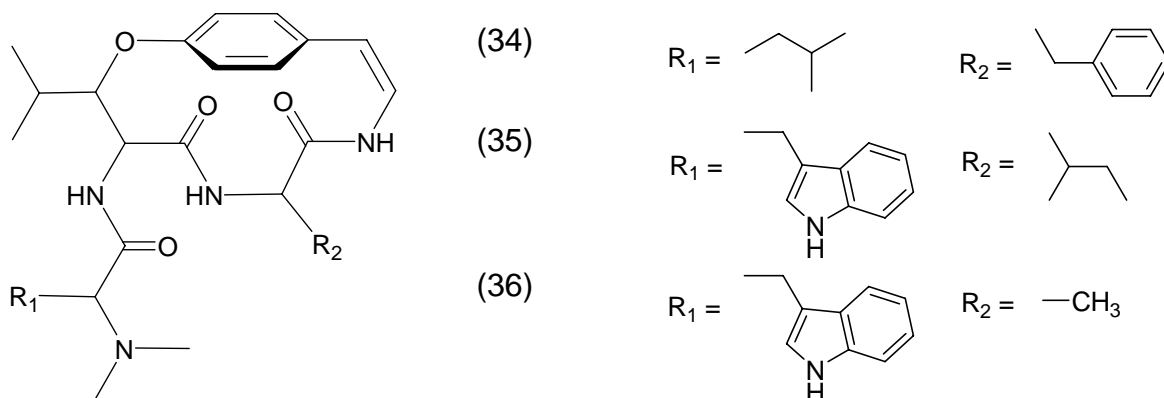
Em 1977, Kapadia e colaboradores detalharam o isolamento e a caracterização de três alcalóides ciclopeptídicos: Scutianina-B (28) e Melonovinas-A e -B (29 e 30 respectivamente). Estes metabólitos foram obtidos da espécie *Melochia tomentosa*.²²



Da espécie *Melochia corchorifolia*, Bhakuni e colaboradores²³, em 1987, isolaram três alcalóides ciclopeptídicos das partes aéreas da planta. Os alcalóides isolados são: Franganina (31), Frangufolina (32), e Melofolina (33).

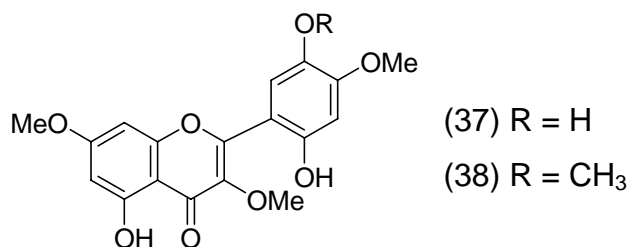


Morel e colaboradores publicaram dois trabalhos em 1999 de isolamento de alcalóides ciclopeptídicos da espécie *Waltheria douradinha*. Dentre eles, Scutianina-B (28), Adouetina-Y' (27)¹³ e Waltherina-A, -B e -C (34, 35 e 36 respectivamente)^{13,14}.



3.3 OUTROS ESTUDOS SOBRE O GÊNERO *Waltheria*

Da espécie *Waltheria americana*, encontram-se estudos publicados de atividade antifúngica referentes a flavonóides isolados. Em 1997, Ragasa e colaboradores⁷ descreveram o isolamento e caracterização dos flavonóides 3,2',5'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (37) comumente chamado de Oxianina-A e 5,2'-dihidroxi-3,7,4',5'-tetrametoxiflavona (38). A Oxianina-A apresentou atividade frente ao fungo parasita *Trichophyton mentagrophytes* (que vive na pele, causando várias dermatomicoses e infecções cutâneas) em concentrações de 5, 10 e 15 μg , e de 20, 25 e 30 μg para a bactéria *C. albicans*. O flavonóide 39 também apresentou atividade frente ao fungo *T. mentagrophytes* (15, 20, 25 e 30 μg), mas também mostrou-se ativo para a bactéria *Aspergillus niger* (causadora de aspergiloses).



A fração butanólica do extrato bruto (etanólico) das partes aéreas de *W. viscosíssima* mostrou-se ativa frente a ensaios cardiovasculares. Atividade hipotensiva (decréscimo da pressão arterial) seguida de bradicardia (redução dos batimentos cardíacos) foram verificados.⁹

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

4.1.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os aparelhos utilizados para a obtenção dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H foram o Espectrômetro Bruker DPX 200 e o Espectrômetro Bruker DPX 400. Estes operam a 200,13 MHz para ^1H e 50,32 MHz para ^{13}C e 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C , respectivamente.

Os tubos de ressonância utilizados para as análises foram de 5 mm e o solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna.

4.1.2 Espectrômetro de Massas

Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução (HRESIME), foi utilizado o aparelho Bruker BioApex 70 eV Spectromether, do Instituto de Bioquímica, Halle-Saale, Alemanha.

4.1.3 Espectrômetro de Difração de Raios-X

As medidas cristalográficas foram feitas por medidas de Difração de Raios-X em aparelho Bruker X8 Kappa-Apex II CCD empregando radiação $\text{Mo K}\alpha$ do Departamento de Química da UFSM. Os programas utilizados para o refinamento e resolução das estruturas foram SHELXS-97, SHELXL-97 e ROTAX-2001.

4.1.4 Aparelho de Ponto de Fusão

Foi utilizado o aparelho MQAPF-301 Digital da Micro Química com termômetro não aferido.

4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS

4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC)

Utilizou-se uma diversidade de dimensões de colunas de vidro e sílica-gel 60 (Merck), 70-230 e 230-400 mesh como suporte sólido.

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Preparativa (CCDP)

Foram empregadas cromatofolhas Al de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck e Sorbent Technologies). Ainda utilizaram-se placas preparadas em laboratório com sílica gel PF₂₅₄ (Merck) sobre lâminas de vidro (2 x 7 cm).

Foram utilizadas também placas preparadas em laboratório, placas preparativas (CCDP), que consistiram de lâminas de vidro (20 x 20 cm) cobertas de sílica gel PF₂₅₄ (Merck) numa espessura de 0,75 mm.

4.3 REAGENTES E MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADOS

Os solventes e reagentes utilizados foram produtos de grau analítico Merck e Vetec e a relação que apresenta os principais sistemas de solventes utilizados nas técnicas cromatográficas de separação são:

Hexano/Acetona (60:40 v/v);

Hexano/Acetona (1:1 v/v);

Hexano (100%);

Hexano/Acetato de Etila (98:2 v/v);

Hexano/Acetato de Etila (95:5 v/v);

Hexano/Acetato de Etila (90:10 v/v);

Hexano/Acetato de Etila (80:20 v/v);

Hexano/Acetato de Etila (60:40 v/v);

Hexano/Acetato de Etila (1:1 v/v);

Hexano/Acetato de Etila (Gradiente de Polaridade);

Éter diisopropílico/Metanol (95:5 v/v);

CHCl₃ (100%);

CHCl₃/Metanol (99:1);
CHCl₃/Metanol (95:5);
CH₂Cl₂ (100%);
CH₂Cl₂/Metanol (99,5:0,5 v/v);
CH₂Cl₂/Metanol (98:2 v/v)
CH₂Cl₂/Metanol (95:5 v/v);
CH₂Cl₂/Metanol (90:10 v/v);
CH₂Cl₂/Metanol (Gradiente de Polaridade).

Para a revelação das cromatoplasmas foi utilizada irradiação com lâmpada de ultravioleta nos comprimentos de onda de $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm (Spectroline), borrifamento de reativo de Dragendorff modificado segundo Munier e Macheboenf⁴⁵, borrifamento de solução de ácido sulfúrico e etanol (5:95 v/v) seguido de aquecimento em chapa quente e reagente de Ehrlich específico para grupamentos indólicos⁴⁶.

Métodos mais específicos como Espectrometria de Massas (EM), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais com as técnicas de DEPT, COSY, HMBC, HMQC, NOESY, e Difração de Raios-X foram de fundamental importância na identificação e caracterização estrutural dos metabólitos isolados.

4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Waltheria douradinha* Saint Hilaire

A espécie *Waltehrria douradinha* Saint Hilaire foi coletada no município de São Pedro do Sul – RS em abril de 2004 e em fevereiro de 2005, sendo identificada no Departamento de Biologia da UFSM e uma exsicata foi depositada no herbário SMDB n° 8073.

4.5 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

Do material coletado, foi separada a casca da raiz e posteriormente lavada em água corrente para a retirada do solo remanescente e seca em estufa de ar

circulante a 25°C por três dias. O material seco foi moído em moinho de faca rotativa, tipo Wiley, obtendo-se 4,040 kg.

O pó da casca da raiz foi submetido à extração exaustiva com metanol a quente, seguido da eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida e obteve-se aproximadamente 1,470 kg de um líquido de cor avermelhada denominado de extrato bruto metanólico.

O extrato bruto foi dissolvido em água e posteriormente suspenso em hexano em pH neutro numa proporção de 1:1 e foram efetuadas várias extrações a fim de remover principalmente as gorduras e demais substâncias apolares presentes. Ao solvente retirado da extração, foi adicionado sulfato de sódio anidro sendo este posteriormente filtrado em papel filtro e em seguida evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Deste fracionamento obteve-se a fração hexânica neutra.

A solução aquosa remanescente foi acidificada com ácido clorídrico (HCl) 2N até pH~2 e após efetuou-se sucessivas extrações com éter etílico até este apresentar-se incolor. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório obtendo-se a fração etérea ácida.

Após, a fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônia (NH₄OH) até pH~9 e efetuada extração exaustiva com os solventes éter etílico e acetato de etila nessa ordem, obtendo-se as frações etérea básica e acetato básica.

O fracionamento do material vegetal seco está esquematizado na Figura 2.

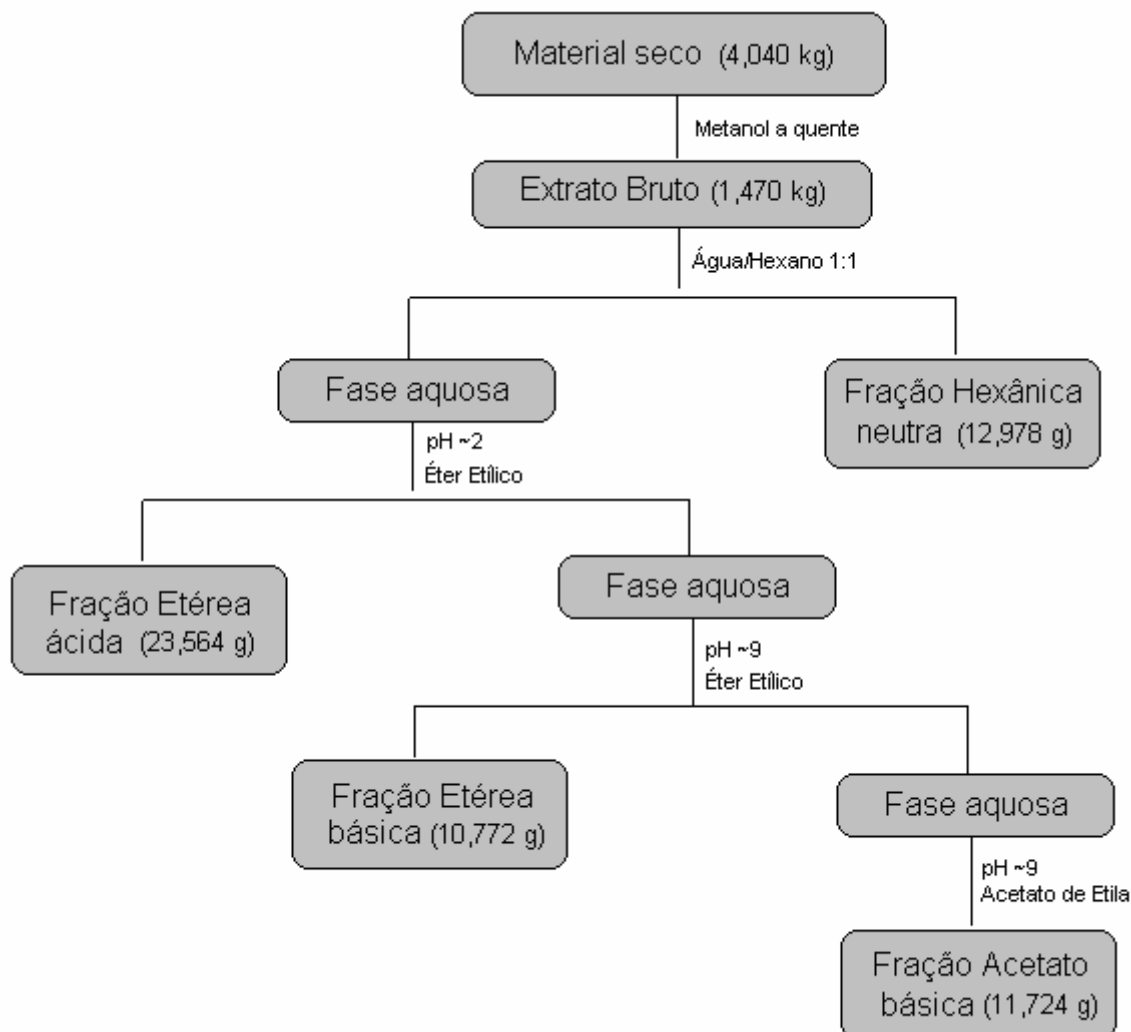


Figura 2 – Fracionamento do material vegetal seco

4.6 ANÁLISES DAS FRAÇÕES OBTIDAS

4.6.1 Fração Hexânica Neutra

A fração hexânica neutra (12,978 g) foi primeiramente analisada por CCD, lâmpada de UV (254 e 365 nm) e reativo de Dragendorff. Detectou-se por estes métodos a presença de vários alcalóides. A fração foi então cromatografada em coluna utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh) como suporte sólido e hexano e acetato de etila num gradiente crescente de polaridade como eluente. Desta coluna, obtiveram-se 68 subfrações.

4.6.1.1 Substâncias isoladas e identificadas

4.6.1.1.1 Antidesmona (Figura 6)

As subfrações 9-17 da coluna, por apresentarem similaridade em CCD, foram reunidas em um balão, o solvente eliminado por rotaevaporação, resultando em um resíduo escuro (1,103g). Análise por CCD deste resíduo mostrou, após revelação com reagente de Dragendorff, a presença, em pequena quantidade, de uma substância que reagia positivamente com este reagente. A fração foi novamente submetida a uma separação em coluna cromatográfica, e as frações semipurificadas contendo a substância alvo, foram reunidas e novamente submetida a purificação, desta vez, através de placas preparativas (CCDP). Para isso, utilizou-se diclorometano e metanol (95:5 v/v) como sistema eluente. O alcalóide foi facilmente detectado devido à absorção de irradiação UV num comprimento de onda de 365 nm e por apresentar resultado positivo com o reagente de Dragendorff. Sua pureza foi confirmada por CCD em vários sistemas de solvente e também por RMN de ^1H e ^{13}C (pág. 32).

4.6.1.1.2 (O)-metiltembamida (Figura 7)

Esta substância foi obtida das frações 18-21 da coluna da fração hexânica. O isolamento desta substância foi possível por placa preparativa usando-se o hexano e acetato de etila (80:20 v/v) como eluente. A detecção do composto foi facilitada por este absorver radiação UV no comprimento de onda de 365 nm e por revelar-se positivo com o reagente de Dragendorff. Sua pureza foi confirmada por CCD em vários sistemas de solvente e também por RMN de ^1H e ^{13}C (pág. 33).

4.6.2 Fração Etérea Básica

A fração etérea básica (10,772 g) foi analisada por CCD, lâmpada de UV (254 e 365 nm) e reativo de Dragendorff e observou-se a presença de vários alcalóides. Em vista disso, a fração foi então cromatografada em coluna utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) como suporte sólido e diclorometano e metanol num gradiente crescente de polaridade como eluente. Desta coluna foram obtidas 455 alíquotas de

200 mL as quais foram rotaevaporadas e reunidas por semelhança de Rfs resultando em 22 subfrações.

Tabela 1 – Frações reunidas obtidas após comparação por CCD da fração etérea básica da raiz de *W. douradinha*.

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 8	CH ₂ Cl ₂ (100)	Mistura de substâncias
II – 9 a 24	CH ₂ Cl ₂ (100)	Mistura de substâncias
III – 25 a 36	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99,5:0,5)	Mistura de substâncias
IV – 37 a 43	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99,5:0,5)	Mistura de substâncias
V – 44 a 72	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99,5:0,5)	Mistura de substâncias
VI – 73 a 97	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99:1,0)	Mistura de substâncias
VII – 98 a 117	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99:1,0)	Mistura de substâncias
VIII – 118 a 125	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99:1,0)	Mistura de substâncias
IX – 126 a 139	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (97:3,0)	Mistura de substâncias
X – 140 a 168	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (97:3,0)	Mistura de substâncias
XI – 169 a 178	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (97:3,0)	Chamaedrina + mistura
XII – 179 a 198	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (97:3,0)	Waltherina-A + mistura
XIII – 199 a 227	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5,0)	Mistura de substâncias
XIV – 228 a 237	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5,0)	VG8 + mistura
XV – 238 a 256	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5,0)	Mistura de substâncias
XVI – 257 a 291	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (90:10)	Waltheriona-A + mistura
XVII – 292 a 340	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (90:10)	Waltheriona-B + mistura
XVIII – 341 a 363	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (85:15)	Mistura de substâncias
XIX – 364 a 378	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (85:15)	Mistura de substâncias
XX – 379 a 403	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80:20)	Mistura de substâncias
XXI – 404 a 425	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (70:30)	Mistura de substâncias
XXII – 426 a 433	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (50:50)	Mistura de substâncias
XXII – 434 a 455	MeOH (100)	Mistura de substâncias

4.6.2.1 Substâncias isoladas e identificadas

4.6.2.1.1 Waltherina-A (Figura 13)

O alcalóide Waltherina-A, foi identificado nas frações 179-198 da coluna por comparação por CCD com amostra autêntica¹³. Isolou-se por placa preparativa com diclorometano e metanol (97:3 v/v) como eluente obtendo-se um sólido branco. A fim de confirmar a estrutura do alcalóide de interesse, efetuou-se a análise de RMN de ¹H e ponto de fusão (pág. 38).

4.6.2.1.2 Waltheriona-A (Figura 23)

O alcalóide Waltheriona-A foi identificado nas frações 257-291 da coluna etérea por comparação em CCD com amostra autêntica existente no laboratório¹². A fração foi submetida a uma separação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída com éter diisopropílico e metanol (95:5 v/v). O material isolado apresentou-se sob forma sólida de cor amarela. A cristalização deste alcalóide em hexano/MeOH (1:1 v/v), possibilitou a formação de cristais possíveis de serem analisados por Difração de Raios-X (pág. 48).

4.6.2.1.3 Waltheriona-B (Figura 25)

Esse alcalóide¹¹ foi identificado nas frações 292-340 da coluna cromatográfica, junto a outros metabólitos não alcaloidais. A mistura foi submetida a uma separação através de CCDP, eluída com hexano/acetona (6:4 v/v), onde foi retirada a faixa que revelou positiva frente ao reagente de Dragendorff. Esta fração, ainda contaminada por outros metabólitos, foi novamente purificada por CCDP, desta vez utilizando-se diclorometano e metanol (95:5 v/v) como sistema eluente. O alcalóide foi obtido como um sólido branco, que foi posteriormente identificado através de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, e por Espectrometria de Massas (pág. 49).

4.6.2.1.4 VG8 (Figura 27b)

As frações 228-237 desta coluna cromatográfica constituíam um outro alcalóide, identificado em CCD por dar reação positiva com o reagente de Dragendorff. Este alcalóide foi isolado puro através da separação em CCDP, utilizando-se hexano e acetona (1:1 v/v) como sistema de solvente eluente. O material puro foi analisado por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e por Espectrometria de Massas de alta resolução (pág. 52).

4.6.2.1.5 Chamaedrina (Figura 37)

O alcalóide V14, identificado como sendo Chamaedrina ao ser comparado com uma amostra autêntica⁴⁷, foi isolado das frações 169-178 da coluna cromatográfica. Sua purificação foi possível através de separação em placa preparativa, utilizando-se diclorometano e metanol (98:2 v/v) para eluição. Foi obtido na forma de sólido branco, o qual quando analisado por CCD, apresenta teste positivo para alcalóides frente ao reativo de Dragendorff e para a presença de grupamento indólico frente ao reagente de Ehrlich (pág. 65).

4.7 DERIVATIZAÇÃO DOS ALCALÓIDES WALTHERIONA-A E WALTHERIONA-B POR REAÇÃO DE METILAÇÃO

A derivatização (reação de metilação) dos alcalóides Waltheriona-A (WA) e Waltheriona-B (WB) foi realizada da seguinte forma:

Solubilizou-se a amostra em 10 mL de acetona e colocou-se em balão de fundo redondo sob agitação. Um sistema de refluxo utilizando gelo seco foi necessário, visto que o CH_3Br é gasoso à temperatura ambiente. Adicionou-se também uma pequena quantidade (uma ponta de espátula) de NaH (base) e borbulhou-se o gás CH_3Br durante 10 minutos na solução. A reação foi acompanhada por CCD e após 1 hora observou-se o fim da reação.

Evaporou-se o solvente em evaporador rotatório e o material remanescente foi transferido para um funil de separação onde se efetuou a extração dos metabólitos de interesse com diclorometano (3x de 30 mL) e após com acetato de etila (3x de 30 mL).

Tanto a reação com WA quanto a com WB resultaram em dois produtos. Estes, por sua vez, foram separados por placa preparativa (CCDP) com diclorometano e metanol (95:5 v/v) para eluição.

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

4.8.1 Método de Bioautografia

O método de Bioautografia foi realizado de acordo com Rahalison e colaboradores⁴⁸ e Hamburger & Hostettmann⁴⁹ o qual é aplicado na detecção de compostos ativos a microrganismos, portanto, um método qualitativo.

As cepas padrão de ATCC (American Type Culture Colection) constituídas por microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos utilizados estão descritos abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Microrganismos Indicadores

Características	Microrganismos	ATCC
Gram-positivo	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
Gram-negativo	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25792
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Salmonella setubal</i>	ATCC 19796
Fungos	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
	<i>Candida dubliniensis</i>	Isolado clínico SM-26
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 28952
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601

Os padrões antibióticos de referência foram Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos. Estes são padrões primários preparados conforme FDA.⁵⁰

Como revelador utiliza-se sal de tetrazóleo (metiltiazol tetrazóleo, MTT; *p*-iodo tetrazóleo, INT; 2, 3, 5-trifenil tetrazóleo, TTC). As bactérias metabolicamente ativas

convertem este sal em um complexo colorido, chamado formazan, sendo assim possível a visualização da zona de inibição provocada pela substância testada.^{48,49}

4.8.1.1 Meios de cultura empregados

Para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia dos extratos, frações e amostras puras, foram utilizados os seguintes meios de cultura:

Ágar nutriente (para repique de bactérias): ágar bacteriológico (15,0 g), cloreto de sódio (8,0 g), extrato de carne (3,0 g), peptona de gelatina (5,0 g) e água destilada (1000 mL).

Ágar sabouraud dextrosado (para repique de fungos): ágar (15,0 g), dextrose (40,0 g), peptona de carne (5,0 g), peptona de caseína (5,0 g) e água destilada (1000,0 mL).

Ágar Mueller-Hinton (para cultivo de bactérias): infuso de carne (300,0 g), caseína hidrolisada (17,5 g), amido de batata (1,5 g), ágar-ágar (17,0 g) e água destilada (1000,0 mL).

Ágar sabouraud (para cultivo de fungos): peptona (10,0 g), dextrose (40,0 g), ágar-ágar (15,0 g) e água destilada (1000,0 mL).

4.8.1.2 Método de determinação da atividade - Quantidade de Substância Ativa (QSA) por bioautografia

Para a verificação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações foram utilizados 50 µg da amostra. Já para as substâncias puras isoladas foi determinado a QSA, utilizando as concentrações 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg, 3,12 µg. Para as amostras que apresentaram atividade em 6,25 µg e 3,12 µg, repetiu-se o teste para estas concentrações e foram testadas ainda as concentrações de 1,56 µg, 1,00 µg, 0,75 µg e 0,50 µg.

O teste realizado consiste na aplicação das amostras em cromatoplasmas de sílica gel, alumina ou papel adequado à cromatografia que são depositadas posteriormente em placas de Petri estéreis (Figura 3). 10 ml do meio de cultura adequado inoculado com o microrganismo indicador foram adicionados sobre as cromatoplasmas e, após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por 16 a

24 horas a 35°C para bactérias e 48 horas a 27°C para fungos, proporcionando o cultivo do microrganismo sobre a amostra. Decorrido o tempo de incubação, a visualização foi efetuada através da adição de uma solução aquosa de sal de tetrazóleo, (TTC, 20 mg mL⁻¹) que é um corante indicador do crescimento microbiano, e novamente incubadas por 1-2 h a 35°C.

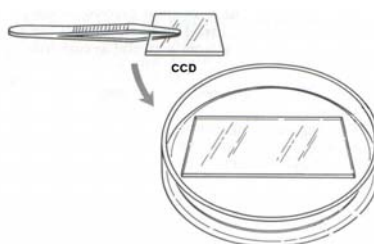


Figura 3 – Aplicação da cromatoplaqueta com as amostras em placa de Petri para realização de bioautografia

A menor concentração da substância, na qual houve o aparecimento de halos de inibição, após a revelação com o sal de tetrazóleo, foi considerada a QSA (quantidade de substância ativa) da substância em estudo.

4.8.2 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração do composto que inibe o crescimento (bacteriostática) de microrganismos num dado meio de cultura. Trata-se de um ensaio quantitativo aplicado a avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras.

Os microrganismos utilizados neste teste são os mesmos utilizados pelo método de bioautografia (Tabela 1).

4.8.2.1 Meios de cultura empregados

Para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de CIM de amostras puras, foram utilizados os seguintes meios de cultura:

Caldo caseína de soja (para cultivo de bactérias): cloreto de sódio (5,0 g), dextrose (2,5 g), fosfato dibásico de potássio (2,5 g), peptona de caseína (17,0 g), peptona de soja (3,0 g), água destilada (1000,0 mL).

Caldo sabouraud dextrosado (para cultivo de fungos): dextrose (40,0 g), peptona de carne (5,0 g), peptona de caseína (5,0 g), água destilada (1000,0 mL).

4.8.2.2 Método de determinação da atividade

Para a determinação da CIM pelo método de microdiluição, empregou-se a técnica descrita pela NCCLS⁵¹ modificada^{52,53}. Este método é determinado em placas de cultura estéreis de 96 poços onde se realizou uma série de diluições das amostras em meio líquido, contendo 2% do surfactante Tween 80 (Figura 4). Os poços foram inoculados com os microrganismos (concentração de 1×10^6 células viáveis) e homogeneizados. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias e por 48 horas a 25 °C para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano (turvação do meio), determinando-se a CIM. Os testes foram realizados em triplicata e efetuados o controle em branco e do inoculo para cada amostra.

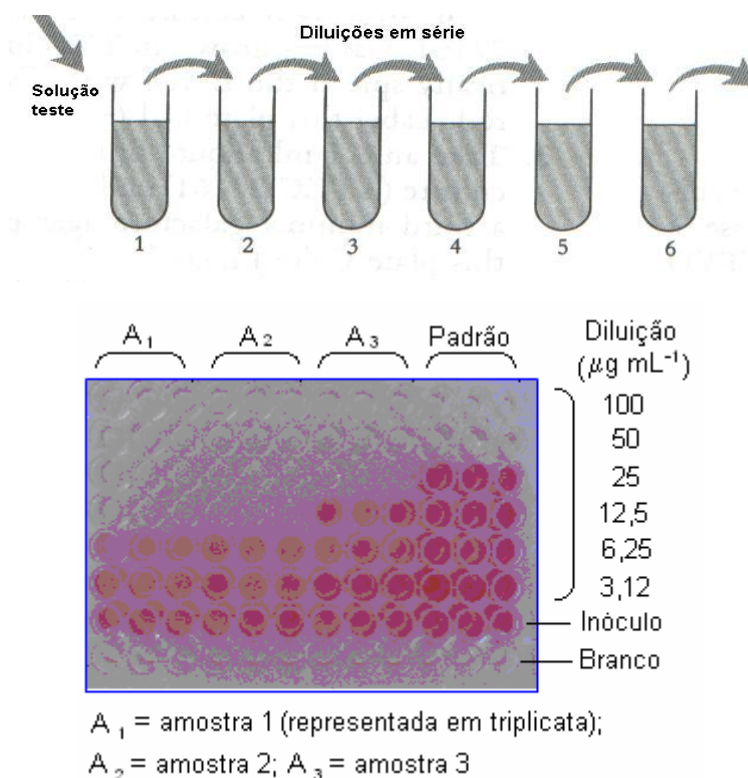


Figura 4 – Método de diluição utilizado na determinação de CIM.

Os padrões utilizados foram Cloranfenicol nas concentrações de 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bactérias e Nistatina nas concentrações de 41,15, 20,6, 10,3, 5,15, 2,58 e 1,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fungos.

4.8.3 Método da Concentração Letal Mínima (CLM)

As culturas do teste de CIM que não apresentaram crescimento nos poços foram usadas para inocular placas de Petri contendo meio ágar onde foram determinados a Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM). Segundo Hammer⁵² trata-se da menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres têm sido implicados em um grande número de doenças que afetam o ser humano. O equilíbrio entre a formação e remoção das espécies radicalares no organismo deve ser regulada para que haja a manutenção fisiológica das células. Em vista disto, há grande interesse na descoberta de novos antioxidantes provenientes de espécies naturais, bem como de ordem sintética, a fim de prevenir o presumido efeito nocivo dos radicais livres no corpo humano.

4.9.1 Método do Radical Livre DPPH

Este método de avaliação da atividade antioxidante (método *screening*), empregando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila, radical livre estável), avalia a habilidade de ação do mesmo como radical (oxidante), ou a dos compostos testados como doadores de hidrogênio (antioxidante).

O DPPH em solução (2 mg mL^{-1} em metanol) é aplicado na forma de spray sobre as cromatoplasas de sílica gel contendo quantidades conhecidas das amostras a serem analisadas - juntamente com o padrão antioxidante quercetrina (2 mg mL^{-1}). Ao borrifar a solução de DPPH (de coloração violeta, $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$,

provocada pelo elétron desemparelhado) sobre a amostra, o radical pode se reduzir recebendo um átomo de hidrogênio da substância (reação primária). Os compostos ativos são vistos como manchas claras sobre o fundo violeta devido ao emparelhamento do elétron do radical DPPH e também devido à presença do resíduo de um grupo picril presente.⁵⁴

A estrutura do DPPH e sua redução por um agente antioxidante é mostrada a seguir (Figura 5).⁵⁵

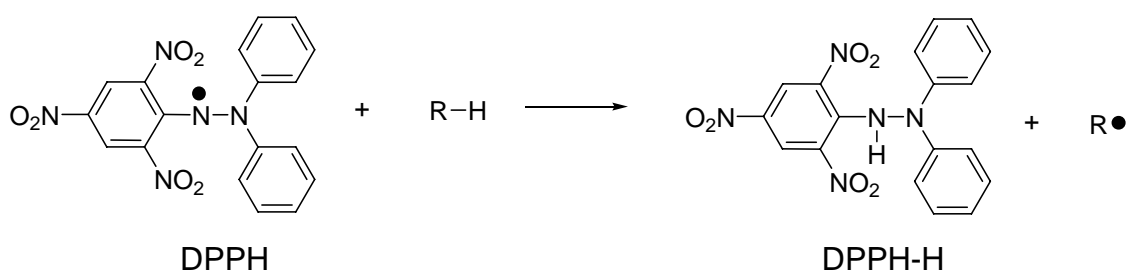


Figura 5 – Redução do DPPH

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Dando continuidade ao estudo de plantas pertencentes à família Sterculiaceae, este trabalho mostra resultados referentes à espécie *Waltheria douradinha* Saint Hilaire. O estudo foi realizado com o intuito de isolar novos metabólitos da planta, bem como sua determinação estrutural e verificação de possíveis aplicações na medicina através de análises de atividade antimicrobiana.

Durante o período de trabalho foi possível efetuar os fracionamentos necessários do material coletado e subsequente análise das frações hexânica neutra e etérea básica. A fração etérea básica, por apresentar grande quantidade de metabólitos de interesse, exigiu grande parte do tempo disponível de estudo. Sendo assim, não foi possível efetuar a análise das demais frações.

5.1 Análise dos rendimentos de fracionamentos e extratos obtidos do material vegetal coletado

Após efetuar as extrações, as frações foram devidamente secas e pesadas a fim de se conhecer o rendimento de cada uma delas em relação ao material seco (raiz) e também em relação ao extrato bruto obtido. Os resultados obtidos estão tabelados a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 – Rendimentos das frações obtidas do extrato bruto de *Waltheria douradinha* Saint Hilaire.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento em relação à raiz seca (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Hexânica neutra	12,978	0,321	0,884
Etérea ácida	23,564	0,583	1,605
Etérea básica	10,772	0,267	0,734
Acetato básica	11,724	0,290	0,798

5.2 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz, caule, folha e flor e das frações obtidas da raiz da planta

A determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia foi realizada com os extratos brutos das várias partes da planta (raiz, caule, folha e flor), bem como das subfrações do extrato bruto da raiz (fração hexânica neutra, FH; fração etérea ácida, FEA; fração etérea básica, FEB; e fração acetato básica, FAB). Os resultados obtidos, listados na Tabela 4, mostram as amostras que formaram zonas de inibição, resultado positivo (+), para bactérias e fungos testados.

Tabela 4 - Resultados dos ensaios de bioautografia dos extratos brutos e frações da raiz.

Microrganismo	Raiz				Caule	Folha	Flor	Padrão
	FH	FEA	FEB	FAB				
<i>S. aureus</i>	+	NA	+	+	+	+	+	0,7 µg
<i>S. epidermidis</i>	NA	NA	+	+	+	+	+	0,7 µg
<i>E. coli</i>	+	NA	+	+	+	+	+	0,5 µg
<i>S. setubal</i>	NA	NA	+	+	+	+	+	0,7 µg
<i>K. pneumoniae</i>	NA	NA	+	+	+	+	+	0,5 µg
<i>B. subtilis</i>	+	NA	+	+	+	+	+	0,8 µg
<i>P. aeruginosa</i>	+	NA	+	+	+	+	+	0,6 µg
<i>S. cerevisiae</i>	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	3,24 µg
<i>C. albicans</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,43 µg
<i>C. dubliniensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4,05 µg
<i>C. neoformans</i>	NA	NA	+	+	NA	NA	NA	2,43 µg

NA = não ativo

5.3 Atividade antioxidante dos extratos brutos da raiz, caule, folha e flor e das frações obtidas da raiz da planta

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH foi testada a concentração de 50 µg dos extratos e frações. Nesta concentração, todas as amostras testadas apresentaram ação positiva.

5.4 Metabólitos isolados da fração hexânica neutra

5.4.1 Alcalóide Antidesmona

Como apresentado no item 4.6.1.1.1 (pág. 20), esta substância foi isolada da fração hexânica obtida do extrato bruto da casca da raiz de *W. douradinha*. A purificação resultou em 12 mg do alcalóide na forma de óleo amarelo e sua pureza foi confirmada por CCD em vários sistemas de solvente e também por RMN de ^1H e ^{13}C .

Devido a semelhanças das características deste alcalóide com outro isolado da espécie *Melochia chamaedrys* e já identificado pelo grupo como o Antidesmona (Figura 6), fez-se comparação por CCD, o qual apresentou um mesmo Rf. A fim de confirmar a estrutura, efetuaram-se análises de RMN de ^1H e ^{13}C e as mesmas foram comparadas com a literatura.⁵⁶

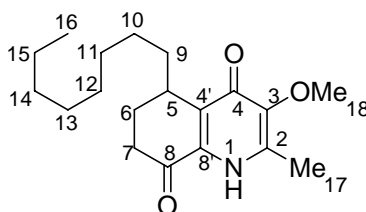


Figura 6 – Estrutura química da Antidesmona

A análise dos dados de RMN obtidos e os apresentados pela literatura permitiram a confirmação de que o alcalóide isolado é o Antidesmona (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos com os da literatura referente ao alcalóide Antidesmona

Posição	δ ^1H (ppm)		δ ^{13}C (ppm)	
	obtido	literatura*	obtido	literatura*
1	8,75	-	-	-
2	-	-	138,1	138,9
3	-	-	147,6	147,5
4	-	-	173,4	172,8
4'	-	-	139,1	139,0
5	3,25	3,27	30,3	30,3
6	2,07	2,08 e 2,20	24,4	24,3
7	2,59	2,58 e 2,75	32,3	32,2
8	-	-	194,9	194,6
8'	-	-	132,0	132,2
9	1,38	1,41	30,6	30,5
10-15	1,26	1,25-1,46	22,6-31,8	22,6 – 31,8
16	0,85	0,87	14,1	14,0
17-Me	2,35	2,37	14,6	14,5
18-OMe	3,93	3,94	59,4	59,4

*literatura: Bringmann e colaboradores⁵⁶

Este alcalóide foi isolado primeiramente da espécie *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae)⁵⁷ em 1999, mas sua estrutura somente foi corretamente determinada em 2000⁵⁶. Este metabólito foi patenteado no ano de 2003 por apresentar atividade contra o agente causador da Doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*, sendo esta atividade maior que sobre outros protozoários parasitas causadores de doenças tropicais.⁵⁸ Estes dados mostram a importância desta substância para a saúde humana e, principalmente, a presença desta na espécie estudada *W. douradinha*.

5.4.2 (O)-metiltembamida

Conforme descrito no item 4.6.1.1.2 (pág. 20) foi possível o isolamento de 130 mg desta substância. Sua forma física foi de um sólido amarelo (P.F. 90-91 °C –

literatura⁵⁹: 88-89 °C), o qual foi submetido à cristalização em clorofórmio a temperatura ambiente. Os cristais formados foram analisados por Difração de Raios-X e confirmada sua pureza por RMN de ^1H e ^{13}C . Os resultados proporcionaram a definição de sua estrutura como sendo o de uma amida, conhecida como (O)-metiltembamida, cuja estrutura é apresentada na Figura 7.

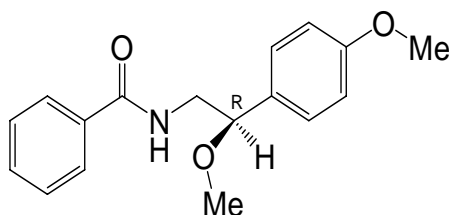


Figura 7 – Estrutura química da (O)-metiltembamida

5.4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 8), pode-se identificar, pela integração dos sinais, a presença de 19 hidrogênios na molécula, dos quais seis são pertencentes a duas metoxilas - uma com deslocamento químico de δ 3,23 ppm (3H, s) e outra de δ 3,79 ppm (3H, s) - e 9 hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos entre δ 6,89 ppm a δ 7,78 ppm.

Observou-se ainda a presença de um hidrogênio ligado a um átomo de nitrogênio (δ 6,74 ppm, s), dois hidrogênios diastereotópicos apresentando deslocamentos químicos de δ 3,40 ppm e δ 3,85 ppm, e ainda um hidrogênio em δ 4,33 ppm.

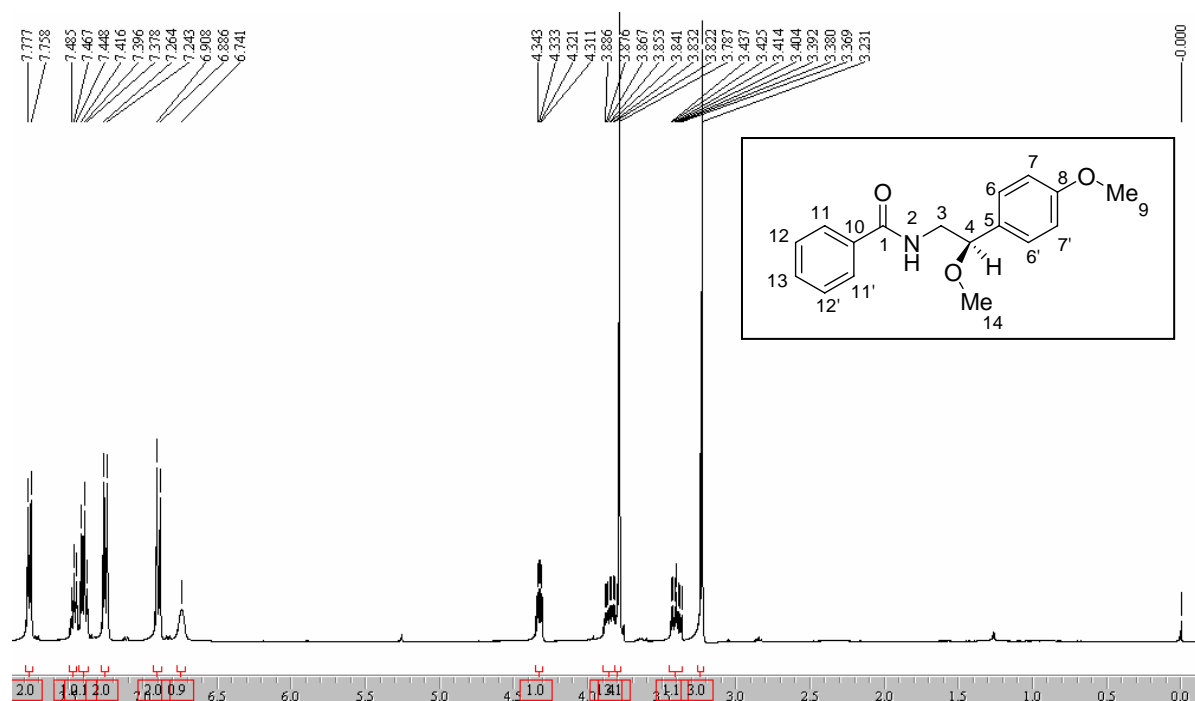


Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H de (O)-metiltembamida em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C.

Na região de campo baixo do espectro, representando hidrogênios aromáticos (Figura 9), observou-se a presença de 9 deles, mas apenas cinco sinais, indicando a presença de um anel mono-substituído (d, t e t) e outro para-substituído (d, d). Os sinais foram atribuídos da seguinte forma:

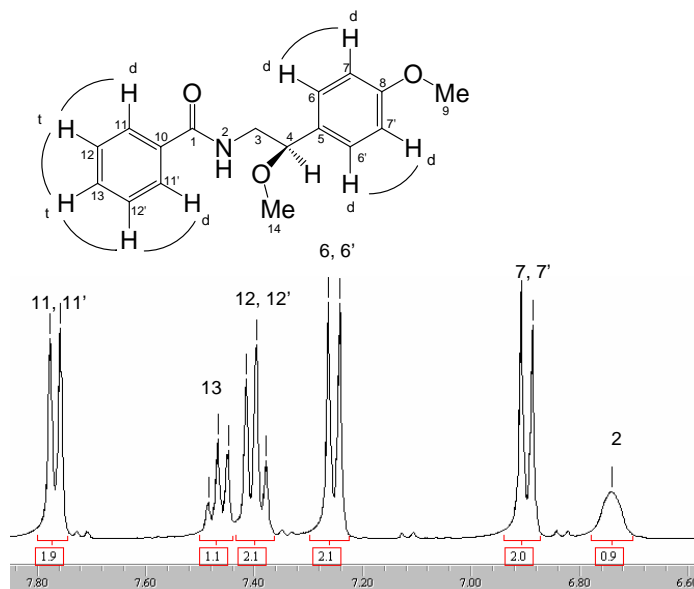


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H expandido (região aromática) de (O)-metiltembamida em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C.

Os hidrogênios metílicos ligados ao carbono oxigenado aparecem como singletos e estes foram atribuídos como δ 3,79 ppm para H-9 e δ 3,23 ppm para H-14. Os dois hidrogênios metilênicos (-CH₂-), por estarem adjacentes a um carbono quiral (C-4), apresentam um desdobramento de sinal (hidrogênios diastereotópicos), sendo então atribuídos δ 3,43 ppm e δ 3,85 ppm para os mesmos. O hidrogênio metínico apresenta deslocamento químico de δ 4,33 ppm.

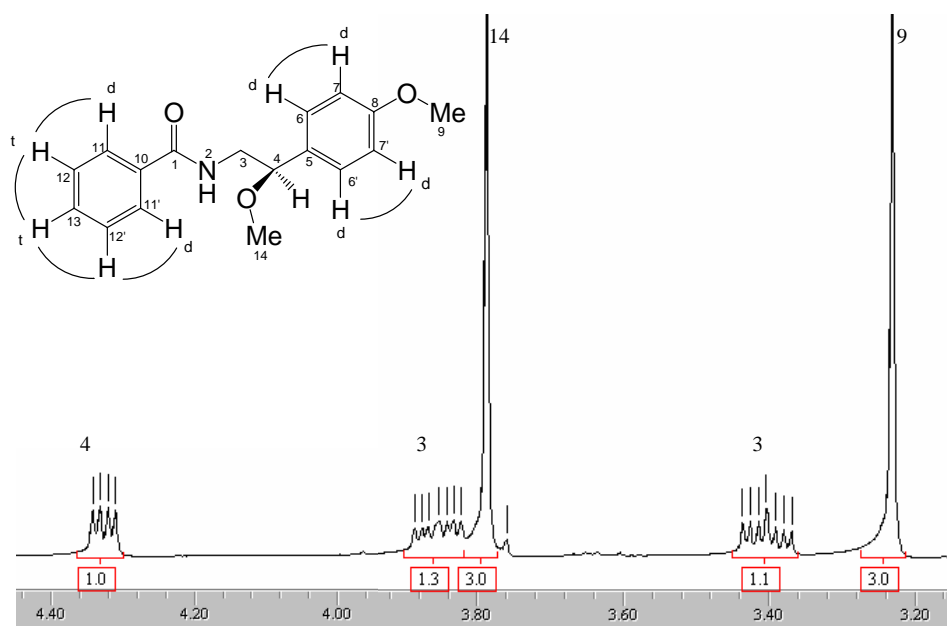


Figura 10 - Espectro de RMN de ¹H expandido (região de δ 3,20 a δ 4,40 ppm) de (O)-metiltembamida em CDCl₃ a 400,13 MHz e 25°C.

5.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C

O espectro de ¹³C (Figura 11) apresentou onze sinais, sendo que o pico presente em δ 167,22 ppm é característico de carbono carbonílico de uma amida. A presença de oito sinais na região aromática mostra que há carbonos aromáticos simétricos na molécula. Os dois sinais na região entre δ 50 ppm e δ 60 ppm são referentes aos carbonos das metoxilas. Os sinais foram atribuídos da seguinte forma:

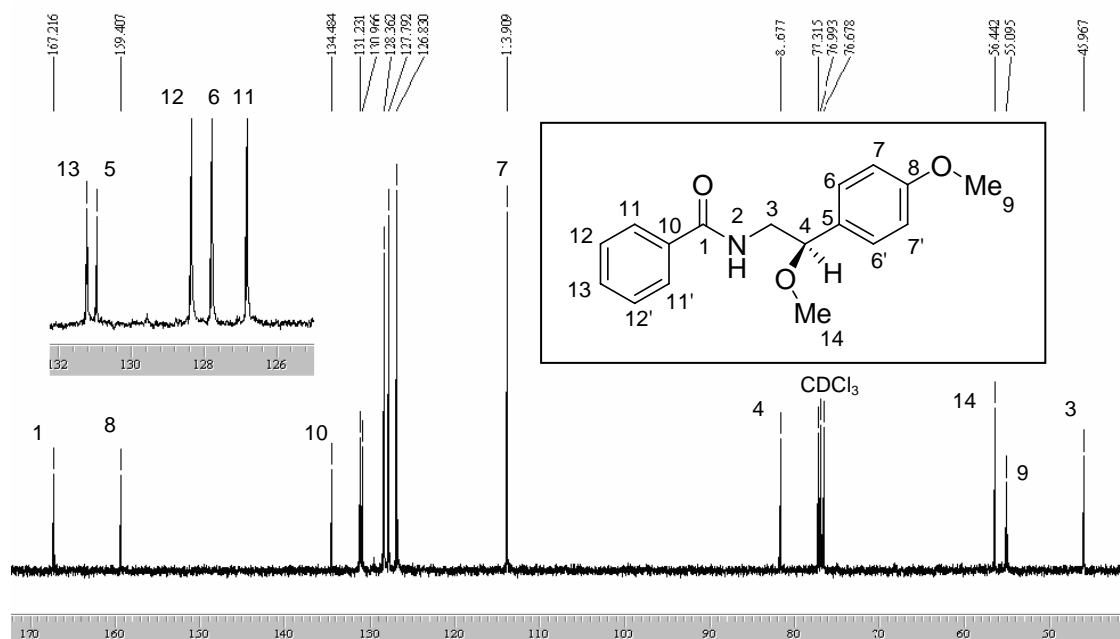


Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*O*)-metiltembamida em CDCl_3 a 100,62 MHz e 25°C.

5.4.2.3 Análise de Difração de Raios-X

A estrutura de (*O*)-metiltembamida também foi determinada por Difração de Raios-X (Figura 12, numeração dos núcleos atribuída pelo aparelho é diferente da atribuída pela literatura). Dados adicionais obtidos da Difração de Raios-X encontram-se em anexo (Anexo 1).

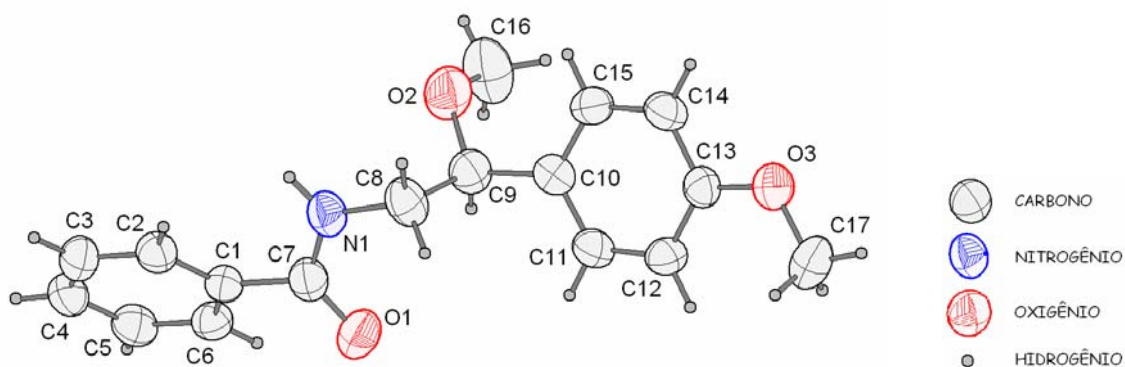


Figura 12 – Estrutura da (*O*)-metiltembamida obtida por Difração de Raios-X

5.4.2.5 Atividade antimicrobiana e antioxidante

A amida isolada não apresentou atividade antimicrobiana pelos métodos de bioautografia (concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 μg) e CIM (concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às bactérias e fungos testados. Nestas mesmas concentrações avaliou-se a atividade antioxidante, a qual também não apresentou-se ativa.

5.4.2.6 Dados apresentados na literatura

Cheng e colaboradores⁶⁰ descreveram o isolamento desta amida da espécie *Zanthoxylum ailanthoides* (Rutaceae) e também relataram que esta substância apresentou atividade anti-HIV em testes *in vitro*. Dados deste trabalho mostram que a (O)-metiltembamida possui uma IC_{50} de 16,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração que inibe 50% do crescimento de células H9 não infectadas) e uma $\text{EC}_{50} < 1,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração que inibe 50% a replicação viral).

O isolamento desta substância da espécie *W. douradinha* mostra que a (O)-metiltembamida também está presente na família Sterculiaceae, portanto uma nova fonte de obtenção desta substância.

5.5 Metabólitos isolados da fração etérea básica

5.5.1 Waltherina-A

O alcalóide Waltherina-A (15 mg) foi isolado conforme descrito no item 4.6.2.1.1 (pág. 22). Sua presença foi confirmada através da comparação em CCD com a substância padrão existente no laboratório e através da análise de seu espectro de RMN de ^1H . A semelhança dos sinais e deslocamentos químicos e o valor do ponto de fusão obtido (P.F. 238-239 $^{\circ}\text{C}$) comparado com o da literatura¹³ (P.F. 234-235 $^{\circ}\text{C}$) confirmaram como sendo o alcalóide ciclopeptídico Waltherina-A (Figura 13).

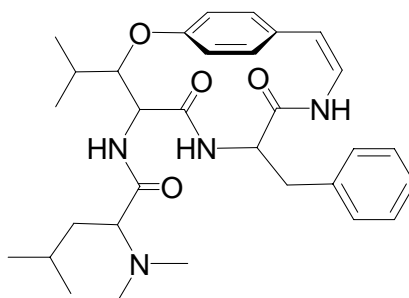


Figura 13 – Waltherina-A

5.5.1.1 Atividade antimicrobiana e antioxidante

Como não se conhecia nenhuma atividade deste metabólito, a mesma foi testada, pelo método da CIM, frente às cepas disponíveis em nosso laboratório (Tabela 2). Os resultados obtidos mostraram que esta substância não apresenta ação inibidora nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade antioxidante pelo método de DPPH deste alcalóide foi analisada, e os resultados obtidos mostraram que este não é ativo em concentrações menor ou igual a 100 μg .

5.5.2 Waltheriona-A e Waltheriona-B

Os alcalóides conhecidos como Waltheriona-A (WA) e -B (WB) foram obtidos da coluna realizada com a fração etérea básica, conforme descrito nos itens 4.6.2.1.2 e 4.6.1.2.3 respectivamente (pág. 22). Estes alcalóides, embora já isolados anteriormente desta planta¹¹, foram isolados novamente, com o objetivo de se obter dados quanto às suas estereoquímicas, mesmo que relativas, já que estes alcalóides tratam-se de dois diastereoisômeros.

O alcalóide Waltheriona-A (120 mg) foi obtido na forma de cristais de coloração amarela. Apresentou um ponto de fusão de 198-199 °C (literatura 206 °C) e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -25,5^{\circ}$ (c 0,01, CHCl_3)¹².

O alcalóide Waltheriona-B foi obtido na forma de um sólido amarelo claro (60 mg), com ponto de fusão de 170-171 °C e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2,1^{\circ}$ (c 0,01, CHCl_3)¹¹.

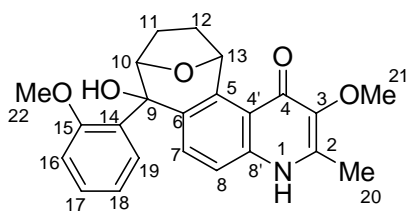


Figura 14 – Estrutura química básica de Waltheriona-A e -B

5.5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e sua comparação com os espectros já obtidos pelo grupo confirmaram que as estruturas isoladas eram de WA e WB. Apesar dos espectros das duas substâncias apresentarem certa similaridade, uma diferença foi fundamental para diferenciar as duas estruturas. Essa diferença pode ser observada comparando-se os dois espectros COSY. Nestes espectros, observa-se a correlação entre os dois hidrogênios estereotópicos em C-10 e C-13. Em WA, um destes hidrogênios absorve em δ 6,81 ppm, enquanto que em WB, este hidrogênio aparece mais blindado, absorvendo em δ 6,67 ppm (Figuras 15 e 16). Este dado é o suficiente para se propor que os alcalóides são dois diastereoisômeros e não a mesma substância.

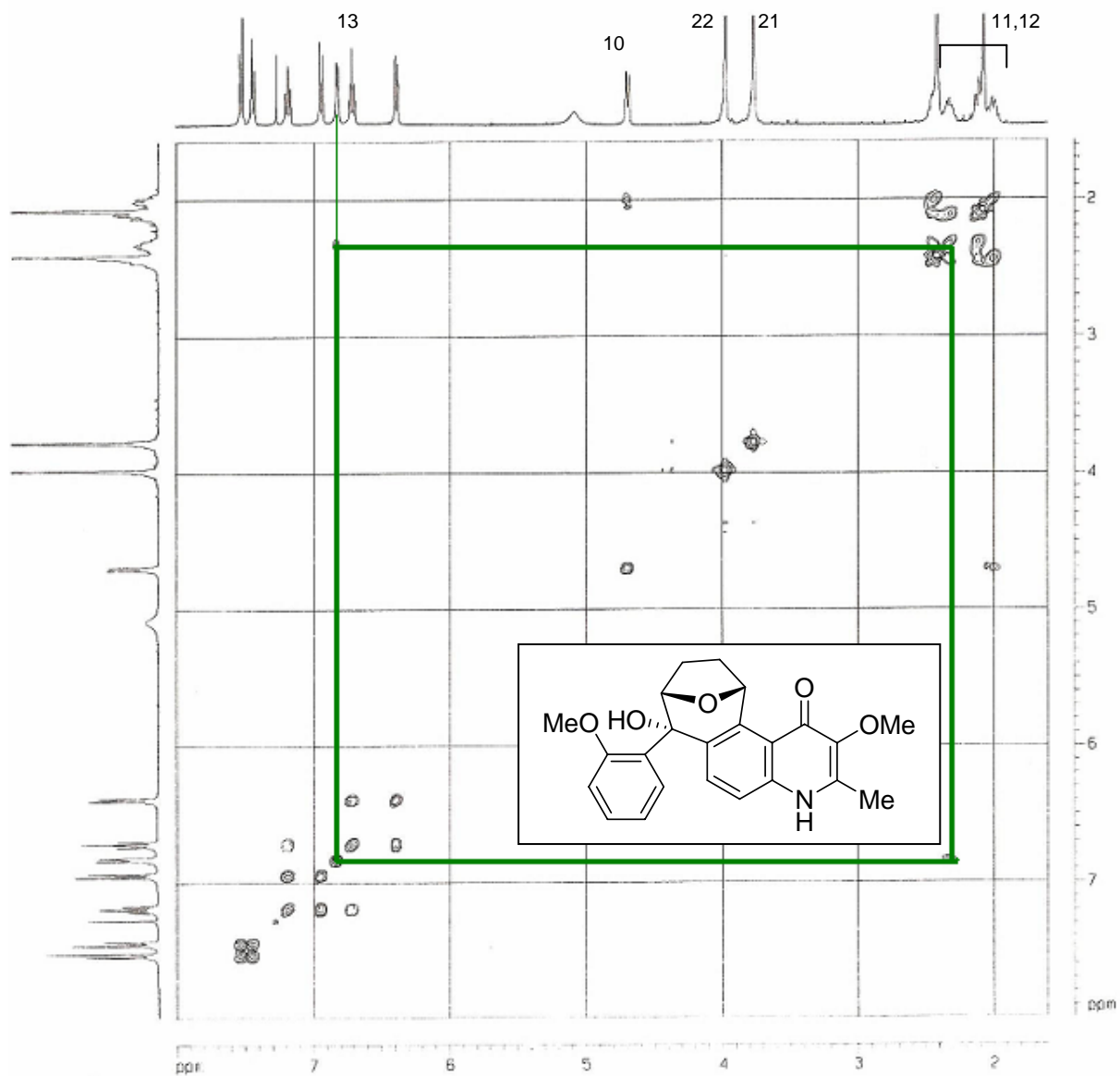


Figura 15 - Espectro de RMN de COSY de Waltheriona-A em CDCl₃ a 400,13 MHz e 25°C.

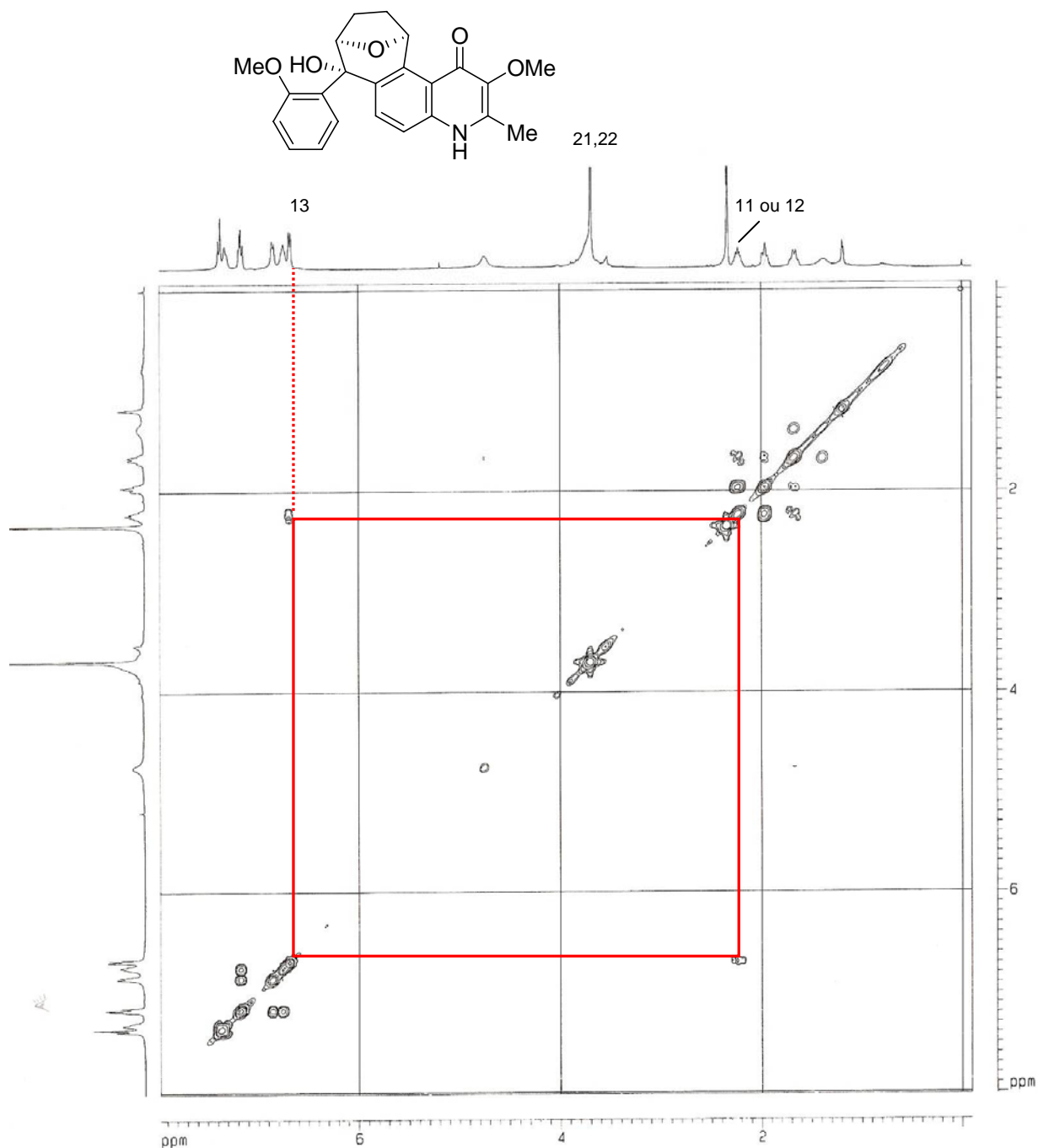


Figura 16 - Espectro de RMN de COSY de Waltheriona-B em CDCl_3 a 400,13 MHz e 50°C .

5.5.2.2 Espectrometria de massas

A fim de confirmar a fórmula molecular do alcalóide WB, o mesmo foi submetido a uma análise em um espectrômetro de massas de alta resolução. O espectro desta substância (Figura 17 e 18) apresentou um íon quase molecular

$[M+Na]^+$ de m/z 416,1469360 (calculado para $C_{23}H_{23}NO_5$ 416,1468439) confirmando sua fórmula molecular.

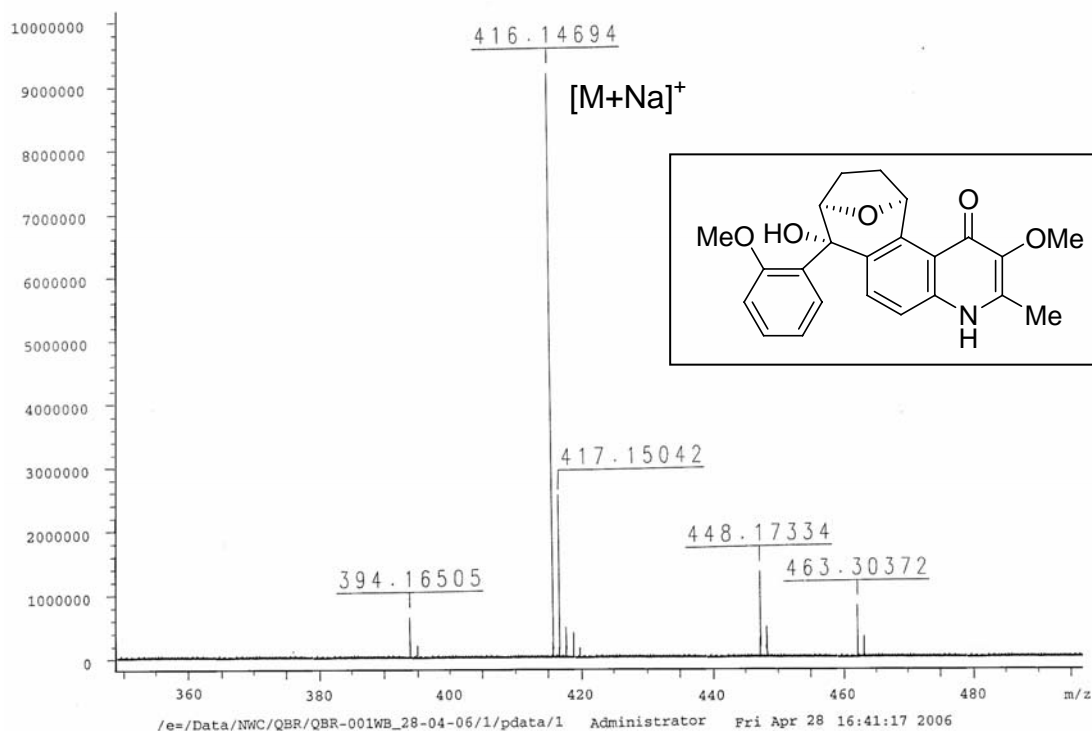


Figura 17 - Espectro de Massas de alta resolução de Waltheriona-B (m/z 340 a 500).

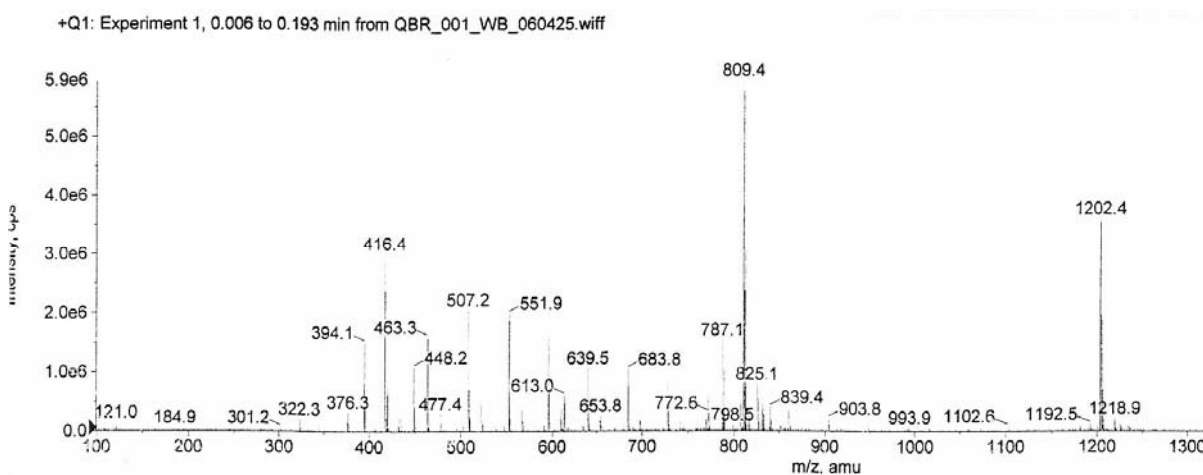


Figura 18 - Espectro de Massas de alta resolução de Waltheriona-B (m/z 100 a 1300).

5.5.2.3 Reação de Metilação de Waltheriona-A e -B

Um estudo realizado pelo grupo¹¹ mostrou que as substâncias WA e WB encontram-se em equilíbrio ceto-enólico, concordando com a observação feita por Werner⁶¹ em 1969. Com base nestes dados decidiu-se obter derivados para análise de atividades biológicas. Desta forma, submetem-se os dois alcalóides à reação de metilação, utilizando-se brometo de metila como agente metilante, já que com diazometano leva somente à produtos O-metilados^{11,61}. Para isso, os alcalóides Waltheriona-A (15 mg) e -B (10 mg) foram utilizados. Outra expectativa era a possibilidade de se obter cristais dos produtos desta reação em condições ideais para a realização das análises em Raios-X, já que cristais de WB livre não foram possíveis de serem analisados por este método. A figura a seguir mostra os produtos resultantes destas duas reações (Figura 19). Pode-se observar pelo resultado, que em ambas as reações, formaram-se produtos N- e O-metilados, o que comprova que as estruturas destes dois alcalóides se encontram em um equilíbrio ceto-enólico.

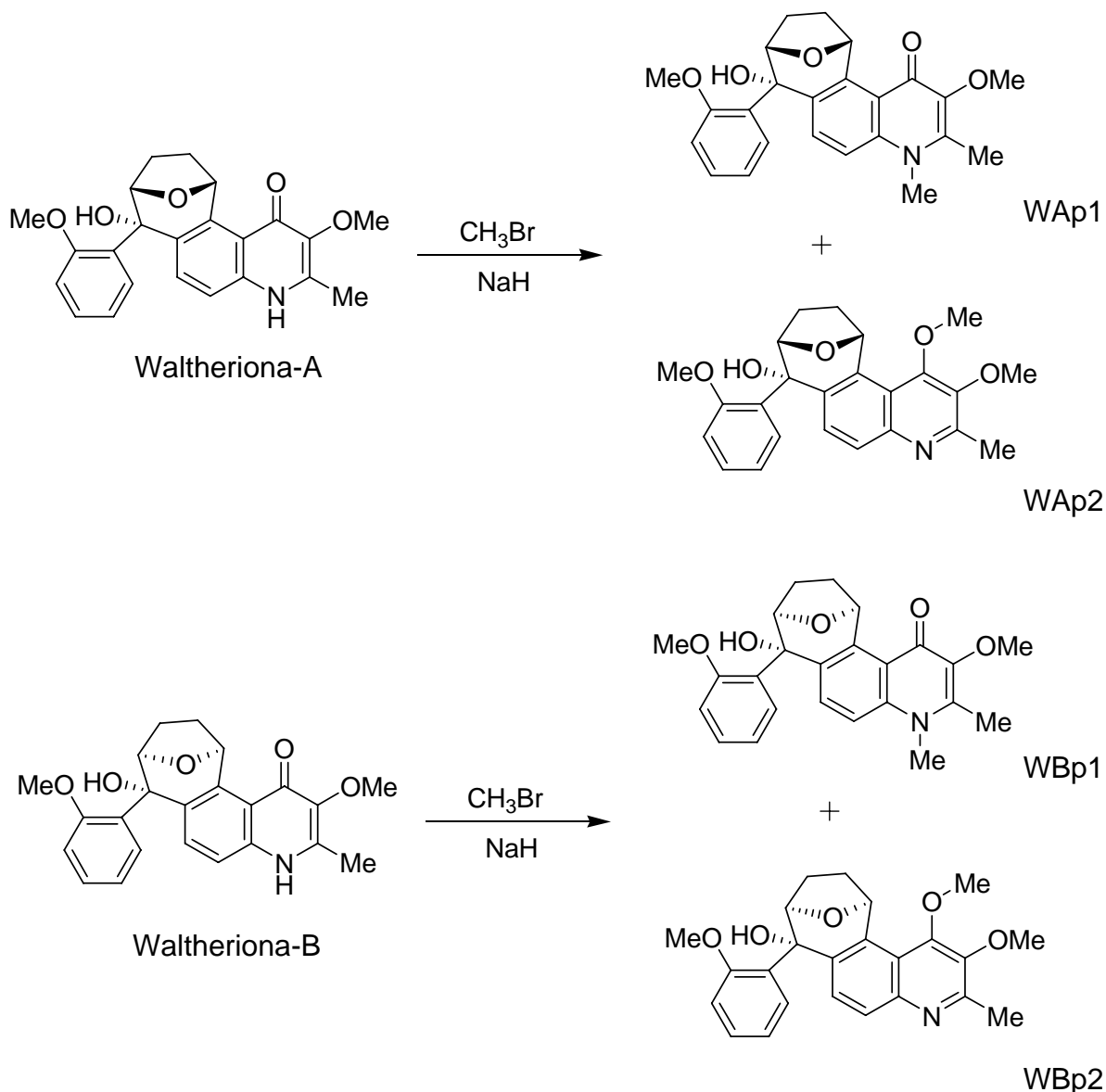


Figura 19 – Waltheriona-A e Waltheriona-B derivatizadas

5.5.2.3.1 Análise de RMN de ¹H

Os quatro produtos foram submetidos à análise de RMN de ¹H e os espectros obtidos foram comparados com o seu respectivo precursor.

No espectro de ¹H de WA pode-se observar a presença de apenas dois sinais (singletos), δ 3,98 ppm e δ 3,77 ppm, os quais são referentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado H-21 e H-22. Ao comparar com os espectros obtidos dos produtos desta reação, WAp1 e WAp2, pode-se observar a presença de um singlete adicional na região de δ 4,00 ppm, sendo este referente à metila incorporada à molécula durante a reação. Os sinais adicionais, um de WAp1 e

o outro de WAp2, apresentam diferentes deslocamentos químicos entre si, mostrando tratar-se de metilas incorporadas em centros diferentes da molécula. O diferente efeito de blindagem provocado pelos núcleos N e O explicam a diferença de deslocamentos químicos das metilas ligadas a eles, sendo assim, os hidrogênios da metila incorporada no nitrogênio da molécula apresentam-se em campo mais alto (δ 3,75 ppm) do que os hidrogênios da metila incorporada no oxigênio da molécula (δ 4,18 ppm). Estes dados podem ser observados na Figura 20.

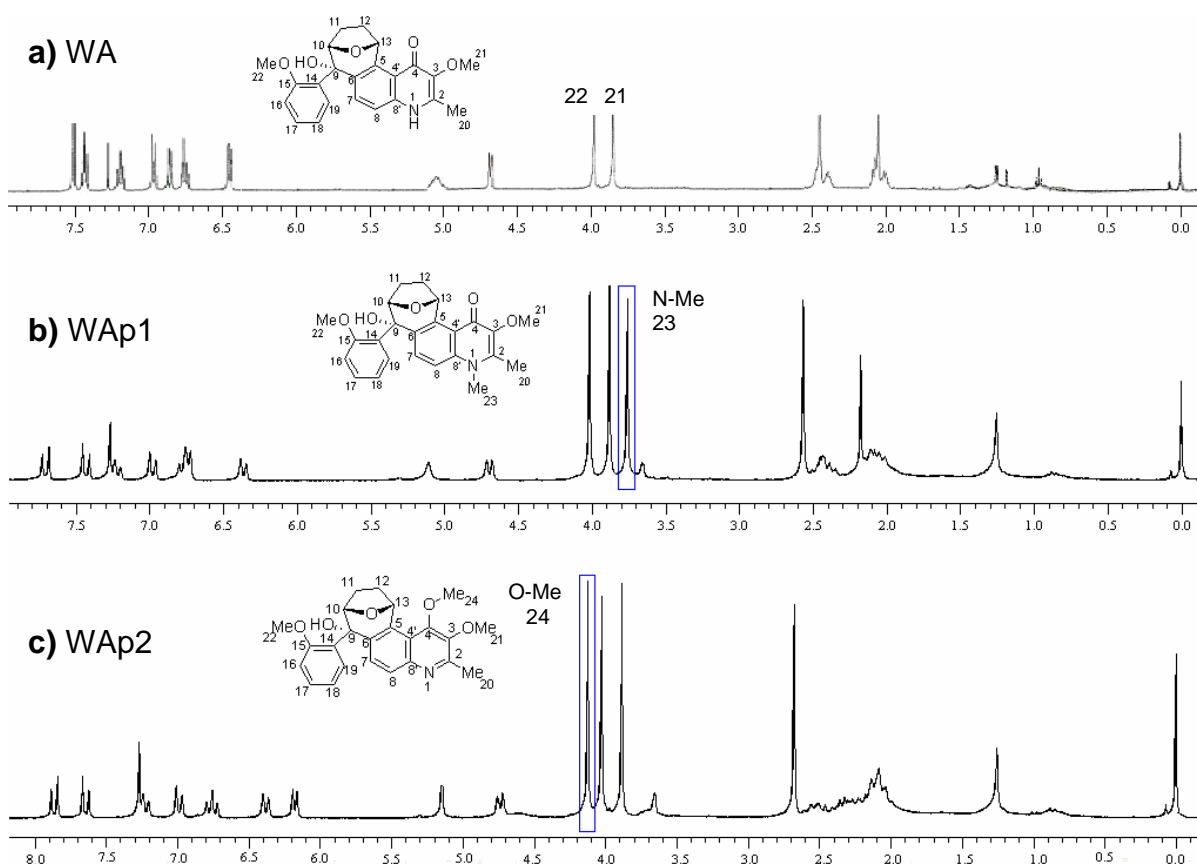


Figura 20 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H : a) WA, (CDCl_3 , 400,13 MHz, 25 °C); b) WAp1 (CDCl_3 , 200,13 MHz, 25 °C) e c) WAp2 (CDCl_3 , 200,13 MHz, 25 °C).

No espectro de ^1H de WB pode-se observar a presença de apenas um sinal (singleto), mas de integração igual a seis hidrogênios, em δ 3,79 ppm, os quais são referentes aos hidrogênios metílicos ligados ao carbono oxigenado H-21 e H-22. Os espectros obtidos dos produtos da reação de metilação (WBp1 e WBp2) apresentaram um sinal adicional próximo de δ 4,00 ppm (δ 3,80 ppm para N-Me e δ

4,15 ppm para O-Me), indicando novamente que houve metilação nos núcleos N e O do sistema aromático da molécula (Figura 21).

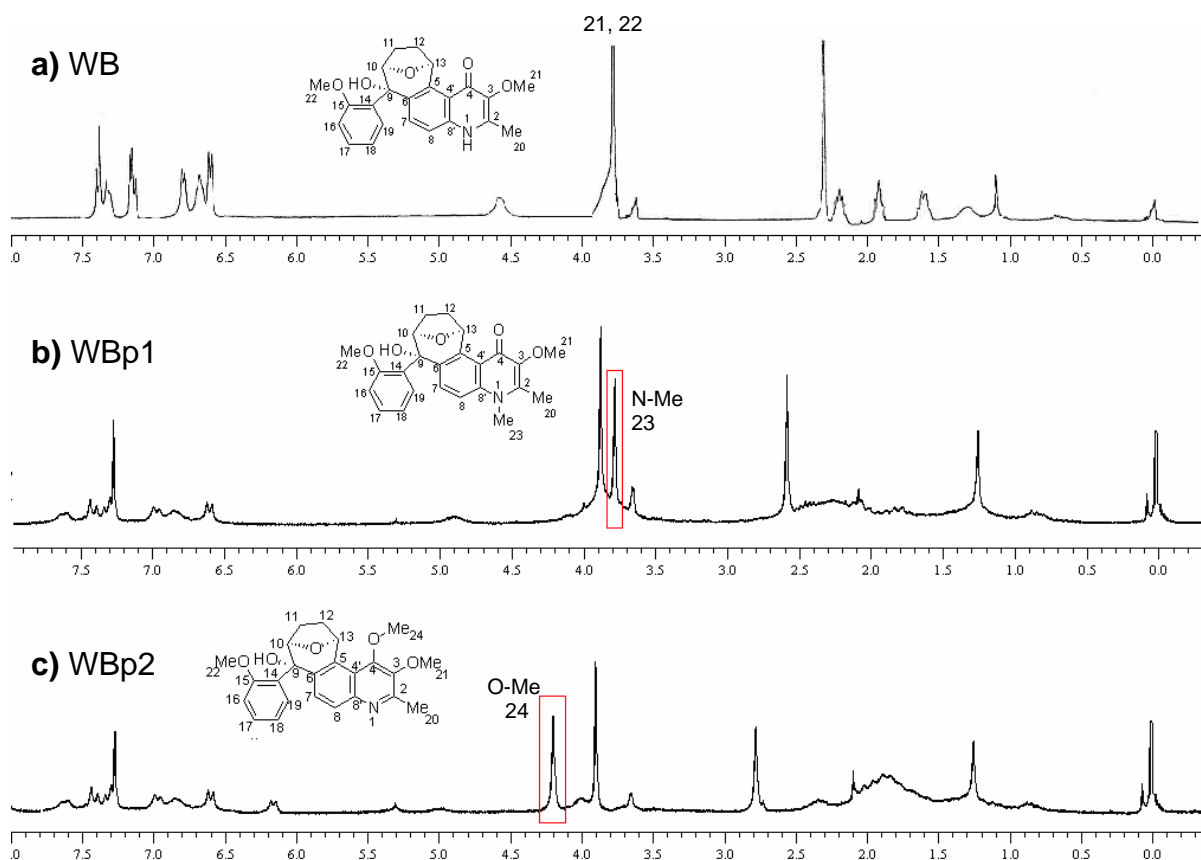


Figura 21 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H : a) WB, (CDCl_3 , 400,13 MHz, 50 °C); b) WBp1 (CDCl_3 , 200,13 MHz, 25 °C) e c) WBp2 (CDCl_3 , 200,13 MHz, 25 °C).

5.5.2.4 Análise de Difração de Raios-X

Cristais do alcalóide Waltheriona-A, obtidos após várias tentativas de cristalizações [hexano/metanol (1:1 v/v) a temperatura ambiente] foram possíveis de serem analisados por este método. Após a análise dos dados obtidos da Difração de Raios-X, chegou-se a estrutura mostrada a seguir (Figura 22). Dados adicionais obtidos da Difração de Raios-X encontram-se em anexo (Anexo 2).

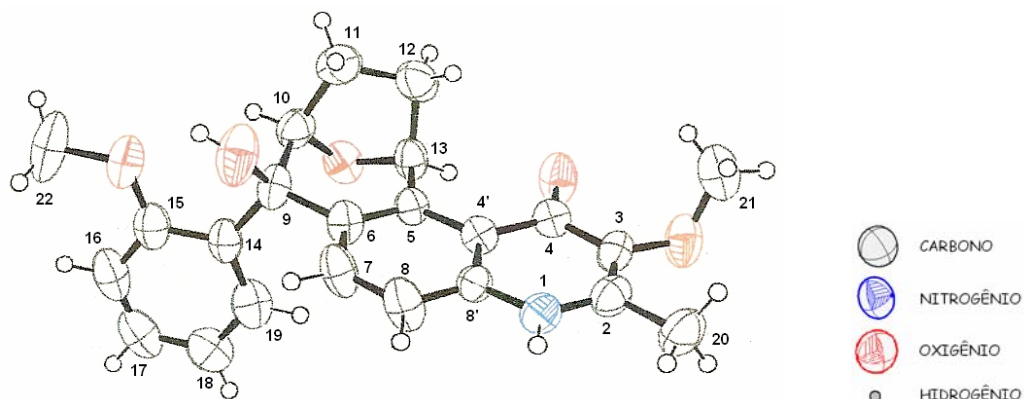


Figura 22 – Estrutura da Waltheriona-A obtida através de Difração de Raios-X

Através desta análise, chegou-se a conclusão que a estrutura proposta para este metabólito, através de RMN e EM estava absolutamente correta, e que os substituintes ligados nos carbonos quirais, a hidroxila em C-9 e o oxigênio que forma ponte nos carbonos C-10 e C-13, se encontram em uma posição *anti*. Esta interpretação sugere uma estereoquímica relativa $9R, 10S, 13R$ para Waltheriona-A (segundo normas da IUPAC, quando se trata de definição da estereoquímica relativa, atribui-se estereoquímica *R* para o centro quiral de menor numeração e as demais em relação a este). Estes dados corrigem a proposta apresentada em 2005 por Morel e colaboradores, sugerida através de cálculos teóricos.¹²

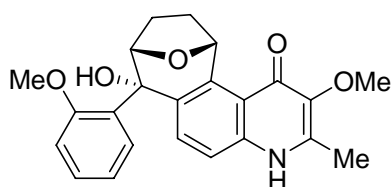


Figura 23 – Alcalóide Waltheiona-A e sua estereoquímica

A análise da Difração de Raios-X de Waltheriona-B ficou impossibilitada devido a não formação de cristais que fossem possíveis de serem analisados por este método. Felizmente, um dos derivados obtidos da reação de metilação deste alcalóide, o menos polar em CCD (WBp2, produto O-metilado), formou cristais que puderam ser analisados por Difração de Raios-X (Figura 24).

A estrutura elucidada comprova que Waltheriona-B é realmente um diastereoisômero de Waltheriona-A. Além disso, foi possível concluir que o cristal formado, o menos polar, trata-se do produto de O-metilação. A estrutura obtida

através da Difração de Raios-X, nos mostra o dado mais importante, um dos objetivos do trabalho, que os dois alcalóides se diferenciam apenas na disposição espacial dos substituintes localizados nos carbonos C-9, C-10 e C-13. Em Waltheriona-B, a hidroxila em C-9 se encontra em uma posição *syn* ao oxigênio ponte entre C-10 e C-13. Isto nos permite propor uma estereoquímica relativa 9*R*, 10*R*, 13*S*. Dados adicionais obtidos da Difração de Raios-X encontram-se em anexo (Anexo 3).

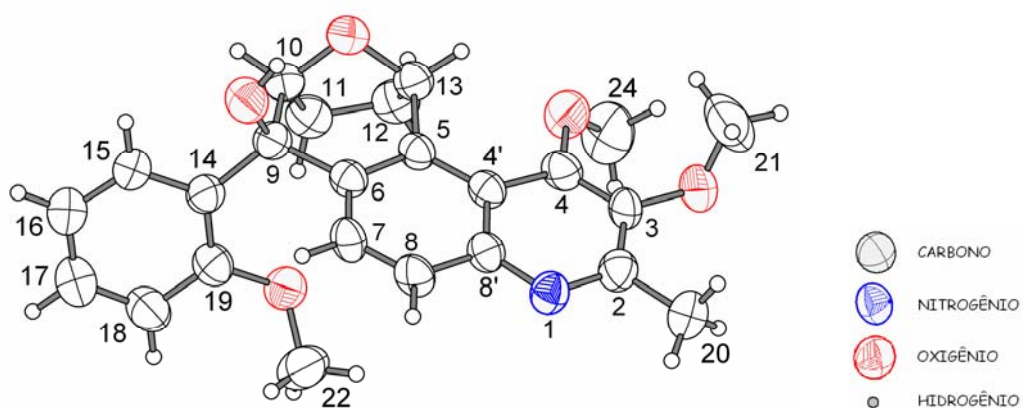


Figura 24 – Estrutura do produto menos polar da reação de metilação de Waltheriona-B obtida por Difração de Raios-X

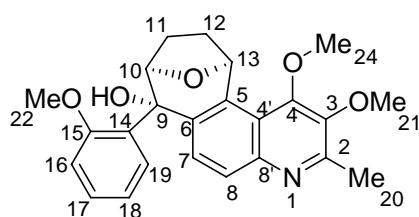


Figura 25 – Alcalóide Waltheiona-B e sua estereoquímica

Mesmo já se conhecendo a estereoquímica do alcalóide WA, realizou-se a análise de Difração de Raios-X do produto mais polar da reação de metilação (WAp1), o qual foi possível de ser cristalizado em diclorometano à temperatura ambiente e obteve-se a seguinte estrutura (Figura 25):

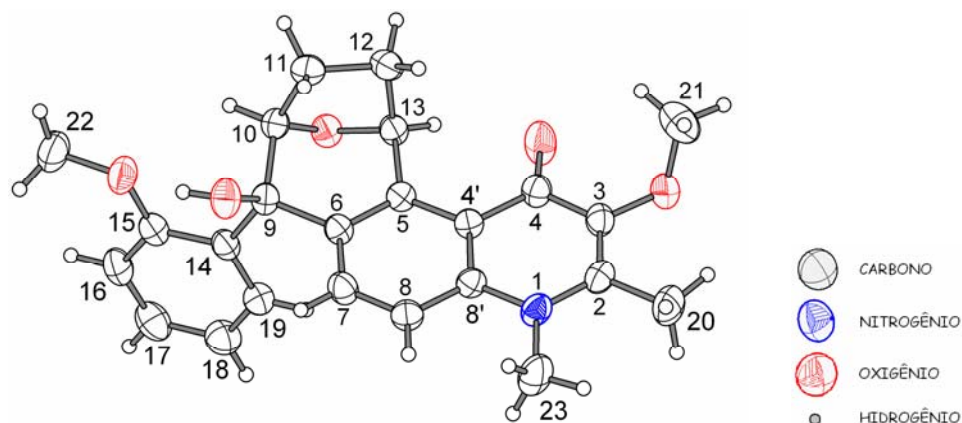


Figura 26 – Estrutura do produto menos polar da reação de metilação de Waltheriona-A obtida por Difração de Raios-X

Os dados mostraram que o produto menos polar obtido da reação resultou na N-metilação do alcalóide. Dados adicionais obtidos da Difração de Raios-X encontram-se em anexo (Anexo 4).

5.5.2.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos alcalóides WA e WB foi realizada a fim de ser comparada com as diferentes estereoquímicas das estruturas, uma vez que diastereoisômeros podem apresentar propriedades físicas, químicas e farmacológicas diferentes.

Os dados obtidos estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana obtidos pelo método de bioautografia de Waltheriona-A e -B

Microrganismo	Resultado positivo (μg)		Padrão (μg)
	Waltheriona-A	Waltheriona-B	
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	12,5	0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	50	0,7
<i>Escherichia coli</i>	NA	25	0,5
<i>Salmonella setubal</i>	100	25	0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	25	0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	50	12,5	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	12,5	0,6
<i>Sacharomyces cereviase</i>	NA	NA	3,24
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	2,43
<i>Candida dubliniensis</i>	NA	NA	4,05
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	NA	2,43

NA = não ativo

Os dados obtidos revelaram atividade de ambas as moléculas frente às bactérias testadas, com exceção da WA para *E. coli*. Observou-se também que o alcalóide WB apresentou atividade em concentrações menores que o alcalóide WA, apresentando assim um maior potencial antimicrobiano.

Testes de atividade biológica pelo método da CIM dos alcalóides WA, WB e de seus derivados (WAp1, WAp2, WBp1 e WBp2) também foram realizados (concentrações: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados obtidos estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana obtidos pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de WA, WAp1, WAp2, WB, WBp1 e WBp2.

Microorganismos	WA		WAp1		WAp2		WB		WBp1		WBp2		Padrão ^a
	CIM ^a	CLM ^a	CIM ^a	CLM ^a	CIM ^a	CLM ^a	CIM ^a	CLM ^a	CIM ^a	CLM ^a	CIM ^a	CLM ^a	
<i>S. aureus</i>	>200	-	200	>200	200	>200	200	>200	>200	-	>200	-	3,12
<i>S. epidermidis</i>	>200	-	200	>200	200	>200	>200	>200	>200	-	>200	-	3,12
<i>E. coli</i>	>200	-	200	>200	200	>200	200	>200	>200	-	>200	-	3,12
<i>S. setubal</i>	>200	-	200	>200	200	>200	200	>200	>200	-	>200	-	3,12
<i>K. pneumoniae</i>	>200	-	200	>200	200	>200	200	>200	>200	-	>200	-	1,56
<i>B. subtilis</i>	>200	-	200	>200	200	>200	200	>200	>200	-	>200	-	3,12
<i>P. aeruginosa</i>	>200	-	200	>200	200	>200	200	>200	>200	-	>200	-	1,56
<i>S. cerevisiae</i>	>200	-	200	>200	200	>200	>200	>200	>200	-	>200	-	5,15
<i>C. albicans</i>	>200	-	200	>200	200	>200	>200	>200	>200	-	>200	-	10,3
<i>C. dubliniensis</i>	>200	-	200	>200	200	>200	>200	>200	>200	-	>200	-	10,3
<i>C. neoformans</i>	>200	-	200	>200	200	>200	>200	>200	>200	-	>200	-	5,15

^a em µg/mL

(-) não testada

5.5.2.5 Atividade antioxidante

Os alcalóides WA e WB não apresentaram atividade antioxidante pelo método de DPPH para concentrações menores e iguais a 100 µg.

5.5.3 Alcalóide VG8

Este composto foi isolado da fração etérea básica (conforme descrito no item 4.6.2.1.4, pág. 23), apresentando-se, depois de purificado, como um óleo de coloração amarela (25 mg) que reagiu positivamente frente ao reagente de Dragendorff, sugerindo a presença de nitrogênio básico na sua estrutura molecular.

A aplicação de métodos físicos de análises, como Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C e experimentos uni e bidimensionais, homo e heteronucleares, assim como, a comparação de dados espectrais referentes ao alcalóide Antidesmona (item 5.4.1, pág. 32) contribuíram para as atribuições dos sinais e sugerir a seguinte estrutura (Figura 27) para este metabólito.

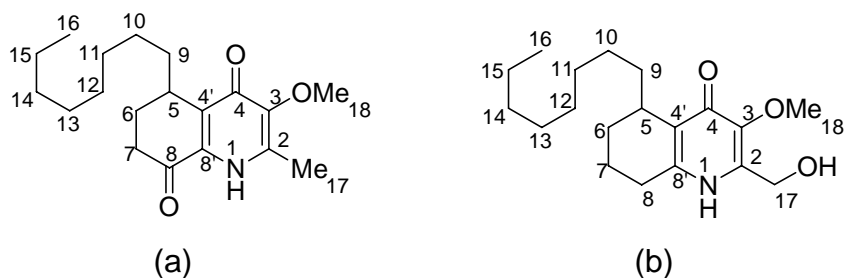


Figura 27 – Estrutura de Antidesmona (a) e estrutura proposta para o alcalóide VG8 (b)

5.5.3.1 Espectrometria de massas

O espectro de massa de alta resolução (HRESIME) foi de grande importância na elucidação estrutural da molécula, pois este apresentou um íon quase molecular $[M+H]^+$ de m/z 322,2377200 (calculado para $C_{19}H_{31}NO_3$ 322,2376703), definindo a fórmula molecular (Figura 28 e 29).

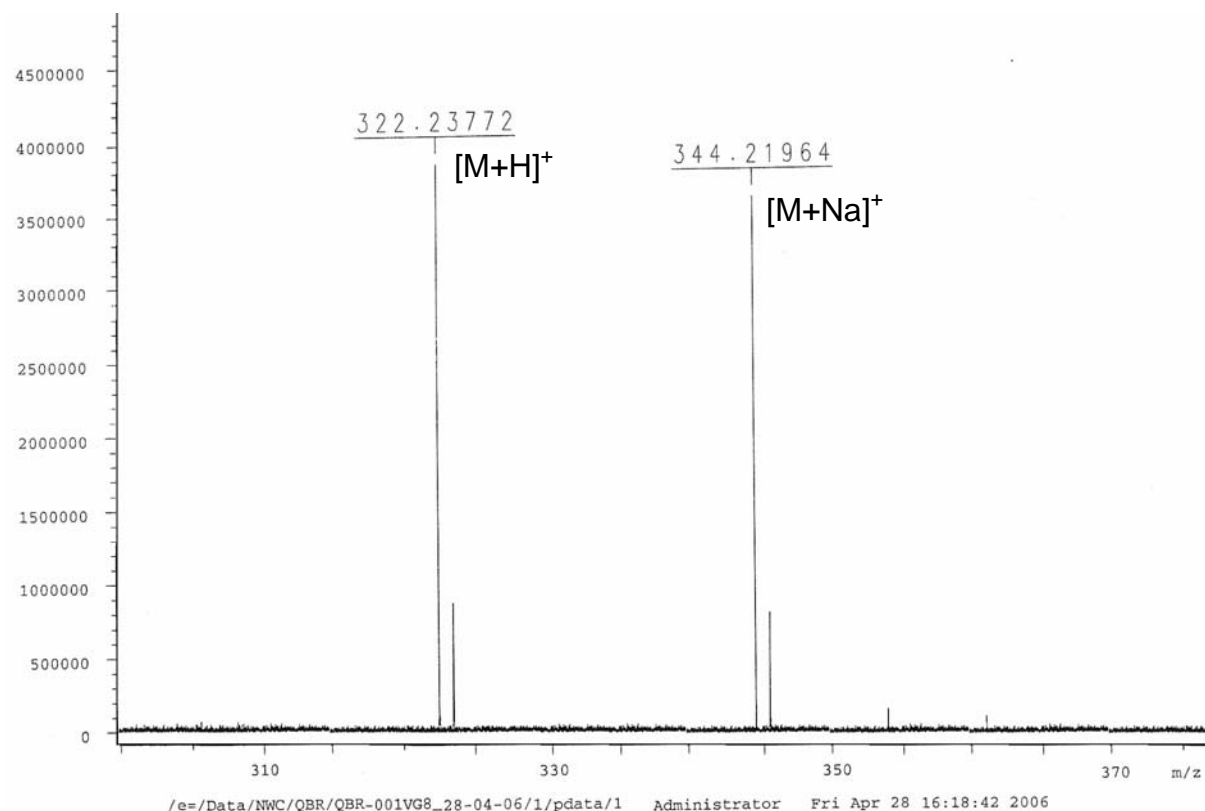


Figura 28 - Espectro de Massas de VG8 (m/z 300 a 375).

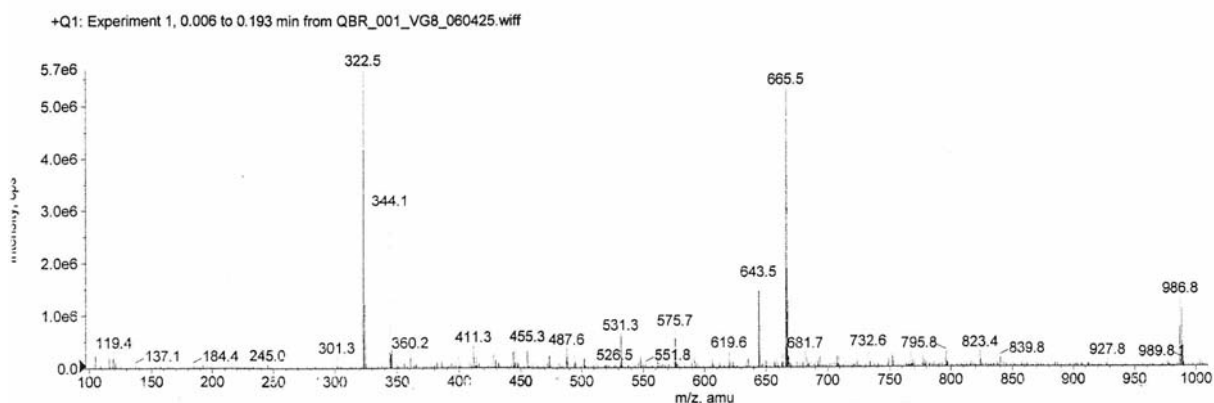


Figura 29 - Espectro de Massas de VG8 (m/z 100 a 1000).

5.5.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 30) mostrou uma grande semelhança com o espectro de hidrogênio do alcalóide Antidesmona, como a presença de uma metila terminal (H-16) ligada a um $-\text{CH}_2-$ (t) em δ 0,85 ppm e vários hidrogênios metilênicos sobrepostos na região de δ 1,23 a δ 1,29 ppm (H-10 a H-15), sugerindo também apresentar uma cadeia carbônica lateral. Outra semelhança apresentada pelos espectros de ^1H foi a presença de um singlete intenso em δ 3,75 ppm representando um grupamento metila de uma metoxila ligada a um sistema aromático (H-18). Pôde-se também observar a presença de um sinal alargado na região de δ 2,95 ppm o qual foi atribuído ao hidrogênio metínico da molécula (H-5) e um sinal em δ 4,75 ppm atribuído a 2 hidrogênios ($-\text{CH}_2-$) vizinhos a um $-\text{OH}$ (H-17). Estes dados permitiram a atribuição de sinais de vários prótons presentes na estrutura (Figura 27b).

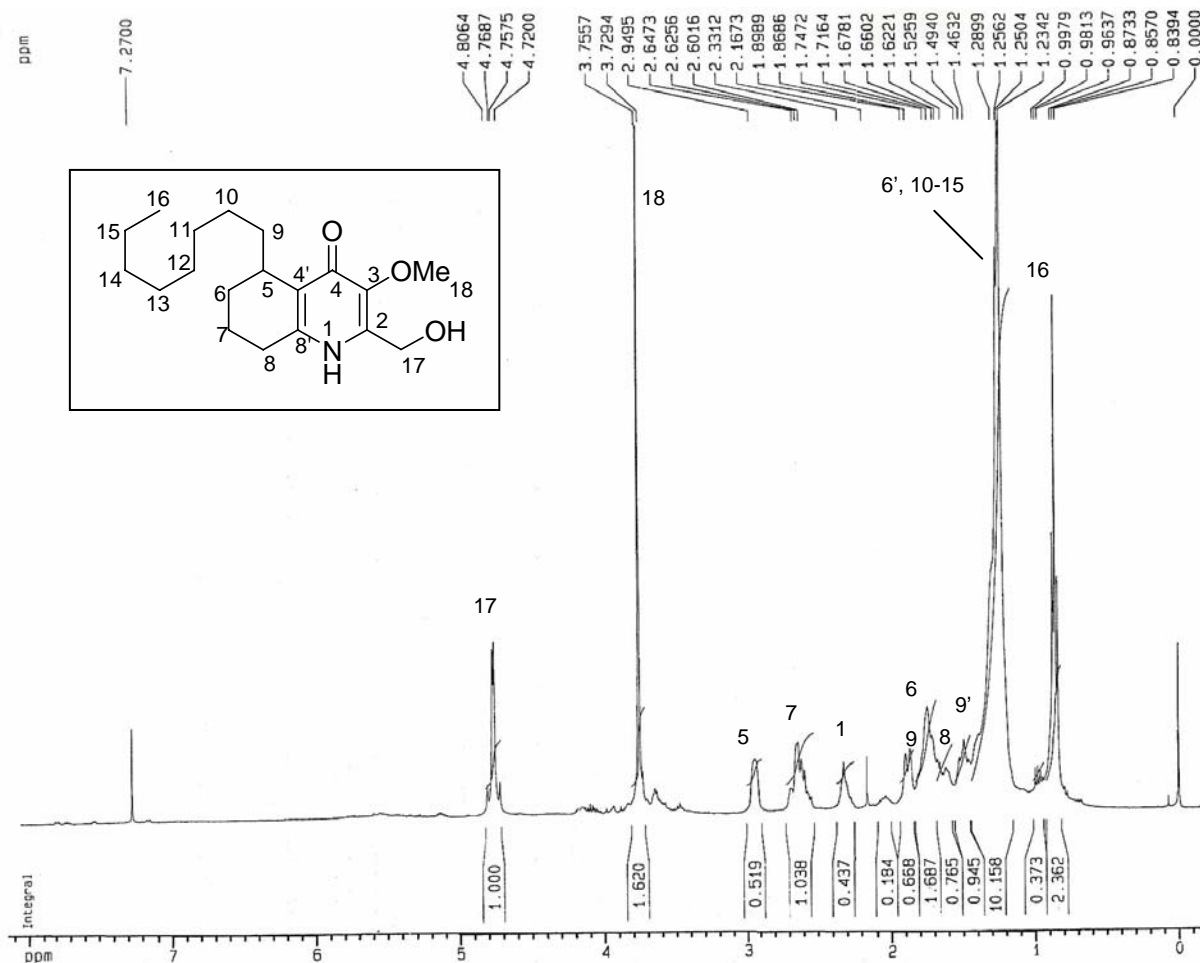


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C.

5.5.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY)

O espectro de RMN de 2D, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de VG8, assim como o espectro de COSY de Antidesmona, revela a presença de um único sistema de spin na molécula (Figura 31 e 32), no qual é possível observar a correlação entre a metila terminal e o $-\text{CH}_2-$ adjacente da cadeia carbônica, além de correlações entre os $-\text{CH}_2-$ desta mesma cadeia. É possível observar uma mesma correlação entre o hidrogênio metínico H-5 (δ 2,95 ppm) e hidrogênios diastereotópicos H-9 (δ 1,74 ppm e δ 1,25 ppm). Além disso, pôde-se observar a correlação entre os hidrogênios diastereotópicos H-6 e H-7.

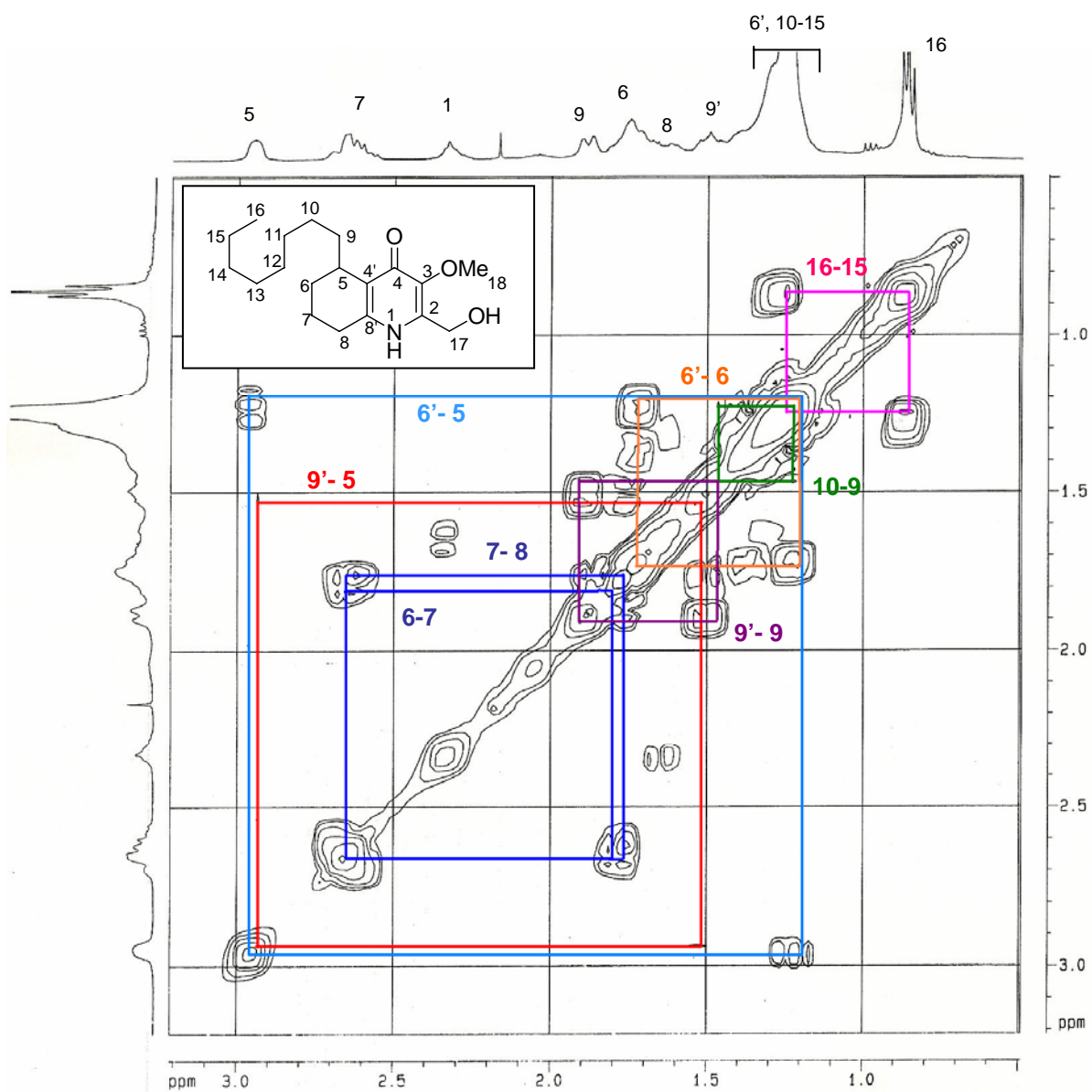


Figura 31 - Espectro de RMN de COSY ^1H - ^1H expandido (região de campo alto) de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C.

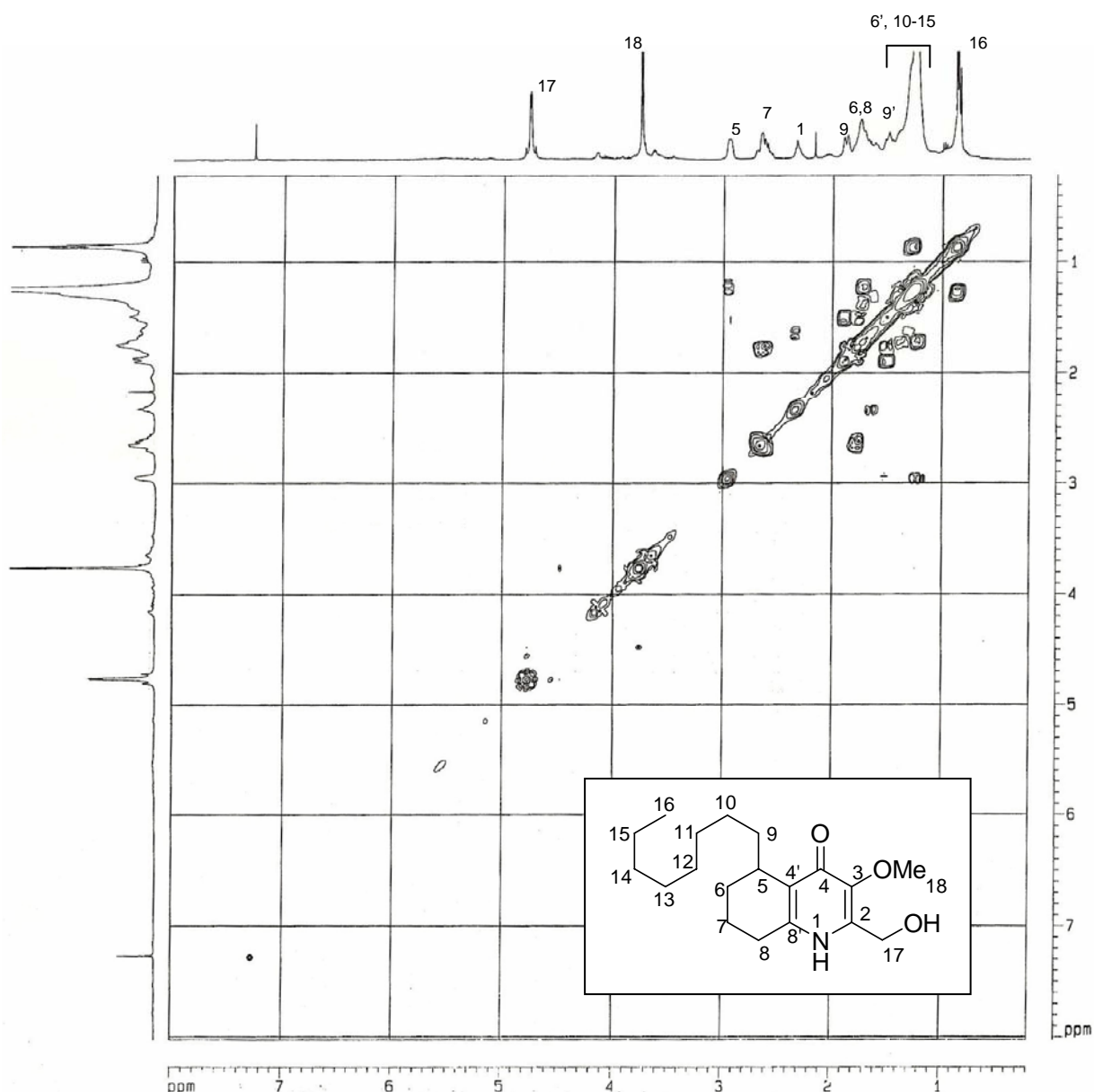


Figura 32 - Espectro de RMN de COSY ^1H - ^1H de VG8 em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25°C .

5.5.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 33) mostrou a presença de 19 sinais, confirmando com os dados obtidos do espectro de massas.

Novamente se comparou os resultados obtidos de RMN de ^{13}C com os da Antidesmona, observando-se várias semelhanças, como a presença de quatro sinais entre δ 125 ppm a δ 150 ppm, sugerindo quatro carbonos de dupla ligação fazendo parte do sistema aromático da molécula; a presença de um carbono carbonílico em δ 172,29 ppm fazendo parte do sistema aromático, semelhante ao apresentado pela

Antidesmona (δ 173,35 ppm). Outra semelhança apresentada é a presença de um sinal em campo alto (δ 14,04 ppm) referente à metila terminal C-16, além de onze sinais entre δ 15 ppm a δ 35 ppm que se referem aos carbonos da cadeia carbônica lateral (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), $-\text{CH}_2-$ do ciclo (C-6, C-7, C-8) e o carbono metínico (C-5).

Diferentemente do espectro de RMN de ^{13}C da Antidesmona, o espectro de VG8 apresentou um sinal a mais em δ 56,05 ppm, sinal em deslocamento químico típico de um carbono ligado a um oxigênio, além da ausência do sinal referente à segunda carbonila de Antidesmona (δ 195,91 ppm).

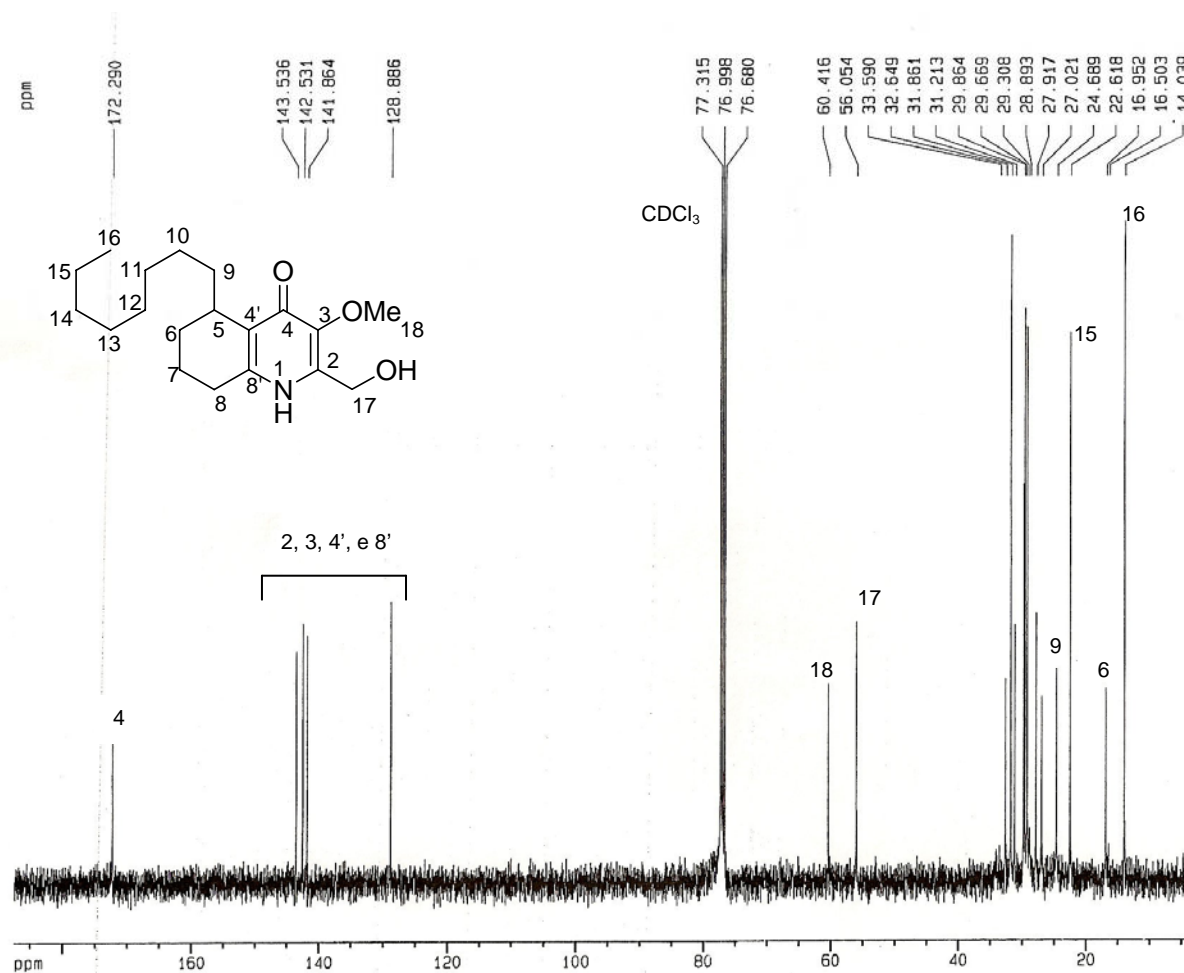


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C de VG8 em CDCl_3 a 100,62 MHz e 25°C.

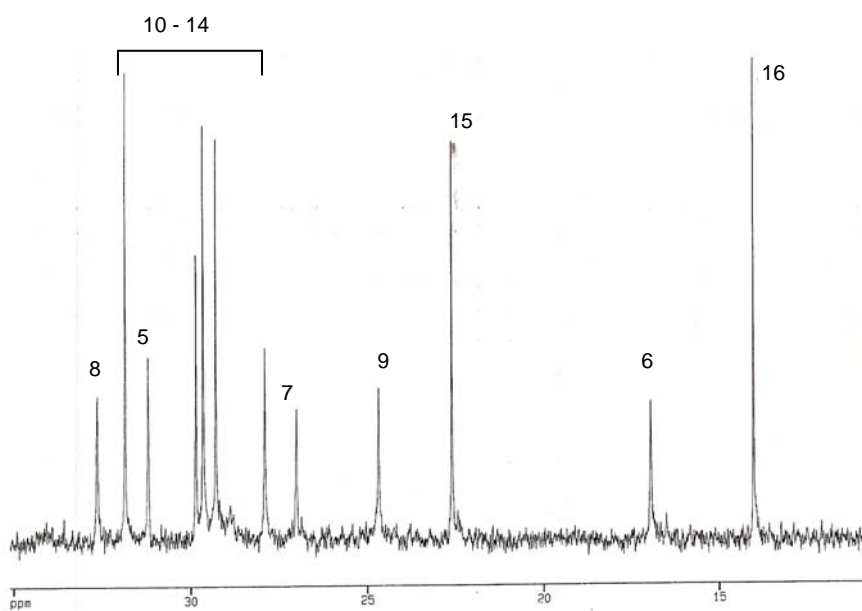


Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C expandido (região de campo alto) de VG8 em CDCl_3 a 100,62 MHz e 25°C .

5.5.3.5 Ressonância Magnética Nuclear ^1H - ^{13}C (HMQC)

O espectro bidimensional heteronuclear HMQC (Figuras 35 e 36) auxiliou na confirmação dos deslocamentos químicos dos carbonos protonados de VG8 através da correlação de cada um deles com seu(s) respectivo(s) hidrogênio(s). Este espectro proporcionou a identificação dos sinais referentes aos hidrogênios diastereotópicos H-9 e H-9' vizinhos ao carbono quiral C-5. Os dois prótons apresentam um desdobramento de sinal e, portanto, absorvem em campos diferentes, δ 1,46 ppm e δ 1,88 ppm, o que pode ser visto através da correlação com o mesmo carbono δ 24,69 ppm. É possível observar ainda a presença de cinco carbonos quaternários (um carbono carbonílico e quatro carbonos de dupla ligação do sistema aromático), os quais não apresentam nenhuma correlação com os sinais dos hidrogênios.

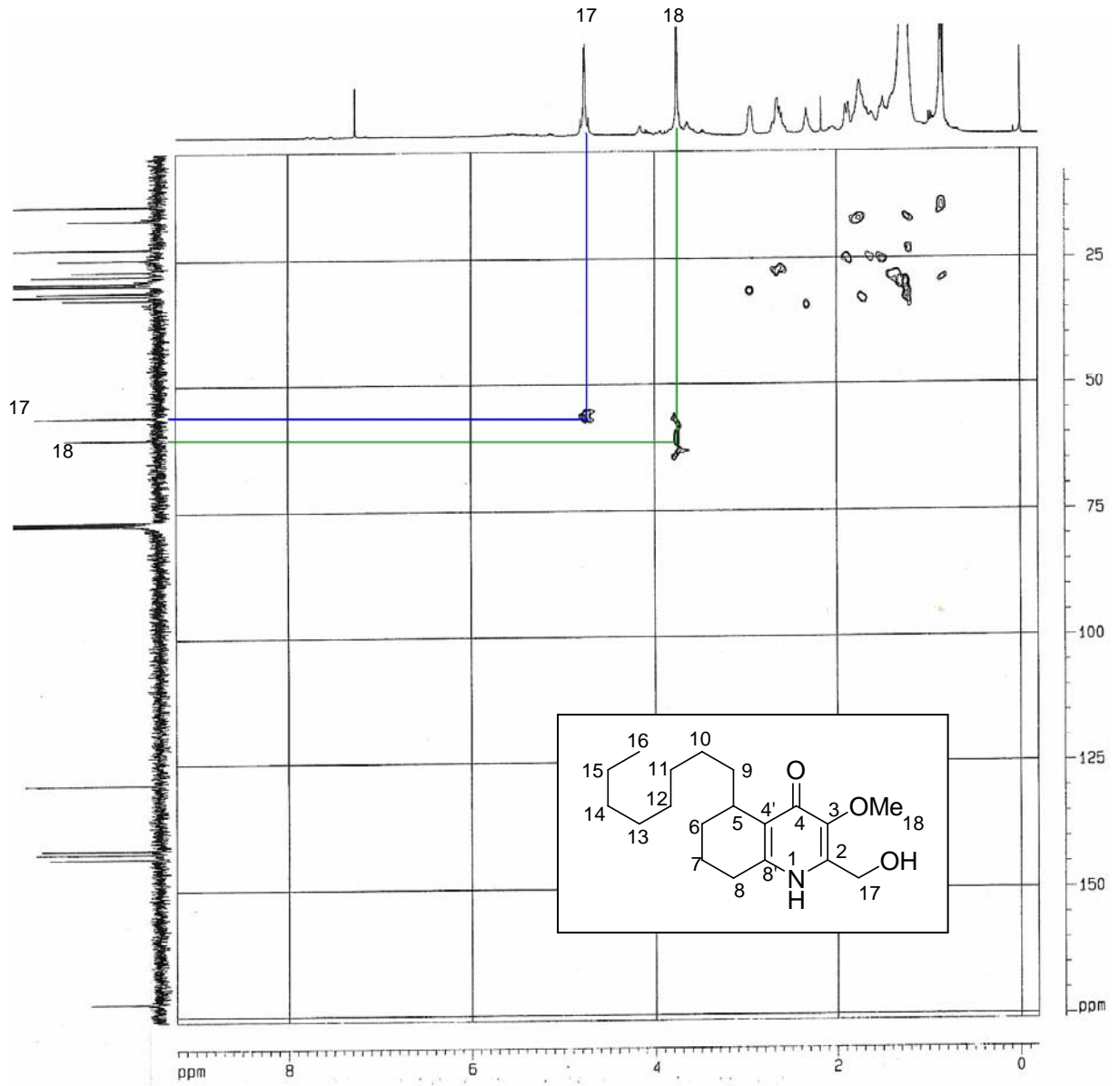


Figura 35 - Espectro de RMN HMQC de VG8 em CDCl₃ a 25°C.

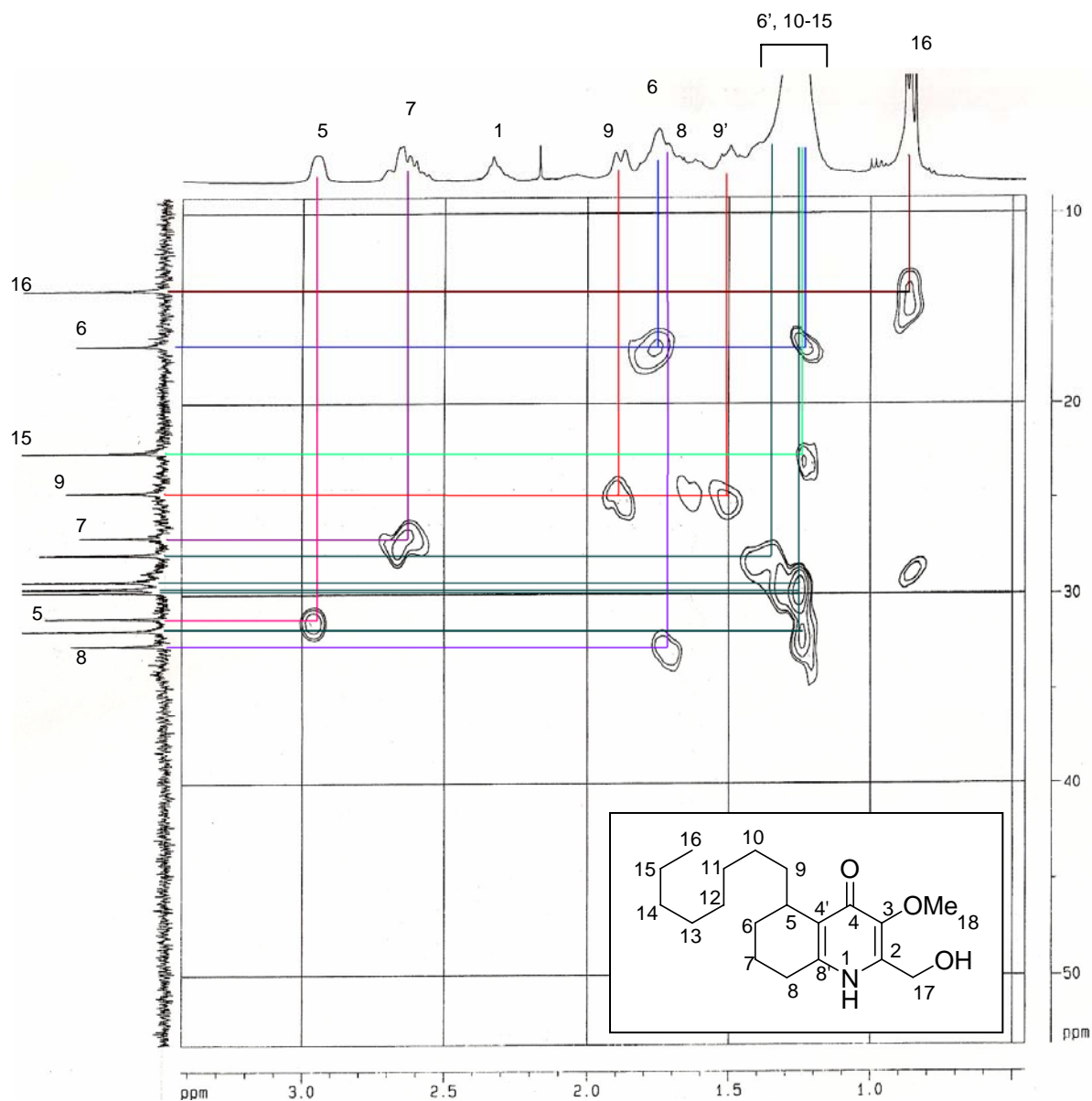


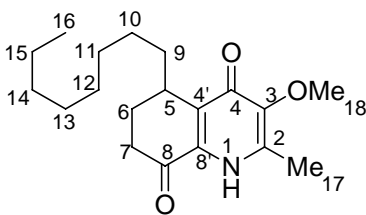
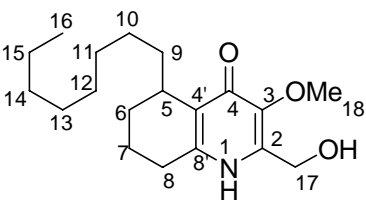
Figura 36 - Espectro de RMN 2D HMQC expandido (região de campo alto) de VG8 em CDCl₃ a 400,13 MHz e 25°C.

Após estas análises e buscas na literatura, conclui-se que o composto codificado como VG8 se trata de um alcalóide quinolônico inédito.

5.5.3.6 Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H de Antidesmona com o alcalóide isolado VG8

Os dados tabelados a seguir (Tabela 8) mostram as semelhanças dos sinais e deslocamentos químicos obtidos por análise de RMN de ^1H entre o alcalóide Antidesmona e o alcalóide VG8.

Tabela 8: Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do alcalóide Antidesmona com VG8

Antidesmona			VG8		
					
Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	8,75	-	1	2,33	-
2	-	138,14	2	-	128,89 – 143,54
3	-	147,61	3	-	128,89 – 143,54
4	-	173,35	4	-	172,29
4'	-	139,1	4'	-	128,89 – 143,54
5	3,25	30,31	5	2,95	31,21
6	2,07	24,44	6	1,71	16,95
7	2,59	32,25	7	2,62	27,02
8	-	194,91	8	1,53	33,59
8'	-	132,00	8'	-	128,89 – 143,54
9	1,38	30,58	9	1,46	24,68
10-15	1,26	22-31	10-15	1,23-1,29	22,61-33,59
16	0,85	14,06	16	0,85	14,04
17	2,35	14,61	17	4,76	56,05
18	3,93	59,39	18	3,75	60,42

5.5.3.7 Atividade antimicrobiana

Para a determinação da Quantidade de Substância Ativa (QSA) pelo método de bioautografia, se verificou as concentrações de 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg, 3,12 µg, 1,56 µg, 1,00 µg, 0,75 µg e 0,5 µg. Houve formação de zonas de inibição para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas nas concentrações apresentadas a seguir (Tabela 9):

Tabela 9 – Resultados obtidos dos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia de VG8

Microrganismo	Resultado positivo (µg)	Padrão (µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,25	0,7
<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,5
<i>Salmonella setubal</i>	3,12	0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	6,25	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5	0,6
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	NA	3,24
<i>Candida albicans</i>	NA	2,43
<i>Candida dubliniensis</i>	NA	4,05
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	2,43

NA = não ativo

A determinação da atividade antimicrobiana também foi testada pelo método da CIM nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg mL⁻¹. Além da determinação da CIM, este teste também permitiu determinar os valores de CLM (Concentração Letal Mínima). A amostra foi testada em triplicata e as médias dos resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados obtidos dos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de VG8

Microorganismos	VG8		Padrão
	CIM ^a	CLM ^a	CIM ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	-	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>100	-	1,56
<i>Escherichia coli</i>	50	>100	3,12
<i>Salmonella setubal</i>	50	>100	3,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	>100	1,56
<i>Bacillus subtilis</i>	>100	-	1,56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	-	1,56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>100	-	5,15
<i>Candida albicans</i>	>100	-	5,15
<i>Candida dubliniensis</i>	>100	-	5,15
<i>Cryptococcus neoformans</i>	>100	-	5,15

^a em µg/mL

(-) não testada

Pode-se observar que o alcalóide VG8 apresentou atividade contra os microrganismos *E. coli*, *S. setubal* e *K. pneumoniae* (50 µg mL⁻¹) pelo método da CIM, e como o valor de CIM obtido foi inferior ao valor de CLM, o alcalóide apresenta, então, propriedades bacteriostáticas. Pode-se observar também que os microrganismos inibidos por este método são os mesmos que os inibidos em maior potencial (0,5 a 3,12 µg) pelo método de bioautografia.

5.5.3.8 Atividade antioxidante

O alcalóide VG8 foi verificado quanto ao seu poder antioxidante pelo método descrito anteriormente (item 4.9). Os resultados mostraram que este metabólito não apresenta atividade antioxidante nas concentrações testadas (100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg e 6,25 µg).

5.5.4 Chamaedrina

O alcalóide V14 foi isolado conforme descrito no item 4.6.2.1.5 (pág. 23) e foram obtidos 16 mg na forma de sólido branco. A substância foi analisada frente aos reagentes Dragendorff e Ehrlich (para triptofano) e com ambos apresentou resultado positivo. O ponto de fusão apresentado pelo metabólito foi de 226°C (literatura: 222-223 °C), o que sugeriu tratar-se do alcalóide já isolado pelo grupo⁴⁶, Chamaedrina (isolado de *Melochia chamaedrys*, Figura 37). Para confirmação utilizou-se análise por comparação desta substância com amostra autêntica de Chamaedrina por CCD em diversos sistemas de solventes e foi verificado um mesmo Rf (0,45 em CH₂Cl₂/MeOH 98:1 v/v). Desta forma, o metabólito V14 se trata do alcalóide Chamaedrina.

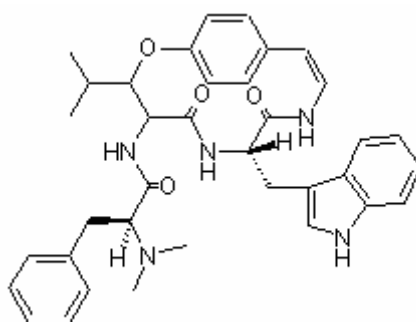


Figura 37 – Estrutura química de Chamaedrina

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho com a raiz da espécie *Waltheria douradinha* St. Hil., e analisando-se os resultados obtidos, conclui-se que:

- Foram isolados seis alcalóides, sendo destes quatro pertencentes à classe das quinolonas - Antidesmona (Figura 6), WA e WB (Figura 14) e VG8 (Figura 27b) - e dois pertencentes à classe dos ciclopeptídicos - Waltherina-A (Figura 13) e Chamaedrina (Figura 37), além de uma amida – (O)-metiltembamida (Figura 7). Destes metabólitos isolados, o Waltherina-A, o WA e o WB já foram isolados anteriormente desta espécie pelo grupo e descritos na literatura; os alcalóides Antidesmona e o Chamaedrina e a amida também já estão descritos na literatura, porém são inéditos na espécie estudada; e o alcalóide VG8, apesar de apresentar estrutura semelhante da Antidesmona, não apresenta referências, portanto inédito.
- Os alcalóides WA e um dos produtos da reação de metilação de WB (WBp2), após análise de seus cristais por Difração de Raios-X, apresentaram estereoquímicas relativas 9*R*, 10*S*, 13*R* e 9*R*, 10*R*, 13*S* respectivamente, mostrando que WA e WB tratam-se de diastereoisômeros.
- A ação antimicrobiana das partes da espécie (raiz, caule, folha e flor) e as subfrações do extrato bruto da raiz foram analisadas e estas (com exceção da fração etérea ácida da raiz) apresentaram atividade principalmente contra as bactérias testadas na concentração de 50 µg.
- A amida (O)-metiltembamida e os alcalóides Waltherina-A, WA, WB e VG8 isolados, bem como os derivados de WA e WB foram submetidos ao teste de atividade antimicrobiana pelo método da CIM. Destes, apenas o alcalóide VG8 apresentou boa atividade, obtendo-se uma CIM de 50 µg mL⁻¹ para *E.*

coli, *S. setubal* e *K. pneumoniae*. Mesmo não apresentando atividade antimicrobiana ou em concentrações relativamente altas ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), as demais substâncias isoladas desta espécie não deixam de ser importante, o que pôde ser observado com a Antidesmona (a qual apresenta atividade antitrypanossômica) e a (O)-metiltembamida (que apresenta atividade anti-HIV), podendo apresentar aplicações ainda não estudadas.

- Através do teste de atividade antioxidante, pelo método de DPPH, observou-se que os extratos e as subfrações de *W. douradinha* apresentam boa atividade, mas as substâncias puras isoladas não são ativas até concentrações de $100 \mu\text{g}$. O aparecimento de ação antioxidante dos extratos e a ausência desta atividade dos compostos isolados sugerem o estudo da sinergia entre os compostos ou o isolamento de outras substâncias ainda não conhecidas a fim de justificar os resultados obtidos.

- De forma geral, os dados apresentados mostram que a *W. douradinha* apresenta grande potencial medicinal, o que pode ser visto através das análises de atividades efetuadas de todas as partes da planta bem como de várias substâncias isolados, não contrariando, assim, seu uso popular. Desta forma, esta espécie se torna atraente para contínuas pesquisas e talvez futura aplicação na medicina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOREIRA, F.; **Plantas que curam: Cuide da sua saúde através da natureza.** São Paulo, Ed. Hemus LTDA, 5ª ed., p. 183, 1996.
2. MARTINS, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E.; **Plantas Medicinais.** Viçosa-MG, Ed. UFV, 5ª ed, p. 15-19, 2003.
3. BARROSO, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichalso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L.; **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Livros Técnicos e Científicos, Ed USP, v.1, p. 155, 1978.
4. CORRÊA, M. P.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v.2, p. 541, 1931.
5. LORENZI, H.; Matos, F. J. A.; **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas.** Nova Odessa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, p. 469-470, 2002.
6. SIMÕES, A. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E. P.; Irgang, B. E.; Stehmann, J. R.; **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, Ed da UFRGS, p. 56-57, 1986.
7. RAGASA, C. Y.; Cruz, C. A.; Chiong, I. D.; Tada, M.; Rideout, J. A.; **Antifungal flavonoids from *Waltheria americana*.** *Philippine Journal of Science.* 126:3, 243-250, 1997.
8. PETRUS, A. J. A.; **Polyphenolic components of *W. indica*.** *Phytochemical Communications - Fitoterapia.* 61:4, p. 371, 1990.
9. VASQUES, C. A. R.; Côrtes, S. F.; Silva, M. S.; Medeiros, I. A.; **Muscarinic agonist properties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheria viscosissima* St. Hil. (*Sterculiaceae*) in rats.** *Phytoterapy Research.* 13, p. 312-317, 1999.
10. GEHRKE, I. T. S.; **Alcalóides ciclopeptídicos isolados de *Waltheria douradinha* (*Sterculiaceae*).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1998.
11. HOELZEL, S. C. da S. M. **Estudo fitoquímico, morfo-histoquímico e atividade antimicrobiana da casca da raiz de *Waltheria douradinha* Saint Hilaire.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
12. MOREL, A. F.; Hoelzel, S. C. S. M.; Vieira, E. R.; Giacomelli, S. R.; Dalcol, I. I.; Zanatta, N., **An Unusual Quinolinone Alkaloid from *Waltheria douradinha*.** *Phytochemistry,* 66, p. 1163-1167, 2005.

13. MOREL, A. F.; Gehrke, I. T. S.; Mostardeiro, M. A.; Ethur, E. M.; Zanatta, N.; Machado, E. C. S.; **Cyclopeptide alkaloids from the bark of *Waltheria douradinha***. *Phytochemistry*, 51, p. 473-477, 1999.
14. MOREL, A. F.; Flach, A.; Zanatta, N.; Ethur, E. M.; Mostardeiro, M. A. e Gehrke, I. T. S.; **A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha***. *Tetrahedron Letters*, 40, p. 9205-9209, 1999.
15. JOLY, A. B., **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal**. 2. ed., p. 450-463, 1977.
16. KAPADIA, G. J.; Paul, B. D.; Silverton, J. V.; Fales, H. M.; Sokoloski, E. A.; **Melochinone, a novel quinolinone from *Melochia tomentosa* L.** *J. Am. Chem. Soc.* 97:23, p. 6814, 1975.
17. KAPADIA, G. J.; Shukla, Y. N.; Bask, S. P.; **Melovinone, an open chain analogue of melochinone from *Melochia tomentosa***. *Phytochemistry*. 17, p. 1444-1445, 1978.
18. KAPADIA, G. J.; Shukla, Y. N.; Bask, S. P.; **The melosatins-a novel class of alkaloids from *Melochia tomentosa***. *Tetrahedron*. 36, p. 2441-2447, 1980.
19. PAÏS, M.; Mainil, J.; Goutarel, R.; **Les adouétines X, Y et Z, alcalóides du *Waltheria americana* L. (Sterculiacées)**. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 21:2, p. 139-146, 1963.
20. TSCHESCHE, R.; Reutel, I.; **Alkaloide aus sterculiaceen, I: Über Peptidalkaloide aus *Melochia corchorifolia***, *Tetrahedron Letters*, 9:35, p. 3817-3818, 1968.
21. MEDINA, E.; Spitteller, G.; **Structure of melochinine, a new type of a pyridone alkaloid from *Melochia pyramidata***. *Liebigs Ann. Chem.*, 112:1, p. 376-383, 1979.
22. KAPADIA, G. J.; Shukla, Y. N.; Morton, J. F.; Lloyd, H. A.; **New cyclopeptide alkaloids from *Melochia tomentosa***. *Phytochemistry*. 16, p. 1431-1433, 1977.
23. BHAKUNI, R. S.; Shukla, Y. N.; Thakur, R. S.; **Cyclopeptide alkaloids from *Melochia corchorifolia***. *Phytochemistry*. 26:1, p. 324-325, 1987.
24. LESHNER, G. Y.; Froelich, D. E.; Guert, M. D.; **1,8 naphthydine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents**. *J. Med. Pharm. Chem.* 5, p. 1063-1068, 1962.
25. MITSCHER, L. A.; **Bacterial topoisomerase inhibitors: Quinolone and pyridine antibacterial agents**. *Chem. Rev.* 105, p. 559-592, 2005.
26. Zufiaurre-Gutiérrez, N.; **Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas**. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17:3, p. 232-243, 2004.

27. HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A.; Barbosa, J.; Compañó, R.; Prat, M. D.; **Analysis of quinolone residues in edible animal products – Review.** *Journal of Chromatography A.* 945, p. 1-24, 2002.
28. JACKSON, L. C.; Reyes, L. A. M.; Cordiés, M. L. H.; **Quinolonas y terapia antimicrobiana.** *Acta Medica.* 8:1, p. 58-65, 1998.
29. BIAVATTI, M. W.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F. da; Fernández, J. B.; Victor, S. R.; Pagnocca, F. C.; Albuquerque, S.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; **Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of Flindersiamine.** *J. Braz. Chem. Soc.*, 13:1, p. 66-70, 2002.
30. WERNY, F.; Scheuer, P. J.; **Hawaiian plant studies-IX: The alkaloids of *Platydesma campanulata* mann.** *Tetrahedron.* 19, p. 1293-1305, 1963.
31. REISCH, J.; Rozsa, Zs.; Szendrei, K., Korösi, J. ; **2-(n-Undecyl)-chinolon-(4) aus den blüten von *Ptelea trifoliata* und den wurzeln von *Ruta graveolens*.** *Phytochemistry.* 14 :3, p. 840-841, 1975.
32. KOSTOVA, I.; Ivanova, A.; Mikhova, B.; Klaiber, I.; **Alkaloids and cumarins from *Ruta graveolens*.** *Monatshefte für Chemie Chemical Monthly,* 130, p. 703-707, 1999.
33. OLIVA, A.; Meepagala, K. M.; Wedge, D. E.; Harries, D.; Hale, A. L.; Aliotta, G.; Duke, S. O.; **Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid.** *J. Agric. Food Chem.* 51, p. 890-896, 2003.
34. TOUATI, D.; Atta-ur-Rahman; Ulubelen, A.; **Alkaloids from *Ruta Montana*.** *Phytochemistry.* 53:2, p. 277-279, 2000.
35. DUFFIELD, A. M.; Jefferies, P. R.; **The chemistry of the western Australian Rutaceae. III. The isolation of *Boronia ternate* Endl.** *Aust. J. Chem.* 16:2, p. 292-294, 1963.
36. AHSAN, M.; Gray, A. I.; Leach, G.; Waterman, P.; **Quinolone and acridone alkaloids from *Boronia lanceolata*.** *Phytochemistry.* 33:6, p. 1507-1510, 1993.
37. KAN-FAN, C.; Das, B. C.; Boiteau, P.; Potier, P.; **Alcaloïdes de *Vepris ampody* (Rutacées).** *Phytochemistry.* 9, p. 1283-1291, 1970.
38. SARTOR, C. F. P.; Silva, M. F. G. F. da.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Fo, E. R.; Cortez, D. A. G.; **Alkaloids from *Dictyoloma vandellianum*: their chemosystematic significance.** *Phytochemistry.* 63, p. 185-192, 2003.
39. SCHMIDT, U.; Lieberknecht, A.; Haslinger, E.; **The Alkaloids**, ed. A. Brossi, Academic Press, New York, v.26, p 299-306, 1985.
40. TAN, N-T.; Zhou, J.; **Plant Cyclopeptides.** *Chem. Rev.* 106, p. 840-895, 2006.
41. PAÏS, M.; Monseur, X.; Lusinchi, X.; Goutarel, R.; *Bull. Soc. Chim Fr.*, 817, 1964.

42. GOURNÉLIS, D. C.; Laskaria, G. G.; Verpoorte, R.; **Cyclopeptide alkaloids**. *Nat. Prod. Rep.*, 14:1, 75-82, 1997.
43. BHAT, K. L.; Joullie, M. M.; *J. Chem. Educ.*, 64, 21, 1987.
44. TSCHESCHE, R.; Kaussaman, E. V.; **The Alkaloids**, v.15, Manske (ed). Academic Press, New York, N. Y., p. 165, 1975.
45. HENNING, P.; Tese de Doutorado, Universidade de Tübingen, Tübingen, Alemanha, 1985.
46. **Reactivos de coloración para cromatografía em capa fina y em papel**. E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha, p. 17.
47. DIAS, G.C.D.; Gressler, V.; Hoenzel, S.C.S.M.; Silva, U.F.; Morel, A.F.; **Constituents of *Melochia chamaedrys***. *Phytochemistry* (artigo aceito em 06 junho, 2006).
48. RAHALISON, L.; Hamburger, M. O.; Hostettmann, K.; Monod, M.; Frenk, E.; **Bioautographis agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants**. *Phytochemical Analysis*. 2, p. 199-203, 1991.
49. HAMBURGER, M. O.; Hostettmann, K.; **Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine**. *Phytochemistry*, 30:12, p. 3864-3874, 1991.
50. Food and Drug Administration: Code of Federal Regulations. Cap. 21, 300-499, 1991.
51. NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard, 5th ed, NCCLS document M7-A5, 2000.
52. HAMMER, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; **Antimicrobial activity of essential oils and plants extracts**. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p. 985-990, 1999.
53. BURT, S.; **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review**. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, p. 223-253, 2004.
54. MOLINEUX, P.; **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 26:2, p. 211-219, 2003.
55. HOSTETTMANN, K.; Queiroz, E. F.; Vieira, P. C.; **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química, IV, Ed. UFSCar, São Carlos, 2003.
56. BRINGMANN, G.; Schlauer, J.; Rischer, H.; Wohlfarth, M.; Mühlbacher, J.; Buske, A.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Adam, G.; **Revised structure of antidesmone, an unusual alkaloid from tropical *Antidesma* plants (Euphorbiaceae)**. *Tetrahedron*. 56, p. 3691-3695, 2000.

57. BUSKE, A.; Busemann, S.; Mühlbacher, J.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Bringmann, G.; Adam, G.; **Antidesmone, a novel type isoquinoline alkaloid from, *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae).** *Tetrahedron*, 55, p. 1079-1086, 1999.
58. BUSKE, A.; Kekule, A. S.; Haring, A.; Adam, G.; **Medicaments containing tetrahydroquinone derivatives and use for the treatment of tropical disease.** PCT Int. Appli, WO 2003000272-A120030103, p. 1-89, 2003.
59. MOURA, N. de F.; Morel, A. F.; Dessoy, E. C.; Zanatta, N.; Bürger, M. M.; Ahlert, N.; Porto, Gerusa, P.; Baldisserotto, B.; **Alkaloids, amides and antistasmodic activity of *Zanthoxylum hyemale*.** *Planta Medica*. 68, p. 534-538, 2002.
60. CHENG, M-J.; Lee, K-H.; Tsai, I-L.; Chen, I-S.; **Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13, p. 5915-5920, 2005.
61. WERNER, W.; **Methylierung und hydrierung von 2-alkyl-chinolon-4.** *Tetrahedron*. 25:2, p. 255-261, 1969.

ANEXOS

ANEXO 1 - Resultados obtidos da análise de Difração de Raios-X de (O)-metiltembamida

Código da amostra: RB_AM_V13

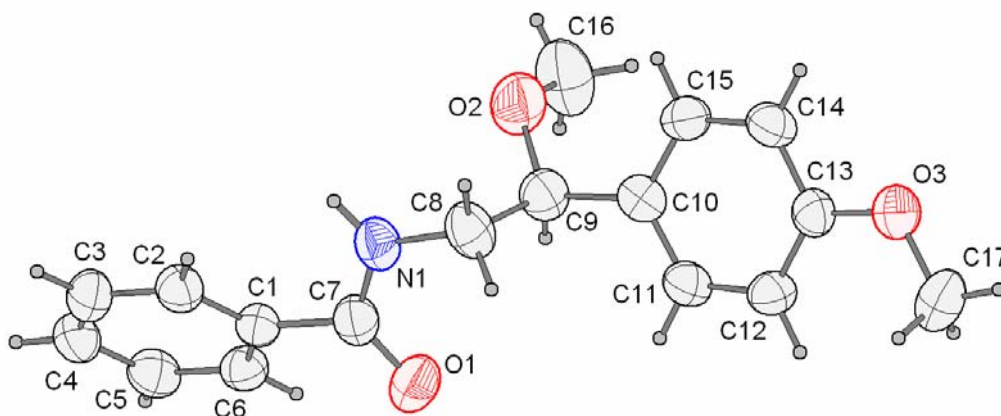


Figura 12 – Estrutura da (O)-metiltembamida obtida por Difração de Raios-X

Tabela 11 - Dados cristalográficos e de distinção estrutural de RB_AM_V13

Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	
Peso molecular	285,33	
Temperatura (K)	295(2)	
Radiação, λ (Å)	0.71073	
Sistema cristalino	Ortorrômbico	
Grupo espacial	P2(1)2(1)2(1)	
Dimensões da célula unitária (Å)	a = 5,5211(5)	$\alpha = 90^\circ$
	b = 7,5792(7)	$\beta = 90^\circ$
	c = 35,292(3)	$\gamma = 90^\circ$
Volume (Å ³), Z	14768(2) , 4	
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,283	
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,088	
F(000)	608	
Dimensão do cristal (mm ³)	0.15 x 0.15 x 0.1	
Região de varredura de θ	2,93 a 28,31°.	
Índices limitantes	-6<=h<=7, -10<=k<=10, -47<=l<=44	
Reflexões medidas	11333	
Reflexões independentes	3669 [R(int) = 0.0958]	
Perfeição para theta = 27.11°	99,7 %	
Correção de absorção	Semi-empírica para equivalentes	
Máx. e mín. transmissão	1 e 0,6336	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	
Dados / controles / parâmetros	3669 / 0 / 192	
Goodness-of-fit on F ²	1,026	
Índices R final [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0,0571, wR ₂ = 0,1444	
Índices R (todos dados)	R ₁ = 0,108, wR ₂ = 0,1677	
Parâmetro de estrutura absoluta	0,2(19)	
Densidade eletrônica residual	0,521 e -0,229 e.Å ⁻³	

ANEXO 2 - Resultados obtidos da análise de Difração de Raios-X do alcalóide Waltheriona-A

Código da amostra: V61

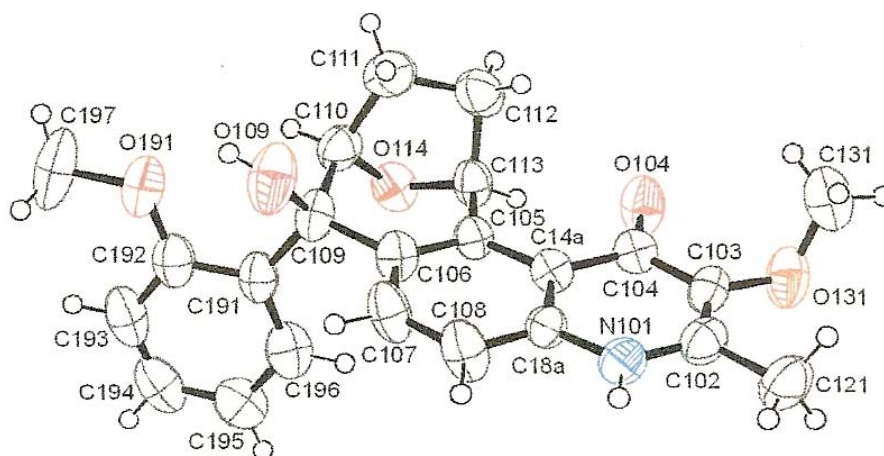


Figura 22 – Estrutura da Waltheriona-A obtida através de Difração de Raios-X

Tabela 12 - Dados cristalográficos e de distinção estrutural de AM V61

Fórmula molecular	$C_{23}H_{23}NO_5$	
Peso molecular	1623,75	
Temperatura (K)	293(2)	
Radiação, λ (Å)	0.71073	
Sistema cristalino	Tetragonal	
Grupo espacial	P43	
Dimensões da célula unitária (Å)	$a = 15,5109(3)$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 15,5109(3)$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 33,6208(11)$	$\gamma = 90^\circ$
Volume (Å ³), Z	8088,8(3) , 4	
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,333	
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,095	
F(000)	3440	
Dimensão do cristal (mm ³)	0.20 x 0.10 x 0.07	
Região de varredura de θ	2,42 a 27,11°.	
Índices limitantes	-19<=h<=19, -19<=k<=19, -39<=l<=43	
Reflexões medidas	50306	
Reflexões independentes	9066 [R(int) = 0.0958]	
Perfeição para theta = 27.11°	99,8 %	
Correção de absorção	Semi-empírica para equivalentes	
Máx. e mín. transmissão	1 e 0,68119	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	
Dados / controles / parâmetros	9066 / 37 / 1103	
Goodness-of-fit on F ²	0,996	
Índices R final [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0541$, $wR_2 = 0,1235$	
Índices R (todos dados)	$R_1 = 0,1250$, $wR_2 = 0,1496$	
Parâmetro de estrutura absoluta	0,4(11)	
Densidade eletrônica residual	0,608 e -0,174 e.Å ⁻³	

ANEXO 3 - Resultados obtidos da análise de Difração de Raios-X do produto menos polar obtido da reação de metilação do alcalóide Waltheriona-B

Código da amostra: RB_AM_VG_WBp2

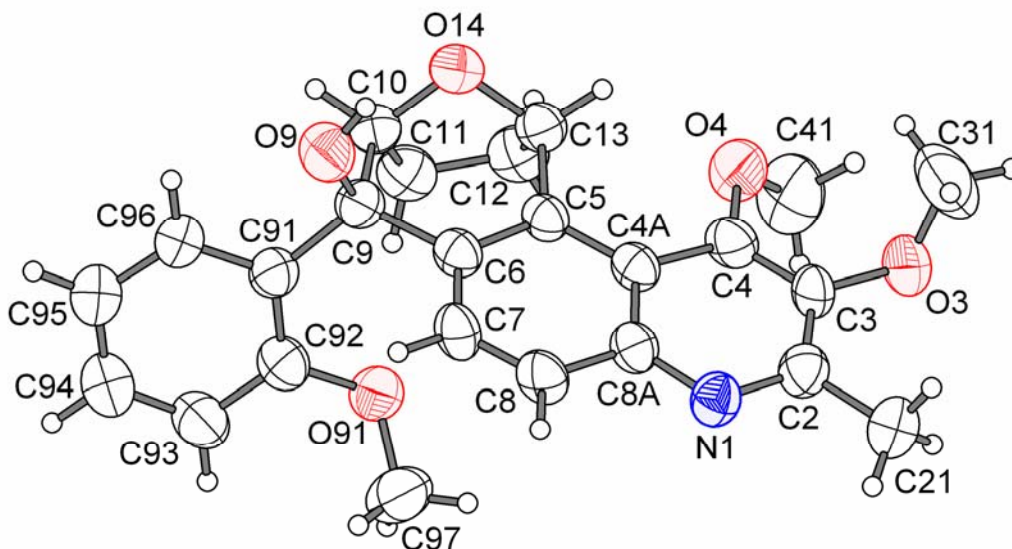


Figura 24 – Estrutura do produto menos polar da reação de metilação de Waltheriona-B obtida por Difração de Raios-X

Tabela 13 – Dados cristalográficos e de distinção estrutural de VG_WBp2

Fórmula molecular	C ₂₄ H ₂₅ NO ₅	
Peso molecular	407,45	
Temperatura (K)	296(2)	
Radiação, λ (Å)	0.71073	
Sistema cristalino	Ortorrômbico	
Grupo espacial	P2(1)2(1)2(1)	
Dimensões da célula unitária (Å)	a = 9.2078(5)	$\alpha = 90^\circ$
	b = 9.4827(5)	$\beta = 90^\circ$
	c = 23.5473(13)	$\gamma = 90^\circ$
Volume (Å ³), Z	2056,03(19), 4	
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,316	
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,092	
F(000)	864	
Dimensão do cristal (mm ³)	0,35 x 0,2 x 0,04	
Região de varredura de θ	3,08 a 26,24°.	
Índices limitantes	-11<=h<=11, -11<=k<=11, -29<=l<=29	
Reflexões medidas	21235	
Reflexões independentes	2347 [R(int) = 0.0958]	
Perfeição para theta = 26.24°	98,3 %	
Correção de absorção	Semi-empírica para equivalentes	
Máx. e mín. transmissão	1 e 0,71374	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	
Dados / controles / parâmetros	2347 / 0 / 277	
Goodness-of-fit on F ²	1,02	
Índices R final [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0,0452, wR ₂ = 0,0998	
Índices R (todos dados)	R ₁ = 0,0923, wR ₂ = 0,1194	
Parâmetro de estrutura absoluta	0,8(19)	
Densidade eletrônica residual	0,158 e -0,145 e.Å ⁻³	

ANEXO 4 - Resultados obtidos da análise de Difração de Raios-X do produto menos polar obtido da reação de metilação do alcalóide Waltheriona-A

Código da amostra: RB_AM_VG_WAP1

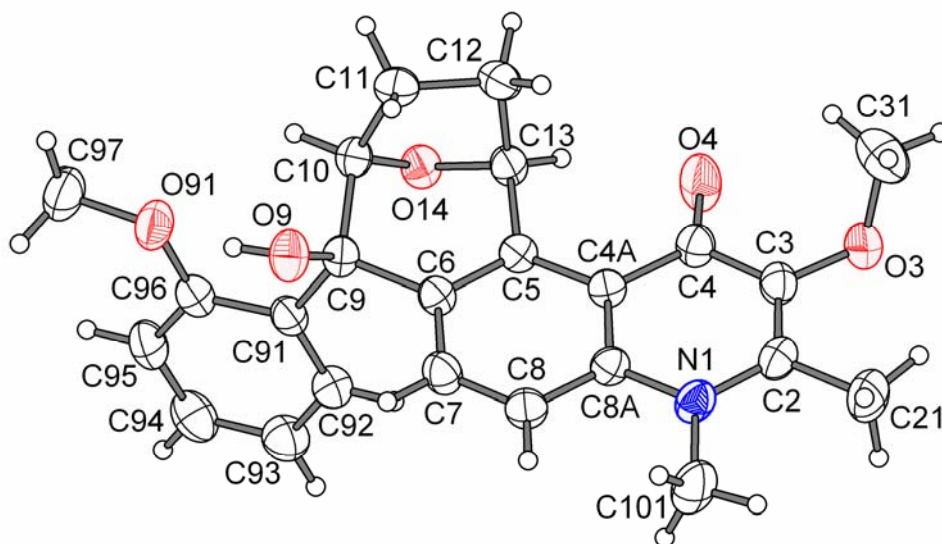


Figura 26 – Estrutura do produto menos polar da reação de metilação de Waltheriona-A obtida por Difração de Raios-X

Tabela 14 – Dados cristalográficos e de distinção estrutural de VG_WAp1

Fórmula molecular	$C_{24}H_{25}NO_5$	
Peso molecular	407,45	
Temperatura (K)	296(2)	
Radiação, λ (Å)	0.71073	
Sistema cristalino	Ortorrômbico	
Grupo espacial	P2(1)2(1)2(1)	
Dimensões da célula unitária (Å)	$a = 7,6938(4)$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 12,2862(7)$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 20,8109(12)$	$\gamma = 90^\circ$
Volume (Å ³), Z	1967,20(19), 4	
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,376	
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,096	
F(000)	864	
Dimensão do cristal (mm ³)	0,3 x 0,25 x 0,15	
Região de varredura de θ	3,12 a 30,08°.	
Índices limitantes	-10<=h<=7, -17<=k<=15, -29<=l<=24	
Reflexões medidas	13172	
Reflexões independentes	3132 [R(int) = 0.0958]	
Perfeição para theta = 26.24°	95,6 %	
Correção de absorção	Semi-empírica para equivalentes	
Máx. e mín. transmissão	1 e 0,770	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	
Dados / controles / parâmetros	3132 / 0 / 276	
Goodness-of-fit on F ²	0,999	
Índices R final [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0404$, $wR_2 = 0,1019$	
Índices R (todos dados)	$R_1 = 0,0608$, $wR_2 = 0,1103$	
Parâmetro de estrutura absoluta	2,4(12)	
Densidade eletrônica residual	0,177 e -0,186 e.Å ⁻³	