



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise Fitoquímica e Estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e
de inibição da enzima Acetilcolinesterase da espécie
Helietta apiculata Benth**

Tanize Stuker Fernandes

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil, 2011

Análise Fitoquímica e Estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima Acetilcolinesterase da espécie *Helietta apiculata* Benth

por

Tanize Stuker Fernandes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas 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

2011

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

**Análise Fitoquímica e Estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição
da enzima Acetilcolinesterase da espécie *Helietta apiculata* Benth**

Elaborada por
Tanize Stuker Fernandes

Como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE em QUÍMICA**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel - UFSM

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

Prof^a. Dr^a. Graciela Maldaner – URCAMP

Santa Maria – RS, julho de 2011.

“Se não morre aquele que planta uma árvore,
E não morre aquele que escreve um livro
Com mais razão não deve morrer o educador
Pois ele semeia nas almas e escreve nos espíritos.”

Berthold Brecht

A Deus por me dar forças para
que eu não desistisse de meus objetivos.

A meus pais, Joseni e Marisa,
pelo exemplo, incentivo, apoio
e carinho ao longo desta etapa.
E aos meus irmãos, Tiéle e Thiago,
pelo apoio e alegrias compartilhadas.

Ao meu namorado, Vanderlã,
pela paciência, carinho, apoio e
amor, sempre dedicados.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel,
meu sincero agradecimento pela sua
orientação, dedicação, paciência,
estímulo e amizade, prestadas
no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

As professoras, Dr^a. Ionara Irion Dalcol e Dr^a. Graciela Maldaner, pelo auxílio para a melhoria deste trabalho como membros da banca examinadora.

A Luciana Adolpho, Carolina Quattrin de Oliveira e Alexandre Tiburski Neto, pela realização das atividades.

A Marcelo Pedroso e Vinicius Ilha pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Dr. Ubiratan Flores da Silva pela ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Robert Alan Burrow pelas análises de difração de raios-X.

A Gabriele do Carmo pela ajuda durante seu trabalho de Iniciação Científica.

Aos colegas de laboratório, Carolina, Caroline, Karine, Patrícia, Janice, Denise, Graciela, Graciane, Marcelo, Alexandre, Vinicius, Alessandra, Juliana, Luciana, Nalin, pela amizade e convivência.

A Coordenação de Pós-Graduação em Química da UFSM que proporcionou a realização deste curso.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

As colegas de apartamento, Tiéle, Leila, Luana e Fabia, pela convivência e momentos de alegrias.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, o meu
Muito Obrigada.

RESUMO

Análise Fitoquímica e Estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima Acetilcolinesterase da espécie *Helietta apiculata* Benth

Autor: Tanize Stuker Fernandes

Orientador: Ademir Farias Morel

A investigação fitoquímica do extrato bruto metanólico e frações da cascas do caule de *Helietta apiculata* Benth, Rutaceae, levou ao isolamento de quatro alcalóides furoquinolínicos (γ -fagarina (**9**), Maculina (**24**), Kokusaginina (**17**) e Isodictamina (**11**)), de um limonóide conhecido como Limonina (**42**), uma cumarina denominada Chalepina (**27**), dois derivados do ácido cinâmico em mistura, 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (**55**), além de uma mistura de três neolignanas (**T26**). Através da hidrodestilação, fez-se também, a extração dos óleos essenciais da espécie *H. apiculata* nas diferentes estações do ano, visando à comparação da constituição química do mesmo quanto à sazonalidade. Sendo que os principais constituintes presentes foram o elemeno, o γ -elemol, o elemol e o espatulenol. Ao passo que limoneno não foi biosintetizado pela planta durante a primavera, estando presente em quantidades apreciáveis no verão, outono e inverno. O extrato bruto, as frações e as substâncias isoladas foram testadas quanto à suas atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima Acetilcolinesterase. Quando testadas frente a agentes microbianos, os metabólitos γ -fagarina, limonina, isodictamina, derivados do ácido cinâmico e a mistura de neolignanas demonstraram relativa atividade antimicrobiana. Ao se testar o potencial antioxidante através de screening as substâncias γ -fagarina, maculina, isodictamina e as neolignanas se mostraram as mais ativas como antioxidantes. Quando testada a capacidade de inibição da enzima Acetilcolinesterase nenhuma das substâncias isoladas se mostrou com potencial inibidor, visto que as mesmas não superaram o valor limite de pMIQ de 10,5 estabelecido como valor necessário para uma substância ser considerada inibidora de tal enzima.

ABSTRACT

Analysis and Phytochemical Study of antimicrobial activity, antioxidant and inhibition of the enzyme acetylcholinesterase species *Helietta apiculata* Benth

Author: Tanize Stuker Fernandes

Academic Advisor: Ademir Farias Morel

The phytochemical research of crude extract of the bark metanólico and stem fractions of *Helietta apiculata* Benth, Rutaceae, led to the isolation of four alkaloids furoquinoline (γ -fagarine (**9**), Maculine (**24**), Kokusaginine (**17**) and Isodictamnine (**11**)), a limonoids known as Limonin (**42**), a coumarin called Chalepin (**27**), two derivatives of cinnamic acid in mixture, 4-hydroxy-3,5-dimetoxicinamato methyl (**69**) and 3, 4, 5- trimetoxicinamato methyl (**55**), In addition to a mixture of three neolignans (**T26**). Through the hidrodestilação was the extraction of essential oils of the species *H. apiculata* in different seasons, with the aim of comparison of chemically the same as seasonality. Being that the main constituents were the gifts, the elemeno, γ -elemol, elemol and espatulenol. While limonene was not biosynthesized during the spring, being present in significant quantities in summer, autumn and winter. The crude extract, fractions and isolated substances were tested as to their antimicrobial, antioxidant activity and inhibition of the enzyme Acetylcholinesterase. When tested against microbial agents, metabolites γ -fagarine, limonin, isodictamnine, derivatives of cinnamic acid and neolignans mixture on demonstrated antimicrobial activity. When testing the antioxidant potential through screening substances γ -fagarine, isodictamnine and maculine, neolignans were more active as antioxidants. To test the ability of inhibition of the enzyme Acetylcholinesterase none of isolated proved with substantial potential inhibitor, since they do not have overcome the pMIQ threshold value of 10,5 established as required value for a substance to be considered such inhibiting enzyme.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cascas do caule de <i>Helietta apiculata</i> Benth..... | 26 |
| Figura 2. Folhas e flores de <i>Helietta apiculata</i> Benth..... | 26 |
| Figura 3: Reação do teste colorimétrico para revelação dos inibidores da AChE | 59 |
| Figura 4: Espectro de RMN de ^1H de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 65 |
| Figura 5: Espectro de RMN de ^1H expandido de Limonina (42) em DMSO a 400 MHz..... | 66 |
| Figura 6: Espectro de RMN COSY de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 67 |
| Figura 7: Espectro de RMN de ^{13}C de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 68 |
| Figura 8: Espectro de RMN de ^{13}C expandido de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 69 |
| Figura 9: Espectro de RMN de ^{13}C expandido de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 69 |
| Figura 10: Espectro de RMN Dept 135 de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 70 |
| Figura 11: Espectro 2D HETCOR de Limonina (42) em DMSO a 400MHz | 71 |
| Figura 12: Espectro 2D HETCOR expandido de Limonina (42) em DMSO a 400MHz..... | 71 |
| Figura 13: Espectro 2D HETCOR expandido de Limonina (42) em DMSO a 400MHz..... | 72 |
| Figura 14: Difração de raios-X da Limonina (42)..... | 72 |
| Figura 15: Espectro de RMN de ^1H de γ -fagarina (9) em CDCl_3 a 400MHz | 76 |
| Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C de γ -fagarina (9) em CDCl_3 a 100MHz | 77 |
| Figura 17: Espectro de RMN de ^1H da Chalepina (27), em CDCl_3 a 200MHz | 79 |
| Figura 18: Espectro 2D COSY da chalepina (27) em CDCl_3 a 200 MHz..... | 80 |
| Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C da Chalepina (27) em CDCl_3 a 50MHz | 81 |
| Figura 20: Espectro de RMN Dept 135 da Chalepina (27) em CDCl_3 a 50 MHz..... | 82 |
| Figura 21: Espectro de RMN de ^1H de Kokusaginina (17) em CDCl_3 a 200MHz | 85 |
| Figura 22: Espectro 2D COSY expandido de Kokusaginina (17) em CDCl_3 a 200MHz..... | 86 |
| Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C de Kokusaginina (17) em CDCl_3 a 100 MHz | 87 |
| Figura 24: Espectro 2D HMQC de Kokusaginina (17) em CDCl_3 a 100 MHz | 88 |
| Figura 25: Espectro 2D HMBC de Kokusaginina (17) em CDCl_3 a 100 MHz | 89 |

| | |
|--|-----|
| Figura 26: Espectro de RMN de ^1H de Maculina (24) em CDCl_3 a 200MHz | 91 |
| Figura 27: Espectro 2D COSY expandido de Maculina (24) em CDCl_3 , a 400 MHz | 92 |
| Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C de Maculina (24) em CDCl_3 a 50 MHz | 93 |
| Figura 29: Espectro de RMN Dept 135 da Maculina (24) em CDCl_3 a 50 MHz..... | 93 |
| Figura 30: Espectro 2D HMQC expandido da Maculina (24) em CDCl_3 , a 400..... | 94 |
| Figura 31: Cromatograma da mistura de derivados do ácido cinâmico, (69) e (55)..... | 96 |
| Figura 32: Cromatograma de massas de 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (55)..... | 96 |
| Figura 33: Cromatograma de massas de 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (69)..... | 97 |
| Figura 34: Espectro de RMN de ^1H de 69 e 55 em CDCl_3 a 200MHz..... | 98 |
| Figura 35: Espectro de RMN 2D COSY de 69 e 55 , em CDCl_3 a 400MHz..... | 99 |
| Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C de 69 e 55 em CDCl_3 a 50 MHz | 100 |
| Figura 37: Espectro 2D HETCOR de 69 e 55 em CDCl_3 a 400 MHz | 101 |
| Figura 38: Espectro de RMN de ^1H de T26 em CDCl_3 a 200 MHz | 103 |
| Figura 39: Espectro de RMN de ^1H expandido de T26 em CDCl_3 a 200 MHz..... | 104 |
| Figura 40: Espectro 2D COSY de T26 em CDCl_3 a 200 MHz..... | 105 |
| Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C de T26 em CDCl_3 a 50 MHz | 106 |
| Figura 42: Espectro de RMN Dept 135 de T26 em CDCl_3 a 50 MHz..... | 107 |
| Figura 43: Espectro 2D HMQC expandido de T26 em CDCl_3 a 200 MHz..... | 108 |
| Figura 44: Espectro 2D HMQC expandido de T26 em CDCl_3 a 200 MHz..... | 109 |
| Figura 45: Difração de Raios-X de T26 | 110 |
| Figura 46: Cromatograma de HPLC da mistura T26 a 360 nm | 110 |
| Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de isodictamina (11) em CDCl_3 a 200MHz | 111 |
| Figura 48: Espectro de RMN de ^1H expandido de isodictamina (11) em CDCl_3 a 200 MHz..... | 112 |
| Figura 49: Espectro 2D COSY de isodictamina (11) em CDCl_3 a 200 MHz..... | 113 |
| Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C de isodictamina (11) em CDCl_3 a 50MHz..... | 114 |
| Figura 51: Espectro de Dept 135 de isodictamina (11) em CDCl_3 a 50 MHz..... | 114 |

- Figura 52:** Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído no inverno 117
- Figura 53:** Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído na primavera .. 117
- Figura 54:** Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído no verão 117
- Figura 55:** Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído no outono 118

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Etérea Básica..... | 47 |
| Tabela 2: Separação em CC da subfração IV | 48 |
| Tabela 3: Separação em CC da subfração V | 48 |
| Tabela 4: Separação em CC da subfração VI..... | 49 |
| Tabela 5: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Acetato Básica..... | 50 |
| Tabela 6: Separação em CC da subfração III | 50 |
| Tabela 7: Separação em CC da subfração IV | 51 |
| Tabela 8: Separação em CC da subfração VI..... | 51 |
| Tabela 9: Microrganismos indicadores..... | 57 |
| Tabela 10: Rendimentos das frações | 63 |
| Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da Limonina (42) (DMSO, 400 MHz)..... | 73 |
| Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C da Limonina (42) (DMSO, 400 MHz)..... | 74 |
| Tabela 13: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C da γ -fagarina (9) (CDCl_3 , ^1H a 400 MHz; ^{13}C a 100 MHz) | 78 |
| Tabela 14: Dados espectroscópicos da Chalepina (27) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz)..... | 83 |
| Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Kokusaginina (17) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 400 MHz)..... | 90 |
| Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Maculina (24) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz)..... | 95 |
| Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (69) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz) | 102 |
| Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Isodictamina (11) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz)..... | 115 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 19: Composição química do óleo essencial de <i>H. apiculata</i> coletado nas quatro estações do ano | 116 |
| Tabela 20: Dados de atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Helietta apiculata</i> | 119 |
| Tabela 21: Potencial antioxidante das substâncias isoladas em diferentes concentrações (µg/mL)..... | 121 |
| Tabela 22: Concentração Inibitória Mínima do extrato e frações de <i>Helietta apiculata</i> | 122 |
| Tabela 23: Concentração Inibitória Mínima das substâncias isoladas de <i>Helietta apiculata</i> | 123 |
| Tabela 24: Concentração Bactericida e Fungicida Mínima das substâncias isoladas de <i>H. apiculata</i> | 124 |
| Tabela 25: Concentração Inibitória Mínima dos óleos extraídos durante o verão e outono de <i>Helietta apiculata</i> | 125 |
| Tabela 26: Concentração Bactericida e Fungicida Mínima dos óleos extraídos de <i>Helietta apiculata</i> | 125 |
| Tabela 27: Atividade de Inibição da Enzima AChE frente as substâncias isoladas de <i>Helietta apiculata</i> (µg/µL) | 126 |
| Tabela 28: Valores de pMIQ para as substâncias isoladas de <i>Helietta apiculata</i> | 127 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1: Fracionamento do Extrato Bruto de <i>Helietta apiculata</i> | 46 |
|---|----|

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para o EB e frações da espécie *Helietta apiculata*119
- Gráfico 2:** Valores de EC₅₀ verificada para o extrato bruto e frações da espécie *Helietta apiculata*120

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Numeração, estrutura e nomenclatura dos compostos isolados | 61 |
|---|----|

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|--|
| δ | Deslocamento Químicos |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| μg | Micrograma |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| CC | Cromatografia em Coluna |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CCDP | Cromatografia em Camada Delgada Preparativa |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CFM | Concentração Fungicida Mínima |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLM | Concentração Letal Mínima |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| d | Dubleto |
| dd | Duplo Dupleto |
| DA | Doença de Alzheimer |
| Dept | Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazila |
| EBM | Extrato Bruto Metanólico |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FEA | Fração Etérea Ácida |
| FEB | Fração Etérea Básica |
| FAB | Fração Acetato Básica |
| FBB | Fração Butanólica Básica |
| Hz | Hertz |
| HETCOR | Heteronuclear Correlation spectroscopy |
| HMQC | Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation |
| m | Multiplete |
| mg | Miligramas |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| NPPN | Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais |

| | |
|------|---------------------------------|
| Pág. | Página |
| ppm | Partes por milhão |
| PF | Ponto de Fusão |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| Rf | Fator de Retenção |
| s | Singleto |
| t | Tripleto |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias |

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Geral..... | 24 |
| 2.2 Específicos | 24 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 25 |
| 3.1 A planta..... | 25 |
| 3.1.1 A Família Rutaceae | 25 |
| 3.1.1 A espécie <i>Helietta apiculata</i> Benth | 25 |
| 3.2 A Química da Família Rutaceae | 26 |
| 3.2.1 Alcalóides..... | 27 |
| 3.2.2 Cumarinas | 32 |
| 3.3 Óleos Voláteis | 36 |
| 3.4 Atividades Farmacológicas | 37 |
| 3.4.1 Atividade Antioxidante | 39 |
| 3.4.2 Atividade Antimicrobiana..... | 40 |
| 3.4.3 Atividade de Inibição da enzima Acetilcolinesterase | 40 |
| 3.4.3.1 A Doença de Alzheimer | 41 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL | 43 |
| 4.1 Procedimentos Experimentais..... | 43 |
| 4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C | 43 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.1.2 | Materiais e métodos cromatográficos | 43 |
| 4.1.3 | Reagentes e solventes utilizados | 44 |
| 4.1.4 | Aparelho de Ponto de Fusão | 44 |
| 4.1.5 | Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa-CG/EM | 44 |
| 4.1.6 | Espectrômetro de Difração de Raios-X | 44 |
| 4.1.7 | Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro..... | 44 |
| 4.2 | <i>Helietta apiculata</i> Benth | 45 |
| 4.2.1 | Extração, fracionamento e cromatografia | 45 |
| 4.2.2 | Fração Etérea Básica | 47 |
| 4.2.3 | Fração Acetato Básica..... | 49 |
| 4.3 | Dados dos compostos isolados..... | 52 |
| 4.3.1 | Fração Etérea Básica | 52 |
| 4.3.1 | Fração Acetato Básica..... | 53 |
| 4.4 | Óleo Volátil de <i>Helietta apiculata</i> Benth | 54 |
| 4.4.1 | Extração de Óleos Voláteis | 54 |
| 4.5 | Determinação da Atividade Antioxidante..... | 55 |
| 4.5.1 | Método do radical livre – Bioautografia | 55 |
| 4.5.2 | Método do radical livre – Ensaio quantitativo | 56 |
| 4.6 | Ensaio Biológicos..... | 56 |
| 4.6.1 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de Micro diluição em Caldo | 56 |
| 4.6.1.1 | Microrganismos empregados nos ensaios..... | 57 |
| 4.6.1.2 | Padrões utilizados nos ensaios microbiológicos | 57 |
| 4.6.1.3 | Meios de Cultura | 57 |
| 4.6.2 | Determinação da atividade de inibição da enzima Acetilcolinesterase | 58 |
| 5. | APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS | 60 |
| 5.1 | Rendimento do Extrato e Frações | 63 |
| 5.2 | Metabólitos isolados de <i>Helietta apiculata</i> Benth: Fração Etérea Básica | 64 |
| 5.2.1 | Limonina (42)..... | 64 |
| 5.2.2 | γ -fagarina (9)..... | 75 |
| 5.2.3 | Chalepina (27)..... | 78 |
| 5.2.4 | Kokusaginina (17)..... | 84 |
| 5.2.5 | Maculina (24)..... | 90 |

| | |
|---|------------|
| 5.3 Metabólitos isolados de <i>Helietta apiculata</i> Benth: Fração Acetato Básica..... | 95 |
| 5.3.1 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (69) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (55)..... | 95 |
| 5.3.2 T26 | 102 |
| 5.3.3 Isodictamina (11)..... | 110 |
| 5.3 Óleos Voláteis de <i>Helietta apiculata</i> Benth..... | 115 |
| 5.4.1 Análise química do óleo essencial de <i>Helietta apiculata</i> | 115 |
| 5.5 Atividade Antioxidante..... | 118 |
| 5.6 Ensaio Biológico..... | 121 |
| 5.6.1 Atividade antimicrobiana..... | 121 |
| 5.6.2 Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase..... | 126 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 128 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 130 |

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, na produção de meios de transporte e como meio restaurador da saúde.¹ No passado a fitoterapia, uso de plantas para tratamento de enfermidades, era mais adotada pela população carente, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde, estando bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África.²

O registro do uso de chás e poções remete-se para mais de 4000 anos atrás. Um exemplo histórico marcante é o suicídio de Sócrates pelo uso de extrato de cicuta em 399 a.C.^{1,3,4}

Apesar da existência de registros antigos que relatam a ampla utilização dos vegetais como alternativa terapêutica, esse conhecimento baseava-se somente no empirismo, ou seja, no conhecimento prático do emprego dos vegetais como medicamentos. Somente no início do século passado esses recursos passaram a ser estudados com instrumentos científicos da época, e os princípios ativos começaram a ser identificados e utilizados pela medicina tradicional.¹

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, com cerca de 55 mil espécies de plantas superiores catalogadas,⁵ representando 15 a 20% da biodiversidade mundial de acordo com dados da Convenção da Diversidade Biológica.^{6,7} Essa imensa biodiversidade, ainda pouco estudada, desperta o interesse mundial para o estudo de produtos naturais. Visto que certas substâncias naturais isoladas ou os fármacos a quem elas servem como protótipos, movimentam um mercado de bilhões de dólares, como a vimblastina e a vincristina, isoladas de *Catharanthus roseus*, e o taxol isolado de *Taxus brevifolia*, utilizados em tratamentos contra o câncer.⁴

Substâncias químicas sintetizadas pelos vegetais são produtos de seu metabolismo que envolve uma série de reações químicas que ocorrem continuamente dentro de cada célula. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário.

O metabolismo primário abrange processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, onde

atuam os aminoácidos, os nucleotídeos e os carboidratos. Já o metabolismo secundário é constituído por saponinas, terpenos, flavonóides, alcalóides, que não são extremamente necessários para que a planta complete seu ciclo de vida, mas que atuam contra a herbivoria, ataque de patógenos, atração de organismos benéficos como os polinizadores, dispersores de sementes, além de possuírem ação protetora em relação a estresses abióticos, como mudanças de temperatura, exposição à radiação ultravioleta (UV), níveis de luz, água e nutrientes minerais.^{1,8}

A etnofarmacologia, ou seja, o conhecimento popular das plantas, fornece dados importantes para novos estudos com plantas medicinais, pois estimula a investigação pelos constituintes químicos relacionando-os ao seu uso popular.

Nesse contexto, o grupo do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), coordenado pelo professor Dr. Ademir Farias Morel, vem contribuindo não somente para a fitoquímica clássica, ou seja, para o isolamento e a determinação estrutural dos compostos químicos, mas também realizando trabalhos que envolvam atividades biológicas de plantas que apresentam algum tipo de uso na medicina popular. O grupo realiza uma triagem de espécies nativas do Rio Grande do Sul, buscando o isolamento e a determinação estrutural de compostos das plantas que tenham efeitos medicinais relatados pela cultura popular.

Dentre as espécies estudadas pelo grupo selecionou-se a espécie *Helietta apiculata* Benth, pertencente à família Rutaceae, conhecida popularmente como canela-de-veado, bastante comum na região central do nosso estado, para uma investigação mais detalhada quanto aos seus constituintes químicos. As espécies que fazem parte da família Rutaceae geralmente apresentam como constituintes químicos alcalóides, terpenos, lignanas e cumarinas, entre outros.^{9,10} Estes metabólitos apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, antimalárica.^{11,20}

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho consiste em realizar o estudo químico e biológico das cascas do caule da espécie *Helietta apiculata* Benth, pertencente à família Rutaceae, nativa do Rio Grande do Sul.

2.2 ESPECÍFICOS

- realizar a extração com as cascas do caule da espécie *H. apiculata* coletada no interior do município de Mata

- isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nas cascas do caule de *H. apiculata*, fazendo uso de técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais, como RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, DEPT 135, HMQC, HETCOR, HMBC, espectrometria de massas e difração de raios-X

- comparar a constituição química do óleo essencial extraído das folhas da espécie quanto à sazonalidade

- realizar ensaios biológicos para a determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante, além da atividade de inibição da enzima Acetilcolinesterase do extrato bruto, das frações e dos metabólitos isolados da espécie.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A PLANTA

3.1.1. A família Rutaceae

A família Rutaceae reúne aproximadamente 160 gêneros e 1900 espécies. É uma família de grande variedade morfológica.¹⁰ Tem grande ocorrência na América tropical, sul da África e Austrália. As plantas pertencentes a esta família são lenhosas, de porte arbustivo ou arbóreo, freqüentemente apresentam glândulas translúcidas nas folhas e desenvolvem glândulas produtoras de óleo fortemente aromático, cujo papel ecológico é provavelmente protegê-las contra ação de predadores.¹²

Esta família também se caracteriza por apresentar um extraordinário arranjo de metabólitos secundários, como limonóides, flavonóides, cumarinas, óleos essenciais e alcalóides, com propriedades medicinais, antimicrobianas, inseticidas e herbicidas ou pesticidas naturais. Considerando a vasta variedade de metabólitos, esta família é considerada como uma das mais versáteis em termos de produtos naturais, o que acaba por gerar diversas atividades biológicas.¹⁰

3.1.2. A espécie *Helietta apiculata* Benth

A espécie *Helietta apiculata* é conhecida popularmente como canela-de-veado e cuncun no Rio Grande do Sul, e osso-de-burro e amarelinho na região de São Paulo. É encontrada em formações vegetais naturais no estado do Rio Grande do Sul, mais precisamente na região central. Tem como sinonímia *Helietta longifoliata* Britt, *Helietta cuspidata* e *Esenbeckia cuspidata*.¹³ Como a espécie em estudo foi identificada pela primeira vez como *H. apiculata* fez-se uso desta denominação nas referências a trabalhos realizados com suas sinonímias neste trabalho. Existem poucos estudos relatados na literatura a respeito desse gênero, sendo a espécie mais estudada a *H. apiculata*.

A maioria das espécies de *Helietta* se apresenta na forma de pequenas árvores, dentre elas, *H. apiculata* (Figuras 1 e 2), ou arbustos perenes e ramificados, com altura de 10 a 18 m e tronco de 30 a 50 cm. Possuem folhas compostas trifolioladas, sustentadas por pecíolos de

3-4 cm de comprimento. Foliólos sésseis, coriáceos, glabros com a ponta enrolada longitudinalmente. Apresenta madeira pesada (densidade $0,98\text{g/cm}^3$), dura, racha com facilidade durante a secagem, baixa resistência ao apodrecimento, suscetível ao ataque de insetos e cupins de madeira seca. Floresce em novembro-dezembro, e seus frutos maturam em março-maio.¹³



Figura 1. Cascas do caule de *Helietta apiculata* Benth



Figura 2. Folhas e flores de *Helietta apiculata* Benth

3.2 A QUÍMICA DA FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae é muito conhecida pela presença de uma ampla diversidade de metabólitos secundários, entre eles, podem-se destacar os alcalóides, cumarinas, lignanas, flavonóides, terpenóides e os limonóides.^{9,10}

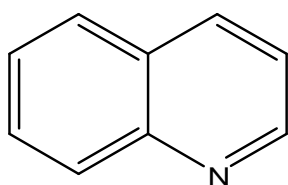
Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica despertando o interesse cada vez maior na investigação fitoquímica dessa família.

3.2.1 Alcalóides

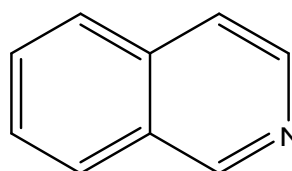
Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, possuindo, na sua grande maioria, caráter alcalino. Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, acumulando-se, principalmente, nos tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos.¹

Nas plantas os alcalóides atuam como agentes venenosos protegendo-as contra insetos e herbívoros, auxiliam a mesma na detoxificação, eliminando compostos que seriam nocivos, são substâncias de reserva capazes de fornecer nitrogênio ou outros elementos necessários a planta.¹

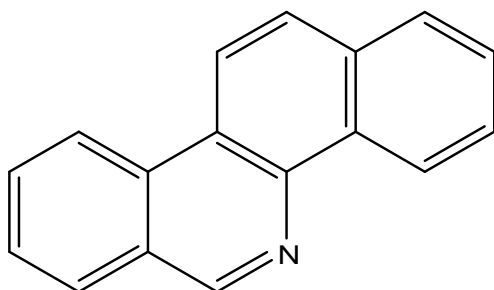
Alcalóides quinolínicos (1), isoquinolínicos (2), benzofenantridínicos (3), furoquinolínicos (4), piranoquinolínicos (5), quinolonas (6) e os terpenóides (7), são grupos de metabólitos bastante comuns na família Rutaceae.¹⁴



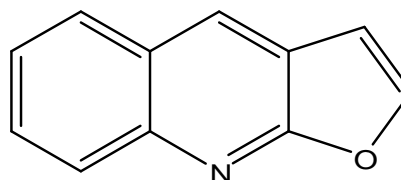
1



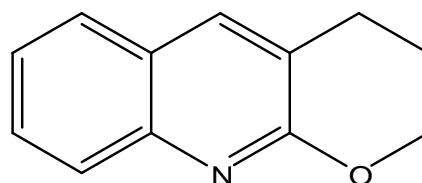
2



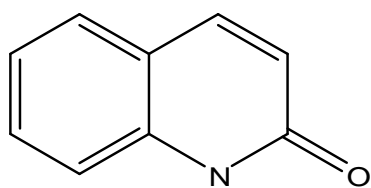
3



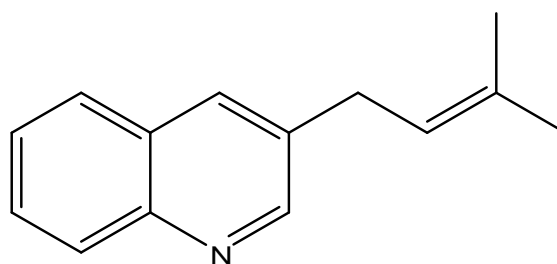
4



5

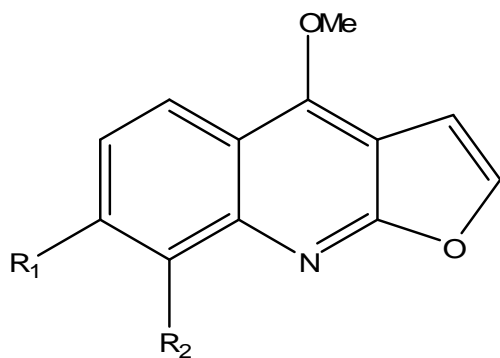
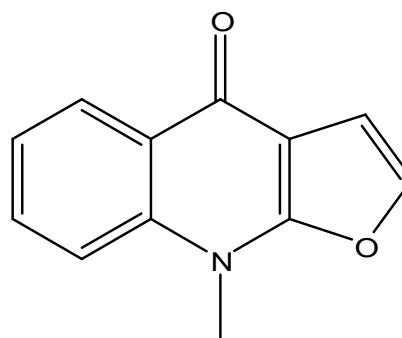


6



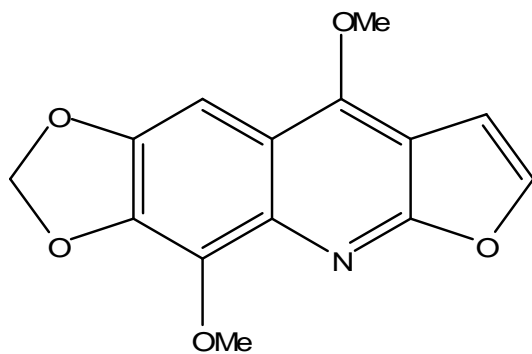
7

Os alcalóides quinolínicos encontram-se distribuídos em vários gêneros da família Rutaceae, como *Esenbeckia*, *Helietta*, *Zanthoxylum*. O estudo destes alcalóides é datado desde os anos 50, sendo que em 1956, dictamina (**8**) e γ -fagarina (**9**) foram sintetizadas pela primeira vez.¹⁵ Trata-se de alcalóides furoquinolínicos, que são os que apresentam o anel furano condensado a estrutura básica da quinolina (**1**). Além de dictamina e γ -fagarina também foram sintetizados skimianina (**10**) e isodictamina (**11**).¹⁶

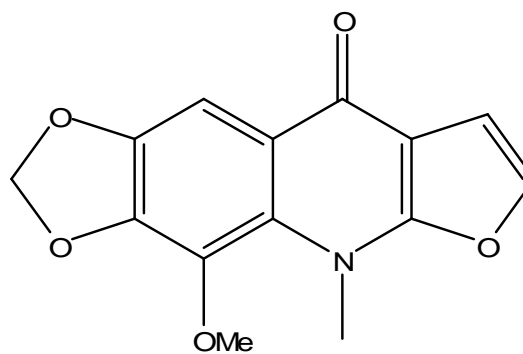
8 $R_1 = R_2 = H$ 9 $R_1 = H, R_2 = OMe$ 10 $R_1 = R_2 = OMe$ 

11

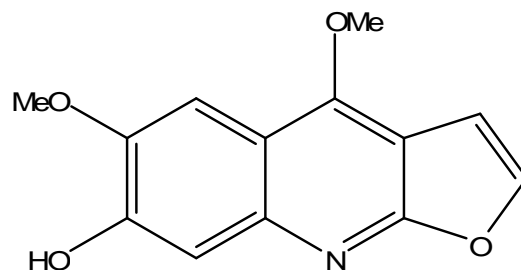
Em 1976, Chang e col., isolaram flindersiamina (**12**), isoflindersiamina (**13**) e um novo alcalóide, heliparvifolina (**14**) de *Helietta parvifolia*.¹⁷



12

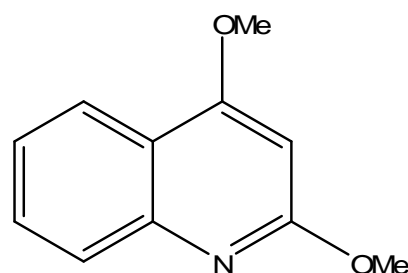
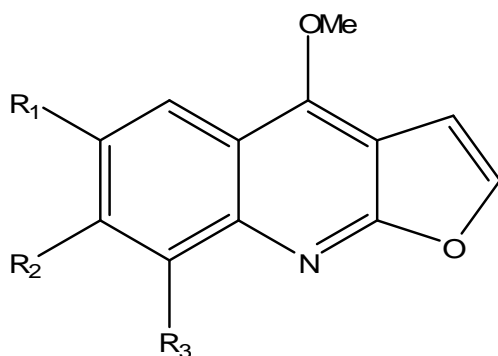


13



14

Tem-se relatos de uma variedade de alcalóides quinolínicos isolados na família Rutaceae, como dictamina (**8**), γ -fagarina (**9**), skimianina (**10**), monrifolina (**15**), delbina (**16**), kokusaginina (**17**), evoxina (**18**), heliparvifolina (**19**), montanina (**20**), haplopina (**21**), robustina (**22**), evolitrina (**23**) e maculina (**24**).^{18,19,20,21,21,22,23}



20

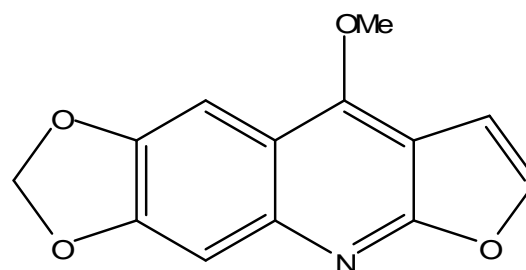
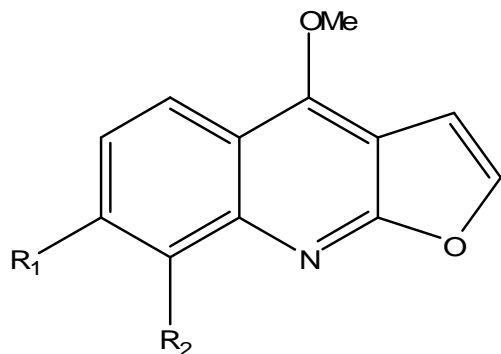
15 $R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = \text{OMe}$; $R_3 = \text{H}$

16 $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OMe}$; $R_3 = \text{H}$

17 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$; $R_3 = \text{H}$

18 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$; $R_3 = \text{OMe}$

19 $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$



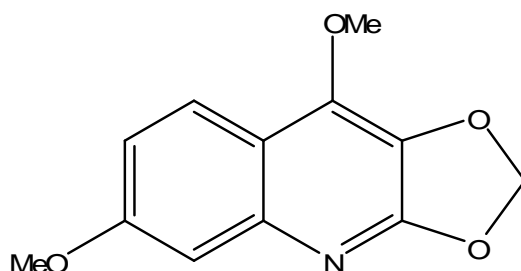
24

21 $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OMe}$

22 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$ $R_1 = R_2 = \text{OH}$

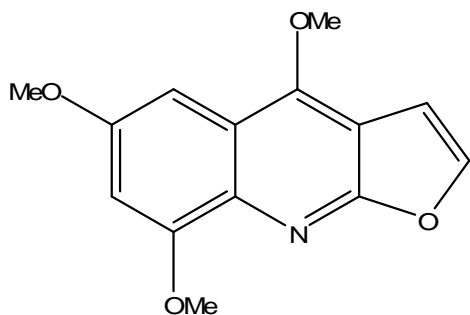
23 $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{H}$

Cui et al (1999) isolaram o alcalóide quinolínico 2,3-metilenodióxi-4,7-dimetoxiquinolina (**25**), juntamente com outros alcalóides já conhecidos da espécie *Acronychia laurifolia*.²⁴

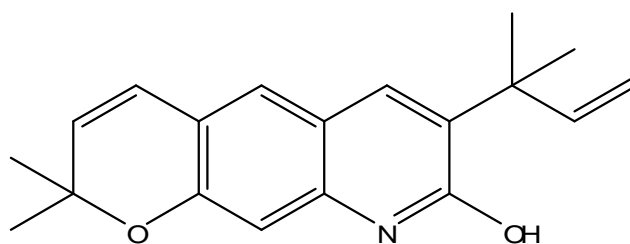


25

Em trabalho realizado por Moura, em 2001, foram isolados, flindesiamina (**12**), kokusaginina (**17**), maculosidina (**26**) além de um novo alcalóide terpenóide, identificado como helietidina (**27**) de *Helietta apiculata*.²⁵

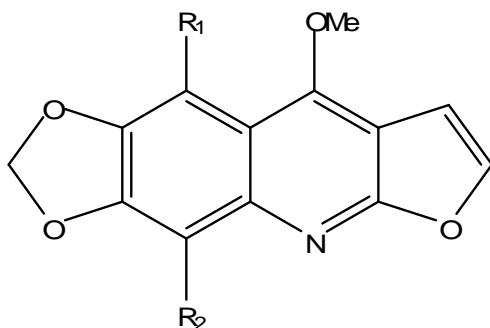
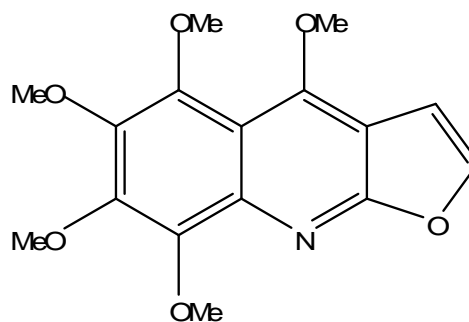


26



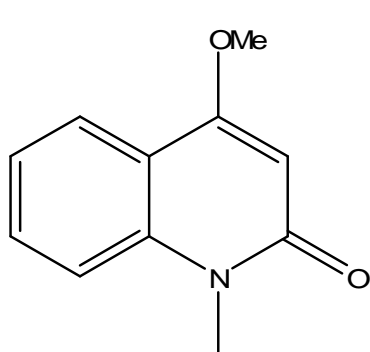
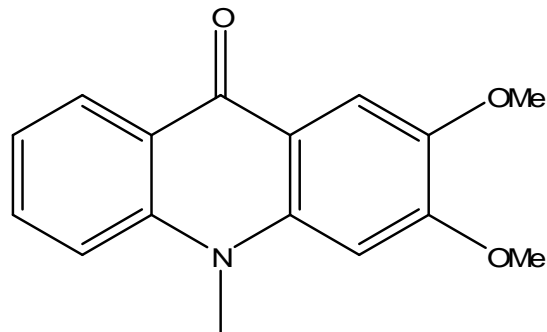
27

Chaturvedula e col., em estudo desenvolvido com *Vepris punctata*, em 2003, realizaram o isolamento de três novos alcalóides furoquinolínicos: 5-metoximaculina (**28**), 5,8-dimetoximaculina (**29**) e 4,5,6,7,8-pentametoxifuroquinolína (**30**).²⁶

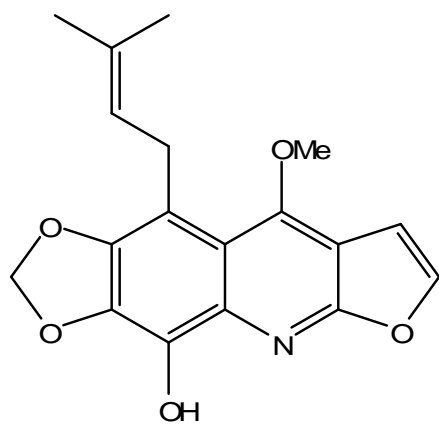
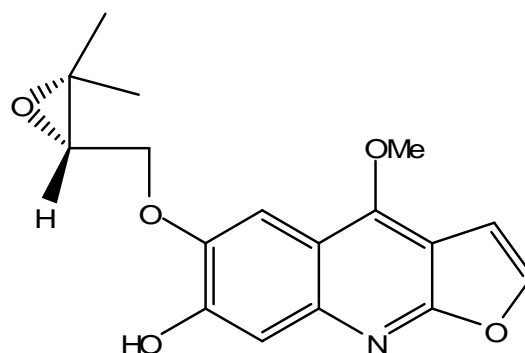
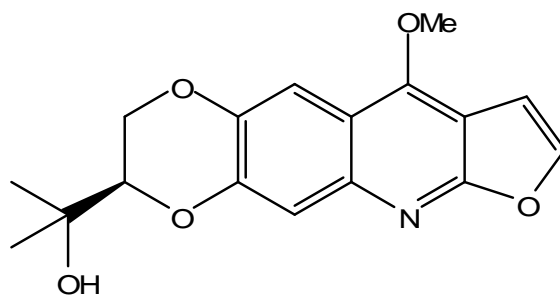
28 R₁=OMe; R₂=H29 R₁=R₂=OMe

30

Em estudo realizado em 2006, por Simote, além de alcalóides furoquinolínicos já conhecidos, foram identificados alcalóides do tipo quinolônico, N-metil-4-metóxi-2-quinolona (**31**), e acridônico, arborinina (**32**) de *Helietta puberula*.²⁷

**31****32**

Wansi e col., em 2008, isolaram da classe de alcalóides furoquinolínicos, tecleaverdoornina (**33**), quinosuaveolina A (**34**) e quinosuaveolina B (**35**) de *Oricia suaveolens*.²⁸

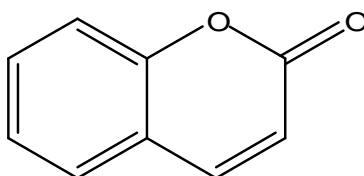
**33****34****35**

Os alcalóides dictamina (**8**), γ -fagarina (**9**), skimianina (**10**), flindersiamina (**12**) e maculina (**24**), foram isolados também, de *H. apiculata*, em trabalho publicado por Ferreira e col. em 2010.²⁹

3.2.2 Cumarinas

A palavra cumarina tem origem caribenha “cumaru”, nome popular de *Dipterix odorata* Willd. É uma classe de metabólitos amplamente distribuído nos vegetais, principalmente nas famílias Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae e Oleaceae, sendo encontradas também em fungos e bactérias.

Estruturalmente são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo a cumarina 1,2-benzopirona (**36**) o representante mais simples.¹

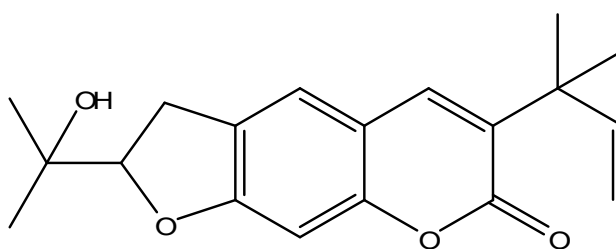


36

Algumas cumarinas apresentam propriedades sedativas, hipnóticas, além de protegerem as plantas contra efeitos das radiações de ondas curtas.³⁰ Possuem diversas atividades, entre elas, antioxidantes, anti-HIV, vasodilatadora e antimicrobiana.¹

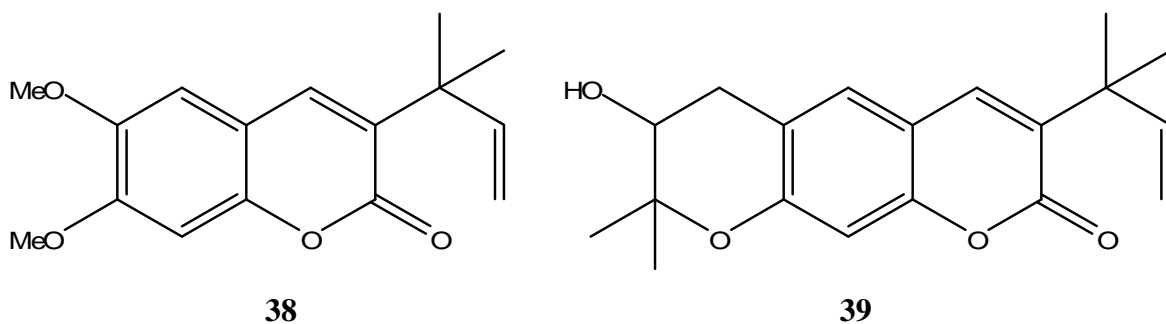
Muitas cumarinas possuem odor característico, como, por exemplo, a 1,2-benzopirona (**36**), que foi utilizada como aromatizante em alimentos industrializados, no entanto, a substância foi classificada como tóxica pela FDA.

Em estudo realizado por Pozzi, em 1966, com a espécie *Helietta apiculata*, obteve-se o isolamento de uma nova furocumarina denominada helietina (**37**).³¹

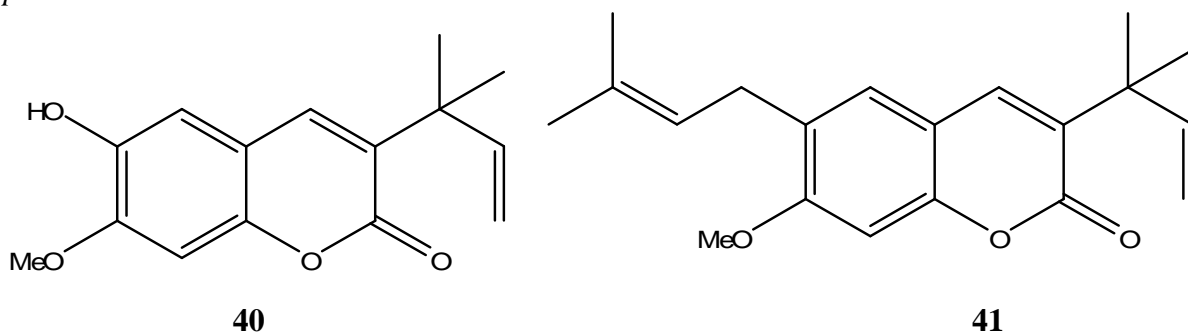


37

Em 2001, Moura, estudando a espécie *Helietta apiculata*, isolou as cumarinas rutacultina (**38**), chalepina (**37**) e (*R*)-ulismoncadina (**39**).²⁵

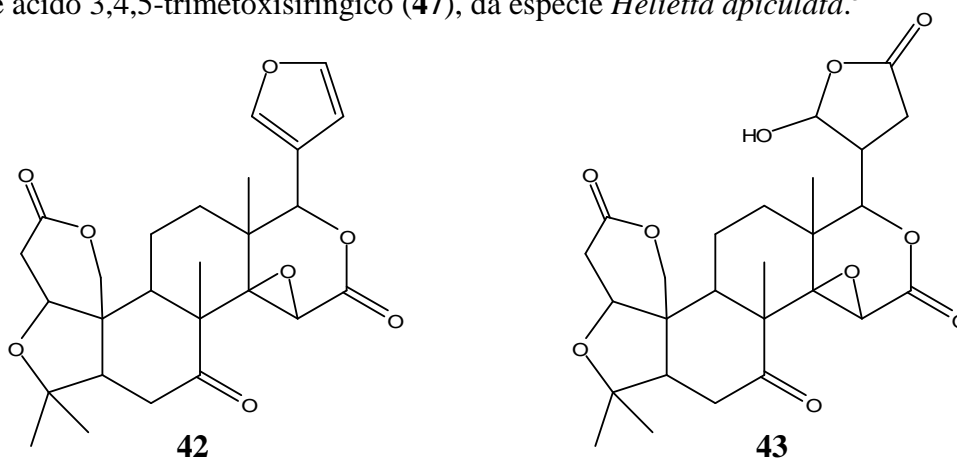


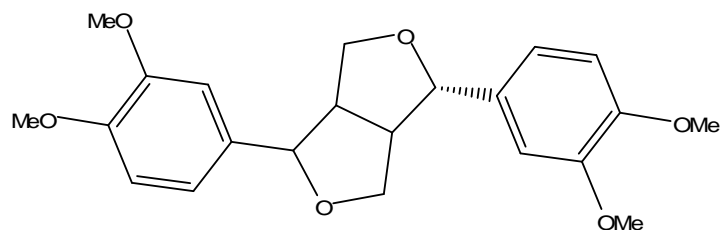
Em 2006, Simote obteve o isolamento das cumarinas 3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina (**40**) e metiletergraveliferona (**41**), com o estudo da espécie *Helietta puberula*.²⁷



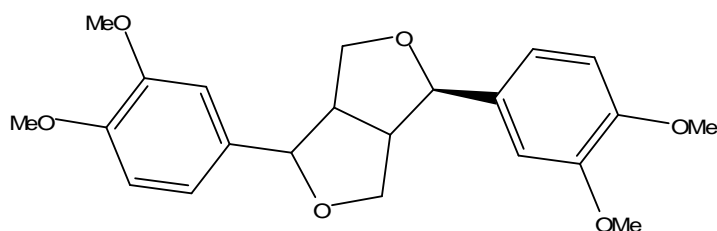
Comprovando a diversidade química apresentada por espécies do gênero *Helietta*, estudos têm relatado ainda o isolamento de uma variedade de outros metabólitos secundários, como limonóides, terpenos e lignanas.

Em estudo realizado por Marques, em 2006, além de alcalóides furoquinolínicos e cumarinas, foram isolados os limonóides limonina (**42**) e ácido limonéxico (**43**). As lignanas eudesmina (**44**) e epi-eudesmina (**45**), além de derivados do ácido siríngico, metilseringato (**46**) e ácido 3,4,5-trimetoxisiríngico (**47**), da espécie *Helietta apiculata*.³²

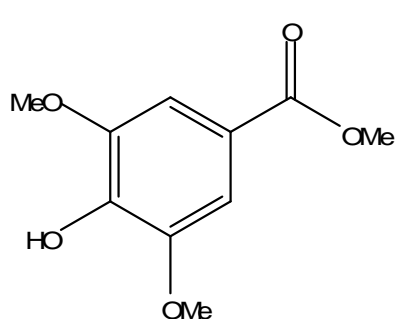




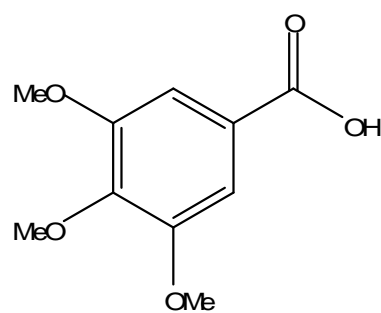
44



45

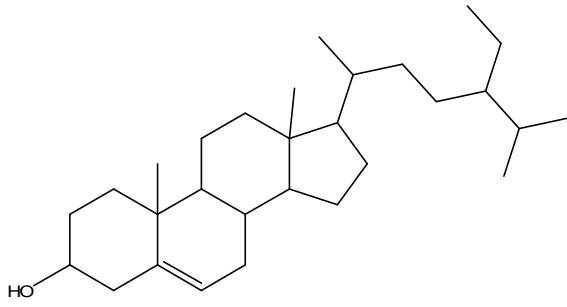


46

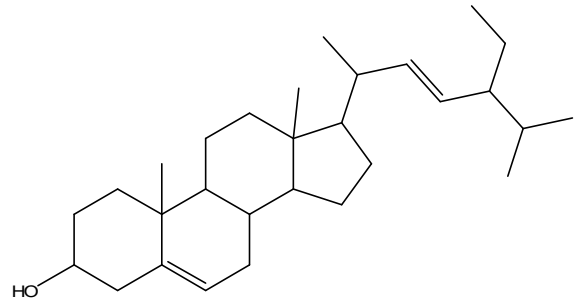


47

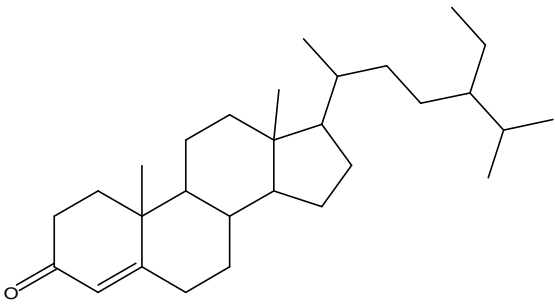
Ainda no mesmo ano, estudando a espécie *Helietta puberula*, Simote obteve o isolamento dos esteróides sitosterol (48) e estigmasterol (49) em mistura, sitostenona (50), estigmastenona (51) e campestenona (52) em mistura, e os tri terpenos, lupeol (53) e lupenona (54) também em mistura, além de derivados do ácido cinâmico, 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (55) e 3,4-dimetoxicinamato de geranila (56).²⁷



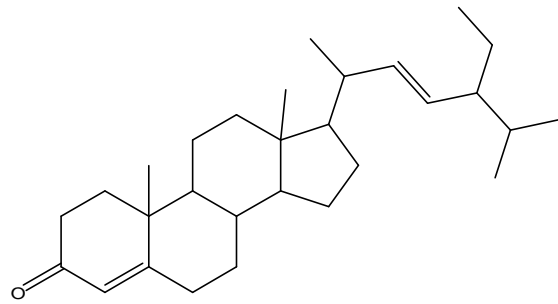
48



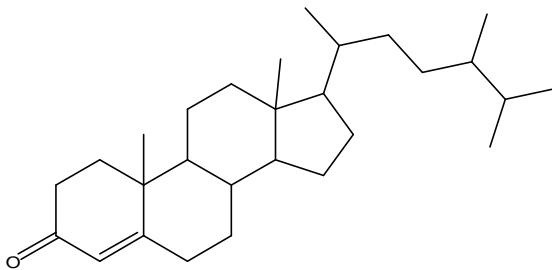
49



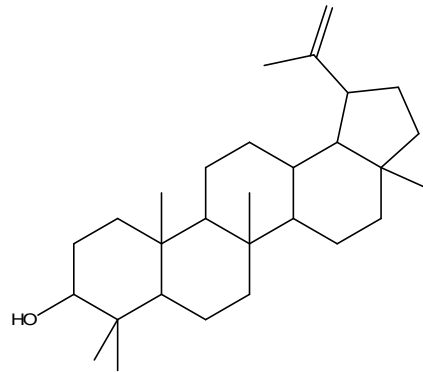
50



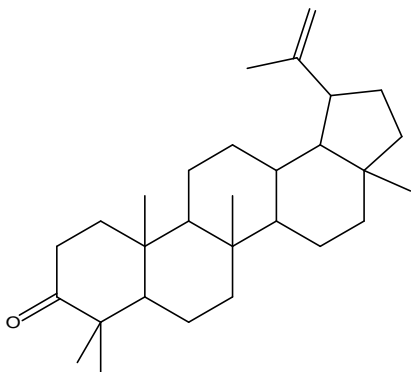
51



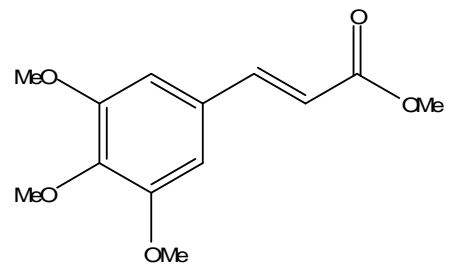
52



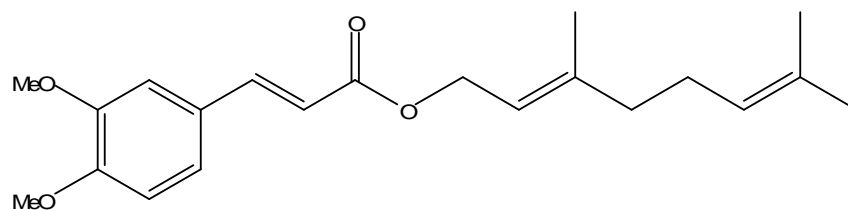
53



54



55

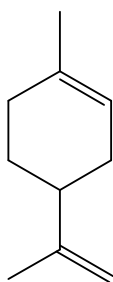


56

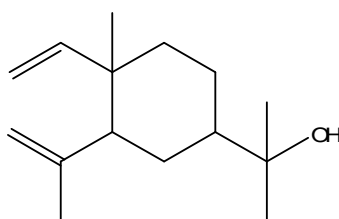
3.3 ÓLEO VOLÁTIL DE *Helietta apiculata* Benth

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, resultantes do metabolismo secundário das plantas. Economicamente, destacam-se por seus compostos serem utilizados na indústria de perfumaria, em produtos odontológicos, na agricultura, na conservação de alimentos, como remédios naturais e protótipos de substâncias farmacologicamente ativas.¹

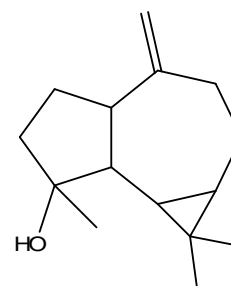
Ainda são poucos os relatos de estudo com óleo de *H. apiculata*. De acordo com estudo realizado por Moura²⁵ em 2001, no próprio Grupo NPPN, há predominância dos compostos Limoneno (**57**), Elemol (**58**) e Espatuleno (**59**). Em estudo realizado por Ferronato (2009)³³ onde se avaliou a composição química em relação à sazonalidade, também foram identificados como majoritários os componentes (**57**), (**58**) e (**59**), nas diferentes estações do ano.



57



58



59

3.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Com base no uso de plantas na medicina popular, a casca de *Helietta apiculata* Benth tem sido usada como tônico, sendo a infusão de sua casca também usada como antimicrobiana, o que desperta o interesse para o estudo e identificação de seus constituintes químicos responsáveis por suas atividades farmacológicas.

Vários estudos vêm sendo realizados com espécies da família Rutaceae, dentre elas *Raulinoa echinata*²², *Acronychia laurifolia*,²⁴ *Oricia suaveolens*,²⁸ *Ruta graveolens*,³⁴ *Galipea panamensis*,³⁵ *Spirantera odoratissima*,³⁶ as quais apresentaram atividades fungicidas, bactericidas, antioxidantes e citotóxicas.

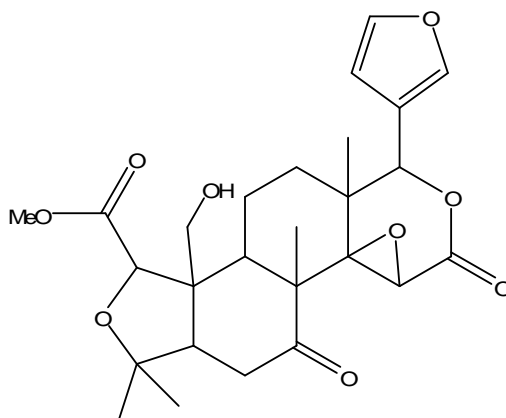
Em estudo realizado por Gunatilaka e Kingston (1994), cumarinas isoladas de Rutaceae do Sri Lanka apresentaram atividades citotóxicas.³⁷

Diegues e col. (2004), estudando espécies de *Zanthoxylum*, relataram atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida, anti-helmíntica, atividade antitumoral, propriedades antiinflamatórias, de inibição enzimática e atividade antioxidante.¹¹

Em estudo realizado por O'Donnell e col.,³⁸ relatou-se atividade antimicrobiana de γ -fagarina (**9**). Metabólitos isolados de *Ruta chalepensis*,³⁹ *Teclea afzelli*,⁴⁰ *Hostia colombiana*,²¹ também apresentaram essa atividade. *T. afzelli* apresentou também atividade anti-plasmódica.⁴¹

Hanawa e col.²⁰ encontraram atividades antimicrobianas em kokusagina (**17**), haplopina (**21**) e skimianina (**10**).

De *Vepris uguenensis* isolou-se um limonóide, metil uguenesonate (**60**), com atividade antimalárica, em trabalho realizado por Cheplogoi e col..⁴²

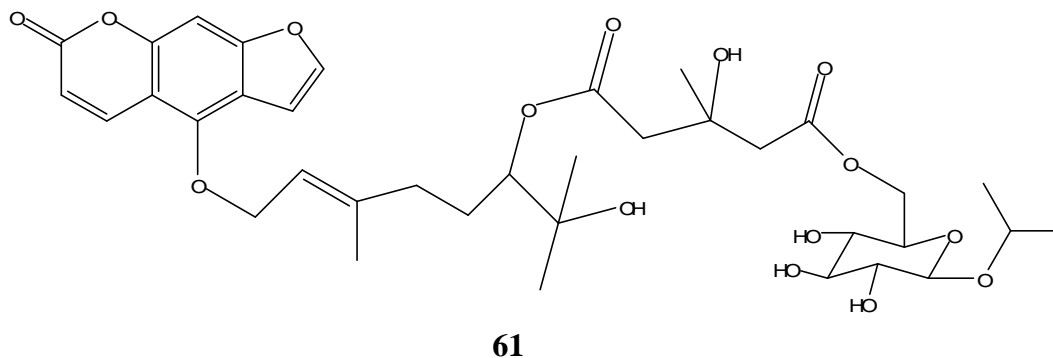


60

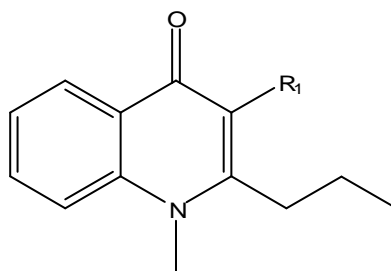
Clausena lansium apresentou propriedades antiinflamatória, antioxidante e antidiabéticas de acordo com estudo de Adebajo e col.⁴³

γ -fagarina (**9**) e skimianina (**10**), isoladas de *Esenbeckia febrifuga*, se mostraram ativas como antimaláricas, conforme Oliveira e col. em 2009.⁴⁴

Em trabalho realizado por Youkwon e col., em 2010, obtiveram o isolamento de uma furocumarina, citrusoside B (**61**), de *Citrus hystrix* que apresentou inibição da colinesterase.⁴⁵



Os alcalóides, leiokinina A (**62**), leptomerina (**63**), kokusaginina (**17**), skimianina (**10**), maculina (**24**) e flindersiamina (**12**), isolados de *Esenbeckia leiocarpa*, por Cardoso-Lopes e col. em 2010, também apresentaram atividades de inibição da enzima acetilcolinesterase, tendo potencial para o tratamento da doença de Alzheimer.⁴⁶



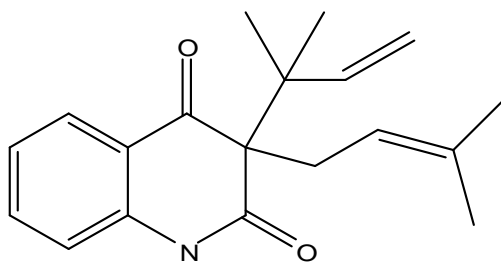
62 R₁=OMe

63 R₁=H

Rutaceae também apresentam atividades tripanocidas, dando destaque para a cumarina chalepina (**37**), que é uma das substâncias isoladas mais ativas contra o *Trypanossoma cruzi*.^{47,48,49}

Cortez e col. em 2011, relatam atividade anti-leishmanial de *Almeidea coerulea*⁵⁰, a mesma atividade foi encontrada por Ferreira et al. (2009) em *Helietta apiculata*.²⁹

Estudos revelam que a buchapina (**64**), um alcalóide quinolona, apresenta atividade contra o vírus HIV-1.⁵¹



64

Alguns estudos com o gênero *Helietta* relatam atividades de inibição do citocromo P-450.⁵² Atividade antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de *H. apiculata*,⁵³ atividade antimicrobiana do óleo essencial da mesma espécie,^{25, 33} atividade antiinflamatória do extrato aquoso⁵⁴ e atividade antileishmanicida, ambas de *H. apiculata*.²⁹

3.4.1 Atividade antioxidante

O oxigênio molecular obtido da atmosfera é vital para os organismos aeróbicos, contudo radicais livres oxigenados são constantemente gerados *in vivo* para propósitos biológicos, e muitas vezes são produzidos em excesso, resultando em estresse oxidativo.⁵⁵

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção contra as EROs encontram-se deterioradas. As mais comuns são os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^\cdot), peroxila (RO_2^\cdot), alcoxila (RO^\cdot) e hidroperoxila (HO_2^\cdot). Outras moléculas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrato ($ONOO$) não são radicais livres, mas podem conduzir a formação deles através de reações químicas.⁵⁶

Um grande número de doenças têm sido relacionadas ao estresse oxidativo e geração de radicais livres, como o câncer, envelhecimento, isquemia, inflamação e doenças neurodegenerativas como mal de Parkinson e de Alzheimer. Assim, as substâncias com poder antioxidante, que retardam a oxidação, são utilizadas para prevenir, inibir ou ao menos atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo. A superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase são as enzimas antioxidantes mais importantes. Albumina, ceruloplasmina, ferritina e vitaminas E, C, e β -caroteno são os antioxidantes não-enzimáticos. Compostos fenólicos também têm sido identificados em vegetais como importantes antioxidantes.⁵⁵

Como exemplo do uso de antioxidantes, tem-se o emprego de tais compostos para aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios, porém, alguns têm restrições em

alimentos por estarem associados a processos carcinogênicos. Assim, a procura por antioxidantes de origem natural tem se intensificado. E como as plantas necessitam de proteção contra o estresse oxidativo gerado pela exposição aos raios solares e ao oxigênio, concentram uma grande diversidade de antioxidantes, dando destaque aos polifenóis.⁵⁵

3.4.2 Atividade antimicrobiana

Devido ao aparecimento de novos agentes infecciosos e ao aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos tradicionais, principalmente pela excessiva exposição a esses fármacos, faz-se necessário a pesquisa por novos compostos com atividades antimicrobianas.^{2,57,58}

Os processos infecciosos, causados por agentes microbianos, preocupam a classe médica, tendo destaque no panorama das doenças oportunistas.⁵⁹ Como exemplo, cita-se a bactéria *Staphylococcus aureus*, patógeno responsável pelas infecções em ferimentos, que representam a terceira causa mais comum de infecção hospitalar.⁶⁰ Tem-se ainda, as leveduras do gênero *Candida*, patógenos oportunistas responsáveis por infecções em indivíduos imunocomprometidos.^{2,61}

Tendo em vista a necessidade por novos compostos para a cura dessas infecções, busca-se nas plantas o isolamento de novos constituintes químicos com atividades farmacológicas, visto que as plantas são utilizadas na medicina popular há muito tempo.

3.4.3 Atividade de inibição da enzima Acetilcolinesterase

As Colinesterases (ChE's) são enzimas importantes em diversas áreas como a neurobiologia, toxicologia e farmacologia. Apresentam-se divididas em Acetilcolinesterase (AChE), ou colinesterase verdadeira, e Butirilcolinesterase (BChE), ou pseudocolinesterase.

A acetilcolinesterase está presente principalmente no sistema nervoso central, envolvida na transmissão nervosa. Sua principal função biológica é catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina. A acetilcolina (AcetilCoA) é o neurotransmissor que transporta mensagens químicas entre dois ou mais neurônios, mais abundante no cérebro, e também, o principal responsável pela propagação do impulso nervoso. Quando ocorre a queda desses neurotransmissores no cérebro surgem doenças neuro-degenerativas, sendo uma das principais, o mal de Alzheimer.⁶²

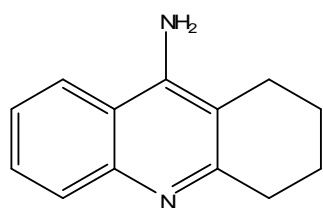
3.4.3.1 A Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA), caracterizada pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, é uma afecção neuro-degenerativa progressiva e irreversível de aparecimento insidioso, que acarreta perda da memória e diversos distúrbios cognitivos.^{63, 64}

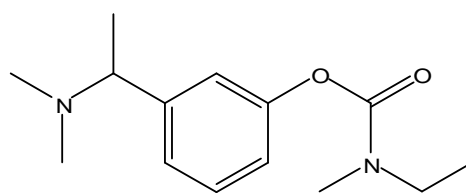
Os principais sintomas apresentados por pessoas acometidas são perda gradual da memória recente, mudança de personalidade, desorientação quanto ao espaço e tempo, problemas de expressão e linguagem, alterações de humor e comportamento, não reconhecem pessoas próximas, incontinência urinária e fecal, além de fases de depressão, agitações e psicoses alucinatórias. As causas da DA ainda não são conhecidas, mas acredita-se que fatores genéticos, agentes infecciosos, alumínio, espécies reativas de oxigênio, aminoácidos neurotóxicos e a ocorrência de danos em micro túbulos e proteínas associadas estejam ligados ao desenvolvimento da doença. As características observadas em pacientes com Alzheimer são principalmente de alterações no tecido cerebral, como a formação de placas amilóides extracelulares, que são depósitos extracelulares amorfos de proteína β -amilóide, a formação de micro túbulos e emaranhados neurofibrilares intraneuronais, os quais aparecem em cérebros normais, porém em menores quantidades. Além da diminuição da concentração de neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina.^{55, 63, 64, 65}

Nos portadores da DA, a concentração de acetilcolina é reduzida devido ao déficit colinérgico que faz com que os neurônios a produzam em baixas quantidades. Assim, as funções cognitivas dos pacientes com DA ficam comprometidas. Para reverter esse quadro é necessária a restauração da função colinérgica, e o método que demonstrou maior eficácia clínica foi o uso de inibidores diretos da enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina.⁵⁵

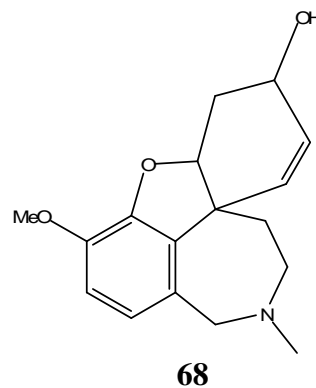
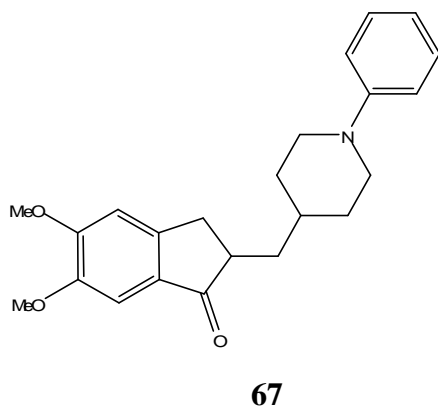
Quatro drogas já foram aprovadas pelo FDA para o tratamento da DA, a Tacrina (**65**), Rivastigmina (**66**), Donepezil (**67**) e a Galantamina (**68**), todos inibindo a AChE. Destes, a galantamina é um fármaco natural, isolado de plantas da família Amarilidaceae.⁵⁵



65



66



Com o uso de um fármaco de origem natural, e a diversidade estrutural observadas nos inibidores da AChE conhecidos, estimula-se estudos fitoquímicos na busca de novos inibidores da AChE que tenham menores riscos de efeitos colaterais, maior potência e ação prolongada. Em uma revisão publicada em 2006 por Barbosa-Filho e col.⁶⁶ com produtos naturais de inibição da AChE, com a consulta de 175 referências, foram isolados 260 compostos de 309 plantas. Destes compostos, 139 pertenciam a classe dos alcalóides, levando à observação que, assim como os alcalóides, a maioria dos compostos utilizados como inibidores da AChE apresentavam o átomo de nitrogênio em suas estruturas. Portanto, a elevada atividade anticolinesterásica encontrada em plantas pode estar relacionada ao seu conteúdo alcaloídico.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (COSY, HMQC, HMBC, Dept 135) foram realizados em espectrômetro Bruker DPX 200, operando a 200,13 MHz para ^1H e 50,32 MHz para ^{13}C , e espectrômetro Bruker DPX 400, operando a 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C , do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria. Para a preparação das amostras, utilizou-se quantidades entre 5-20 mg de amostra em 0,5 mL de solvente deuterado em tubos de 5 mm. Os solventes utilizados para a análise das amostras foram: clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6). Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). Para a calibração dos espectros utilizou-se como referência interna o TMS (δ 0,00) para os espectros de hidrogênio, e para a calibração dos espectros de carbono, utilizou-se CDCl_3 (δ 77,00) e DMSO-d_6 (δ 39,50).

4.1.2 Materiais e métodos cromatográficos

Foram realizadas separações cromatográficas em coluna (CC), com diferentes diâmetros interno, utilizando sílica gel tipo 60 (Sorbent), 70-230 e 230-400 mesh, como adsorvente, numa relação de 1 g de amostra: 30 g de sílica. Para a purificação dos compostos utilizou-se a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se placas de vidro (20 cm x 20 cm) recobertas com o adsorvente gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Sorbent). A cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromato folhas de alumínio, como suporte, e sílica gel 60 F₂₅₄ como adsorvente. As cromatoplasmas foram reveladas através de lâmpada ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm, Spectroline), reativo de Dragendorff para a revelação dos alcalóides e nebulização com solução de álcool etílico e ácido sulfúrico (95:5 v/v) seguido de aquecimento para demais metabólitos.

4.1.3 Reagentes e solventes utilizados

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho possuem procedência Belga, Vetec e Tedia, de grau comercial, sendo purificados por técnicas de destilação. A polaridade de misturas dos solventes usados na Cromatografia em Coluna, Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa são indicadas no decorrer do texto.

4.1.4 Aparelho de Ponto de Fusão

Os pontos de fusão (PF) das substâncias foram determinados em aparelhos MQAPF-301 da Microquímica Equipamentos.

4.1.5 Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa-CG/EM

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo a gás Varian modelo 3400. Os sinais foram observados através de detector de ionização de chama (DIC), injetor split-splitless, operando com temperaturas do injetor e detector a 220 e 280°C, respectivamente, utilizando hidrogênio como gás de arraste. As análises de espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa foram realizadas em aparelho Shimadzu, com coluna 5MS de polaridade intermediária.

4.1.6 Espectrômetro de Difração de Raios-X

As medidas Cristalográficas foram obtidas em aparelho Bruker X8 Kappa-Apex II CCD empregando radiação Mo K α de propriedade do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

4.1.7 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro

Para realização das medidas de rotação óptica utilizou-se polarímetro automático Perkin Almmmer, modelo 343.

4.2 *Helietta apiculata* Benth

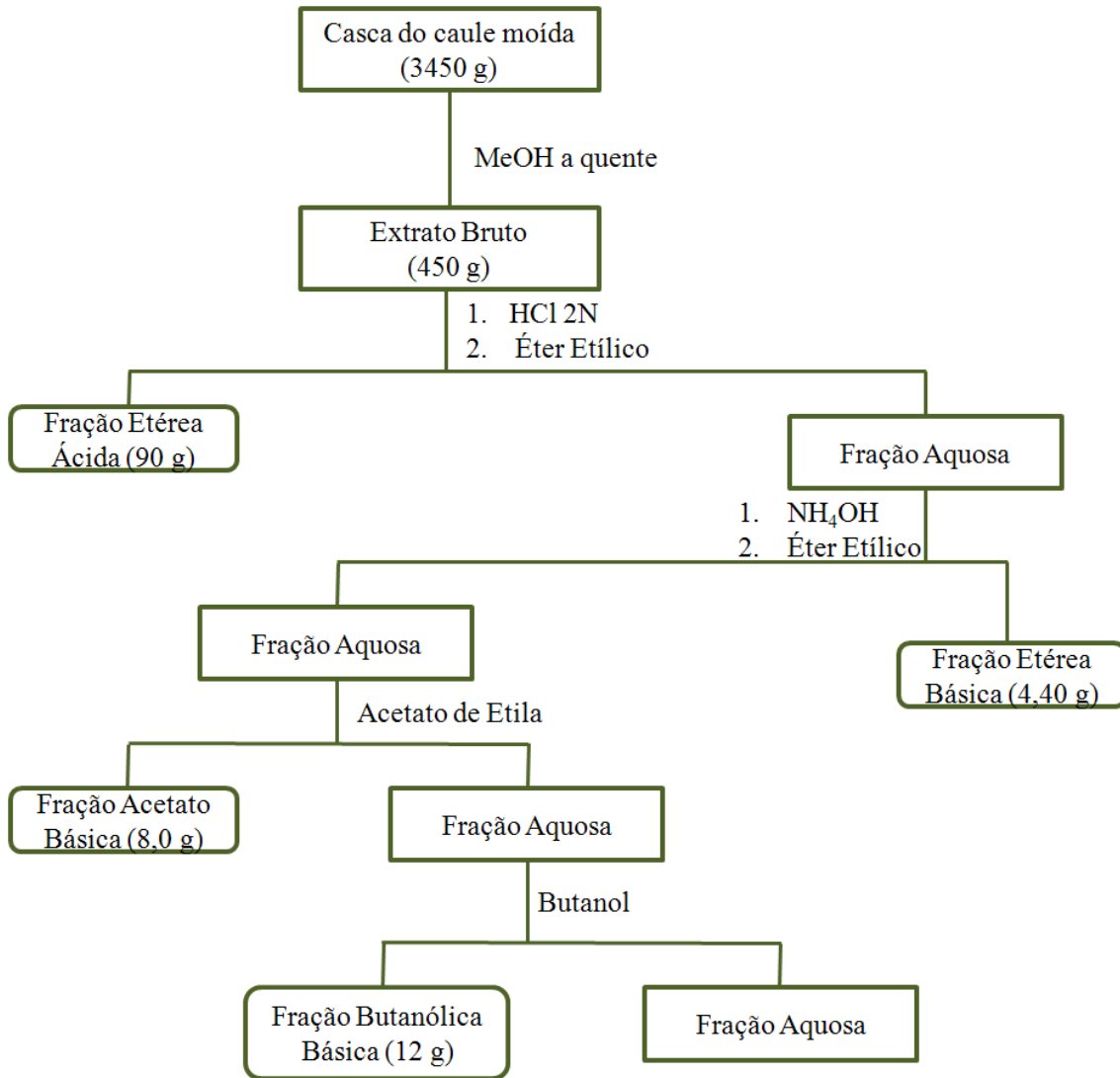
A casca do caule (3,5 Kg) da espécie *Helietta apiculata* Benth foi coletada no mês de outubro de 2009, no interior do município de Mata (29°31'13,1''S; 54°28'23,02''O). As folhas da espécie, utilizadas nas extrações de óleos voláteis, também foram coletadas no interior do município de Mata, porém em diferentes épocas do ano. Para a avaliação da composição química do óleo essencial durante o inverno as folhas foram coletadas em julho; em outubro para avaliação referente à primavera, em janeiro para avaliação do verão, e para avaliação do outono, fez-se a coleta em abril.

A identificação do material botânico foi feita pela professora Dr^a. Sônia Maria Eisinger, sendo que uma exsicata da planta encontra-se no Herbário do Departamento de Botânica – UFSM, sob número SMDB 12504.

4.2.1 Extração, fracionamento e cromatografia

O material coletado, cascas do caule, foi seco em estufa de ar circulante a uma temperatura de 50°C, e moídas a fino grão (3,450 Kg) em moinho Wiley. Realizou-se a extração deste material com metanol à quente, onde o material foi alojado em balão de 5 L com a adição de metanol até a cobertura total do mesmo. O solvente foi evaporado a pressão reduzida uma vez ao dia, até completa exaustão, durante doze dias, resultando num resíduo escuro e viscoso, denominado Extrato Bruto Metanólico (EBM).

Este Extrato Bruto (450 g) foi solubilizado em água e acidificado com ácido clorídrico (HCl) 2N a pH próximo de 1,5, e extraído exaustivamente com éter etílico em ampola de separação. Eliminou-se o solvente em rota evaporador, obtendo-se um resíduo verde escuro, denominado de Fração Etérea Ácida (FEA). A solução aquosa remanescente foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) a pH 9,0, e extraída exaustivamente com éter etílico, acetato de etila e n-butanol. Após cada extração efetuou-se a evaporação do solvente em rota evaporador para concentração das frações resultantes, Fração Etérea Básica (FEB), Fração Acetato Básica (FAB) e Fração Butanólica Básica (FBB), conforme Esquema 1.



Esquema 1: Fracionamento do Extrato Bruto de *Helietta apiculata*.

As frações obtidas foram submetidas à análise em CCD, utilizando-se vários sistemas de solvente, e reveladas em lâmpada UV_{254nm} e UV_{365nm}, reagente de Dragendorff e ácido sulfúrico/álcool etílico (5:95 v/v). Deste modo observou-se que as frações, etérea e acetato, básicas apresentaram manchas alaranjadas frente ao reagente Dragendorff, mostrando positividade para alcalóides. Já a fração etérea ácida e a fração butanólica básica, apresentaram manchas escuras quando reveladas em ácido sulfúrico, seguido de aquecimento.

Visto que as frações básicas, etérea e acetato, se revelaram positivas para alcalóides, estas foram analisadas individualmente para o isolamento e identificação destes, além do isolamento de outros metabólitos.

4.2.2 Fração Etérea Básica

A fração etérea básica (4,40 g) foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária, com proporção de 1:30 (g amostra: g sílica), e hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol como sistema eluente. Foram coletadas frações de 50 mL e rotaevaporadas. Estas foram reunidas conforme suas similaridades, quando comparadas em CCD, conforme descreve a Tabela 1.

Tabela 1: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Etérea Básica

| Subfrações | Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|------------|-----------|------------------|--------------------|--------|
| I | 1 a 14 | Hexano | Mistura | 30 mg |
| II | 15 a 26 | Hex/Dicloro 10% | Mistura | 100 mg |
| III | 27 a 34 | Hex/Dic 25% | Mistura | 160 mg |
| IV | 35 a 48 | Hex/Dic 50% | Mistura | 800 mg |
| V | 49 a 70 | Dicloro | Mistura | 1,0 g |
| VI | 71 a 80 | Dic/Acetato 25% | Mistura | 320 mg |
| VII | 81 a 94 | Dic/Acet 50% | Limonina + Mistura | 530 mg |
| VII | 95 a 106 | Acetato | Mistura | 850 mg |
| IX | 107 a 119 | Acet/Metanol 25% | Mistura | 430 mg |
| X | 120 a 132 | Acet/MeOH 50% | Mistura | 270 mg |
| XI | 133 a 138 | Metanol | Mistura | 160 mg |

Na subfração VII, frações 81 a 94, houve a formação de cristais, os quais foram submetidos à lavagem com metanol para limpeza. Quando testado em CCD, apresentaram-se puros. As análises de RMN de ^1H e ^{13}C levaram a identificação do composto como sendo um limonóide, conhecido como limonina (**42**). A estrutura deste limonóide foi confirmada através de medidas de difração de raios-X.

A subfração IV, frações 35-48, (800 mg), foi novamente colunada com hexano/diclorometano/acetato de etila num gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas frações de 30 mL, sendo reunidas após análise por CCD, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Separação em CC da subfração IV

| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|---------|--------------|----------------------------|--------|
| 1 a 10 | Hex/Dic 25% | Mistura | 80 mg |
| 11 a 23 | Hex/Dic 50% | Mistura | 180 mg |
| 24 a 38 | Dicloro | γ -fagarina+mistura | 170 mg |
| 39 a 46 | Dic/MeOH 10% | Mistura | 190 mg |
| 47 a 52 | Dic/MeOH 50% | Mistura | 160 mg |

Nas frações 24 a 38 pode-se perceber a ocorrência de um alcalóide através da revelação de CCD com o reativo de Dragendorff. Este metabólito foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) através de eluição com diclorometano 100% e algumas gotas de hidróxido de amônio. Após, confirmou-se a pureza do mesmo a partir de eluição em CCD. As análises de RMN de ^1H e ^{13}C , além de comparação com dados da literatura levaram a identificação deste alcalóide como sendo a γ -fagarina (**9**), bastante comum em plantas da família Rutaceae.

Uma nova coluna da subfração V, frações 49 a 70, (1,0 g), foi realizada com eluição de hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol num gradiente de polaridade. A partir desta eluição foram coletadas amostras de 30 mL, que foram rotaevaporadas e reunidas conforme suas similaridades em CCD, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Separação em CC da subfração V

| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|---------|--------------|----------------------|--------|
| 1 a 18 | Hex/Dic 25% | Mistura | 98 mg |
| 19 a 32 | Hex/Dic 50% | Mistura | 80 mg |
| 33 a 45 | Dicloro | Mistura | 260 mg |
| 46 a 54 | Dic/Acet 5% | Chalepina+ mistura | 140 mg |
| 55 a 65 | Dic/Acet 25% | Mistura | 110 mg |
| 66 a 78 | Dic/Acet 50% | Kokusaginina+mistura | 90 mg |
| 79 a 86 | Acetato | Mistura | 85 mg |
| 87 a 96 | Acet/Metanol | Mistura | 78 mg |

Quando aplicado em CCD, as frações 46 a 54 revelaram um composto em maior quantidade e de fácil separação, o mesmo foi então purificado através de CCDP com eluição

de diclorometano/acetato de etila 25%, demonstrando pureza após este procedimento. Analisando espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , e comparação com dados da literatura, identificou-se o metabólito como sendo uma cumarina denominada Chalepina (**27**).

Das frações 66 a 78, isolou-se um metabólito que frente ao reativo de Dragendorff apresentou coloração alaranjada, demonstrando se tratar de um alcalóide. O mesmo foi purificado através de CCDP (diclorometano 100%). Com a análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , e de posse de dados já descritos na literatura propôs-se a estrutura como sendo o alcalóide kokusaginina (**17**).

A partir da subfração VI, frações 71 a 80 (320 mg), fez-se uma nova coluna eluida em diclorometano e acetato de etila com gradiente de polaridade. Coletaram-se amostras de 30 mL, que foram rotaevaporadas e reunidas conforme suas similaridades em CCD, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Separação em CC da subfração VI

| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|---------|--------------|--------------------|-------|
| 1 a 10 | Dicloro | Mistura | 20 mg |
| 11 a 18 | Dic/Acet 5% | Mistura | 50 mg |
| 19 a 27 | Dic/Acet 10% | Mistura | 40 mg |
| 28 a 39 | Dic/Acet 25% | Maculina + mistura | 90 mg |
| 40 a 49 | Dic/Acet 50% | Mistura | 65 mg |
| 50 a 64 | Acetato | Mistura | 30 mg |

As frações 28 a 39 acusaram a presença de um alcalóide quando revelada sua CCD com reativo de Dragendorff. Como se apresentava de fácil separação foi submetido à CCDP para purificação, com eluição de diclorometano 100%. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C , e comparação com dados da literatura, revelaram ser o alcalóide Maculina (**24**).

4.2.3. Fração Acetato Básica

A fração acetato básica (8,0 g) foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária, e hexano/acetato de etila/metanol como sistema eluente. Foram coletadas frações de 50 mL e evaporadas, sendo reunidas conforme suas similaridades após comparação de CCD, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Acetato Básica

| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|------------------|------------------|-------------|--------|
| I - 1 a 16 | Hexano | Mistura | 60 mg |
| II - 17 a 23 | Hex/Acet 10% | Mistura | 130 mg |
| III - 24 a 32 | Hex/Acet 25% | Mistura | 350 mg |
| IV - 33 a 54 | Hex/Acet 50% | Mistura | 930 mg |
| V - 55 a 69 | Acetato | Mistura | 600 mg |
| VI - 70 a 93 | Acet/Metanol 25% | Mistura | 3,9 g |
| VII - 94 a 107 | Acet/MeOH 50% | Mistura | 280 mg |
| VIII – 108 a 116 | Metanol | Mistura | 200 mg |

A subfração III, frações 24-32, (350 mg) foi colunada em hexano/acetato de etila/metanol em ordem crescente de polaridade. Coletaram-se frações de 30 mL, que foram reunidas após análise em CCD, conforme a Tabela 6.

Tabela 6: Separação em CC da subfração III

| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|---------|---------------|---------------------------------------|-------|
| 1 a 16 | Hex/Acet 10% | Mistura | 20 mg |
| 17 a 29 | Hex/Acet 25% | Mistura | 60 mg |
| 30 a 47 | Hex/Acet 50% | Derivados do ácido cinâmico + mistura | 90 mg |
| 48 a 56 | Acetato | Mistura | 80 mg |
| 57 a 69 | Acet/MeOH 25% | Mistura | 60 mg |

Nas frações 30 a 47 pode-se perceber a ocorrência de um metabólito em maior quantidade. Este foi purificado por CCDP com eluição de diclorometano 100%. Após análises de RMN de ^1H e ^{13}C , e espectrometria de massa, pode-se perceber que se tratava de uma mistura de substâncias, numa relação de 3:1. Estes foram identificados como 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (**55**), derivados do ácido cinâmico.

Uma nova coluna foi realizada da subfração IV, frações 33 a 54, (930 mg), onde foram usados hexano/acetato de etila/metanol como sistema eluente. Foram coletadas frações de 30

mL, rotaevaporadas e reunidas conforme suas similaridades em CCD, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7: Separação em CC da subfração IV

| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|---------|---------------|---------------|--------|
| 1 a 18 | Hex/Acet 10% | Mistura | 70 mg |
| 19 a 32 | Hex/Acet 25% | Mistura | 80 mg |
| 33 a 47 | Hex/Acet 50% | T26 + mistura | 110 mg |
| 48 a 60 | Acetato | Mistura | 215 mg |
| 61 a 73 | Acet/MeOH 25% | Mistura | 180 mg |
| 74 a 87 | Acet/MeOH 50% | Mistura | 160 mg |

Uma nova coluna foi efetuada da subfração VI, frações 70 a 93, (3,9 g) proveniente da fração acetato básica, utilizando como sistema eluente diclorometano/acetato de etila/metanol, num gradiente de polaridade. Coletaram-se frações de 30 mL, as quais foram rotaevaporadas e reunidas conforme suas similaridades em CCD, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Separação em CC da subfração VI

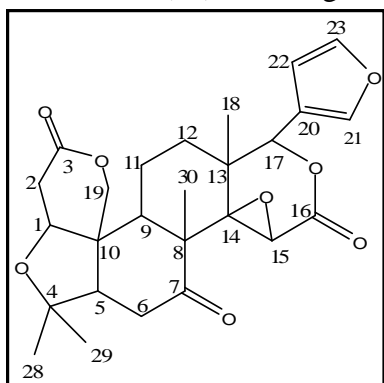
| Frações | % Solventes | Substâncias | Peso |
|-----------|---------------|----------------------|--------|
| 1 a 23 | Dicloro | Mistura | 280 mg |
| 24 a 42 | Dic/Acet 25% | Isodictamina+mistura | 610 mg |
| 43 a 59 | Dic/Acet 50% | Mistura | 520 mg |
| 60 a 83 | Acetato | Mistura | 840 mg |
| 84 a 97 | Acet/MeOH 25% | Mistura | 230 mg |
| 98 a 110 | Acet/MeOH 50% | Mistura | 750 mg |
| 111 a 119 | Metanol | Mistura | 430 mg |

As frações 24 a 42 mostraram mancha alaranjada quando reveladas com reagente de Dragendorff, indicando a presença de alcalóide. O mesmo foi purificado através de CCDP (diclorometano/acetato de etila 25%). Ao serem analisados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, e comparação com dados já descritos na literatura, pode-se identificar a substância como sendo o alcalóide isodictamina (**11**).

4.3 DADOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

4.3.1 Fração Etérea Básica

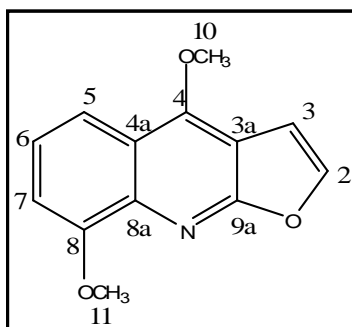
Limonina (42): 350 mg, cristais branco amarelado, PF: 290,4-294,3°C (Lit. 295-296°C)⁶⁷;



Rf: 0,88 cm em Clorofórmio/Metanol 80:20; RMN ¹H a 400 MHz, DMSO: δ 1,01 (3H, s, H-30), 1,03 (3H, s, H-29), 1,12 (3H, s, H-18), 1,19 (3H, s, H-28), 1,29 (1H, m, H-12), 1,72 (2H, m, H-11;H-12), 1,84 (1H, m, H-11), 2,25 (1H, d, *J*=16,0 Hz, H-6), 2,43 (1H, d, *J*=16,0 Hz, H-5), 2,58 (1H, d, *J*=15,0 Hz, H-9), 2,64 (1H, d, *J*=15,8 Hz, H-2), 2,74 (1H, d, *J*=16,5 Hz, H-2), 3,09 (1H, t, *J*=15,5 Hz, H-6), 4,11 (1H, s, H-1), 4,11 (1H, s, H-15),

4,50/4,90 (2H, d, *J*=13,0 Hz, H-19), 5,47 (1H, s, H-17), 6,48 (1H, s, H-22), 7,68 (1H, s, H-21), 7,62 (1H, s, H-23); RMN de ¹³C a 100 MHz, DMSO: δ 16,90 (C-30), 17,42 (C-11), 21,22 (C-29), 29,00 (C-12), 29,58 (C-28), 35,45 (C-2), 36,03 (C-6), 37,54 (C-13), 45,17 (C-10), 46,40 (C-9), 50,19 (C-8), 53,63 (C-15), 58,03 (C-5), 64,66 (C-19), 66,54 (C-14), 77,29 (C-17), 78,33 (C-1), 79,31 (C-4), 109,96 (C-22), 141,47 (C-21), 143,10 (C-23), 166,95 (C-16), 169,79 (C-3), 207,67 (C-7).

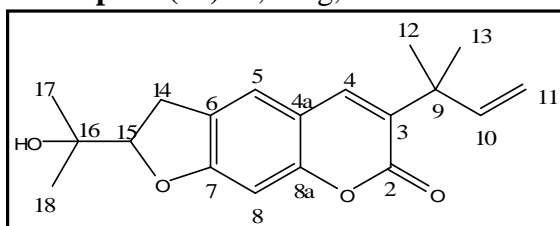
γ-fagarina (9): 6 mg, sólido amarelo alaranjado, PF: 142,6-145,8 °C (Lit. 141-142°C)¹⁶; Rf:



0,44 cm em Clorofórmio/Acetato de Etila 95:5; RMN ¹H a 400 MHz, CDCl₃: δ 4,07 (3H, s, H-11), 4,43 (3H, s, H-10), 7,04 (1H, d, *J*=7,7 Hz, H-7), 7,07 (1H, d, *J*=2,8 Hz, H-3), 7,35 (1H, dd, *J*=7,7; 8,5 Hz, H-6), 7,64 (1H, d, *J*=2,8 Hz, H-2), 7,84 (1H, dd, *J*=1,1; 8,5 Hz, H-5); RMN de ¹³C a 100 MHz, CDCl₃: δ 55,96 (C-11), 59,00 (C-10), 103,93 (C-3a), 104,50 (C-3), 107,78 (C-

7), 114,10 (C-5), 119,71 (C-4a), 123,42 (C-6), 137,58 (C-8a), 143,90 (C-2), 154,62 (C-8), 156,90 (C-4), 163,24 (C-9a).

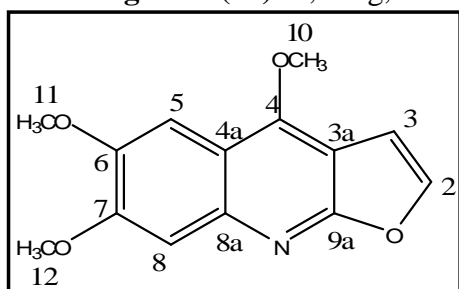
Chalepina (27): 8,2 mg, sólido branco. PF: 126-129°C (Lit. 118-119°C)⁶⁸; Rf: 0,55 cm em



Clorofórmio/Acetato de Etila 80:20; [α]_D = -28°, CHCl₃, (Lit. [α]_D = +28°)⁶⁸; RMN ¹H a 200 MHz, CDCl₃: δ 1,22 (3H, s, H-17), 1,35 (3H, s, H-18), 1,45 (6H, s, H-13, H-12), 3,19 (2H, d, *J*=8,8

Hz, H-14), 4,71 (1H, t, $J=8,8$ Hz, H-15), 5,04 (1H, dd, $J=6,0$; 1,0 Hz, H-11), 5,10 (1H, s, H-11), 6,16 (1H, dd, $J=16,0$; 10,2 Hz, H-10), 6,69 (1H, s, H-8), 7,18 (1H, s, H-5), 7,47 (1H, s, H-4); RMN de ^{13}C a 50 MHz, CDCl_3 : δ 24,2 (C-17), 26,0 (C-12, C-13, C-18), 29,58 (C-14), 40,27 (C-9), 71,68 (C-16), 90,87 (C-15), 97,1 (C-8), 112,03 (C-11), 113,12 (C-4a), 123,21 (C-5), 124,53 (C-6), 130,87 (C-3), 138,02 (C-4), 145,59 (C-10), 154,62 (C-8a), 160,17 (C-2), 162,23 (C-7).

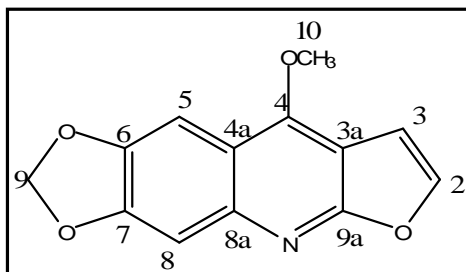
Kokusaginina (17): 7,3 mg, sólido branco. PF: 165-170°C (Lit. 168-170°C)⁴⁰; Rf: 0,82 cm



em Clorofórmio/Acetato de Etila 80:20; RMN ^1H a 200 MHz, CDCl_3 : δ 4,02 (3H, s, H-12), 4,03 (3H, s, H-11), 4,44 (3H, s, H-10), 7,05 (1H, d, $J=2,8$ Hz, H-3), 7,35 (1H, s, H-8), 7,47 (1H, s, H-5), 7,57 (1H, d, $J=2,8$ Hz, H-2); RMN de ^{13}C a 100 MHz, CDCl_3 : δ 55,96 (C-12),

56,01 (C-11), 58,84 (C-10), 100,23 (C-5), 102,21 (C-3a), 104,57 (C-3), 106,61 (C-8), 112,93 (C-4a), 142,42 (C-2), 142,42 (C-8a), 147,81 (C-6), 152,65 (C-7), 155,62 (C-4), 162,98 (C-9a).

Maculina (24): 50 mg, cristal branco. PF: 192-196°C (Lit. 196-197°C)⁴⁰; Rf: 0,46 cm em

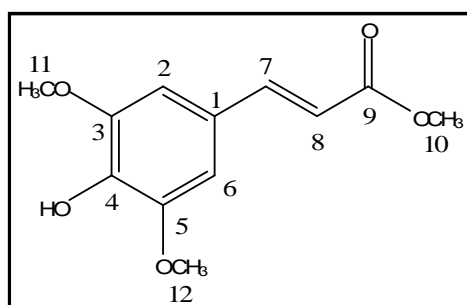


Clorofórmio/Acetato de Etila 80:20; RMN ^1H a 200 MHz, CDCl_3 : δ 4,39 (3H, s, H-10), 6,07 (2H, s, H-9), 7,02 (1H, d, $J=2,8$ Hz, H-3), 7,29 (1H, s, H-8), 7,50 (1H, s, H-5), 7,56 (1H, d, $J=2,8$ Hz, H-2); RMN de ^{13}C a 50 MHz, CDCl_3 : δ 59,28 (C-10), 98,39 (C-5), 101,96 (C-9),

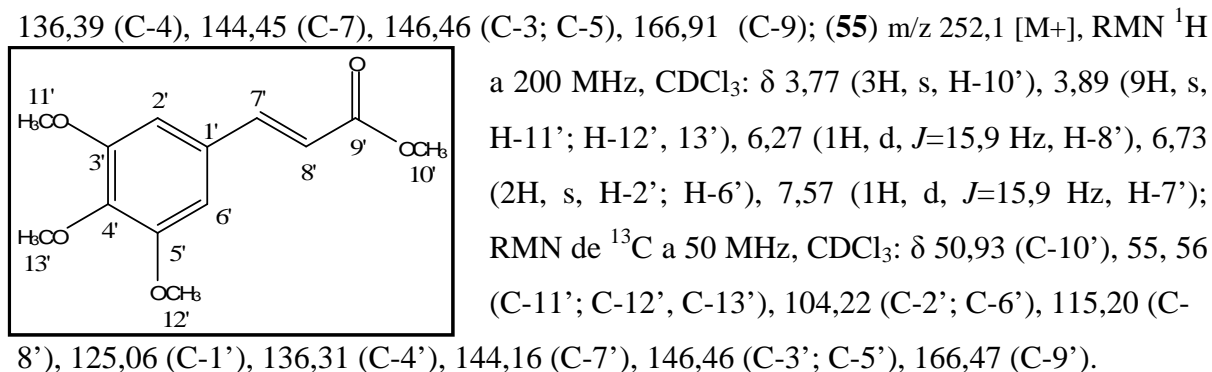
102,86 (C-4a), 104,82 (C-3), 104,86 (C-8), 114,69 (C-3a), 142,94 (C-2), 144,20 (C-8a), 146,45 (C-6), 151,13 (C-7), 156,35 (C-4), 163,49 (C-9a).

4.3.2 Fração Acetato Básica

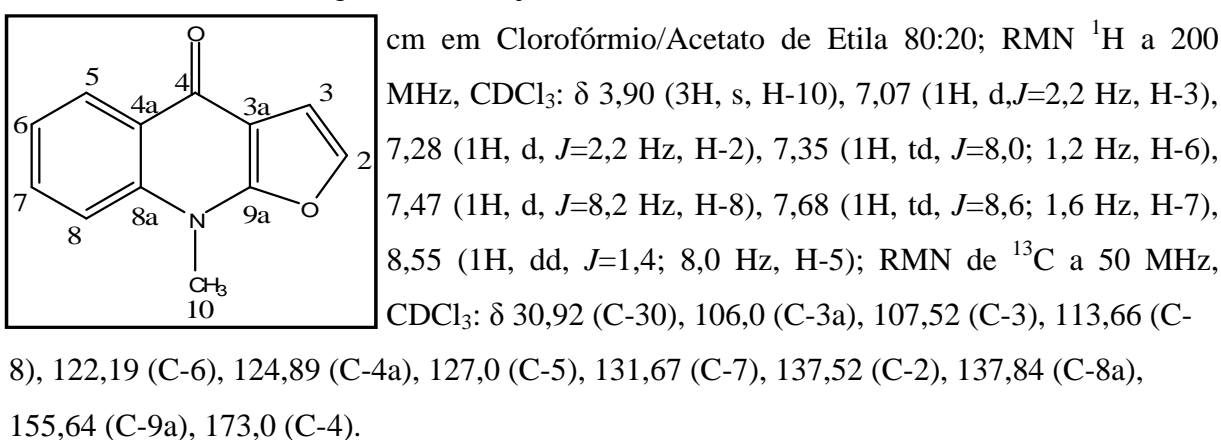
4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (69) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (55):



32 mg, resíduo amarelo claro; (**69**) m/z 238,1 [M⁺]; RMN ^1H a 200 MHz, CDCl_3 : δ 3,77 (3H, s, H-10), 3,89 (6H, s, H-11; H-12), 6,27 (1H, d, $J=15,9$ Hz, H-8), 6,73 (2H, s, H-2; H-6), 7,57 (1H, d, $J=15,9$ Hz, H-7); RMN de ^{13}C a 50 MHz, CDCl_3 : δ 50,93 (C-10), 55, 56 (C-11; C-12), 104,26 (C-2; C-6), 114,71 (C-8), 125,15 (C-1),



Isodictamina (11): 28 mg, sólido laranja claro. PF: 184,3-187,8 (Lit. 185-188°C)¹⁶; Rf: 0,33



4.4 ÓLEO VOLÁTIL DE *Helietta apiculata* Benth

4.4.1 Extração de Óleos Voláteis

Os óleos voláteis foram extraídos através de arraste de vapor de água, utilizando aparelho de Clevenger modificado. As folhas da espécie *H. apiculata* foram coletadas acompanhando a variação da sazonalidade, sendo coletadas folhas no inverno (780 g), primavera (450 g), verão (1800 g) e outono (700 g). Estas foram trituradas em liquidificador, e alocadas em balão de 5 L com água para proceder a extração, durante um período de 5 horas. Após a extração, separou-se o óleo da água utilizando-se éter etílico. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio e evaporou-se o solvente em rotaevaporador com pouco aquecimento, evitando assim uma possível decomposição do óleo. Este foi armazenado em congelador após injeção em CG/EM para identificação dos constituintes presentes no óleo.

Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados através da injeção de uma mistura de *n*-alcanos (C₈ a C₂₆) com tempo de retenção e ordem de eluição conhecidos através da equação:

$$IK = 100n + \Delta n \frac{R_i - R_n}{R_m - R_n}$$

Onde:

IK = Índice de Kovats

n = número de carbonos do alcano que elui antes da amostra

Δn = número de carbonos do alcano que elui depois de i menos o número de carbonos do alcano que elui antes da amostra

R_i = tempo de retenção da amostra

R_n = tempo de retenção do alcano que elui antes da amostra

R_m = tempo de retenção do alcano que elui depois da amostra

Os índices de retenção de Kovats dos constituintes dos óleos foram determinados e comparados com os padrões de igual índice de retenção, encontrados na literatura.⁶⁹

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante dos extratos, frações e metabólitos isolados fez-se uso de um ensaio qualitativo, aplicando-se o método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) descrito por Hostettmann,⁷⁰ através de um “screening” das amostras testadas em várias concentrações.

Fez-se uso, também, do método quantitativo realizado pela medida da leitura de absorvância das amostras frente uma amostra branco e um padrão (BHT).

4.5.1 Método do radical livre – Bioautografia

O método fundamenta-se na redução do radical DPPH, onde é avaliada a capacidade dos compostos testados em serem doadores de hidrogênio – ação antioxidante. A solução de DPPH possui uma coloração violeta que descolore progressivamente tornando-se amarelada, permitindo assim, a observação da capacidade antioxidante do composto testado.

Foram testados os compostos isolados através da aplicação pontual dos mesmos nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$ em cromatoplas. Através de borrifamento, o DPPH é aplicado sobre as cromatoplas, as quais ficam com coloração

violeta. Após 30 minutos, em repouso, as amostras ativas descolorem o DPPH, formando manchas claras sobre a placa violeta, caracterizando atividade antioxidante positiva.

4.5.2 Método do radical livre – Ensaio quantitativo

Quando a capacidade antioxidante é avaliada pelo método quantitativo, as amostras testadas, juntamente com o padrão BHT (di-terc-butil metil fenol) são preparados nas concentrações de 20 µg/mL em etanol. Em seguida, 1 mL da amostra é transferida para tubos de ensaio onde são acrescentados 2 mL de etanol, procedendo-se as diluições em série até se obter concentrações de 500 a 3,9 µg/mL. A cada diluição são acrescentados 0,5 mL de solução de DPPH 0,004%. As amostras permanecem à temperatura ambiente por 30 minutos sob proteção da luz. Após esse tempo faz-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 517 nm para medir a redução do radical livre, contra uma amostra em branco preparada para cada diluição. Empregou-se uma solução de etanol (2 mL), acrescentado de 0,5 mL de solução metanólica 0,004% de DPPH como controle, sendo 0% de inibição.

Para avaliar a atividade de captura do radical pelas amostras testadas, a porcentagem de inibição é calculada pela fórmula: % de inibição = $[(Ac-Aa)/Ac] \times 100$, onde Ac é a absorbância da solução controle e Aa é a absorbância da amostra testada, no tempo de 30 minutos.

Através de regressão linear, a partir das médias das porcentagens, é obtida a EC₅₀, sendo a concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH.

4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de Micro diluição em Caldo

A susceptibilidade antimicrobiana de uma substância é avaliada com base na determinação de sua concentração inibitória mínima, que é a menor concentração da substância necessária para inibir o crescimento de um dado microrganismo após incubação *in vitro*. Quanto menor a CIM, maior a potência antimicrobiana, e maior a dificuldade do microrganismo em desenvolver resistência.

4.6.1.1 Microrganismos empregados nos ensaios

Utilizaram-se cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, conforme a Tabela 9.

Tabela 9: Microrganismos indicadores

| Microrganismos | | |
|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Gram-negativos | Gram-positivos | Fungos |
| <i>Escherichia coli</i> 25792 | <i>Staphylococcus aureus</i> 6538 | <i>Candida albicans</i> 10231 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2601 |
| <i>Shigella sonnei</i> 25931 | <i>Bacillus subtilis</i> 6633 | <i>Cryptococcus neoformans</i> 28952 |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 | <i>Candida tropicalis</i> |
| | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> 15305 | |

4.6.1.2 Padrões utilizados nos ensaios microbiológicos

Os padrões antibióticos, preparados conforme FDA⁷¹ foram Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos.

4.6.1.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura empregados foram:

- Caldo caseína de soja (para bactérias): cloreto de sódio (5,0g), dextrose (2,5g), fosfato dibásico de potássio (2,5g), peptona de caseína (17,0g), peptona de soja (3,0g) e água destilada (1L);
- Caldo Sabouraud dextrosado (para fungos): dextrose (40,0g), peptona de carne (5,0g), peptona de caseína (5,0g) e água destilada (1L).

A CIM foi determinada pelo Método de Micro diluição em caldo, conforme recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS).⁷² As amostras a serem testadas foram diluídas em meio líquido (metanol/DMSO – 2,5 mg/mL) que continha 2% do surfactante Tween 80, e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 500 a 3,12 µg/mL. Cada poço foi inoculado com os microrganismos (10⁶ células viáveis) e homogeneizado. As placas foram incubadas por 24

horas a 35°C para bactérias e, por 48 horas a 25°C para leveduras. Após a incubação ocorre a turvação do meio, indicando crescimento microbiano, determinando-se a CIM.

Quando as amostras testadas para determinação da CIM não apresentam crescimento nos poços, são, ainda, testadas para verificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM). São usadas para inocular placas de Petri (10µL) que contenham meio ágar, sendo determinada a Concentração Letal Mínima (CLM – CBM e CFM), a qual é a menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9% do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

4.6.2 Determinação da atividade de inibição da enzima Acetilcolinesterase

Na execução desse ensaio utilizou-se o método elaborado por Martson e Hostettmann⁷³ para CCD que emprega o reagente colorimétrico Sal Fast Blue B e solução da enzima acetilcolinesterase (250 U/mL) e albumina de soro bovino, solubilizadas em solução tampão de Ácido-tris-hidroclorídrico a pH 7,8 para borrifamento nas placas.

As CCDs utilizadas no ensaio são previamente eluídas em acetona, para que sejam removidos qualquer resíduo ou sujidades das mesmas. Os extratos e frações a serem testadas são agrupados conforme semelhança de polaridade e, depois de solubilizadas em solvente adequado, aplica-se 1 µL de uma solução contendo 25 µg da substância, observando uma distância de 1,0 cm entre cada aplicação. As CCDs são eluídas com o solvente adequado, conforme a polaridade das amostras. Após eluição, as placas são visualizadas em câmara UV e marcam-se os compostos visualizados em ambos os comprimentos de onda.

Para os metabólitos puros, preparou-se uma solução com concentração inicial de 5 µg/µL de cada composto (2 mg em 0,4 mL de solvente – no qual a substância seja solúvel). A partir da solução inicial foram realizadas diluições em série, obtendo-se assim, soluções nas concentrações de 5,0; 1,0; 0,2; 0,04; $8,0 \cdot 10^{-3}$; $1,6 \cdot 10^{-3}$ e $3,2 \cdot 10^{-4}$ µg/µL. Aplicou-se na forma pontual, 1 µL de cada solução a ser testada na CCD, observando-se uma distância de 1,0 cm entre cada ponto de aplicação. Após as CCDs são eluídas em solvente adequado. Fisostigmina foi utilizada como controle positivo neste ensaio.

Após preparação das CCDs, a solução da enzima é aplicada sobre as placas que novamente são secas, e incubadas. Na incubação utiliza-se atmosfera úmida a 37°C por 20 minutos. Passado esse tempo, são preparados, imediatamente antes do uso, os reveladores Acetato de 1-naftila (12,5 mg de acetato de 1-naftila em 5 mL de etanol) e Solução de Fast Blue B 950,0 mg de sal de Fast Blue B em 20 mL de água destilada). As CCDs são reveladas

com essas soluções através do borrifamento das mesmas sobre as placas. Com a revelação, observa-se o aparecimento de coloração violeta sobre as placas, sendo que onde ocorre a inibição da enzima provocada pelos compostos testados, visualiza-se o desenvolvimento de halos brancos no fundo violeta.

Na Figura 3, tem-se a reação ocorrida no teste com o reagente de Sal de Fast Blue B. O reagente Acetato de Naftila serve como substrato e sofre a quebra, pela acetilcolinesterase, formando o 1-naftol, o qual continua a reagir com o reagente colorimétrico Sal de Fast Blue B para formar um sal de Diazônio de coloração violeta. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase são diretamente detectados devido à formação de halos brancos na CCD.

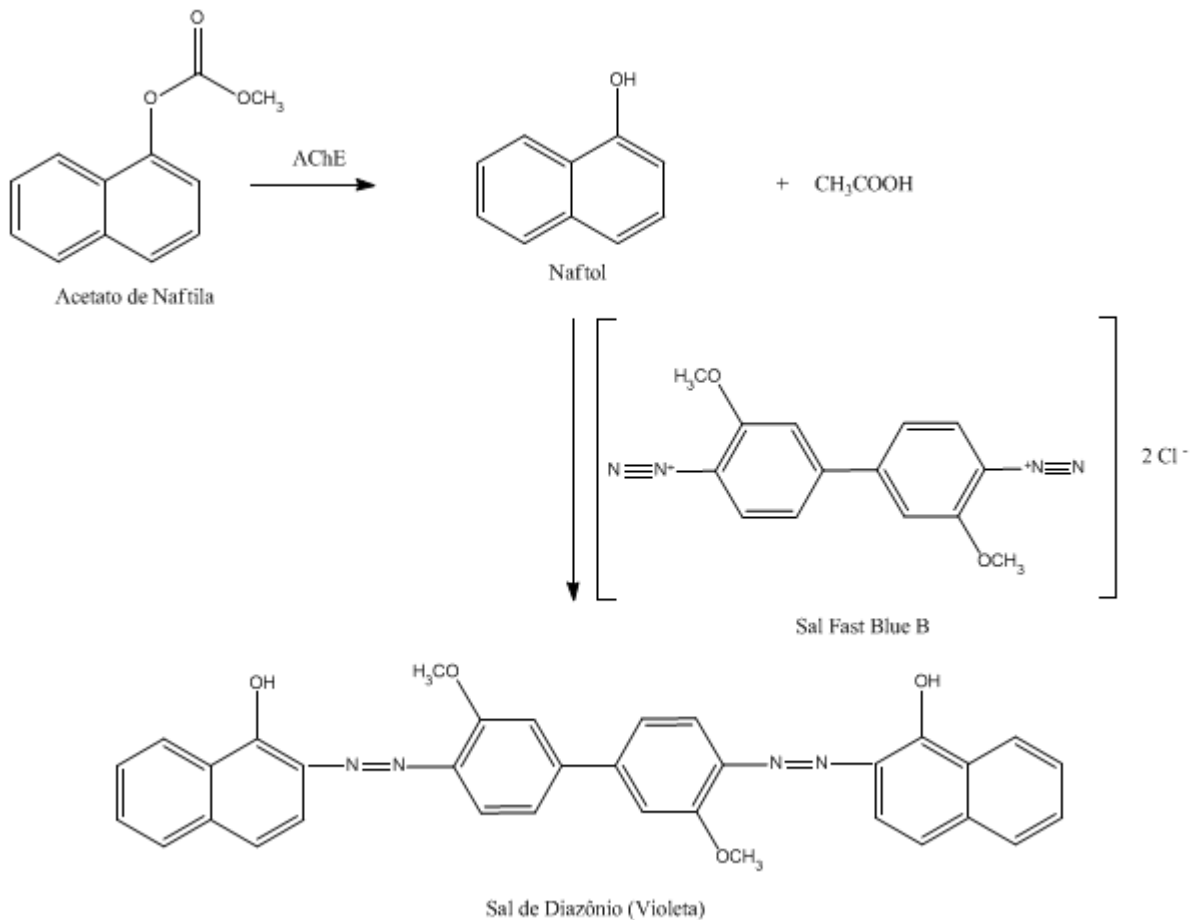


Figura 3: Reação do teste colorimétrico para revelação dos inibidores da AChE

A atividade de inibição da AChE dos compostos é expressa em pMIQ, que representa o logaritmo negativo da mínima quantidade inibitória (em mol), que produziu um halo com o mínimo de brancura observável. O limite de atividade é fixado em um pMIQ mínimo de 10,5. Compostos com valores abaixo deste pMIQ são considerados inativos ou pouco ativos.⁷⁴

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados e a discussão do estudo fitoquímico realizado com o extrato, frações e metabólitos isolados da casca do caule de *Helietta apiculata* Benth. Juntamente com a análise da composição química foi realizada a avaliação de atividades biológicas do extrato bruto, das frações e dos metabólitos isolados.

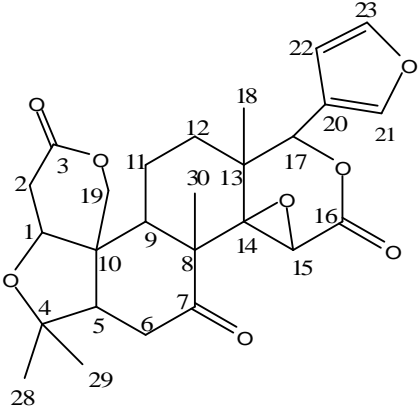
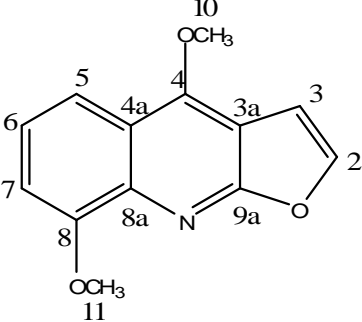
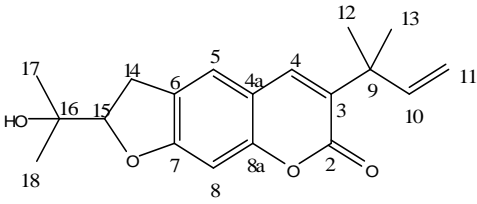
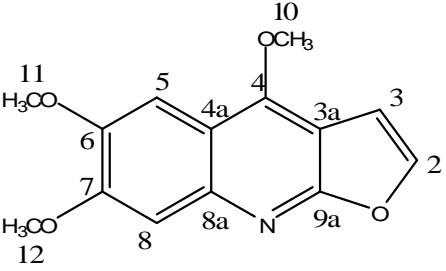
A determinação estrutural dos metabólitos isolados foi estabelecida com base na interpretação de dados espectrais, principalmente de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, dados de raios-X, espectrometria de massa, além de comparação com dados da literatura.

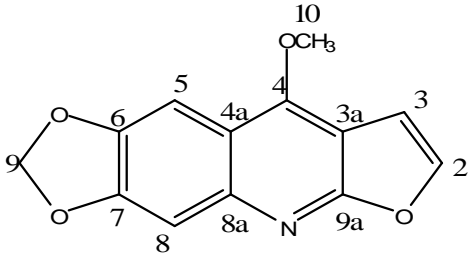
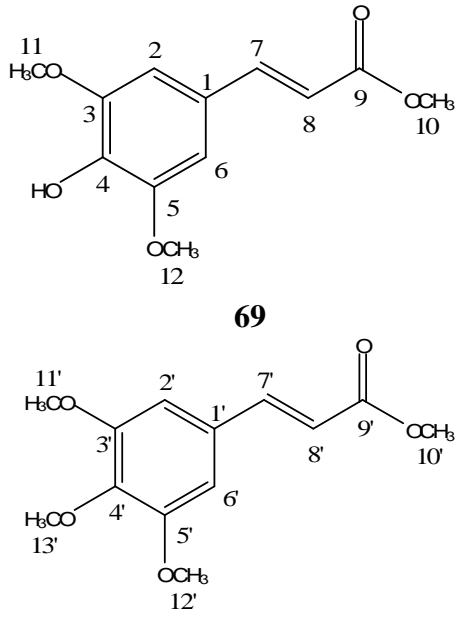
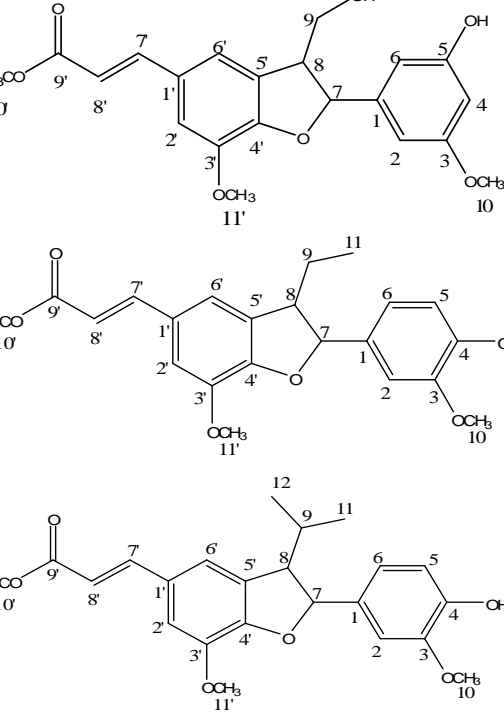
A investigação das frações básicas, etérea e acetato, conduziram ao isolamento e identificação de onze compostos. Quatro deles são alcalóides, pertencentes à classe dos furoquinolínicos, bastante comuns no gênero *Helietta*, são eles γ -fagarina (**9**), Maculina (**24**), Kokusaginina (**17**) e Isodictamina (**11**). Uma cumarina, conhecida com Chalepina (**27**), um limonóide, denominado Limonina (**42**), dois derivados do ácido cinâmico em mistura, 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (**55**), além de uma mistura de três neolignanas (**T26**), identificadas como (E)-metil 3-(2-(3-hidroxi-5-metoxifenil)-3-(hidroximetil)-7-metoxi-2,3-diidrobenzofuran-5-il)acrilato; (E)-metil 3-(3-etil-2-(3-hidroxi-5-metoxifenil)-7-metoxi-2,3-diidrobenzofuran-5-il)acrilato e (E)-metil 3-(2-(3-hidroxi-5-metoxifenil)-3-isopropil-7-metoxi-2,3-diidrobenzofuran-5-il)acrilato.

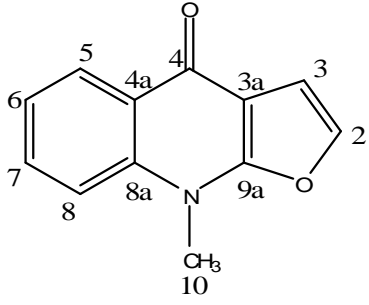
Estes compostos, assim como o extrato bruto e as frações, foram submetidos a ensaios biológicos visando determinar suas atividades antimicrobianas e de inibição da enzima AChE, além de atividade antioxidante.

No Quadro 1, estão ilustrados os compostos identificados durante este estudo.

Quadro 1: Estruturas numeradas, características e identificação dos compostos isolados

| Estrutura | Características | Identificação |
|--|---|---|
|  <p style="text-align: center;">42</p> | <p>Sólido cristalino branco amarelado</p> <p>PF: 290,4-294,3°C Lit.: 295-296°C⁶⁷</p> | <p>Limonina</p> <p>Isolamento: pág. 47 Identificação: pág. 64 Ensaio: pág. 118-127</p> |
|  <p style="text-align: center;">9</p> | <p>Sólido laranja claro</p> <p>PF: 142,6-145,8°C Lit.: 141-142°C¹⁶</p> | <p>γ-fagarina</p> <p>Isolamento: pág. 48 Identificação: pág. 75 Ensaio: pág. 118-127</p> |
|  <p style="text-align: center;">27</p> | <p>Sólido branco</p> <p>PF: 124-126°C Lit.: 118-119°C⁶⁸</p> | <p>Chalepina</p> <p>Isolamento: pág. 48-49 Identificação: pág. 78 Ensaio: pág. 118-127</p> |
|  <p style="text-align: center;">17</p> | <p>Sólido branco</p> <p>PF: 165-170°C Lit.: 168-170°C⁴⁰</p> | <p>Kokusaginina</p> <p>Isolamento: pág. 49 Identificação: pág. 84 Ensaio: pág. 118-127</p> |

| | | |
|--|---|---|
|  <p style="text-align: center;">24</p> | <p>Sólido branco</p> <p>PF: 192-196°C</p> <p>Lit.: 196-197°C⁴⁰</p> | <p>Maculina</p> <p>Isolamento: pág. 59</p> <p>Identificação: pág. 90</p> <p>Ensaio: pág. 118-127</p> |
|  <p style="text-align: center;">69</p> <p style="text-align: center;">55</p> | <p>Resíduo amarelo claro</p> | <p>4-Hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila</p> <p>3,4,5-Trimetoxicinamato de metila</p> <p>Isolamento: pág. 50</p> <p>Identificação: pág. 95</p> <p>Ensaio: pág. 118-127</p> |
|  <p style="text-align: center;">T26</p> | <p>Cristais brancos</p> | <p>T26</p> <p>Isolamento: pág. 51</p> <p>Identificação: pág. 102</p> <p>Ensaio: pág. 118-127</p> |

| | | |
|--|--|--|
|  <p style="text-align: center;">11</p> | <p>Sólido laranja claro</p> <p>PF: 184,3-187,8°C</p> <p>Lit.: 185-188°C¹⁶</p> | <p>Isodictamina</p> <p>Isolamento: pág. 51</p> <p>Identificação: pág. 110</p> <p>Ensaio: pág. 118-127</p> |
|--|--|--|

5.1 RENDIMENTOS DO EXTRATO E FRAÇÕES

Após coleta, secagem e moagem das cascas do caule, obteve-se 3450 g de planta moída, fez-se a extração do material vegetal, obtendo-se 450 g do extrato bruto metanólico (EBM). A partir deste extrato partiu-se para uma extração ácido/base, conforme descrito anteriormente (página 47), obtendo-se as frações: etérea ácida (FEA), etérea básica (FEB), acetato básica (FAB) e butanólica básica (FBB).

Os rendimentos, em relação à planta moída e ao extrato bruto, são demonstrados na Tabela 10.

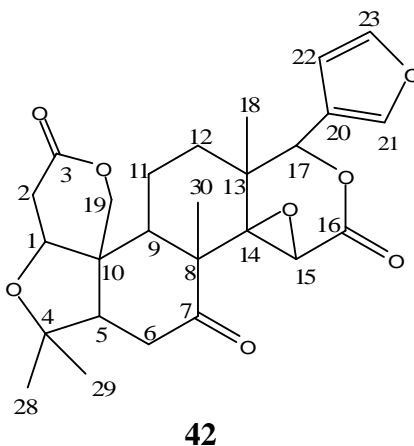
Tabela 10: Rendimentos das frações

| Frações | Quantidade obtida(g) | Em relação à casca do caule seca (%) | Em relação ao extrato Bruto (%) |
|-------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Etérea Ácida | 90 | 2,60 | 20 |
| Etérea Básica | 4,40 | 0,12 | 0,98 |
| Acetato Básica | 10 | 0,29 | 2,22 |
| Butanólica Básica | 12 | 0,34 | 2,66 |

5.2 METABÓLITOS ISOLADOS DE *Helietta apiculata* Benth: FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA

5.2.1 Limonina (42)

O limonóide Limonina (**42**), foi isolado na forma de cristais, da fração etérea básica a partir do EBM das cascas de *H. apiculata*, como descrito em Experimental (página 47), sendo identificado após análises de técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , medidas de raios-X e comparação com dados da literatura.³²



Através da análise do espectro de ^1H (Figura 4), pode-se observar quatro singletos em δ 1,01, δ 1,03, δ 1,12 e δ 1,19 ppm, atribuídos às metilas 30, 29, 18 e 28. Os sinais em δ 7,62 e δ 7,68 ppm, integrando para um hidrogênio cada, correspondem aos H-23 e H-21 respectivamente, enquanto o sinal em δ 6,48 ppm, representando um hidrogênio na forma de singlete, corresponde ao H-22, sinais estes, característicos de anel furano.

O sinal em δ 5,47 ppm, integrando para um hidrogênio na forma de singlete, é atribuído ao H-17. Os sinais em δ 4,50 (d, $J=13,0$ Hz) e δ 4,90 ppm (d, $J=13,0$ Hz) são atribuídos aos H-19. O sinal referente em δ 4,11 ppm, na forma de singlete integrando para dois hidrogênios é correspondente ao H-15 e H-1. O sinal em δ 2,74 ppm (d, $J=16,5$ Hz), foi atribuído a um dos H-2, enquanto que o sinal para o outro H-2 apresenta-se em δ 2,64 ppm, como um dubleto ($J=15,8$ Hz). Em δ 2,58 ppm (d, $J=15,0$ Hz) observa-se o sinal correspondente ao H-9. E os sinais em δ 3,09 (1H, t, $J=15,1$ Hz) e δ 2,25 ppm (1H, d, $J=16,0$ Hz), são referentes aos H-6.

Para o H-5, atribuiu-se o sinal em δ 2,43 ppm (d, $J=16,0$ Hz). Para os demais hidrogênios, H-11 e H-12, são atribuídos os sinais em δ 1,29 (1H, m.), δ 1,72 (2H, m) e δ 1,84

ppm (1H, m) esses deslocamento são melhores visualizados na expansão do espectro apresentada na Figura 5.

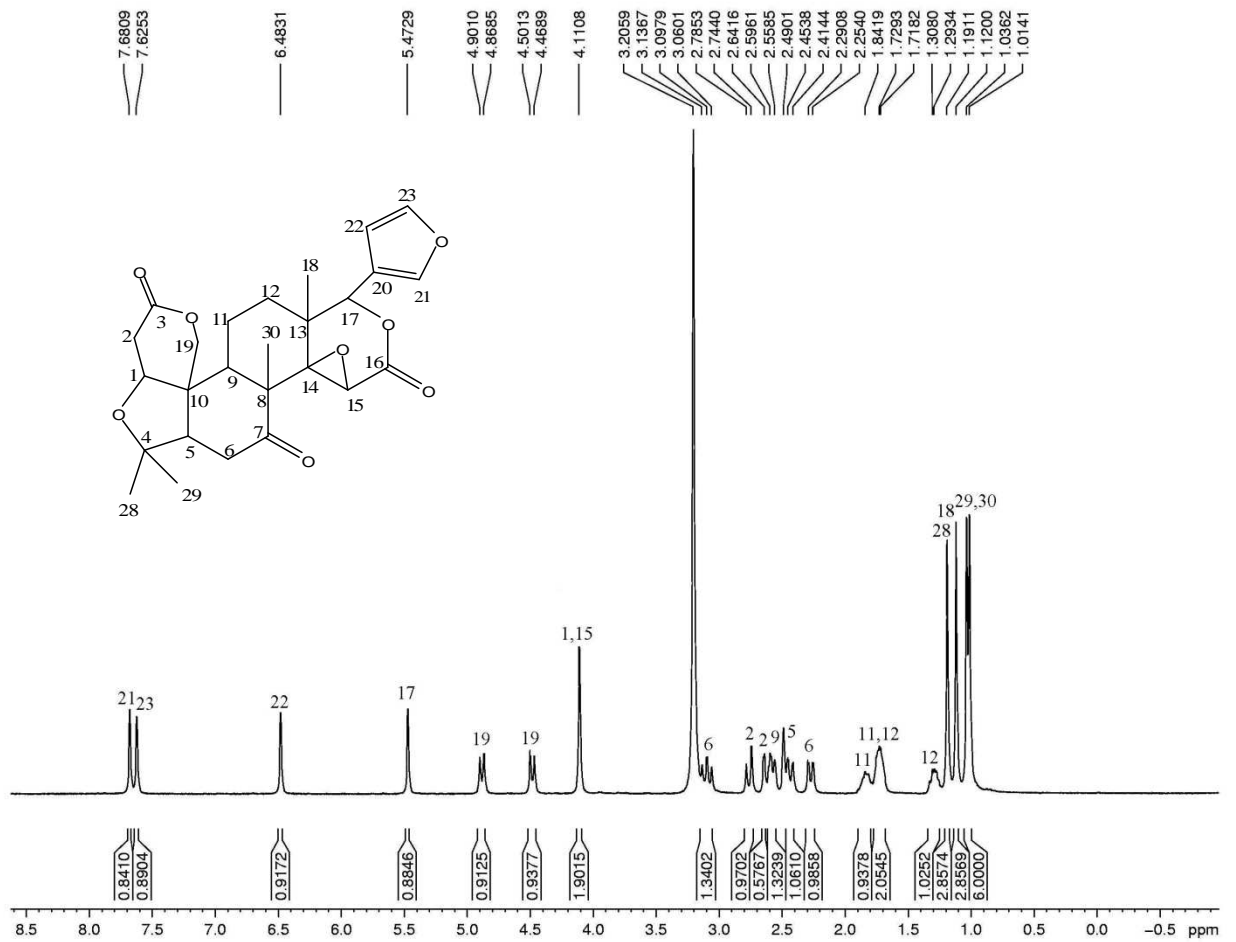


Figura 4: Espectro de RMN de ^1H de Limonina em DMSO a 400MHz

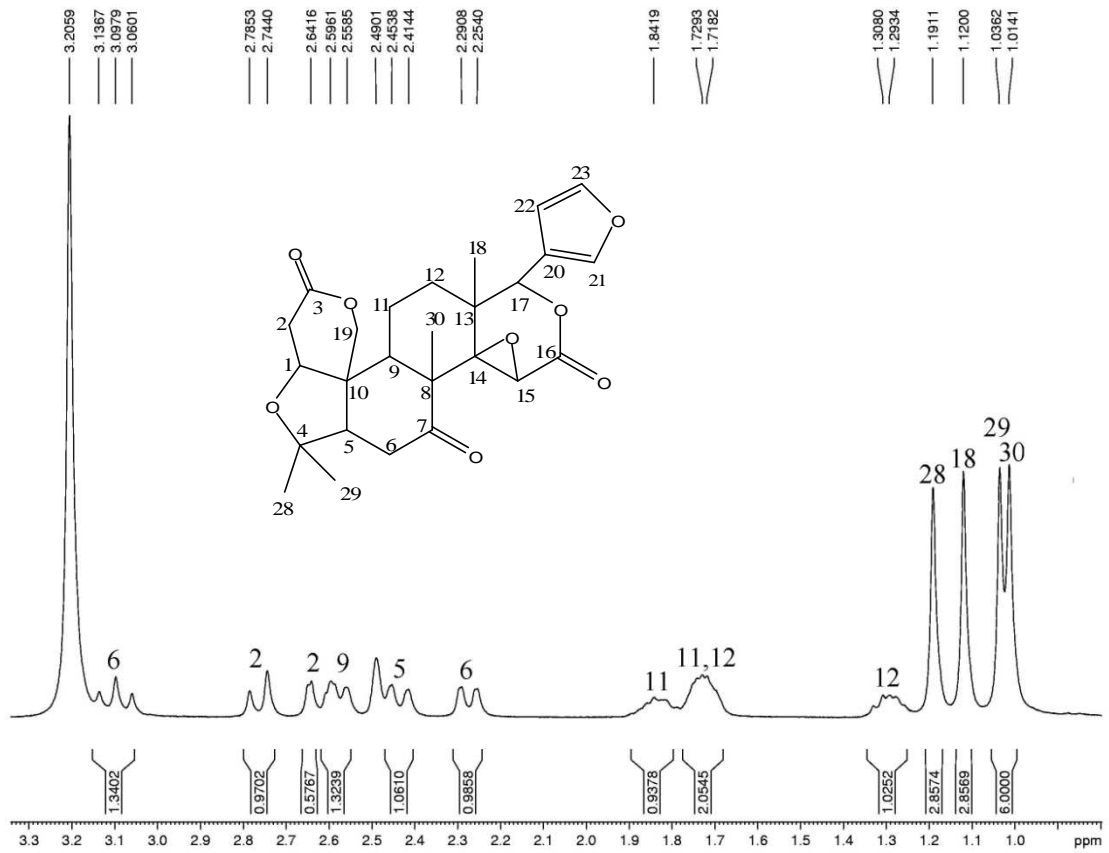


Figura 5: Espectro de RMN de ^1H expandido (0-3,3 ppm) de Limonina em DMSO a 400 MHz

No espectro 2D COSY puderam-se observar as correlações dos hidrogênios, conforme descreve a Figura 6.

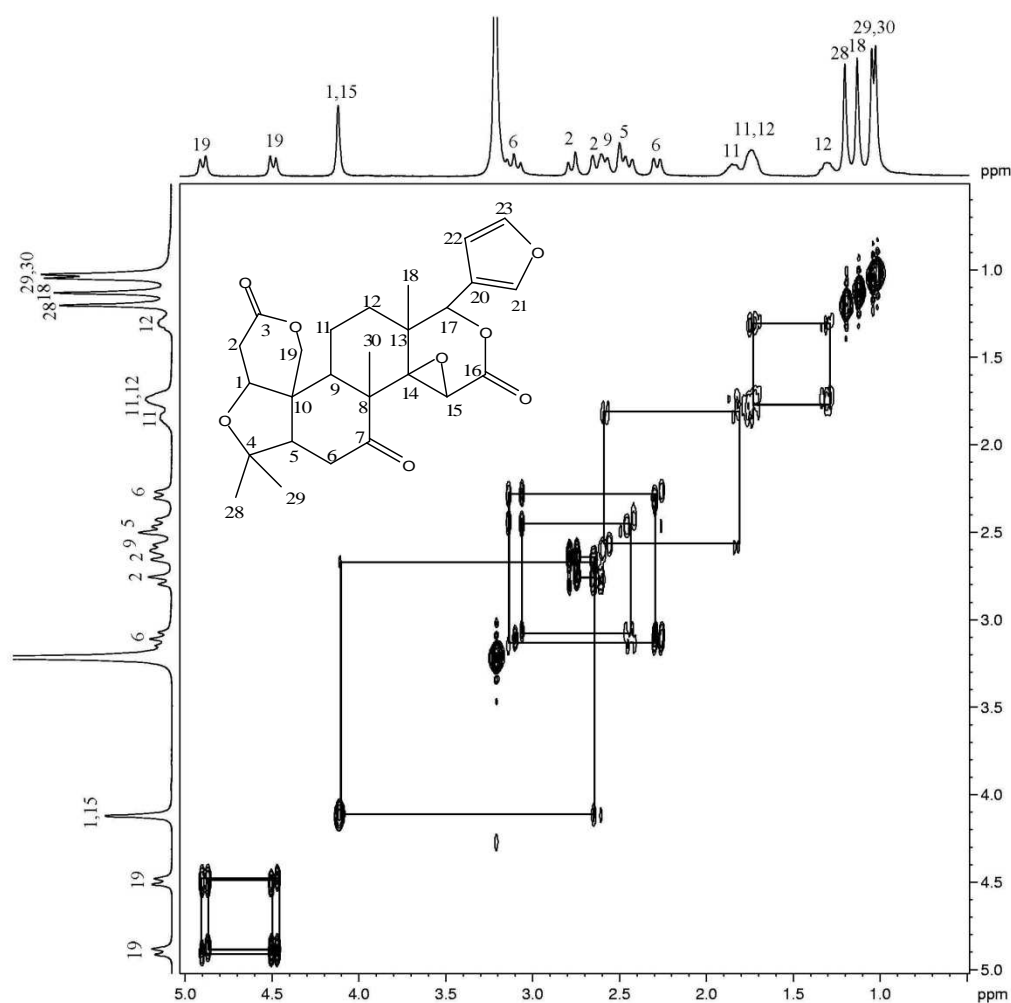


Figura 6: Espectro de RMN COSY de Limonina em DMSO a 400MHz

O espectro de RMN de ^{13}C para a limonina (Figura 7) mostrou sinais para carbonos em δ 207,60 ppm, δ 169,70 ppm e δ 166,60 ppm referente aos carbonos C-7, C-3 e C-16, respectivamente, sendo todos carbonílicos. Para os carbonos metínicos, C-22, C-21 e C-23, os sinais aparecem em δ 109,0 ppm, δ 141,4 ppm e δ 143,70 ppm, respectivamente. O sinal em δ 120,0 ppm corresponde ao C-20. Para os carbonos oxigenados têm-se sinais em δ 79,31 ppm para o C-4, δ 78,30 ppm para o C-1, δ 77,29 ppm para o C-17, δ 66,53 ppm para o C-14, δ 64,60 ppm para o C-19 e δ 50,20 ppm para o C-15. Estes deslocamentos são melhores visualizados nas expansões do espectro de ^{13}C (Figuras 8 e 9).

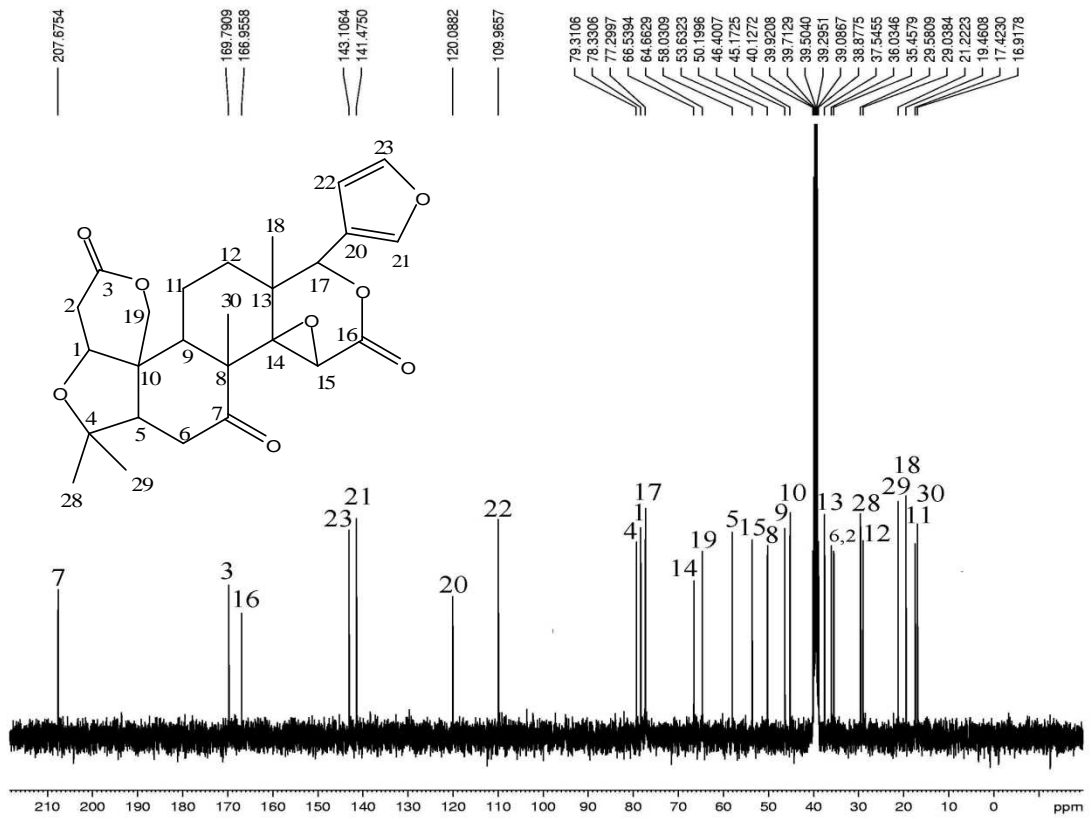


Figura 7: Espectro de RMN de ^{13}C de Limonina em DMSO a 400MHz

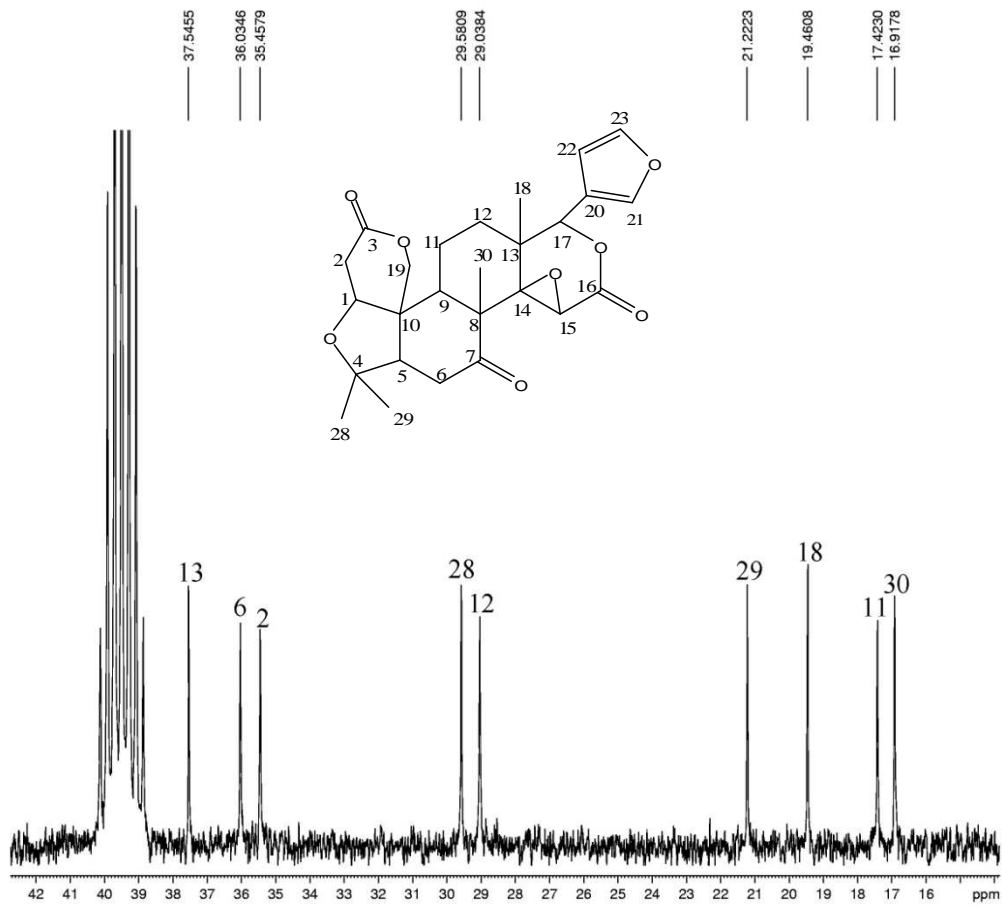


Figura 8: Espectro de RMN de ^{13}C expandido de Limonina (42) em DMSO a 400MHz

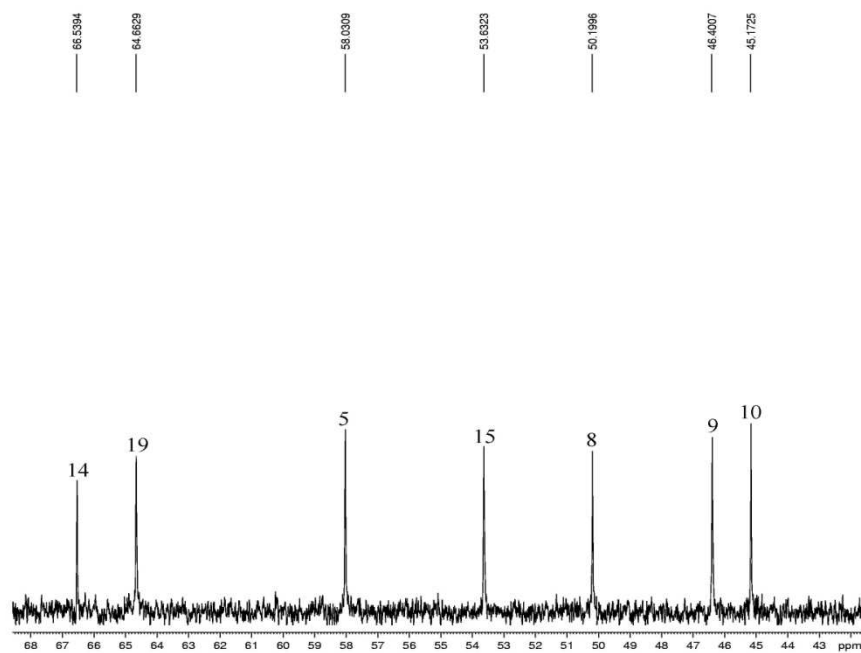


Figura 9: Espectro de RMN de ^{13}C expandido de Limonina (42) em DMSO a 400MHz

Através do espectro de Dept 135, Figura 10, visualiza-se a presença de cinco carbonos metilênicos, C-19, C-6, C-2, C-11 e C12.

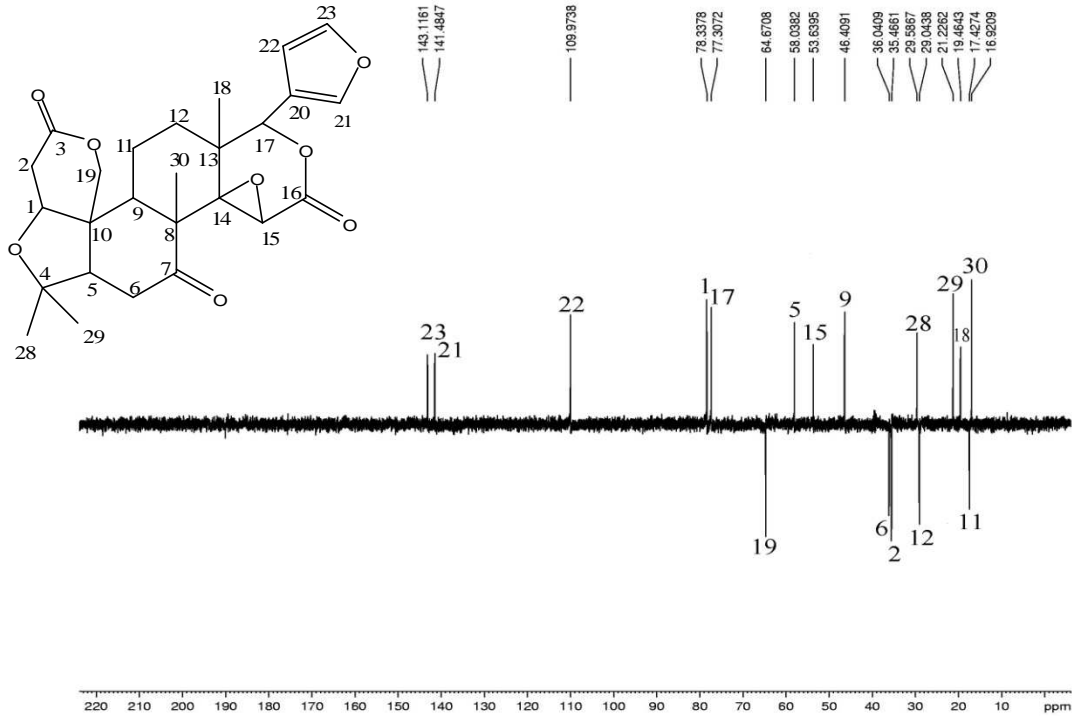


Figura 10: Espectro de RMN Dept 135 de Limonina (**42**) em DMSO a 400MHz

Com a análise do espectro HMQC (Figura 11) e suas expansões (Figuras 12 e 13), torna-se possível a identificação das correlações entre carbono e hidrogênio existentes na estrutura da limonina.

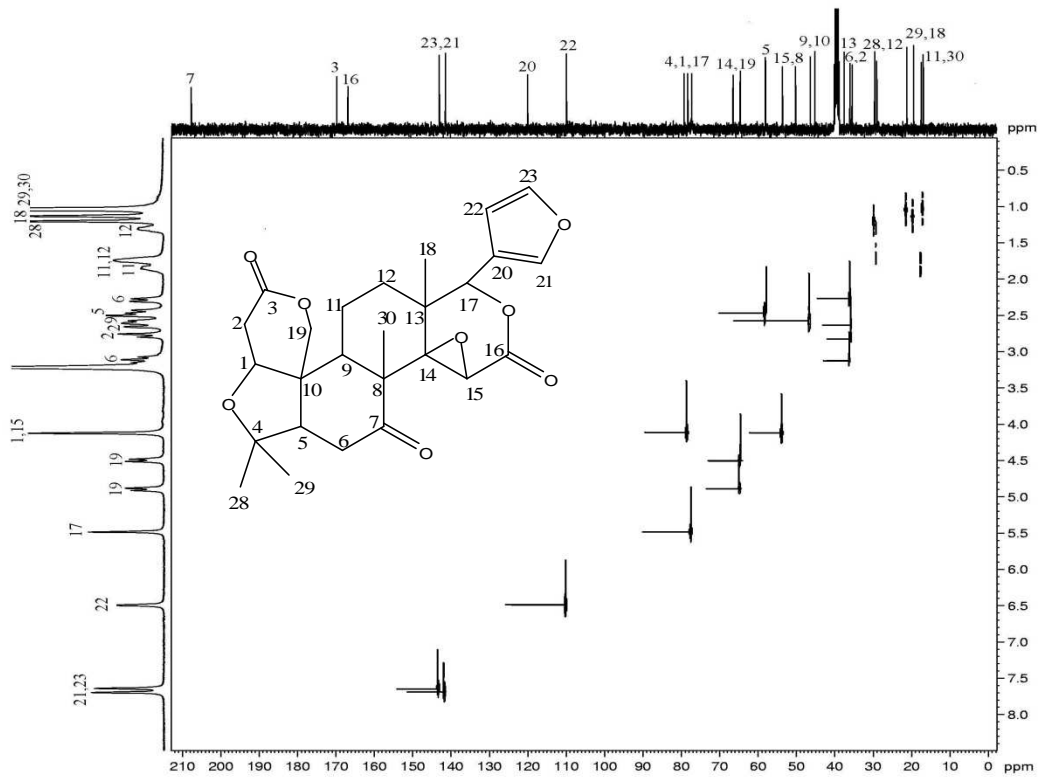


Figura 11: Espectro de 2D HETCOR de Limonina (**42**) em DMSO a 400MHz

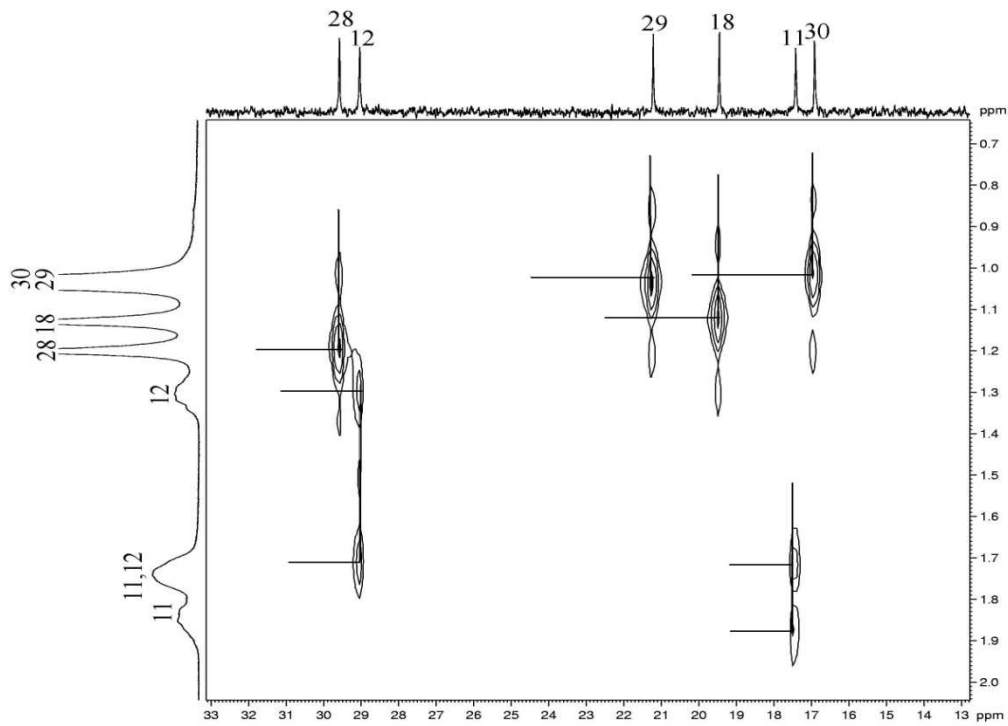


Figura 12: Espectro de 2D HETCOR expandido de Limonina (**42**) em DMSO a 400MHz

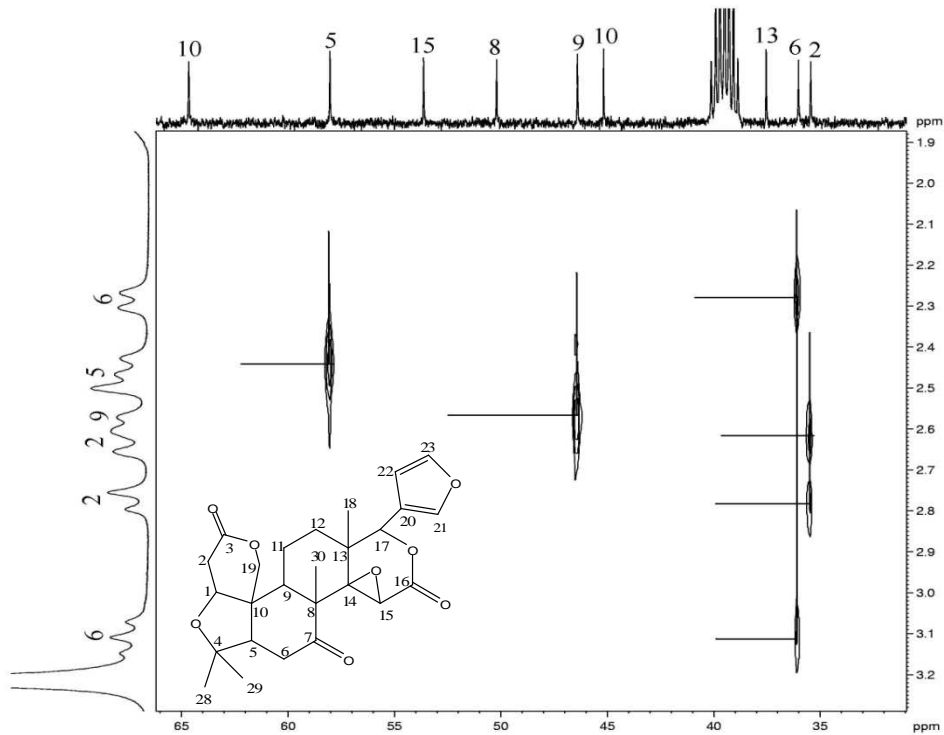


Figura 13: Espectro 2D HETCOR expandido de Limonina (**42**) em DMSO a 400MHz

A estrutura deste limonóide, **42**, com fórmula molecular $C_{26}H_{30}O_8$, foi confirmada através de medidas de difração de raios-X (Figura 14).

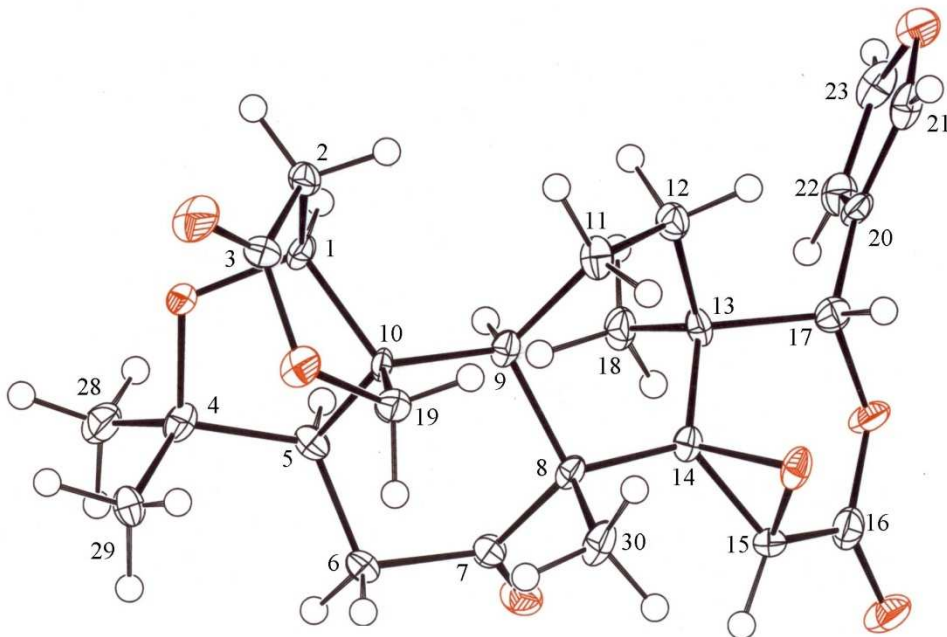


Figura 14: Difração de raios-X da Limonina (**42**). Onde, C: numerados; O: vermelho; H: branco

Nas Tabelas 11 e 12 são descritos os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de **42**, juntamente com os comparativos da literatura.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da Limonina (**42**) (DMSO, 400 MHz)

| Posição | δ_{H} (ppm) | δ_{H}^* (ppm) |
|---------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | 4,11 (s) | 4,02 (s) |
| 2 | 2,74 (d, $J=16,5$ Hz) | 2,94 (dd, $J=16,7$; 3,8 Hz) |
| 2 | 2,64 (d, $J=18,2$ Hz) | 2,64 (dd, $J=18,6$; 2,0 Hz) |
| 5 | 2,45 (d, $J=15,8$ Hz) | 2,19 (dd, $J=19,1$; 3,2 Hz) |
| 6 | 3,09 (t, $J=15,5$ Hz) | 2,81 (t, $J=15,2$ Hz) |
| 6 | 2,25 (d, $J=16,0$ Hz) | 2,43 (dd, $J=18,0$; 3,3 Hz) |
| 9 | 2,58 (d, $J=15,0$ Hz) | 2,51 (dd, $J=15,2$; 3,0 Hz) |
| 11 | 1,84 (s) | 1,76 (m) |
| 11,12 | 1,72 (m) | - |
| 12 | 1,29 (m) | 1,47 (m) |
| 15 | 4,11 (s) | 4,03 (s) |
| 17 | 5,47 (s) | 5,45 (s) |
| 18 | 1,12 (s) | 1,16 (s) |
| 19 | 4,50 (d, $J=13,0$ Hz) | 4,43 (d, $J=13,0$ Hz) |
| 19 | 4,90 (d, $J=13,0$ Hz) | 4,73 (d, $J=13,0$ Hz) |
| 21 | 7,68 (s) | 7,38-7,40 (m) |
| 22 | 6,48 (s) | 6,32 (m) |
| 23 | 7,62 (s) | 7,38-7,40 (m) |
| 28 | 1,19 (s) | 1,27 (s) |
| 29 | 1,03 (s) | 1,15 (s) |
| 30 | 1,01 (s) | 0,97 (s) |

* δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) conforme Marques³²

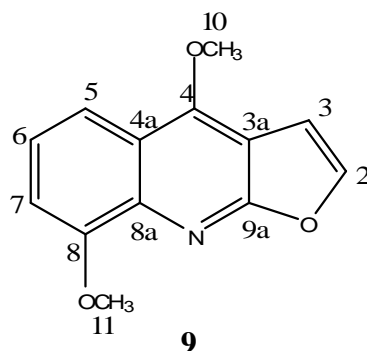
Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C da Limonina (**42**) (DMSO, 400 MHz)

| Posição | δ_{C} (ppm) | δ_{C}^* (ppm) |
|---------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | 78,33 | 79,10 |
| 2 | 35,45 | 35,70 |
| 3 | 169,79 | 169,20 |
| 4 | 79,31 | 79,20 |
| 5 | 58,03 | 60,50 |
| 6 | 36,03 | 36,40 |
| 7 | 207,67 | 206,20 |
| 8 | 50,19 | 53,90 |
| 9 | 46,40 | 48,10 |
| 10 | 45,17 | 45,90 |
| 11 | 17,42 | 18,90 |
| 12 | 29,00 | 30,80 |
| 13 | 37,54 | 37,90 |
| 14 | 65,53 | 65,70 |
| 15 | 53,63 | 53,80 |
| 16 | 166,95 | 166,70 |
| 17 | 77,29 | 77,80 |
| 18 | 19,46 | 20,70 |
| 19 | 64,66 | 65,40 |
| 20 | 120,00 | 119,90 |
| 21 | 141,47 | 141,10 |
| 22 | 109,96 | 109,70 |
| 23 | 143,10 | 143,20 |
| 28 | 29,58 | 30,10 |
| 29 | 21,22 | 21,40 |
| 30 | 16,90 | 17,60 |

* δ_{C} (CDCl_3 , 400 MHz) conforme Marques³²

5.2.2 γ -fagarina

O alcalóide furoquinolínico, γ -fagarina (**9**), já isolado pelo grupo anteriormente,^{9,25} foi isolado da fração etérea básica a partir do extrato bruto metanólico das cascas de *H. apiculata*, conforme descrito na parte experimental (página 48), e identificado por RMN de ^1H e ^{13}C , além de comparação com dados da literatura.⁹



No espectro de RMN de ^1H (Figura 15) do alcalóide **9** observa-se a presença de onze hidrogênios através da integração dos sinais. Seis desses hidrogênios pertencem as metoxilas, com deslocamentos químicos de δ 4,07 ppm, referente aos H-11, e δ 4,43 ppm, referente aos H-10. Outros dois hidrogênios apresentam-se na forma de dubletos com $J=2,8$ Hz, em δ 7,64 e δ 7,07 ppm, sendo característico de hidrogênios de anel furano (H-2 e H-3). Na região dos aromáticos tem-se, ainda, a presença de três sinais de hidrogênios, sendo o sinal em δ 7,84 ppm na forma de duplo dubleto (dd, $J=8,5$; 1,1 Hz) referente ao H-5. Em δ 7,35 ppm, também como duplo dubleto (dd, $J=8,5$; 7,7 Hz), tem-se o H-6, e em δ 7,04 ppm (d, $J=7,7$ Hz) sinaliza o H-7.

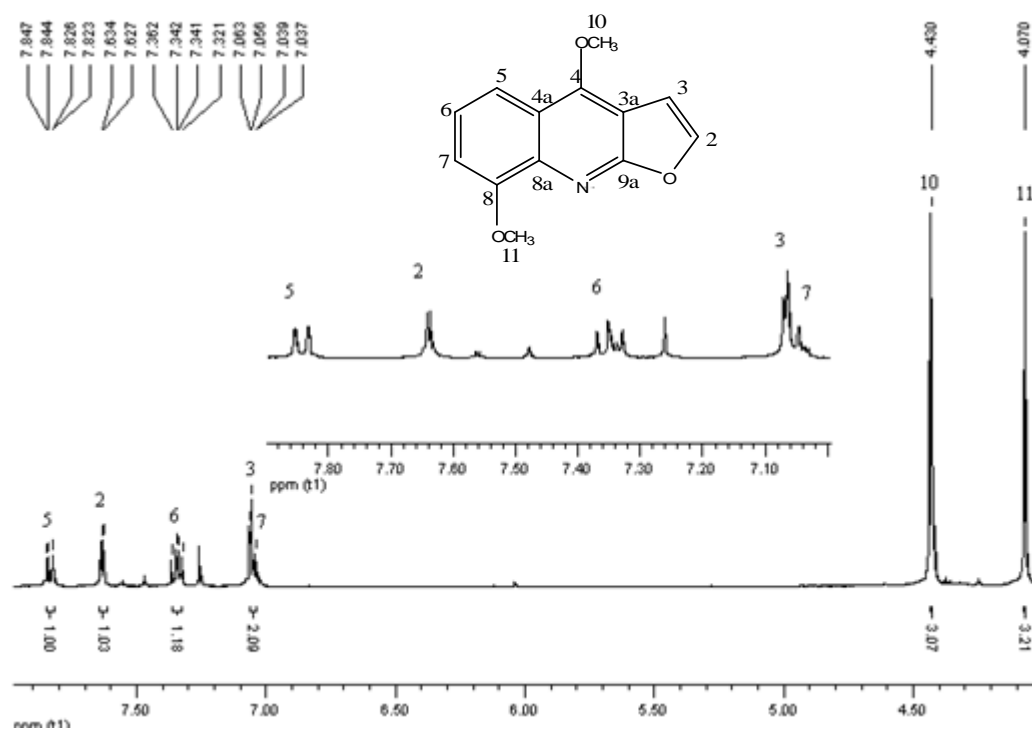


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H de γ -fagarina (**9**) em CDCl_3 a 400MHz

Através da análise de RMN de ^{13}C (Figura 16), confirma-se a presença de treze carbonos condizendo com a estrutura **9** de fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$. Em $\delta=55,96$ e $59,00$ ppm tem-se a presença dos carbonos dos grupos metoxilas ligados ao anel aromático, C-11 e C-10. Os carbonos do anel furano, C-2 e C-3, sinalizam em $\delta=143,90$ e $103,93$ ppm.

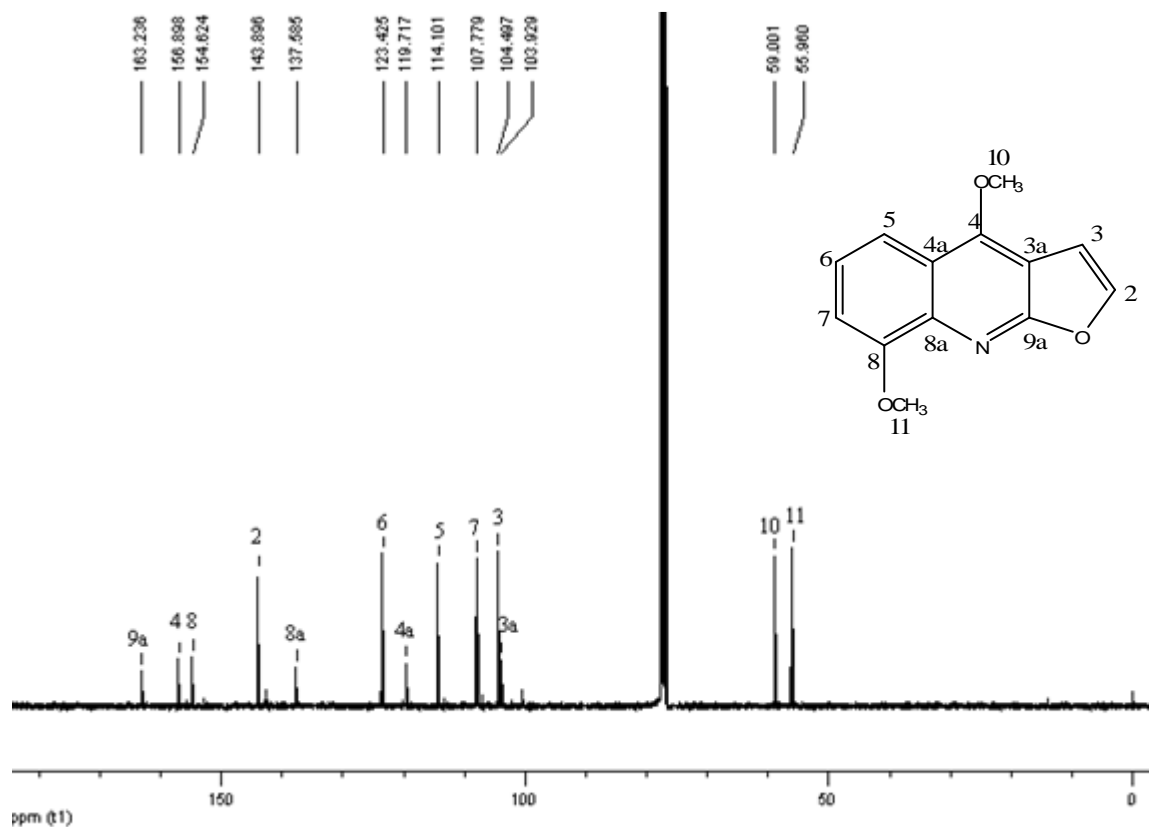


Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C de γ -fagarina (**9**) em CDCl_3 a 100MHz

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do alcalóide γ -fagarina são mostrados na Tabela 13, assim como os comparativos com a literatura.

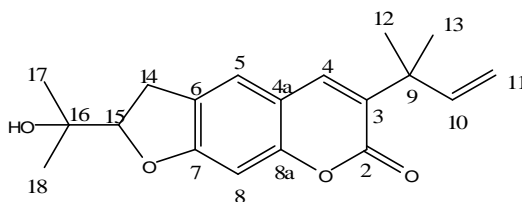
Tabela 13: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C da γ -fagarina (**9**) (CDCl_3 , ^1H a 400 MHz; ^{13}C a 100 MHz)

| Posição | δ_{H} (ppm) | δ_{H^*} (ppm) | δ_{C} (ppm) | δ_{C^*} (ppm) |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 2 | 7,64 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 7,63 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 143,89 | 143,81 |
| 3 | 7,07 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 7,06 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 104,49 | 104,47 |
| 3a | - | - | 103,92 | 103,79 |
| 4 | - | - | 156,89 | 156,81 |
| 4a | - | - | 119,71 | 119,58 |
| 5 | 7,84(dd, $J=1,1$ e $8,5\text{Hz}$) | 7,82(d, $J=8,6\text{Hz}$) | 114,10 | 114,02 |
| 6 | 7,35(dd, $J=7,7$ e $8,5\text{Hz}$) | 7,34(dd, $J=7,6$ e $8,6\text{Hz}$) | 123,42 | 123,36 |
| 7 | 7,04 (d, $J=7,7\text{Hz}$) | 7,04 (d, $J=7,6\text{Hz}$) | 107,77 | 107,66 |
| 8 | - | - | 154,62 | 154,48 |
| 8a | - | - | 137,58 | 137,42 |
| 9a | - | - | 163,23 | 163,15 |
| 10 | 4,43 (s) | 4,42 (s) | 59,00 | 58,93 |
| 11 | 4,07 (s) | 4,07 (s) | 55,96 | 55,88 |

* δ_{H} e δ_{C} (CDCl_3 , 400 e 100MHz) conforme Zanon⁹

5.2.4 Chalepina

Este metabólito foi isolado da fração etérea básica, proveniente do EBM das cascas do caule de *H. apiculata* (páginas 48 e 49), sendo que o mesmo já havia sido isolado pelo grupo NPPN.⁷⁵ Foi submetido às técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais. Após análise destes resultados, e comparação com dados da literatura^{68,75} propôs-se a estrutura como sendo uma cumarina, de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$, conhecida como chalepina (**27**).



27

No espectro de RMN de ^1H (Figura 17), tem-se a identificação de um substituinte prenilado, identificado através da absorção dos dois hidrogênios metilênicos a δ 5,04 ppm (dd, $J=6,0; 1,0$ Hz) e δ 5,10 (s) referentes aos H-11, do hidrogênio metínico, H-10, que apresenta sinal em δ 6,16 ppm (dd, $J=16,0; 10,2$ Hz) e os hidrogênios metílicos, H-12 e H-13, que se apresentam na forma de um singlete em δ 1,45 ppm. Apresenta ainda, mais dois sinais correspondendo a grupos metilas em δ 1,22 e 1,35 ppm, H-17 e H-18, respectivamente.

Os dois hidrogênios aromáticos, H-5 e H-8, e o hidrogênio H-4, vínlico do anel lactônico, absorvem em δ 7,18, 6,69 e 7,47 ppm, respectivamente. Tem-se ainda, um sinal correspondendo a dois hidrogênios metilênicos, H-14, em δ 3,19 ppm na forma de dubleto, com $J=8,8$ Hz, e outro sinal em δ 4,70 ppm, correspondendo a um hidrogênio metínico, H-15, na forma de triplete ($J=8,8$ Hz), sugerindo um anel do tipo furano na estrutura.

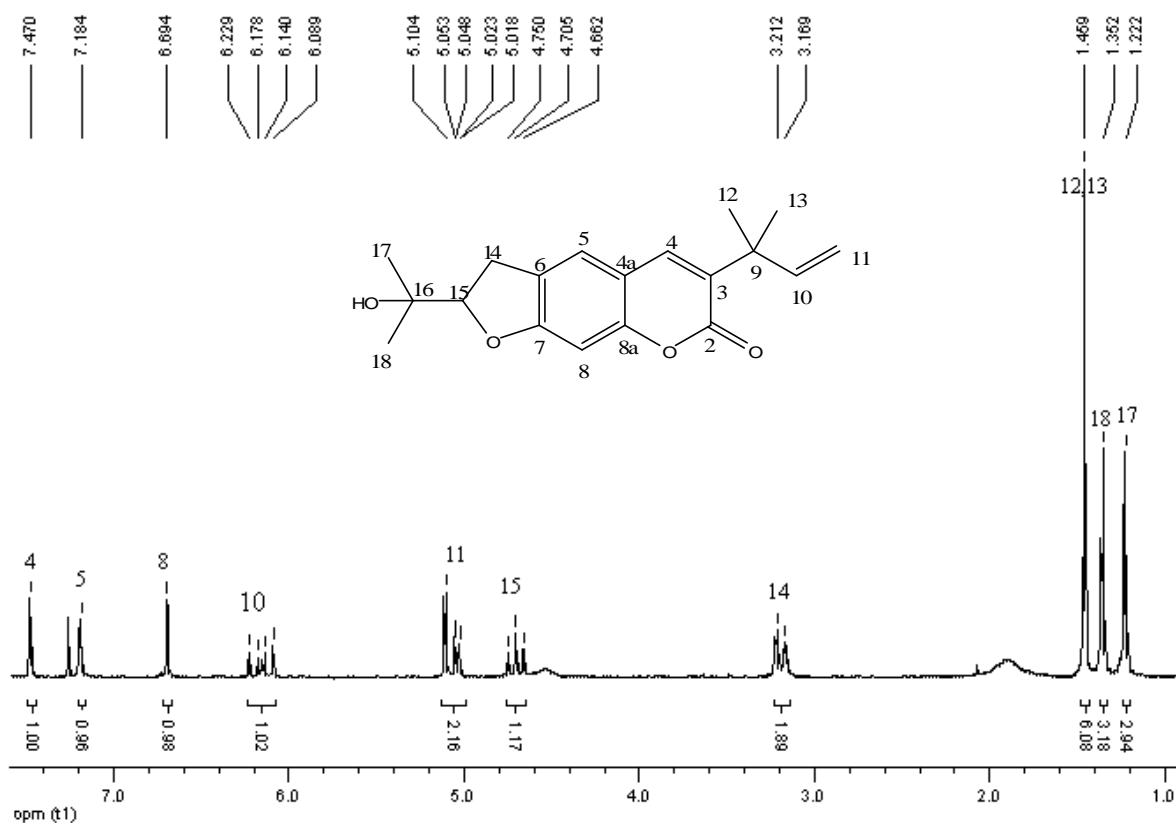


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H da Chalepina (**27**), em CDCl_3 a 200MHz.

O espectro bidimensional homonuclear, COSY H-H, mostrado na Figura 18, apresenta apenas dois sistemas de spins na estrutura **27**.

O primeiro sistema de spins mostra o acoplamento existente entre H-10 (δ 6,16 ppm) e o H-11 (δ 5,04 ppm), do substituinte prenilado, enquanto que o segundo sistema de spins é

observado através do acoplamento entre os H-14 (δ 3,19 ppm) e o H-15 (δ 4,71 ppm) do anel furano.

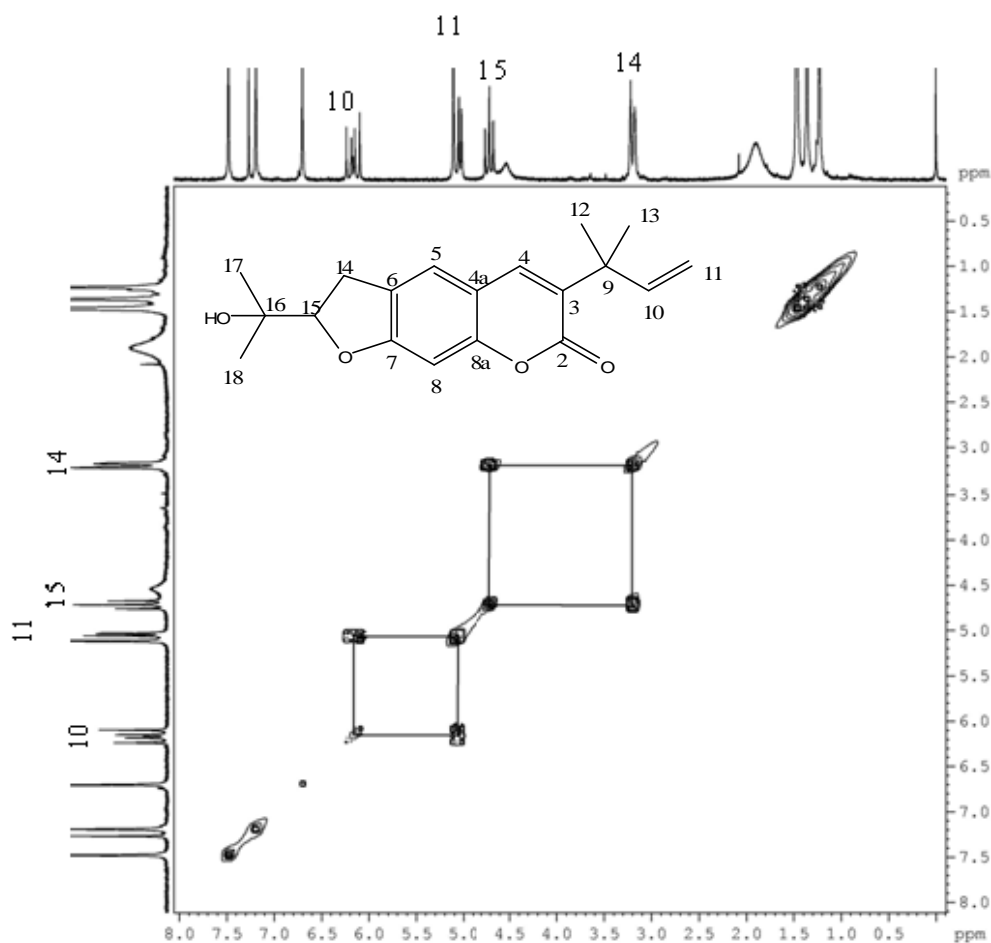


Figura 18: Espectro 2D COSY da chalapina (**27**) em CDCl_3 a 200 MHz

O espectro de RMN de ^{13}C de **27** (Figura 19) apresenta 19 sinais de carbonos, confirmando a estrutura como sendo a cumarina chalapina. Onde os carbonos correspondentes as metilas, C-17, C-13, C-12 e C-18, sinalizam em δ 24,20, 26,02, 26,08 e 26,58 ppm. No sinal em δ 71,68 ppm tem-se o C-16, deslocamento característico de carbono ligado a álcool. E os carbonos, C-11 e C-10, da dupla ligação sinalizam em δ 112,03 ppm e 145,59 ppm, respectivamente.

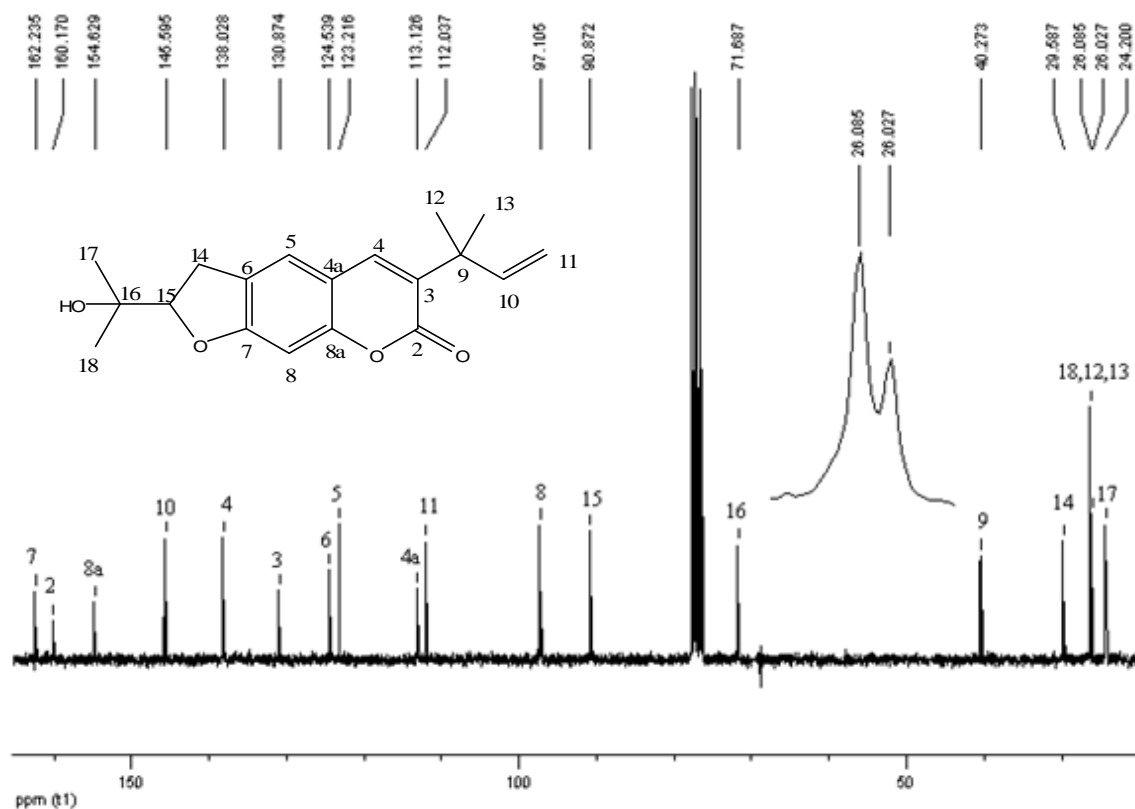


Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C da Chalepina (27) em CDCl_3 a 50MHz

Analisando o espectro Dept 135, Figura 20, confirma-se a presença de dois carbonos metilênicos, C-14 e C-11, e cinco carbonos hidrogenados, C-15, C-8, C-5, C-4 e C-10, na estrutura da Chalepina, além das quatro metilas, C-17, C-13, C-12 e C-18.

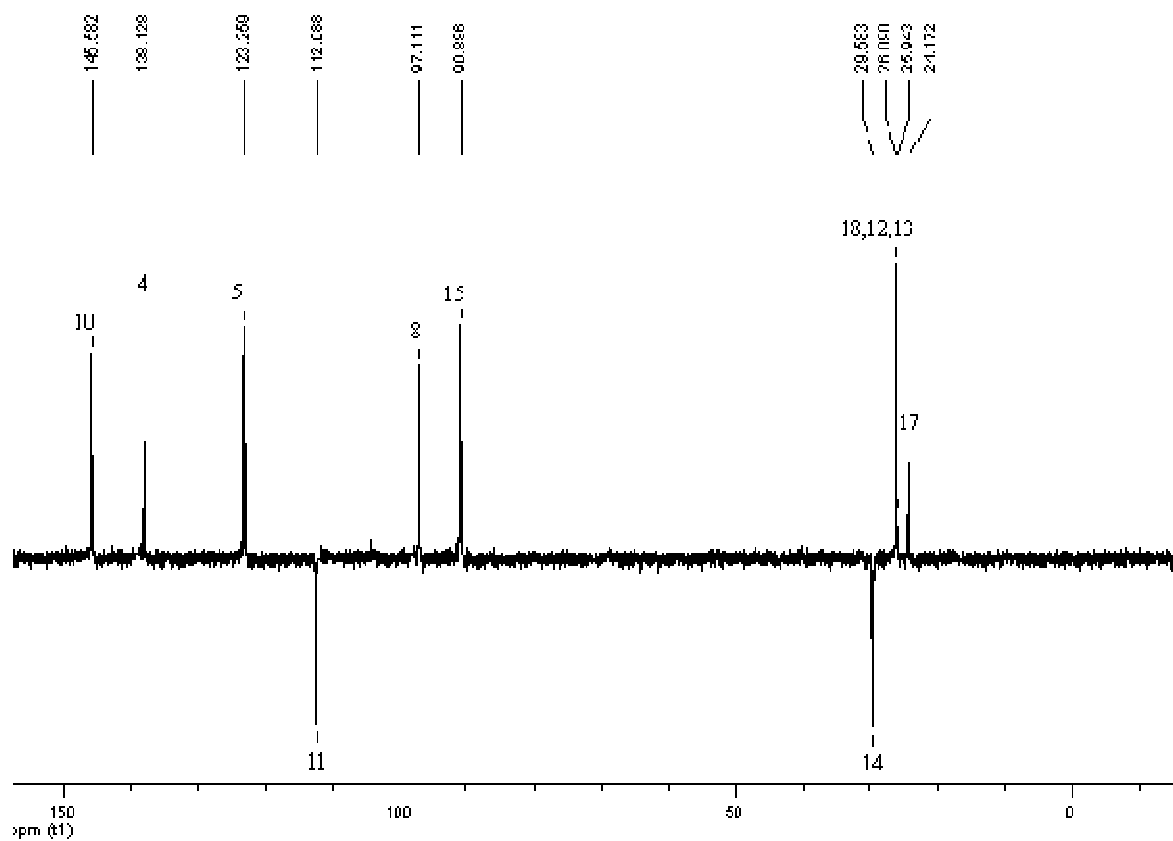


Figura 20: Espectro de RMN Dept 135 da Chalepina (**27**) em CDCl₃ a 50 MHz

Na tabela 14, estão listados os dados espectroscópicos da Chalepina e comparação com a literatura.

Tabela 14: Dados espectroscópicos da Chalepina (**27**) (CDCl₃, ¹H a 200 MHz; ¹³C a 50 MHz)

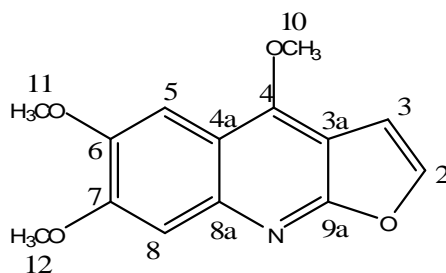
| Posição | δ_H (ppm) | δ_{H^*} (ppm) | δ_C (ppm) | δ_{C^*} (ppm) |
|---------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------|----------------------|
| 2 | - | - | 160,1 | 160,6 |
| 3 | - | - | 130,87 | 131,3 |
| 4 | 7,47 (s) | 7,40 (s) | 138,02 | 138,4 |
| 4a | - | - | 113,12 | 113,5 |
| 5 | 7,18 (s) | 7,12 (s) | 123,21 | 123,6 |
| 6 | - | - | 124,53 | 124,9 |
| 7 | - | - | 162,23 | 162,7 |
| 8 | 6,69 (s) | 6,62 (s) | 97,1 | 97,5 |
| 8a | - | - | 154,62 | 155,0 |
| 9 | - | - | 40,27 | 40,7 |
| 10 | 6,16 (dd, $J=16,0$; 10,2 Hz) | 6,10 (dd, $J=16,2$; 6,0 Hz) | 145,6 | 146,0 |
| 11 | 5,04 (dd, $J=6,0$; 1,0 Hz); 5,10 (s) | 4,98 (ddd, $J=16,2$; 6,0; 8,0 Hz) | 112,03 | 112,4 |
| 12 | 1,45 (s) | 1,99 (s) | 26,0 | 26,5 |
| 13 | 1,45 (s) | 1,99 (s) | 26,0 | 26,5 |
| 14 | 3,19 (d, $J=8,8$ Hz) | 3,10 (d, $J=8,6$ Hz) | 29,58 | 30,0 |
| 15 | 4,71 (t, $J=8,8$ Hz) | 4,64 (t) | 90,87 | 91,3 |
| 16 | - | - | 71,68 | 72,1 |
| 17 | 1,22 (s) | 0,91 (s) | 24,2 | 24,6 |
| 18 | 1,35 (s) | 1,21 (s) | 26,0 | 24,6 |

* δ_H e δ_C (CDCl₃, 400 e 100 MHz) conforme Moura⁷⁵

Em 1967, Pozzi e col.³¹, estudando a espécie *Helietta longifoliata* Britt, sendo esta, sinonímia de *H. apiculata*, identificaram essa mesma estrutura como sendo a helietina (**27**), a qual apresentava um valor de rotação óptica de 0°. Já em 1971, Joshi e Gawad⁶⁸ identificaram a estrutura com o nome de Chalepina (**27**), a qual apresentou um $[\alpha]_D=+28^\circ$. A partir de então essa estrutura passou a ser identificada como Chalepina (**27**)^{43, 47, 48, 49, 78} Devido a maior parte dos autores reconhecerem essa estrutura com Chalepina (**27**), neste trabalho optou-se por esta identificação. Quando a mesma foi submetida a medidas de rotação óptica esta apresentou um valor de -28° , demonstrando se tratar de um isômero da substância identificada em 1971.

5.2.5 Kokusaginina (17)

A partir da fração etérea básica, proveniente do EBM das cascas de *H. apiculata*, fez o isolamento do alcalóide furoquinolínico kokusaginina (página 49), já isolado pelo grupo NPPN.⁷⁵ Após purificação, o mesmo foi submetido as técnicas de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais. A partir das análises desses dados e comparação com a literatura pode-se propor a estrutura como sendo o alcalóide kokusaginina (**17**) apresentando fórmula molecular C₁₄H₁₃NO₄.



17

No espectro de RMN de ¹H, Figura 21, do alcalóide **17** observa-se a presença de treze hidrogênios através da integração dos sinais. Nove desses hidrogênios, pertencem as três metoxilas, com deslocamentos químico de δ 4,44 ppm, H-10, δ 4,03 ppm, H-11 e δ 4,02 ppm referente ao H-12.

Dois hidrogênios apresentam-se na forma de dubletos, em δ 7,57 ppm com $J=2,8$ Hz, e δ 7,05 ppm com $J=2,7$ Hz, característico dos hidrogênios do anel furano (H-2 e H-3). Outros dois sinais, na forma de singletos, são identificados na região dos aromáticos em δ 7,47 e δ 7,35 ppm, referentes aos H-5 e H-8.

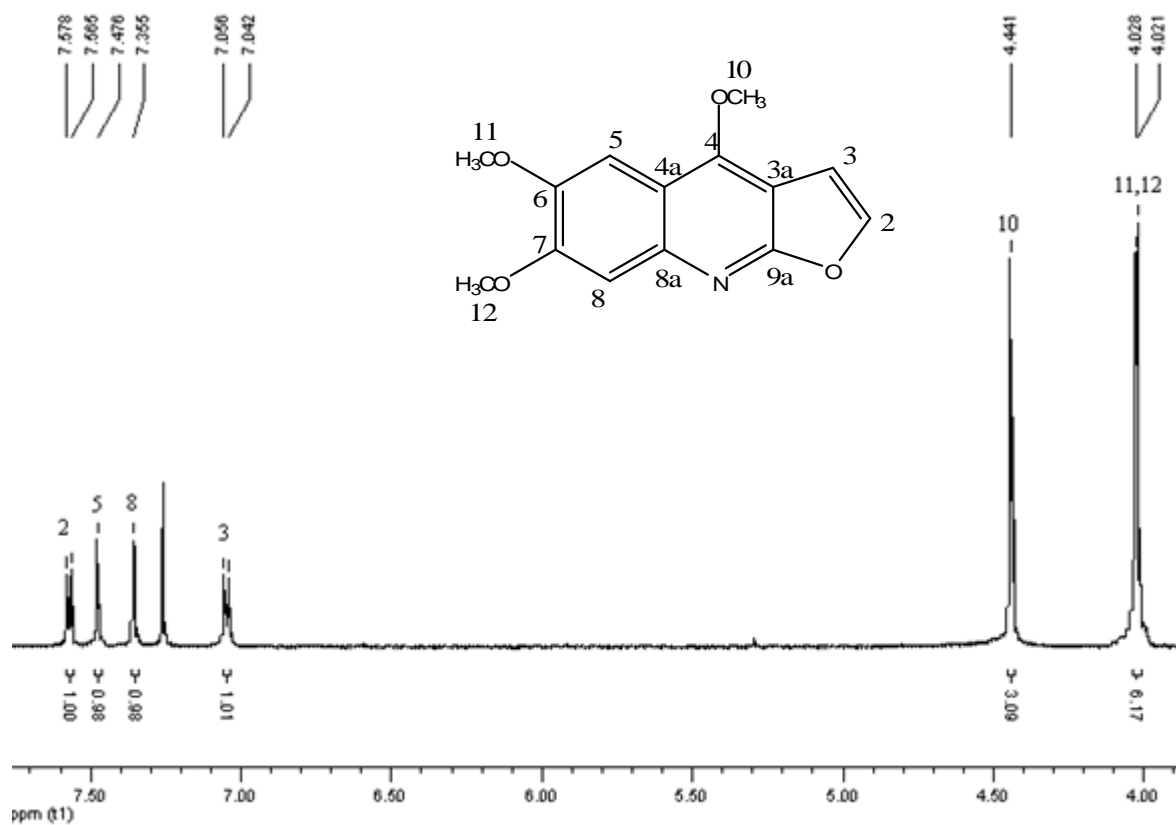


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H de Kokusaginina (**17**) em CDCl_3 a 200MHz

Analisando o espectro de COSY (Figura 22) é possível identificar o sistema de spins referente ao acoplamento entre os hidrogênios da ligação dupla do anel furano, H-2 (δ 7,57 ppm) e H-3 (δ 7,05 ppm).

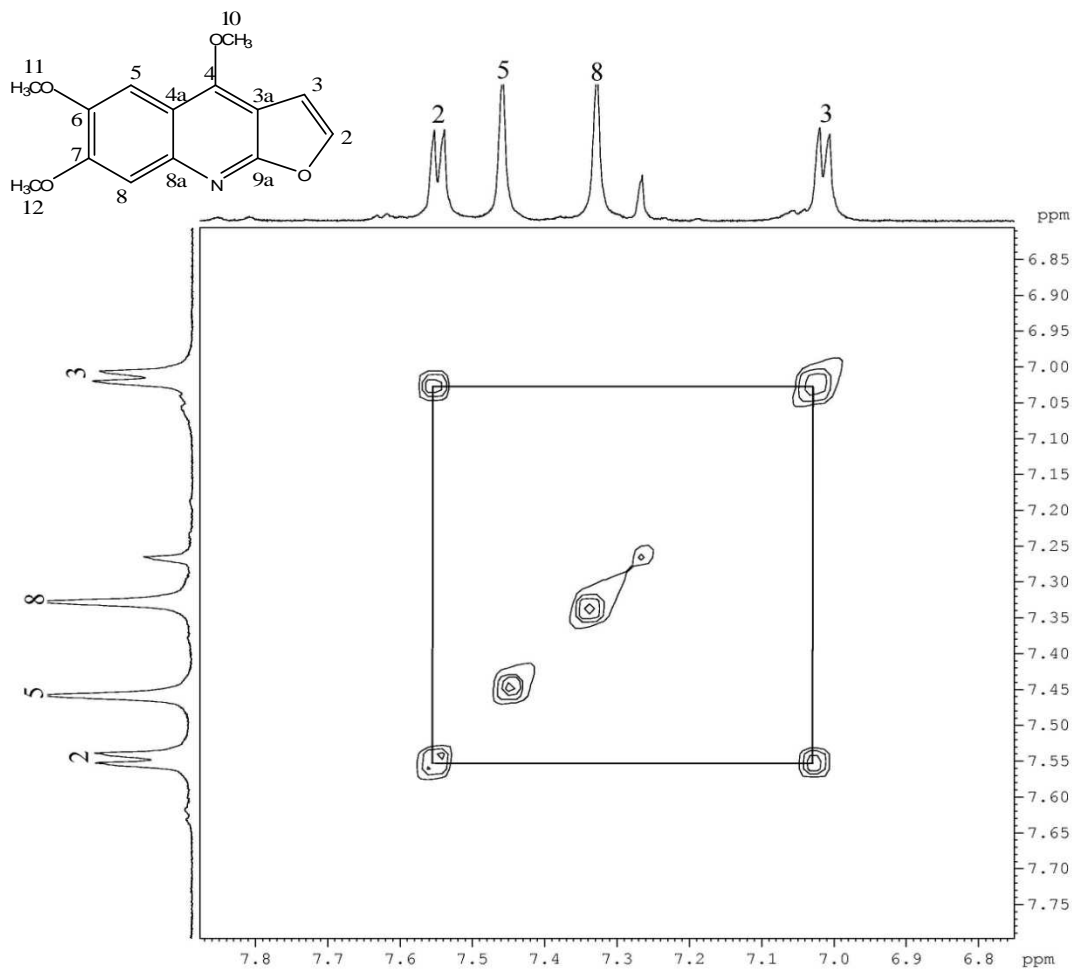


Figura 22: Espectro 2D COSY expandido de Kokusaginina (**17**) em CDCl_3 a 200MHz

Através da análise de RMN de ^{13}C (Figura 23), confirma-se a presença de quatorze carbonos. Em δ 55,98, δ 56,01 e δ 58,84 ppm tem-se a presença dos três carbonos pertencentes as metoxilas, C-12, C-11 e C-10, respectivamente. Os carbonos do anel furano, C-2 e C-3, sinalizam em $\delta=142,42$ e $104,57$ ppm.

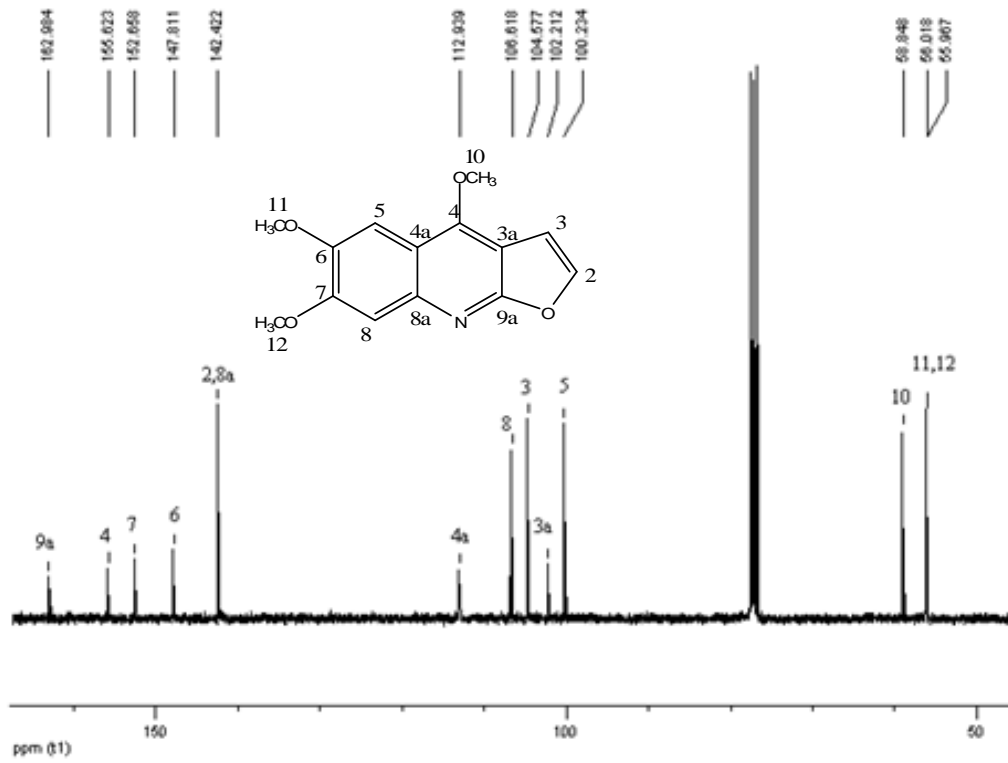


Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C de Kokusaginina (17) em CDCl_3 a 100 MHz

Através da análise do espectro de HMQC, Figura 24, da Kokusaginina é possível visualizar as correlações existentes entre C-H.

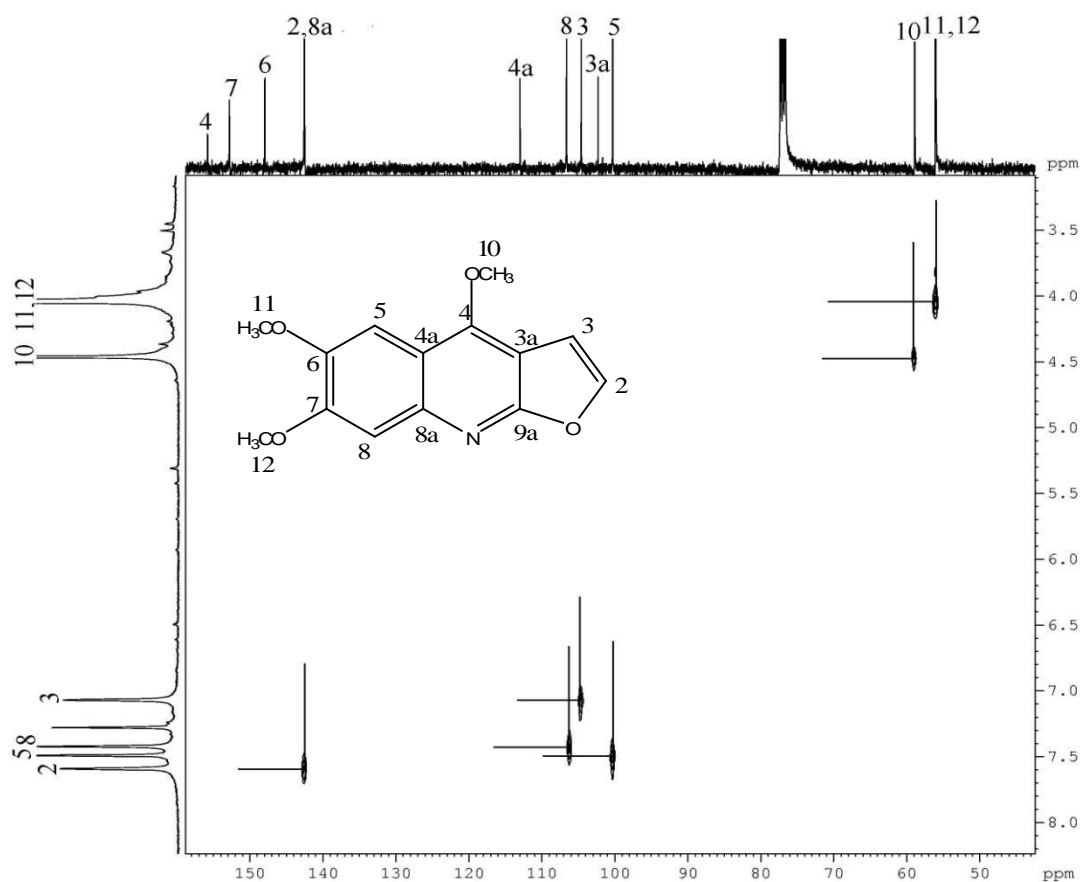
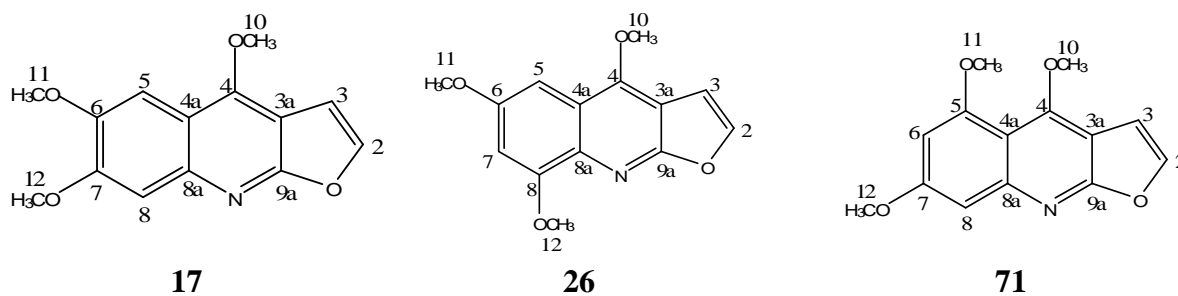


Figura 24: Espectro 2D HMQC de Kokusaginina (**17**) em CDCl_3 a 100 MHz

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H identifica-se a presença de dois hidrogênios aromáticos na estrutura na forma de singletos, confirmando a existência de algum grupamento entre eles, neste caso, metoxilas. Assim poderíamos ter a possibilidade de três estruturas, onde os grupamentos metoxilas poderiam estar nas posições C-6 e C-7 (**17**), C-6 e C-8 (**26**) e ainda em C-5 e C-7 (**71**).



Para confirmar a estrutura como sendo a kokusaginina (**17**) fez-se necessário a análise do espectro de HMBC, onde foi possível identificar as correlações existentes entre o H-5

($\delta=7,47$ ppm) com C-4 ($\delta=155,62$ ppm), C-7 ($\delta=152,65$ ppm) e C-8a ($\delta=142,42$ ppm), e entre H-8 ($\delta=7,35$ ppm) com C-4a ($\delta=112,93$ ppm) e C-6 ($\delta=147,81$ ppm), determinando, assim, a posição das metoxilas nos carbonos C-6 e C-7.

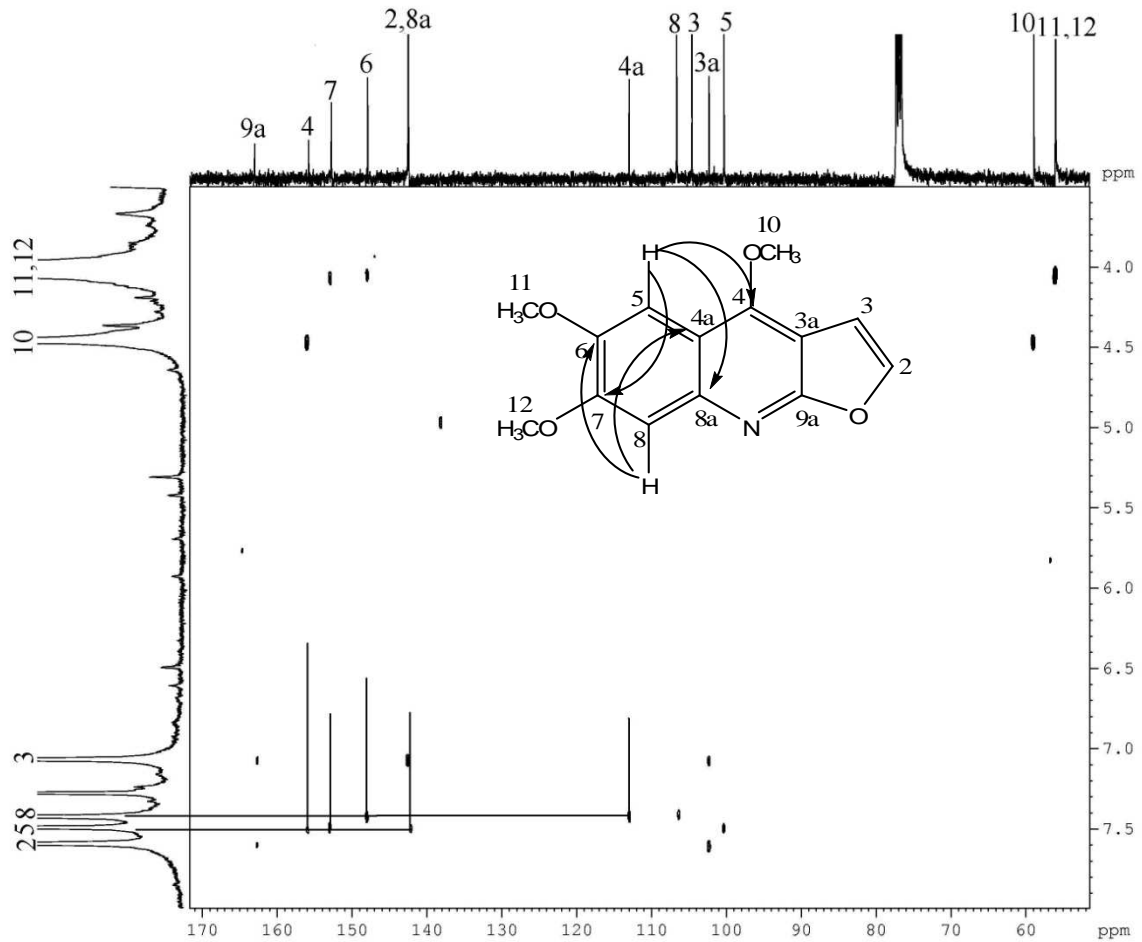


Figura 25: Espectro 2D HMBC de Kokusaginina (**17**) em CDCl_3 a 100 MHz

Na Tabela 15, são listados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do metabólito **17**, bem como os dados de referência da literatura.

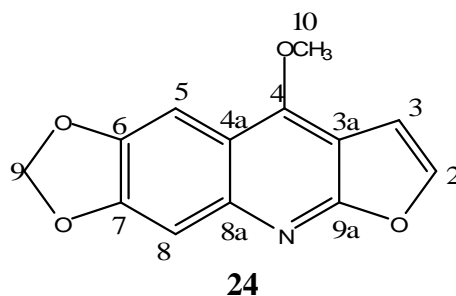
Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Kokusaginina (**17**) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 400 MHz)

| Posição | δ_{H} | δ_{H}^* | δ_{C} | δ_{C}^* |
|---------|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 2 | 7,57 (d, $J=2,8$ Hz) | 7,58 (d, $J=2,8$ Hz) | 142,42 | 142,50 |
| 3 | 7,05 (d, $J=2,7$ Hz) | 7,05 (d, $J=2,8$ Hz) | 104,57 | 104,60 |
| 3a | - | - | 102,21 | 109,50 |
| 4 | - | - | 155,62 | 154,60 |
| 4a | - | - | 112,93 | 112,90 |
| 5 | 7,47 (s) | 7,49 (s) | 100,23 | 100,30 |
| 6 | - | - | 147,81 | 147,80 |
| 7 | - | - | 152,65 | 152,60 |
| 8 | 7,35 (s) | 7,34 (s) | 106,61 | 106,70 |
| 8a | - | - | 142,42 | 141,00 |
| 9a | | | 162,98 | 160,20 |
| 10 | 4,44 (s) | 4,44 (s) | 58,84 | 58,00 |
| 11 | 4,028 (s) | 4,43 (s) | 56,01 | 56,00 |
| 12 | 4,021 (s) | 4,03 (s) | 55,96 | 56,00 |

* δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz), δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz) conforme Moura⁷⁵

5.2.6 Maculina (**24**)

O alcalóide furoquinolínico, Maculina (**24**) de fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$, foi isolado da fração acetato básica a partir do extrato bruto metanólico das cascas de *H. apiculata* conforme descrito na parte experimental deste trabalho (página 49). Foi identificado através de análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura.²⁷



No espectro de RMN de ^1H , Figura 26, do alcalóide **24** observa-se a presença de nove hidrogênios através da integração dos sinais. Três hidrogênios pertencem a metoxila com deslocamento químico de δ 4,39 ppm, referente aos H-10.

Dois hidrogênios apresentam-se na forma de dubletos, em δ 7,56 ppm com $J=2,8$ Hz, e δ 7,02 ppm com $J=2,8$ Hz, característico de hidrogênios de anel furano (H-2 e H-3). Outros dois sinais, na forma de singletos, são identificados na região dos aromáticos em δ 7,50 e δ 7,30 ppm, referentes aos H-5 e H-8. Um singlete em δ 6,07 ppm, integrando para dois hidrogênios, acusa a presença de um grupo metilenodioxila na molécula, H-9.

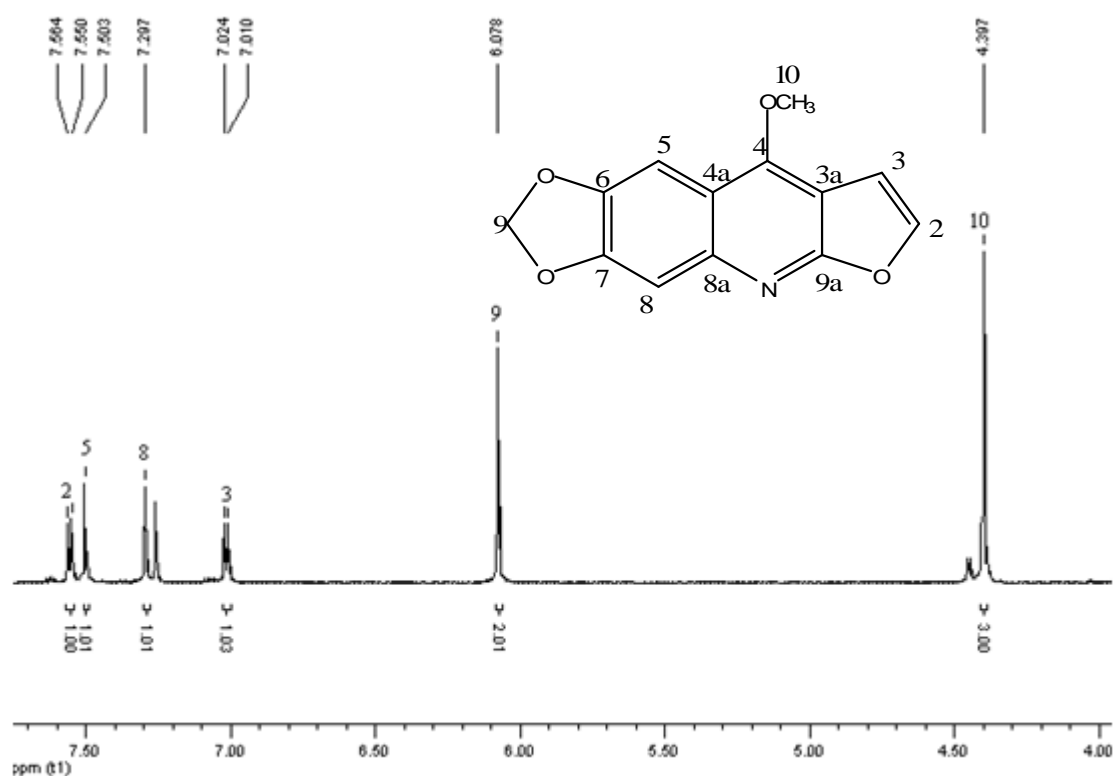


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H de Maculina (**24**) em CDCl_3 a 200MHz

No espectro de COSY (Figura 27) é visível o sistema de spins referente ao acoplamento entre os hidrogênios da ligação dupla do anel furano, H-2 (δ 7,56 ppm) e H-3 (δ 7,02 ppm).



Figura 27: Espectro 2D COSY expandido de Maculina (**24**) em CDCl₃, a 400 MHz

Através da análise de RMN de ¹³C, Figura 28, confirma-se a presença de treze carbonos. Em $\delta=59,28$ ppm tem-se a presença do carbono da metoxila, C-10. Os carbonos do anel furano, C-2 e C-3, sinalizam em $\delta=142,94$ e $104,82$ ppm. Em $\delta=101,96$ ppm confirma-se a presença do carbono metilênico, C-9, que também é visto pelo espectro de Dept 135 (Figura 29).

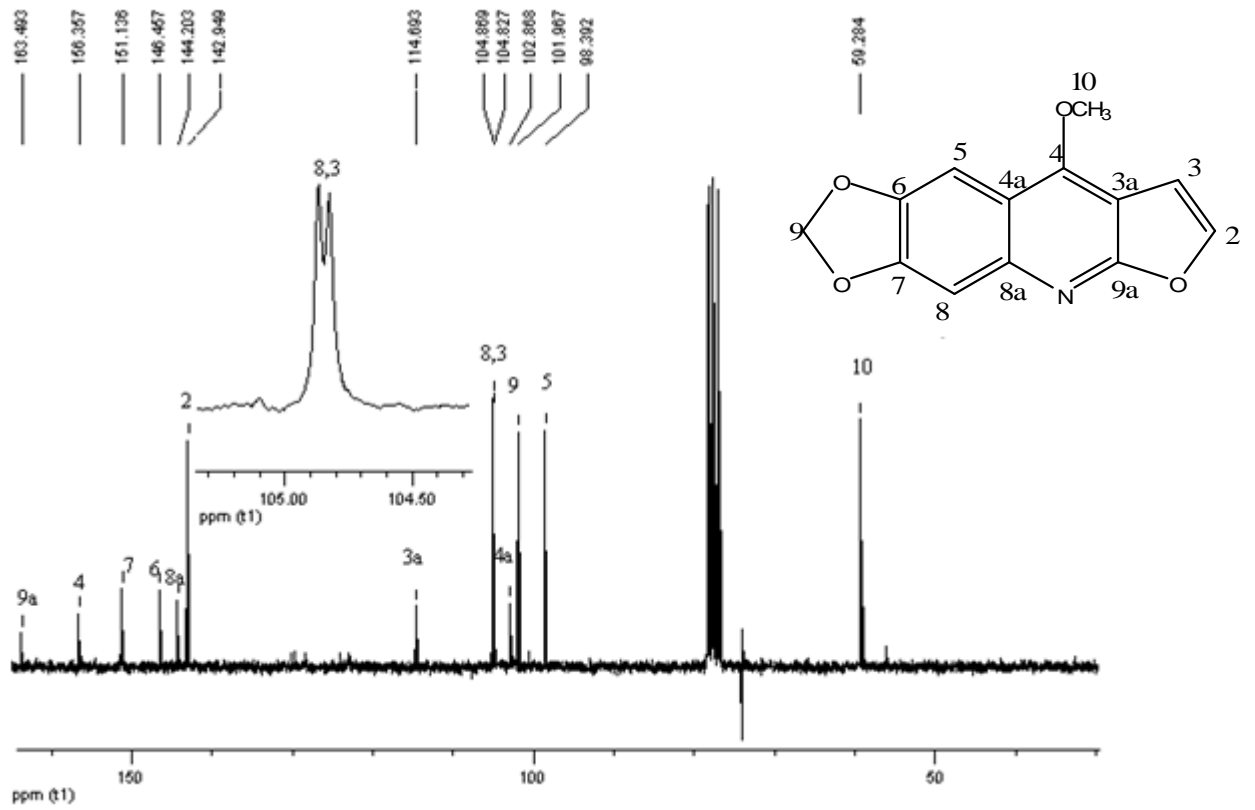


Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C de Maculina (**24**) em CDCl_3 a 50 MHz

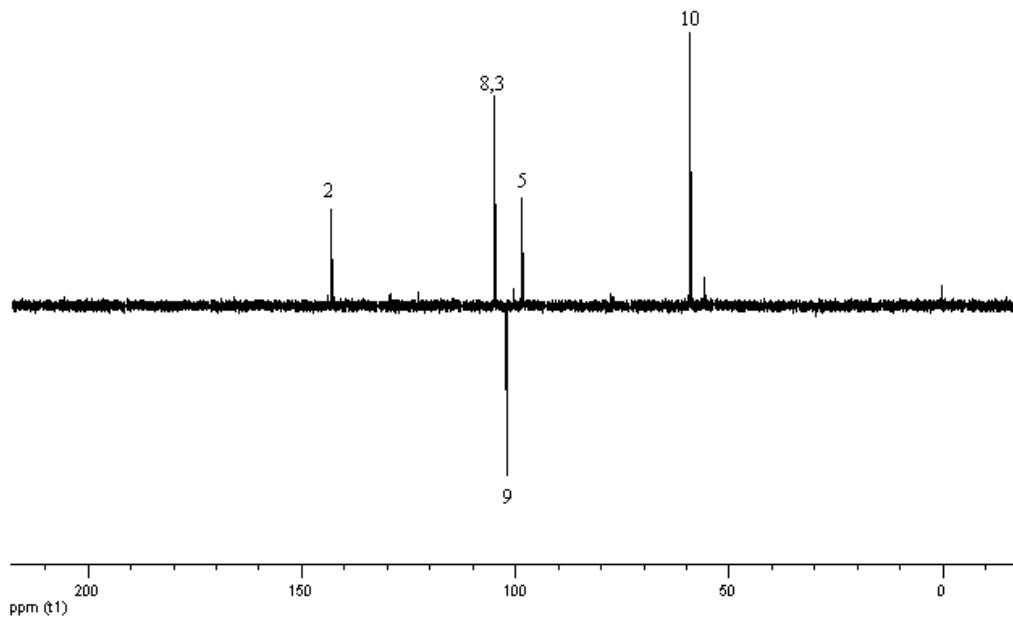


Figura 29: Espectro de RMN Dept 135 da Maculina (**24**) em CDCl_3 a 50 MHz

O espectro HMQC, representado na Figura 30 foi útil na identificação das correlações entre os carbonos e hidrogênios da estrutura **24**.

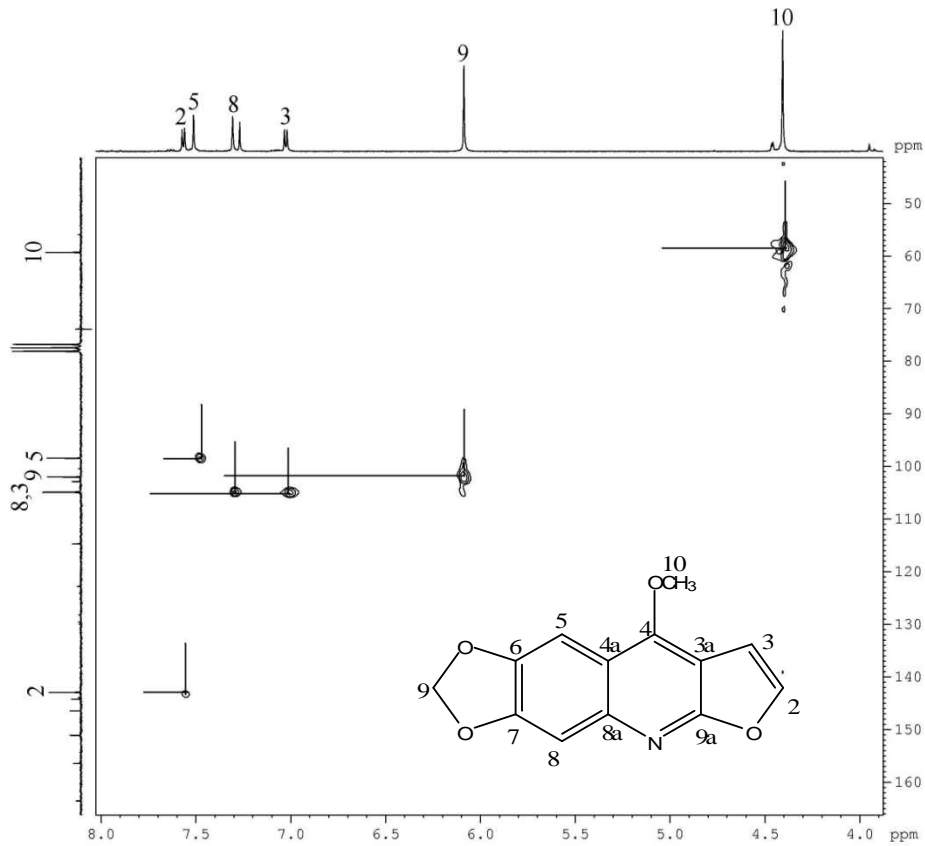


Figura 30: Espectro 2D HMQC expandido da Maculina (**24**) em CDCl₃, a 400 MHz

Na Tabela 16 estão listados os dados espectroscópicos do metabólito **24**, além de comparação com dados da literatura.

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Maculina (**24**) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz)

| Posição | δ_{H} (ppm) | δ_{H^*} (ppm) | δ_{C} (ppm) | δ_{C^*} (ppm) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 2 | 7,56 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 7,56 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 142,94 | 142,50 |
| 3 | 7,01 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 7,03 (d, $J=2,8\text{Hz}$) | 104,82 | 104,40 |
| 3a | - | - | 114,60 | 114,30 |
| 4 | - | - | 156,30 | 155,90 |
| 4a | - | - | 102,80 | 100,10 |
| 5 | 7,55 (s) | 7,50 (s) | 98,39 | 101,60 |
| 6 | - | - | 146,40 | 146,00 |
| 7 | - | - | 151,13 | 150,77 |
| 8 | 7,29 (s) | 7,30 (s) | 104,86 | 104,50 |
| 8a | - | - | 144,20 | 143,83 |
| 9 | 6,07 (s) | 6,09 (s) | 101,96 | 102,50 |
| 9a | - | - | 163,49 | 163,10 |
| 10 | 4,39 (s) | 4,40 (s) | 59,28 | 58,90 |

* δ_{H} (CDCl_3 , 200 MHz), δ_{C} (CDCl_3 , 50 MHz) conforme Simote²⁷

5.3 METABÓLITOS ISOLADOS DE *Helietta apiculata* Benth: FRAÇÃO ACETATO BÁSICA

5.3.1 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (**55**)

A identificação destes metabólitos, como sendo uma mistura de derivados do ácido cinâmico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (**55**), é proposta com base na espectrometria de massas e espectroscopia de RMN. Conforme pode ser visto no cromatograma apresentado na Figura 31, tem-se a presença de dois metabólitos numa relação de 3:1. A partir da análise dos espectros de massa de cada metabólito isolado, apresentado nas Figuras 32 e 33, tem-se a identificação de uma substância com massa 238,1 [M+], sendo este identificado como **69** com fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$, e outra substância com massa 252,1 [M+] identificado como **55** apresentando fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$. Destas substâncias, **55** já foi isolada da espécie *Helietta*,²⁷ enquanto **69** foi obtida sinteticamente.⁷⁶

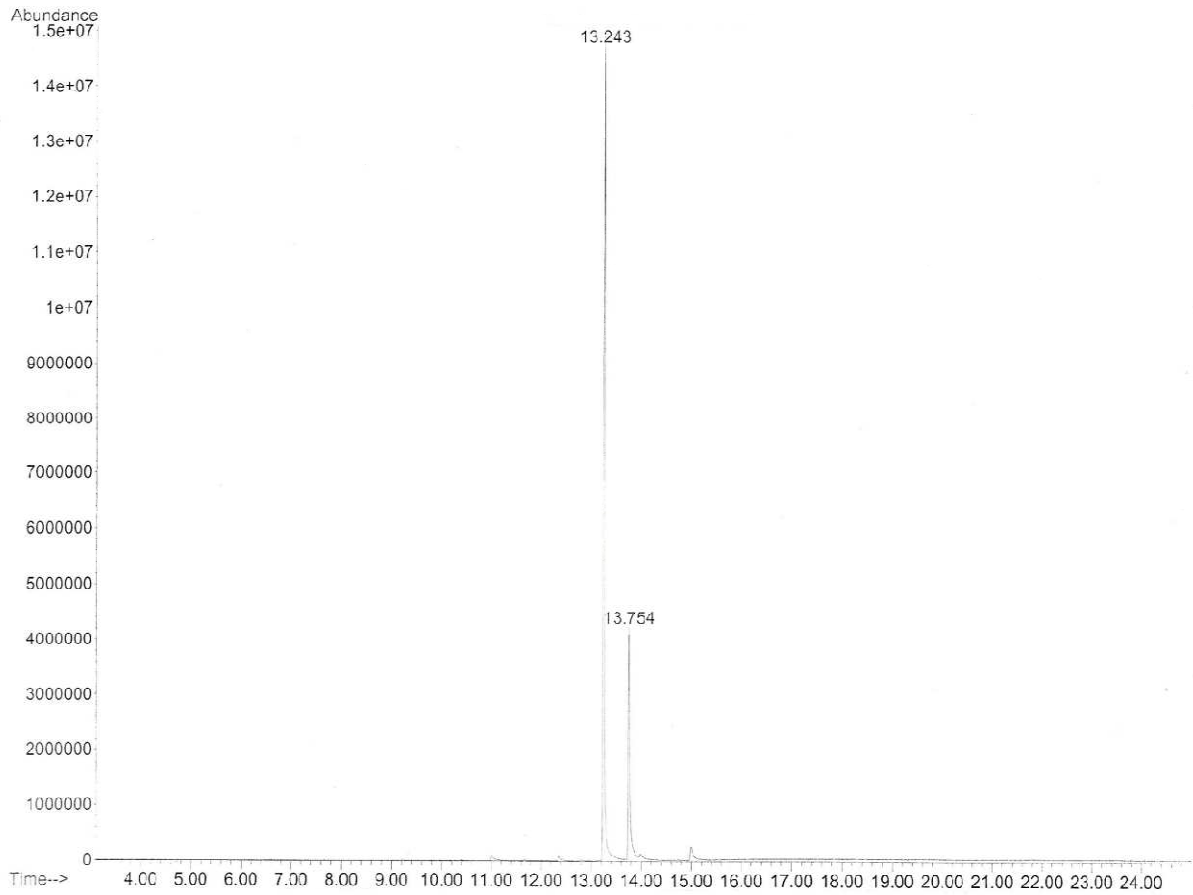


Figura 31: Cromatograma da mistura de derivados do ácido cinâmico, **69** e **55**

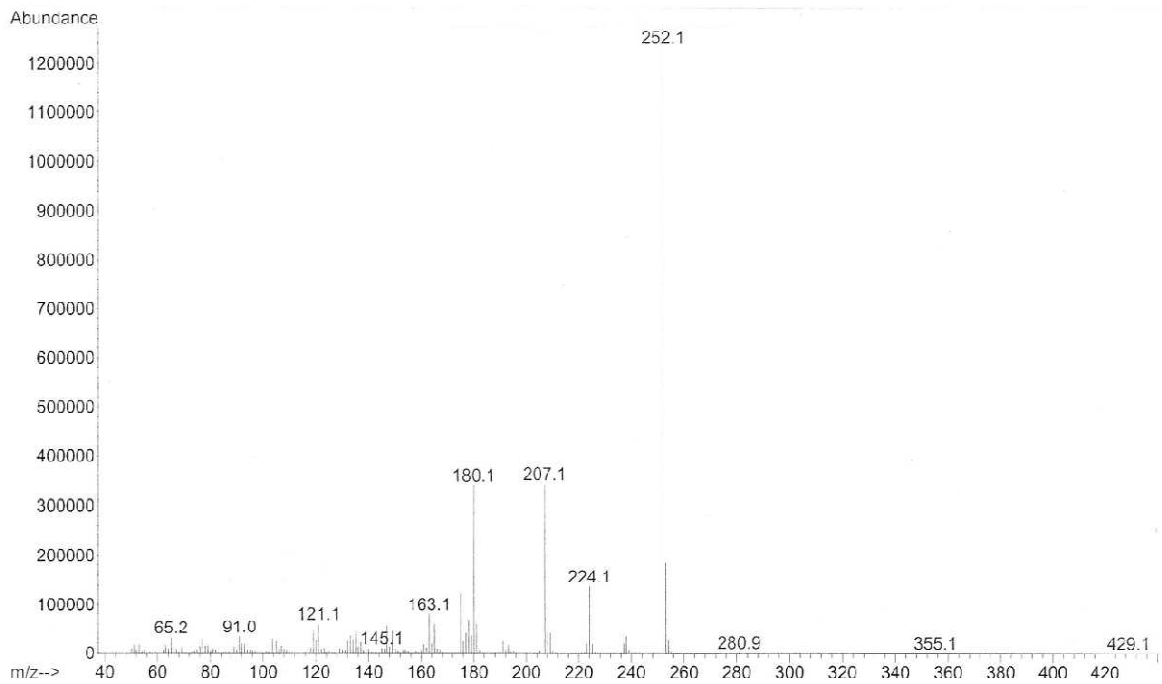


Figura 32: Espectro de massas de 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (**55**)

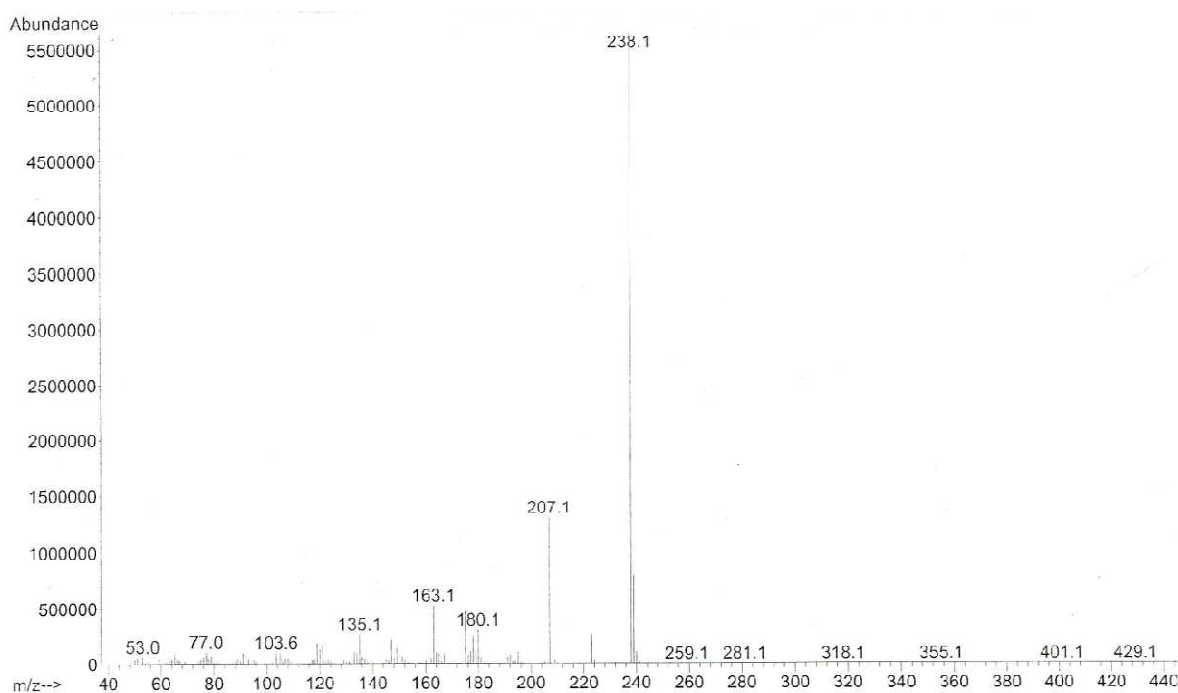
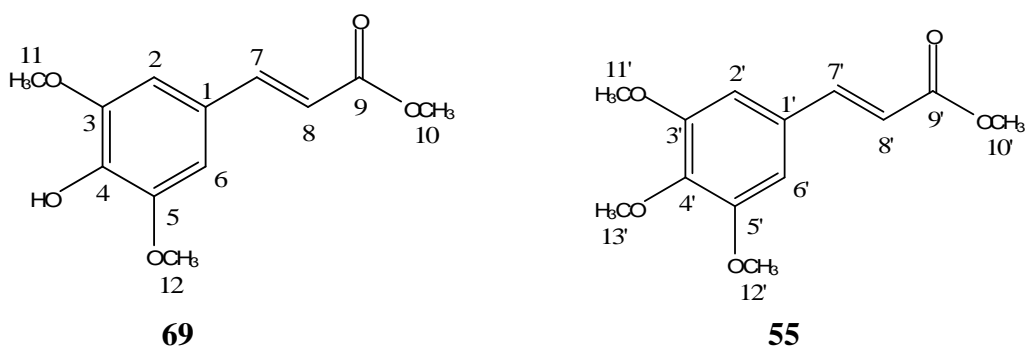


Figura 33: Espectro de massas de 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**)

Além da espectrometria de massas, fizeram-se análises de RMN de ^1H e ^{13}C , e comparação com dados da literatura.^{27, 76} Estes metabólitos foram isolados a partir da fração acetato básica, proveniente do EBM de *H. apiculata*, conforme descrito na página 50.



Através da análise do espectro de RMN de ^1H , Figura 34, observa-se a identificação do metabólito principal, **69**. Em δ 6,27 ppm e 7,57 ppm sinalizam os dois hidrogênios, H-8 e H-7, correspondentes a dupla ligação da cadeia alifática, os mesmos apresentam-se na forma de dubletos com constantes de acoplamento (J) de 15,9 Hz, o que caracteriza uma dupla em *trans*. Os dois hidrogênios do anel aromático sinalizam em δ 6,73 ppm, na forma de um singlete, demonstrando serem equivalentes. Sinalizando em δ 5,91 ppm, apresenta-se o

hidrogênio correspondente a hidroxila do anel em C-4. Para as metoxilas tem-se a sinalização em δ 3,77 ppm (3H, s, H-10) e δ 3,89 ppm, (6H, s, H-11; H-12).

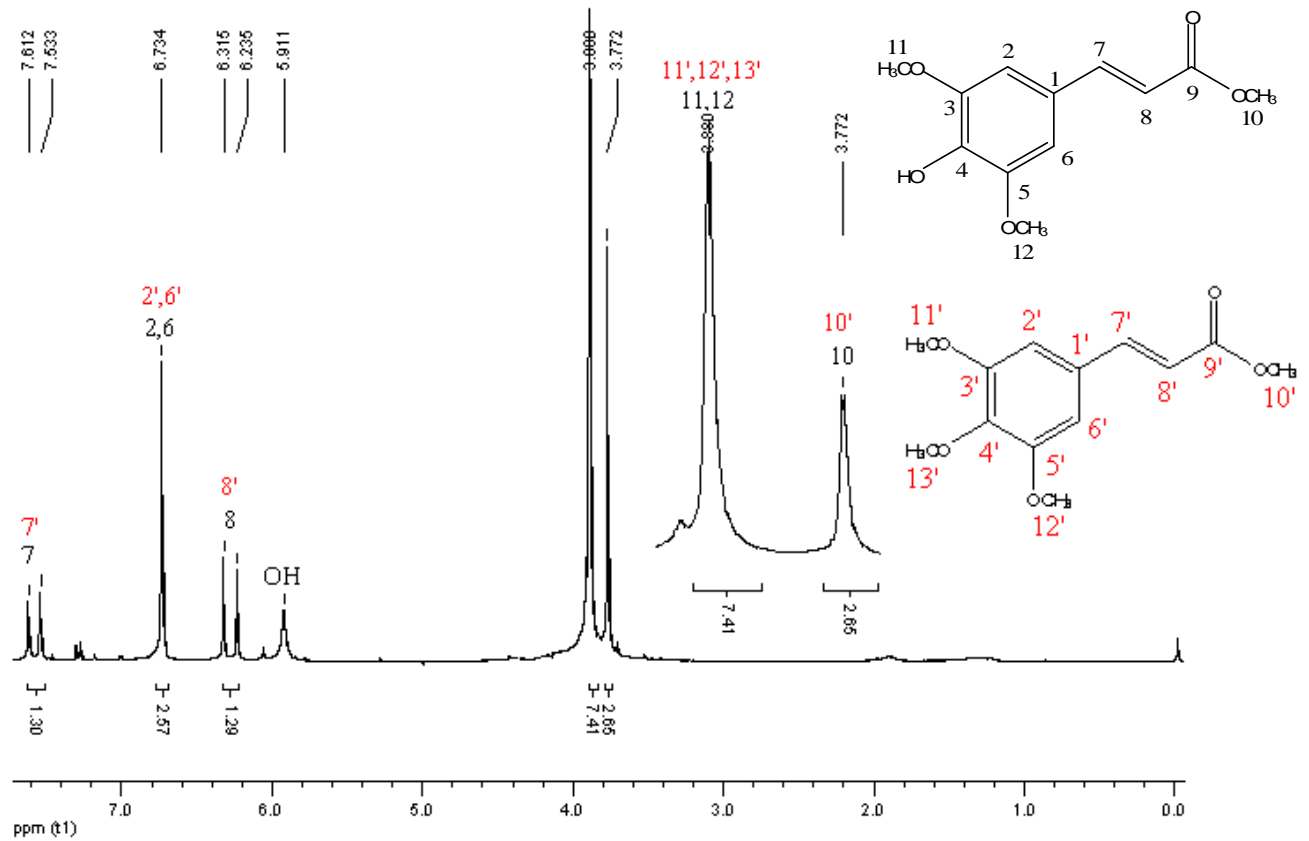


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H de **55** e **69** em CDCl_3 a 200 MHz

Ao analisar o espectro 2D COSY, Figura 35, é possível visualizar o sistema de spins referente ao acoplamento existente entre os hidrogênios da dupla ligação, H-7 (δ 7,57 ppm) e H-8 (δ 6,27 ppm).

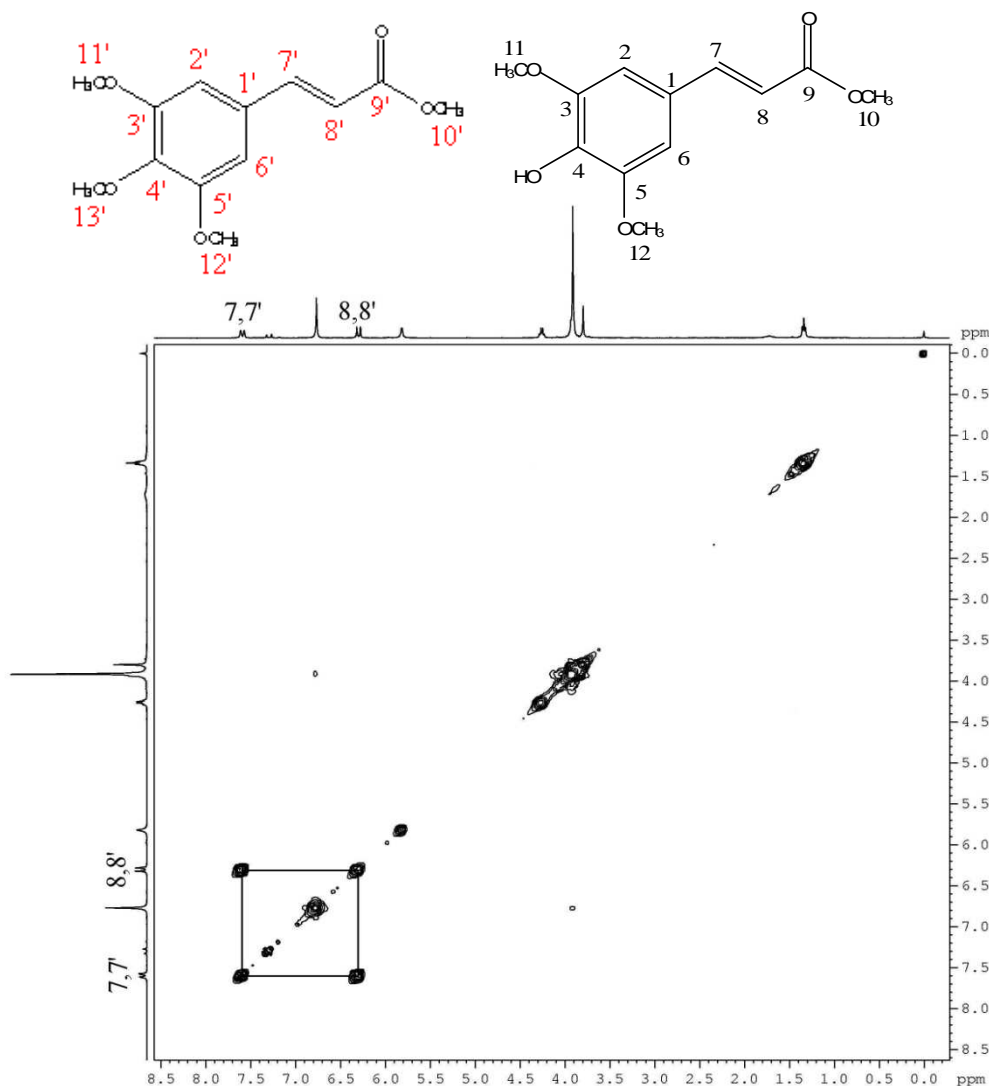


Figura 35: Espectro de RMN 2D COSY de **69** e **55**, em CDCl_3 a 400 MHz.

Analisando o espectro de ^{13}C (Figura 36) identifica-se a presença de três metoxilas, sendo que as mesmas sinalizam em δ 50,93 ppm, C-10, e δ 55,56 ppm referente as metoxilas C-11 e C-12. Os carbonos oxigenados, C-3 e C-5, sinalizam em δ 146,46 ppm. Para os carbonos hidrogenados, H-2 e H-6, tem-se deslocamento químico de δ 104,26 ppm. Em δ 125,15 ppm e 136,39 ppm são identificados como sendo os carbonos quaternários C-1 e C-4. E para os carbonos da dupla ligação, C-8 e C-7, são observados deslocamentos químicos em δ 115,20 e 144,45 ppm.

De acordo com o espectro de RMN de ^{13}C é possível visualizar a sobreposição de alguns sinais, o que confirma a existência de uma mistura. Propõe-se para este metabólito minoritário a estrutura **55**, conhecido com 3,4,5-trimetoxicinamato de metila.

Na Figura 36 são identificados os deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes a **69** e **55**.

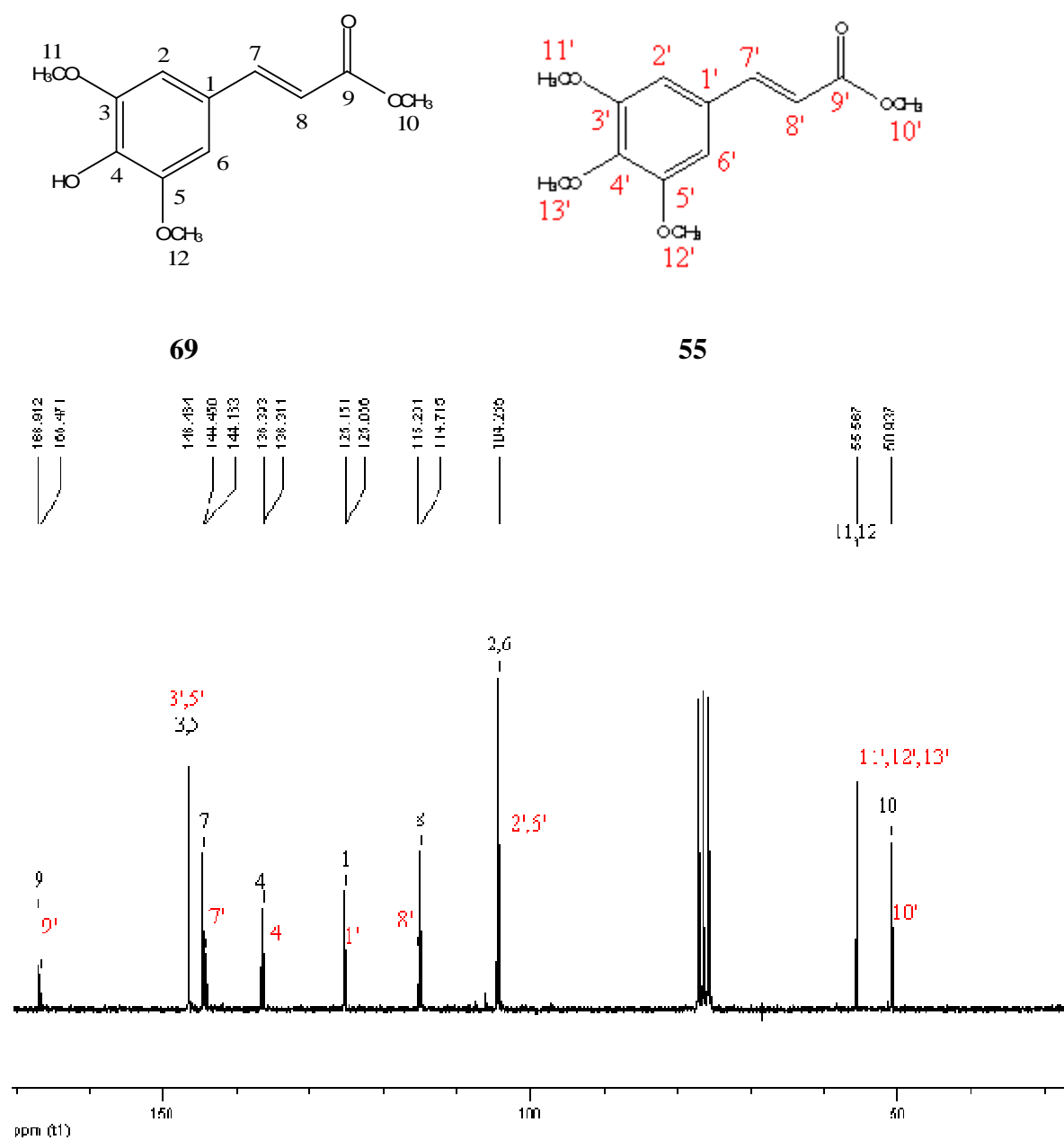


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C de **69** e **55** em CDCl_3 a 50 MHz

No espectro de HETCOR, Figura 37, foi possível visualizar as correlações entre carbonos e hidrogênios de **69** e **55**.

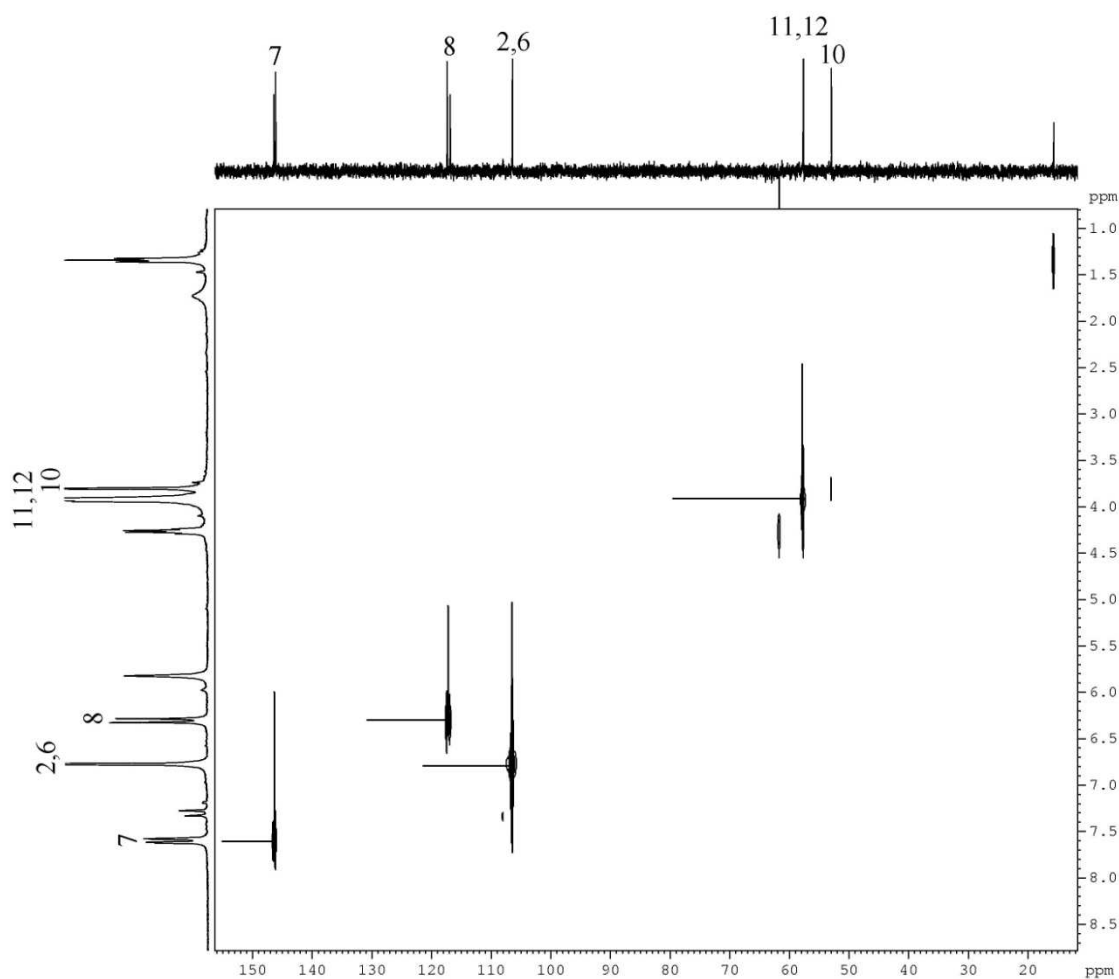


Figura 37: Espectro 2D HETCOR de **69** e **55** em CDCl_3 a 400 MHz

Na Tabela 17 são listados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , do metabólito **69**, presente em maior quantidade na mistura isolada, e comparação com dados do mesmo obtido sinteticamente por Gaspar e col. (2010).⁷⁶

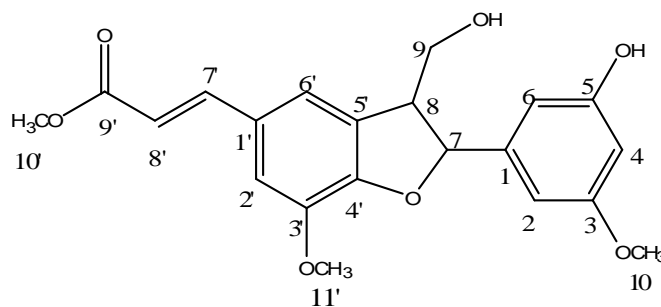
Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**69**) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz)

| Posição | δ_{H} | δ_{H}^* | δ_{C} | δ_{C}^* |
|---------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 1 | - | - | 125,15 | 124,4 |
| 2 | 6,7 (s) | 7,03 (s) | 104,26 | 106,2 |
| 3 | - | - | 146,46 | 148,0 |
| 4 | 5,91 (OH) | 8,98 (OH) | 136,39 | 138,3 |
| 5 | - | - | 146,46 | 148,0 |
| 6 | 6,7 (s) | 7,03 (s) | 104,26 | 106,2 |
| 7 | 7,57 (d, $J=15,9$ Hz) | 7,57 (d, $J=15,9$ Hz) | 144,45 | 145,5 |
| 8 | 6,27 (d, $J=15,9$ Hz) | 6,54 (d, $J=15,9$ Hz) | 114,71 | 114,6 |
| 9 | - | - | 166,9 | 167,1 |
| 10 | 3,77 (s) | 3,72 (s) | 50,93 | 51,3 |
| 11 | 3,90 (s) | 3,80 (s) | 55,56 | 56,1 |
| 12 | 3,88 (s) | 3,80 (s) | 55,56 | 56,1 |

* δ_{H} (DMSO-d_6 , 300.13 MHz); δ_{C} (DMSO-d_6 , 75.47 MHz) conforme Gaspar et al.⁷⁶

5.3.2 T26

A partir da fração acetato básica, proveniente do extrato bruto das cascas de *H. apiculata*, descrito na página 51 da parte experimental, fez o isolamento do metabólito **T26**. Este foi isolado na forma de cristais brancos, que se demonstraram puros quando eluidos em CCD, sendo submetidos a técnicas espectroscópicas, além de medidas de difração de raios-X. Através de análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais propõe-se a estrutura como sendo uma neolignana (**70**) de fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$.



70

Através da análise do espectro de ^1H , Figura 38 e 39, percebe-se a presença de vinte e dois hidrogênios. Detecta-se a presença de três grupamentos metoxilas sinalizando em δ 3,79 ppm, 3,86 ppm e 3,91 ppm referentes as metoxilas 10', 10 e 11'. Entre 3,7 e 4,0 ppm tem-se os hidrogênios H-9, sinalizando juntamente com as metoxilas. Ainda próximo a essa região observa-se o deslocamento do H-8 na forma de um multipletto em δ 3,66 ppm. Sinalizando em δ 5,62 ppm se apresenta o H-7 como um dubleto ($J=7,2$ Hz), juntamente com esse sinal identifica-se a presença da hidroxila do álcool presente no C-9. Na região referente aos deslocamentos químicos de aromáticos identifica-se a presença de um singletto, integrando para três hidrogênios em δ 6,89 ppm, sendo este identificado como H-2, H-4 e H-6. Já os hidrogênios H-2' e H-6' pertencentes ao outro anel aromático, sinalizam em δ 7,06 e 7,0 ppm, respectivamente. Em δ 7,64 ppm e 6,30 ppm, sinalizam os hidrogênios da ligação dupla H-7' e H-8', ambos na forma de dubletos com $J=16$ Hz, caracterizando uma dupla em *trans*.

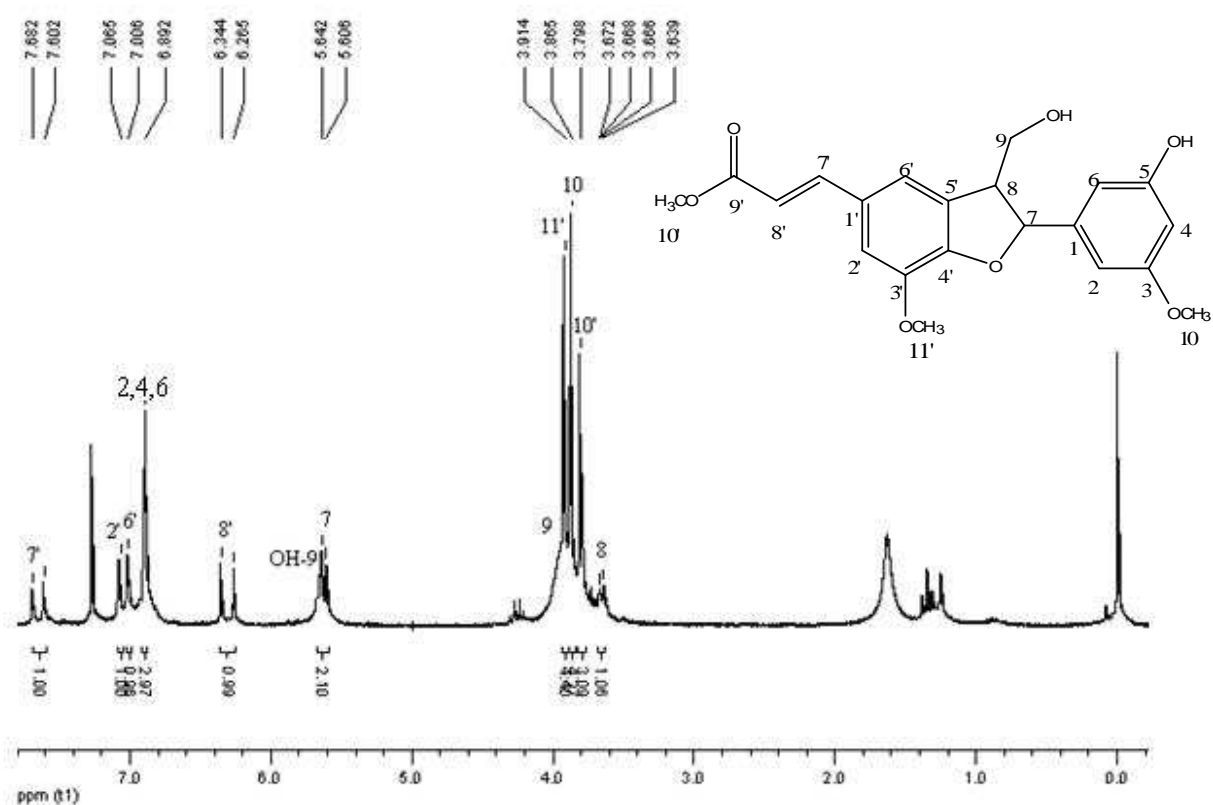


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H de **T26** em CDCl_3 a 200 MHz

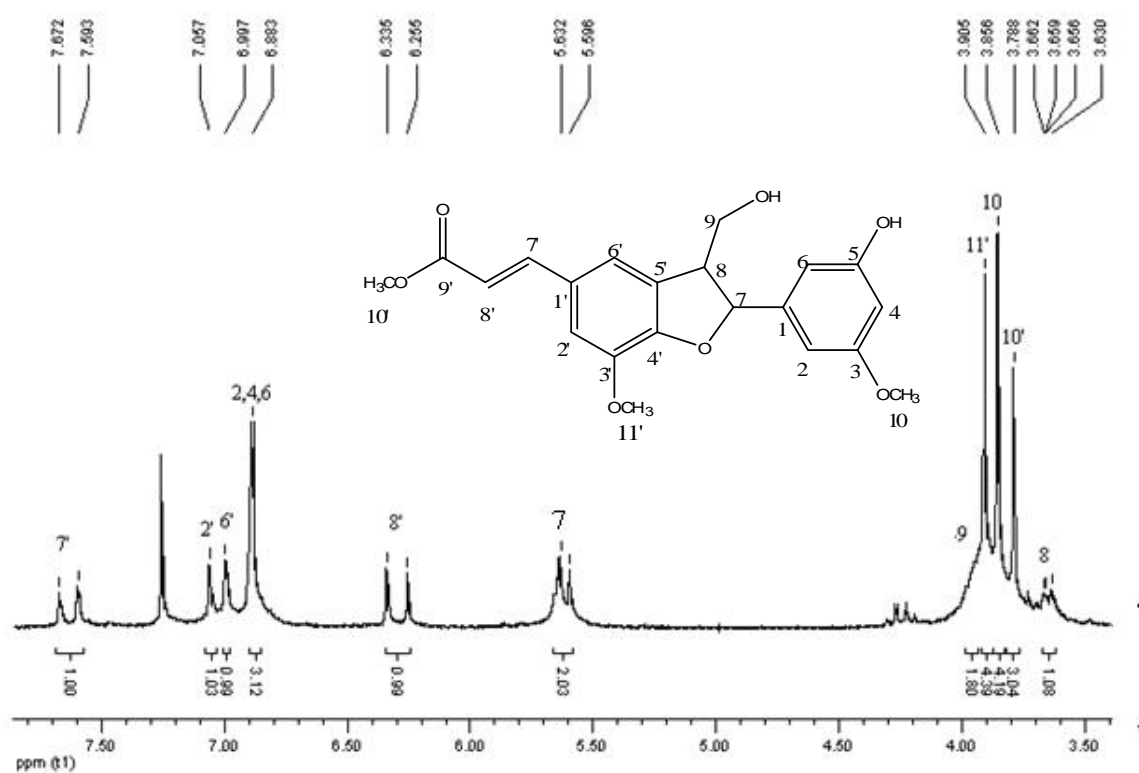


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H expandido de **T26** em CDCl_3 a 200 MHz

Analisando o espectro de COSY, Figura 40, identifica-se o sistema de spins referente ao acoplamento entre os hidrogênios da ligação dupla H-7' (δ 7,64 ppm) e H-8' (δ 6,30 ppm). Além do acoplamento entre H-7 (δ 5,62 ppm) e H-8 (δ 3,66 ppm), e deste com H-9.

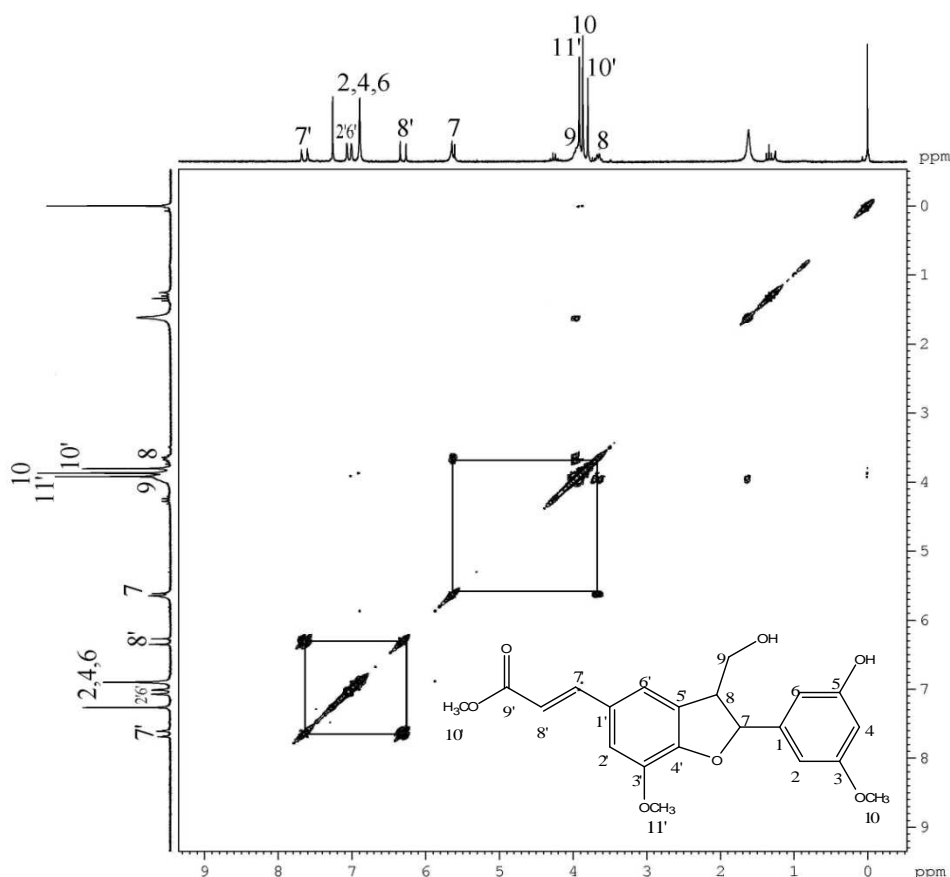


Figura 40: Espectro 2D COSY de **T26** em CDCl_3 a 200 MHz

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C de **T26**, (Figura 41), tem-se a confirmação da presença de vinte e um carbonos na estrutura. Em δ 167,73 ppm sinaliza o carbono carbonílico C-9'. Os carbonos referentes às metoxilas sinalizam em δ 51,60 ppm (C-10'), 55,99 ppm (C-11') e 56,03 ppm (C10). Em δ 63,92 ppm sinaliza o carbono metilênico C-9, conforme identificado pelo espectro Dept 135 (Figura 41). Os carbonos hidrogenados não-aromáticos, C-7 e C-8, sinalizam em 88,71 ppm e 53,16 ppm, respectivamente, enquanto os carbonos hidrogenados aromáticos sinalizam em δ 108,75 ppm (C-2), 111,93 ppm (C-6'), 114,41 ppm (C-4), 115,21 ppm (C-8'), 117,27 ppm (C-2'), 119,41 ppm (C-6) e 144,92 ppm (C-7'). Sinalizando em δ 144,63 ppm, 146,72 ppm e 145,86 ppm tem-se os carbonos quaternários substituídos, C-3', C-3 e C-5. Já o restante dos carbonos quaternários sinalizam em δ 128,47 ppm (C-1'), 128,69 ppm (C-5') e 132,46 ppm (C-1).

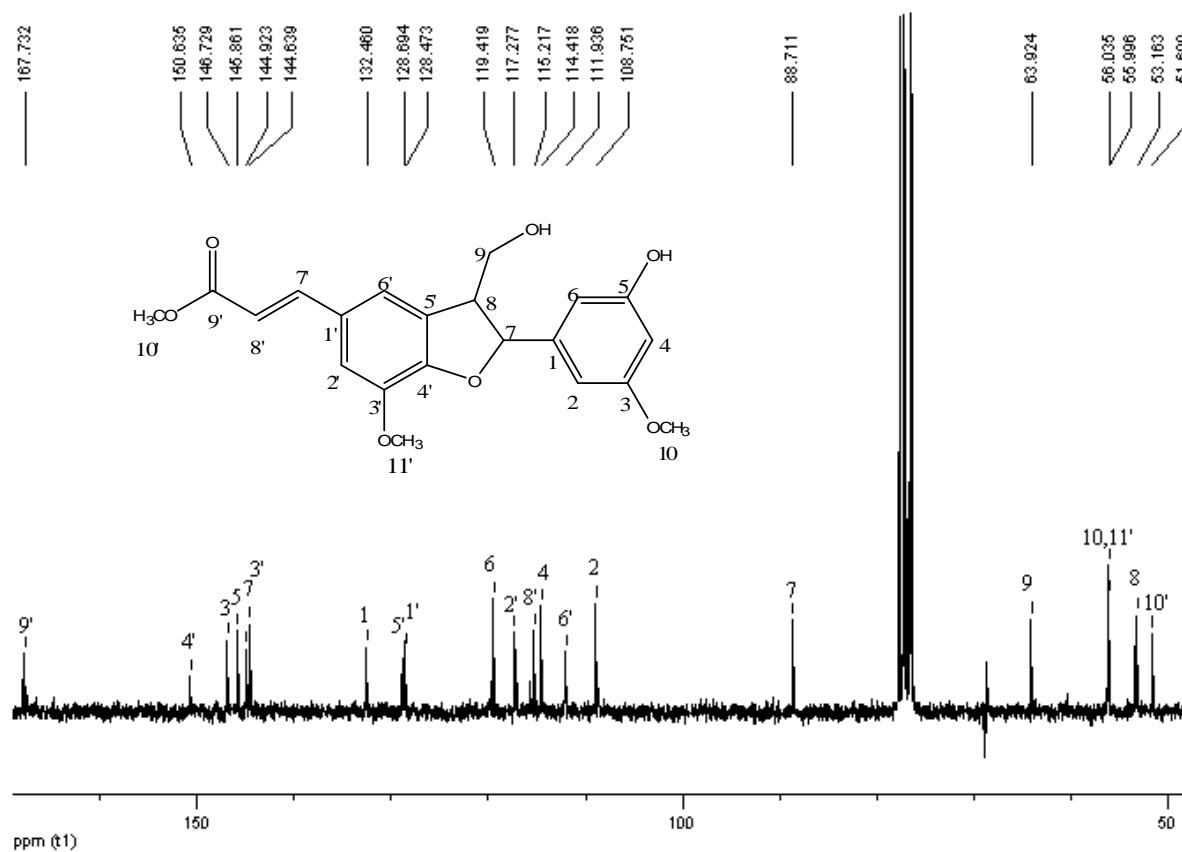


Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C de **T26** em CDCl_3 a 50 MHz

No espectro de Dept 135 (Figura 42) confirma-se a presença de um grupo metilênico, além de doze carbonos hidrogenados.

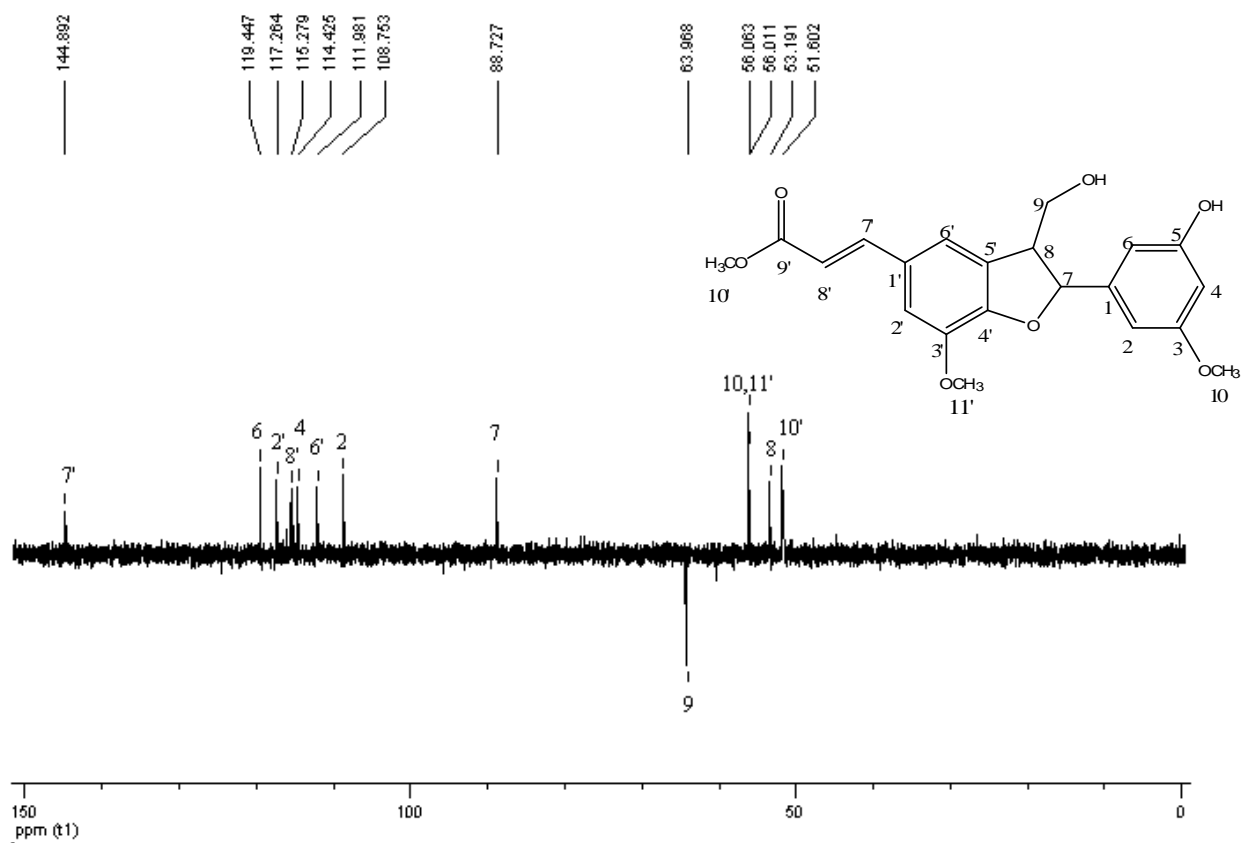


Figura 42: Espectro de RMN Dept 135 de **T26** em CDCl_3 a 50 MHz

A análise do espectro de HMQC representado nas Figuras 43 e 44 possibilitaram a correlação direta entre os hidrogênios e carbonos da estrutura.

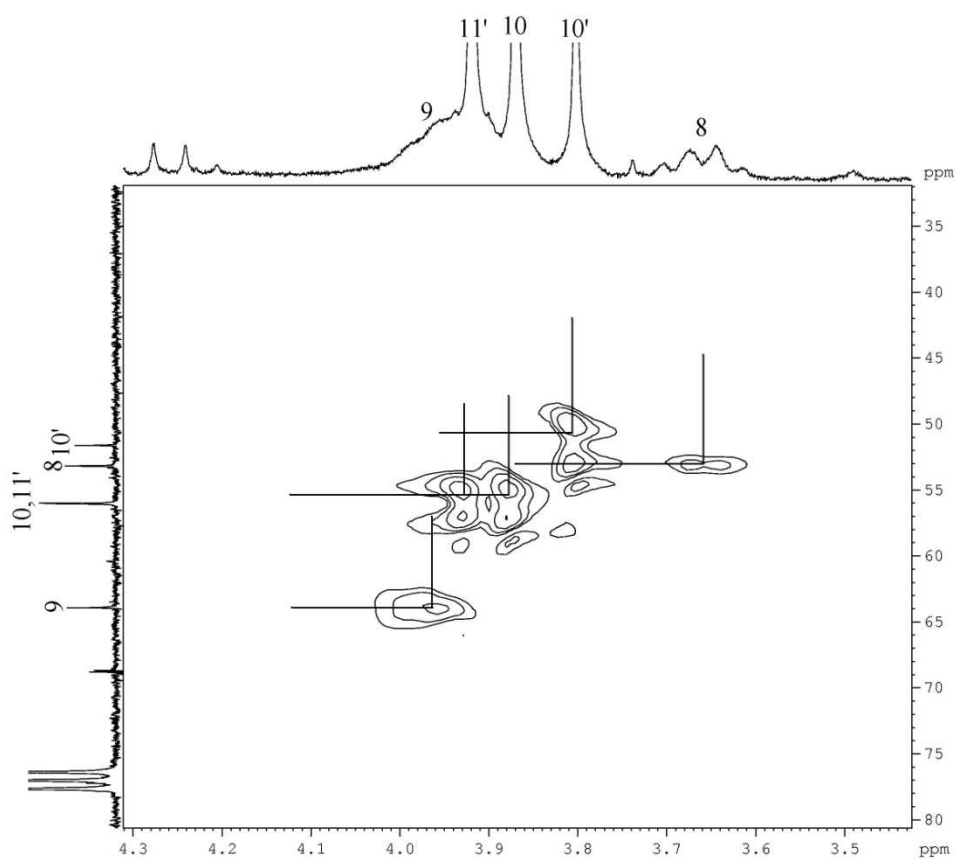


Figura 43: Espectro 2D HMQC expandido de **T26** em CDCl_3 a 200 MHz

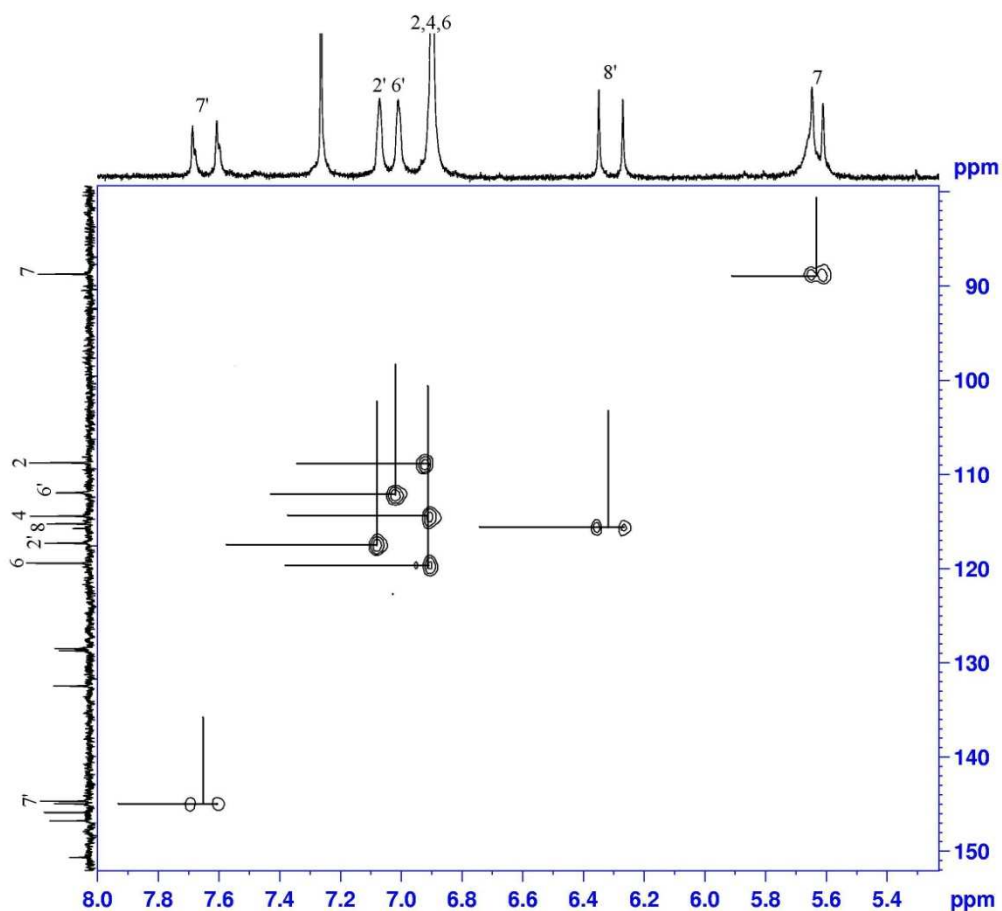
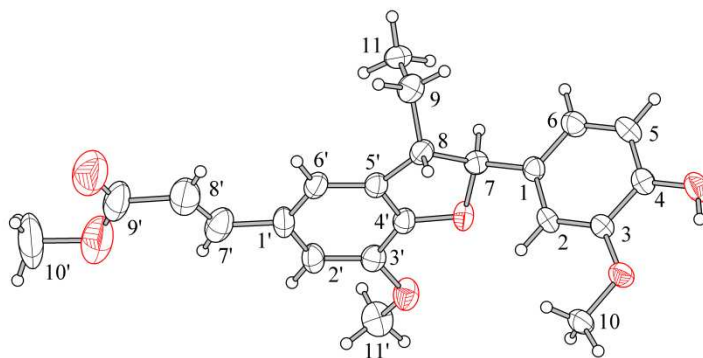


Figura 44: Espectro 2D HMQC expandido de **T26** em CDCl_3 a 200 MHz

Como T26 foi isolado na forma de cristais o mesmo foi submetido a medidas de difração de raios-X, sendo detectadas mais duas substâncias na mistura, conforme Figura 45. A estrutura com grupamento etila na posição C-8 foi obtida numa porcentagem de 69 % nessa mistura, enquanto a estrutura com o grupamento propila foi obtida com 31 %.



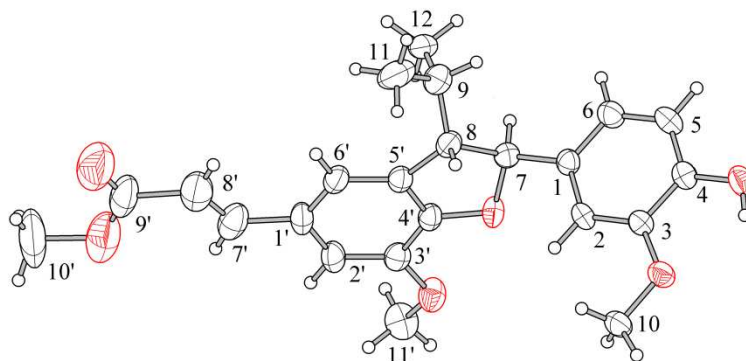


Figura 45: Difração de Raios-X de **T26**

Assim, acredita-se ser uma mistura com três compostos sendo um majoritário, detectado por RMN, e os outros dois minoritários, que cristalizaram, sendo detectados por difração de raios-X.

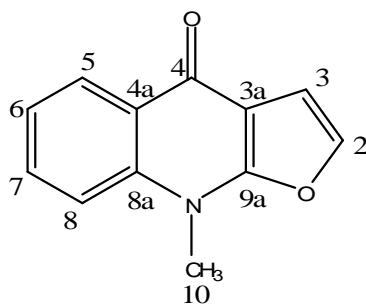
Após injeção da amostra em HPLC foi possível identificar a mesma como uma mistura de três substâncias, sendo uma majoritária, conforme visualizado na Figura 46. Devido a pouca quantidade isolado dessa mistura (**T26**), esta não foi passível de separação.



Figura 46: Cromatograma de HPLC da mistura **T26** a 360 nm

5.3.3 Isodictamina (11)

O alcalóide isodictamina (**11**), pertencente à classe dos furoquinolínicos, foi isolado da fração acetato básica proveniente do EBM de *H. apiculata* conforme descrito na parte experimental, página 51, na forma de cristais alaranjados. Após ser submetido a técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, e por comparação com dados já descritos na literatura⁷⁷ foi possível identificar este metabólito como sendo o alcalóide isodictamina, de estrutura **11**.



11

Analisando o espectro de RMN de ^1H , Figura 47, pode-se observar a presença de um grupamento metila sinalizando em δ 3,90 ppm, na forma de um singlete, caracterizado como sendo o H-10. Dois sinais característicos de anel furano são identificados em δ 7,07 ppm e δ 7,28 ppm, ambos na forma de dubleto com $J=2,2$ Hz, identificados como H-3 e H-2 respectivamente. Os hidrogênios aromáticos sinalizam em δ 7,35 ppm (1H, td, $J=8,0$; 1,2 Hz, H-6), δ 7,47 ppm (1H, d, $J=8,2$ Hz, H-8), 7,68 ppm (1H, td, $J=8,6$; 1,6 Hz, H-7) e em δ 8,55 ppm (1H, dd, $J=1,4$; 8,0 Hz, H-5).

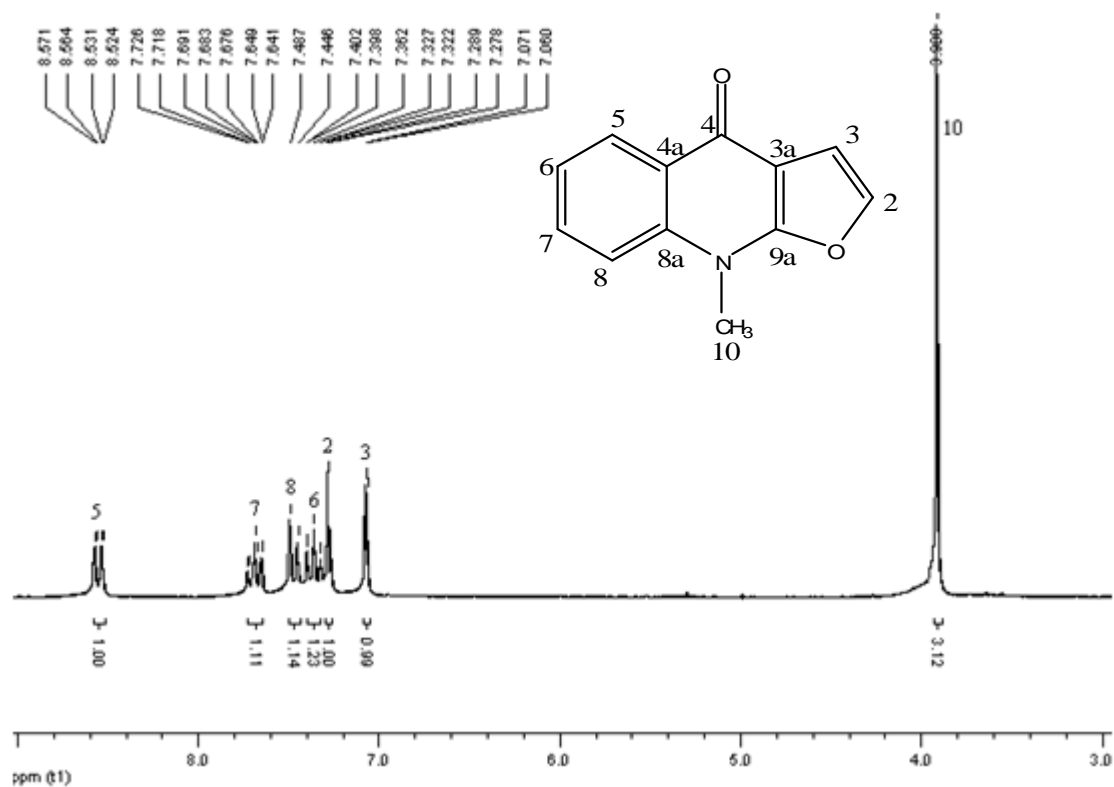


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de isodictamina (**11**) em CDCl_3 a 200MHz

A região dos aromáticos apresenta melhor visualização através da expansão do espectro de ^1H mostrada na Figura 48.

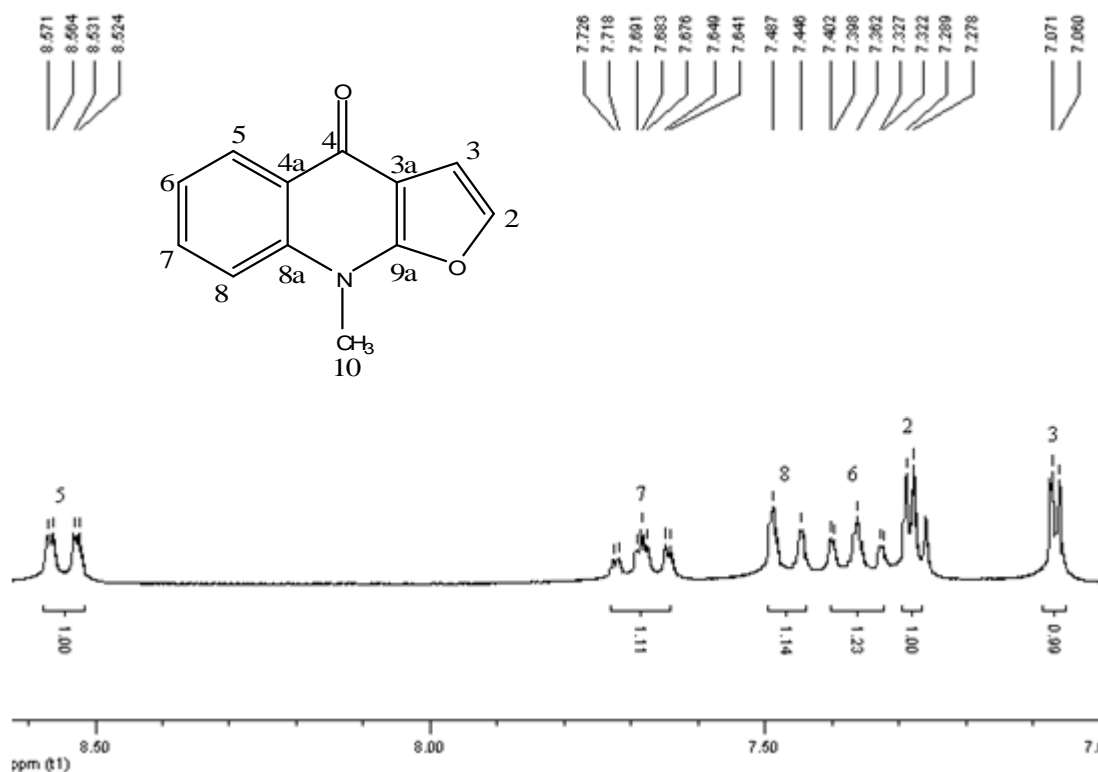


Figura 48: Expansão do espectro de RMN de ^1H de isodictamina (**11**) em CDCl_3 a 200 MHz

Através do espectro 2D COSY são visualizados os acoplamentos entre o H-2 (δ 7,28 ppm) e o H-3 (δ 7,07 ppm) do anel furano, além dos acoplamentos entre os hidrogênios do anel aromático, H-5, H-6, H-7 e H-8, conforme descreve a Figura 49.

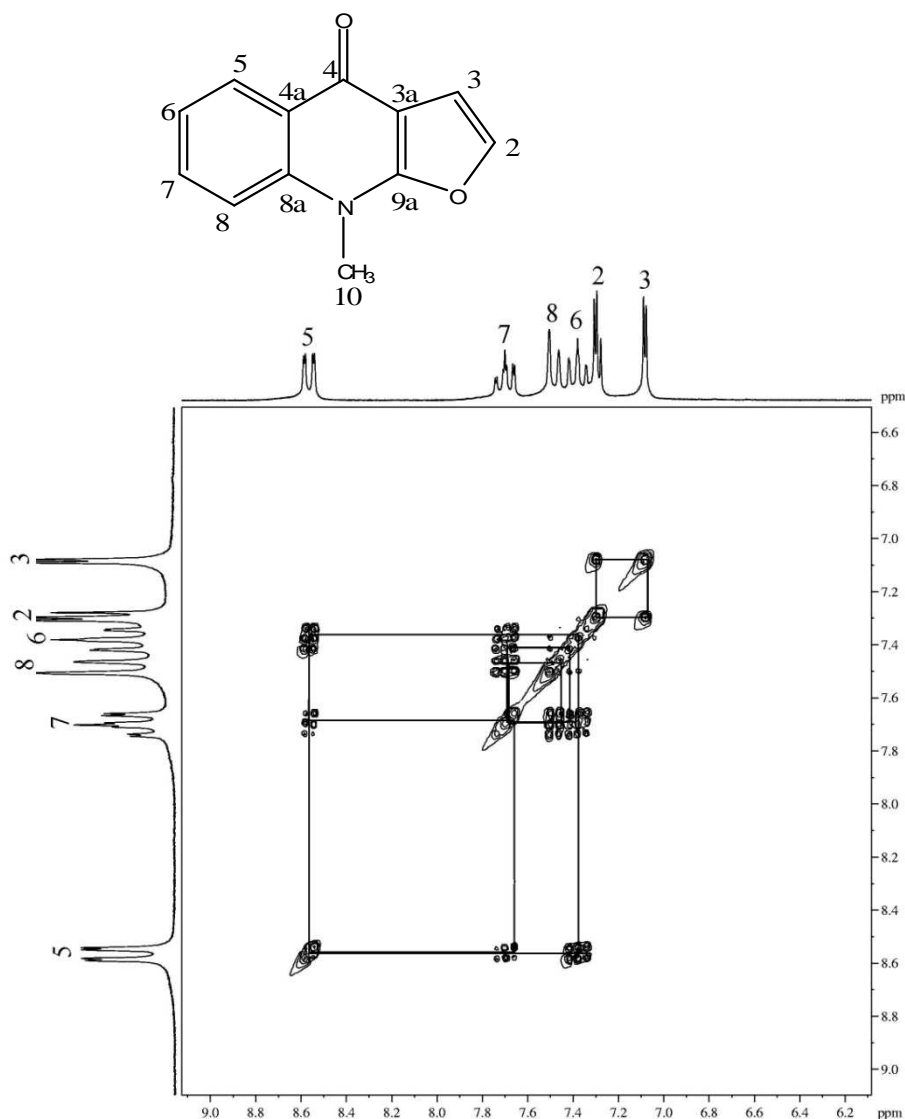


Figura 49: Espectro 2D COSY de isodictamina (**11**) em CDCl_3 a 200 MHz

Através da análise de RMN de ^{13}C (Figura 50), confirma-se a presença de doze carbonos. Em $\delta=30,95$ ppm sinaliza o carbono metílico, C-10, ligado a um átomo de nitrogênio. Os carbonos, C-2 e C-3, do anel furano, sinalizam em δ 137,52 ppm e δ 107,52 ppm. Para os carbonos hidrogenados tem-se deslocamentos químicos em δ 127,05 ppm, C-5, δ 122,19 ppm, C-6, δ 131,67 ppm, C-7, e δ 133,66 ppm para o C-8. Em δ 173,0 ppm sinaliza o carbono carbonílico, C-4. Os carbonos quaternários, C-3a, C-4a, C-8a e C-9a sinalizam em δ 106,0 ppm, δ 124,89 ppm, δ 137,84 ppm e δ 155,64 ppm, respectivamente.

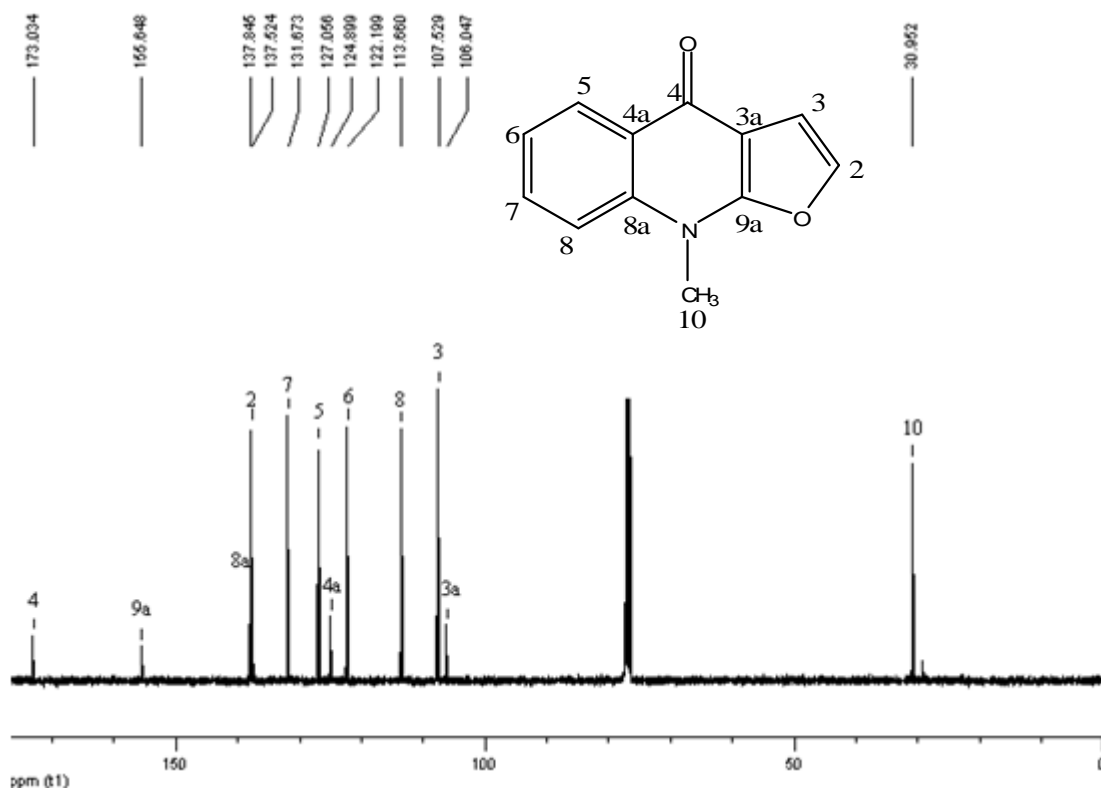


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C de isodictamina (**11**) em CDCl_3 a 50MHz

No espectro de Dept 135, temos a presença de um carbono metílico e seis carbonos hidrogenados, além da ausência de carbonos metilênicos, confirmando a estrutura **11**, como mostra a Figura 51.

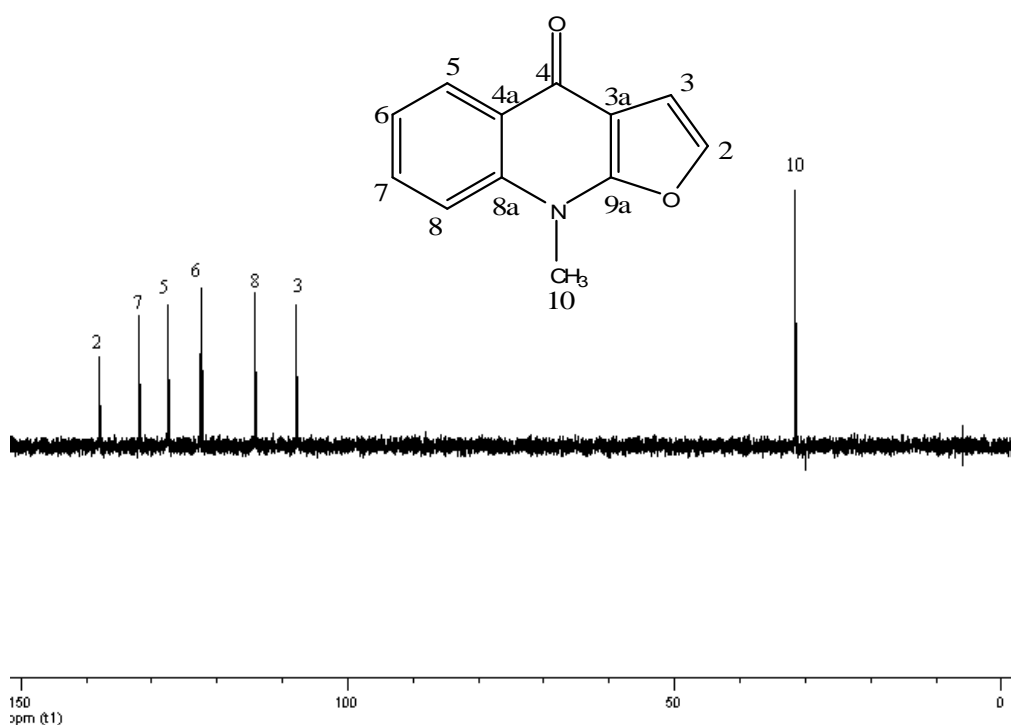


Figura 51: Espectro de Dept 135 de isodictamina (**11**) em CDCl_3 a 50 MHz

Na Tabela 18, são demonstrados os deslocamentos químicos de **11** e comparação com dados da literatura.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Isodictamina (**11**) (CDCl_3 , ^1H a 200 MHz; ^{13}C a 50 MHz)

| Posição | δ_{H} | δ_{H^*} | δ_{C} | δ_{C^*} |
|---------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 2 | 7,28 (d, $J=2,2$ Hz) | 7,32 (d, $J=1,0$ Hz) | 137,52 | 132,1 |
| 3 | 7,07 (d, $J=2,2$ Hz) | 7,14 (d, $J=1,0$ Hz) | 107,52 | 107,2 |
| 3a | - | - | 106,04 | 105,7 |
| 4 | - | - | 173,03 | 172,2 |
| 4a | - | - | 124,89 | 124,5 |
| 5 | 8,55 (dd, $J=1,4$; 8,0 Hz) | 8,59 (dd, $J=7,9$ Hz) | 127,05 | 126,7 |
| 6 | 7,35 (td, $J=8,0$; 1,2 Hz) | 7,41 (t, $J=7,9$ Hz) | 122,19 | 121,9 |
| 7 | 7,68 (td, $J=8,6$; 1,6 Hz) | 7,74 (t, $J=7,3$ Hz) | 131,67 | 131,4 |
| 8 | 7,47 (d, $J=8,2$ Hz) | 7,53 (d, $J=8,4$ Hz) | 113,66 | 113,3 |
| 8a | - | - | 137,84 | 137,2 |
| 9a | - | - | 155,64 | 137,5 |
| 10 | 3,90 (s) | 3,96 (s) | 30,95 | 30,7 |

* δ_{H} e δ_{C} (CDCl_3) conforme Pirrung et al.⁷⁷

5.4 ÓLEOS VOLÁTEIS DE *Helietta apiculata* Benth

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, resultantes do metabolismo secundário das plantas.

5.4.1 Análise química do óleo essencial de *Helietta apiculata*

O óleo essencial da espécie *H. apiculata* foi extraído de diferentes épocas do ano, com o objetivo de avaliar as modificações químicas da espécie. Foram extraídos óleo essencial no inverno (OIN), primavera (OPR), verão (OVE) e outono (OOU). Os rendimentos médios dos óleos para cada estação foram de 0,12% (OIN), 0,075% (OPR), 0,057% (OVE) e 0,068% (OOU).

A Tabela 19 apresenta a composição química do óleo essencial de *H. apiculata* coletado nas diferentes épocas do ano. Estes resultados foram obtidos através do cálculo do Índice de Kovats, em conjunto com análise do cromatograma de massas de cada composto comparada com a literatura.⁷⁴

Tabela 19: Composição química do óleo essencial de *H. apiculata* coletado nas quatro estações do ano (%)

| Número | Componente | IK ^a | IK ^b | Inverno | Primavera | Verão | Outono | Identificação |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|---------|-----------|-------|--------|---------------|
| 1 | Limoneno | 1030 | 1031 | 9,8 | - | 27,1 | 28,3 | Co-injeção |
| 2 | Linalol | 1092 | 1098 | 2,74 | - | 2,27 | 1,83 | CG-MS |
| 3 | <i>Cis</i> -óxido limoneno | 1132 | 1134 | 2,3 | - | 1,97 | 3,12 | CG-MS |
| 4 | Carveol | 1216 | 1217 | 3,47 | 2,17 | - | - | CG-MS |
| 5 | Carvona | 1239 | 1242 | 1,36 | 3,48 | 2,89 | 2,18 | CG-MS |
| 6 | <i>Trans</i> óxido carvona | 1277 | 1277 | 1,15 | 0,87 | 1,08 | 1,11 | CG-MS |
| 7 | Neodiidrocarveol acetato | 1305 | 1303 | 1,8 | 0,81 | - | 2,09 | CG-MS |
| 8 | δ -elemeno | 1341 | 1339 | 6,12 | 9,76 | 9,15 | 7,32 | CG-MS |
| 9 | <i>Cis</i> carvil acetato | 1368 | 1362 | 0,87 | 0,76 | 0,32 | - | CG-MS |
| 10 | β -bourboneno | 1382 | 1384 | 6,58 | 6,74 | 7,14 | 5,48 | CG-MS |
| 11 | β -elemeno | 1386 | 1391 | 2,83 | 9,84 | 8,42 | 7,18 | CG-MS |
| 12 | E-cariofileno | 1414 | 1418 | 1,67 | 2,23 | 0,42 | 0,65 | CG-MS |
| 13 | γ -elemeno | 1430 | 1433 | 7,74 | 7,63 | 5,41 | 7,07 | CG-MS |
| 14 | α -humeleno | 1454 | 1454 | 2,21 | 3,44 | - | - | CG-MS |
| 15 | γ -muureleno | 1475 | 1477 | 3,54 | 2,43 | 1,57 | 1,96 | CG-MS |
| 16 | Biciclogermacreno | 1490 | 1494 | 1,43 | 1,20 | - | - | CG-MS |
| 17 | Germacreno A | 1503 | 1503 | 3,25 | - | - | - | CG-MS |
| 18 | β -bisaboleno | 1515 | 1509 | 0,84 | 1,13 | 0,53 | 1,40 | CG-MS |
| 19 | Elemol | 1544 | 1549 | 18,1 | 19,3 | 12,2 | 11,49 | CG-MS |
| 20 | Espatulanol | 1572 | 1576 | 7,31 | 6,45 | 6,32 | 5,96 | CG-MS |
| 21 | Óxido cariofileno | 1582 | 1581 | 0,77 | 0,65 | 0,86 | 0,92 | CG-MS |
| 22 | Epóxido humeleno | 1600 | 1606 | 1,31 | 3,27 | 4,12 | 2,11 | CG-MS |
| 23 | γ -eudesmol | 1636 | 1630 | 0,91 | 1,13 | - | - | CG-MS |
| 24 | α -muurolol | 1643 | 1645 | 1,14 | 1,23 | 1,31 | 1,98 | CG-MS |
| 25 | β -eudesmol | 1648 | 1649 | 2,11 | 1,86 | - | - | CG-MS |
| 26 | α -cadinol | 1655 | 1653 | 1,10 | 3,24 | 0,87 | 0,33 | CG-MS |
| 27 | Acetato nerolidol | 1720 | 1714 | 0,87 | 1,18 | - | - | CG-MS |
| 28 | Lanceol | 1750 | 1763 | 0,75 | - | - | - | CG-MS |
| Total dos Compostos Químicos (%) | | | | 94,07 | 90,8 | 93,95 | 92,48 | |

^a IK calculado; ^b IK literatura

Esta diferença na composição química pode ser visualizada nos cromatogramas dos óleos de cada estação, nas Figuras 52, 53, 54 e 55.

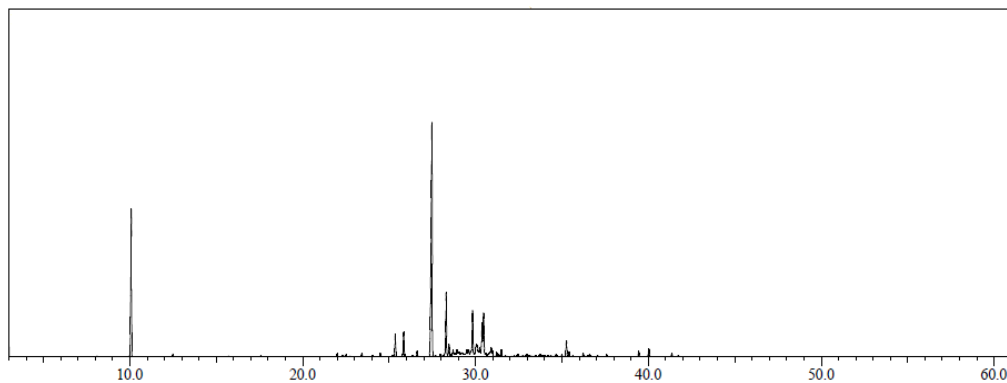


Figura 52: Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído no inverno

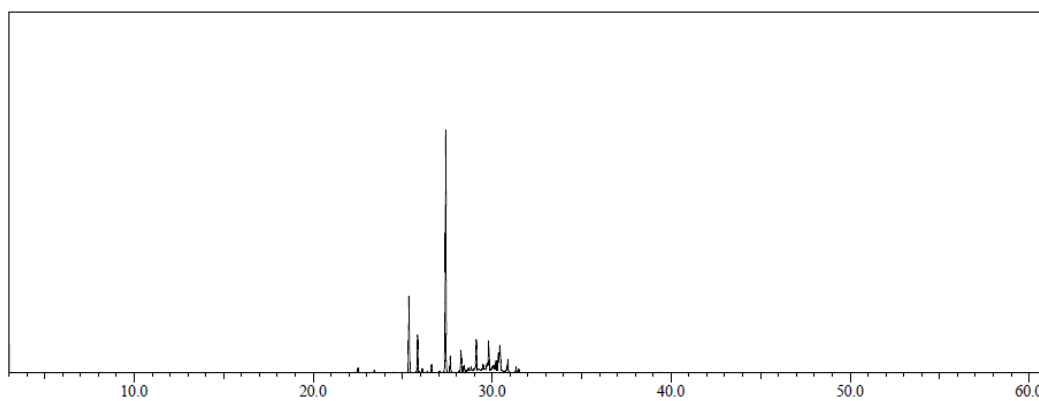


Figura 53: Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído na primavera

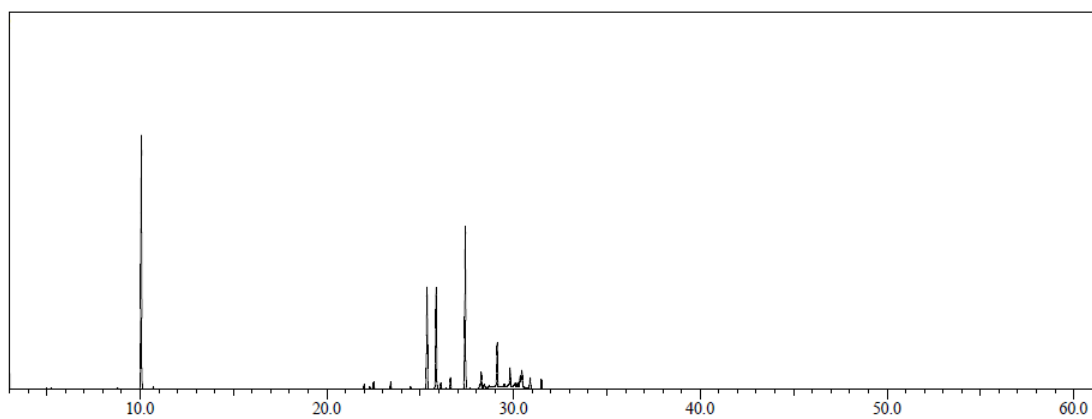


Figura 54: Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído no verão

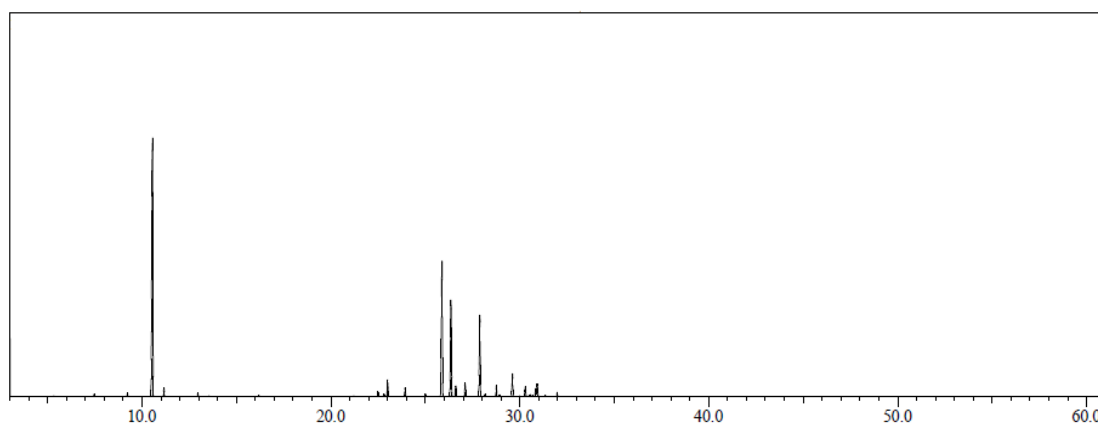


Figura 55: Cromatograma do óleo essencial de *Helietta apiculata* extraído no outono

A partir da análise da composição dos óleos percebe-se a maior concentração de δ -elemeno (8,08%), γ -elemeno(6,96%), elemol (15,27%) e espatulenol (6,51%) em todas as estações, enquanto limoneno aparece em quantidades consideráveis, porém não se manifesta durante a primavera (21,73%). A presença de limoneno (28,16%), elemol (15,70%) e espatulenol (11,31%) em grandes quantidades também foi encontrada em trabalho realizado por Ferronato⁵³ com a espécie *H. apiculata* coletada em Chapecó, Santa Catarina. Moura,⁷⁵ em 2002, observou maior porcentagem para limoneno (17,5%), germacreno D (16,6%), elemol (11,8%), biciclogermacreno (11,6%), guaiol (11,5%) e epi- α -bisabolol (7,24%) em estudo realizado com a mesma espécie coletada nos meses de janeiro e agosto.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com o intuito de avaliar o potencial antioxidante da planta em estudo, utilizou-se o método do DPPH, conforme descrito na parte experimental (páginas 55 e 56). Após a realização de um screening com o extrato bruto e as frações que demonstraram positividade frente ao método do BHT, estas foram submetidas à análise pelo método do DPPH quantitativo.

Devido à grande quantidade de substância necessária para a realização deste teste, o mesmo não foi possível de ser realizado com as substâncias isoladas, devido a pouca quantidade das mesmas. Com estas, foi então realizado um screening.

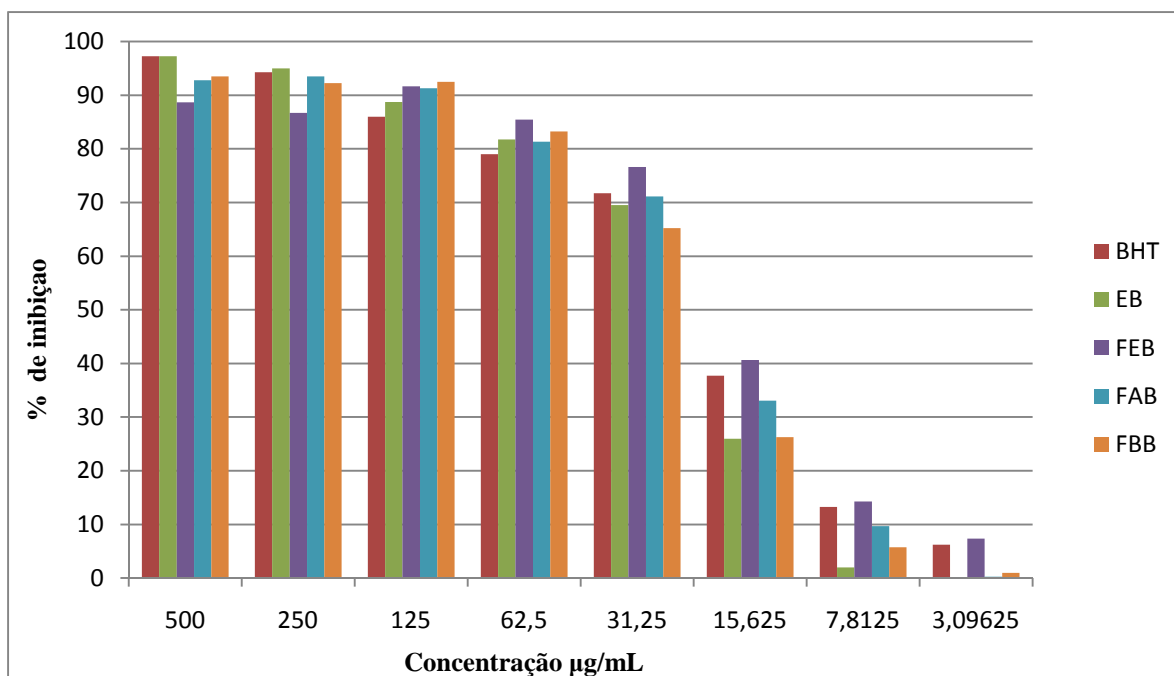
Na Tabela 20, são apresentados o potencial antioxidante do EB e frações da espécie *H. apiculata* comparadas ao padrão BHT.

Tabela 20: Dados de atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Helietta apiculata*

| Amostras/ Concentração ^a | % de Inibição | | | | |
|--|---------------|-------|-------|-------|-------|
| | BHT | EB | FEB | FAB | FBB |
| 500 | 97,25 | 97,25 | 88,67 | 92,78 | 93,50 |
| 250 | 94,25 | 95,00 | 86,69 | 93,53 | 92,25 |
| 125 | 86,00 | 88,75 | 91,62 | 91,29 | 92,50 |
| 62,5 | 79,00 | 81,75 | 85,46 | 81,34 | 83,25 |
| 31,25 | 71,75 | 69,50 | 76,60 | 71,14 | 65,25 |
| 15,62 | 37,75 | 26,00 | 40,64 | 33,08 | 26,25 |
| 7,81 | 13,25 | 2,00 | 14,28 | 9,70 | 5,75 |
| 3,09 | 6,25 | 0,00 | 7,38 | 0,24 | 1,00 |

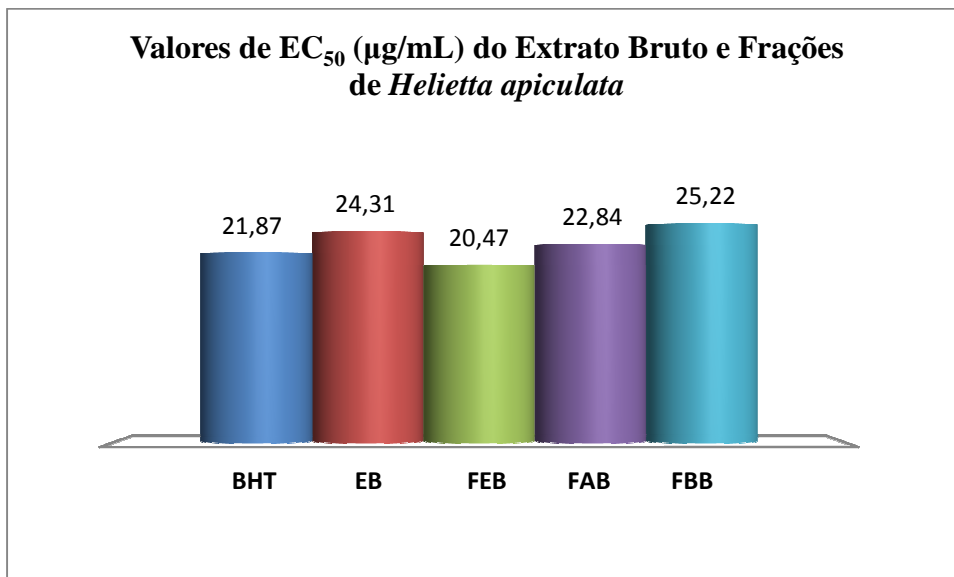
^a em µg/mL

Estes valores podem ser também visualizados através do Gráfico 1.

Gráfico 1: Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para o EB e frações da espécie *Helietta apiculata*

Através destes valores pode-se concluir que a espécie em questão tem relativo potencial antioxidante, permitindo assim o cálculo da EC₅₀, que é a concentração necessária para inibir 50% da atividade do radical DPPH, sendo esta demonstrada no Gráfico 2.

Gráfico 2: Valores de EC_{50} verificada para o extrato bruto e frações da espécie *Helietta apiculata*



Analisando os dados de EC_{50} apresentados no Gráfico 2, percebe-se que a FAB apresentou EC_{50} de 22,84 $\mu\text{g/mL}$, bem próximo ao valor do padrão BHT (21,87 $\mu\text{g/mL}$). Dá-se destaque para a FEB que apresentou EC_{50} de 20,47 $\mu\text{g/mL}$, sendo mais ativa que o próprio padrão, evidenciando a boa capacidade de inibir o radical DPPH e atuarem como antioxidante.

Para as substâncias puras, devido a pouca quantidade isolada das mesmas, não se pode fazer uso deste método, sendo aplicado então o método do DPPH qualitativo através de um screening, conforme visualizado na Tabela 21.

Tabela 21: Potencial antioxidante das substâncias isoladas em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$)

| | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,6 | 7,8 |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|------|-------|------|-----|
| Limonina | + | + | + | + | - | - | - |
| γ-fagarina | + | + | + | + | + | + | + |
| Chalepina | + | + | + | + | + | - | - |
| Kokusaginina | + | + | + | - | - | - | - |
| Maculina | + | + | + | + | + | + | + |
| Derivados do ác. cinâmico | + | + | + | + | + | + | - |
| T26 | + | + | + | + | + | + | + |
| Isodictamina | + | + | + | + | + | + | + |

+: zona de inibição observada; -: zona de inibição não observada

A zona de inibição observada, demonstrada pelo sinal positivo, é observada através do aparecimento de halos esbranquiçados na placa CCD após o borrifamento do DPPH. As substâncias que demonstraram maior potencial antioxidante foram os alcalóides, γ -fagarina, maculina, isodictamina e T26, sendo ativas até a última concentração testada (7,8 $\mu\text{g/mL}$), seguido dos derivados do ácido cinâmico, chalepina, limonina e kokusaginina.

5.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.6.1 Atividade antimicrobiana

Um dos objetivos deste trabalho foi o estudo da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da espécie *Helietta apiculata* Benth, assim como o estudo do respectivo extrato bruto e das frações que deram origem a estes metabólitos. Para a realização deste ensaio fez-se uso do método de microdiluição em caldo, conforme descrito na parte experimental, páginas 56 a 58, utilizando-se bactérias e fungos que fazem parte do grupo das infecções oportunistas, freqüentemente encontrados em pacientes imunocomprometidos.

Na Tabela 22, são apresentados os valores de concentração inibitória mínima do extrato bruto e das frações de *H. apiculata*.

Tabela 22: Concentração Inibitória Mínima do extrato e frações de *Helietta apiculata*

| Substâncias | CIM (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Bactérias Gram-positivas ^a | | | | | Bactérias Gram-negativas ^a | | | Fungos ^a | | | |
| | <i>Sa</i> | <i>Se</i> | <i>Ss</i> | <i>Bs</i> | <i>Sp</i> | <i>Ec</i> | <i>Pa</i> | <i>Sgs</i> | <i>Ca</i> | <i>Ct</i> | <i>Cn</i> | <i>Sc</i> |
| EBM | 250 | 500 | 500 | 250 | 250 | 250 | 500 | 250 | 250 | 500 | 500 | 500 |
| FEA | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | >500 | 250 | 500 | 500 | 250 | 500 |
| FEB | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 500 | 250 | 250 | 250 | 500 | 500 |
| FAB | 250 | 250 | 500 | 250 | 250 | 250 | 500 | 250 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| FBB | 250 | 250 | 500 | 250 | 250 | 250 | 500 | 250 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Padrão^b | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12, | 3,12 | 3,12 | 6,25 | 6,25 | 5,15 | 10,3 |

^a ATCC (American Type Culture Collection): *Sa-Staphylococcus aureus*; *Se-Staphylococcus epidermidis*; *Ss-Staphylococcus saprophyticus*; *Bs-Bacillus subtilis*; *Sp-Streptococcus pyogenes*; *Ec-Escherichia coli*; *Pa-Pseudomonas aeruginosa*; *Ss-Shigella sonnei*; *Ca-Candida albicans*; *Ct-Candida tropicalis*; *Cn-Cryptococcus neoformans*; *Sc-Sacharomyces cerevisiae*

^b Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos

Todas as amostras testadas demonstraram algum potencial antimicrobiano. Com valores de CIM de 250 µg/mL, FEA e FEB foram as mais ativas, inibindo o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas testadas. A inibição dos fungos foi detectada apenas para o EBM e as frações FEA e FEB. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Siguella sonnei* foram os microrganismos inibidos, tanto pelo EBM, como por todas as frações testadas com CIM 250 µg/mL.

Sacharomyces cerivisae e *Pseudomonas aeruginosa* foram os microrganismos mais resistentes frente ao extrato bruto e frações de *H. apiculata*.

Somente o EBM, FEA, FAB e FBB demonstraram concentração fungicida mínima, com uma CFM de 500 µg/mL frente a *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Para os demais microrganismos a CBM e a CFM foram maior que 500 µg/mL, não sendo observado potencial bactericida, nem fungicida por parte das frações e extrato bruto.

A partir dessa análise pode-se concluir que o extrato bruto e as frações da espécie em estudo apresentam atividade antimicrobiana, principalmente frente a bactérias. Após essa constatação fez-se o ensaio com os metabólitos isolados da planta *H. apiculata*, sendo os resultados apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Concentração Inibitória Mínima das substâncias isoladas de *Helietta apiculata*

| Substâncias | CIM (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------|------------|-----------|---------------------|-----------|-----------|
| | Bactérias Gram-positivas ^a | | | | | Bactérias Gram-negativas ^a | | | | Fungos ^a | | |
| | <i>Sa</i> | <i>Se</i> | <i>Ss</i> | <i>Bs</i> | <i>Sp</i> | <i>Ec</i> | <i>Pa</i> | <i>Sgs</i> | <i>Ca</i> | <i>Ct</i> | <i>Cn</i> | <i>Sc</i> |
| Limonina | 100 | 100 | >200 | 100 | 100 | 100 | 200 | 100 | 200 | 100 | 200 | 100 |
| γ-fagarina | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 200 | 100 | 100 | 100 | 200 | 200 |
| Maculina | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 |
| Kokusaginina | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 |
| Chalepina | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 |
| Der. ác. cinâmico | 200 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 200 | 100 | 100 | 200 | 200 |
| T26 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 200 |
| Isodictamina | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 200 |
| Padrão^b | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 6,25 | 6,25 | 5,15 | 10,3 |

^a ATCC (American Type Culture Collection): *Sa-Staphylococcus aureus*; *Se-Staphylococcus epidermidis*; *Ss-Staphylococcus saprophyticus*; *Bs-Bacillus subtilis*; *Sp-Streptococcus pyogenes*; *Ec-Escherichia coli*; *Pa-Pseudomonas aeruginosa*; *Ss-Shigella sonnei*; *Ca-Candida albicans*; *Ct-Candida tropicalis*; *Cn-Cryptococcus neoformans*; *Sc-Sacharomyces cerevisiae*

^b Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungo,

De acordo com dados apresentados na Tabela 23, os metabólitos T26 e Isodictamina foram os mais ativos como antimicrobianos, seguido da γ-fagarina, limonina e da mistura de 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila. Todos estes apresentaram CIM de 100 µg/mL. *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* foram os microrganismos mais sensíveis quanto ao poder antimicrobiano das substâncias testadas. Maculina, kokusaginina e chalepina não causaram inibição no crescimento de nenhum dos microrganismos testados.

A atividade antimicrobiana relatada para γ-fagarina corrobora com estudo realizado por O'Donnel (2010),³⁸ onde essa substância mostrou atividade antimicrobiana contra metilicina resistente a *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. aureus* e *Micrococcus luteus*. Em estudo realizado por Biavati (2002)²² têm-se relatos das substâncias kokusaginina e maculina demonstrando atividade antimicrobiana contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer, sendo que para os fungos testados durante este trabalho (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Sacharomyces cerevisiae*) estas substâncias não demonstraram tal atividade.

As substâncias que inibiram o crescimento microbiano foram testadas quanto à letalidade desses microrganismos, conforme dados da Tabela 24. Pode-se perceber que somente frente aos fungos houve uma atividade bactericida causada pelas substâncias γ-

fagarina, os derivados do ácido cinâmico, isodictamina, limonina e T26, com uma CFM de 200 µg/mL.

Tabela 24: Concentração Bactericida e Fungicida Mínima das substâncias isoladas de *H. apiculata*

| Substâncias | CBM/CFM(µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Bactérias Gram-positivas ^a | | | | | Bactérias Gram-negativas ^a | | | Fungos ^a | | | |
| | <i>Sa</i> | <i>Se</i> | <i>Ss</i> | <i>Bs</i> | <i>Sp</i> | <i>Ec</i> | <i>Pa</i> | <i>Sgs</i> | <i>Ca</i> | <i>Ct</i> | <i>Cn</i> | <i>Sc</i> |
| Limonina | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 200 | 200 | 200 |
| γ-fagarina | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Maculina | >200 | >200 | - | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | - | - | - | - |
| Kokusaginina | >200 | >200 | - | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | - | - | - | - |
| Chalepina | >200 | >200 | - | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | - | - | - | - |
| Der. ác. cinâmico | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| T26 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 200 | 200 | >200 | >200 |
| Isodictamina | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 200 | 200 | 200 | >200 |
| Padrão^b | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 6,25 | 6,25 | 5,15 | 10,3 |

^a ATCC (American Type Culture Collection): *Sa-Staphylococcus aureus*; *Se-Staphylococcus epidermidis*; *Ss-Staphylococcus saprophyticus*; *Bs-Bacillus subtilis*; *Sp-Streptococcus pyogenes*; *Ec-Escherichia coli*; *Pa-Pseudomonas aeruginosa*; *Ss-Shiguella sonnei*; *Ca-Candida albicans*; *Ct-Candida tropicalis*; *Cn-Cryptococcus neoformans*; *Sc-Sacharomyces cerevisiae*

^b Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos

Os óleos do verão e do outono foram testados quanto à atividade antimicrobiana, demonstrando serem ativos frente todas as bactérias testadas. Com concentrações de 1,25 mg/mL os dois óleos inibiram o crescimento de *Staphylococcus saprophyticus*. Para as demais bactérias houve inibição de crescimento com concentrações que variaram de 2,5 a 10 mg/mL. Para os fungos, os óleos demonstraram pouca atividade, sendo que para *Candida tropicalis* não houve inibição de crescimento, conforme demonstra a Tabela 25. Percebe-se também que o óleo extraído durante o verão apresentou uma melhor atividade comparado ao extraído no outono. Os óleos extraídos no inverno e na primavera não foram testados devido a pouca quantidade existente dos mesmos.

Tabela 25: Concentração Inibitória Mínima dos óleos extraídos durante o verão e outono de *Helietta apiculata*

| Substâncias | CIM (mg/mL) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Bactérias Gram-positivas ^a | | | | | Bactérias Gram-negativas ^a | | | Fungos ^a | | | |
| | <i>Sa</i> | <i>Se</i> | <i>Ss</i> | <i>Bs</i> | <i>Sp</i> | <i>Ec</i> | <i>Pa</i> | <i>Sgs</i> | <i>Ca</i> | <i>Ct</i> | <i>Cn</i> | <i>Sc</i> |
| Óleo Verão | 2,5 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 10 | 2,5 | 20 | >20 | 20 | 20 |
| Óleo Outono | 5 | 5 | 1,25 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 | 20 | >20 | 20 | 20 |
| Padrão^b | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 6,25 | 6,25 | 5,15 | 10,3 |

^a ATCC (American Type Culture Collection): *Sa-Staphylococcus aureus*; *Se-Staphylococcus epidermidis*; *Ss-Staphylococcus saprophyticus*; *Bs-Bacillus subtilis*; *Sp-Streptococcus pyogenes*; *Ec-Escherichia coli*; *Pa-Pseudomonas aeruginosa*; *Ss-Shigella sonnei*; *Ca-Candida albicans*; *Ct-Candida tropicalis*; *Cn-Cryptococcus neoformans*; *Sc-Sacharomyces cerevisiae*

^b Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos

Os óleos apresentaram CBM apenas para *Staphylococcus aureus*, com CBM de 2,5 mg/mL do OVE, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*. Frente aos fungos testados nenhum óleo apresentou concentração fungicida mínima. A CBM também não foi observada contra *Staphylococcus saprophyticus* e *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com dados da Tabela 26.

Tabela 26: Concentração Bactericida e Fungicida Mínima dos óleos extraídos de *H. apiculata*

| Substâncias | CLM (mg/mL) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Bactérias Gram-positivas ^a | | | | | Bactérias Gram-negativas ^a | | | Fungos ^a | | | |
| | <i>Sa</i> | <i>Se</i> | <i>Ss</i> | <i>Bs</i> | <i>Sp</i> | <i>Ec</i> | <i>Pa</i> | <i>Sgs</i> | <i>Ca</i> | <i>Ct</i> | <i>Cn</i> | <i>Sc</i> |
| Óleo Verão | 2,5 | 10 | >20 | 5 | 5 | 10 | >20 | 5 | >20 | >20 | >20 | >20 |
| Óleo Outono | 20 | 10 | >20 | 10 | 20 | 10 | >20 | 20 | >20 | >20 | >20 | >20 |
| Padrão^b | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 3,12 | 6,25 | 6,25 | 5,15 | 10,3 |

^a ATCC (American Type Culture Collection): *Sa-Staphylococcus aureus*; *Se-Staphylococcus epidermidis*; *Ss-Staphylococcus saprophyticus*; *Bs-Bacillus subtilis*; *Sp-Streptococcus pyogenes*; *Ec-Escherichia coli*; *Pa-Pseudomonas aeruginosa*; *Ss-Shigella sonnei*; *Ca-Candida albicans*; *Ct-Candida tropicalis*; *Cn-Cryptococcus neoformans*; *Sc-Sacharomyces cerevisiae*

^b Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos

5.6.2 Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

Neste trabalho foi realizado o ensaio biológico com extrato bruto, frações e substâncias isoladas de *H. apiculata*, com o intuito de avaliar o potencial de inibição da

AChE. Para tal, o extrato bruto e as frações foram aplicados em CCD na quantidade de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo a CCD eluída com solvente adequado de acordo com a polaridade da amostra. Para as substâncias puras partiu-se de uma solução 5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo feitas sucessivas diluições em série, obtendo-se concentrações de 5,0 a $3,2 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para cada amostra. Estas soluções foram aplicadas em CCD e eluídas com solvente adequado. Após o borrifamento das CDDs com os reveladores, conforme já descrito em experimental (páginas 58 e 59), a observação de halos esbranquiçados demonstra atividade de inibição da enzima AChE por parte das substâncias testadas. Esse resultado positivo foi percebido frente ao extrato bruto, e frações etérea ácida e básica, e acetato básica.

Analisando os resultados do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase frente ao EB e frações da espécie em estudo, percebe-se que a mesma apresenta grande potencial como inibidora de tal enzima. A partir disto, foram testadas as substâncias isoladas em diferentes concentrações para identificação do pMIQ dessas substâncias demonstrando o poder de inibição da AChE, de acordo com dados apresentados na Tabela 27.

Tabela 27: Atividade de Inibição da Enzima AChE frente as substâncias isoladas de *Helietta apiculata* ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

| | 5 | 1 | 0,2 | 0,04 | $8 \cdot 10^{-3}$ | $1,6 \cdot 10^{-3}$ | $3,2 \cdot 10^{-4}$ |
|--------------------------------------|---|---|-----|------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Limonina | + | + | + | - | - | - | - |
| γ-fagarina | - | - | - | - | - | - | - |
| Chalepina | + | + | - | - | - | - | - |
| Kokusaginina | - | - | - | - | - | - | - |
| Maculina | - | - | - | - | - | - | - |
| Derivados do ác. cinâmico | + | + | + | + | - | - | - |
| T26 | + | + | - | - | - | - | - |
| Isodictamina | + | + | + | - | - | - | - |

+: zona de inibição observada; -: zona de inibição não observada

Após a realização do teste de Inibição da enzima AChE com o EBM e as frações da casca do caule de *H. apiculata*, fez-se o mesmo teste com as substâncias isoladas. A partir dos dados expressos na Tabela 27, percebe-se que as substâncias que demonstraram maior poder de inibição da enzima foram os derivados do ácido cinâmico até uma concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, seguido do alcalóide isodictamina e da limonina, ambos com inibição até a

concentração de 0,2 µg/µL. Chalepina e T26 mostraram o menor potencial de inibição da AChE, resultando em inibição apenas nas concentrações de 5 e 1 µg/µL, ao passo que os alcalóides γ -fagarina, kokusaginina e maculina não demonstraram nenhum potencial de inibição frente as concentrações testadas.

As atividades de inibição da enzima AChE foram expressas através do pMIQ, representado pelo logaritmo negativo da mínima quantidade inibitório, em mol, que produziu o halo esbranquiçado na CCD. Apenas pode-se calcular o pMIQ de limonina, chalepina e isodictamina, conforme Tabela 28, visto que T26 e os derivados do ácido cinâmico se apresentavam como mistura.

Tabela 28: Valores de pMIQ para as substâncias isoladas de *Helietta apiculata*

| Substância | pMIQ |
|-------------------|-------------|
| Limonina | 9,37 |
| Chalepina | 8,47 |
| Isodictamina | 8,99 |

A partir do resultado expresso pelo pMIQ percebe-se que nenhuma das substâncias se mostraram potenciais inibidoras da AChE, visto que nenhum desses resultados foi superior ao limite de 10,5, valor necessário para a substância ser considerada inibidora da enzima AChE.

6. CONCLUSÃO

Após a análise fitoquímica da espécie *Helietta apiculata* Benth, pertencente à família Rutaceae, pode-se concluir que:

- esta espécie produz diferentes classes de metabólitos, característica comum na família Rutaceae, como alcalóides, limonóides e cumarinas entre outros. Durante este estudo foram isolados, como constituintes fixos, quatro alcalóides furoquinolínicos (γ -fagarina, Maculina, Kokusaginina e Isodictamina), um limonóide (Limonina), uma cumarina identificada como Chalepina, dois derivados do ácido cinâmico em mistura (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila), além de uma mistura de neolignanais. Como constituintes voláteis foram identificados terpenos do óleo essencial extraído da espécie;

- através da comparação sazonal realizada a partir da extração, por hidrodestilação, do óleo essencial da espécie *H. apiculata* pode-se perceber algumas diferenças na sua composição química, sendo que os principais constituintes identificados foram o elemeno, o γ -elemol, o elemol e o espatulenol nas quatro estações (inverno, primavera, outono e verão), ao passo que o limoneno não se manifestou durante a primavera;

- através do método do DPPH foi avaliada a atividade antioxidante do extrato bruto, das frações e das substâncias isoladas. Através da análises dos valores de EC₅₀ do extrato bruto e frações, dá-se destaque para a fração etérea básica que se mostrou mais ativa que o próprio padrão BHT. Devido a pouca quantidade isolada das substâncias puras, as mesmas foram testadas através de um screening, onde γ -fagarina, maculina, isodictamina e T26 se mostraram mais ativas como antioxidantes;

- a ação antimicrobiana dos compostos isolados, do extrato bruto e das frações foram testadas pelo método de microdiluição em caldo. As frações etérea ácida e etérea básica foram as que se mostraram mais ativas como antimicrobianas. Das substâncias isoladas, isodictamina e T26 foram os metabólitos com maior atividade antimicrobiana, seguido de γ -fagarina, limonina e da mistura de 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila e 3,4,5-trimetoxicinamato de metila;

- através de screening realizado para inibição da enzima AChE com EB e frações apenas a FBB não se apresentou com potencial de inibição. Quando foram testadas as substâncias puras obteve-se valores de pMIQ menores que o valor limite de 10,5,

demonstrando, assim, que nenhuma das substâncias isoladas apresenta potencial inibidor da enzima Acetilcolinesterase;

- devido a pouca quantidade isolada do metabólito T26, e sabendo se tratar de substâncias ainda não descritas na literatura, o mesmo necessita ser novamente isolado em maiores quantidades para purificação e identificação de cada um dos componentes presentes na mistura. Isto demonstra a diversidade de metabólitos secundários ainda não conhecidos da espécie *H. apiculata*;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento, 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.
2. DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, 7, Campinas, SP, 2006.
3. CORREIA, C. R. D. Síntese Estereosseletiva de Alcalóides e N-Heterociclos. Série de Textos da Escola de Verão em Química, vol II. EdUFSCar, São Carlos, 2001.
4. PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas, **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.
5. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm. Acesso em 15 maio 2011.
6. Convenção da Diversidade Biológica - CDB. Disponível em: <http://www.cdb.gov.br/CDB>. Acesso em: 04 maio 2011.
7. BARREIRO, E. J.; Bolzani, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 679-688, 2009.
8. PEREZ, L. E. P. Metabolismo secundário. São Paulo, 2004. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>. Acesso em: 10 maio 2011.
9. ZANON, G. Análise Fitoquímica e estudo das atividades antimicrobiana, de inibição da enzima acetilcolinesterase e atividade antioxidante das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*. 2010, 151p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.
10. GROppo, M. et al. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, 95, 8, 985-1005, 2008.

11. DIEGUES, R. et al. Potencialidad del Género *Zanthoxylum* como Fuente de Agentes con Actividad Biológica, **Acta Farm. Bonaerense**, 23, 2, 243-251, 2004.
12. MELO, M. F. F.; ZICKEL, C. S. Os gêneros *Zanthoxylum* e *Esenbeckia* (Rutaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, 18, 1, 73-90, 2004.
13. LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Ed. Plantarum, 1992.
14. BROWN, N. M. D. et al. Quinoline alkaloids—XXI: The ^{13}C NMR spectra of hemiterpenoid quinoline alkaloids and related prenylquinolines. **Tetrahedron**, 36, 24, 3579-3584, 1980.
15. GRUNDON, M. F.; MCCORKINDALE, N. J. The synthesis of dictamnine and γ -fagarine. **J. Chem. Soc.**, 2177-2185, 1957.
16. COLLINS, J. F. et al. Quinoline Alkaloids. Part XIII. A convenient synthesis of Furoquinoline Alkaloids of the Dictamine Type. **J. C. S. Perkin I**, 94-97, 1973.
17. CHANG, P. T. O.; AYNILIAN, G. H. et al. Isolation of flindersiamine, isoflindersiamine, and a new alkaloid, heliparvifoline, from *Helietta parvifolia* (Rutaceae). **J. Pharm. Sciences**, v. 65, 4, 561-563, 1976.
18. BHATTACHARYYAL, J.; SERUR, L. M. and CHERIVAN, U. O. Isolation of the Alkaloids of *Monnieria trifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 2, 379-381, 1984.
19. ULUBELEN, A. A new alkaloid, montanine, from *Ruta montana*. **J. Nat. Prod.**, v. 53, n. 1, 207-208, 1990.
20. HANAWA, F.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A-L. Photo-Activated DNA Binding and Antimicrobial Activities of Furoquinoline and Pyranoquinolone Alkaloids from Rutaceae. **Planta Medica**, 70, 6, 531-535, 2004.
21. LUIS, E. et al. Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*, **Rev. Col. Quim.**, v. 27, n. 1, 23-29, 1988.
22. BIAVATI, M. W. et al. Biological Activity of Quinoline Alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray Structure of Flindersiamine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 1, 66-77, 2002.

23. CHLOUCHI, A. et al. Coumarins and furoquinoline alkaloids from *Philotheca deserti* var. *deserti* (Rutaceae). **Biochemical systematics and ecology**, 34, 71-74, 2006.
24. CUI, B. et al. Quinoline alkaloids from *Acronychia laurifolia*. **Phytochemistry**, 52, 95-98, 1999.
25. MOURA, N. F. et al. Quinoline Alkaloids, Coumarins and Volatile Constituents of *Helietta longifoliata*. **Planta Med.**, 68, 7, 631-634, 2002.
26. CHATURVEDULA, V. S. P. et al. New Cytotoxic Alkaloids from the Wood of *Vepris punctata* from the Madagascar Rainforest. **J. Nat. Prod.**, 66, 532-534, 2003.
27. SIMOTE, S. Y. Estudo Fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e Busca de um Processo de Microencapsulação de Compostos Ativos, Visando o Controle de Formigas Cortadeiras. 2006, 200p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, SP, 2006.
28. WANSI, J. D. et al. Oxidative Burst Inhibitory and Cytotoxic Indoloquinazoline and Furoquinoline Alkaloids from *Oricia suaveolens*. **J. Nat. Prod.**, 71, 1942-1945, 2008.
29. FERREIRA, M. E. et al. Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. **Phytomedicine**, 17, 375-378, 2010.
30. SETHNA, S. M. and SHAH, N. M. The Chemistry of Coumarins. 1944.
31. POZZI, H.; SÁNCHEZ, E and COMIN, J. Studies on Argentine plants-XXII: Helietin, a new furocoumarin from *Helietta longifoliata* Britt. **Tetrahedron**, v. 23, 1129-1137, 1967.
32. MARQUES, A. S. F. Estudo Fitoquímico de três espécies de Rutaceae e Avaliação Biológica de Produtos Naturais em Modelos Celulares e Bioquímicos de Tripanossomatídeos. 2006, 266p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.
33. FERRONATTO, R. Análise Química e antimicrobiana do óleo essencial de *Helietta apiculata* Benth (Rutaceae), 2010, 71p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Comunitária Regional de Chapecó, SC, 2010.

34. OLIVA, A. et al. Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. Leaves, Including a New Quinolone Alkaloid. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 890-896, 2003.
35. ARANGO, V. et al. Coumarins from *Galipea panamensis* and Their Activity against *Leishmania panamensis*. **J. Nat. Prod.**, 73, 1012-1014, 2010.
36. TEREZAN, A. P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hill (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotics fungus. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 5, 882-886, 2010.
37. GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 4, 518-520, 1994.
38. O'DONNELL, F. et al. A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolines. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 35, 30-38, 2010.
39. SAYED, K. E. et al. New Quinoline Alkaloids from *Ruta chalepensis*. **J. Nat. Prod.**, 63, 995-997, 2000.
40. KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Teclea afzelii* (Rutaceae). **South African Journal of Botany**, 74, 572-576, 2008.
41. WANSI, J. D. et al. Antiplasmodial Activities of Furoquinoline Alkaloids from *Teclea afzelii*. **Phytotherapy Research**, 24, 775-777, 2010.
42. CHEPLOGOI, P. K. et al. An azole, an amide and a limonoid from *Vepris uguenensis* (Rutaceae). **Phytochemistry**, 69, 1384-1388, 2008.
43. ADEBAJO, A. C. et al. Pharmacological properties of the extract and some isolated compounds of *Clausena lansium* stem bark: Anti-trichomonal, antidiabetic, anti-inflammatory, hepatoprotective and antioxidant effects. **Journal of ethnopharmacology**, 122, 10-19, 2009.
44. OLIVEIRA, A. B. et al. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 81, 4, 715-740, 2009.

45. YOUKWAN, J.; SUTTHIVAIYAKIT, S. and SUTTVAIYAKIT, P. Citrusosides A-D and Furanocoumarins with Cholinesterase Inhibitory Activity from the Fruit Peels of *Citrus hystrix*. **J. Nat. Prod.**, 73, 1879-1883, 2010.
46. CARDOSO-LOPES, E. M. et.al. Alkaloids from Stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as Potential Treatment for Alzheimer Disease. **Molecules**, 15, 9205-9213, 2010.
47. VIEIRA, P. C. et al. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, 617-622, 2001.
48. PAVÃO, F. et al. Structure of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, 520, 13-17, 2002.
49. LEITÃO, A. et al. Structure–activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14, 2199-2204, 2004.
50. CORTEZ, L. L. R. et al. Alkaloids and Triterpene from *Almeidea coerulea* (Nees and Mart.) a. St.-Hil. and Anti-leishmanial Activity. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 54, n. 1, 61-66, 2011.
51. MCCORMICK, J. L. et al. HIV Inhibitory Natural Products. 26. Quinoline Alkaloids from *Euodia roxburghiana*. **Journal Natural Products**, 59, 469-471, 1996
52. GOLOUBKOVA, T. D. et al. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **Journal of Ethnopharmacology**, 60, 141–148, 1998
53. FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, 29-38, Londrina, jan./mar. 2007.
54. MARROQUIM-SEGURA, R. et al. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, 639–641, 2009.
55. MORAIS, S. M. de, BRAZ-FILHO, R. Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos. Editora da Universidade Estadual do Ceará (EdUECE), Ceará, Fortaleza, 2007.

56. VICENTINO, A. R. R.; MENESES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17, 3, 384-387, 2007.
57. VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, 369-380, 2007.
58. OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, 2, 301-307, 2008.
59. ARAUJO, J. C. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v 33, 1, 55-64, 2004.
60. PONZI, E. A. C. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.**, v. 10, 1, 89-94, 2010.
61. CASTILHO, E. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de surfactantes sobre *Candida albicans*. VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade Federal do Paraíba, 2000.
62. MIAO, Y.; HE, N. and ZHU, J-J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. **Chemical Reviews**, 2009.
63. SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr. - Genética**, v. 21, 3-7, 1999.
64. WILLIAMS, P. ; SORRIBAS, A. ; HOWES. M-J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Nat. Prod. Rep.**, 28, 48-77, 2011.
65. SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, 1, 2008.
66. BARBOSA-FILHO, G. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, 258-285, 2006.

67. NGADJUI, B. T. et al. Limonoids from *Clausena anisata*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 4, 832-836, 1989.
68. JOSHI, B. S. and GAWAD, D. H. Isolation of some furanocoumarins from *Clausena indica* and identity of chalepentin with xylostenin. **Phytochemistry**, v. 10, n. 2, 480-481, 1971.
69. ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, 456p., 2001.
70. 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.
71. Food and Drugs Administration: Code of Federal Regulations, Cap. 21, 300, 1991.
72. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5th Ed, NCCLS document M7-A5, 2000.
73. MARTSON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, 51-54, 2002.
74. DI GIOVANNI, S. et al. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, 109-119, 2008.
75. MOURA, N. F. Estudo Fitoquímico de Plantas pertencentes à Família Rutaceae: Gêneros *Zanthoxylum* e *Helietta*, 2001, 215 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2001
76. GASPAR, A. et al. Dietary Phenolic Acids and Derivatives. Evaluation of the Antioxidant Activity of Sinapic Acid and Its Alkyl Esters. **J. Agric. Food Chem.** 58, 11273–11280, 2010.
77. PIRRUNG, M. C. and BLUME, F. Rhodium-Mediated Dipolar Cycloaddition of Diazoquinolinediones. **J. Org. Chem.**, 64, 3642-3649, 1999.

78. KUMAR, V. et al. 2,7-Dihydroxy-3-formyl-1-(3'-metyl-2'-butenyl)carbazole from *Clausena lansium*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, 1563-1565, 1995.