

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Zanthoxylum rhoifolium***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andréia Denise Weber

Santa Maria, RS, Brasil

2005

ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Zanthoxylum rhoifolium

por

Andréia Denise Weber

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

2005

**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 BIOLÓGICA DE
*Zanthoxylum rhoifolium***

elaborada por

Andréia Denise Weber

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof^a. Dra. Ionara Irion Dalcol - UFSM

Prof^a. Dra. Solange Cristina da Silva Martins Hoezel- UNIFRA

Santa Maria, 12 de agosto de 2005.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu mais sincero agradecimento e
admiração. Agradeço imensamente pela sua orientação,
paciência e amizade.

Aos meus pais Almiro e Elenir, e aos meus irmãos
Douglas e Denise, dedico esta dissertação pelo seu amor, carinho e
incentivo.

Ao meu noivo Eduardo, dedico esta dissertação pelo seu amor,
compreensão e apoio nos momentos difíceis.
TE AMO MUITO!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ionara I. Dalcol, pelo incentivo, apoio e co-orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wellington de Abreu Gonzaga pela amizade, apoio e ensinamentos durante minha iniciação científica.

Aos amigos por compartilhar das alegrias e pelos incentivos nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório: Adari, Álvaro, Anderson, Carla, Cláudia, Caroline, Irene, Juliano, Larissa, Euclésio, Graciela, Gilvan, Sandro, Vanessa, Veridiana e Vinicius pela amizade, auxílio e companheirismo durante estes anos.

A funcionária, Maria Angélica, pela sua amizade, profissionalismo e dedicação demonstrada na obtenção dos espectros de RMN.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, em especial aos funcionários Ademir Sartóri e Valéria Velasque, pela atenção dispensada.

RESUMO

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

ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Zanthoxylum rhoifolium*

Autora: Andréia Denise Weber

Orientador: Ademir Farias Morel

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de agosto de 2005.

Quatro alcalóides benzofenantridínicos já conhecidos, Diidrocheleritrina (**39**), Bocconolina (**42**), Cheleritrina (**2**) e 6-Acetonildiidrocheleritrina (**33**), foram isolados da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*, juntamente com outras três lignanas e o triterpeno Lupeol (**11**). Uma das lignanas foi identificada como sendo a Sesamina (**114**), comum no gênero *Zanthoxylum* e as outras duas pertencem à classe dibenzilbutirolactônica, denominadas de Kaerofilina (**117**) e Gadaina (**120**), ambas já conhecidas, porém foram isoladas pela primeira vez de *Zanthoxylum rhoifolium*. As estruturas destes metabólitos foram determinadas, principalmente, por métodos espectroscópicos, como a espectroscopia de 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 compostos puros e as frações ácidas hexânica e etérea, bem como a fração clorofórmica básica foram submetidas a testes de atividade antitumoral com nove linhagens de culturas de células tumorais humanas *in vitro*: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (pulmão), PCO-3 (próstata), HT-29 (cólon), OVCAR (ovário),

786-0 (rim) e K-562 (leucemia). Os alcalóides benzofenantridínicos e as frações apresentaram-se mais ativos, inibindo o crescimento e provocando a morte de diversas linhagens celulares. Já as lignanas apresentaram atividade pouco significativa, sendo que gadaina (**120**) exibiu atividade citostática para todas as linhagens, somente na maior concentração testada.

Através dos ensaios de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*; Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal* e fungos: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*, observou-se que os alcalóides e as frações foram bastante ativos, principalmente, contra bactérias. Cheleritrina (**2**) foi o composto mais ativo, devido à inibição de crescimento de todos os microrganismos testados, na menor das concentrações testadas (0,15µg). As lignanas não foram ativas contra os microrganismos testados. Através dos resultados obtidos pelo Método de Microdiluição, observou-se que o alcalóide cheleritrina apresenta caráter bacteriostático e fungicida.

Palavras-chave: *Zanthoxylum rhoifolium*, alcalóides, lignanas, atividade antitumoral e antimicrobiana.

ABSTRACT

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

STUDY PHYTOCHEMICAL AND OF THE ACTIVITY BIOLOGICAL OF *Zanthoxylum rhoifolium*

Authora: Andréia Denise Weber
Academic Advisor: Ademir Farias Morel
Santa Maria, 12 of august 2005.

Four previously known dihydrobenzophenanthridine alkaloids, Dihydrochelerythrine (**39**), Bocconoline (**42**), Chelerythrine (**2**) and 6-Acetyldihydrochelerythrine (**33**), were isolated from the stem bark of *Zanthoxylum rhoifolium*, along with other three lignans and the triterpen Lupeol (**11**). One of the lignans was identified as being sesamine (**114**), common in *Zanthoxylum* and the other two, already known, called Kaerophyllin (**117**) and Gadain (**120**) belong to dibenzylbutyrolactones. However, Kaerophyllin (**117**) and Gadain (**120**) were isolated for the first time from the *Zanthoxylum rhoifolium*. The structures of these metabolites were determined, mainly through spectroscopic methods, such as Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ^1H e ^{13}C (COSY, HMQC e HMBC), mass spectrometry and through the comparison of the data obtained from the melting point and data from the literature.

The pure compounds and the hexane and eterea acid fractions, as well as chloroform basic fraction were tested for antitumor activity with nine cultured human tumor cell lines in vitro: MCF-7 (breast), NCI-ADR (breast with phenotype of the drug-resistant), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (lung), PCO-3 (prostate), HT-

29 (colon), OVCAR (ovary), 786-0 (kidney) e K-562 (leukemia). The dihydrobenzophenanthridine alkaloids and the fractions showed more active, inhibiting the growth and provoking the death of several cell lines. On the other hand, the lignans showed no significant activity, being that, gadain (**120**) showed citostatic activity for all lines, only in the largest concentration tested.

Through antimicrobial activity assays against Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus subtilis*; Gram-negatives: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella setubal* and fungi: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Sacharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*, it was possible to observe that the alkaloids and the fractions were really active, mainly against bacteria. Chelerythrine (**2**) was the most active compound due to the growth inhibition of all the tested microorganisms, at the lowest concentration tested (0.15µg). The lignans were inactive against the tested microorganisms. The results found through the Microdilution Method showed that the alkaloid Chelerythrine presents a fungicide bacteriostatic property.

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium*, alkaloids, lignans, antitumor and antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A -Espectro de RMN ^1H , a 200MHz, de Diidrocheleritrina (39) em CDCl_3	61
Figura 1B -Espectro de RMN ^1H Expandido (6,89-7,70ppm), de Diidrocheleritrina (39) em CDCl_3	62
Figura 2 -Espectro de RMN 2D, COSY Expandido região espectral dos aromáticos de Diidrocheleritrina (39) em CDCl_3	63
Figura 3A -Espectro de RMN ^{13}C de Diidrocheleritrina (39) em CDCl_3	64
Figura 3B -Espectro de RMN ^{13}C Expandido (100-132ppm) de Diidrocheleritrina (39) em CDCl_3	64
Figura 4 : Espectro de RMN DEPT 135° de Diidrocheleritrina (39) em CDCl_3	65
Figura 5A -Espectro de RMN ^1H , de 6-Acetonildiidrocheleritrina (33) em CDCl_3	68
Figura 5B -Espectro de RMN ^1H Expandido (6,8-7,8 ppm), de 6-Acetonildiidrocheleritrina (33) em CDCl_3	68
Figura 5C -Espectro de RMN ^1H Expandido (2,0-5,1ppm), de 6-Acetonildiidrocheleritrina (33) em CDCl_3	69
Figura 6A -Espectro de RMN ^{13}C de 6-Acetonildiidrocheleritrina (33) em CDCl_3	70
Figura 6B -Espectro de RMN ^{13}C Expandido (100-153ppm) de 6-Acetonildiidrocheleritrina (33) em CDCl_3	70
Figura 7 -Espectro de RMN de ^1H de Cheleritrina (2) em DMSO.....	73
Figura 8A -Espectro de RMN ^1H de Bocconolina (42) em CDCl_3	76
Figura 8B -Espectro de RMN ^1H Expandido (6,0-7,8ppm) de Bocconolina (42), em CDCl_3	77

Figura 9 -Espectro de Massas de Kaerofilina.....	80
Figura 10A -Espectro de RMN ^1H de kaerofilina (117) em CDCl_3	82
Figura 10B -Espectro de RMN ^1H Expandido (6,6-7,6ppm), de kaerofilina (117) em CDCl_3	82
Figura 11A -Espectro de RMN 2D COSY ^1H - ^1H de Kaerofilina (117) em CDCl_3	84
Figura 11B -Espectro de RMN 2D COSY ^1H – ^1H Expandido (2,5-4,3ppm) de kaerofilina (117) em CDCl_3	85
Figura 11C -Espectro de RMN 2D COSY ^1H – ^1H Expandido (6,4-7,6ppm) de kaerofilina (117) em CDCl_3	86
Figura 12A -Espectro de RMN ^{13}C de kaerofilina (117) em CDCl_3	88
Figura 12B -Espectro de RMN ^{13}C Expandido (100-151ppm) de 117 em CDCl_3	88
Figura 13 -Espectro de DEPT 135° de kaerofilina (117) em CDCl_3	89
Figura 14A -Espectro de RMN 2D HMQC de kaerofilina (117) em CDCl_3	90
Figura 14B -Espectro de RMN 2D HMQC Expandido (5,5-7,8ppm) de kaerofilina (117) em CDCl_3	91
Figura 15A -Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (6,4-7,7ppm) de kaerofilina (117) em CDCl_3	92
Figura 15B -Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (3,8-8,4ppm) de kaerofilina (117) em CDCl_3	93
Figura 16 -Espectro de Massa de Gadaina (120).....	96
Figura 17A -Espectro de RMN ^1H , de Gadaina (120) em CDCl_3	97
Figura 17B : Espectro de RMN ^1H Expandido (5,8-7,5ppm), a 400MHz, de 120 em CDCl_3	98
Figura 18A -Espectro de RMN 2D, COSY a 400MHz, de 120 em CDCl_3	99
Figura 18B -Espectro de RMN 2D, COSY Expandido (6,5-7,1ppm) a 400MHz, de 120 em CDCl_3	100

Figura 19A -Espectro de RMN ¹³ C de Gadaina (120) em CDCl ₃	101
Figura 19B -Espectro de RMN ¹³ C Expandido (120-150ppm) de Gadaina (120), em CDCl ₃	101
Figura 20 -Espectro de RMN DEPT 135° de Gadaina (120), em CDCl ₃	102
Figura 21A -Espectro de RMN 2D HMQC de Gadaina (120) em CDCl ₃	103
Figura 21B -Espectro de RMN 2D HMQC Expandido (6,5-7,5ppm) de Gadaina (120) em CDCl ₃	104
Figura 22A -Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (5,5-7,6ppm) de Gadaina (120) em CDCl ₃	105
Figura 22B -Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (2,5-7,5ppm) de Gadaina (120) em CDCl ₃	106
Figura 22C -Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (2,4-3,4ppm) de Gadaina (120) em CDCl ₃	106
Figura 22D -Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (5,3-7,6ppm) de Gadaina (120) em CDCl ₃	107
Figura 23A -Espectro de RMN ¹ H de Sesamina (114) em CDCl ₃	110
Figura 23B -Espectro de RMN ¹ H Expandido (3,0-4,8ppm) de Sesamina (114) em CDCl ₃	110
Figura 24 -Espectro de RMN 2D, COSY a 400MHz, de 114 em CDCl ₃	111
Figura 25 -Espectro de RMN ¹³ C de Sesamina (114) em CDCl ₃	112
Figura 26 -Espectro de RMN DEPT 135° de 114 em CDCl ₃	113
Figura 27 -Espectro de RMN ¹ H, a 400MHz, de 11 em CDCl ₃	115
Figura 28 -Quantidade Mínima (0,15µg) de cheleritrina (2) para a inibição de <i>Escherichia coli</i> sobre CCD.....	117
Figura 29 -Quantidade Mínima (1,56µg) de cheleritrina (2) para a inibição de <i>S. setubal</i> , sobre CCD.....	117
Figura 30 -Resultado da atividade antitumoral para o controle Doxorubicina.....	122

Figura 31- Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide 6-Acetonildiidroavicina.....	123
Figura 32- Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Bocconolina.....	123
Figura 33- Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Diidrocheleritrina.....	124
Figura 34- Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Zantoxilina.....	124
Figura 35- Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Diidroavicina.....	125
Figura 36- Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Cheleritrina.....	125
Figura 37- Resultado da atividade antitumoral para a lignana Kaerofilina.....	126
Figura 38- Resultado da atividade antitumoral para a lignana Gadaina.....	126
Figura 39- Resultado da atividade antitumoral para a fração etérea ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	127
Figura 40- Resultado da atividade antitumoral para a fração hexânica ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	128
Figura 41- Resultado da atividade antitumoral para a fração clorofórmica básica da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	128

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação dos Alcalóides benzofenantridínicos.....	30
TABELA 2: Cromatografia em Coluna da fração hexânica ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	44
TABELA 3: Cromatografia em Coluna da fração etérea ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	48
TABELA 4: Microrganismos Indicadores.....	50
TABELA 5: Deslocamentos Químicos de RMN ^1H (400MHz) e ^{13}C (100MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de Diidrocheleritrina.....	65
TABELA 6: Deslocamentos Químicos de RMN ^1H (400MHz) e ^{13}C (100MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de 6-Acetonildiidrocheleritrina.....	71
TABELA 7: Deslocamentos Químicos de RMN de ^1H (400MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de Cheleritrina.....	73
TABELA 8: Deslocamentos Químicos de RMN de ^1H (400MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de Boconolina.....	77
TABELA 9: Deslocamentos Químicos de RMN de ^1H (400MHz) e ^{13}C (100MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de Kaerofilina.....	94
TABELA 10: Deslocamentos Químicos de RMN de ^1H (400MHz) e ^{13}C (100MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de Gadaina.....	108
TABELA 11: Deslocamentos Químicos de RMN de ^1H (400MHz) e ^{13}C (100MHz) e Constantes de Acoplamento (JHH) de Sesamina.....	113
TABELA 12: Quantidade Mínima (μg) requerida para a inibição das bactérias testadas sobre CCD.....	118
TABELA 13: Quantidade Mínima (μg) requerida para a inibição dos fungos testados sobre CCD.....	118
TABELA 14: Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Letal Mínima (CLM) do alcalóide cheleritrina.....	120

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial da Saúde
COSY	Correlated spectroscopy
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
MHz	Mega Hertz
DMSO	Dimetilsulfóxido
δ	Deslocamento químico
ppm	Partes por milhão
TMS	Tetrametilsilano
$\Delta\delta$	Varição de deslocamento químico
EI	Ionização eletrônica
EM	Espectrometria de Massa
CG	Cromatografia Gasosa
eV	Elétron-Volt
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CPP	Cromatografia em Placa Preparativa
°C	Graus Celsius
Rf	Fator de retenção
PF	Ponto de fusão
pág	Página
m/z	Relação massa/carga
ATCC	American Type Culture Collection
FDA	Food and Drug Administration
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

QSA	Quantidade de substância ativa
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola.
SRB	Sulforrodamina B
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
s	Singleto
t	Tripleto
m	Multipleto
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
TCC	Cloreto de trifenil tetrazóleo

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Fracionamento do extrato bruto da casca das raízes da <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	43
ESQUEMA 2: Representação esquemática da reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, dando origem a sua forma reduzida, DPPH-H.....	55

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ESQUEMAS

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	23
2-OBJETIVOS.....	25
3- REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3.1-Alcalóides benzofenantridínicos.....	29
3.1.1-Classificação dos Alcalóides benzofenantridínicos.....	30
3.1.2-Obtenção dos Alcalóides benzofenantridínicos.....	34
3.1.3-Farmacologia.....	35
3.2-Lignananas.....	37
4-PARTE EXPERIMENTAL.....	40
4.1-Instrumentos utilizados.....	40
4.1.1-Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
4.1.2-Aparelho de Ponto de Fusão.....	40
4.1.3-Espectrômetro de Massas.....	40

4.1.4-Materiais e Métodos Cromatográficos.....	40
4.2-Coleta do material vegetal e identificação da planta.....	41
4.3-Secagem, obtenção do pó vegetal e extração da casca da raiz.....	42
4.4-Fracionamento do Extrato Bruto.....	42
4.5-Análise da fração hexânica ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	43
4.5.1-Dados sobre os compostos isolados da fração hexânica ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	44
4.5.1.1-Lupeol (1AC).....	44
4.5.1.2-Sesamina (3AC).....	45
4.5.1.3-Gadaina (120).....	45
4.5.1.4-Diidrocheleritrina (39).....	46
4.5.1.5-Kaerofilina (117).....	46
4.6-Análise da fração etérea ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	47
4.6.1-Dados sobre os compostos isolados da fração etérea ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	48
4.6.1.1-Boconolina (42).....	48
4.6.1.2-Cheleritrina (2).....	49
4.6.1.3- 6-Acetonildiidrocheleritrina (33).....	49
4.7-Determinação da Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	50
4.7.1-Microrganismos empregados nos ensaios microbiológicos.....	50
4.7.2-Substâncias empregadas como padrões nos ensaios microbiológicos.....	51
4.7.3- Meios de Cultura	51
4.7.3.1-Manutenção dos microrganismos Indicadores.....	51
4.7.3.2-Preparo dos Inóculos Bacterianos e Fúngicos.....	52
4.7.3.3-Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	52
4.7.3.4-Preparo das Suspensões Bacterianas (inóculo).....	53
4.7.4-Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de	

Bioautografia.....	53
4.7.5-Determinação da Quantidade de Substância Ativa (QSA) pelo Método de Bioautografia.....	53
4.7.6-Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição.....	54
4.8-Teste de Atividade Antioxidante.....	55
4.8.1-Método do Radical livre DPPH.....	55
4.9-Teste de atividade Antitumoral.....	56
4.9.1-Teste de Atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas.....	56
5-APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	59
5.1-Compostos isolados de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>.....	59
5.2-Alcalóides isoquinolínicos.....	59
5.3-Alcalóides benzofenantridínicos.....	60
5.3.1-Diidrocheleritrina (39).....	60
5.3.1.2-Ressonância Magnética Nuclear de ¹H.....	61
5.3.1.3-Análise do Espectro de COSY ¹H-¹H.....	62
5.3.1.4-Análise do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ¹³C.....	63
5.3.2-6-Acetonildiidrocheleritrina (33).....	67
5.3.2.1-Ressonância Magnética Nuclear ¹H de 6-Acetonildiidrocheleritrina.....	67
5.3.2.2-Ressonância Magnética Nuclear ¹³C de 6-Acetonildiidrocheleritrina.....	69
5.3.3-Cheleritrina (2).....	72
5.3.3.1-Ressonância Magnética Nuclear ¹H de Cheleritrina.....	72
5.3.4-Bocconolina.....	75
5.3.4.1-Ressonância Magnética Nuclear ¹H de Bocconolina.....	75
5.4-Lignanas Dibenzilbutirolactônicas.....	79
5.4.1-Kaerofilina (117).....	79
5.4.1.1-Espectrometria de Massas de Kaerofilina.....	80

5.4.1.2-Ressonância Magnética Nuclear ^1H de Kaerofilina.....	80
5.4.1.3-Ressonância Magnética Nuclear 2D COSY ^1H - ^1H de Kaerofilina.....	82
5.4.1.4-Análise do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C de Kaerofilina.....	87
5.4.1.5-Espectros de HMQC e HMBC de Kaerofilina.....	89
5.4.2-Lignana Gadaina (120).....	95
5.4.2.1-Espectrometria de Massas de Gadaina.....	95
5.4.2.2-Ressonância Magnética Nuclear ^1H de Gadaina.....	96
5.4.2.3-Ressonância Magnética Nuclear 2D COSY ^1H - ^1H de Gadaina.....	98
5.4.2.4-Análise do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C de Gadaina.....	100
5.4.2.5-Espectros de HMQC e HMBC de Gadaina.....	102
5.4.3-Sesamina 114.....	109
5.4.3.1-Ressonância Magnética Nuclear ^1H de sesamina.....	109
5.4.3.2-Análise do Espectro de COSY ^1H - ^1H de sesamina.....	111
5.4.3.3-Análise do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C de sesamina.....	112
5.5-Triterpenóide.....	114
5.5.1-Lupeol.....	114
5.5.1.2-Ressonância Magnética Nuclear ^1H de Lupeol.....	114
5.6-Atividade farmacológica de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	116
5.6.1-Determinação da Quantidade de Substância ativa (QSA) pelo Método de Bioautografia.....	116
5.6.2-Determinação da CIM pelo Método de Microdiluição.....	120
5.6.3-Resultados da atividade antitumoral.....	121
5.6.3.1-Doxorrubicina-controle positivo.....	122
5.6.3.2-Alcalóide 6-Acetonildiidroavicina.....	122
5.6.3.3-Alcalóide boconolina.....	123
5.6.3.4-Alcalóide diidrocheleritrina.....	123

5.6.3.5-Zantoxilina.....	124
5.6.3.6-Diidroavicina.....	125
5.6.3.7-Cheleritrina.....	125
5.6.3.8-Lignana Kaerofilina.....	126
5.6.3.9-Lignana Gadaina.....	126
5.6.3.10-Fração etérea ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	127
5.6.3.11-Fração hexânica ácida da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	127
5.6.3.12-Fração clorofórmica básica da casca da raiz de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	128
5.7-Teste de atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH.	128
6-CONCLUSÕES	130
7-BIBLIOGRAFIA	132

1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos o homem vem buscando na natureza, por meio da utilização de plantas medicinais, soluções para o combate de doenças, bem como sua prevenção. Têm-se registros de que o homem pré- histórico já fazia uso de plantas na cura de moléstias.

Em um período mais atual os índios também contribuíram muito para a descoberta de plantas medicinais. Esta contribuição se deu por meio de manipulações e de experimentações, sendo que esta chegou a ocasionar várias intoxicações, pois muitas das plantas utilizadas eram desconhecidas quanto a sua toxicidade.

Com a interferência do homem dito civilizado, o qual realizou estudos para buscar meios de curar as doenças e epidemias que assolavam o ser humano no início do século XX, houve um avanço na medicina. Estes estudos foram facilitados pelo desenvolvimento da química experimental, em meados do século XIX, o que levou às experiências de extração de princípios ativos vegetais.

De posse do conhecimento de que as plantas previnem e até curam doenças, o homem começou a sintetizar remédios a partir de princípios ativos extraídos de plantas medicinais.

Atualmente a fitoterapia, o uso de plantas medicinais, tem fundamental importância como meio alternativo de prevenção para as populações de baixa renda. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial usa os recursos provenientes da medicina popular para suprir as necessidades de assistência médica primária.¹ Porém, o cuidado no uso é imprescindível, devido à toxicidade e os efeitos colaterais danosos à saúde humana, que algumas plantas podem ocasionar quando ingeridas em grande quantidade.

Com o intuito de corroborar no estudo de identificação de plantas medicinais e na compreensão dos mecanismos terapêuticos responsáveis pelo uso das mesmas na medicina popular, o grupo de pesquisa de produtos naturais (NPPN-SM), vem atuando desde 1985, no estudo de plantas medicinais nativas e cultivadas no Rio Grande do Sul. Neste período, várias espécies de plantas da flora do Rio Grande do Sul foram estudadas quanto seus constituintes químicos, vários novos metabólitos secundários foram isolados, estruturas elucidadas e algumas atividades

biológicas determinadas. Estas pesquisas têm originado várias publicações em periódicos especializados na área.²⁻⁸

O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo fitoquímico e biológico de uma espécie nativa do Rio Grande do Sul e de outras regiões do país, *Zanthoxylum rhoifolium*, pertencente à família Rutaceae. O interesse pelo estudo desta espécie é atribuído a sua vasta utilidade na medicina popular, sendo que as partes mais utilizadas e suas aplicações são: a raiz que é amarga e aromática, adstringente, febrífuga, estomáquica e tônica; a casca, a qual também apresenta propriedades tônicas e é usada para as flatulências, cólicas e dispepsias e o suco de suas folhas são aplicados contra dores de dente e de ouvidos.^{9,10} Além disso, as espécies pertencentes a esta família apresentam constituintes químicos, como os alcalóides benziltetraidroisoquinolínicos, os quais possuem uma variedade de efeitos farmacológicos, tais como: ação cardiorespiratória,¹¹ antimicrobiana,¹²⁻¹⁴ antiinflamatória,¹⁵ antipasmódica¹⁶ e antitumoral.¹⁷⁻²⁰

2. OBJETIVOS

O estudo fitoquímico da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* (Lam) tem como principais objetivos:

- a) Realizar o estudo fitoquímico da casca da raiz da espécie em questão;
- b) Identificar estruturalmente os metabólitos isolados, utilizando-se de dados da literatura e da aplicação de técnicas, tais como: Espectrometria de Massa, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais (COSY ^1H - ^1H , HMQC e HMBC);
- c) Realizar ensaios biológicos dos extratos, frações e das substâncias isoladas neste trabalho e também de substâncias isoladas anteriormente pelo grupo (Rhoifolina A e B, Diidroavicina, Zantoxilina, 6-Acetonildiidroavicina e 6-Acetonildiidronitidina), como a determinação da atividade antimicrobiana e atividade antioxidante;
- d) Realizar testes de atividade antitumoral em linhagens de células tumorais humanas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A família Rutaceae, pertence à ordem das geniales, subordem das geraniíneas, com flores actimorfas ou zigomorfas, pentâmeras ou tetrâmeras, quase sempre hemafrodita. É composta predominantemente por árvores e arbustos, amplamente distribuídos em regiões de climas temperados e tropicais. Compreende aproximadamente 160 gêneros e 1600 espécies. Dentre os mais importantes cita-se a *Ruta*, *Dictamus*, *Boronia*, *Pilocarpus*, *Aegle*, *Citrus*, *Helietta*, *Esenbeckia* e *Zanthoxylum*.²¹⁻²²

O gênero *Zanthoxylum*, alvo deste estudo é encontrado em formações vegetais naturais do Estado do Rio Grande do Sul. Plantas pertencentes a este gênero são ricas em metabólitos secundários típicos da família Rutaceae, como cumarinas, alcalóides, lignanas e outros.²³

Zanthoxylum rhoifolium (Lam); tem como sinonímia botânica: *Fagara rhoifolia* (Lam.) Engl.; *Zanthoxylum perrotetti* DC.; *Zanthoxylum sorbifolium* ST. Hill., além de outras. Esta espécie é encontrada em quase todo o País, principalmente na mata pluvial da encosta atlântica e na floresta semidecídua de altitude. É conhecida popularmente como: “mamica de cadela”, “mamica de porca”, “tembetari”, “juvevê” e espinho de vintém.¹⁰

Trata-se de uma planta aculeada de 6-12m de altura com tronco de 30-40 cm de diâmetro. Possui uma copa densa e caracteristicamente arredondada; apresenta folhas compostas de 5-13 pares de folíolos opostos, sendo que estes às vezes podem ser aculeados na face inferior.¹⁰

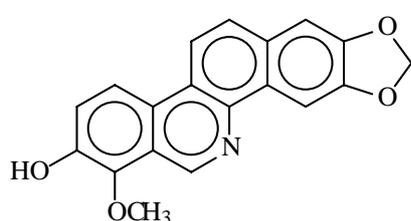
É muito rara de ser encontrada no interior da mata primária densa, sendo mais freqüente em clareiras de matas. Ocorre preferencialmente em terrenos íngremes e pedregosos onde a drenagem é rápida. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis que garante sua regeneração natural. Seus frutos são consumidos por algumas espécies de pássaros, razão pela qual não deve faltar na composição de reflorestamentos mistos destinados ao repovoamento de áreas degradadas de preservação permanente.¹⁰

Entre os constituintes químicos, os alcalóides são os representantes mais comumente encontrados nas plantas pertencentes à família das Rutaceas. Estes são compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos, que podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, acumulando-se, principalmente, nos

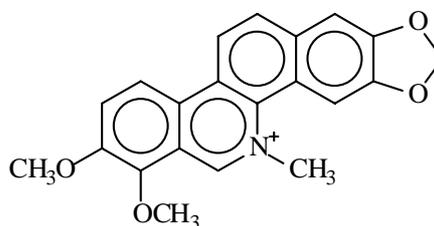
tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos.²⁴

Estes apresentam como principais funções nas plantas: (a) agentes venenosos que protegem as plantas contra insetos e herbívoros; (b) produtos finais de destoxificação, eliminando compostos que seriam nocivos à planta; (c) fatores reguladores de crescimento; (d) substâncias de reservas capazes de fornecer nitrogênio ou outros elementos necessários à planta.²⁴

Estudos realizados por Watermann e colaboradores²⁵ de algumas espécies de *Fagara* possibilitaram o isolamento de vários alcalóides benzofenantridínicos, como a decarina (1) e a cheleritrina (2).

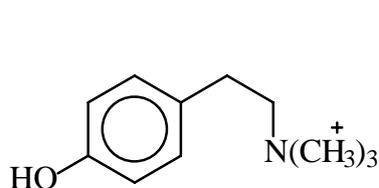


(1)

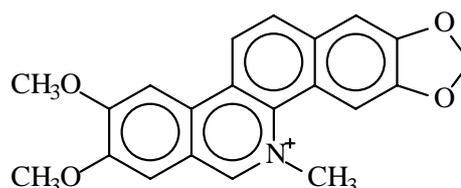


(2)

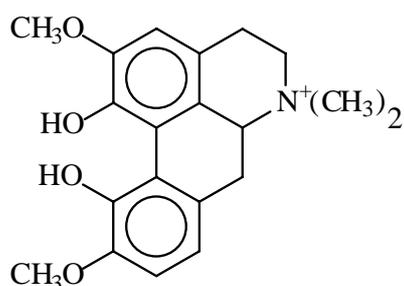
Dentre o gênero *Zanthoxylum* foram isoladas de *Fagara rhoifolia*, por Kuck et al,²⁶ vários alcalóides como: candicina (3), cheleritrina (2), nitidina (4) e magnoflorina (5).



(3)

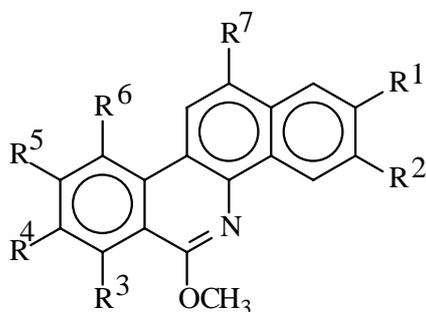


(4)



(5)

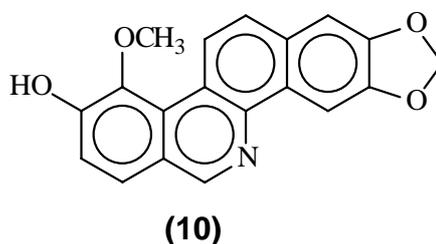
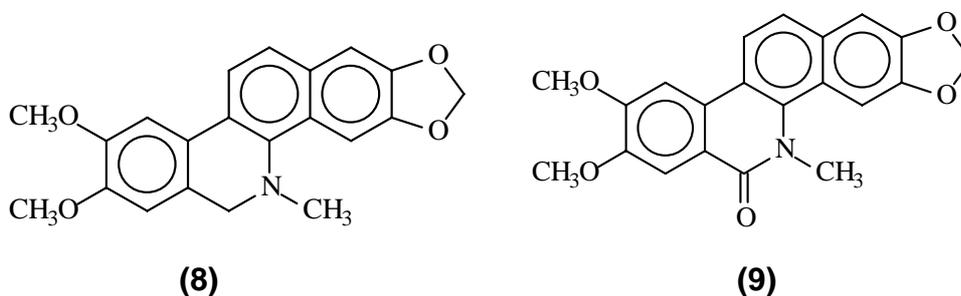
Em um trabalho desenvolvido em 2003 no grupo de pesquisa NPPN foram isolados da espécie em estudo *Zanthoxylum rhoifolium* dois novos alcalóides benzofenantridínicos, rhoifolina A (**6**) e rhoifolina B (**7**), extraídos da casca da raiz da mesma.²



(6) R¹+R²= OCH₂O; R³=R⁶=R⁷=H; R⁴+R⁵=OCH₂O

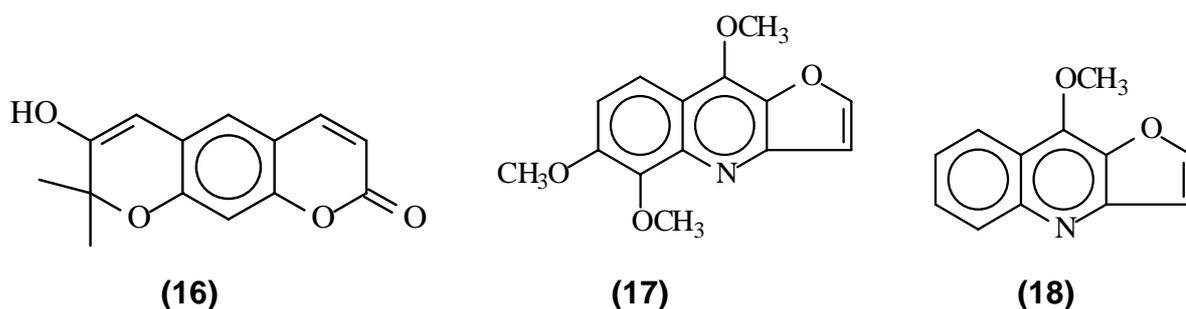
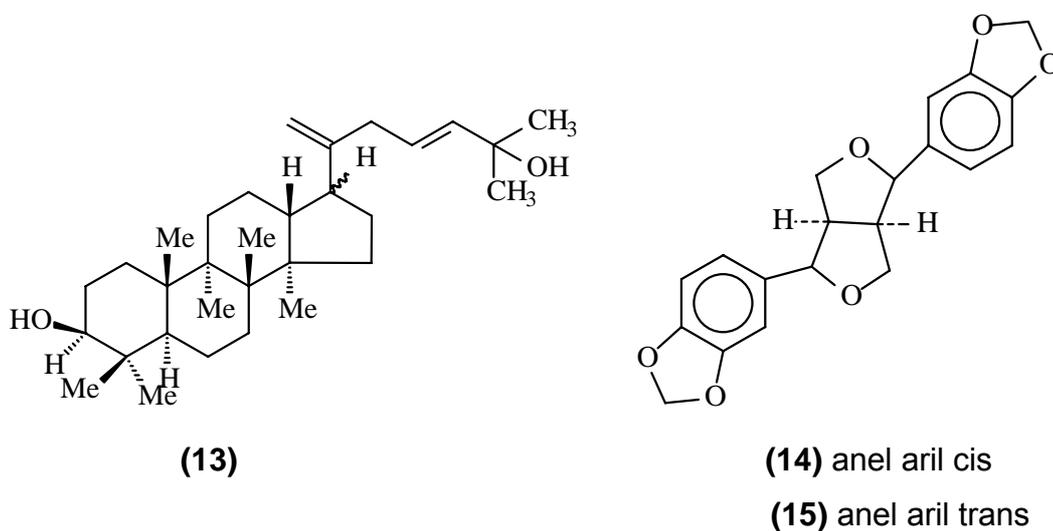
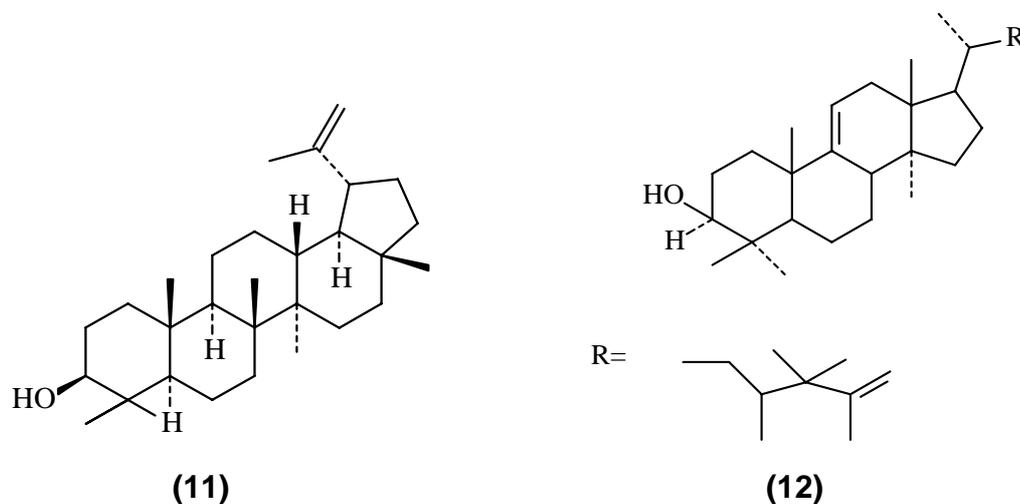
(7) R¹+R²= OCH₂O; R³=R⁶=R⁷=H; R⁴=R⁵=OCH₃

Do extrato metanólico da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium* foram isolados vários alcalóides benzofenantridínicos, entre eles pode-se citar: decarina (**1**), diidronitidina (**8**), oxinitidina (**9**) e zantoxilina (**10**).⁷



Além dos alcalóides benzofenantridínicos encontrados nesta espécie, encontra-se também uma variedade de outras classes de metabólitos secundários, incluindo terpenos tais como: lupeol (**11**),²⁷ lansiol (**12**)²⁸ e dammarano (**13**);²⁹ as lignanas sesamina (**14**)^{27,30} e asaranina (**15**);³⁰ a cumarina marmesina (**16**)²⁹ e os

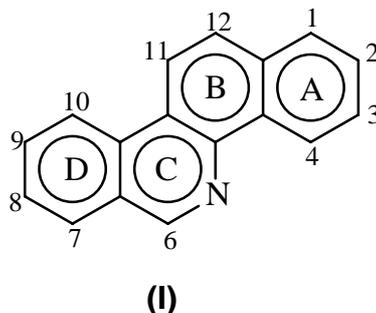
alcalóides furoquinolínicos, pertencentes à família dos quinolínicos, como exemplos têm a skimianina (17) e dictamina (18).³¹



3.1 Alcalóides Benzofenantridínicos

Os alcalóides isoquinolínicos são muito comuns nas espécies pertencentes à família Rutaceae e representam um dos maiores grupos de metabólitos secundários de importância farmacológica. Os alcalóides isoquinolínicos são representados por

mais de 2000 estruturas. Dentro desta classe de compostos encontram-se os alcalóides benzofenantridínicos. Estes alcalóides encontram-se distribuídos nas famílias Fumariaceae, Papaveraceae e Rutaceae, e são caracterizados por apresentarem um esqueleto fenantridínico, com um anel benzênico condensado ao anel C (I).

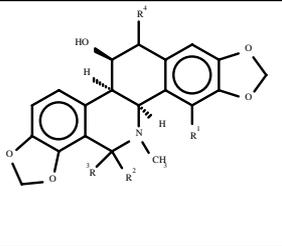
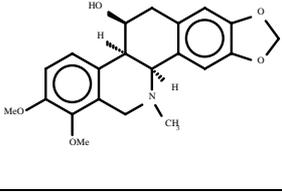
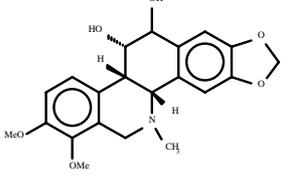


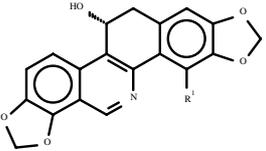
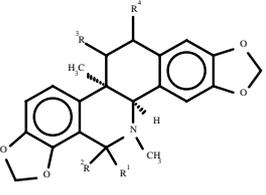
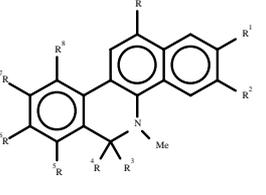
O tipo de numeração mostrada em (I) é a sistemática descrita por Simanék³² em 1985 e é a mesma adotada neste trabalho.

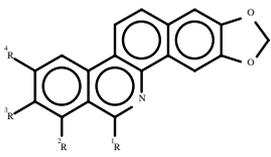
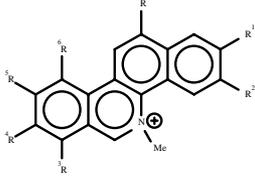
3.1.1 Classificação dos Alcalóides Benzofenantridínicos

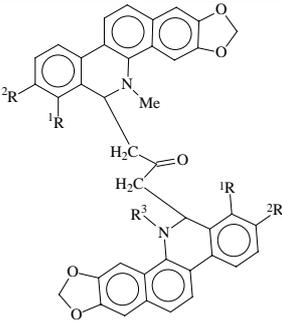
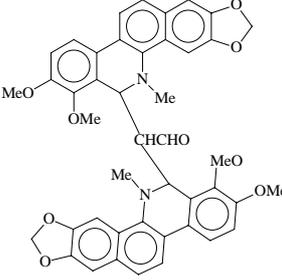
Os alcalóides benzofenantridínicos estão classificados em classes com base na estrutura e propriedades dos mesmos.²⁴

Tabela 1: Classificação dos alcalóides benzofenantridínicos

ESTRUTURA	CLASSE DE ALCALÓIDES	SUBSTÂNCIA	FAMÍLIA	Ref. ..
	Alcalóides Hexaidrobenzofenantridínicos	(19) $R^1=R^2=R^3=R^4=H$ [(+)-chelidonina] (20) $R^1=R^2 = R^3=H$; $R^4=OH$ [chelamina]. (21) $R^1=R^4=H$; $R^2+R^3=O$ [oxichelidonina] (22) $R^1=OCH_3$; $R^2=R^3=R^4=H$ [4-metoxichelidonina]	Papaveraceae Fumariaceae; Rutaceae; Caprifoliaceae	33, 24, 34, 35
	Alcalóides Hexaidrobenzofenantridínicos	(23) [(+) homochelidonina]	Papaveraceae Fumariaceae; Rutaceae; Caprifoliaceae	33, 24, 34, 35
	Alcalóides Hexaidrobenzofenantridínicos	(24) [chelamidina]	Papaveraceae Fumariaceae; Rutaceae; Caprifoliaceae	33, 24, 34, 35

	<p>Alcalóides Hexaidrobenzofenantridínicos</p>	<p>(25) [(+)-luguina]</p>	<p>Papaveraceae Fumariaceae; Rutaceae; Caprifoliaceae</p>	<p>33, 24, 34, 35</p>
	<p>Alcalóides Hexaidrobenzofenantridínicos</p>	<p>(26) $R^1=R^2=R^4=H$; $R^3=OCOCH_3$ [acetilcorinolina]; (27) $R^1=R^2=R^4=H$; $R^3=OH$ [corinolina]; (28) $R^1=R^2=H$; $R^3=R^4=OH$ [(+/-) 12-hidroxicorinolina]; (29) $R^1=CH_2COCH_3$; $R^2=R^4=H$; $R^3=OCOCH_3$ [cosperina].</p>	<p>Papaveraceae Fumariaceae; Rutaceae; Caprifoliaceae</p>	<p>33, 24, 34, 35</p>
	<p>Alcalóides Dihidrobenzofenantridínicos</p>	<p>(30) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^7=R^8=R^9=H$; $R^4=R^5=R^6=OCH_3$; [6- metildiidrocheleritrina] (31) $R^1+R^2=R^5+R^6=OCH_2O$; $R^3=CH_2COCH_3$; $R^4=R^7=R^8=R^9=H$; [6- acetonildiidrosanguinarina] (8) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^4=R^5=R^8=R^9=H$; $R^6=R^7=OCH_3$; [diidronitidina] (32) $R^1+R^2=OCH_2O$; R^3 $=R^5=R^6=OCH_3$; $R^4=R^7=R^8=R^9=H$; [angolina] (33) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^7=R^8=R^9=H$; $R^4=CH_2COMe$, $R^5=R^6=OCH_3$; [6-acetonildiidrocheleritrina] (34) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=$ $R^7=R^8=R^9=H$; $R^4=CH_2COOH$; $R^5=R^6=OCH_3$; [6-carboximetildiidrocheleritrina] (35) $R^1+R^2=R^5+R^6=OCH_2O$; $R^3=R^7=R^8=R^9=H$; $R^4=CH_2COCH_2(Me)_2$; [6-(4-metil-2-oxopentanol) diidrocheleritrina] (36) $R^1+R^2=R^5+R^6=OCH_2O$; $R^3+R^4=NH$; $R^7=R^8=R^9=H$; [6- iminosanguinarina] (37) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=CH_2OH$; $R^4=R^7=R^8=R^9=H$; $R^5=OH$; $R^6=OCH_3$ [6- hidroximetildiidrocheleritrina] (9) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3+R^4=O$; $R^5=R^8=R^9=H$; $R^6=R^7=OCH_3$; [oxinitidina] (38) $R^1+R^2=R^6+R^7=OCH_2O$; $R^3=R^4=R^5=R^8=R^9=H$; [diidroavicina] (39) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^4=R^7=R^8=R^9=H$; $R^5=R^6=$ OCH_3; [diidrocheleritrina] (40) $R^1=R^2=R^5=R^6=R^8=OCH_3$; $R^3=R^4=R^7=R^9=H$; [diidrosanguilutina] (41) $R^1+R^2=R^5+R^6=OCH_2O$; $R^3=R^7=R^9=H$; $R^8=OCH_3$; $R^4=$  [chelelactam] (42) $R^1+R^2=OCH_2O$;</p>	<p>Papavera ceae Fumariaceae; Rutaceae.</p>	<p>7, 27, 30, 33, 36, 24, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42</p>

		$R^4=R^7=R^8=R^9=H$; $R^3=CH_2OH$; $R^5=R^6=OCH_3$; [boconolina]. (43) $R^1+R^2=R^5+R^6=OCH_2O$; $R^3=R^4=R^7=R^8=R^9=H$; [diidrosanguinarina]. (44) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3+R^4=O$; $R^5=R^6=OCH_3$; $R^7=R^8=R^9=H$; [oxicheleritrina].		
	Alcalóides <i>N</i> - Demetilbenzofenantridínicos	(1) $R^1=R^4=H$; $R^2=OCH_3$; $R^3=OH$ [decarina]; (6) $R^1=OCH_3$; $R^2=H$; $R^3+R^4=OCH_2O$ [rhoifolina A]; (7) $R^1=OCH_3$; $R^2=H$; $R^3=R^4=OCH_3$ [rhoifolina B]; (45) $R^1=Me$; $R^4=H$; $R^2=$ $R^3=OCH_3$ [6- metilnorcheleritrina]; (46) $R^1=R^4=H$; $R^2=OCH_3$; $R^3=OAc$ [decarina acetato]; (47) $R^1=OMe$; $R^2+R^3=OCH_2O$; $R^4=H$ [8-metoxi-nor- sanguinarina]; (48) $R^1=H$; $R^2+R^3=R^4=OCH_3$ [norchelilutina]; (49) $R^1=R^2=H$; $R^3=R^4=OCH_3$ [nornitidina]; (50) $R^1=R^2=H$; $R^3=R^4=OCH_2O$ [des- <i>N</i> -metilavicina]; (51) $R^1=R^4=H$; $R^2=OH$; $R^3=OCH_3$ [isodecarina]. (52) $R^1=R^4=H$; $R^2=R^3=OCH_3$ [norcheleritrina]. (53) $R^1=R^4=H$; $R^2+R^3=OCH_2O$ [norsanguinarina] (54) $R^1=OCH_3$; $R^2+R^3=OCH_2O$; $R^4=H$ [pancorina]	Papaveraceae Fumariaceae; Rutaceae.	7, 31, 33, 24, 37, 41
	Alcalóides Benzofenantridínicos Quaternários	(55) $R^1+R^2=R^3+R^4=OCH_2O$; $R^5=R^6=R^7=H$ [sanguinarina]; (2) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^4=OMe$; $R^5=R^6=R^7=H$; [cheleritrina]; (56) $R^1+R^2=R^3+R^4=OCH_2O$; $R^5=H$; $R^6=R^7=OCH_3$ [macarpina]; (57) $R^1+R^2=R^4+R^5=OCH_2O$; $R^3=R^6=R^7=H$ [avicina]; (58) $R^1=R^2=R^3=R^4=R^6=OCH_3$; $R^5=R^7=H$ [sanguilutina]; (59) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=OH$; $R^4=OCH_3$; $R^5=R^6=R^7=H$ [fagaridina]; (60) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^4=R^6=OCH_3$; $R^5=R^7=H$ [chelilutina]; (61) $R^1=R^2=R^6=OCH_3$; $R^3+R^4=OCH_2O$; $R^5=R^7=H$ [sanguirubina] (4) $R^1+R^2=OCH_2O$; $R^3=R^6=R^7=H$; $R^4=R^5=OCH_3$ [nitidina]. (62) $R^1=OH$; $R^2=R^4=R^5=OCH_3$; $R^3=R^6=R^7=H$ [fagaronina]	Papaveraceae; Fumariaceae; Rutaceae.	43, 30, 33, 24, 34, 14, 44, 45, 46, 43, 15

	<p>Alcalóides Benzofenantridínicos Diméricos</p>	<p>(63) $R^1=R^2=OCH_3; R^3=CH_3$ [(+)-sanguidimerina] (64) $R^1=R^2=OCH_3; R^3=CH_3$ [(+/-)-chelidimerina] (65) $R^1+R^2=OCH_2O; R^3=CH_3$ [cheleritidimerina] (66) $R^1+R^2=OCH_2O; R^3=H$ [toddalidimerina]</p>	<p>Papaveracea; Rutaceae</p>	<p>33, 24, 37, 41</p>
	<p>Alcalóides Benzofenantridínicos Diméricos</p>	<p>(67) [caimandimerina]</p>	<p>Papaveracea; Rutaceae</p>	<p>33, 24, 37, 41</p>

Alcalóides Hexaidrobenzofenantridínicos

Este grupo é subdividido em alcalóides do tipo chelidonina (**19**), e acetilcorinolina (**26**), sendo que este último apresenta um grupamento metila na junção dos anéis **B/C**. Nos dois tipos deste grupo, os anéis **A** e **D** do esqueleto são aromáticos, (Tabela 1).

Alcalóides Diidrobenzofenantridínicos

São os alcalóides dihidrogenados e oxigenados no C-6. Constituem umas das maiores e mais bem distribuídas classes de alcalóides benzofenantridínicos, as estruturas de 30 - 44 na Tabela 1, são exemplos de alcalóides desta classe.

Alcalóides *N*-Demetilbenzofenantridínicos

Este terceiro grupo compreende alcalóides benzofenantridínicos aromáticos que não apresentam o grupamento NMe. Entretanto, apresentam concomitantemente o grupamento metilenodioxila ligado aos carbonos C-2 e C-3 do anel **A**, substituinte no carbono C-6 do anel **C** e substituinte nos carbonos C-7, C-8 e C-9 do anel **D**. Na Tabela 1 são mostrados alguns alcalóides deste grupo (45 - 54).

Alcalóides Benzofenantridínicos Quaternários

Este grupo de alcalóides é um dos mais estudados entre os isoquinolínicos, principalmente pelo fato de alguns deles apresentarem atividade biológica, tais como: antifúngica,^{34,14} antiinflamatória e antitumoral.⁴³ Na Tabela 1 apresentamos alguns alcalóides pertencentes a este grupo (55 - 62).

Alcalóides Benzofenantridínicos Diméricos

O grupo de alcalóides benzofenantridínicos diméricos, apresenta estrutura simétrica, com dois esqueletos originados de alcalóides diidrobenzofenantridínicos, ligados por uma unidade propanona ao carbono C-6 de cada estrutura.³³ Uma exceção encontrada na literatura é o caimandimerina (**67**), que possui seus esqueletos ligados por um grupo acetaldeído.³⁷ Como exemplo mostraremos na Tabela abaixo alguns alcalóides deste grupo.

3.1.2 Obtenção de Alcalóides Benzofenantridínicos

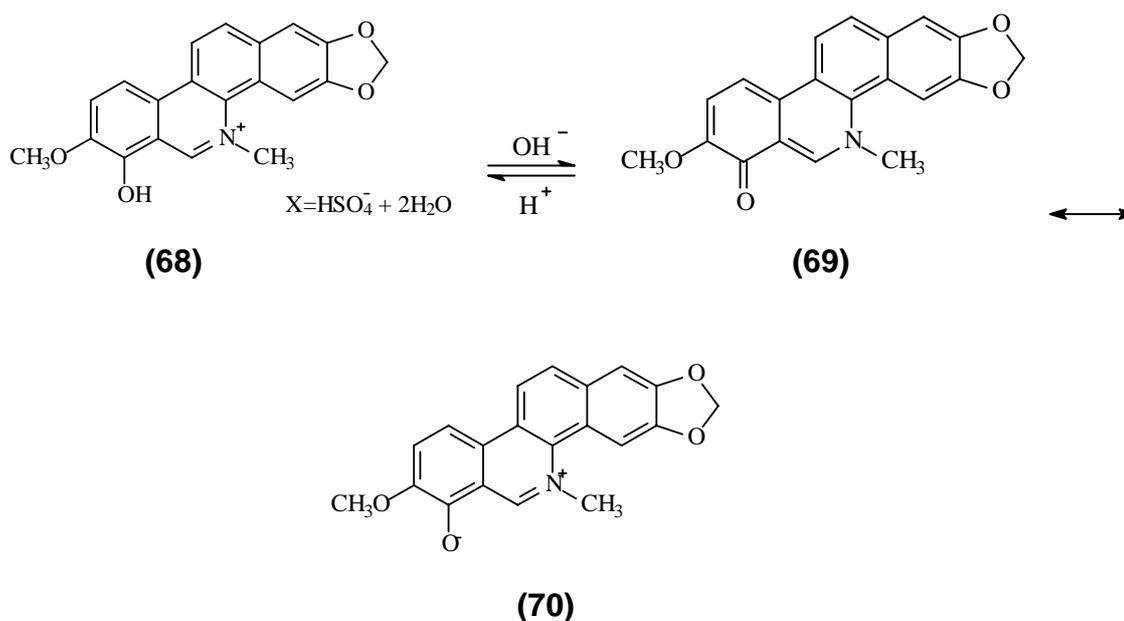
Os alcalóides benzofenantridínicos são isolados de plantas através de procedimentos clássicos de extração e separação, usualmente, por colunas cromatográficas ou por HPLC. Tem-se como exemplo desta forma de isolamento a determinação qualitativa e quantitativa de alcalóides benzofenantridínicos do extrato metanólico de *Hylomecon hylomeconoides* e *H. vernale*, pertencentes à família Papaveraceae. Este método foi usado para a separação de 6-acetonildiidroanguinarina (**31**) e de diidroanguinarina (**43**), das espécies acima citadas.³⁶

3.1.3 Farmacologia

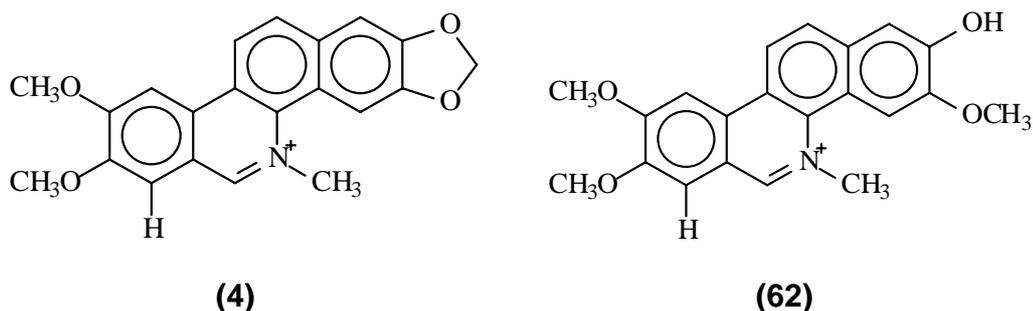
O interesse no estudo de *Zanthoxylum rhoifolium* foi despertado, principalmente, pelas atividades farmacológicas conferidas ao grupo de alcalóides que são encontrados nesta planta. Dentre as atividades farmacológicas exibidas pelo gênero *Zanthoxylum* destaca-se a atividade antitumoral.⁴⁷⁻⁴⁸

Recentemente Nakanishi⁴⁹ e colaboradores realizaram estudos referente a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* de NK 109 (**68**), um alcalóide benzofenantridínico sintético, e de alcalóides naturais não fenólicos do tipo benzofenantridínico, como cheleritina (**2**), sanguinarina (**55**), nitidina (**4**) e fagaronina (**62**), a fim de estabelecer uma relação estrutura-atividade.

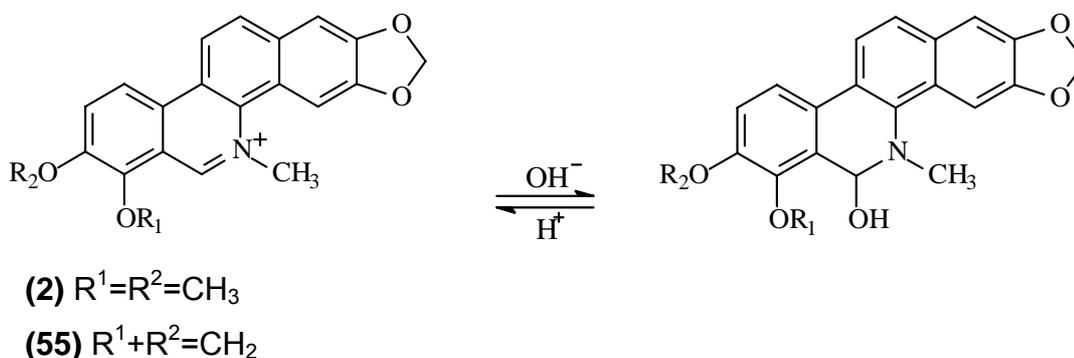
O estudo das propriedades estruturais de NK 109 (**68**), um alcalóide 7,8 oxigenado, mostrou que este se encontra em equilíbrio em condições biológicas entre a forma iônica e o híbrido de ressonância ceto-amino (**69**) e zwitterion (**70**). Em condições biológicas o equilíbrio encontra-se deslocado para a forma catiônica. Sua principal característica é a planaridade molecular e a permanência da forma catiônica do átomo de nitrogênio. Devido a estas características, NK 109 (**68**) possui uma significativa atividade antitumoral *in vivo*.



Muitos pesquisadores têm estudado os alcalóides benzofenantridínicos e alguns têm concluído que os compostos 8,9 oxigenados apresentam elevada atividade antitumoral, tendo como exemplos os compostos nitidina (**4**) e fagaronina (**62**), os quais em condições biológicas existem como formas catiônicas intactas, condição fundamental para apresentar atividade antitumoral.⁵⁰⁻⁵¹



Já os alcalóides 7,8 oxigenados, não apresentam atividade antitumoral, pois em condições biológicas eles perdem a estrutura catiônica para formar pseudobases.⁵⁰ Os alcalóides cheleritina (**2**) e sanguinarina (**55**) exemplificam este caso.



No presente estudo,⁴⁹ NK 109 (**68**) apresentou significativa atividade antitumoral in vivo, sendo, no entanto também um alcalóide 7,8 oxigenado, mas que apresenta uma hidroxila fenólica na posição C-7 possível de sofrer perda do próton ácido, levando a formação de um híbrido de ressonância, que mantém a forma catiônica do átomo de nitrogênio.

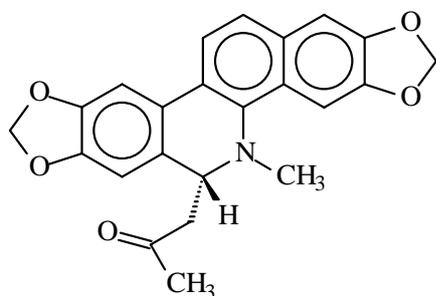
O cloreto de nitidina apresenta alta toxicidade e exibe atividade antitumoral contra células leucêmicas L1210 e P388 de ratos e inibe o câncer pulmonar de Lewis.^{18, 50}

Fagaronina (**62**), isolada de *Fagara zanthoxyloides* Lam, também apresenta boa atividade contra células leucêmicas P388.¹⁸ Ambos os alcalóides, nitidina (**4**) e fagaronina (**62**), bem como chelidonina (**19**) possuem atividade inibitória contra a enzima transcriptase reversa (RT).⁵² Esta enzima é uma DNA polimerase, responsável pela replicação viral para formar o DNA viral (provírus), em tumores causados por vírus.

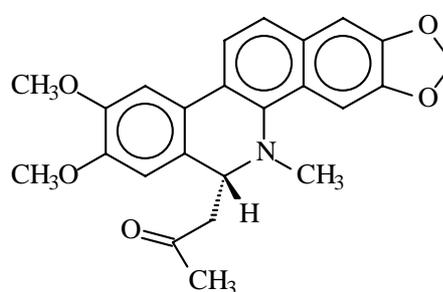
Além destes alcalóides benzofenantridínicos, existem outros da mesma classe, que possuem atividade antitumoral, como a chelidonina (**19**), usada no tratamento de câncer gástrico.³⁵ O alcalóide cheleritrina (**2**) é usada como inibidor da proteína quinase.⁵³

O alcalóide sanguinarina (**55**) apresenta diversas atividades biológicas como antimicrobial, atividade antimicrotubular e antiinflamatória.⁵⁴ O alcalóide cheleritrina (**2**) também apresenta uma considerável atividade antimicrobiana contra bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, e fungos.¹⁴

Os alcalóides 6-acetonildiidroavicina (**71**) e 6-acetonildiidronitidina (**72**) exibem significativa atividade antibacteriana e antifúngica.³⁸



(71)



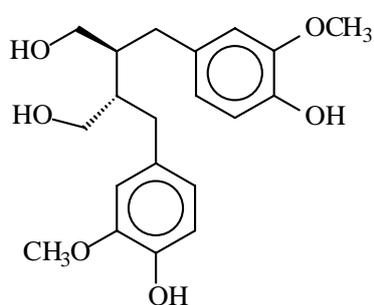
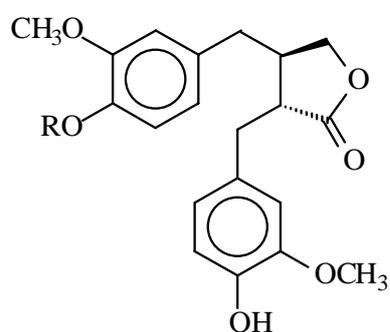
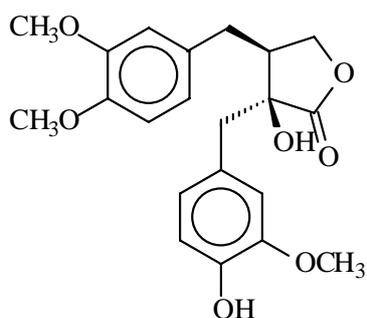
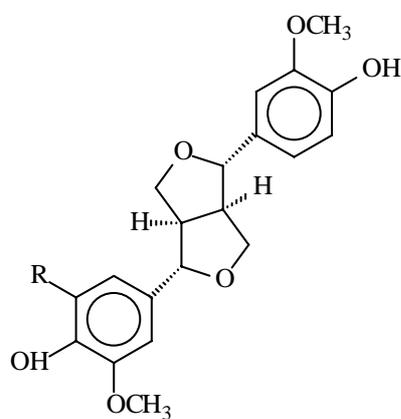
(72)

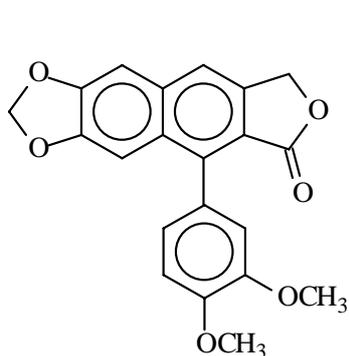
Além destes alcalóides benzofenantridínicos, diidrocheleritrina (**39**) e diidrosanguinarina (**43**), também apresentam propriedades antimicrobianas.⁴⁰

3.2 Lignanas

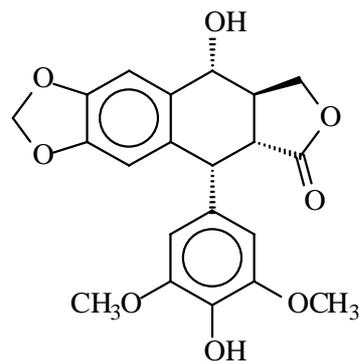
Lignanas são metabólitos secundários pertencentes à classe dos fenilpropanóides, que ocorrem em muitas plantas. Apresentam uma diversidade de atividades biológicas, como antitumoral, antiviral, antioxidante e antimitótica,⁵⁵⁻⁵⁶ fato que tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores.

Esta classe de metabólitos pode ser dividida em diversas e diferentes subfamílias, com base em suas diferenças estruturais. Entre a mais comum está a dibenzilbutânica, a qual pertence à lignana (+)- secoisolariciresinol (**73**); dibenzilbutirolactônica que tem como representante as lignanas matairesinol (**74**), arctigenina (**75**) e trachelogenina (**76**); furofurânicas, tendo como exemplo as lignanas (+)-pinoresinol (**77**) e medioresinol (**78**); arilnaftalenas, chinensina (**79**) e ariltetrahidronaftalena, tendo como representante principal a lignana podofilotoxina (**80**).⁵⁷

**(73)****(74)** R=H**(75)** R=CH₃**(76)****(77)** R=H**(78)** R=OCH₃



(79)

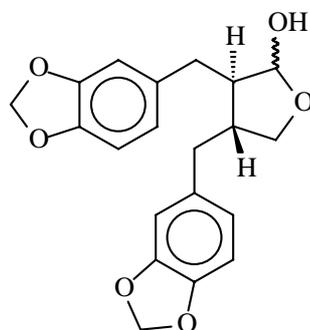


(80)

Muitas lignanas exibem importantes efeitos farmacológicos, por exemplo: podofilotoxina (**80**) (e seus derivados etoposídeo e tenitoposídeo) é usada contra uma variedade de cânceres,⁵⁸ como câncer de testículos e contra leucemia aguda linfocítica.

Em 1990, estudos realizados por Schröder⁵⁹ e colaboradores revelaram que arctigenina (**75**) e trachelogenina (**76**), a 0,27 e 0,52 μM , respectivamente, reduzem a replicação viral do vírus da imunodeficiência viral (HIV tipo 1) por 60 e 70%, e inibem a atividade viral da transcriptase reversa (RT) por 69 e 57%, respectivamente. Embora apresentem uma boa atividade, estes compostos não têm seu uso terapêutico permitido, devido a sua alta toxicidade.

Cubebina (**81**), uma lignana dibenzilbutirolactônica, isolada do extrato bruto hexânico das folhas de *Zanthoxylum naranjillo*, apresenta uma significativa atividade antiinflamatória, pelo uso de edema de pata induzido por carragenina em ratos.⁶⁰



(81)

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentos Utilizados

4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , foi utilizado o espectrômetro Bruker DPX 400, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, que opera a 400 MHz para ^1H e a 100 MHz para ^{13}C , em tubos de 5 mm. Os solventes utilizados para a realização das análises das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetil sulfóxido (DMSO). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm), em relação ao TMS ($\delta = 0,00$).

4.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão

O ponto de fusão de cada substância isolada foi determinado em um aparelho MQAPF - 301 digital da Micro Química, com termômetro não aferido.

4.1.3 Espectrômetro de Massas

Para obtenção dos espectros de massas EI foi utilizado o espectrômetro GC-MS Hewlett-Packard HP-6890I MSD5973. Os espectros de alta resolução foram obtidos utilizando um GC/MS HP Detector Seletivo de Massa, acoplado num HP 6890 GC. HREIMS foram registrados sobre um VG-Autospec-impacto de elétrons 70 eV.

4.1.4 Materiais e Métodos Cromatográficos

Cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel tipo 60 (Merck), 70-230 e 230-400 mesh, como suporte sólido. Cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas sobre placas de cromatofolhas Al de sílica gel 60 F_{254} (Merck). Cromatografias em placas preparativas, as quais foram preparadas no laboratório, usando-se sílica gel 60 GF $_{254}$ (Merck) em placas de

vidro. Para revelação, utilizou-se dos seguintes métodos: lâmpadas Ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm), (Spectroline), reagente de Dragendorff, modificado segundo Munier e Macheboenf,⁶¹ solução de ácido sulfúrico e álcool etílico (10:90 V/V) seguido de aquecimento. Os solventes e reagentes utilizados foram produtos analíticos Vetec, Merck e Reagen.

A seguir é mostrada uma relação que apresenta os principais sistemas de solventes utilizados em cromatografia.

1. Hexano (100%);
2. Hexano, Acetato (98:2);
3. Hexano, Acetato (95:5);
4. Hexano, Acetato (90:10);
5. Hexano, Acetato (85:15);
6. Hexano, Acetato (80:20);
7. Hexano, Clorofórmio (85:15);
8. Hexano, Clorofórmio (90:10);
9. Clorofórmio (100%)
10. Clorofórmio, Metanol (99,5: 0,5);
11. Clorofórmio, Metanol (99:1);
12. Clorofórmio, Metanol (97:3);
13. Clorofórmio, Metanol (95:5);
14. Clorofórmio, Metanol (Gradiente de Polaridade).

4.2 Coleta do material vegetal e identificação da planta

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Jaguari, no estado do Rio Grande do Sul, no mês de novembro de 2000. A identificação do material foi feita pelo Professor Renato Záchia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Sua exsicata HDFI 194 encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM.

4.3 Secagem, obtenção do pó vegetal e extração da casca da raiz

O material vegetal (10 kg da casca da raiz) foi seco, inicialmente sob luz, de modo a evitar a presença de fungos e, após esta primeira secagem foi seco em uma estufa de ar seco circulante, à temperatura de 50 °C. Em seguida o material foi moído em um moinho Wiley.

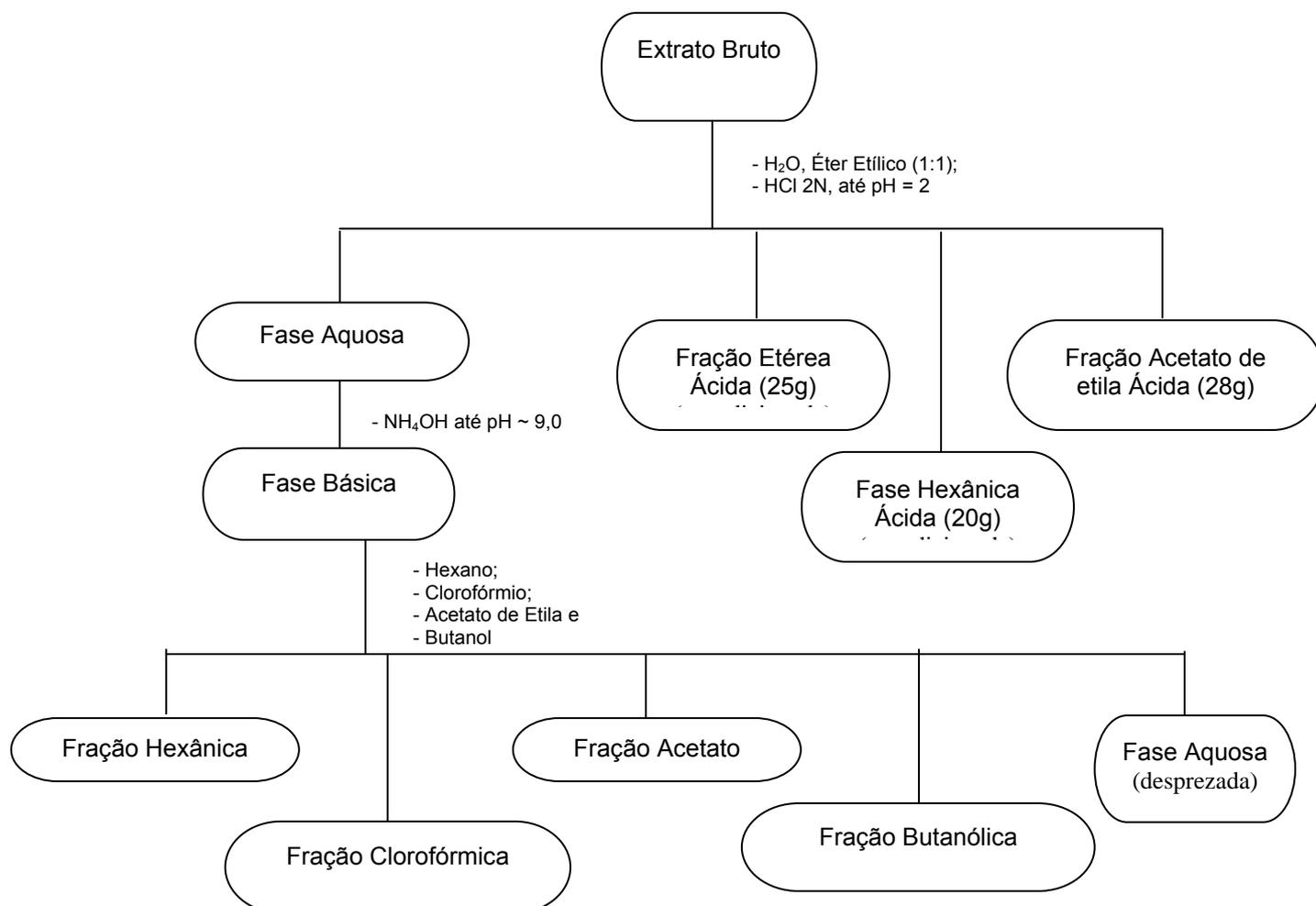
De posse do material moído, passou-se a fazer a extração a frio, utilizando-se metanol como solvente. Ao final de várias extrações, evaporando-se o solvente em rotavapor com pressão reduzida, obteve-se o extrato bruto, caracterizado como um resíduo escuro viscoso. O rendimento do extrato foi de 1500 g, ou seja, 15% do peso da casca da raiz.

4.4 Fracionamento do Extrato Bruto

Ao extrato bruto (1500 g) da casca da raiz, foi adicionado 1 L de água e após esta mistura foi acidificada com HCl 2N até $\text{pH} \pm 2$. Esta mistura foi extraída exaustivamente com solventes de polaridades crescentes, como hexano, éter etílico e acetato de etila. Cada uma destas frações foi lavada com água e secas com sulfato de sódio anidro. Os solventes foram evaporados, a fim de obter as várias frações ácidas, a saber, as frações hexânica, a etérea e a acetato de etila. As frações estudadas, hexânica, etérea e acetato de etila foram submetidas a técnicas cromatográficas, como a cromatografia em coluna e cromatografia em placas preparativas.

A solução aquosa remanescente foi alcalinizada com hidróxido de amônia (NH_4OH) até que se atingisse o $\text{pH} \pm 9,0$ e logo após, a solução foi extraída exaustivamente com solventes de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, Fluxograma-1 na página 43.

Cada fração obtida foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada e analisada por CCD.

Fluxograma 1 - Fracionamento do extrato bruto de *Zanthoxylum rhoifolium*.

4.5 Análise da fração hexânica ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*.

A fração hexânica ácida (12 g) foi previamente analisada por cromatografia de camada delgada (CCD), em vários sistemas de solventes e através desta análise detectou-se a presença de vários alcalóides, bem como a presença de outros metabólitos secundários. A presença de alcalóides foi indicada através do uso do reagente de Dragendorff. O resultado positivo é caracterizado por uma intensa coloração laranja. A presença de alcalóides nesta fração pode ser explicada pelo fato destes serem fracamente básicos e não formarem sais com a adição de HCl no momento da extração.

Esta fração foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna (CC), utilizando-se sílica gel 60 (Merck), 70-230 mesh como suporte sólido e hexano (100 %) e hexano: clorofórmio (100:0 – 0:100 %) como sistema eluente. As

subfrações foram coletadas em frascos de vidro com frações de 50 mL cada e analisadas individualmente por cromatografia de camada delgada (CCD) e reunidas conforme suas semelhanças em R_f , como mostrado na Tabela 2.

Os sistemas de solventes utilizados tanto em cromatografia de camada delgada, quanto em cromatografia em placas preparativas estão listados na página 41.

Tabela 2: Cromatografia em coluna da fração hexânica ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

FRAÇÕES	SOLVENTES %	ALCALÓIDES ISOLADOS	PESO (mg)
I – 1 a 4	Hexano	Mistura de substâncias	160
II – 5 a 9	Hexano: CHCl ₃ (95:5)	Mistura de substâncias	250
III – 10 a 14	Hexano:CHCl ₃ (90:10)	Lupeol +mistura de substâncias	980
IV – 15 a 21	Hexano: CHCl ₃ (80:20)	Sesamina + mistura de substâncias	790
V – 22 a 28	Hexano: CHCl ₃ (70:30)	Mistura de substâncias	1100
VI –29 a 35	Hexano: CHCl ₃ (60:40)	4AC+ 8AC + mistura de substâncias	1300
VII – 36 a 42	CHCl ₃ (100)	Diidrocheleritina + mistura de substâncias	850
VIII – 43 a 49	CHCl ₃ :metanol (95:5)	Mistura de substâncias	430
IX – 50 a 54	CHCl ₃ :metanol (90:10)	Mistura de substâncias	580
X – 55 a 61	CHCl ₃ :metanol (80:20)	Mistura de substâncias	870
XI – 62 a 65	CHCl ₃ :metanol (70:30)	Mistura de substâncias	270
XII – 66 a 74	Metanol (100)	Mistura de substâncias	1090

4.5.1 Dados sobre os compostos isolados da fração hexânica ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

4.5.1.1 Lupeol 1AC (11)

A substância **1AC** foi obtida na forma de um sólido branco (500 mg), após cristalização em hexano. Sua pureza foi confirmada em CCD, utilizando-se vários sistemas de solventes. A estrutura deste composto foi determinada por métodos

espectroscópicos e por comparações com dados da literatura. Por meio destas análises, comprovou-se tratar do triterpeno lupeol (**11**). Após sua purificação, foram realizadas as seguintes análises:

$R_f = 0,42$ (hexano, acetato 90:10)

P.F = 198-200 °C;

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig. 27, pag. 115)

4.5.1.2 Sesamina 3AC (114)

Esta substância (240 mg) foi obtida na forma de um sólido branco. Foi purificada através de cromatografia em coluna (CC), usando o sistema de solvente nº 7 (página 41). Em CCD, mostrou-se pura em vários sistemas de solventes. Apresenta coloração azul em ambos os comprimentos de onda da luz ultravioleta e é revelada em ácido sob aquecimento. Após sua purificação, foram realizadas as seguintes análises:

$R_f = 0,46$ (CHCl_3 100%)

P.F = 122-123 °C; (123-124 °C); ⁶²

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig. 23A e 23B, pag. 110) δ (ppm) = (Tabela-11, pag. 113).

Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 (Fig. 25, pag. 112) δ (ppm) = (Tabela-11, pag. 113).

4.5.1.3 Lignana 4AC (120)

A substância identificada pela estrutura **120** (140 mg), a qual se apresenta na forma sólida, foi isolada através de cromatografia em placa preparativa, utilizando o sistema de solvente 9 (página 41). Em CCD, mostrou-se pura em vários sistemas de solventes e ao reagir com o reagente Dragendorff não apresentou resultado positivo. Após sua purificação, foram feitas as seguintes análises:

$R_f = 0,62$ (CHCl_3 100%)

P.F = 146, 8-148 °C; (145 °C); ⁶³

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig. 17A e 17B, pag. 97 e 98) δ (ppm) = (Tabela-10, pag. 108).

Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 (Fig.19A e 19B, pag. 101) δ (ppm) = (Tabela-10, pag. 108).

Espectro de Massas EI (Fig.16, pag. 96) $m/z=352$ (M^+), 135 (pico base).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +111.6$ [c 0,002, CHCl_3]; $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +86$ (CHCl_3)\}.⁶³

4.5.1.4 Diidrocheleritrina (39)

Este metabólito (152 mg) foi isolado através de coluna cromatográfica, utilizando-se hexano e hexano: acetato como sistemas de solventes. Apresentou-se como um sólido amarelo e reagiu de forma positiva com o reagente de Dragendorff, indicando a presença de nitrogênio básico na estrutura molecular, característico de alcalóides. Em ambos os comprimentos de onda da luz ultravioleta, apresenta coloração azul, característica de alcalóides benzofenantridínicos. Com o mesmo foram realizadas as seguintes análises:

$R_f = 0,66$ (Hexano, acetato 80:20)

P.F = 160-16 °C; (161-162 °C);⁶⁴

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig.1A e 1B, pag. 61 e 62) δ (ppm) = (Tabela-5, pag. 65).

Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 (Fig.3A e 3B, pag. 64) δ (ppm) = (Tabela-5, pag. 65).

4.5.1.5 Kaerofilina 8AC (117)

A substância identificada pela estrutura **117** (80 mg), apresentou-se como um sólido cristalino incolor. Foi isolado através de cromatografia em coluna (CC), usando hexano e hexano: acetato de etila como sistema eluente. Foi cristalizado em CHCl_3 e acetato de etila, obtendo cristais em forma de agulha. Sua pureza foi confirmada em CCD, utilizando vários sistemas de solventes. Não apresentou reação positiva com o reagente de Dragendorff, o que permitiu concluir que não se tratava de um alcalóide. Com esta substância foram feitas as seguintes determinações:

$R_f = 0,55$ (Hexano, acetato 70:30)

P.F = 150,4-150,9 °C; (150 °C).⁶⁵

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig.10A e 10B, pag. 82) δ (ppm) = (Tabela-9, pag. 94). Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 (Fig.12A e 12B, pag. 88) δ (ppm) = (Tabela-9, pag. 94).

Espectro de Massas EI (Fig 9, pag. 80) $m/z=368$ (M^+), 135 (pico base).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -114^\circ$ [c 0.0028, CHCl_3]; $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -91.8^\circ$ (c 0.39, $\text{CHCl}_3\}$.⁶⁵

4.6 Análise da fração etérea ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Esta fração (16 g) foi previamente analisada por cromatografia de camada delgada (CCD), em vários sistemas de solventes, detectando-se a presença de vários alcalóides, além de outras substâncias com Rfs muito próximos. A existência de alcalóides na mistura foi indicada através do teste positivo com o reagente de Dragendorff. A presença de alcalóides na fração etérea ácida também pode ser explicada pelo fato destes serem fracamente básicos e não formarem sais com a adição de HCl no momento da extração.

A fração etérea da casca da raiz foi submetida a uma separação através de coluna cromatográfica, utilizando-se sílica gel 60 (Merck), 70-230 mesh como suporte sólido e hexano (100%), hexano: CHCl_3 (100:0-0:100%) e após CHCl_3 :metanol (100:0-0:100%) como sistemas eluentes.

As subfrações foram coletadas em frascos de 50 ml cada e depois de analisadas individualmente por CCD, estas foram reunidas conforme suas semelhanças de Rfs, resultando em várias subfrações, conforme Tabela 3:

Tabela 3: Coluna Cromatográfica da fração etérea ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

FRAÇÕES	SOLVENTES %	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	PESO (mg)
I- 1 a 7	Hexano (100)	Mistura de substâncias	950
II- 8 a 13	Hexano, CHCl ₃ (95:5)	Mistura de substâncias	800
III- 14 a 17	Hexano, CHCl ₃ (90:10)	Diidrocheleritrina+ sesamina + mistura de substâncias	1130
IV- 18 a 22	Hexano, CHCl ₃ (75:25)	Kaerofilina +4AC +mistura de substâncias	1050
V- 23 a 26	CHCl ₃ (100)	Bocconolina + mistura de substâncias	1200
VI- 27 a 30	CHCl ₃ (100)	Mistura de substâncias	650
VII- 31 a 38	CHCl ₃ , metanol (95:5)	Mistura de substâncias	980
VIII-39 a 41	CHCl ₃ , metanol (90:10)	Mistura de substâncias	750
IX- 42 a 44	CHCl ₃ , metanol (90:10)	Cheleritrina +mistura de substâncias	890
X- 45 a 52	CHCl ₃ , metanol (80:20)	Mistura de substâncias	1230
XI-53 a 60	CHCl ₃ , metanol (70:30)	Mistura de substâncias	1150
XII- 61 a 68	Metanol (100)	Mistura de substâncias	740

4.6.1 Dados sobre os compostos isolados da fração etérea ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

4.6.1.1 Bocconolina 9AC (42)

Esta substância (40 mg) foi identificada na fração 5 da coluna cromatográfica. Foi isolada através de cromatografia em placa preparativa, utilizando o sistema de solvente 6 (página 41). Apresentou-se como um sólido amarelo e

reagiu positivamente com o reagente de Dragendorff, sugerindo ser a estrutura de um alcalóide. Com o mesmo foram realizadas as seguintes análises:

$R_f = 0,48$ (Hexano, acetato 80:20).

P.F = 230-231 °C; (232-233 °C).⁶⁶

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig. 8A e 8B, pag. 76 e 77) δ (ppm) = (Tabela-8, pag. 77).

4.6.1.2 Cheleritrina 10A (2)

Este metabólito (478 mg) foi isolado da subfração IX da fração etérea ácida na forma de um sólido amarelo. Apresentou-se puro em cromatografia de camada delgada (CCD) em vários sistemas de solventes. Ao reagir com o reativo de Dragendorff apresentou teste positivo, sugerindo se tratar de um alcalóide. Com esta substância foram feitas as seguintes análises:

$R_f = 0,38$ (CHCl_3 , metanol 95:5)

P.F = 191-193 °C; (193 °C).⁶⁷

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em DMSO (Fig. 7, pag. 73) δ (ppm) = (Tabela-7, pag. 73).

4.6.1.3 6-Acetonildiidrocheleritrina R10 (33)

Este metabólito (5 mg) foi isolado através de cromatografia em placa preparativa, utilizando como sistema de solvente 6 (página 41). Foi isolado na forma de um sólido branco e reagiu positivamente com o reagente de Dragendorff. Apresentou-se puro em CCD em vários sistemas de solventes. Com o mesmo foram feitas as seguintes análises:

$R_f = 0,55$ (Hexano, acetato 80:20)

P.F = 195-196,8 °C; (193-194 °C).⁶⁸

Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz, em CDCl_3 (Fig. 5A, 5B e 5C, pag. 68 e 69) δ (ppm) = (Tabela-6, pag. 71). Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz, em CDCl_3 (Fig. 6A e 6B, pag. 70) δ (ppm) = (Tabela-6, pag. 71).

As demais substâncias presentes nesta fração (sesamina 3AC e as lignanas gadaina 4AC e kaerofilina 8AC) foram identificadas como sendo as mesmas isoladas da fração hexânica ácida. Desta forma estes metabólitos não foram isolados e quantificados, apenas foram comparados com referências padrões em CCD.

A fração acetato de etila ácida foi submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando-se sílica gel 60 (Merck), 70-230 mesh como suporte sólido e hexano (100%), hexano:CHCl₃ (100:0-0:100%) e após CHCl₃:metanol (100:0-0:100%) como sistemas eluentes e a partir desta separação cromatográfica obteve-se os mesmos metabólitos isolados nas frações hexânica e etérea ácidas.

4.7 Determinação da Atividade Antimicrobiana *in vitro*

4.7.1 Microrganismos Empregados nos Ensaio Microbiológicos

Para a verificação da atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas na forma pura foram utilizadas as cepas padrão de ATCC (American Type Culture Collection) constituídas por microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos conforme Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Microrganismos Indicadores

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

4.7.2 Substâncias Empregadas como Padrões nos Ensaio Microbiológicos

Os padrões de antibióticos, Amoxicilina para bactérias, potência (978.9 µg / mg) e Nistatina para fungos, potência (2464.38 UI / mg), utilizados como referência nos ensaios de determinação da atividade antimicrobiana são padrões primários USP e foram preparados conforme FDA. ⁶⁹

4.7.3 Meios de Cultura

4.7.3.1 Manutenção dos Microrganismos Indicadores

Com a finalidade de preservá-las as cepas dos microrganismos indicadores eram repicadas a cada 15 dias em tubos de ensaios contendo de 5-8 mL de Ágar simples para bactérias e Ágar Sabouraud para fungos, sendo os mesmos incubados a 37 °C de 24-48 horas. A seguir, eram retirados da estufa e mantidos à temperatura ambiente, para estudos subseqüentes.

Ágar simples

- Caldo Nutriente	8,0 g
- Ágar – ágar	15,0 g
- Água destilada	1.000,0 mL

Após a dissolução em água destilada, o meio foi distribuído em volumes de 5,0 mL em tubos de ensaio 16x150 mm, tamponados com algodão e esterilizados em autoclave a 120 °C durante 15 minutos . Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados até a solidificação do meio.

Ágar sabouraud

- Peptona	10,0 g
- Dextrose	40,0 g
- Ágar – ágar	15,0 g
- Água destilada	1.000,0 mL

Reidratou-se 65,0 g do meio em 1.000,0 mL de água destilada e aquecida até a fusão do ágar. Em seguida 5,0 mL foram distribuídos em tubos 16x150 mm e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após os tubos foram mantidos inclinados até a sua solidificação.

4.7.3.2 Preparo dos Inóculos Bacterianos e Fúngicos

Para a obtenção dos mesmos, as culturas bacterianas e fúngicas provenientes dos meios de manutenção foram semeadas em caldo de Caseína-Soja.

Caldo de Caseína-Soja

- Caseína tratada por suco pancreático	17,0 g
- Farinha de soja por digestão papaínica	3,0 g
- Dextrose	2,5 g
- Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
- Cloreto de sódio	5,0 g
- Água destilada	1.000,0 mL

4.7.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade das amostras em estudo (extratos, frações, substâncias puras), foram utilizados os seguintes meios de culturas:

Ágar Mueller-Hinton

- Infuso de carne	300,0 g
- Caseína hidrolisada	17,5 g
- Amido	1,5 g
- Ágar-ágar	17,0 g
- Água destilada	1.000,0 mL

De acordo com instruções do fabricante, reidratou-se 38,0 g em água destilada, esterilizando em seguida em autoclave a 120 °C por 15 minutos.

4.7.3.4 Preparo das suspensões bacterianas (inóculo)

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de microrganismos indicadores mantidos inclinados em ágar simples foram transferidas para tubos contendo 5,0 mL de uma solução salina estéril e padronizada pela escala de MacFarland (0,5 mL de cloreto de bário 0,048 M+ 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1,0%). Obteve-se, assim um inóculo contendo aproximadamente 10^5 UFC. mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias / mL), equivalente a metade da escala 1 de MacFarland, e denominada de “suspensão concentrada”, utilizada para a elaboração da camada semeada, quando adicionada ao meio de cultura, na proporção de 0,5%.

4.7.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia

Este é um método qualitativo aplicado a detecção de compostos antimicrobianos em misturas de composição complexa e mesmo desconhecida. O ensaio de determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia foi realizado de acordo com Rahalison⁷⁰ e colaboradores, e Hamburger & Hostettmann.⁷¹ Para a realização deste, foram utilizadas placas de Petri de 10x100 mm de diâmetro, onde foram depositadas as cromatoplasmas com as amostras a serem analisadas. Em seguida, foram adicionados 10 mL do meio de cultura inoculado com o microrganismo indicador sobre as cromatoplasmas. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas na posição invertida por 16 a 24 horas para bactérias a 35 °C e a 27 °C por 48 horas para fungos. Decorrido o período de incubação, as cromatoplasmas foram reveladas com uma solução aquosa de sal de tetrazóleo (5 mg / mL), e incubados por um período entre 2 a 4 horas a 35 °C.

4.7.5 Determinação da Quantidade de Substância Ativa (QSA) por Bioautografia

Para a determinação da QSA das substâncias isoladas, foram testadas as concentrações de 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µg, enquanto que para o extrato bruto e as frações foram testadas as concentrações de 200,0; 100,0; 50,0; 25,0; 12,5 e 6,25 µg contra bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. subtilis*;

Gram-negativas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. setubal* e fungos *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans* e *C. dubliniensis*. Os microrganismos usados para os ensaios antimicrobianos foram conservados no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) do Departamento de Química da UFSM.

Após a aplicação das amostras em cromatoplasmas, estas foram depositadas em placas de petri estéreis, sobre as quais foi adicionado o meio de cultura inoculado com o microrganismo indicador, conforme descrito no item 4.7.4.

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 da substância em estudo.

4.7.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição.

A efetividade antimicrobiana de uma substância é freqüentemente descrita em termos de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é um ensaio quantitativo aplicado a avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. Este método é realizado em microdiluição (100-500 µL) e avalia o comportamento dos microrganismos frente a concentrações crescentes dos compostos antimicrobianos em meio de cultura líquido.

Para a determinação da CIM pelo método de microdiluição, empregou-se a técnica descrita pela NCCLS.⁷² Os ensaios foram realizados em placas estéreis de 96 micropoços, onde se efetuou uma série de diluições das amostras em meio caldo caseína de soja e sabouraud, contendo 2% do surfactante Tween 80, iniciando da concentração de 20 mg/mL de amostra. Os poços foram inoculados com a suspensão microbiana, na concentração de 1×10^6 células viáveis, com intensa homogeneização e 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, indicado pelo aparecimento de turvação, possibilitando assim, a verificação da CIM.

As culturas que não apresentaram crescimento nos poços foram usadas para inocular placas de Petri contendo meio ágar onde foram determinados a Concentração Bactericida ou Fungicida Mínima (CBM/CFM), sendo consideradas

como: a menor concentração da substância onde não ocorre crescimento microbiano. Testes em branco foram efetuados simultaneamente e as amostras foram realizadas em triplicata.

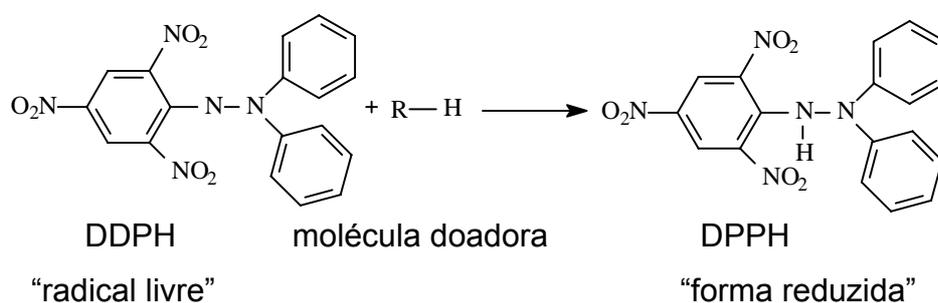
4.8 Teste de Atividade Antioxidante

4.8.1 Método do radical livre DPPH

Neste método o ensaio emprega o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e este têm recebido grande destaque por ser de fácil realização e de baixo custo.

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização de um elétron disponível na parte central da molécula, assim a molécula não se dimeriza, como ocorre com muitos outros radicais. Esta deslocalização também dá origem à uma coloração violeta intensa, caracterizada por uma banda de absorção, em solução alcoólica, centrada em 520 nm.⁷³

Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, isto dá origem a sua forma reduzida com perda da coloração violeta, permanecendo apenas um resíduo de cor amarelo pálido de algum grupo de picril presente. A reação primária que ocorre é representada no Esquema 2, a seguir.⁷⁴



Esquema 2: Representação esquemática da reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, dando origem a sua forma reduzida, DPPH-H.

A redução do radical DPPH permite estimar a atividade antioxidante em termos da habilidade da substância ou misturas de compostos como doador de elétrons (H) ou trapeador de radicais livres.

As amostras em solução foram aplicadas em cromatoplasmas, utilizando como antioxidantes padrões substâncias naturais como a quercetrina, na concentração de (2 mg/mL) sendo aplicada juntamente com as amostras.

Após a aplicação das placas, uma solução metanólica de DPPH foi borrifada sobre as cromatoplasmas, deixando-as em repouso por cerca de 1 hora. Aos poucos a coloração violácea foi diminuindo, com a formação de manchas amarelas sobre o fundo violeta.

4.9 Teste de Atividade Antitumoral

4.9.1 Teste de atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas

O estudo da atividade antitumoral, através do ensaio *in vitro*, foi realizado pelo grupo de pesquisa do professor Dr. João Ernesto de Carvalho, coordenador da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) da Universidade de Campinas- UNICAMP.

A metodologia usada é a mesma empregada pelo Instituto Nacional do Câncer (INC).⁷⁵

Para a realização da triagem *in vitro* foram selecionadas as linhagens de culturas de células tumorais humanas: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (pulmão), PCO-3 (próstata), HT-29 (cólon), OVCAR (ovário), 786-0 (rim) e K-562 (leucemia). Essas linhagens são cultivadas em RPMI com 5% de soro fetal bovino inativado, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e ambiente úmido.

Os testes de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas foram realizadas com as frações ácidas etérea e hexânica da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*, fração básica clorofórmica, juntamente com as substâncias puras isoladas desta parte vegetal da planta em estudo, como os alcalóides benzofenantridínicos boconolina (**42**), diidrocheleritrina (**39**), zantoxilina (**10**), 6-acetonildiidroavicina (**71**), diidroavicina (**38**), cheleritrina (**2**), rhoifolina A (**6**), as lignanas dibenzilbutirolactônicas Kaerofilina (**117**) e gadaina (**120**).

Para a realização dos testes, as amostras acima mencionadas foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 1 mg/ml

resultando em soluções estoques. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, evitando a atividade do DMSO.

Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 μ l de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido, para readaptação ao ambiente. Depois desse período uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de células no momento da adição das drogas. Nas demais placas foram adicionadas as drogas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 μ g/ml e incubadas por 48 horas. Após este período, As placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e fixadas com 50 μ l de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão (leucemia). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50 μ l do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente.

O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 μ M e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos, e calculada a porcentagem de inibição de crescimento.

Com os dados obtidos, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração da substância teste. Como controle positivo foi padronizado o quimioterápico doxorrubicina.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Em continuação ao nosso estudo sobre plantas pertencentes à família Rutaceae, desenvolvemos neste trabalho a análise de uma planta do gênero *Zanthoxylum*, mais especificamente a espécie *Zanthoxylum rhoifolium*. As frações estudadas neste trabalho foram as frações ácidas, a saber, as frações hexânica, etérea e acetato de etila, em razão de que as frações básicas hexânica e clorofórmica, já haviam sido analisadas anteriormente.² Estas foram submetidas ao estudo da atividade antitumoral, antimicrobiano e antioxidante.

5.1 Compostos isolados de *Zanthoxylum rhoifolium*

A investigação das frações ácidas permitiu o isolamento e a determinação estrutural de quatro alcalóides benzofenantridínicos, identificados como sendo alcalóides já isolados anteriormente e denominados de diidrocheleritrina (**39**),^{76-77, 66} bocconolina (**42**),^{66, 78-80} cheleritrina (**2**)^{68,80} e 6-acetonildiidrocheleritrina (**33**).^{80-82, 68,77} Juntamente com estes quatro alcalóides, foram isoladas três lignanas. Uma foi identificada como sendo a estrutura da lignana sesamina, de estrutura (**114**), comum no gênero *Zanthoxylum*.⁸³⁻⁸⁴

As outras duas, foram identificadas como sendo lignanas pertencentes à classe benzilbutirolactônicas, denominadas de kaerofilina (**117**)⁶⁵ e gadaina (**120**).⁶³

As estruturas das substâncias isoladas neste trabalho foram determinadas com base em dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C unidimensionais e bidimensionais, homonucleares e heteronucleares (COSY, HMQC, HMBC), espectrometria de massas e através da comparação dos dados obtidos a partir do ponto de fusão. Juntamente com estes dados utilizaram-se ainda substâncias puras, que foram usadas como referências padrões em CCD. Além disso, foi possível atribuir dados de deslocamentos químicos de hidrogênios e de carbonos para todas as estruturas. Para algumas delas foi possível comparar dados de deslocamentos com dados da literatura.

5.2 Alcalóides isoquinolínicos

Esta classe de alcalóides é a mais comum em plantas pertencentes à família Rutaceae⁸⁵ e a esta classe de metabólitos são atribuídas uma variedade de atividades farmacológicas, principalmente por serem precursores de moléculas terapêuticas como a morfina, papaverina e berberina. Dentro desta classe, os alcalóides benzofenantridínicos são os mais comuns e terão uma maior ênfase, por serem estes umas das classes de metabólitos isoladas e discutidas neste trabalho.

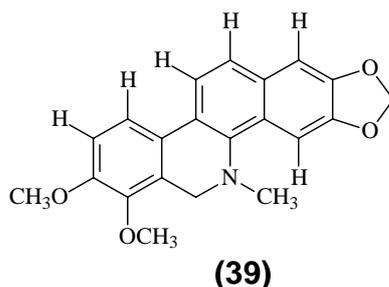
5.3 Alcalóides benzofenantridínicos

Neste trabalho foram isolados quatro alcalóides benzofenantridínicos da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*, codificadas como 6AC (**39**), 9AC (**42**), 10A (**2**) e R10 (**33**). Suas estruturas foram confirmadas através da análise de RMN de ¹H e ¹³C uni-e bidimensional e por meio de comparações com os dados descritos na literatura.

5.3.1 Diidrocheleritrina (**39**)

O referido composto foi isolado das frações hexânica e etérea em grande quantidade e apresentou-se na forma de um sólido amarelo. Em CCD, mostrou-se puro e reagiu positivamente quando se utilizou o reagente de Dragendorff como revelador, indicando a presença de um nitrogênio básico, característico de alcalóides.

Após analisar a substância por métodos físicos, como Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C e comparar estes dados com os presentes na literatura,⁶⁴ foi possível propor a estrutura (**39**) para este alcalóide. A estrutura da substância corresponde à mesma de um alcalóide já isolado anteriormente e denominado de Diidrocheleritrina.



5.3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro de RMN de ^1H de diidrocheleritina (Fig.1A e 1B, pag. 61 e 62), permitiu a atribuição de sinais de vários prótons presentes na estrutura (**39**). Neste espectro, observa-se a presença de um intenso singlete (3H, s) a $\delta=2,58$ ppm, o que sugere a presença de um nitrogênio metilado na estrutura. Além disso, foi possível constatar a presença de quatro hidrogênios aromáticos, na forma de dubletos com constantes de acoplamento $J=8,54$ Hz, sugerindo uma relação orto em cada par.

Dois sinais, um a $\delta=3,86$ ppm e o outro a $\delta=3,90$ ppm, ambos com integração para três prótons, foram atribuídos aos dois grupos metoxilas (-O-CH₃) presentes na estrutura (**39**), correspondentes aos prótons H-15 e H-16. Em adição a estes sinais, observou-se um que ressona a $\delta=6,01$ ppm, com integração para dois hidrogênios, referente ao grupo metilenodioxila (-O-CH₂-O-). Este resultado foi confirmado pela análise do espectro de RMN de DEPT 135°, onde aparece um sinal em $\delta=48,73$ ppm de amplitude negativa.

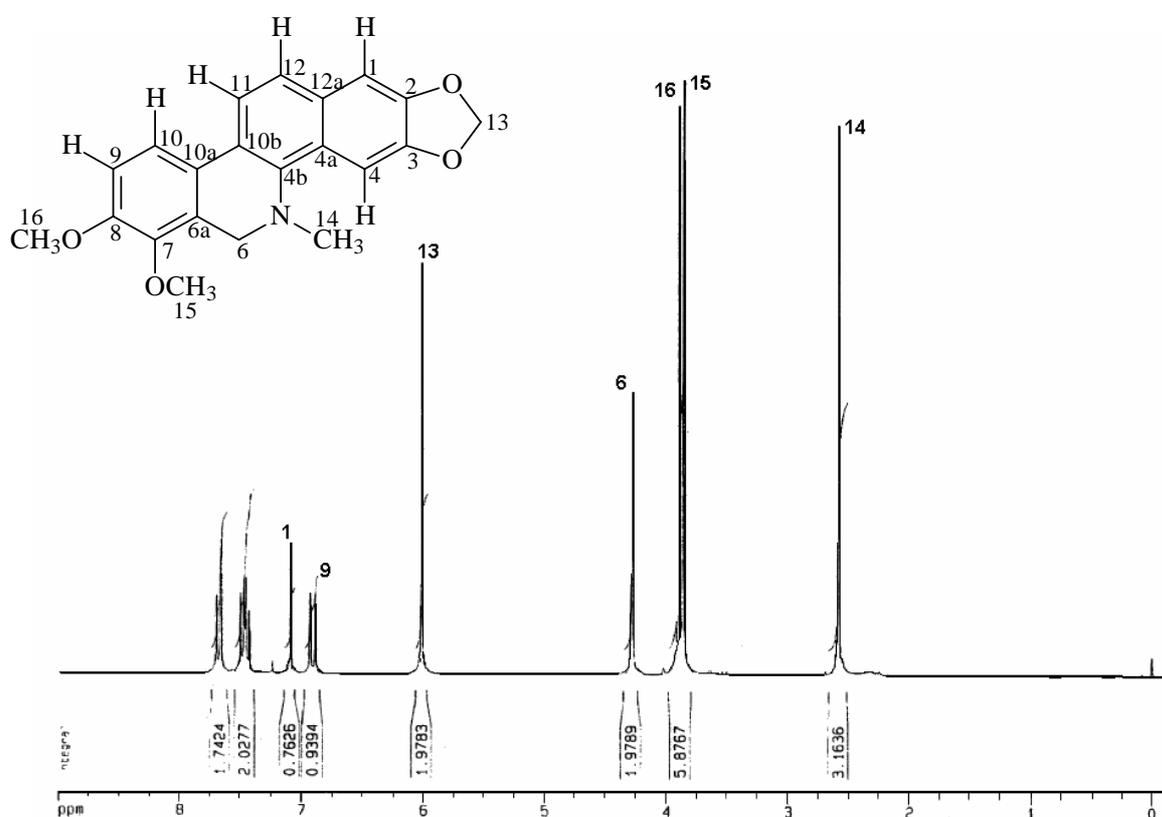


Figura 1A: Espectro de RMN ^1H , a 200 MHz, de Diidrocheleritrina (**39**) em CDCl_3

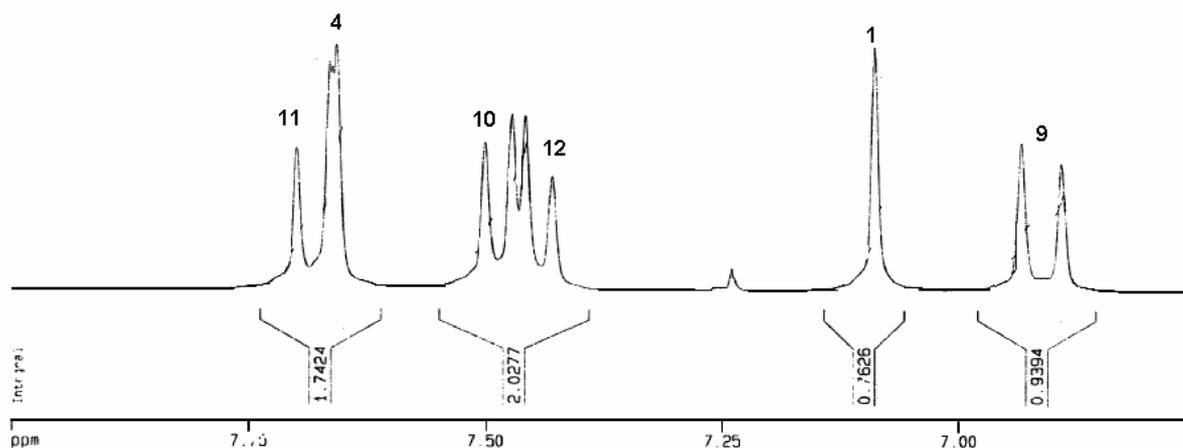
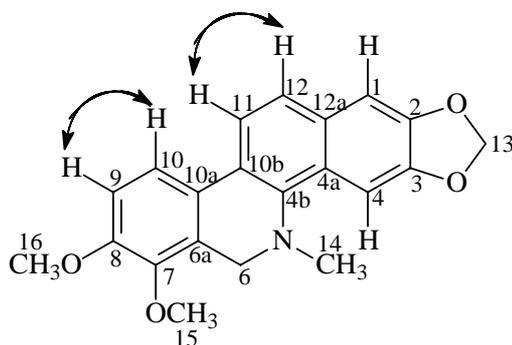


Figura 1B: Espectro de RMN ^1H Expandido (6,89-7,70 ppm), de Diidrocheleritrina (**39**) em CDCl_3 .

5.3.1.3 Análise do espectro COSY ^1H - ^1H

Com a finalidade de determinar corretamente a posição e a vizinhança dos hidrogênios da estrutura (**39**), foi realizado um experimento COSY.

Através da análise deste espectro (Fig.2, pag. 63) foi possível identificar a existência de dois sistemas de spins, cada um formado por dois prótons aromáticos, com relação orto entre si.



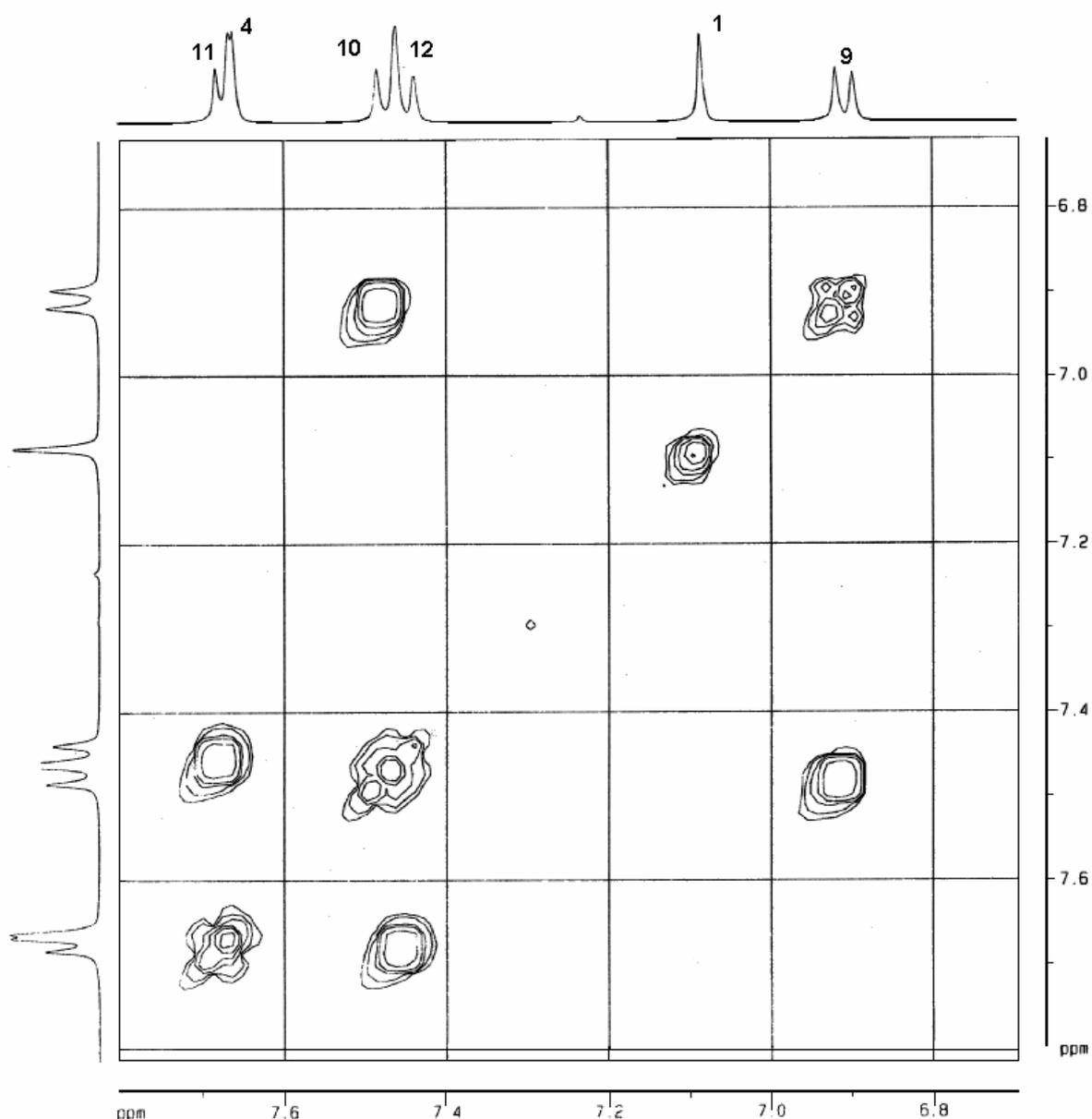


Figura 2: Espectro de RMN 2D, COSY Expandido região espectral dos aromáticos de Diidrocheleritina (**39**) em CDCl_3

5.3.1.4 Análise Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

O espectro totalmente desacoplado de ^{13}C (Fig. 3A e 3B, pag. 64), apresentou vinte e um sinais numa região espectral compreendida entre $\delta=41,25$ - $152,24$ ppm. Utilizando-se o espectro DEPT 135° (Fig. 4, pag. 65), pode-se observar que a estrutura é composta por dois carbonos metilênicos (CH_2), seis metínicos (CH), três metílicos (CH_3) e dez carbonos quaternários. Os sinais dos carbonos

quaternários encontram-se na região espectral característica dos aromáticos, compreendida entre $\delta=124,21-152,24$ ppm. Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C da estrutura descrita acima, comparados com os dados da literatura ⁶⁴ estão na Tabela 5, página 65.

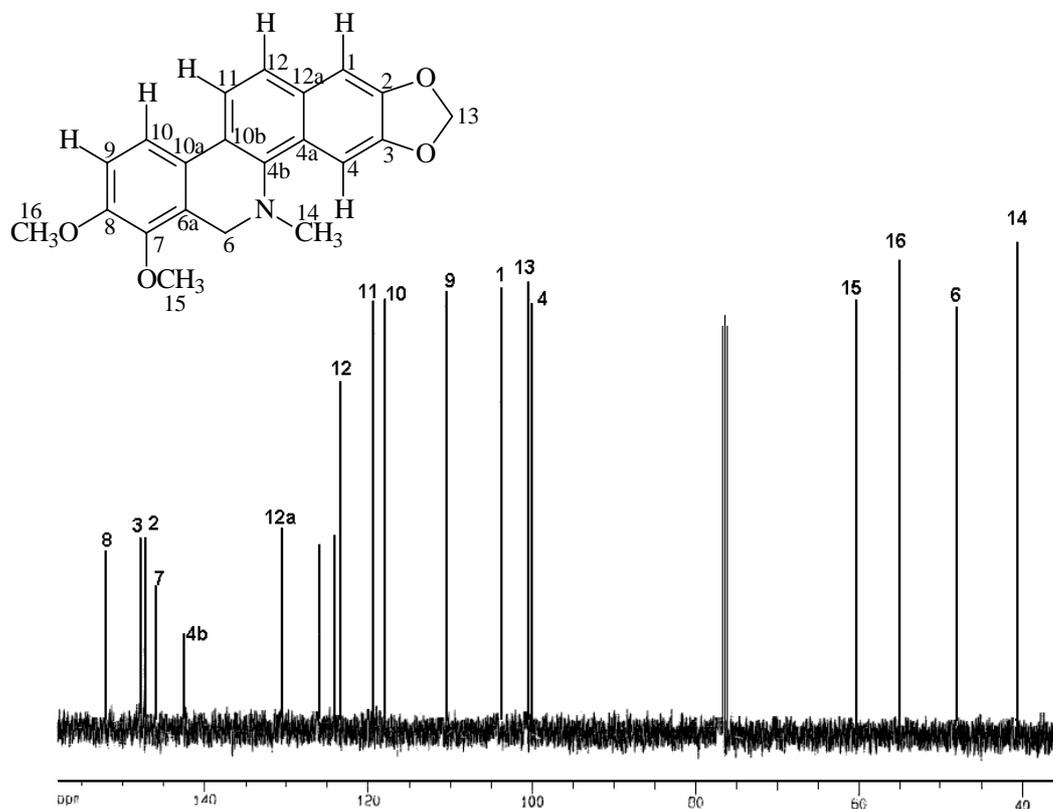


Figura 3A: Espectro de RMN ^{13}C de Diidrocheleritrina (**39**) em CDCl_3

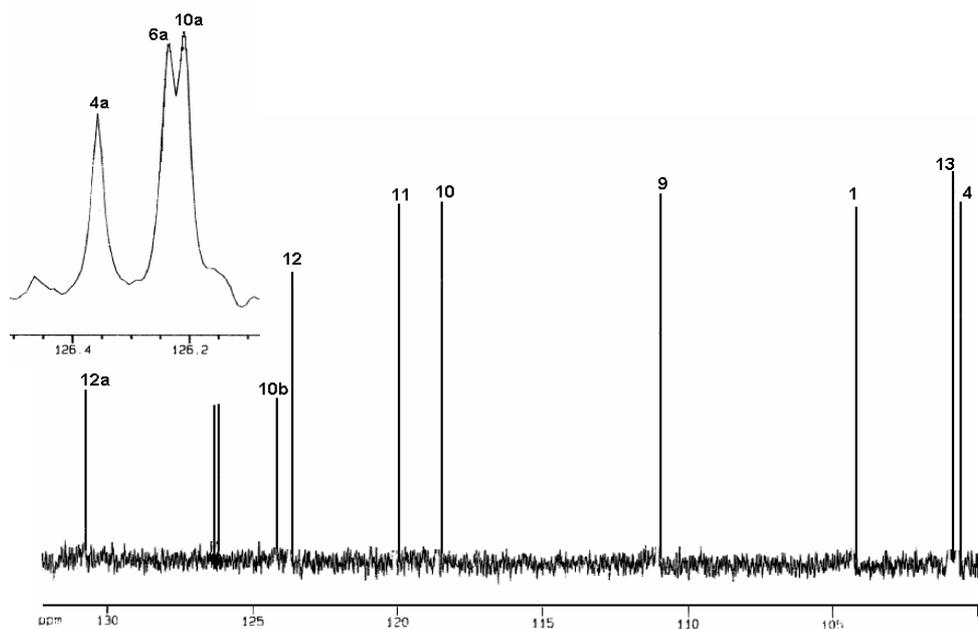


Figura 3B: Espectro de RMN ^{13}C Expandido (100-132 ppm) de Diidrocheleritrina (**39**) em CDCl_3

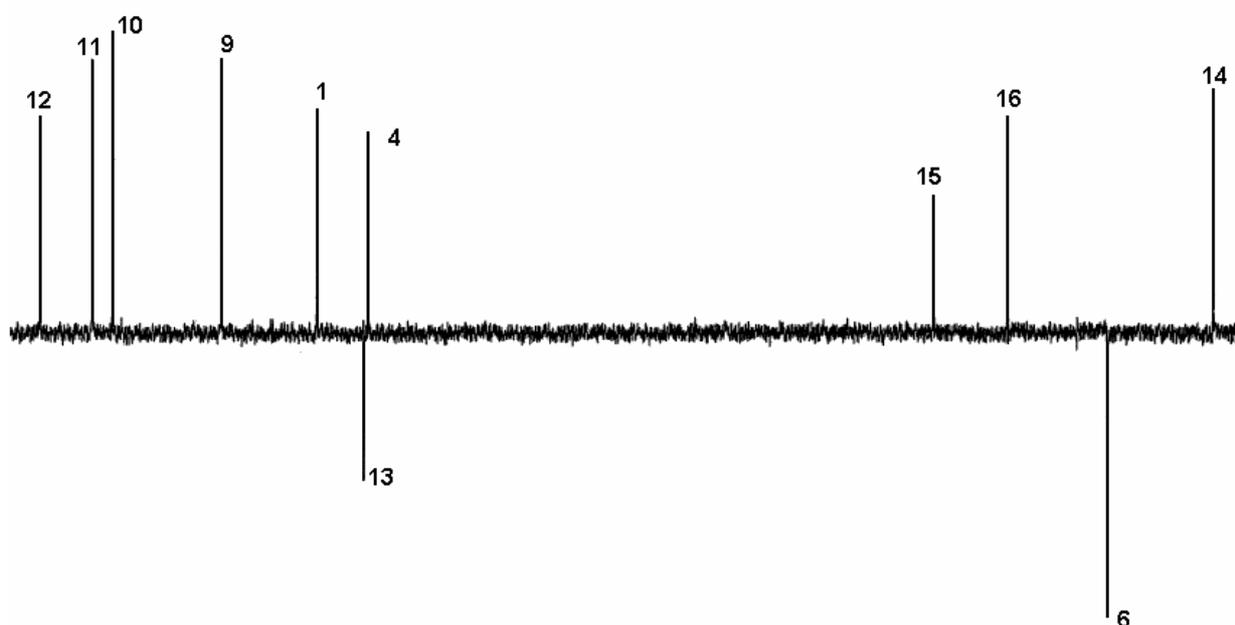


Figura 4: Espectro de RMN DEPT 135° de Diidrocheleritrina (**39**) em CDCl_3

Tabela 5: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H - (400 MHz) e ^{13}C - (100 MHz) de Diidrocheleritrina (**39**) em CDCl_3

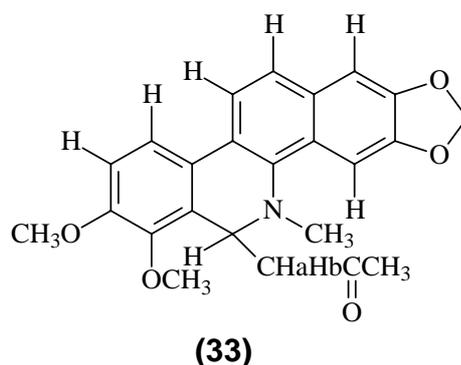
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ⁶⁴	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ⁶⁴
1	7,09 (s)	-	104,30	7,11 (s)	104,3
2	-	-	147,44	-	148,0
3	-	-	148,03	-	147,4
4	7,66 (s)	-	100,69	7,67 (s)	100,7
4a	-	-	126,35	-	126,3
4b	-	-	142,67	-	142,7
6	4,28 (s)	-	48,73	4,29 (s)	48,7
6a	-	-	126,23	-	126,2
7	-	-	146,14	-	146,1
8	-	-	152,24	-	152,2
9	6,91 (d)	$J_{9,10}=8,54$	111,03	6,94 (d, $J=8,5\text{Hz}$)	111,0
10	7,47 (d)	$J_{10,9}=8,54$	118,61	7,51 (d, $J=8,5\text{Hz}$)	118,6
10a	-	-	126,19	-	126,2
10b	-	-	124,21	-	124,2

11	7,68 (d)	$J_{11,12}=8,50$	120,07	7,70 (d, $J=8,6\text{Hz}$)	120,1
12	7,45 (d)	$J_{12,11}=8,50$	123,74	7,48 (d, $J=8,6\text{Hz}$)	123,7
12a	-	-	130,80	-	130,8
13	6,01 (s)	-	100,95	6,04 (s)	101,0
14	2,58 (s)	-	41,25	2,59 (s)	41,2
15	3,86 (s)	-	61,00	3,87 (s)	61,0
16	3,90 (s)	-	55,78	3,92 (s)	55,8

5.3.2 6-Acetonildiidrocheleritrina (33)

Este alcalóide foi isolado da fração etérea ácida, em pequena quantidade (5 mg). Foi identificado, principalmente, através da análise de RMN de ^1H e ^{13}C , e da comparação com dados espectrais descritos na literatura.⁸⁰

Este alcalóide de fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ apresenta uma estrutura muito semelhante à estrutura do composto diidrocheleritrina (39), com a única diferença que este alcalóide (33), tem um substituinte acetnil na posição C-6.



5.3.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Através da análise do espectro de RMN de ^1H de 6-Acetonildiidrocheleritrina (Fig. 5A, 5B e 5C, pag. 68 e 69) pode-se observar, assim como no espectro de RMN de ^1H de diidrocheleritrina, quatro prótons aromáticos na forma de dubletos com $J=8,5$ Hz, sugerindo uma relação orto em cada par. Dois destes prótons foram atribuídos ao anel D, especificamente nas posições 9 e 10, e os outros dois ao anel B, nas posições 11 e 12.

Em adição aos sinais observados no espectro de RMN de ^1H de 39 (Fig. 5A, 5B e 5C, pag. 68 e 69), é observado uma absorção em $\delta=5,02$ ppm, na forma de um duplo dubleto (1H, $J=3,6$ e $11,12$ Hz), atribuído ao próton H-6 ligado a um carbono metínico quiral, vizinho ao grupo metilênico diastereotópico. Os dois sinais do grupo metilênico podem ser observados a $\delta=2,23$ (H-15a) e a $\delta=2,55$ ppm (H-15b), ambos na forma de duplo dubletos, com constantes de acoplamento $J=3,6$ e $14,96$ Hz e $J=11,12$ e $14,96$ Hz, respectivamente.

Os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e as multiplicidades de todos os sinais dos prótons da estrutura molecular de 6-Acetonildiidrocheleritrina, encontram-se na Tabela 6, página 71.

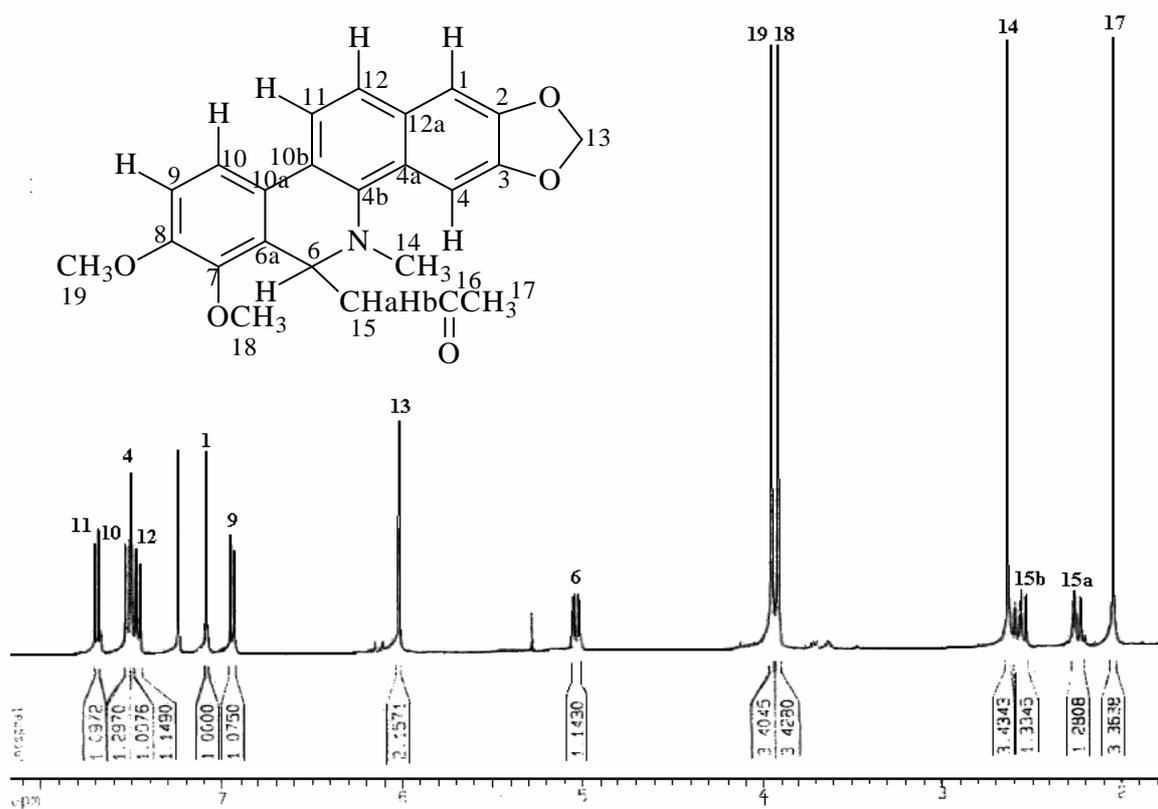


Figura 5A: Espectro de RMN ^1H , de 6-Acetonildiidrocheleritrina (**33**) em CDCl_3

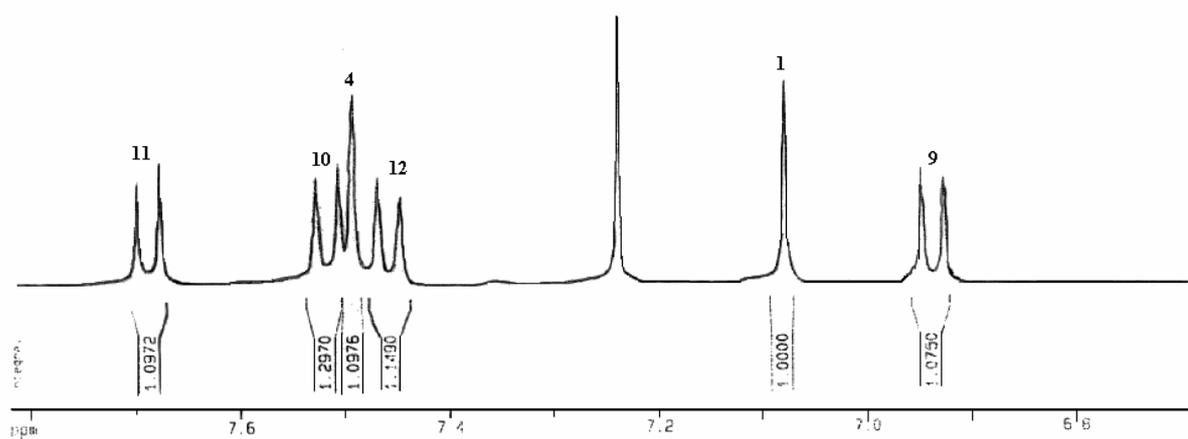


Figura 5B: Espectro de RMN ^1H Expandido (6,8-7,8 ppm), de 6-Acetonildiidrocheleritrina (**33**) em CDCl_3

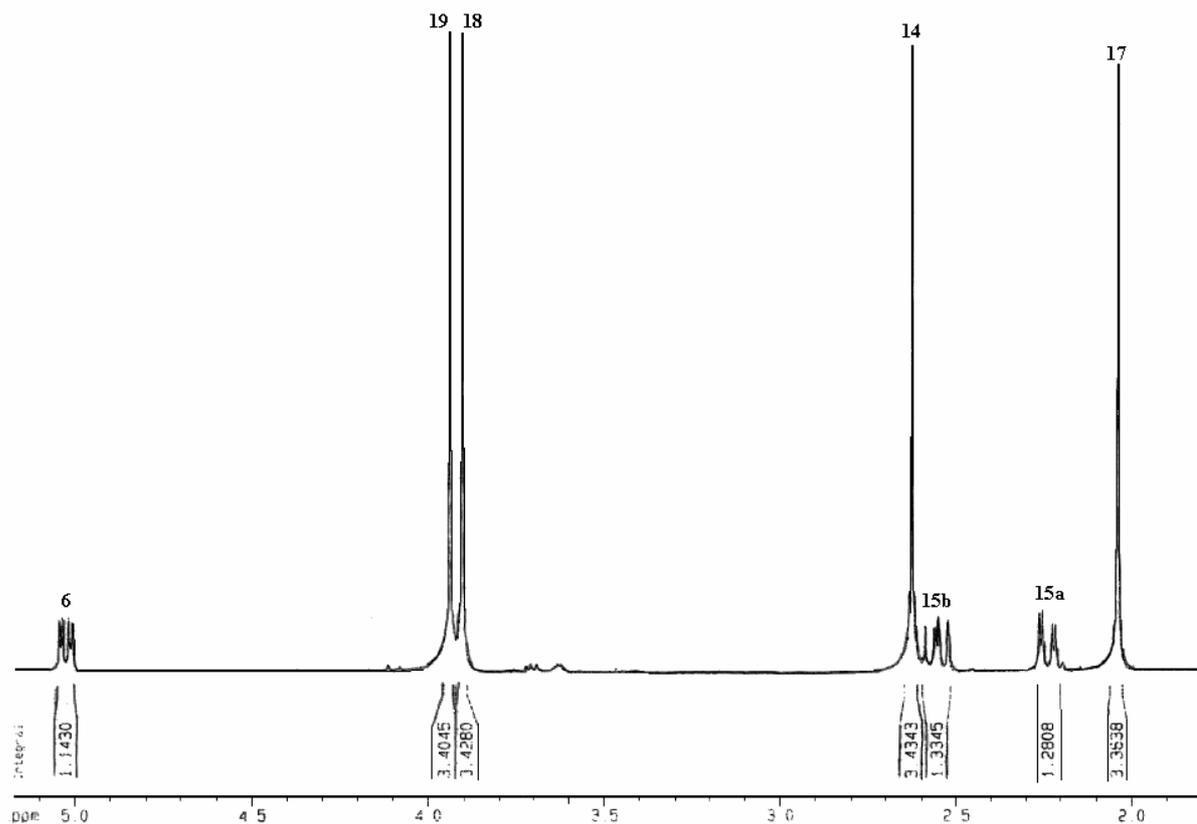


Figura 5C: Espectro de RMN ^1H Expandido (2,0-5,1ppm), de 6-Acetonildiidrocheleritrina (**33**) em CDCl_3 .

5.3.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

No espectro de carbono totalmente desacoplado (Fig. 6A e 6B, pag. 70) observou-se a presença de vinte e quatro sinais em uma região espectral de $\delta = 31,05$ a $\delta = 207,42$ ppm. A composição da estrutura é de onze carbonos quaternários, sete metínicos (CH), dois metilênicos (CH_2) e quatro metílicos (CH_3).

O espectro de RMN de ^{13}C mostra sinais característicos a $\delta = 46,92$; 207,42 e 31,05 ppm próprio dos carbonos metilênico, carbonil e metil, respectivamente, do grupo acetnil ligado ao C-6 da posição 6. Em $\delta = 101,02$ ppm aparece um sinal de amplitude negativa (C-13), característico de carbono metilênico do grupo metilenodioxila.

Os deslocamentos químicos dos carbonos que constituem a estrutura do alcalóide 6-Acetonildiidrocheleritrina são encontrados na Tabela 6, página 71.

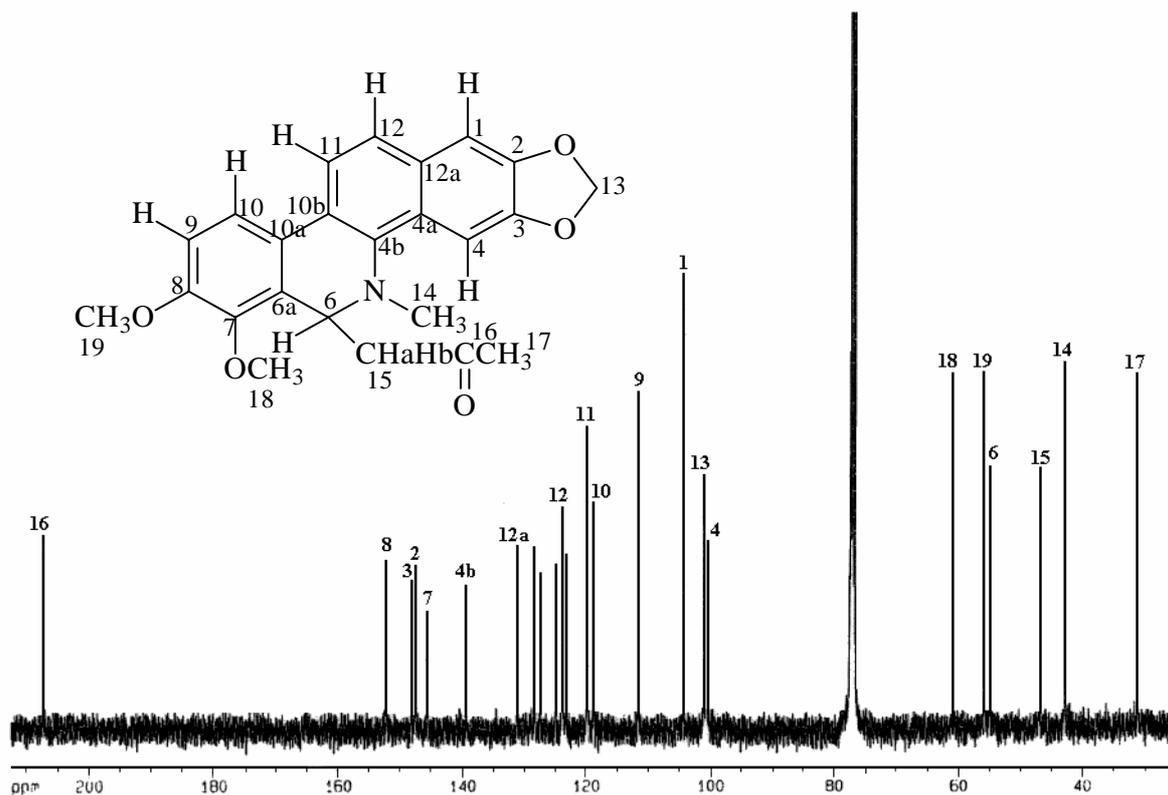


Figura 6A: Espectro de RMN ¹³C de 6-Acetonildidrocheleritrina (**33**) em CDCl₃

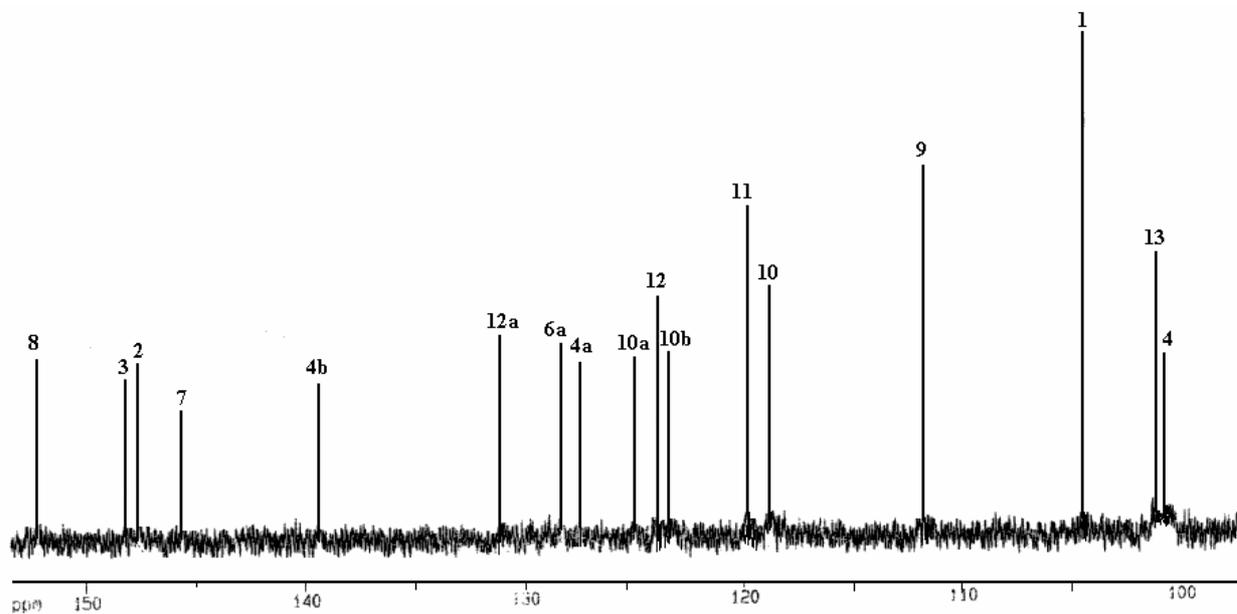


Figura 6B: Espectro de RMN ¹³C Expandido (100-153 ppm) de 6-Acetonildidrocheleritrina (**33**) em CDCl₃

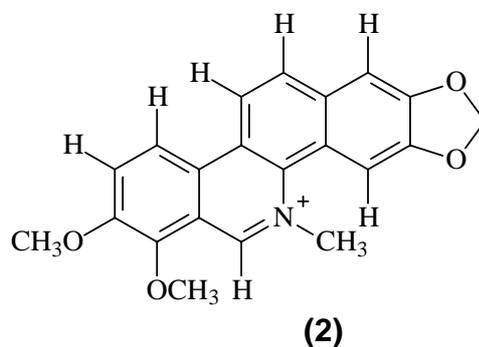
Tabela 6: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H - (400 MHz) e ^{13}C - (100 MHz) de 6-Acetonildiidrocheleritina (**33**) em CDCl_3

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ⁸⁰	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ⁸⁰
1	7,07 (s)	-	104,35	7,08 (s)	104,2
2	-	-	147,60	-	147,5
3	-	-	148,17	-	148,1
4	7,49 (s)	-	100,69	7,51 (s)	100,5
4a	-	-	127,40	-	127,2
4b	-	-	139,37	-	139,2
6	5,02 (dd)	$J_{6-\text{Ha},6}=3,6$; $J_{6,\text{Hb}}=11,12$	54,95	5,03 (dd)	54,8
6a	-	-	128,25	-	128,1
7	-	-	145,63	-	145,4
8	-	-	152,18	-	152,0
9	6,93 (d)	$J_{9,10}=8,56$	111,67	6,94 (d, $J=8,7\text{Hz}$)	111,4
10	7,51 (d)	$J_{10,9}=8,56$	118,78	7,53 (d, $J=8,7\text{Hz}$)	118,7
10a	-	-	124,89	-	124,7
10b	-	-	123,32	-	123,2
11	7,68 (d)	$J_{11,12}=8,56$	119,78	7,70 (d, $J=8,7\text{Hz}$)	119,7
12	7,45 (d)	$J_{12,11}=8,56$	123,84	7,46 (d, $J=8,7\text{Hz}$)	123,7
12a	-	-	131,11	-	130,9
13	6,01 (d)	$J=1,24$	101,02	6,02 (s)	101,0
14	2,62 (s)	-	42,81	2,63 (s)	41,2
15a	2,23 (dd)	$J_{\text{Ha},\text{Hb}}=14,96$; $J_{\text{Ha},6}=3,6$	46,92	2,25 (dd, $J_{\text{A},\text{B}}=14,9$; $J_{\text{A},6}=3,6\text{Hz}$)	46,7
15b	2,55 (dd)	$J_{\text{Hb},\text{Ha}}=14,96$; $J_{\text{Hb},6}=11,12$	-	2,57 (dd)	-
16	-	-	207,42	-	207,0
17	2,03 (s)	-	31,05	2,05 (s)	31,0
18	3,90 (s)	-	60,96	3,91 (s)	60,9
19	3,93 (s)	-	55,85	3,94 (s)	55,7

5.3.3 Cheleritrina (2)

Este composto foi isolado da subfração IX da fração etérea ácida, em grande quantidade (478 mg). Este alcalóide é um sal quaternário de coloração amarelo brilhante na forma de cristais. Este membro da classe dos benzofenantridínicos é conhecido desde 1839,³³ e ocorre em muitas espécies de plantas da família Rutaceae.

Apresenta uma semelhança estrutural com os dois alcalóides descritos anteriormente, o diidrocheleritrina (**33**) e o 6-Acetonildiidrocheleritrina (**39**), porém possui um sinal em $\delta=9,92$ ppm, o que sugere um hidrogênio na posição C-6 do sistema e que este anel é aromático, não possuindo portanto nenhum substituinte nesta posição, característica que diferencia um sistema benzofenantridínico de um dihidrobenzofenantridínico. Os dados espectrais de RMN de ^1H foram comparados com os dados encontrados na literatura³³ e a estrutura do alcalóide cheleritrina foi confirmada, não tendo, portanto a necessidade de realizar os demais experimentos.



5.3.3.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de Cheleritrina

No espectro de RMN de ^1H deste alcalóide (Fig.7, pag. 73), foi possível identificar dois singletos intensos, um a $\delta=3,99$ ppm e o outro a $\delta=4,07$ ppm, ambos com integração para três hidrogênios, que foram atribuídos a duas metoxilas. A presença do grupo metilenodioxila é evidenciada pelo sinal que ressona em $\delta =6,22$ ppm.

Além destes sinais discutidos acima, observa-se ainda a presença de um intenso singleto em $\delta=4,87$ ppm (3H, s), característico de um grupo metil ligado a um átomo de nitrogênio quaternário.

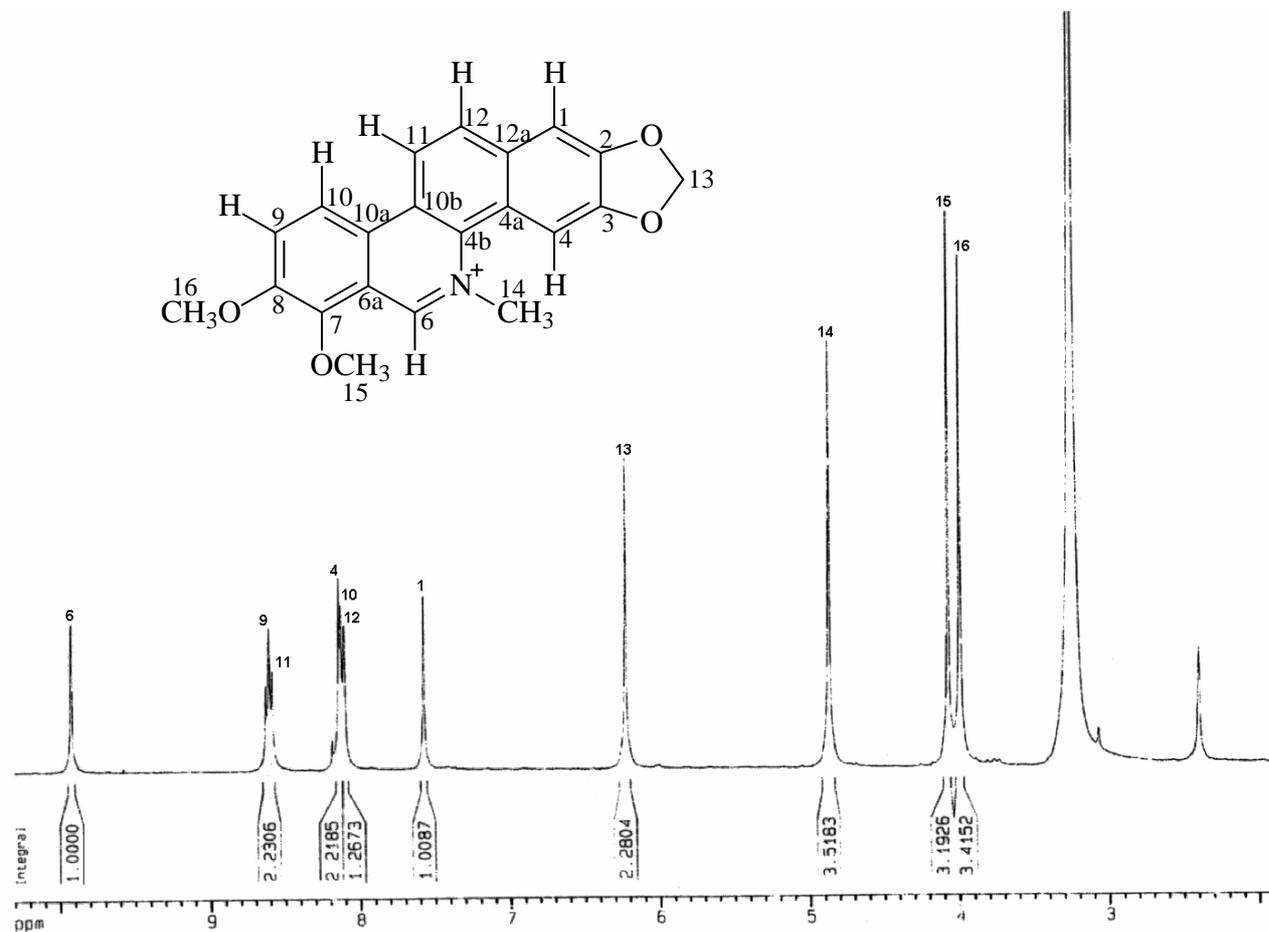


Figura 7: Espectro de RMN de ^1H de Cheliritrina (**2**) em DMSO

Tabela 7: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H - (400 MHz) e ^{13}C - (100 MHz) de Cheliritrina (**2**) em DMSO

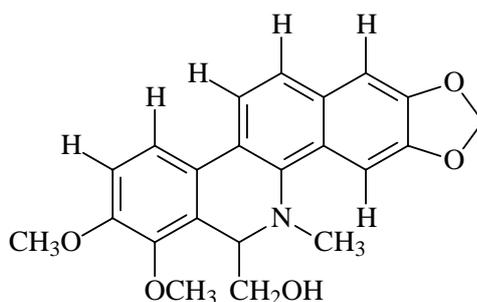
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ³³
1	7,57 (s)	-	7,57 (s)
2	-	-	-
3	-	-	-
4	8,14 (s)	-	8,15 (s)
4a	-	-	-
4b	-	-	-
6	9,92 (s)	-	9,89 (s)
6a	-	-	-

7	-	-	-
8	-	-	-
9	8,61 (d)	$J_{9,10}=8,6$	8,72 (d, $J=9,6$ Hz)
10	8,12 (d)	$J_{10,9}=8,6$	8,22 (d, $J=9,6$ Hz)
10a	-	-	-
10b	-	-	-
11	8,59 (d)	$J_{11,12}=9,5$	8,67 (d, $J=9,6$ Hz)
12	8,11 (d)	$J_{12,11}=9,5$	8,27 (d, $J=9,6$ Hz)
12a	-	-	-
13	6,22 (s)	-	6,31 (s)
14	4,87 (s)	-	5,12 (s)
15	4,07 (s)	-	4,44 (s)
16	4,01 (s)	-	4,26(s)

5.3.4 Bocconolina (42)

Este alcalóide teve sua fórmula molecular determinada ($C_{22}H_{21}NO_5$) com base em seus dados espectrais de RMN de 1H , o qual apresentou características de um esqueleto benzofenantridínico. Os dados espectrais foram comparados com os dados relatados na literatura,⁶⁶ e dados de ponto de fusão, o que facilitou a determinação estrutural, não tendo necessidades de realizar espectros de RMN de ^{13}C .

Apresenta semelhança estrutural com os demais alcalóides discutidos anteriormente, porém, a principal diferença é a de que este possui um substituinte hidroximetil ($-CH_2OH$) na posição C-6, ao invés de um grupo acetnil como observado em 6-Acetonildiidrocheleritrina (39).



(42)

5.3.4.1 Ressonância Magnética Nuclear de 1H de Bocconolina

Através da análise do espectro de RMN de 1H (Fig. 8A e 8B, pag. 76 e 77) podemos observar a presença de dois grupos metoxilas em $\delta=3,89$ e $\delta=3,92$ ppm, ambos com integração para 3H na forma de singletos. Em adição a estes sinais observa-se ainda um intenso singlete em $\delta=6,02$ ppm (2H, s) correspondente ao grupo metilenodioxila e um grupo metil (3H, s) ligado a um átomo de nitrogênio, com deslocamento de $\delta=2,71$ ppm, conferindo a este composto características básicas.

Este alcalóide apresenta um núcleo diidrocheleritrina substituído na posição C-6 (C_1H_3O). A principal característica do espectro de RMN 1H é a presença de um grupo metilênico em $\delta=3,09$ ppm (1H, t, $J=10,6$ Hz) e $\delta=3,48$ ppm (1H, dd, $J=4,84$ e $10,6$ Hz), o qual acopla com um hidrogênio vicinal que absorve a $\delta=4,65$ ppm, na

forma de um duplo duplete com constantes de acoplamento $J=10,56$ e $4,84$ Hz, que pode ser atribuído a um sistema CH-CH₂OH.

Os hidrogênios aromáticos apresentam o mesmo sistema de spins encontrados para os outros três alcalóides benzofenantridínicos descritos acima. Um deles compreende dois prótons na forma de dubletos com $J=8,56$ Hz, referente aos prótons H-9 e H-10 a $\delta=6,94$ e $7,51$ ppm, respectivamente. O outro sistema pertence aos prótons H-11 e H-12, ambos dubletos com $J=8,6$ Hz, o que sugere uma relação orto entre si.

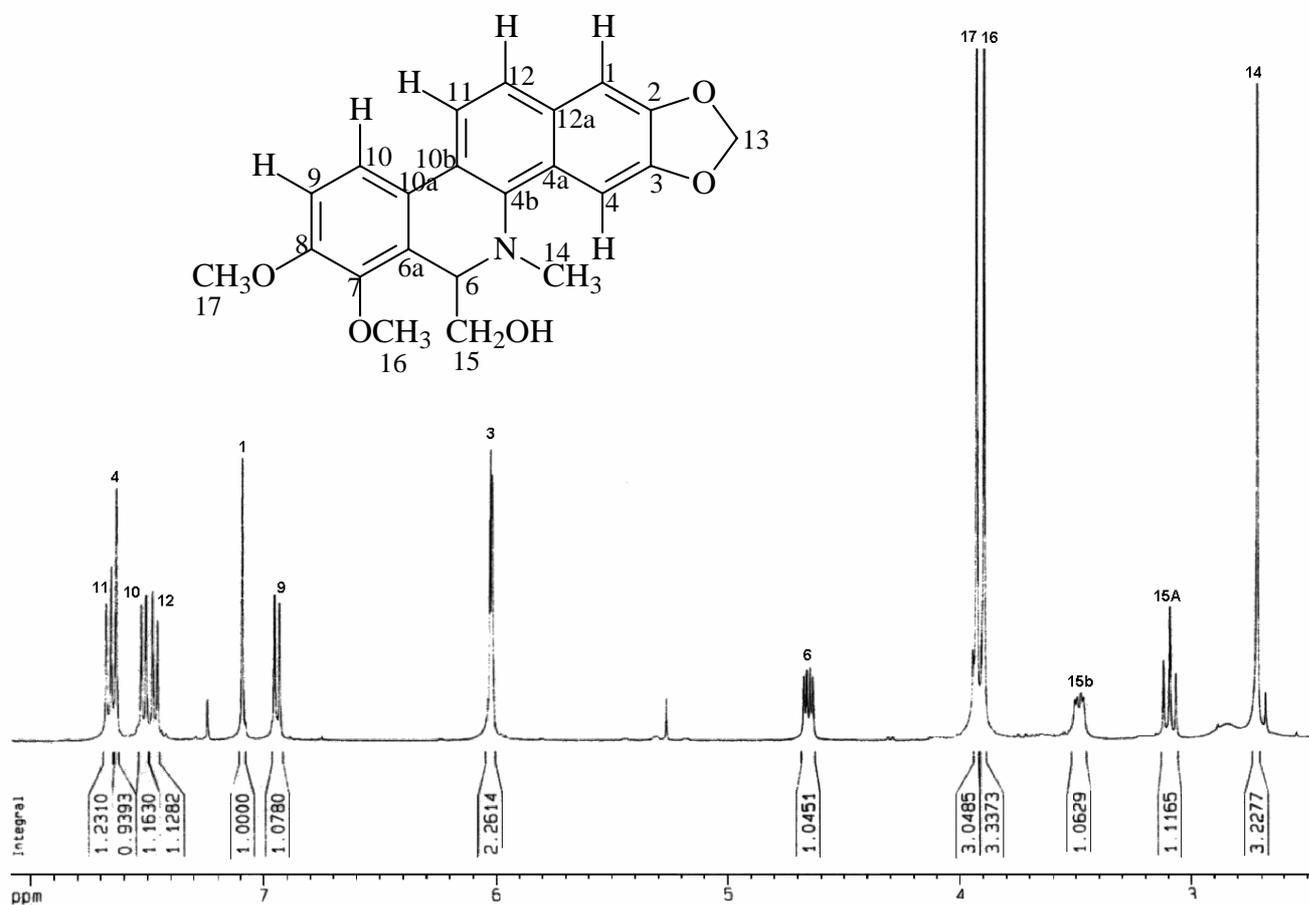


Figura 8A: Espectro de RMN ¹H de Bocconolina (42) em CDCl₃

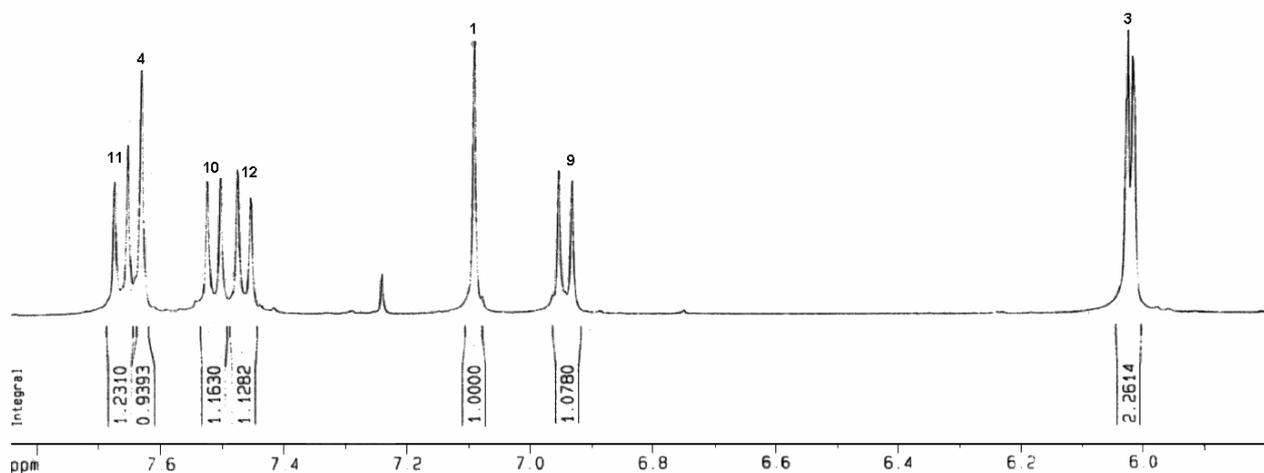


Figura 8B: Espectro de RMN ^1H Expandido (6,0-7,8 ppm) de Bocconolina (**42**), em CDCl_3

Tabela 8: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H - (400 MHz) e ^{13}C - (100 MHz) de Bocconolina (**42**) em CDCl_3

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ⁶⁶
1	7,09 (s)	-	7,11(s)
2	-	-	-
3	-	-	-
4	7,63 (s)	-	7,65(s)
4a	-	-	-
4b	-	-	-
6	4,65 (dd)	$J_{6,15}=10,56$; $J_{6,15}=4,84$	4,65(dd) J=10,5 e 5Hz
6a	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	6,94 (d)	$J_{9,10}=8,56$	6,96 (d) J=8,8Hz
10	7,51 (d)	$J_{10,9}=8,56$	7,54 (d) J=8,8Hz
10a	-	-	-
10b	-	-	-
11	7,66 (d)	$J_{11,12}=8,60$	7,70 (d) J=8,6Hz
12	7,46 (d)	$J_{12,11}=8,60$	7,49 (d) J=8,6Hz
12a	-	-	-
13	6,02 (d)	J=3,24	6,03 (s)

14	2,71 (s)	-	2,74 (s)
15a	3,09 (t)	J=10,6	3,09 (t) J=10,5Hz
15b	3,48 (dd)	$J_{15b,15a}=4,84$; $J_{15b,6}=10,56$	3,47 (dd) J=10,5 e 5Hz
16	3,89 (s)	-	3,92 (s)
17	3,92 (s)	-	3,95 (s)

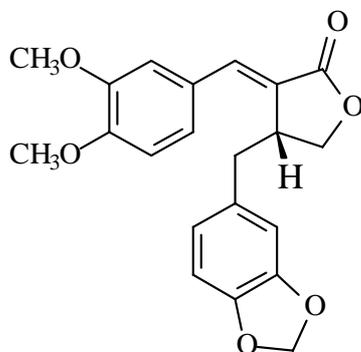
5.4 Lignanas dibenzilbutirolactônicas

Lignanas são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza e exibem uma variedade de tipos estruturais. São encontradas em vários gêneros da família Rutaceae.^{58, 86}

Neste trabalho foram isoladas três lignanas, entre elas a sesamina codificada como 3AC e duas outras lignanas pertencentes à classe dibenzilbutirolactônica, Kaerofilina (8AC) e Gadaina (4AC). Ambas as lignanas já foram descritas anteriormente na literatura,^{65,63} porém foram isoladas pela primeira vez da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.

5.4.1 Kaerofilina 117

Esta lignana foi isolada da fração hexânica ácida e da etérea ácida. Sua estrutura foi determinada a partir da análise dos dados de RMN de ¹H e ¹³C, bem como da análise de espectros complementares como COSY, HMQC e HMBC. Os dados espectrais foram comparados com os dados obtidos da literatura.⁶⁵



(117)

5.4.1.1 Espectrometria de Massas de Kaerofilina

Através da análise do espectro de massas (Figura 9) de Kaerofilina, foi possível identificar o pico íon molecular à $m/z=368$ (M^+), o qual juntamente com a análise dos espectros de ^1H e ^{13}C , sugeriu $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ como fórmula molecular para esta lignana. Além disso, o espectro apresenta dois principais fragmentos, um em $m/z=233$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4$) e o outro em $m/z=135$ ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2$), os quais sugerem a presença de um grupo metilenodioxibenzil.

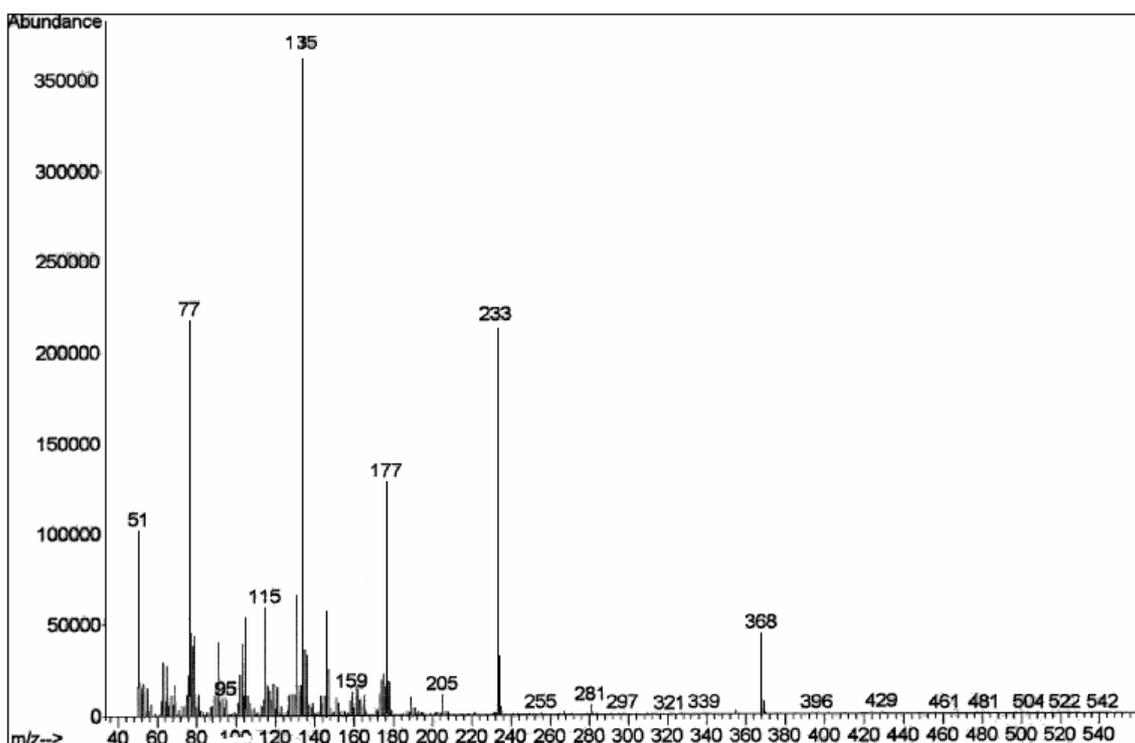


Figura 9: Espectro de Massas de Kaerofilina

5.4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro de RMN de ^1H de Kaerofilina (Fig. 10A e 10B, pag. 82), permitiu atribuir os sinais dos prótons presentes na estrutura **117**. Neste espectro observa-se a presença de um intenso singleto, com integração para dois prótons, a $\delta=5,92$ ppm, característico de um grupo metilenodioxila ligado a um anel aromático e também a presença de dois intensos singletos, ambos com integração para três prótons, em $\delta=3,90$ e $3,93$ ppm, os quais indicam a existência de dois grupos metoxilas ligados as posições 3 e 4 do anel aromático, respectivamente.

Em adição a estes sinais, são também observados sete sinais referentes aos prótons localizados em campo baixo do espectro de RMN de ^1H ($\delta=6,62-7,52$ ppm), pertencentes aos dois anéis benzênicos do tipo 1, 3, 4 substituídos e ao grupo benzilideno. Portanto o espectro indica dois grupos de anéis aromáticos trissubstituídos, a $\delta=7,05$ ppm (1H, d, $J=1,96$ Hz, H-2), $\delta=6,94$ ppm (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-5), $\delta=7,21$ ppm (1H, dd, $J=8,4$ e $1,96$ Hz, H-6); e o segundo grupo compreende os seguintes sinais a $\delta=6,65$ ppm (1H, d, $J=1,64$ Hz, H-2'), $\delta=6,72$ ppm (1H, d, $J=7,84$ Hz, H-5'), $\delta=6,62$ ppm (1H, dd, $J=7,84$ e $1,64$ Hz, H-6'). Já em campo mais baixo do espectro de RMN de ^1H , encontra-se um dubleto referente ao próton H-7 ($\delta=7,52$ ppm, 1H, $J=1,76$ Hz), da dupla ligação exocíclica, característico de lignanas insaturadas.

Além desses sinais, foi observada a presença de dois prótons metilênicos diastereotópicos (H-9') a $\delta=4,25$ ppm na forma de um multipletto, referente ao anel butirolactônico. Um outro sinal com absorção a $\delta=3,80$ ppm com integração para um hidrogênio na forma de um multipletto foi atribuído ao próton ligado a um carbono metínico quiral, vizinho ao grupo metilênico diastereotópico discutido anteriormente. Ligado a este carbono metínico quiral tem-se um segundo grupo de prótons metilênicos diastereotópicos (H-7' a e H-7' b), que ressonam a $\delta=3,03$ e $2,61$ ppm, ambos na forma de duplo dubletos, com uma constante de acoplamento $J=14,4$ e $4,32$ Hz e $J=14,4$ e $10,16$ Hz, respectivamente. Este sistema de spins foi confirmado pelo espectro de COSY, descrito posteriormente.

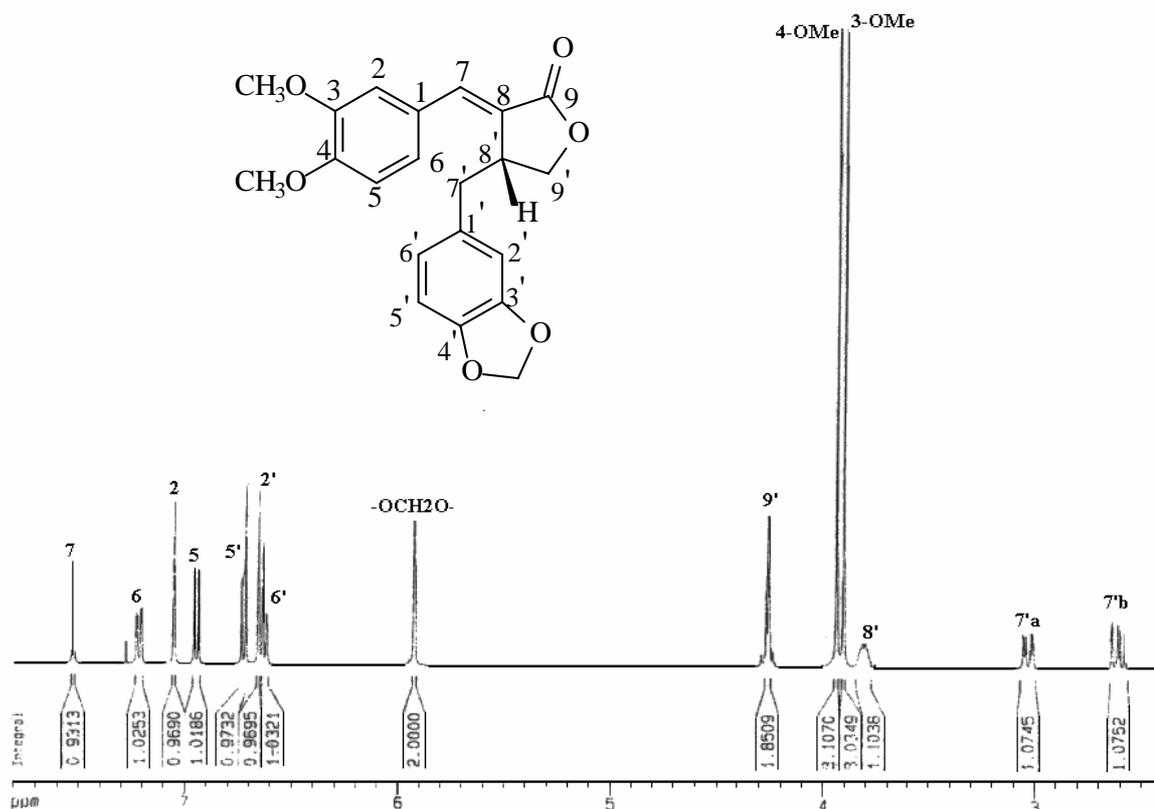


Figura 10A: Espectro de RMN ^1H de kaerofilina (117) em CDCl_3

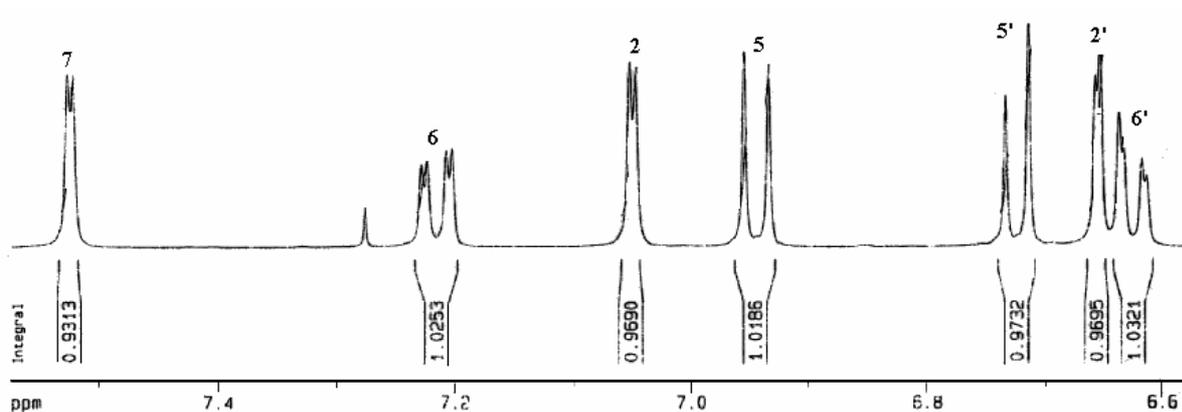


Figura 10B: Espectro de RMN ^1H Expandido (6,6-7,6 ppm), de kaerofilina (117) em CDCl_3

5.4.1.3 Ressonância Magnética Nuclear 2D, COSY ^1H - ^1H de kaerofilina

O espectro de COSY (Fig. 11A, 11B e 11C, pag. 84, 85 e 86) foi realizado com o objetivo de determinar corretamente a posição e a vizinhança dos hidrogênios presentes na estrutura da lignana 8AC.

Ao analisar o espectro COSY de **117**, foi possível observar três sistemas de spins. Os dois primeiros ocorrem entre os prótons aromáticos dos anéis benzênicos trissubstituídos A e B, e um terceiro sistema apresenta os dois prótons metilênicos diastereotópicos H-9' e o próton H-8' do carbono metínico quiral, o qual por sua vez está ligado aos prótons metilênicos diastereotópicos H-7' a e H-7'b.

Um dos sistemas de spins que contém os prótons aromáticos do anel A apresenta uma relação orto entre os prótons H-5 e H-6, o qual por sua vez possui uma relação meta com o próton H-2, com uma constante de acoplamento em torno de 2 Hz. Já o próton H-2 possui uma pequena correlação a longa distância com o próton H-7. O outro sistema é correspondente aos hidrogênios aromáticos do anel B, que inclui o próton H-5', o qual mantém uma relação orto com o próton H-6' ($J=7,84$ Hz), que por sua vez possui uma relação meta com o próton H-2'.

A Figura abaixo mostra as correlações observadas no espectro COSY de **117**.

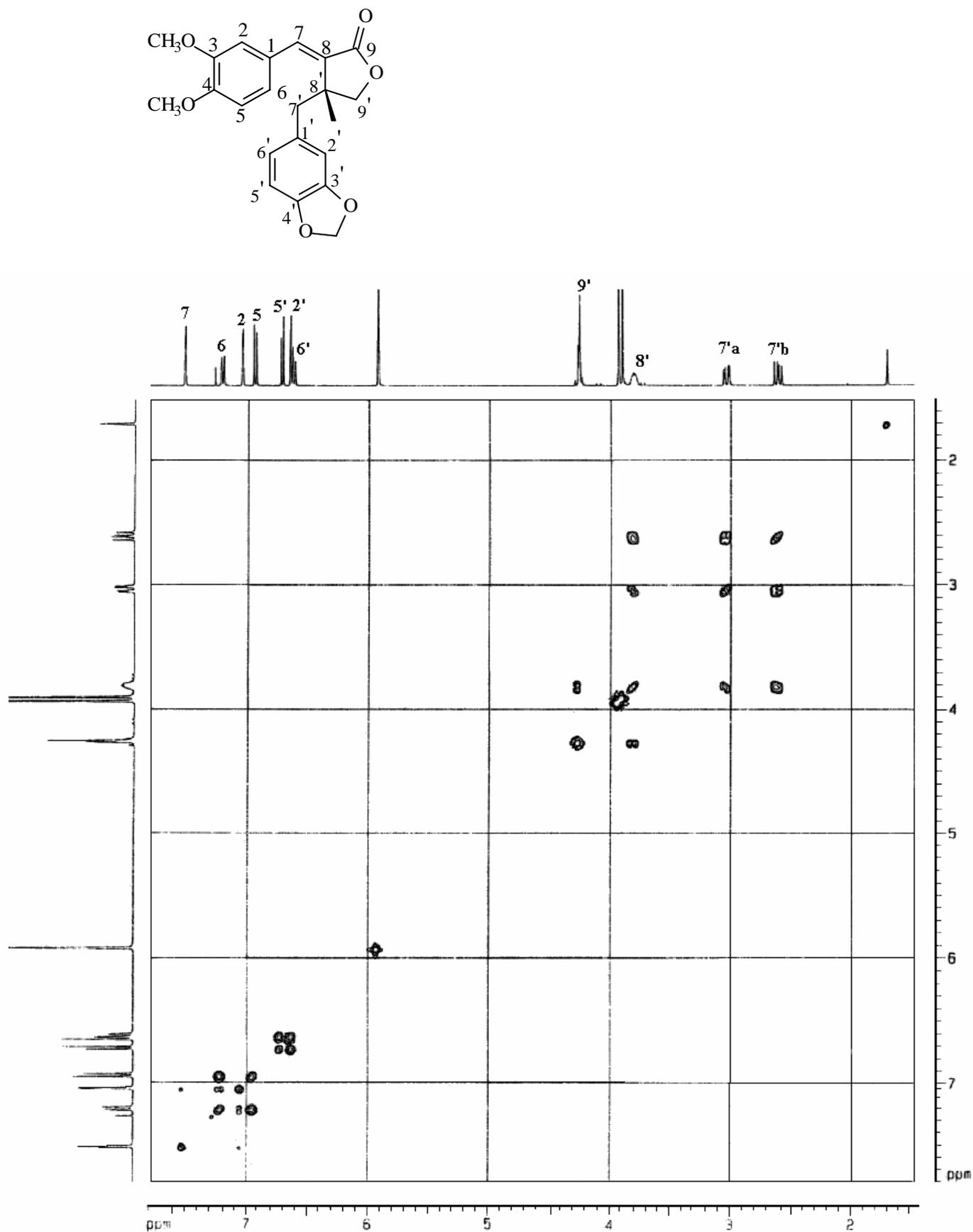


Figura 11A: Espectro de RMN 2D, COSY ^1H - ^1H de kaerofilina (117) em CDCl_3

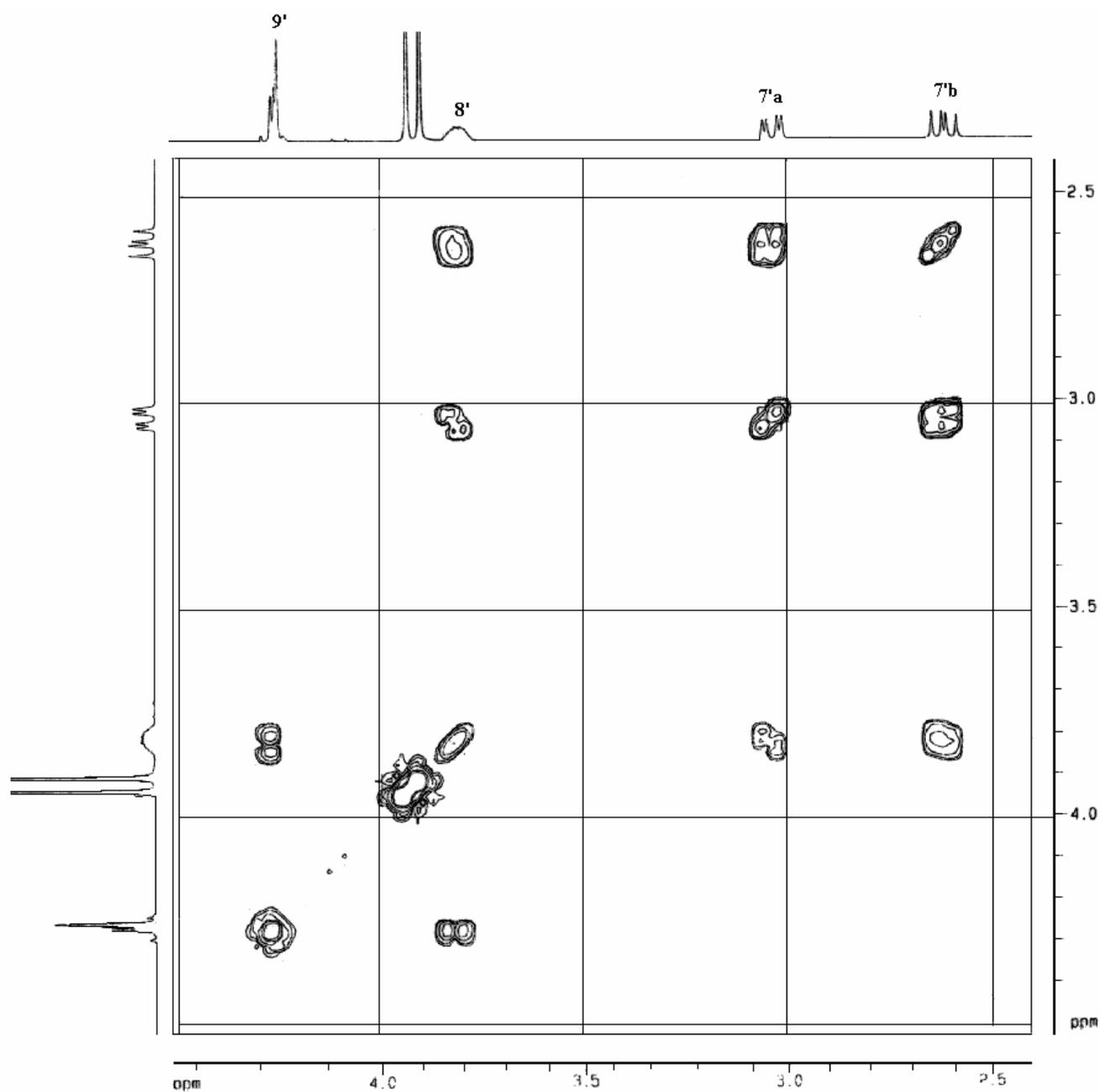


Figura 11B: Espectro de RMN 2D COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ Expandido (2,5-4,3 ppm) de kaerofilina (**117**) em CDCl_3 .

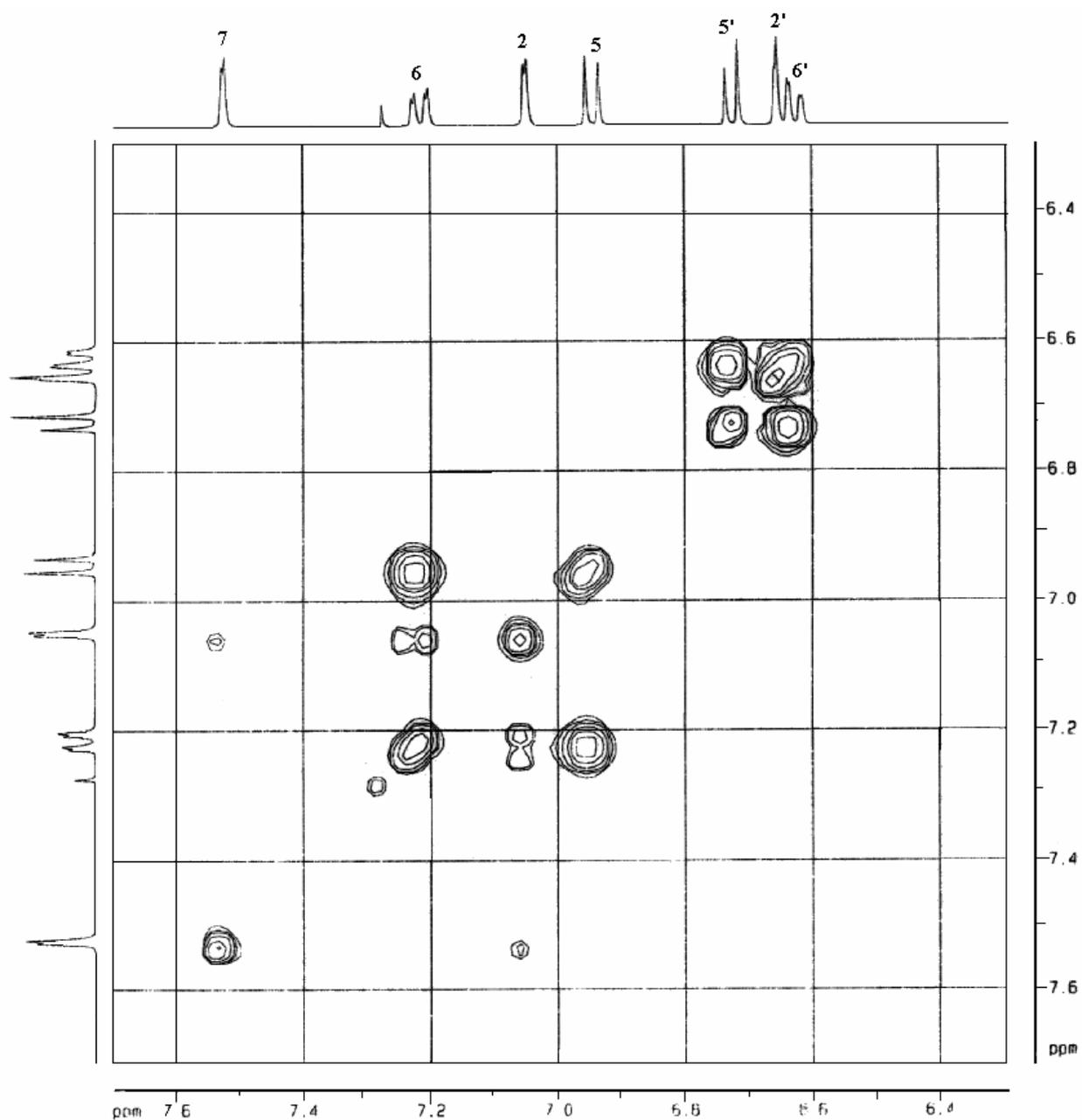


Figura 11C: Espectro de RMN 2D COSY ^1H – ^1H Expandido (6,4-7,6 ppm) de kaerofilina (**117**) em CDCl_3 .

5.4.1.4 Análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 12A e 12B, pag. 88) permitiu identificar vinte e um sinais em uma região espectral compreendida entre $\delta=37,68$ - $172,48$ ppm. Com o auxílio do espectro de DEPT 135° foi possível determinar a multiplicidade dos sinais referentes aos vinte e um carbonos. Desta forma tem-se que a composição da estrutura é de oito carbonos quaternários, oito metínicos (CH), três metilênicos (CH_2) e dois metílicos (CH_3).

O experimento DEPT 135° (Fig. 13, pag. 89) confirmou a presença de dois grupos metilênicos, um ligado a um átomo de oxigênio em $\delta=69,44$ ppm C-9' e o outro correspondente ao carbono $\delta=37,36$ ppm, C-7', juntamente com um terceiro CH_2 correspondente ao carbono do grupo metilenodioxila ($\delta=100,99$ ppm). Os sinais referentes aos dois carbonos metílicos das metoxilas encontram-se em $\delta=55,94$ e $55,93$ ppm, resultando em único sinal. Os carbonos metínicos, bem como os quaternários são encontrados em uma região espectral compreendida entre $\delta=150,67$ ppm e $\delta=108,38$ ppm, característica de aromáticos e olefínicos. Em $\delta=172,42$ ppm aparece um sinal pertencente ao carbono carbonílico do anel butirolactônico. Os sinais dos carbonos quaternários foram identificados corretamente com o auxílio do espectro HMBC, discutido posteriormente.

Os deslocamentos químicos dos carbonos que formam a estrutura da referida lignana, encontram-se na Tabela 9, página 94.

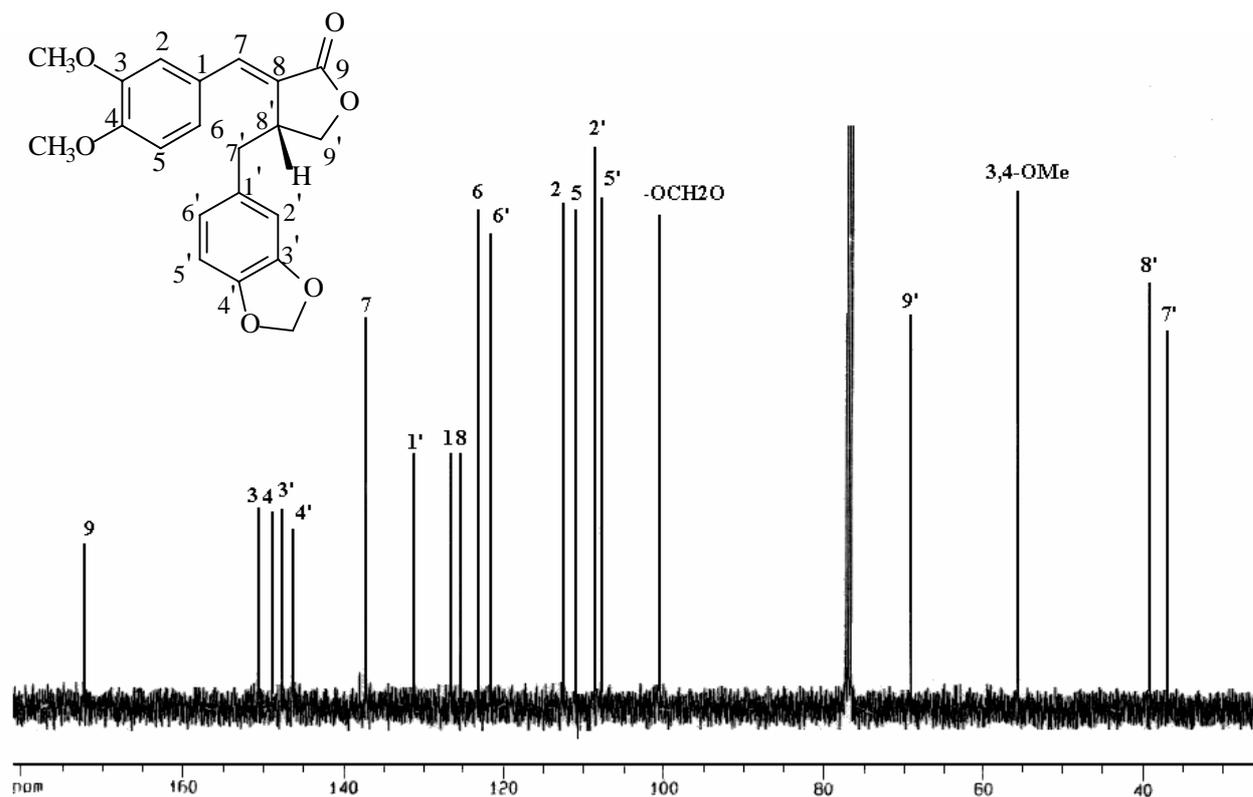


Figura 12A: Espectro de RMN ^{13}C de kaerofilina (**117**) em CDCl_3 .

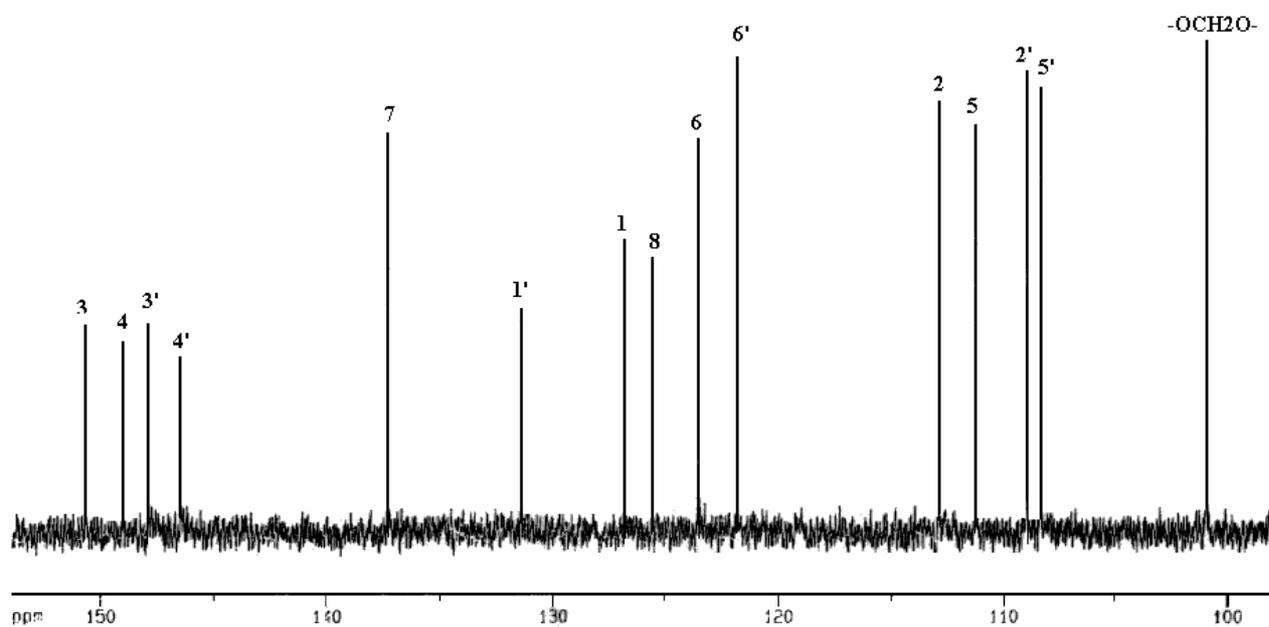


Figura 12B: Espectro de RMN ^{13}C Expandido (100-151 ppm) de **117** em CDCl_3 .

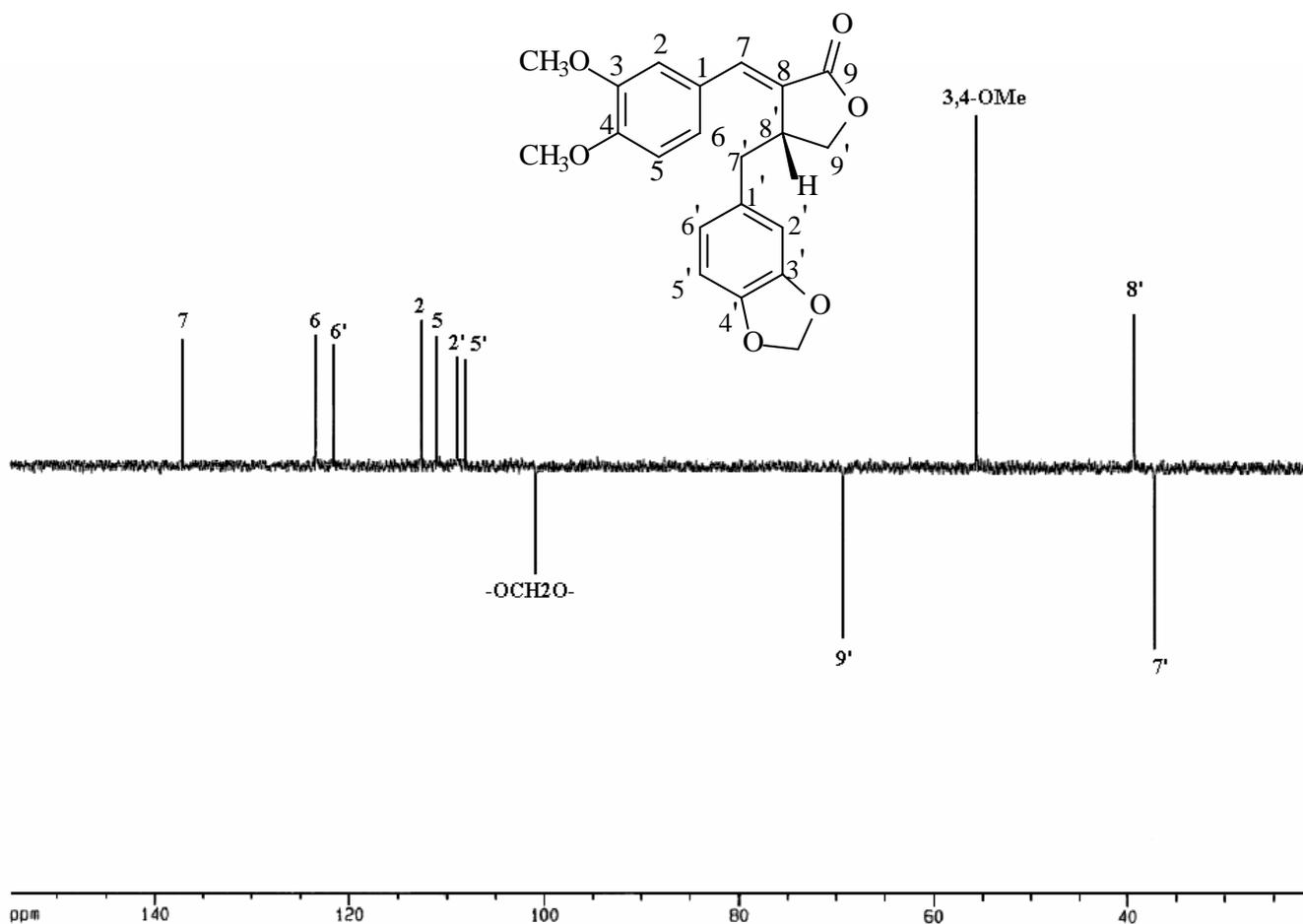


Figura 13: Espectro de DEPT 135° de kaerofilina (**117**) em CDCl₃.

5.4.1.5 Espectros de HMQC e HMBC de Kaerofilina

Através da análise dos espectros de HMQC e HMBC, foi possível confirmar inequivocamente os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C da estrutura **117**.

O espectro HMQC (Fig. 14A e 14B, pag. 90 e 91), possibilitou a confirmação dos deslocamentos químicos dos carbonos protonados da estrutura, correlacionando cada um dos carbonos com seu respectivo hidrogênio. Foi através da análise deste espectro que se observou o grupo metilênico (C-7'), vizinho do carbono quiral C-8', com sendo um carbono diastereotópico. Os dois prótons geminais que absorvem em campos diferentes $\delta=3,03$ e $2,61$ ppm, correlacionam com o mesmo carbono a $\delta=37,36$ ppm. É possível observar ainda a correlação de ambos os sinais dos hidrogênios referentes as duas metoxilas, com um único sinal no espectro de ¹³C, o que demonstra um deslocamento equivalente.

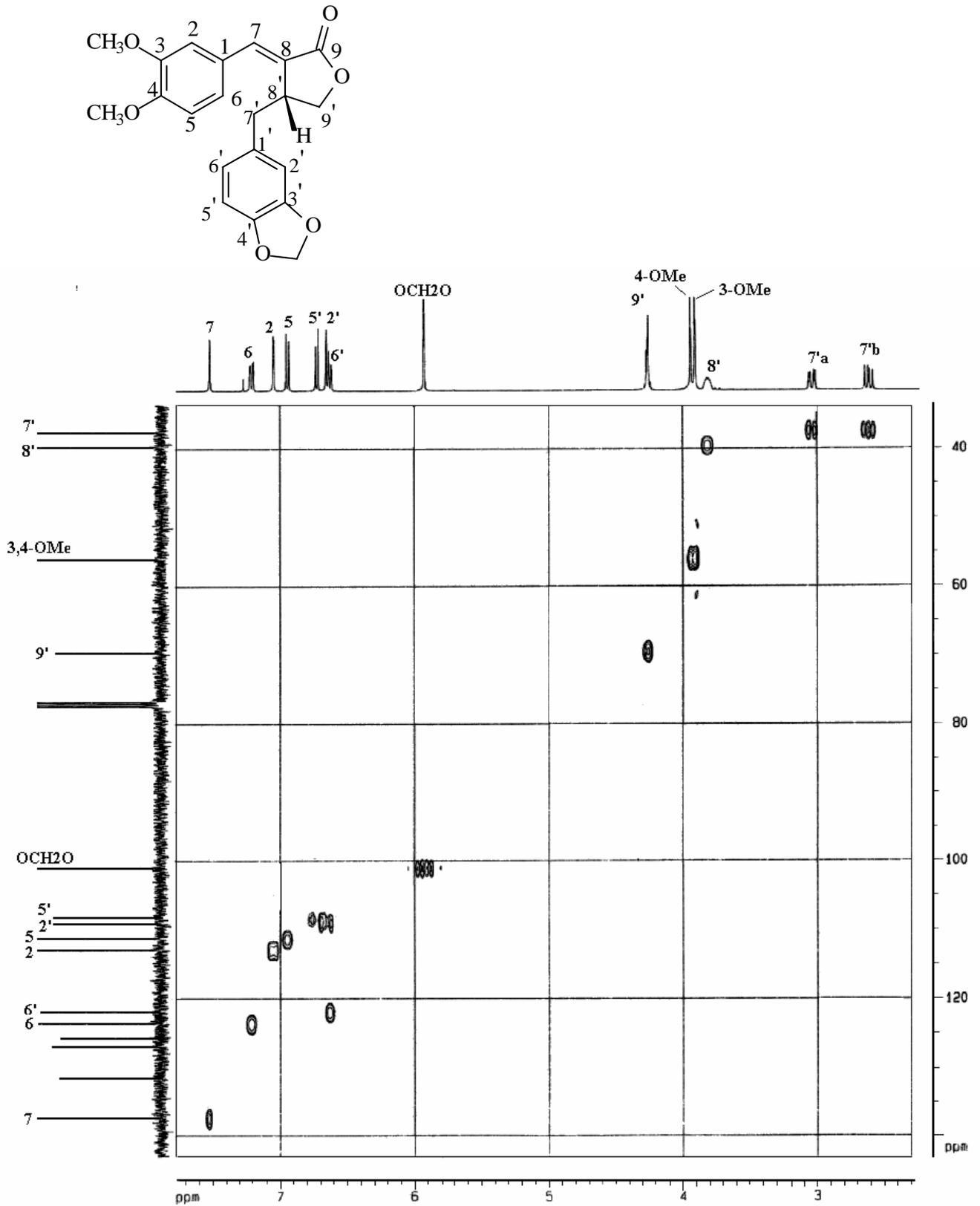


Figura 14A: Espectro de RMN 2D HMQC de kaerofilina (117) em CDCl_3

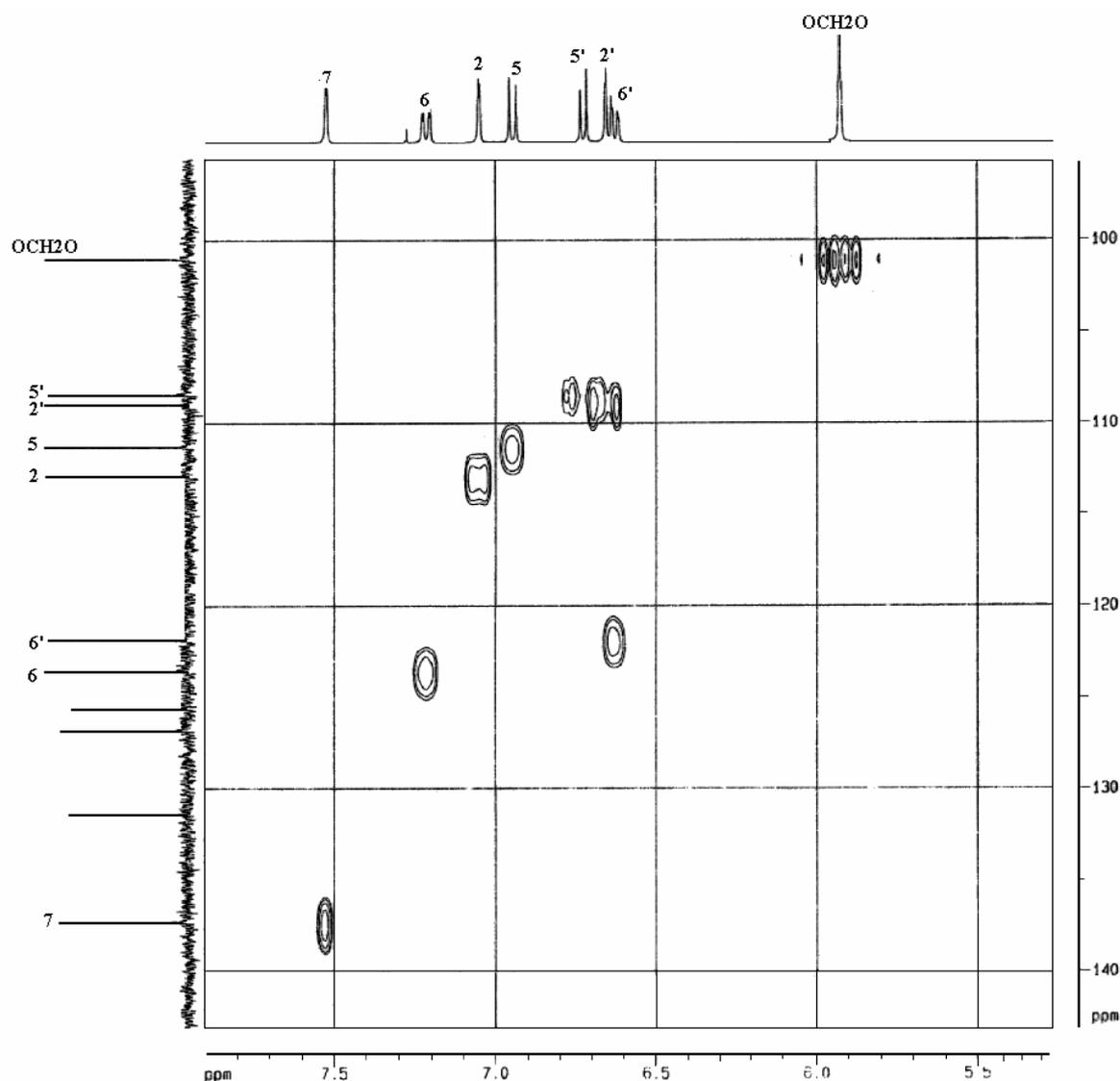


Figura 14B: Espectro de RMN 2D HMQC Expandido (5,5-7,8 ppm) de kaerofilina (**117**) em CDCl_3

Através da análise do espectro de HMBC (Fig. 15A e 15B, pag. 92 e 93), foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários e, principalmente os pertencentes aos sistemas aromáticos e confirmar os demais carbonos protonados.

Neste espectro, as correlações a longa distância via $^3J_{\text{H-C}}$ e $^4J_{\text{H-C}}$ foram observados entre alguns sinais: via ($^4J_{\text{H-C}}$), o próton H-6 que absorve em $\delta=7,21$ ppm mostra correlação com C-3 a $\delta=150,67$ ppm, enquanto que o próton H-5 a $\delta=6,94$ ppm correlaciona-se com o carbono C-3 via $^3J_{\text{H-C}}$. Referente às correlações via $^3J_{\text{H-C}}$, observa-se que o próton H-2 a $\delta=7,05$ ppm, apresenta correlações com os C-6 a $\delta=123,54$ ppm e com o C-7 a $\delta=137,34$ ppm, enquanto que o próton H-5 a $\delta=6,94$ ppm,

correlaciona-se com os carbonos C-1 e C-3 a $\delta=126,83$ ppm e a $\delta=150,67$ ppm, respectivamente.

Além dessas correlações mostradas, o espectro HMBC possibilitou observar outras correlações importantes para a elucidação da estrutura desta lignana. A figura 15A e 15B abaixo e a Tabela 9 na página 94, mostram as demais correlações observadas neste espectro.

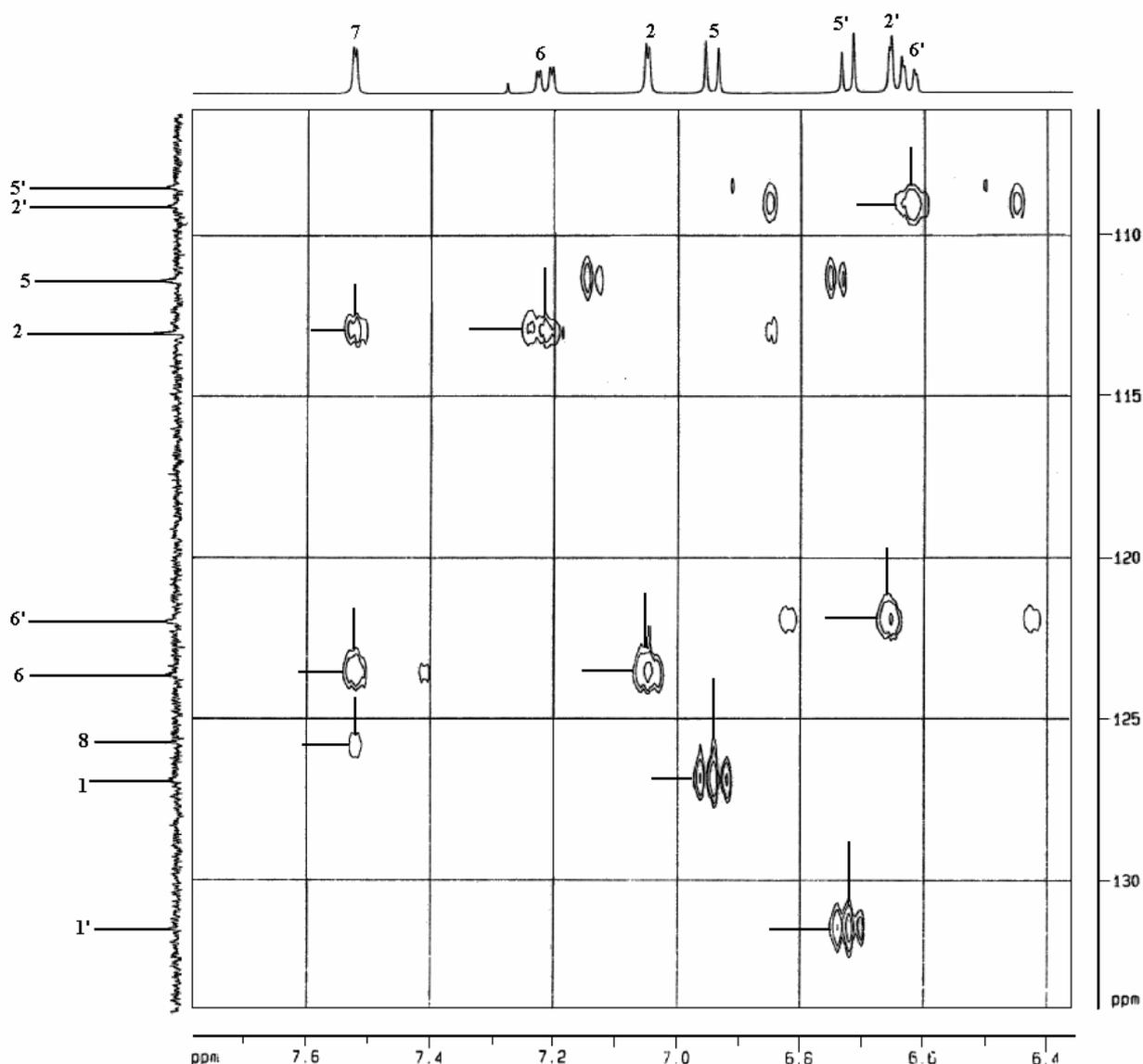


Figura 15A: Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (6,4-7,7 ppm) de kaerofilina (117) em CDCl₃

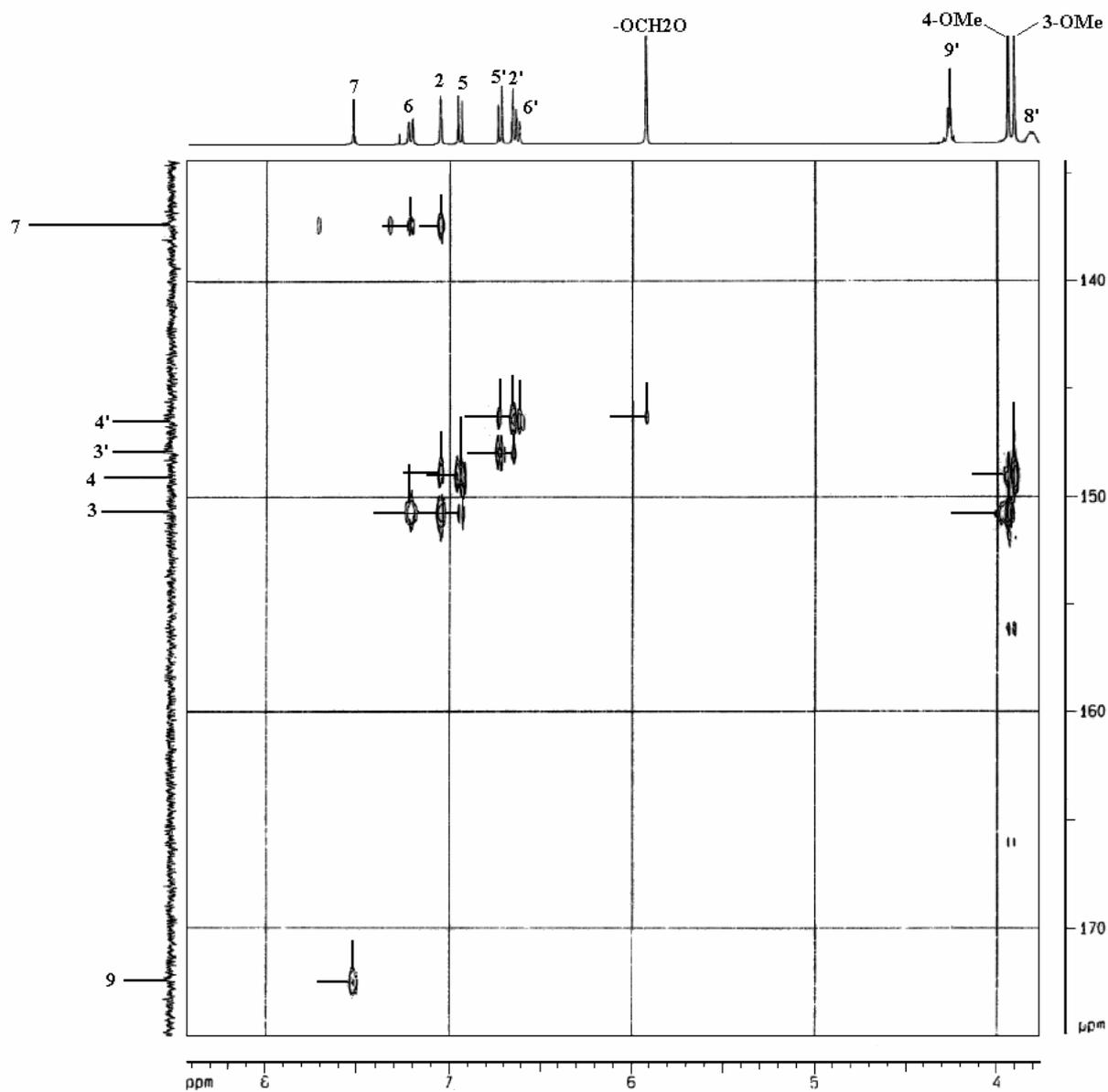


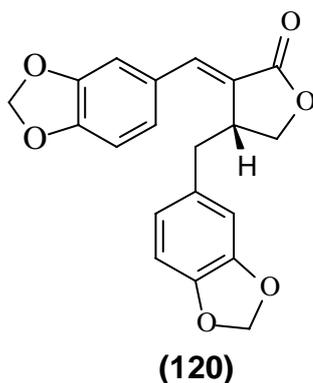
Figura 15B: Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (3,8-8,4 ppm) de kaerofilina (117) em CDCl₃

Tabela 9: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹H- (400 MHz) e ¹³C- (100 MHz) de kaerofilina (**117**) em CDCl₃

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ⁶⁵	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ⁶⁵	HMBC
1	-	-	126,83	-	126,8	-
2	7,05 (d)	J _{2,6} =1,96	112,91	7,03 (d, J=2Hz)	112,9	C-3, C-4, C-6, C-7
3	-	-	150,67	-	150,7	-
4	-	-	149,07	-	149,1	-
5	6,94 (d)	J _{5,6} =8,4	111,28	6,93 (d, J=8,4 Hz)	111,2	C-1, C-3, C-4
6	7,21 (dd)	J _{6,5} =8,4 ; J _{6,2} =1,96	123,54	7,20 (dd, J=8,4 ; J=2,0Hz)	123,6	C-2, C-3, C-7
7	7,52 (d)	J _{7,8} '=1,76	137,34	7,51 (d, J=1,90Hz)	137,4	C-2, C-6, C-8, C-8', C-9
8	-	-	125,61	-	125,6	-
9	-	-	172,48	-	172,6	-
1'	-	-	131,42	-	131,5	-
2'	6,65 (d)	J _{2',6'} =1,64	108,97	6,63 (d, J=1,60Hz)	109,0	C-3', C-4', C-6', C-7'
3'	-	-	147,90	-	148,0	-
4'	-	-	146,49	-	146,5	-
5'	6,72 (d)	J _{5',6'} =7,84	108,38	6,71 (d, J=7,8Hz)	108,5	C-1', C-3', C-4'
6'	6,62 (dd)	J _{6',5'} =7,84 ; J _{6',2'} =1,64	121,87	6,61 (dd, J=7,8 ; J=1,6)	121,9	C-2', C-4', C-7'
7a	3,03 (dd)	J _{7a',7b'} =14,4 ; J _{7a',8'} =4,32	37,36	3,02 (dd, J=14,4 ; J=4,2Hz)	37,4	C-1', C-2', C-6', C-8', C-9'
7b	2,61 (dd)	J _{7b',7a'} =14,4 ; J _{7b',8'} =10,16	-	2,59 (dd, J=14,4 ; J=10,3Hz)	-	-
8'	3,80 (m)	-	39,57	3,80 (m)	39,7	-
9'	4,25 (m)	-	69,44	4,25 (m)	69,5	C-7'
3-OCH ₃	3,90 (s)	-	55,94	3,89 (s)	56	C-3, C-4
4-OCH ₃	3,93 (s)	-	55,93	3,92 (s)	55,9	C-3, C-4
-	5,92	-	100,99	5,91	100,1	C-4'
OCH ₂ O-				(A,B; J _{A,B} =1,4Hz)		

5.4.2 Gadaina 120

A lignana gadaina foi isolada tanto da fração hexânica ácida como da etérea ácida, na forma de um sólido cristalino. A estrutura deste metabólito foi proposta com base em dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , uni-e bidimensionais homo-e heteronucleares, bem como da análise de Espectrometria de Massas. Trata-se de um lignana dibenzilbutirolactônica gadaina (**120**), já isolada anteriormente,⁶³ porém inédita nesta espécie.



5.4.2.1 Espectrometria de Massas de Gadaina

No espectro de massas (Fig. 16, pag. 96) desta substância foi possível observarmos uma diferença com relação ao espectro da lignana discutida anteriormente. Neste, o pico íon molecular apareceu a $m/z=352(\text{M}^+)$, e com o auxílio das análises dos espectros de ^1H e ^{13}C sugerem $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ como fórmula molecular para este metabólito. Além do íon molecular, fragmentos característicos foram observados a $m/z=217$, 159, 135 (pico base) e 77, no espectro de massas. Os picos em $m/z=217$ e 135 resultam da clivagem benzílica na posição 7'-8'.

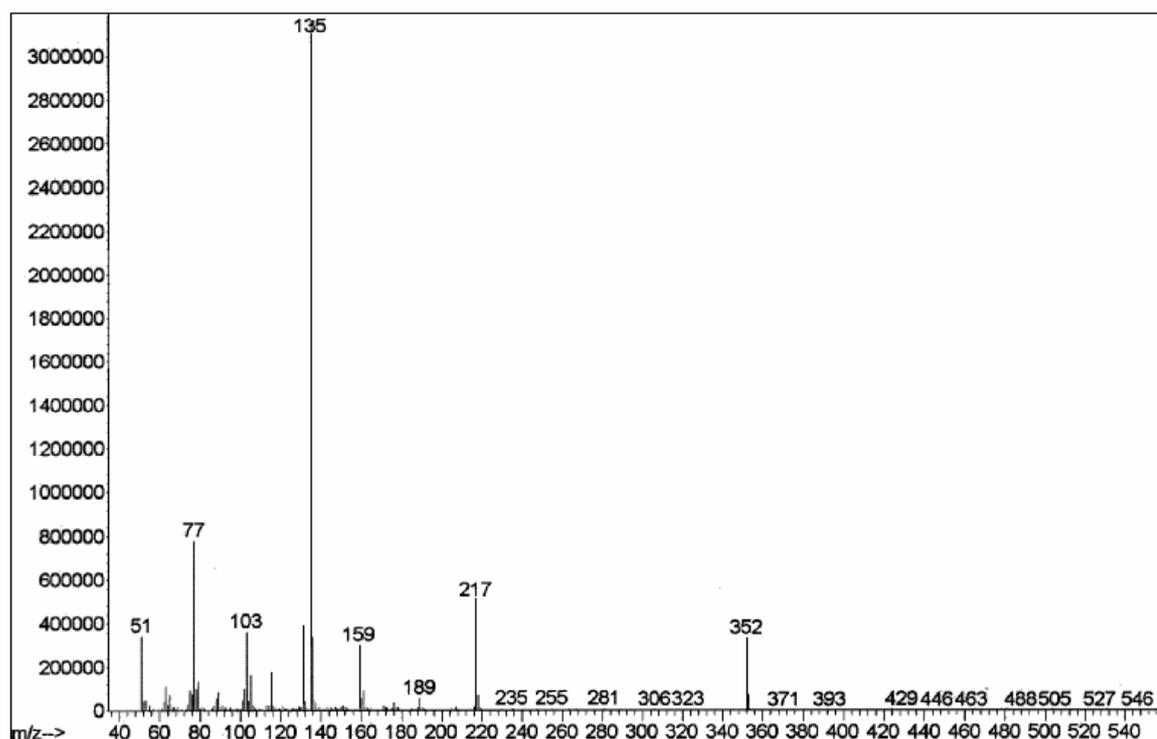


Figura 16: Espectro de Massa de Gadaina **120**

5.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de Gadaina

Pelo espectro de RMN de ^1H de Gadaina (**120**) (Fig 17A e 17B, pag. 97 e 98), pode-se deduzir que esta substância apresenta uma estrutura muito semelhante a do metabólito discutido anteriormente (Kaerofilina). Trata-se de uma lignana dibenzilbutirolactônica, porém a principal diferença entre as duas lignanas é a ausência dos dois grupos metoxilas na estrutura de Gadaina, e o surgimento de um segundo grupo metilenodioxila.

A análise do espectro de RMN de ^1H comprova a presença de dois grupos metilenodioxilas ligados aos anéis aromáticos A e B, os quais absorvem respectivamente em $\delta=6,01$ e a $\delta=5,89$ ppm. O espectro de RMN ^1H exibe ainda sinais característicos de lignanas dibenzilbutirolactônicas, como dois duplos dubletos em $\delta=2,56$ e $2,96$ ppm referentes aos prótons metilênicos benzílicos H-7' a e H-7' b, respectivamente. Este modelo sugere que o carbono vizinho a este carbono vizinho a este carbono metilênico é um metínico quiral, cujo próton ligado a ele, H-8' absorve em $\delta=3,71$ ppm na forma de um multipletto. Em adição a estes sinais, um segundo grupo metilênico ligado a um átomo de oxigênio, exibe um multipletto em $\delta=4,22$ ppm

e correlaciona-se com o próton H-8' vizinho a ele. Este sistema de spins pode ser observado no espectro de COSY, discutido posteriormente.

O sistema de spins dos prótons aromáticos descritos para kaerofilina é o mesmo observado para Gadaina, porém com algumas diferenças de deslocamentos químicos, o que indica que ocorreu uma substituição em um dos anéis aromáticos. Os hidrogênios aromáticos do anel A correspondem ao H-2 em $\delta=7,00$ ppm (1H, d, $J=1,5$ Hz), H-5 e $\delta=6,84$ ppm (1H, d, $J=8,04$ Hz) e H-6 a $\delta=7,05$ ppm (1H, dd, $J=8,04$ e $1,5$ Hz). Um segundo sistema observado se refere aos prótons aromáticos do anel B, que inclui H-2' a $\delta=6,63$ ppm (1H, d, $J=1,48$ Hz), H-5' em $\delta=6,70$ ppm (1H, d, $J=7,96$ Hz), bem como H-6' a $\delta=6,60$ ppm (1H, dd, $J=7,96$ e $1,48$ Hz).

Em campo mais baixo do espectro de RMN de ^1H encontra-se um singlete correspondente ao próton H-7 da dupla ligação, cujo deslocamento químico é $\delta=7,46$ ppm.

Os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamentos e as multiplicidades dos prótons da estrutura da referida lignana encontram-se na Tabela 10, página 108.

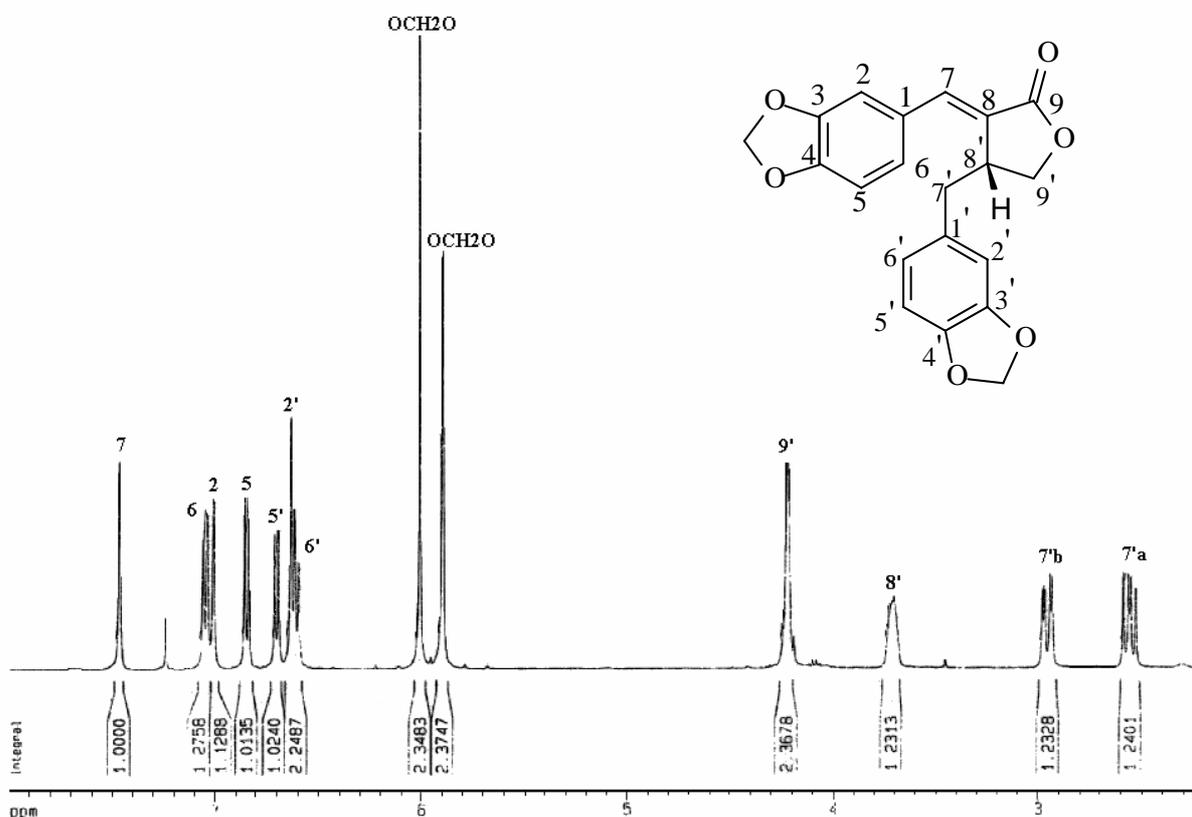


Figura 17A: Espectro de RMN ^1H , de Gadaina (120) em CDCl_3

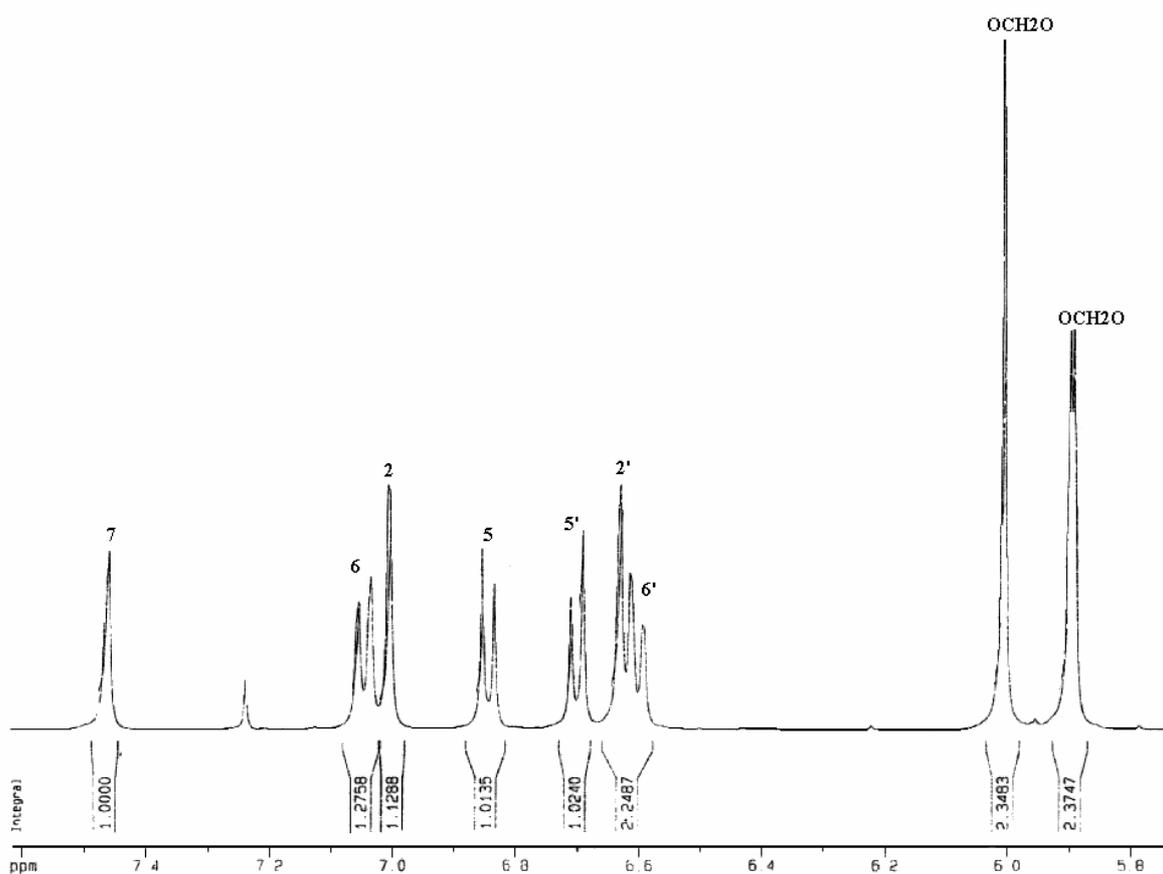


Figura 17B: Espectro de RMN ^1H Expandido (5,8-7,5 ppm), a 400 MHz, de **120** em CDCl_3

5.4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear 2D, COSY ^1H - ^1H de Gadaina

Ao analisar o espectro COSY (Fig. 18A e 18B, pag. 99 e 100) de **120**, observou-se o mesmo sistema observado para a lignana Kaerofilina. Um dos referidos sistemas apresenta a correlação entre os dois prótons metilênicos diastereotópicos H-9' e o próton H-8' do carbono metínico quiral, o qual tem conectividade com os prótons metilênicos benzílicos H-7'a e H-7'b.

Os outros dois sistemas ocorrem entre os prótons aromáticos dos anéis benzênicos trissubstituídos A e B. Os prótons aromáticos do anel A compreendem os prótons H-5 e H-6, os quais possuem uma relação orto entre si, e ainda o próton H-2 que mantém com o H-6 uma relação meta, com uma constante de acoplamento (J) em torno de 2 Hz. O outro sistema é correspondente aos prótons aromáticos do anel B, que inclui o próton H-5', o qual mantém uma relação orto com o próton H-6' (J=7,96 Hz), que por sua vez possui uma relação meta com o H-2'.

A Figura abaixo mostra as correlações observadas no espectro de COSY de Gadaina.

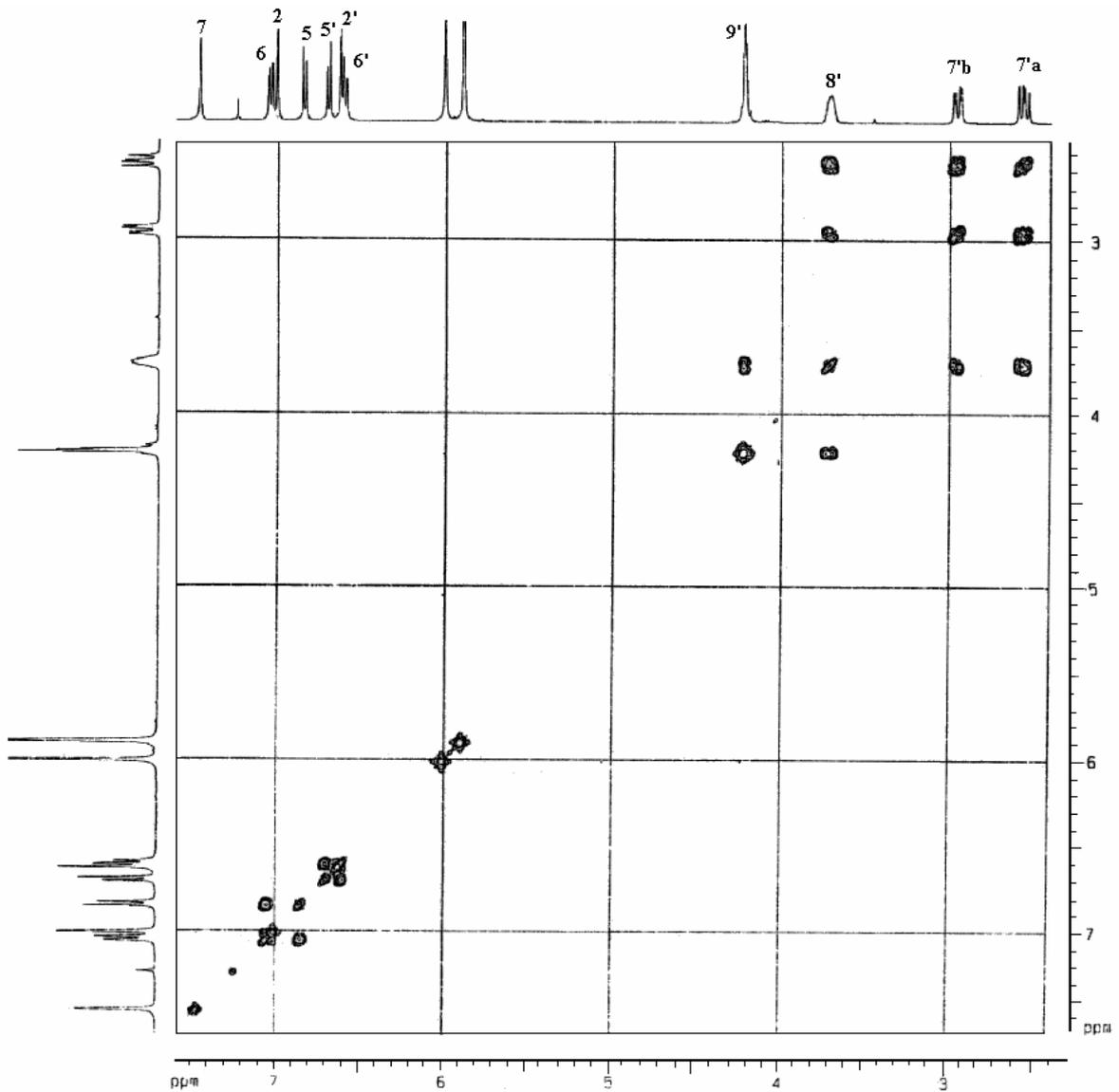


Figura 18A: Espectro de RMN 2D, COSY a 400MHz, de **120** em CDCl_3

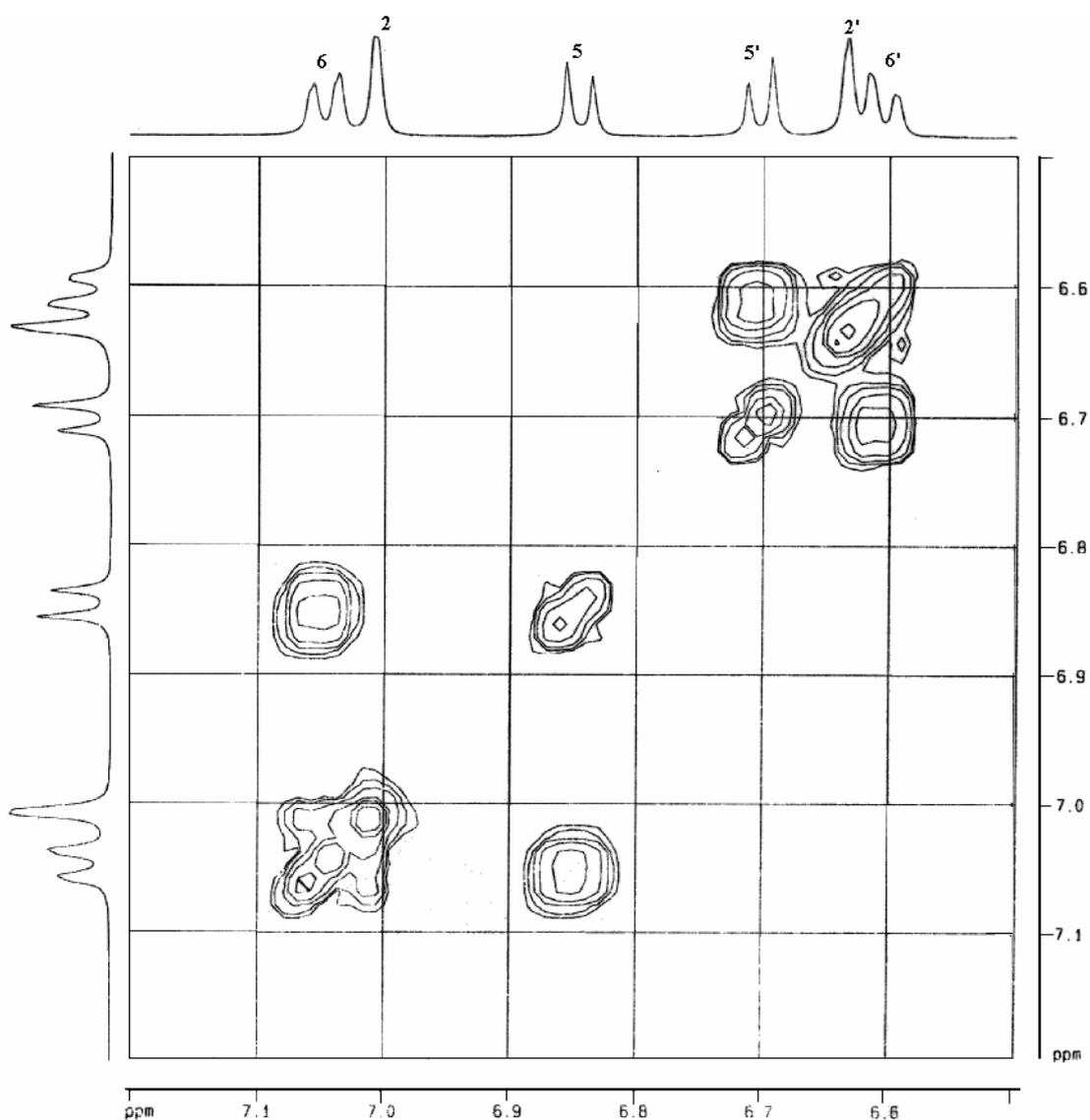


Figura 18B: Espectro de RMN 2D, COSY Expandido (6,5-7,1 ppm) a 400 MHz, de **120** em CDCl_3

5.4.2.4 Análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C de Gadaina.

O espectro de carbono totalmente desacoplado (Fig 19A e 19B, pag. 101), apresentou vinte sinais numa região espectral compreendida entre $\delta=37,52$ ppm e 172,46 ppm. Utilizando-se o espectro DEPT 135° (Fig 20 pag. 102) foi possível perceber que a estrutura é composta por oito carbonos quaternários, oito metínicos (CH) e quatro carbonos metilênicos (CH_2). Esta constatação reforça a ausência dos dois grupos metoxilas e a substituição destas por um segundo grupo metilenodioxila

em $\delta=101,69$ e $101,00$ ppm. Os demais sinais observados são equivalentes aos observados para kaerofilina.

Os deslocamentos químicos dos carbonos que formam a estrutura do composto 4AC encontram-se na Tabela 10, página 108.

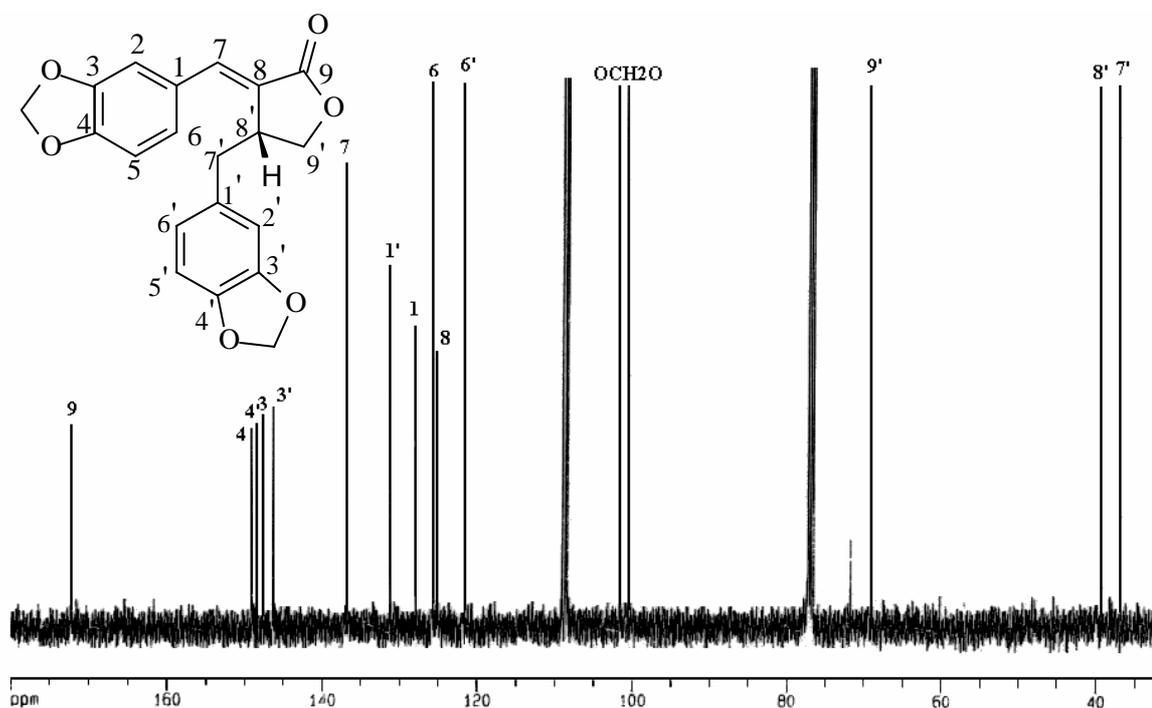


Figura 19A: Espectro de RMN ^{13}C de Gadaina (120) em CDCl_3 .

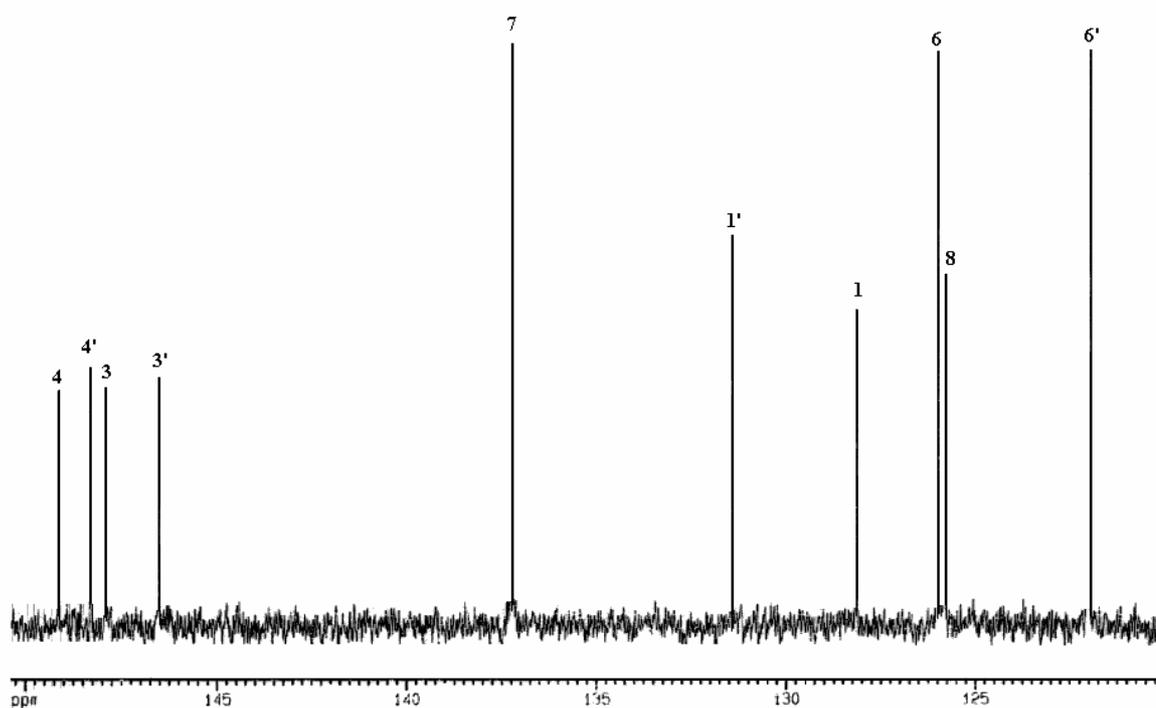


Figura 19B: Espectro de RMN ^{13}C Expandido (120-150 ppm) de Gadaina (120), em CDCl_3

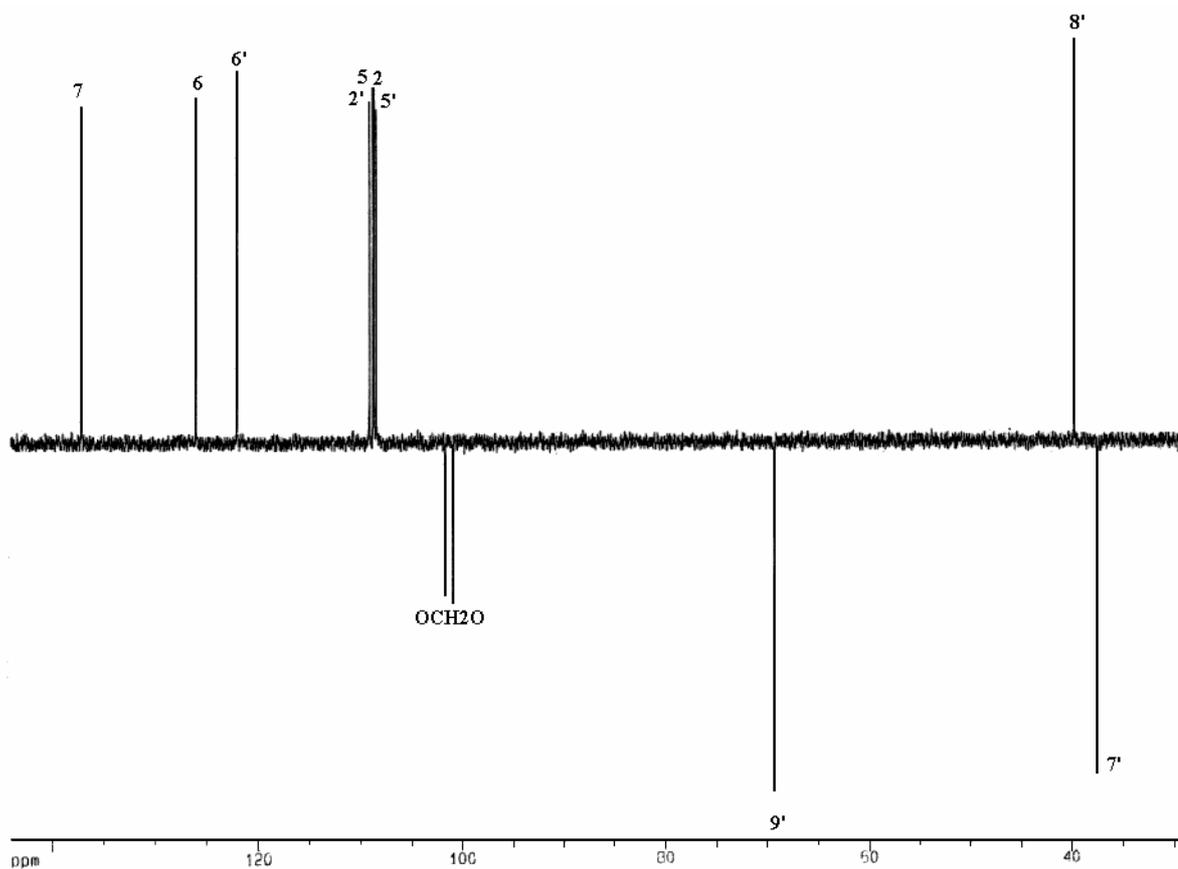


Figura 20: Espectro de RMN DEPT 135° de Gadaina (**120**), em CDCl_3

5.4.2.5 Espectros de HMQC e HMBC de Gadaina

O espectro HMQC (Fig. 21A e 21B, pag. 103 e 104) foi útil para confirmar a conectividade dos átomos proposta pelos métodos anteriores, enquanto que o espectro HMBC, através das correlações à longa distância via $^2J_{\text{H-C}}$ e $^3J_{\text{H-C}}$, tornou possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários, além de confirmar os deslocamentos químicos dos demais carbonos.

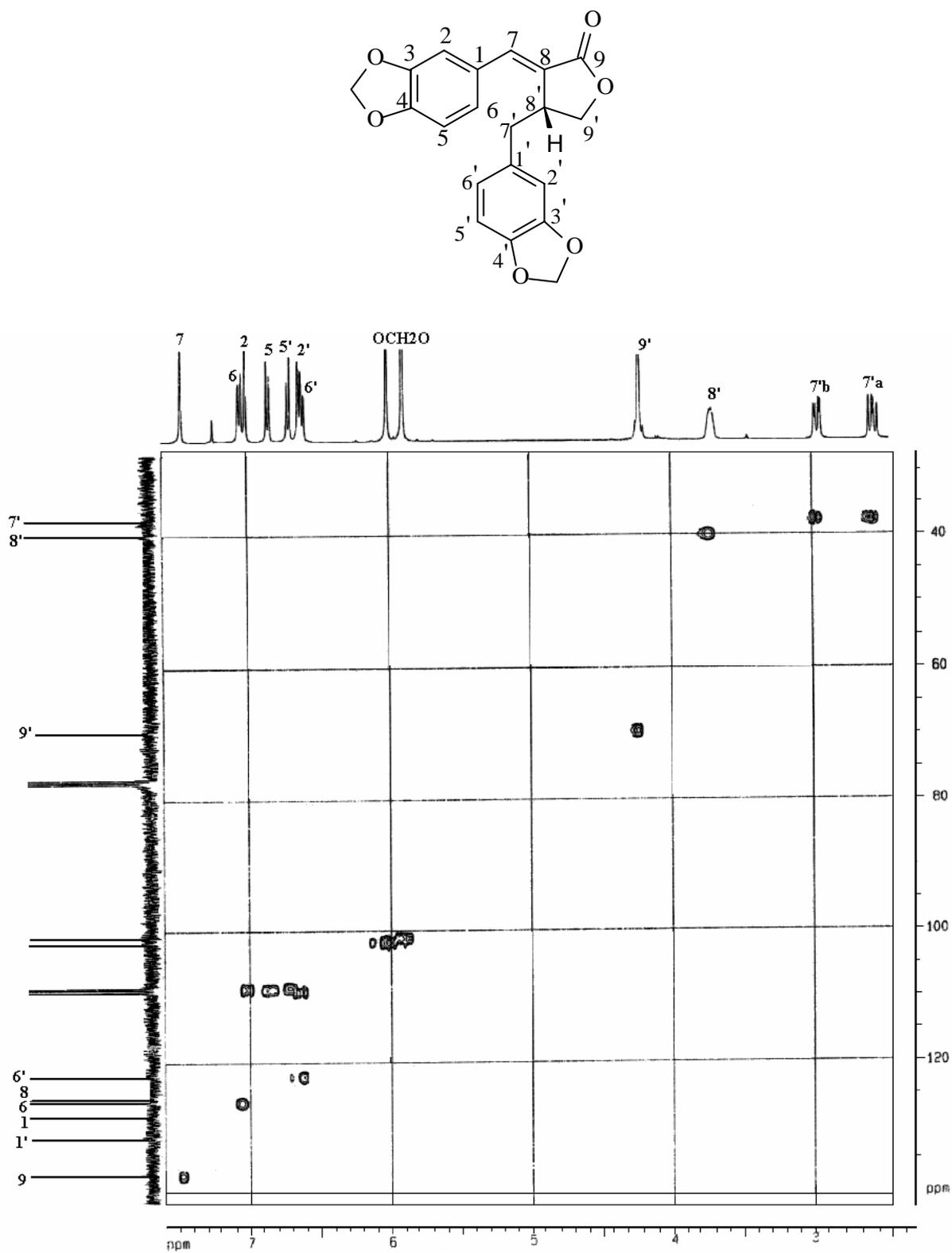


Figura 21A: Espectro de RMN 2D HMQC de Gadaina (120) em CDCl₃

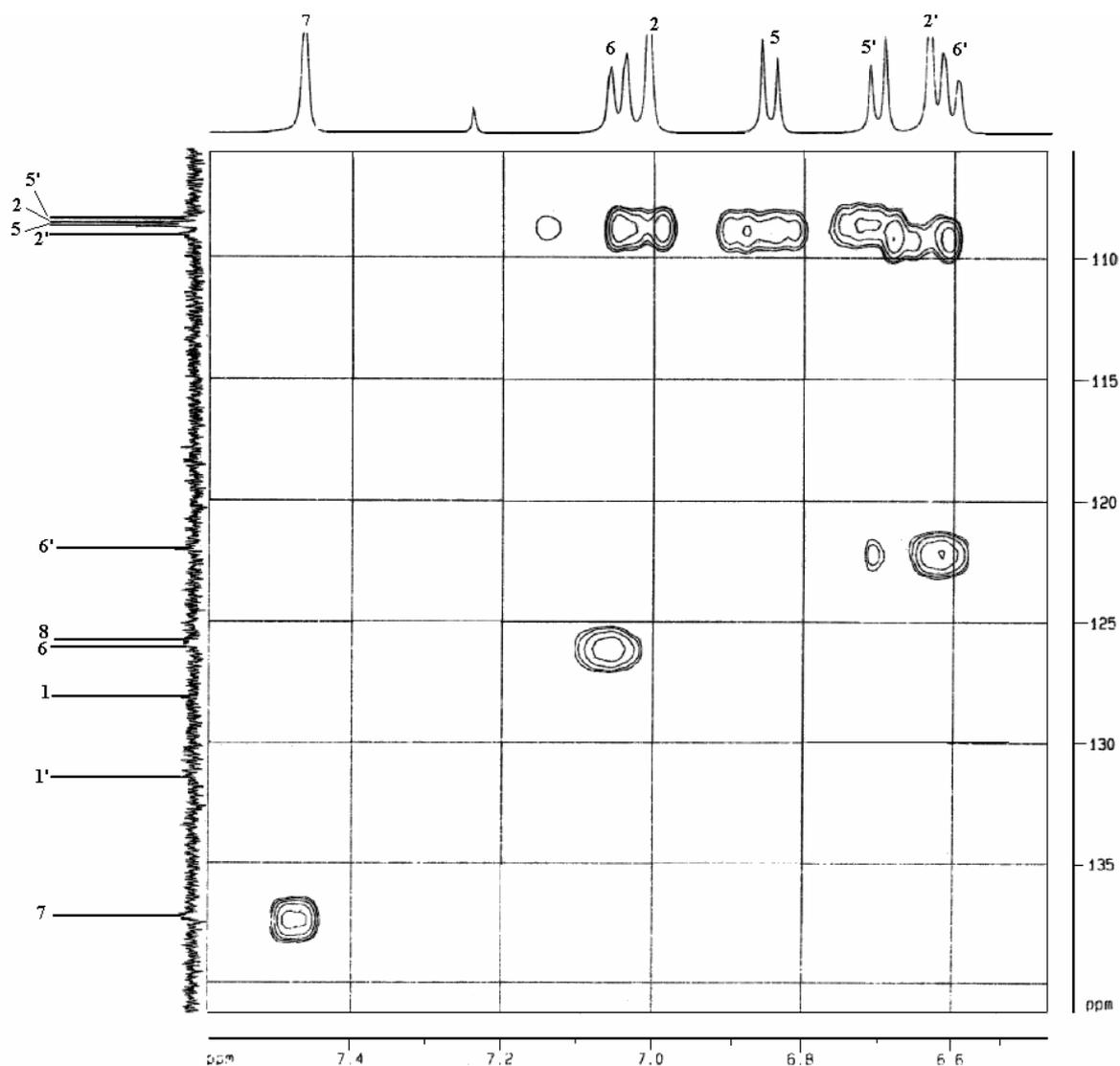


Figura 21B: Espectro de RMN 2D HMQC Expandido (6,5-7,5 ppm) de Gadaina (**120**) em CDCl_3

Através da análise do espectro HMBC (Fig. 22A, 22B, 22C e 22D pag. 105, 106 e 107), foi possível observar algumas correlações via $^3J_{\text{H-C}}$, como por exemplo: o próton H-2 que ressona em $\delta=7,00$ ppm, correlaciona-se com o C-6 a $\delta=126,01$ ppm, com o C-7 a $\delta=137,23$ ppm, com o C-4 a $\delta=149,15$ ppm e mantém ainda uma correlação via $^2J_{\text{H-C}}$ com o C-3 a $\delta=147,92$ ppm. Já o próton H-5 a $\delta=6,84$ ppm, correlaciona-se via $^3J_{\text{H-C}}$ com o C-3 a $\delta=147,92$ ppm, com o C-1 a $\delta=128,16$ ppm e via $^2J_{\text{H-C}}$ com o C-4 a $\delta=149,15$ ppm, com o C-6 a $\delta=126,01$ ppm e via $^4J_{\text{H-C}}$ com o C-2 a $\delta=108,64$ ppm.

Além dessas correlações mostradas, o espectro HMBC possibilitou observar outras correlações importantes para a elucidação da estrutura desta lignana. A figura

22A, 22B, 22C e 22D abaixo e a Tabela 10 na página 108, mostram as demais correlações observadas neste espectro.

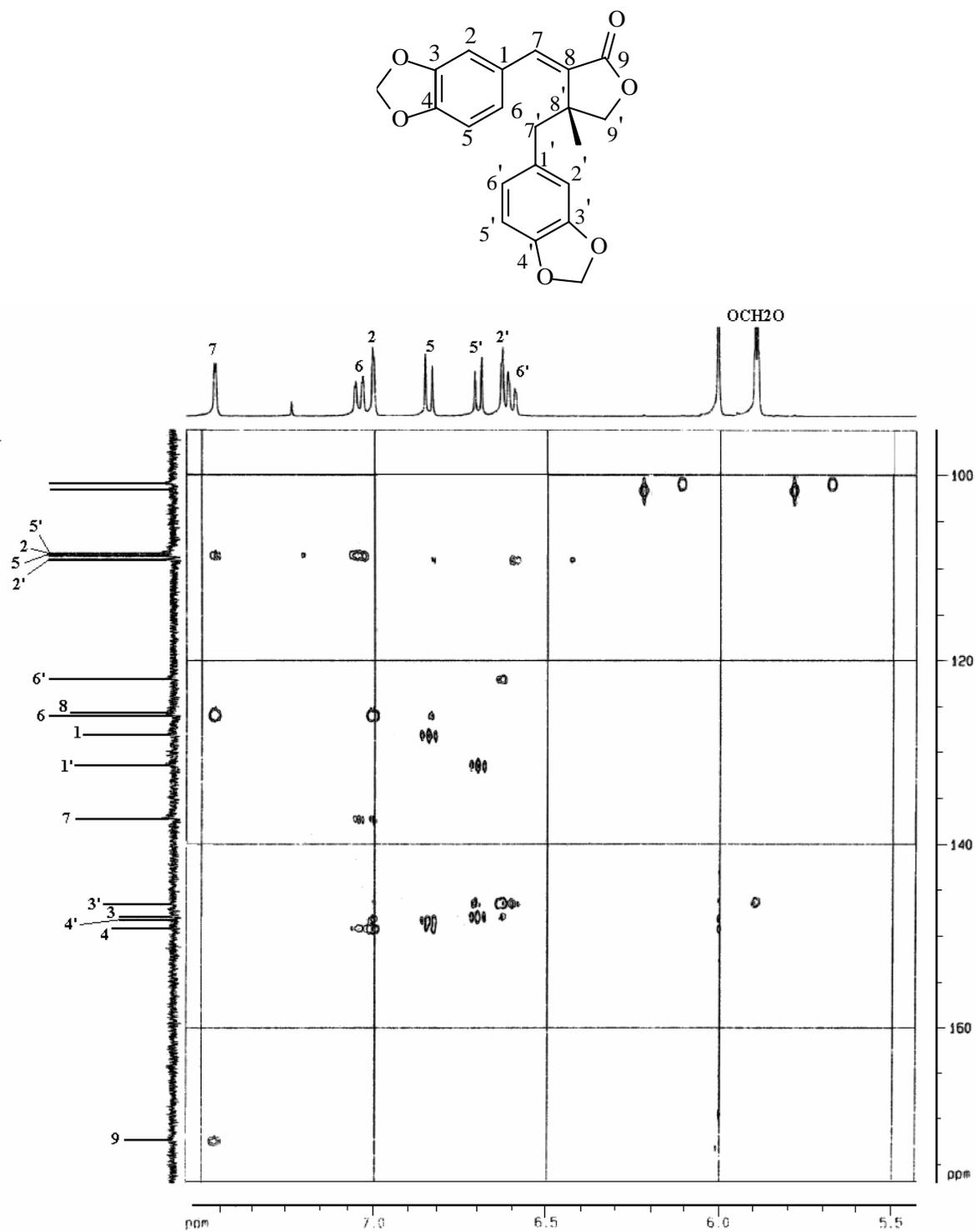


Figura 22A: Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (5,5-7,6 ppm) de Gadaina (**120**) em CDCl₃

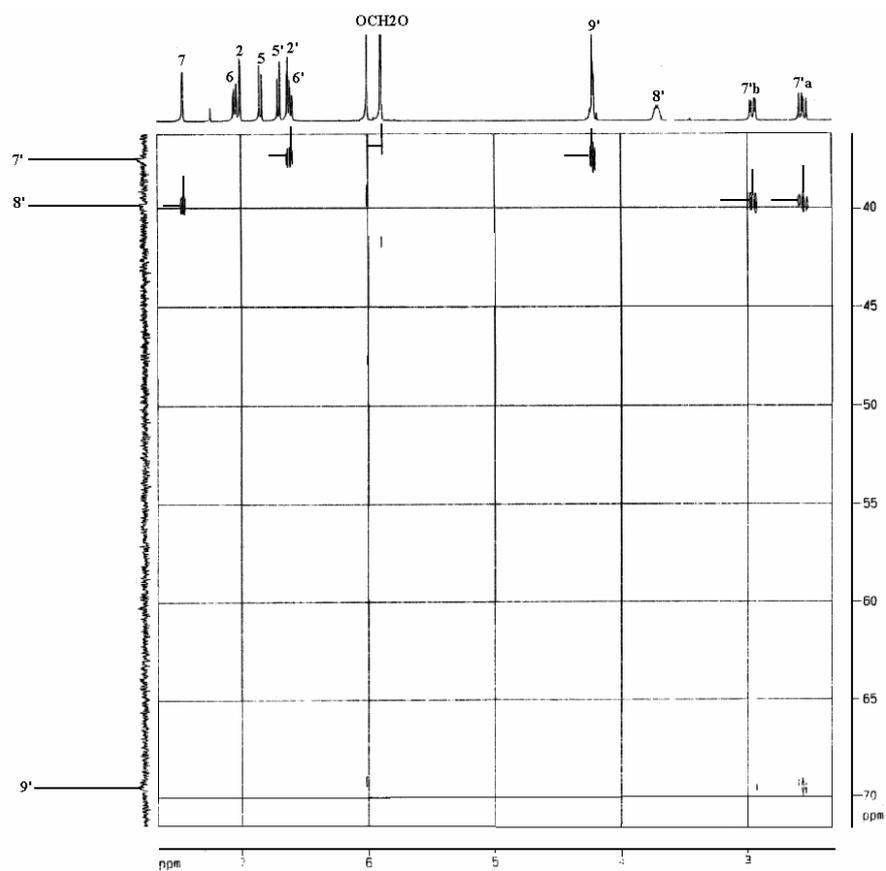


Figura 22B: Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (2,5-7,5 ppm) de **120**

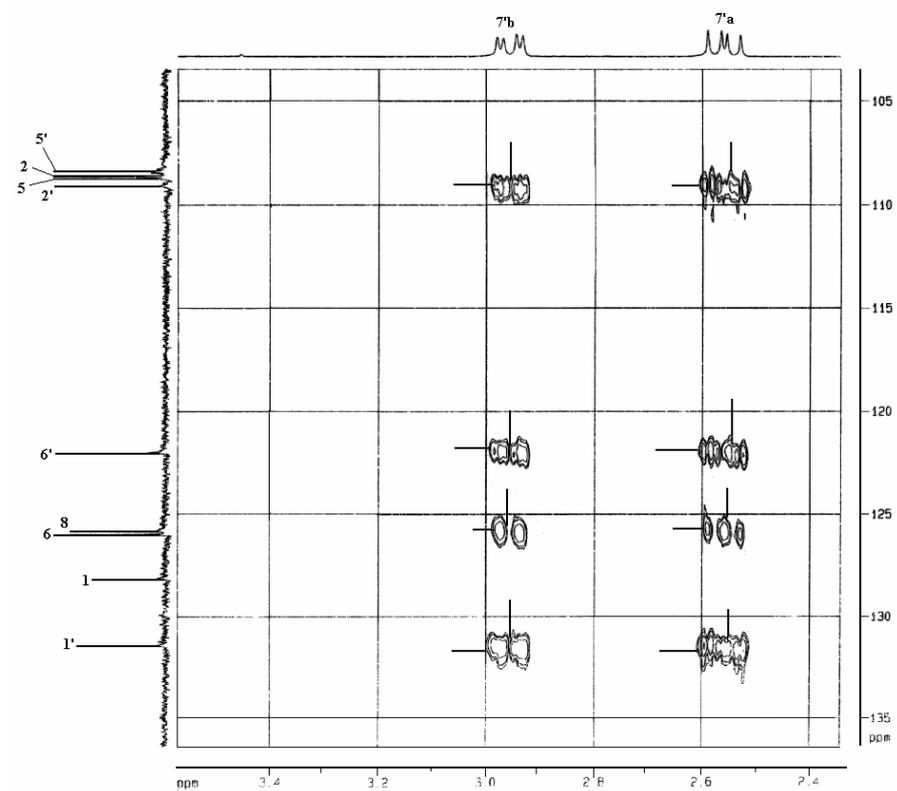


Figura 22C: Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (2,4-3,4 ppm) de **120**

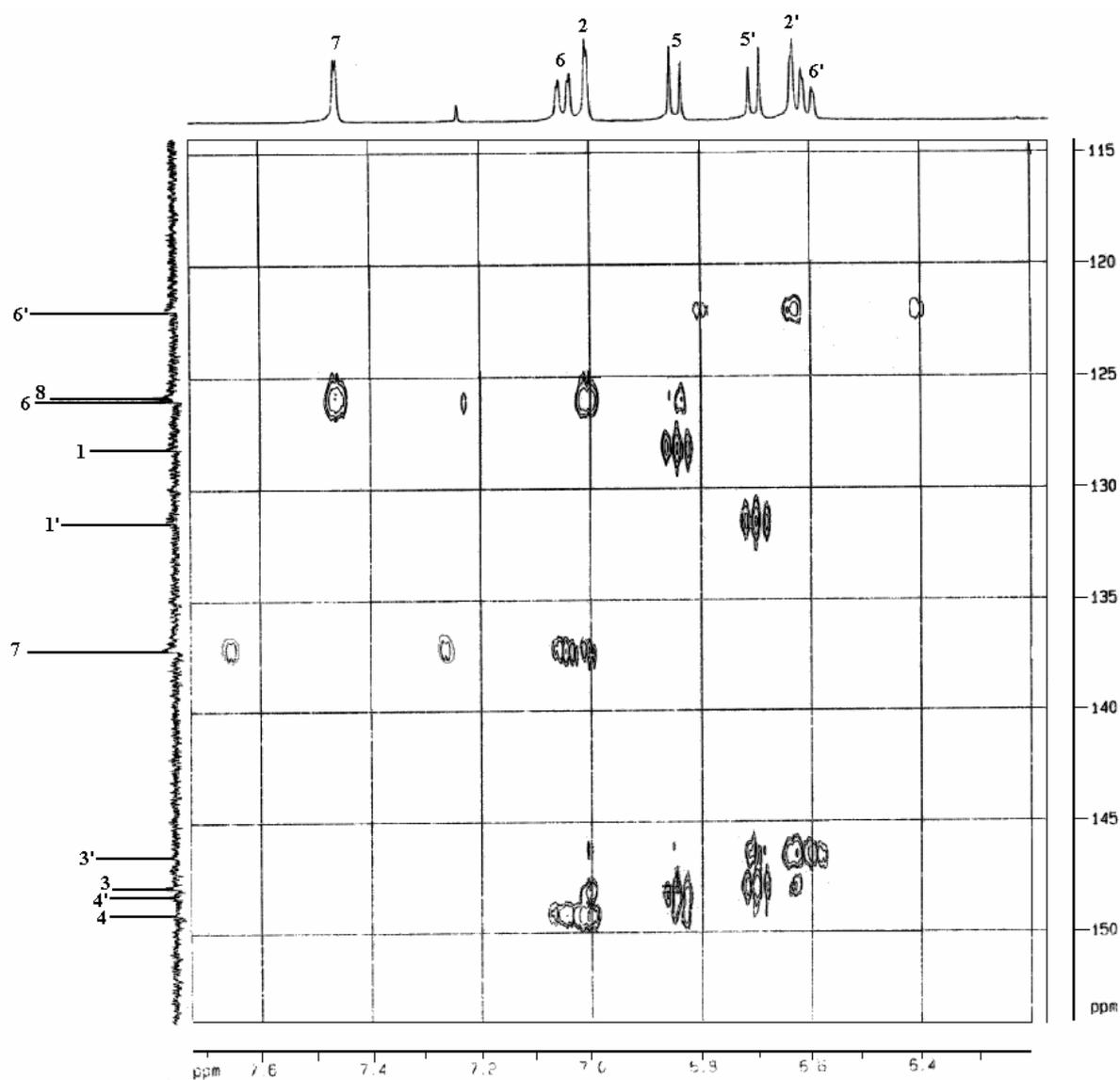


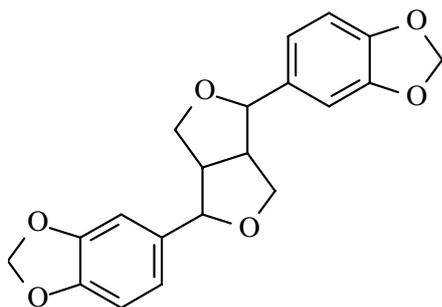
Figura 22D: Espectro de RMN 2D HMBC Expandido (5,3-7,6 ppm) de 120 em CDCl_3

Tabela 10: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H - (400 MHz) e ^{13}C - (100 MHz) de Gadaina (**120**) em CDCl_3

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ⁶³	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ⁶³	HMBC
1	-	-	126,16	-	131,37	-
2	7,01 (d)	$J_{2,6}=1,5$	108,64	7,07 (d, $J=1,5\text{Hz}$)	108,36	C-3, C-4, C-6, C-7
3	-	-	147,92	-	147,92	-
4	-	-	149,15	-	148,97	-
5	6,84 (d)	$J_{5,6}=8,04$	108,76	6,80 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)	110,34	C-1,C-2,C-3,C-4,C-6
6	7,05 (dd)	$J_{6,5}=8,04$; $J_{6,2}=1,50$	126,01	7,11 (dd, $J=8,0$; $J=1,5\text{Hz}$)	125,18	C-2, C-4, C-7
7	7,46 (s)	-	137,23	7,54 (d, $J=1,60\text{Hz}$)	140,33	C-2, C-6, C-8', C-9
8	-	-	125,84	-	126,85	-
9	-	-	172,46	-	169,26	-
1'	-	-	131,45	-	127,89	-
2'	6,63 (d)	$J_{2',6'}=1,48$	109,12	6,68 (d, $J=1,50\text{Hz}$)	107,87	C-3', C-4', C-6', C-7'
3'	-	-	146,53	-	146,46	-
4'	-	-	148,32	-	147,55	-
5'	6,70 (d)	$J_{5',6'}=7,96$	108,45	6,64 (d, $J=8,0\text{Hz}$)	109,27	C-1', C-3', C-4'
6'	6,60 (dd)	$J_{6',5'}=7,96$; $J_{6',2'}=1,48$	122,03	6,75 (dd, $J=8,0$; $J=1,5$)	122,69	C-2', C-3', C-7'
7'a	2,56 (dd)	$J_{7'a',7'b'}=14,2$; $J_{7'a',8'}=10$	37,52	2,6 (dd, $J=16,8$; $J=12\text{Hz}$)	40,73	C-1', C-2', C-6', C-8, C-8', C-9'
7'b	2,96 (dd)	$J_{7'b',7'a'}=14,2$; $J_{7'b',8'}=4,44$	-	2,59 (dd, $J=16,8$; $J=4,8\text{Hz}$)	-	-
8'	3,71 (m)	-	39,85	3,72 (m)	44,22	-
9'	4,22 (m)	-	69,47	4,32-4,24 (m)	69,80	C-7'
-	6,01 (s)	-	101,69	5,97 (s)	101,42	-
OCH ₂ O-	-	-	-	-	-	-
-	5,89(d)	$J=1,96$	101,00	5,92 (A,B; $J_{A,B}=1,4\text{Hz}$)	101,02	C-3'
OCH ₂ O-	-	-	-	-	-	-

5.4.3 Sesamina (114)

Este metabólito codificado como 3AC, foi identificado através de métodos físicos, como Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . A análise destes dados permitiu propor a estrutura **114** para este metabólito, a qual corresponde a de uma lignana denominada sesamina.



(114)

5.4.3.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de sesamina

Através da análise do espectro de RMN ^1H da lignana (Fig 23A e 23B, pag.110), pode-se propor uma estrutura para esta substância. Neste espectro observa-se a presença de um singlete intenso a $\delta=5,98$ ppm (2H, s) referente a um grupo metilenodioxila (-O-CH₂-O-). A presença do metilenodioxila foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^{13}C e principalmente pelo espectro DEPT 135°, no qual aparece um sinal de amplitude negativa em $\delta=101,27$ ppm. Foi observada a presença de dois hidrogênios metilênicos diastereotópicos em $\delta=3,90$ e 4,27 ppm, ambos na forma de duplo dubletos, com uma constante de acoplamento $J=3,2$ e 9,2 Hz e $J=6,64$ e 8,8 Hz, respectivamente, atribuídos aos hidrogênios H-1 e 1'. Estes hidrogênios diastereotópicos acoplam com os hidrogênios H-2 que absorvem a $\delta=3,08$ ppm, que por sua vez acoplam com os hidrogênios H-3, que absorvem a $\delta=4,75$ ppm. Este sistema de spins pode ser observado no espectro bidimensional homonuclear COSY (Fig 24, pag 111). Além destes sinais, observa-se a presença de três hidrogênios aromáticos; um sinal como sendo um singlete ($\delta=6,88$ ppm) do H-9 e os outros dois sinais com deslocamentos em $\delta=6,84$ e 6,81 ppm, referente aos hidrogênios H-5 e H-6 respectivamente, os quais apresentam uma relação orto entre si.

Os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e as multiplicidades dos hidrogênios da estrutura **114** encontram-se na Tabela 11, página 92.

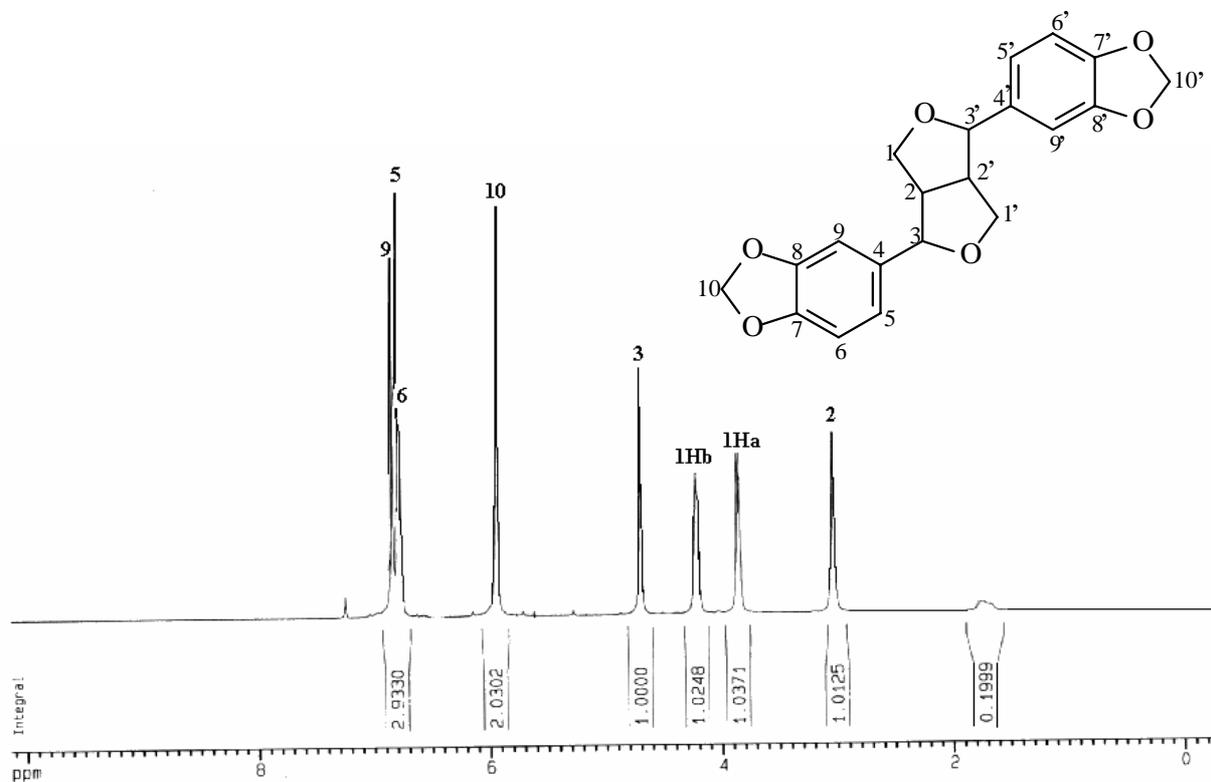


Figura 23A: Espectro de RMN ^1H de Sesamina (**114**) em CDCl_3

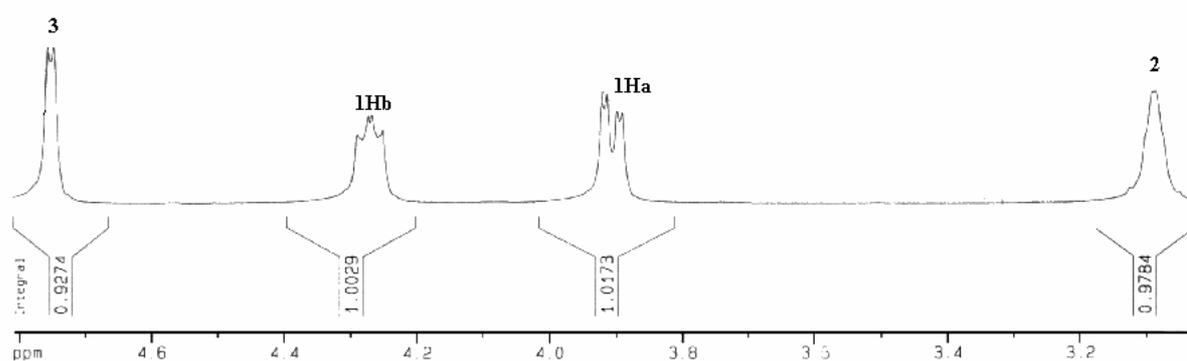


Figura 23B: Espectro de RMN ^1H Expandido (3,0-4,8 ppm) de Sesamina (**114**) em CDCl_3

5.4.3.2 Análise do espectro COSY ^1H - ^1H

Este espectro de COSY (Fig 24, pag. 111) foi realizado com a finalidade de identificar os sistemas de spins da estrutura.

Através da análise deste espectro, foi possível identificar acoplamentos através de ligações que definiram dois sistemas de spins: i) o sistema de spins envolvendo os hidrogênios do grupamento metilênico (CH_2) diastereotópico e o hidrogênio ligado ao carbono quiral (C-2), o qual por sua vez acopla com um segundo hidrogênio ligado ao carbono quiral (C-3), e ii) o sistema de spins envolvendo os dois hidrogênios aromáticos.

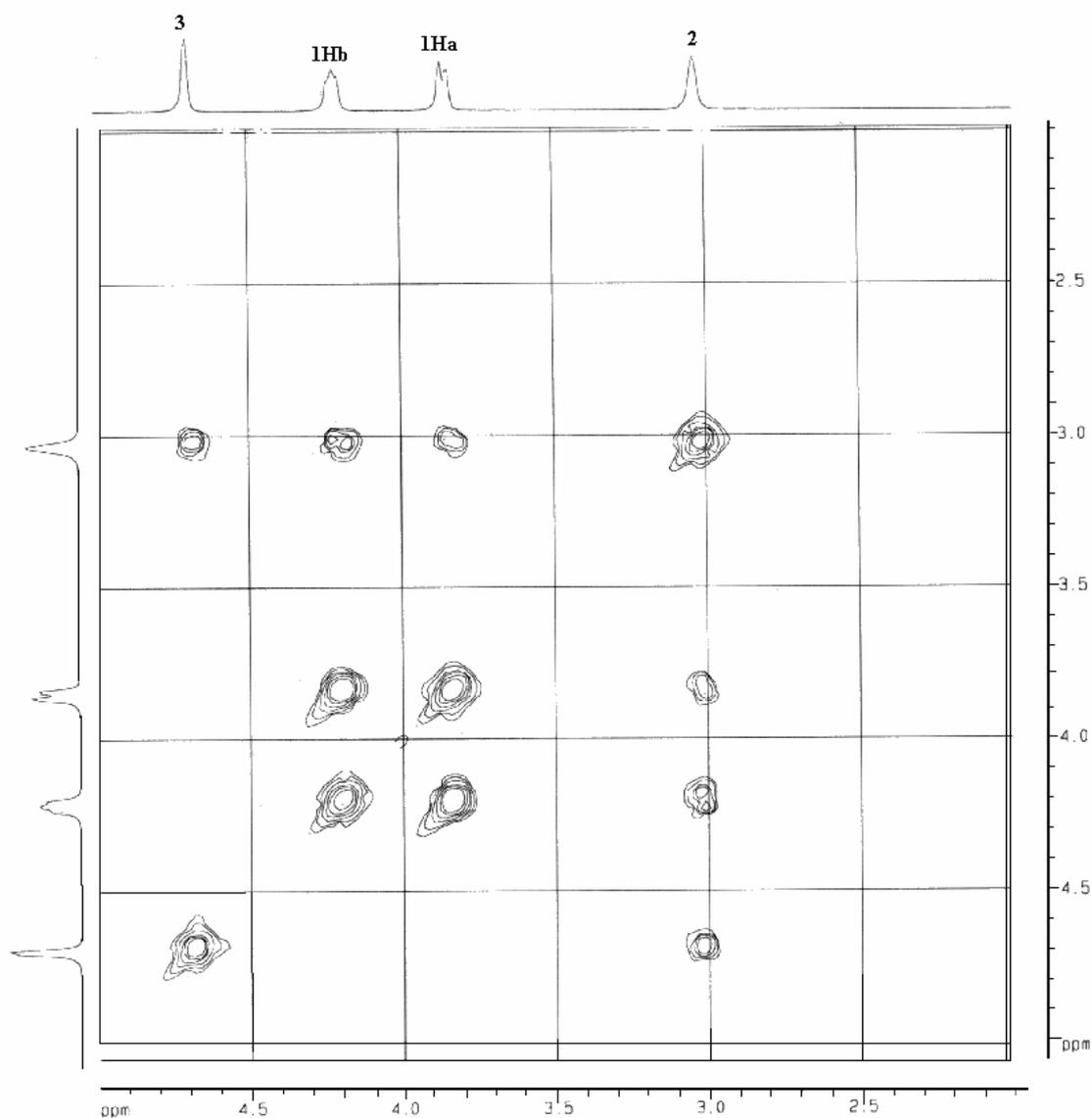


Figura 24: Espectro de RMN 2D, COSY a 400 MHz, de 114 em CDCl_3

5.4.3.3 Análise do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

A análise do espectro de carbono totalmente desacoplado (Fig. 25, pag. 112), permitiu a identificação de dez sinais distribuídos na região espectral compreendida entre $\delta=54,29\text{-}147,92$ ppm. Por esta técnica não foi possível identificar as multiplicidades dos carbonos, sendo, portanto necessário realizar um espectro DEPT 135° . Com o auxílio dos dados referentes ao espectro DEPT 135° (Fig 26 pag. 113), foi possível observar que a estrutura é composta por três carbonos quaternários, cinco carbonos metínicos e dois carbonos metilênicos de amplitude negativa. Estes dois sinais de carbonos metilênicos foram facilmente identificados através do espectro DEPT 135° . Um deles ressona a $\delta=71,88$ ppm, sinal referente ao carbono diastereotópico (C-1), enquanto que o outro sinal que aparece em $\delta=101,27$ ppm, corresponde aos dois carbonos metilênicos da estrutura, (C-10 e C-10'). Os sinais dos carbonos quaternários se encontram na região espectral compreendida entre $\delta=135,07\text{-}147,92$ ppm, correspondentes aos carbonos aromáticos substituídos.

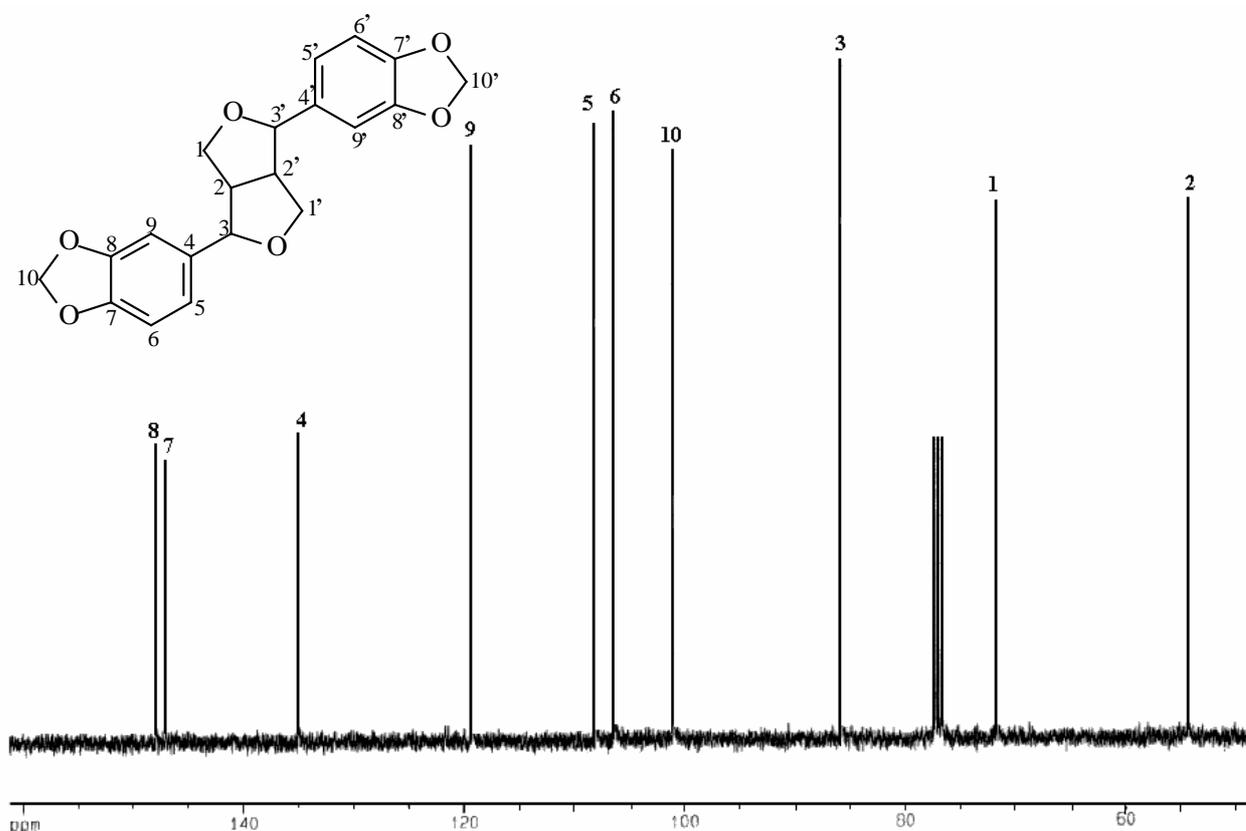


Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C de Sesamina (**114**) em CDCl_3

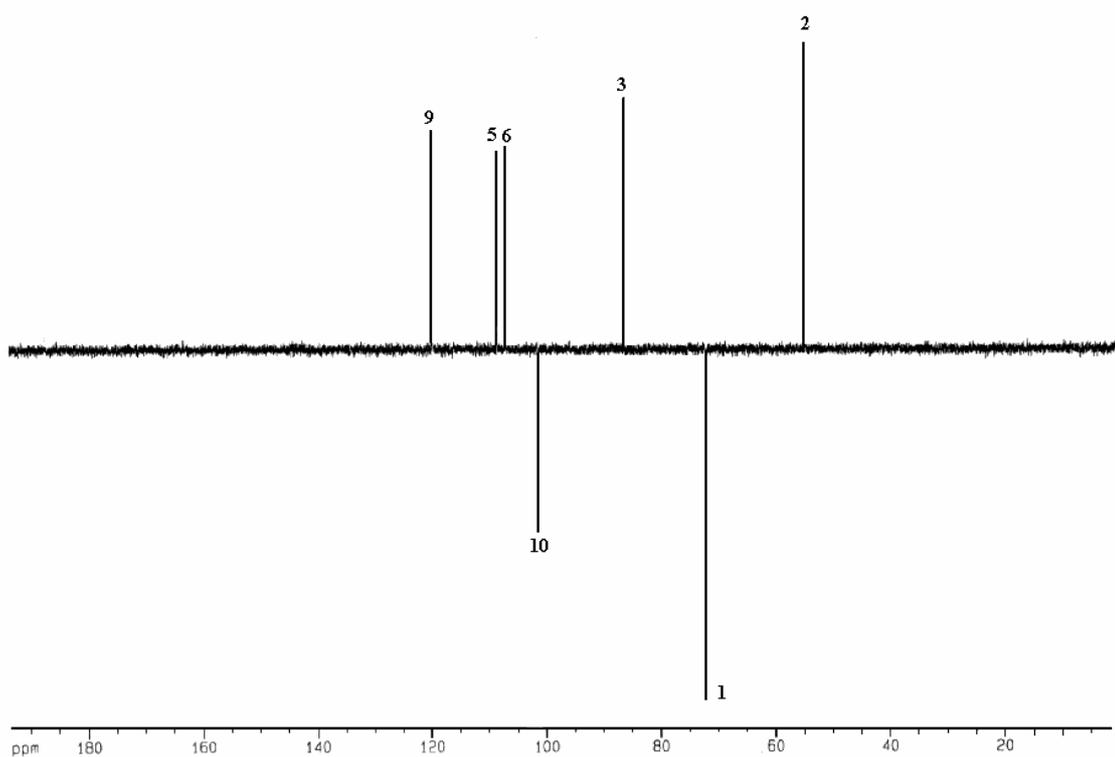


Figura 26: Espectro de RMN DEPT 135° de **114** em CDCl_3

Tabela 11: Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H - (400 MHz) e ^{13}C - (100 MHz) de Sesamina (**114**) em CDCl_3

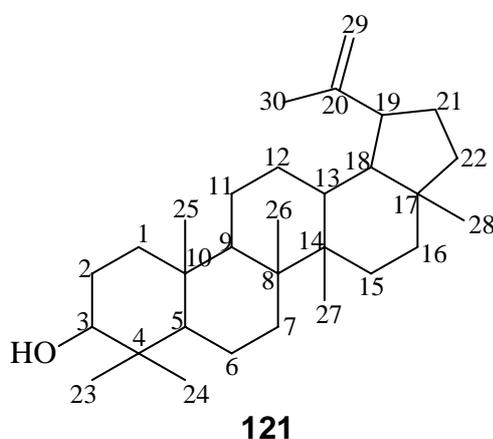
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1 Ha	3,90 (dd)	J=3,2; J=9,2	71,8
Hb	4,27 (dd)	J=8,8; J=6,6	-
2	3,08 (dd)		54,29
3	4,75 (d)	$J_{3,2}= 3,8$	85,72
4	-	-	135,07
5	6,84 (d)	$J_{5,6}= 8,0$	108,10
6	6,81 (d)	$J_{6,5}= 8,0$	106,42
7	-	-	147,05
8	-	-	147,92
9	6,88 (s)	-	119,25
10	5,98 (s)	-	100,99

5.5 Triterpenóide

5.5.1 Lupeol (11)

Este metabólito foi isolado em grande quantidade das frações hexânica e etérea ácida e apresentou-se como um sólido incolor, cristalizado em hexano. Sua pureza foi confirmada em CCD, utilizando-se de vários sistemas de solventes.

A estrutura deste composto foi determinada com base em dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura correspondente ao triterpeno lupeol.



5.5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro de RMN ^1H de **11** (Fig 27, pag. 114) é característico de compostos triterpênicos. Na região entre 0,7 e 1,8 ppm observa-se sinais referentes aos sete grupos metílicos presentes em **11**, a δ 0,75; δ 0,78; δ 0,83; δ 0,93; δ 0,95; δ 1,15 e δ 1,17 ppm.

A dupla ligação presente em **11** é identificada pelos sinais em $\delta=4,57$ e $4,68$ ppm. O próton ligado ao átomo de carbono quiral (C-3) vizinho à hidroxila, tem um deslocamento $\delta=3,18$ ppm e aparece na forma de um duplo dubleto (1H, J=8 e 12 Hz), pois acopla com hidrogênios diastereotópicos (H-2).

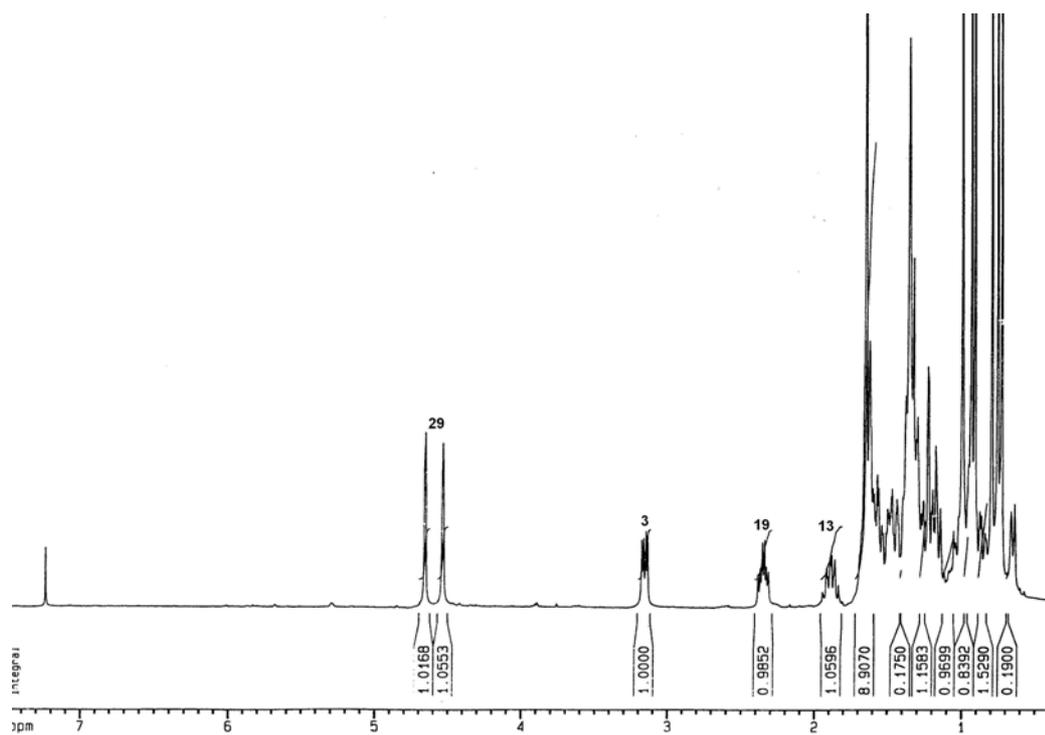


Figura 27: Espectro de RMN ^1H , a 400 MHz, de **11** em CDCl_3

5.6 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE *Z. rhoifolium*

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos capazes de inibir o crescimento bacteriano e fúngico, obtidos de plantas tem sido objeto de estudos de vários pesquisadores. Este interesse foi originado pelo uso indiscriminado de antibióticos na tentativa de se curar infecções potencialmente fatais. Porém a prática abusiva de tais drogas resultou no aparecimento de patógenos resistentes, o que tornou necessário à busca, cada vez maior, de novos fármacos. Daí a grande importância da pesquisa por novas substâncias com poder bactericida ou bacteriostático.⁸⁷

A bioautografia é um método que combina a CCD com bioensaio *in situ*. Este método mostra a localização exata do constituinte ativo de uma matriz complexa, sendo, portanto, o método mais eficiente no isolamento biomonitorado pela atividade, através de uma cromatoplaça de referência revelado com um reagente cromogênico. A técnica mais utilizada para o isolamento de compostos antibacterianos de substâncias, por bioautografia é chamada “overlayer agar”, onde se podem testar diferentes microrganismos. Por esta técnica, são obtidas zonas de inibição bem definidas, que são visualizadas pela detecção da atividade da enzima desidrogenase com sal de tetrazóleo (metiltiazol tetrazóleo, MTT; p-iodo tetrazóleo, INT; 2, 3, 5-trifenil tetrazóleo, TTC). As bactérias metabolicamente ativas convertem o sal de tetrazóleo em um complexo colorido, chamado formazan.⁷⁰⁻⁷¹

5.6.1 Determinação da Quantidade de Substância Ativa (QSA) pelo método de bioautografia

Para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia do extrato bruto de *Z. rhoifolium*, das frações hexânica e clorofórmica básica, bem como das frações hexânica e etérea ácida e das substâncias isoladas na forma pura de *Z. rhoifolium* (6-acetonildiidrocheleritrina, 6-acetonildiidroavicina, 6-acetonildiidronitidina, diidroavicina, diidrocheleritrina, cheleritrina, rhoifolina A, rhoifolina B, boconolina, gadaina e kaerofilina) houve formação de zonas de inibição para bactérias e para os fungos testados, conforme mostrado pelas Figuras 28 e 29.

Os resultados obtidos pela análise da atividade antimicrobiana estão representados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente e nas Figuras 28 e 29.

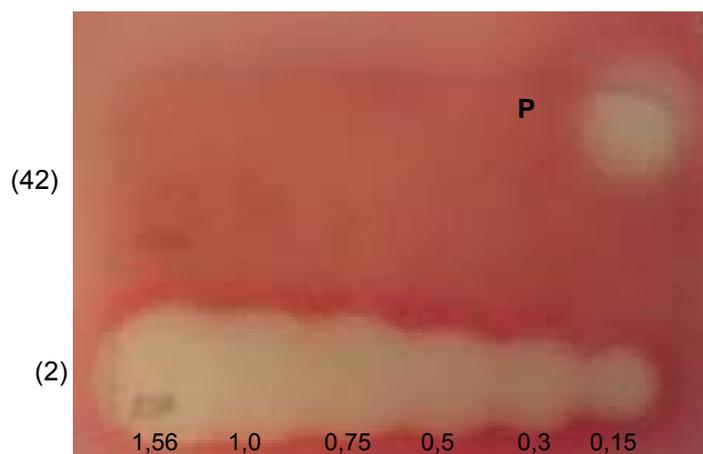


Figura 28: Quantidade Mínima ($0,15\mu\text{g}$) de cheleritina (2) para a inibição de *Escherichia coli*, sobre CCD.

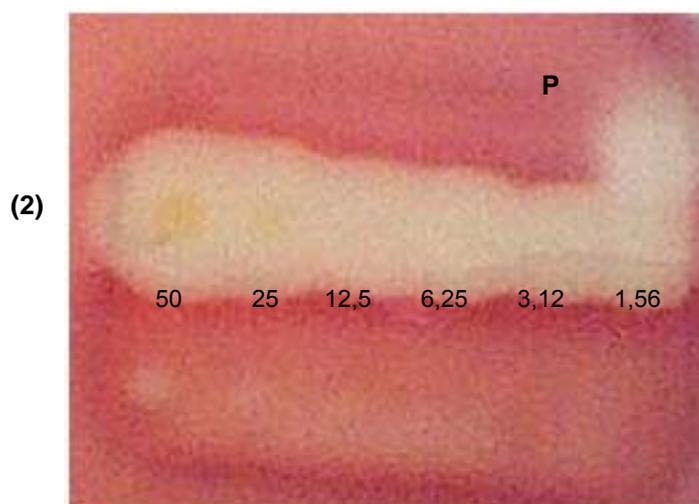


Figura 29: Quantidade Mínima ($1,56\mu\text{g}$) de cheleritina (2) para a inibição de *S. setubal* sobre CCD.

Na Tabela 12 são apresentadas as quantidades mínimas (μg) necessárias para a inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e na Tabela 13 as quantidades necessárias para a inibição do crescimento dos fungos, para todas as amostras puras isoladas de *Z. rhoifolium*, bem como das frações ácidas (etérea e hexânica) e básicas (hexânica e clorofórmica). Já as figuras mostram a inibição de alguns microrganismos testados, apenas para o alcalóide benzofenantridínico cheleritina, o qual apresenta ótimos resultados de atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

A QSA foi definida como a quantidade de substância no qual não houve crescimento bacteriano após 18 horas de incubação.

Tabela 12: Quantidade mínima (μg) requerida para inibição das bactérias testadas sobre CCD

Microrganismos Amostras	S. <i>aureus</i>	S. <i>epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. setubal</i>
6-Acetonildiidroavicina	1,56	3,12	25	3,12	1,56	12,5	3,12
6-Acetonildiidronitidina	1,56	1,56	12,5	1,56	3,12	25	3,12
Diidrocheleritrina	3,12	3,12	3,12	1,56	3,12	1,56	1,56
Diidroavicina	6,25	1,56	1,56	1,56	12,5	3,12	1,56
Rhoifolina A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rhoifolina B	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Boconolina	1,56	1,56	1,56	1,56	1,5 6	3,12	1,56
6-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Acetonildiidrocheleritrina							
Gadaina	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kaerofilina	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cheleritrina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Fração etérea ácida	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Fração hexânica ácida	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5	6,25	12,5
Fração Clorofórmica	25,0	25,0	NT	25,0	25,0	NT	50,0
Básica							
Fração Hexânica Básica	12,5	25,0	NT	12,5	12,5	NT	12,5
Extrato Bruto	100	25,0	NT	12,5	25,0	NT	12,5
Padrão ^a μg	0,7	0,7	0,8	0,5	0,5	0,6	0,7

^a Cloranfenicol

Tabela 13: Quantidade mínima (μg) requerida para inibição dos fungos testados sobre CCD

Microrganismos Amostras	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. neoformans</i>
6-Acetonildiidroavicina	NA	NA	NA	NA
6-Acetonildiidronitidina	NA	NA	NA	NA
Diidrocheleritrina	25,0	12,5	NA	NA
Diidroavicina	1,56	1,56	NA	NA
Rhoifolina A	NA	NA	NA	NA
Rhoifolina B	NA	NA	NA	NA
Boconolina	NA	NA	NA	NA
6-Acetonildiidrocheleritrina	NA	NA	NA	NA
Gadaina	NA	NA	NA	NA
Kaerofilina	NA	NA	NA	NA
Cheleritrina	12,5	0,75	3,12	0,3
Fração etérea ácida	NA	NA	NA	100
Fração hexânica ácida	NA	NA	NA	200
Fração Clorofórmica Básica	NT	NT	NT	NT
Fração Hexânica Básica	NT	NT	NT	NT
Extrato Bruto	NT	NT	NT	NT
Padrão Nistatina	2,43	3,24	4,05	2,43

Conforme pode ser visto nas Tabelas acima, as lignanas dibenzilbutirolactônicas Gadaina e Kaerofilina não apresentaram atividade contra nenhum dos microrganismos testados, assim como os alcalóides benzofenantridínicos Rhoifolina A, Rhoifolina B e 6-Acetonildiidrocheleritrina.

Já o alcalóide benzofenantridínico Diidrocheleritrina, que apresenta uma estrutura muito semelhante ao alcalóide 6-Acetonildiidrocheleritrina, com a única diferença que este não apresenta o substituinte acetnil na posição C-6, apresentou uma boa atividade contra todos os microrganismos testados, exceto para os fungos *C. dubliniensis* e *C. neoformans*

Outro alcalóide benzofenantridínico, boconolina, de estrutura muito semelhante aos alcalóides 6-Acetonildiidrocheleritrina e Diidrocheleritrina, porém com a diferença de que este apresenta um substituinte hidroximetil na posição C-6, apresentou ótima atividade contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo ativo na menor concentração testada (1,56 µg) para todas as bactérias, exceto para os fungos, para os quais não foi ativo. Como este alcalóide foi ativo na menor concentração, reduziram-se ainda mais as concentrações testadas. Desta forma, as análises foram repetidas e as seguintes concentrações foram aplicadas: 1,56; 1,0; 0,75; 0,5; 0,3 e 0,15 µg.

Após a revelação das cromatoplasas com sal de tetrazóleo, observou-se um ótimo resultado. O alcalóide boconolina foi ativo para *S. epidermidis* (0,5 µg), *E. coli* (0,5 µg) e *K. pneumoniae* (0,75 µg) e *P. aeruginosa* (0,5 µg). Estas pequenas concentrações para as quais a substância boconolina inibiu o crescimento foram menores que as concentrações utilizadas para o padrão Cloranfenicol.

Os alcalóides 6-Acetonildiidronitidina e 6-Acetonildiidroavicina inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém não foram ativos contra os fungos *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. dubliniensis* e *C. neoformans*, enquanto que o alcalóide Diidroavicina não apresentou atividade somente para os dois últimos fungos testados descritos acima.

O alcalóide Cheleritrina exibiu uma fascinante atividade antimicrobiana, tanto para fungos e bactérias. Este foi ativo mesmo na concentração de 0,15 µg para todas as bactérias testadas. Este resultado expressa uma ótima atividade, pois foi mais ativo que o padrão Cloranfenicol utilizado (0,7 µg).

De um modo geral as substâncias isoladas de *Z. rhoifolium*, apresentaram significativa atividade antimicrobiana, merecendo destaque a atividade apresentada pelos dois alcalóides benzofenantridínicos boconolina e cheleritrina. As amostras testadas foram mais ativas frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, do que se comparado à atividade antifúngica.

5.6.2-Determinação da CIM pelo Método de Microdiluição

Para a realização do ensaio de CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi selecionada uma amostra do alcalóide cheleritrina, pelo fato deste ter sido ativo nas menores concentrações testadas pelo método de Bioautografia. Além da determinação do CIM, estes testes também permitiram 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 14.

Tabela 14: Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Letal Mínima (CLM) do alcalóide cheleritrina

Microrganismos ^a	Cheleritrina		Padrão ^c
	CIM ^b	CLM ^b	CIM ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	12,5	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	12,5	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,5	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25792	25	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Salmonella setubal</i> ATCC 19796	12,5	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12,5	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	12,5	>100	3,12 x10 ⁻³
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	12,5	12,5	10,3 x10 ⁻³
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50	50	20,6 x10 ⁻³
<i>Candida dubliniensis</i> SM-26	6,25	6,25	10,3 x10 ⁻³
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 28952	6,25	6,25	10,3 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^b amostra em µg/mL, e padrões em mg/mL

^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

Pode-se observar que o alcalóide cheleritrina apresentou uma atividade moderada (12,5 a 25,0 µg/mL) contra todas as bactérias testadas, exceto para *Escherichia coli* (25 µg/mL). Como o valor de CIM para todas as bactérias foi bem inferior ao valor de CLM, o alcalóide cheleritrina apresenta propriedades bacteriostáticas. Já frente aos fungos, o alcalóide teve uma atividade mais

expressiva com CIM de 6,25 µg/mL para *Candida dubliniensis* e *Cryptococcus neoformans*, sendo menos ativo para *Candida albicans* com CIM de 50 µg/mL. O mesmo apresentou caráter fungicida, pois os valores de CIM coincidiram com os de CLM. Estudos biológicos realizados anteriormente com o alcalóide chelitrina¹⁴ reforçam os resultados obtidos neste trabalho. Este alcalóide teve a sua atividade biológica avaliada pelo método de microdiluição CIM (Concentração Inibitória Mínima) para *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Escherichia coli* (ATCC 9637), *Salmonella gallinarum* (ATCC 9184), *Klebsiella pneumoniae* AD (ATCC 10031), *Mycobacterium smegmatis* 607B (ATCC 607) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os resultados obtidos foram os seguintes: *Staphylococcus aureus* (12,5µg/mL), *Escherichia coli* (>100µg/mL), *Salmonella gallinarum* (>100µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* AD (12,5µg/mL), *Mycobacterium smegmatis* 607B (12,5µg/mL) e *Candida albicans* (6,25µg/mL).

5.6.3 Resultados da atividade antitumoral

As amostras foram testadas *in vitro* em nove linhagens de células tumorais: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI460 (pulmão), PCO3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR (ovário) e 786-0 (rim). Estes testes mostraram resultados preliminares indicativos de possível atividade citotóxica (antiproliferativa) para estas amostras, porém este estudo reforça a necessidade de novos ensaios toxicológicos, pois estas substâncias podem também provocar a morte de células normais do organismo humano.

As frações e substâncias puras isoladas, foram avaliadas em concentrações crescentes (0,25 a 250 µg/mL) e o controle positivo usado foi a doxorrubicina. Após a incubação das amostras por 48 horas, a atividade foi determinada através da dosagem de proteína pelo corante sulforradamina B. Com os dados obtidos a partir do teste colorimétrico, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração da substância teste.

A seguir serão avaliados os resultados referentes a cada amostra testada para as linhagens celulares, com base nos dados apresentados pelos gráficos.

Foram consideradas ativas as amostras que produziram atividade dependente da concentração e preferencialmente seletiva. Considera-se inibição de

crescimento (atividade citostática) acima de 50% (abaixo da linha tracejada do gráfico) e ou atividade citocida ou citotóxica, que corresponde aos valores de inibição abaixo da linha zero do gráfico.

5.6.3.1 Doxorrubicina-controle positivo

O quimioterápico doxorrubicina apresentou atividade citostática para quase todas as linhagens, exceto para NCI-460 (pulmão), PC0-3 (próstata), OVCAR (ovário), UACC-62 (melanoma) e 786-0 (rim), para as quais apresentou uma baixa atividade citocida somente na alta concentração 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

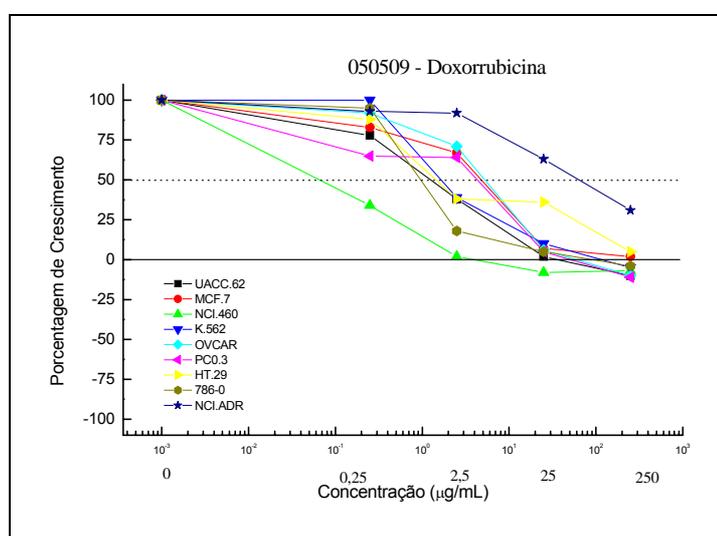


Figura 30: Resultado da atividade antitumoral para o controle Doxorrubicina

5.6.3.2 Alcalóide 6-Acetonildiidroavicina

O alcalóide benzofenantridínico 6-Acetonildiidroavicina teve boa atividade. Apresentou atividade citostática, na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todas as linhagens, exceto para a linhagem K-562 (leucemia). Pode-se dizer através deste resultado que esta linhagem celular não é sensível ao alcalóide 6-Acetonildiidroavicina. Esta amostra apresentou seletividade para as linhagens de células OVCAR (ovário), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (pulmão) e NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas). Na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o alcalóide 6-Acetonildiidroavicina produziu atividade citotóxica, ou seja, causou morte celular das linhagens celulares acima citadas.

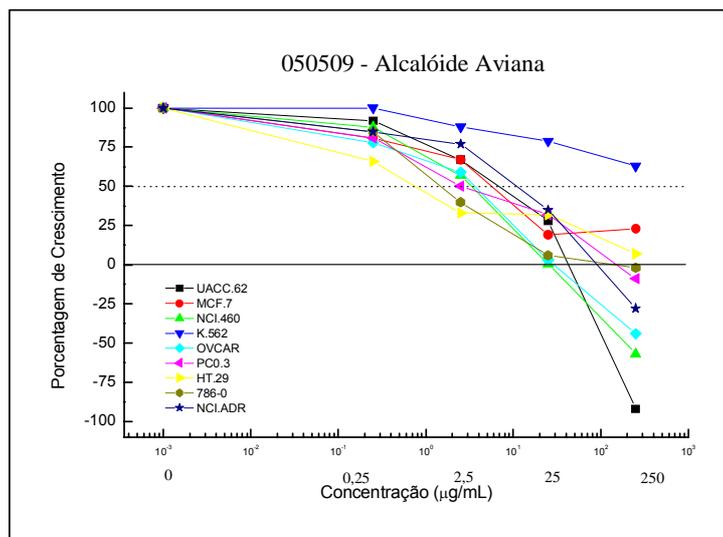


Figura 31: Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide 6-Acetonildiidroavicina

5.6.3.3 Alcalóide boconolina

O alcalóide boconolina apresentou um perfil semelhante ao descrito para o 6-Acetonildiidroavicina, porém exibiu uma seletividade maior para as linhagens de células de PC0-3 (próstata), 786-0 (rim) e UACC-62 (melanoma). Este apresentou atividade citostática para apenas três linhagens, enquanto que atividade citocida foi observada para as demais culturas celulares, na maior das concentrações.

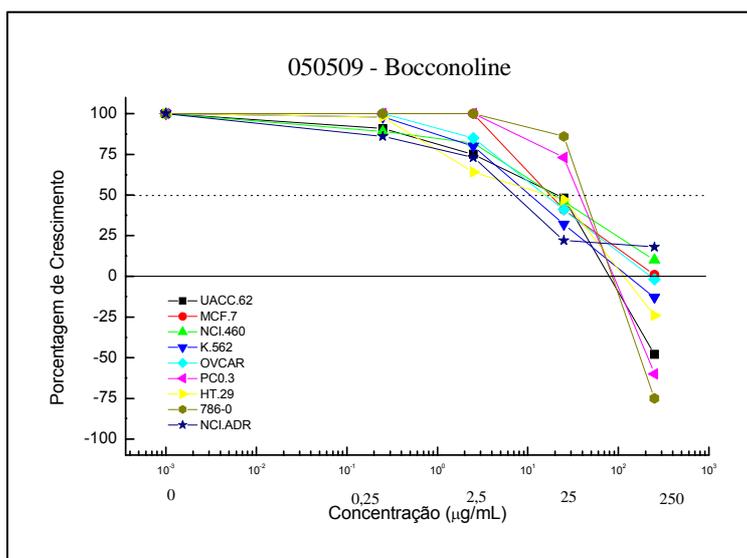


Figura 32: Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Bocconolina

5.6.3.4 Alcalóide Diidrocheleritina

Este alcalóide mostrou uma boa atividade antitumoral, porém não apresentou seletividade frente às linhagens celulares. Na maior das concentrações exibiu atividade citocida para todas as células tumorais humanas, exceto para UACC-62 (melanoma), que para a qual apenas foi citostática.

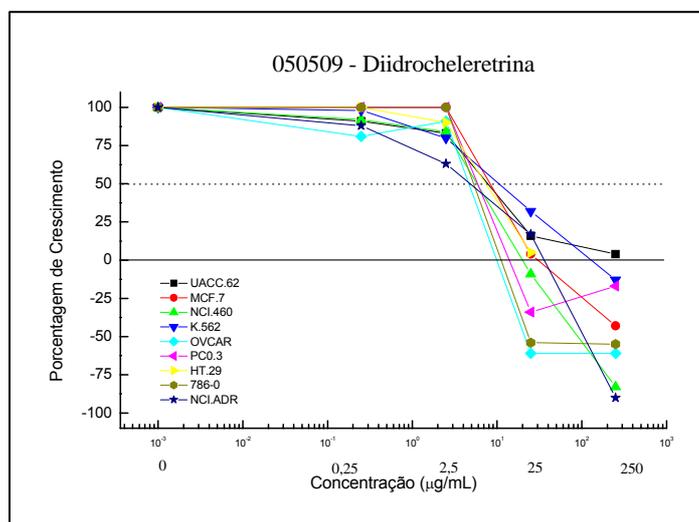


Figura 33: Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Diidrocheleritina

5.6.3.5 Zantoxilina

Apresentou atividade pouco significativa e com baixa seletividade. Na concentração de 250 µg/mL exibiu atividade citostática para todas as linhagens celulares tumorais humanas.

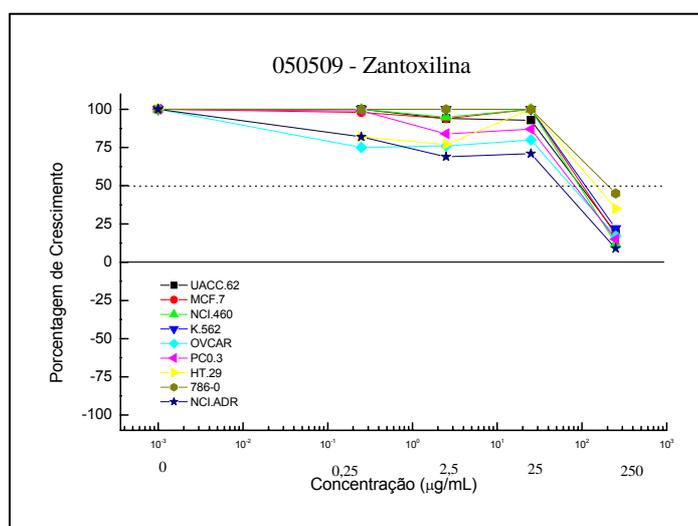


Figura 34: Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Zantoxilina

5.6.3.6 Diidroavicina

Apresentou um perfil semelhante ao demonstrado pelo alcalóide zantoxilina, exercendo apenas atividade citostática para todas as linhagens celulares tumorais, exceto para UACC-62 (melanoma), na maior das concentrações. Teve certa seletividade para as linhagens de OVCAR (ovário) e H7-29 (cólon).

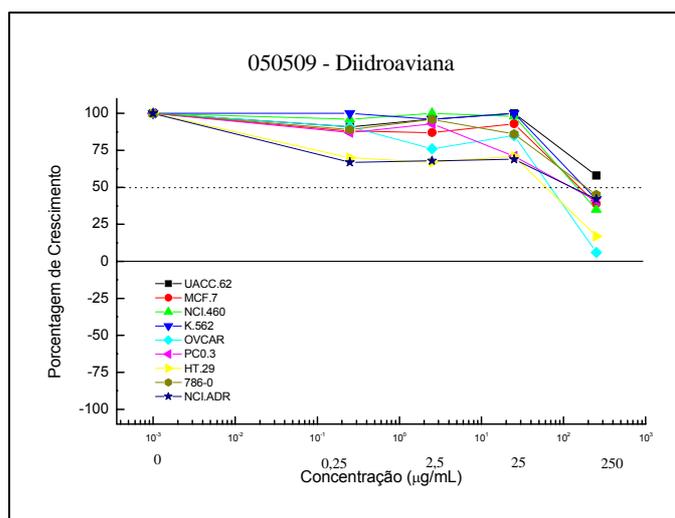


Figura 35: Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Diidroavicina

5.6.3.7 Cheleritrina

Este alcalóide praticamente não exerceu atividade quando testado nas menores concentrações (0-25 µg/mL), porém na maior concentração apresentou atividade citostática e citocida, com uma seletividade maior para a linhagem de célula leucêmica (K-562).

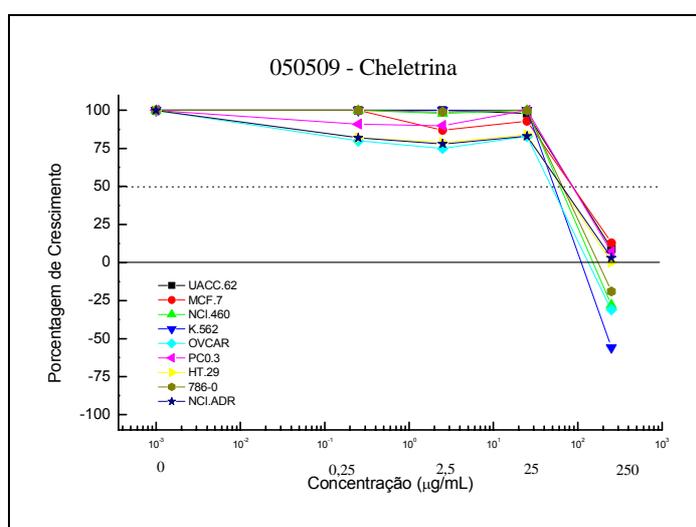


Figura 36: Resultado da atividade antitumoral para o alcalóide Cheleritrina

5.6.3.8 Lignana Kaerofilina

Apresentou atividade pouco significativa, exibindo atividade citostática somente para a linhagem de 786-0 (rim).

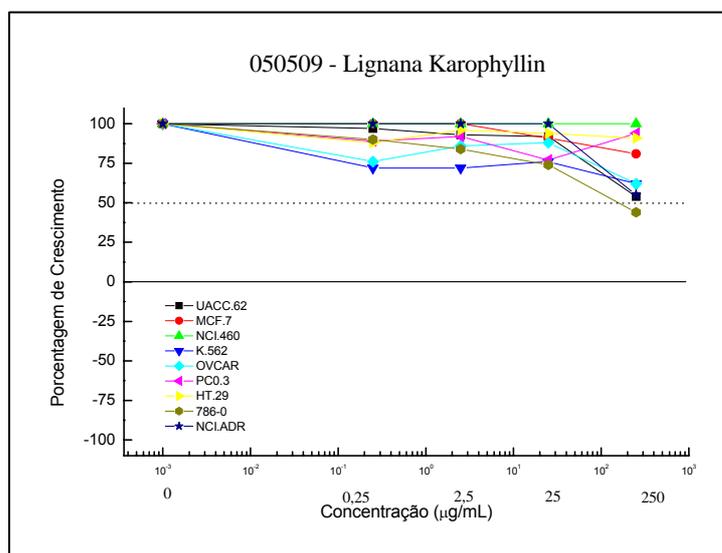


Figura 37: Resultado da atividade antitumoral para a lignana kaerofilina

5.6.3.9 Lignana Gadaina

Já esta lignana, a qual pertence a mesma classe da lignana acima citada, com apenas uma pequena diferença estrutural, apresentou atividade citostática para todas as linhagens celulares na maior das concentrações, mas não teve uma boa seletividade.

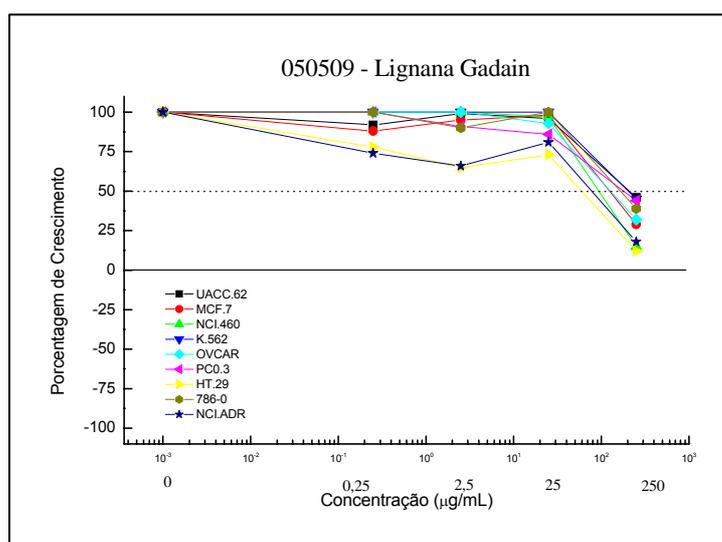


Figura 38: Resultado da atividade antitumoral para a lignana Gadaina

As frações tanto ácidas como básicas apresentaram ótima atividade antitumoral, inibindo tanto o crescimento celular como também provocando a morte celular para as diferentes linhagens de células tumorais humanas.

5.6.3.10 Fração etérea ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

Esta amostra apresentou atividade citocida para todas as culturas celulares, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, exceto para PCO-3 (próstata). Já para a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ causou a morte de todas as linhagens celulares, o que demonstra uma ótima atividade, porém com pouca seletividade.

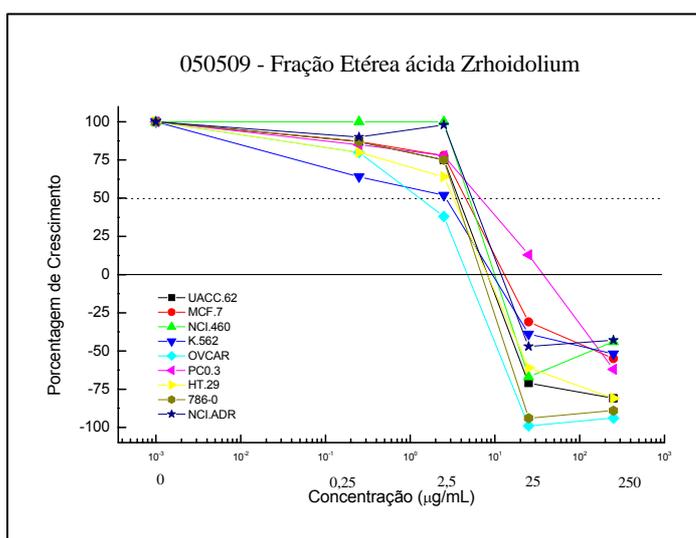


Figura 39: Resultado da atividade antitumoral para a fração etérea ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

5.6.3.11 Fração hexânica ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

Esta fração apresentou atividade com boa correlação concentração-efeito e seletividade. Como observada para a fração anterior, apresentou atividade citostática para todas as linhagens celulares, exceto para MCF-7 (mama), K-562 (leucemia) e UACC-62 (melanoma). Para a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ ocasionou morte celular de todas as culturas celulares, demonstrando uma alta atividade.

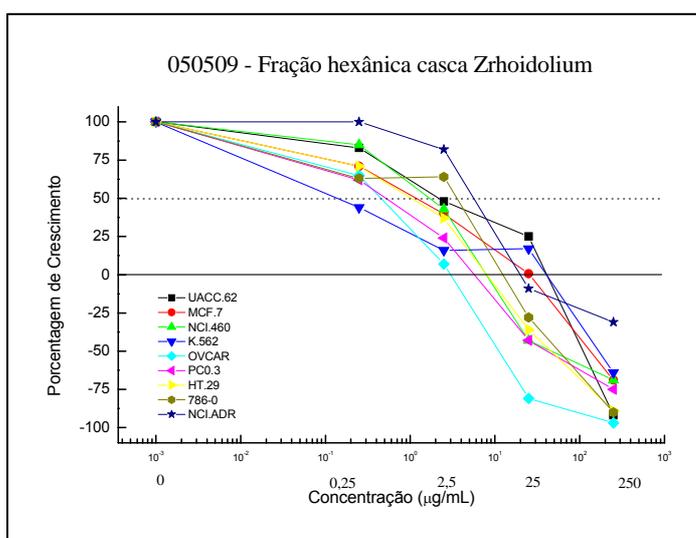


Figura 40: Resultado da atividade antitumoral para a fração hexânica ácida da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

5.6.3.12 Fração clorofórmica básica da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

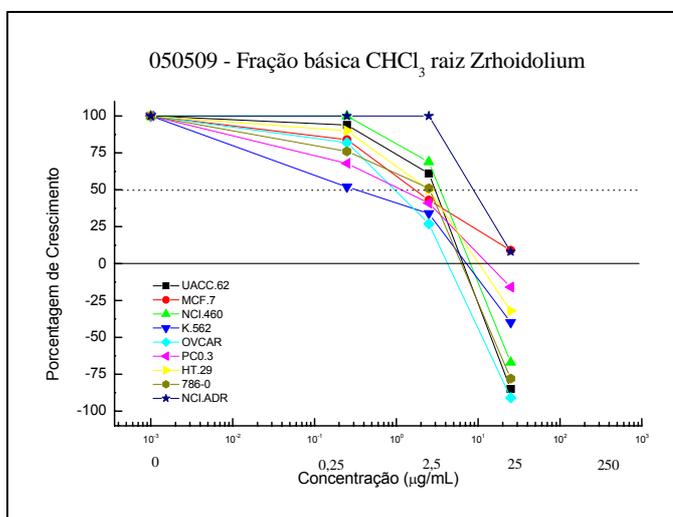


Figura 41: Resultado da atividade antitumoral para a fração clorofórmica básica da casca da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*

5.7 Teste de Atividade Antioxidante pelo método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram as mesmas utilizadas para o teste de Bioautografia e análise da atividade antitumoral: extrato bruto de *Z.*

rhoifolium, as frações hexânica e clorofórmica básica, bem como as frações hexânica e etérea ácida e as substâncias isoladas na forma pura de *Z. rhoifolium* (6-acetonildiidrocheleritrina, 6-acetonildiidroavicina, cheleritrina, diidroavicina, diidrocheleritrina, rhoifolina A, rhoifolina B, boconolina, gadaina, kaerofilina e sesamina). Como antioxidante padrão foi utilizado o flavonóide quercetrina, sendo aplicada juntamente com as amostras, na concentração de 2 mg/mL. Este padrão foi utilizado por ser um padrão do qual se dispõem de grandes quantidades.

As substâncias 6-acetonildiidrocheleritrina, cheleritrina, 6-acetonildiidroavicina, 6-acetonildiidronitidina, rhoifolina A, rhoifolina B, boconolina, gadaina, kaerofilina e sesamina não foram ativos como trapeadores do radical livre DPPH, porém os alcalóides diidroavicina, diidrocheleritrina e as frações hexânica e etérea ácidas apresentaram boa atividade. Já as frações hexânica e clorofórmica básica exibiram moderada atividade. O alcalóide boconolina apresentou mínima atividade

6. Conclusões

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho, e analisando-se os métodos desenvolvidos, juntamente com os resultados obtidos pode-se concluir que:

❖ Foram identificados quatro alcalóides, todos isoquinolínicos, da classe dos alcalóides benzofenantridínicos, sendo que todos já foram isolados anteriormente de espécies da mesma família (6-Acetonildiidrocheleritrina, Cheleritrina, Diidrocheleritrina e Bocconolina), juntamente com outras três lignanas, a Sesamina e duas lignanas pertencentes à classe dibenzilbutirolactônica kaerofilina e Gadaina. Ambas já foram descritas na literatura, porém são isoladas pela primeira vez de *Zanthoxylum rhoifolium*;

❖ Através dos ensaios de atividade antimicrobiana verificou-se que os alcalóides benzofenantridínicos foram bastante ativos, principalmente contra bactérias. Já as lignanas Gadaina e Kaerofilina, pertencentes à classe dibenzilbutirolactônica não apresentaram atividade antimicrobiana;

❖ Os alcalóides benzofenantridínicos Cheleritrina e Bocconolina apresentaram ótima atividade antimicrobiana. O alcalóide Cheleritrina foi ativo para todos os microrganismos testados, em concentrações menores (0,15 µg) que aquelas aplicadas para o padrão Cloranfenicol (0,7 µg), para bactérias e nistatina para os fungos, ou seja, ambos foram mais ativos que os padrões usados;

❖ Através de uma comparação estrutural entre os alcalóides Bocconolina, Diidrocheleritrina, 6-Acetonildiidrocheleritrina e Cheleritrina, observa-se que o substituinte hidroximetil ligado ao C-6 do alcalóide Bocconolina, bem como a presença do átomo de nitrogênio quaternário do alcalóide cheleritrina, são responsáveis pela atividade antimicrobiana exibida por ambos os alcalóides. Já o alcalóide 6-Acetonildiidrocheleritrina, que apresenta o mesmo esqueleto benzofenantridínico, porém com um substituinte acetil na posição C-6, não apresentou nenhuma atividade frente aos microrganismos testados. O alcalóide Diidrocheleritrina, o qual não possui nenhuma substituição na posição C-6 foi ativo frente a bactérias e fungos, o que evidencia a contribuição do esqueleto benzofenantridínico na atividade antimicrobiana;

❖ Através do teste de atividade antioxidante, pelo método de DPPH, observou-se que as substâncias puras isoladas de *Zanthoxylum rhoifolium*

não apresentaram atividade como trapeadores do radical livre DPPH, exceto os alcalóides Diidroavicina e Diidrocheleritrina. Já as frações ácidas hexânica e etérea apresentaram boa atividade quando comparado à atividade exibida pelas frações básicas, hexânica e clorofórmica, a qual foi moderada;

❖ Os resultados referentes à atividade antitumoral demonstraram que a classe dos alcalóides benzofenantridínicos foi a que se mostrou mais ativa para quase todas as linhagens celulares tumorais humanas;

❖ Em culturas de células tumorais humanas, as frações e substâncias puras inibiram o crescimento e provocaram a morte de diversas linhagens celulares. Estes resultados reforçam a necessidade de estudos toxicológicos, pois essas substâncias podem também provocar a morte de células normais do organismo humano;

❖ Os estudos preliminares de atividade biológica realizados neste trabalho corroboram para o conhecimento científico desta espécie e sua utilização na medicina popular, na forma de chás, contra uma série de enfermidades.

7. Bibliografia

- 1-Newman, D.J.; Craag, G.M. and Snader , K.M., *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215-234.
- 2-Gonzaga, A.W.; Morel, A.F.; Weber, D.A.; Dalcol, I.I.; Giacomelli, R.S.; Hoelzel, S.C.S., *Planta Medica*, **2003**,69(4), 371-374.
- 3-Gonzaga, A.W.; Morel, A.F.; Burrow, A. R.; Mössmer-Maichle, C.; Strähle,, *Journal Acta Cryst.*, **2002**, C58 606-607.
- 4-Morel, A.F.; Moura, N.F.; Hoelzel, S.C.S.; Simionato, E.; Machado, E.C.; Zanatta, N.; Porto, C., *Planta Medica*, **2002**, 68(7), 631-634.
- 5-Morel, A.F.; Flach, A.; Gregel, B.; Simionato, E.; Silva, U.F.; Zanatta, N.; linares, C.E.B.; Alves, S.H., *Planta Medica*, **2002** 68(9), 836-838.
- 6-Morel, A.F.; Ribeiro, H.B.; Moura, N.F.; Ethur, E.M.; Machado, E.C.; Zanatta, N. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 473-477.
- 7-Moura, N.F.; Ribeiro, H.B., Machado, E.C.S.; Ethur, E.M.; Zanatta, N.; Morel, A.F., *Phytochemistry*, **1997**, 46, 1443-1446.
- 8-Morel, A.F.; Menezes, A.S.; Mostardeiro, M.A.; Zanatta, N., *Phytochemistry*, **1995** ,38(3), 783-786.
- 9-Moreira,F. *Plantas que curam: Cuide da sua saúde através da natureza*. São Paulo, **1996**, Ed. Hemus LTDA, 5ª edição, 183.
- 10-Lorenzi, H., *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. São Paulo,**1992**, Ed. Platurum, , p.312.
- 11-Morel, A.F., Moura, N.F., Giacomelli, S.R., Machado, E.C., Silveira, C.F.S., Bittencourt, C.F., *Fitoterapia*, **1998**, LXIX (3), 271-272.
- 12-Odebiji, O.O.; Sofowora, E.A., *Planta Medica*, **1979**, 36, 204.
- 13-Godowski, K.C., *Journal Clin. Dentistry*, **1989**, 1, 96.
- 14-Mitscher, L.A., Park, Y., Clark, D.; Clark, G.W. 3rd, Hammesfahr, P.D., Wu, W.N., Beal, J.L., *Journal Natural Products*, **1978**, 41(2), 145-150.
- 15-Lenfeld, J., Kroutil, M., Marsalek, E., Slavik, J., Preininger, V.; Simanek, V., *Planta Medica*, **1981**, 43(2), 161-165.
- 16-Hiller, K.O., Ghorbani, M.; Schilcher, H.; **1998**, 64(8), 758-760.
- 17-Cordell, G.A.; Farnsworth, N.R., *Heterocycles*, **1976**, 4, 393.

- 18-Zee-Cheng, R.K.Y.; Cheng, C.C., *Journal Medicinal Chemistry*, **1975**, 18, 66.
- 19-Stermitz, F.R., Gillespie, J.P., Amoros, L.G., Romero, R., Stermitz, T.A., Larson, K.A., Earl, S.; Ogg, J.E., *Journal Medicinal Chemistry*, **1975**, 18, 708.
- 20-Tin-Wa, M., Bell, C.L., Bevelle, C., Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R., *J. Pharm. Science*, **1974**, 63, 1476-1477.
- 21-Rennó, L.R., *Pequeno Dicionário Etimológico das Famílias Botânicas*, **1963**, Imprensa UFMG.
- 22- Joly, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia*. São Paulo: Ed. Nacional, 4ª edição, **1977**.
- 23-Michael, J.P., *Natural Product Reportt*, **1995**, 77.
- 24-James, E.R. et al. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Ed. Premier, **1997**, p. 163-208.
- 25-Fish, F.; Watermann, P.G., *Phytochemistry*, **1971**, 10, 3322.
- 26-Kuck, A.M.; Albonico, S.M.; Deulofeu, V. 1967 *Phytochemistry*, 6, 1541.
- 27-Chaib, F.; Queiroz, E.F.; Ndjoko, K.; Diallo, D.; Hostettmann, K., *Planta Medica*, **2003**, 69(4), 316-320.
- 28-Lakshmi, V.; Raj, K.; Kapil, R.S., *Phytochemistry*, **1989**, 28(3), 943-945.
- 29-Sarker, S.D.; Armstrong, J.A.; Watermann, P.G., *Phytochemistry*, **1995**, 39(4), 801-804.
- 30-Stermitz, F.R.; Caolo, M.A.; Swinehart, J.A., *Phytochemistry*, **1980**, 19, 1469-1472.
- 31-Vaquete, J.; Pousset, J.L.; Paris, R., *Phytochemistry*, **1974**, 13, 1257-1259.
- 32-Simanék, V. *The Alkaloids*, Academic Press, **1985**, New lork, V.26, 185.
- 33-Krane, B.D., et al., *Journal Natural Products*, **1984**, 47(1), 1-43.
- 34-Vlietinck, A. J.; Caballero-George, C. et al., *Planta Medica*, **2002**, 68, 770-775.

- 35-Manske, R. H. F. *The Alkaloids*, New York, **1954**, Academic Press, v.25, 178-198.
- 36-Kang, S.J., Long, H.P., Lim, M.H., Kim, H.Y.; Blaschke, G., *Archives of Pharmacal Research*, **2003**, 26(2), 114-119.
- 37-Ng, M.K., Gray, I. A.; Watermann, G.P., *Phytochemistry*, **1987**, 26, 3251-3254.
- 38-Ajith, P.K.N., Veranja, K., Bandara, B.M.R., Viajaya, K., Tsutomu, N., Masatoshi, N., Akira, I., Tillekeratne, L.M.V., Wijesundara, D.S.A.; Gunatilaka, A. A. L., *Phytochemistry*, **2001**, 56, 857-861.
- 39-Watermann, G.P.; Khalid, S.A., *Biochemical Systematics and Ecology*, **1981**, 9, 45-51.
- 40-Navarro, V.; Delgado, G., *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 66, 223-226.
- 41-Sharma, N.P., Shoeb, A. Kapil, S.R.; Popli, P.S., *Phytochemistry*, **1981**, 20(12), 2781-2783.
- 42-Fish, F., Gray, I.A.; Watermann, G.P., *Phytochemistry*, **1975**, 14(3), 841-842.
- 43-Cushman, M., Mohan, L., Smith, E. C. R., *Journal Medicinal Chemistry*, **1984**, 27, 544.
- 44-Blaskó, G., Cordell, G.A., *J. Heterocyclic Chem.*, **1989**, 26, 1601.
- 45-Gillespie, J.P., Amoros, L.G., Stermitz, F.R., *Journal Organic Chemistry*, **1974**, 22(39), 3239.
- 46-Arthur, H.R., Hul, W.H., Ng, Y.L., *Journal Chemistry Society*, **1959**, 1840.
- 47-Boulware, R.T., Stermitz, F.R., *Journal Natural Products*, **1981**, 44, 200.
- 48-Ninomiya, I., Naito, T., Ishii, H., *Heterocycles*, **1975**, 3, 307.
- 49-Nakanishi, T., Suzuki, M., Saimoto, A., Kabasawa, T., *Journal Natural Products*, **1999**, 62, 864-867.
- 50-Stermitz, F.R., Larson, K.A., Kim, D.K., *Journal Medicinal Chemistry*, **1973**, 16, 939-940.

- 51- Caolo, M.A., Stermitz, F.R., *Heterocycles*, **1979**, 12, 11-15.
- 52- Sethi, M.L., *Journal Natural Products*, **1979**, 42 (2), 18
- 53- Couillerot, E., Caron, C., Comol, L., *Phytochemistry*, **1994**, 37(2) 425.
- 54- Chaturvedy, M.M., Kumar, A., Damay, B.G., Chainy, G.B.N., Agarwal, S., Aggarwal, B.B., *Journal Biological Chemistry*, **1997**, 272(48), 30129-30134.
- 55- Macrae, W.D.; Towers, G.H.N., *Phytochemistry*, **1984**, 23, 1207-1220.
- 56- Umezawa, T. Lignans. In. *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*; Higuchi, T., Ed. Springer-Verlag: Berlin, Germany, **1997**, 181-194.
- 57- Chu, A., Dinkova, A., Davin, B.L., Bedgar, L.D., Lewis, G.N., *Journal of Biological Chemistry*, **1993**, 268, 27026-27033.
- 58- Ayres, D.C., and Loike, J.D. *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, **1990**, Cambridge.
- 59- Schröder, H.C.; Mertz, H.; Steffen, R.; Müller, W.E.G.; Sarin, P.S.; Trumm, S.; Schulz, J.; Eich, E. Z., *Naturforsch. Sect. C.*, **1990**, 45, 1215-1221.
- 60- Bastos, J.K., Carvalho, J.C.T., Souza, G.H.B., Pedrazzi, A.H.P., Sarti, S.J., *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, 75, 279-282.
- 61- Henning, P., Tese de Doutorado, **1985**, Universidade de Tübingen.
- 62- Ludwig, C.H., Nist, B.J., McCarthy, J.L., *Journal Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1186.
- 63- Banerji, J., Das, B., Chatterjee, A., Shoolery, J.N., *Phytochemistry*, **1984**, 23, 2323-2327.
- 64- Oechslim, S.M., König, G.M., Oechslim, M. K., Wright, A.D., Kinghorn, A.D., Sticher, O., *Journal Natural Products*, **1991**, 54, 519-524.
- 65- Khetwal, K.S., Harbola, S., Cai, P., Snyder, J.K., Newton, M.G., Pelletier, S.W., Joshi, B.S., *Journal Natural Products*, **1993**, 56 (3), 318-328.

- 66-Ishii, H., Hosoya, K., Takao, N., *Tetrahedron Letters*, **1971**, 26, 2429-2432
- 67- Calderwood, J.M., Finkelstein, N., Fish, F., *Phytochemistry*, **1970**, 9, 675.
- 68-Desai, P.D., Govindachari, T.R., Nagarajan, K., Viswanatham, N., *Indian Journal Chemistry*, **1967**, 5, 41.
- 69-*Food and Drugs Administration: Code of Federal Regulations*. Cap. 21, 300-499, **1991**.
- 70-Rahalison, L.; Hamburger, M.O.; Hostettmann, K.; Monod, M., Frenk, E., *Phytochemical Analysis*, **1991**, 2, 199-203.
- 71-Hamburger, M.O.; Hostettmann, K., *Phytochemistry*, **1991**, 30 (12), 3864-3874.
- 72-NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5th edition , NCCLS document M7-A5, **2000**.
- 73-Molineux, P., *Songklanakarín Journal of Science Technology*, **2003**, 26(2), 211-219.
- 74-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**.
- 75-Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A .; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J., Boyd, M., *Journal of the National Cancer Institute*, **1991**, 83(11), 757-766.
- 76-Slavick, J., Slavikova L., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1977**, 42, 2686.
- 77-MacLean, D.B., Gracey, D.E.F., Saunders, J.K., Rodrigo, R., Manske, H.F., *Can. J. Chem.*, **1968**, 47, 1951.
- 78-Itokawa, H., Ikuta, A., Tsutsui, N., Ishiguro, I., *Phytochemistry*, **1978**, 17, 839-840.
- 79-Chen, I.S., Wu, S.J., Leu, Y.L., Tsai, I.W., Wu, T.S., *Phytochemistry*, **1996**, 42(1), 217-219.

- 80-Ishii, H., Ishikawa, T., Akaike, M., Tohjoh, T., Toyoki, M., Ishikawa, M., Chen, I.S., *Yakugaku Zasshi*, **1984**, 104(10), 1030-1042.
- 81-Martínez, M.F.J., Padilla, M.I.I., Hernández, C.B., Pérez, G.R.M., García, B.E.V., *Journal Chem. Crystallography*, **2002**, 32, 63-68.
- 82-Decaudain, N., Kunesch, K., Poisson, J., *Phytochemistry*, **1974**, 13,505.
- 83-Fuganti, C & Stefano, S., *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 5609-10
- 84-Arruda, M.S. et. al., *Biochemical Systematic and Ecology*, **1992**, 20(2), 173.
- 85-Barton, D. H. et. al., *J. Chem. Soc.*, **1969**, 807.
- 86-Watermann, P.G., Gray, A.I., Deyun, K., *Biochemical Systematic and Ecology*, **1996**, 24(1), 87-88.
- 87-Goodman , L.S. & Gilman, A., "*The Pharmacological Basis of Therapeutic*", **1990**, 8^aed. 1018.