

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

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO BIOLÓGICO DA
ESPÉCIE *Pilocarpus pennatifolius* LEMMAIRE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gabriele do Carmo

**Santa Maria, RS-Brasil
2014**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO BIOLÓGICO DA
ESPÉCIE *Pilocarpus pennatifolius* LEMMAIRE.**

Gabriele do Carmo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS – Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carmo, Gabriele do
Análise Fitoquímica e Estudo Biológico da espécie
Pilocarpus pennatifolius Lemmaire / Gabriele do Carmo.-
2014.
125 p. ; 30cm

Orientador: Ademir Farias Morel
Coorientador: Ionara Irion Dalcol
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2014

1. isolamento 2. metabólitos 3. *Pilocarpus*
pennatifolius 4. atividades farmacológicas 5. óleo
essencial I. Farias Morel, Ademir II. Irion Dalcol,
Ionara III. Título.

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

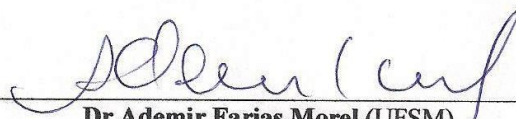
A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada, Aprova a Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO BIOLÓGICO DA ESPÉCIE
PILOCARPUS PENNATIFOLIUS LEMMAIRE**

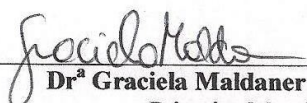
elaborada por
Gabriele do Carmo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

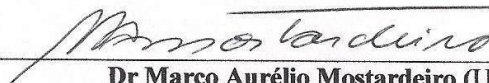
Comissão Examinadora



Dr Ademir Farias Morel (UFSM)
Presidente/Orientador



Dr^a Graciela Maldaner (URCAMP)
Primeiro Membro



Dr Marco Aurélio Mostardeiro (UFSM)
Segundo Membro

Santa Maria, 28 de março, 2014.

Ao meu Pai e minha Mãe,
pelos ensinamentos,
confiança em mim depositada,
e princípios que hoje levo comigo.

Ao meu amor Anderson

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida, por me permitir chegar até aqui, pela força e determinação, pelo que sou e pela confiança de um dia poder me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu amor **Anderson** pelo carinho, pelo nosso amor construído, por ser tão especial, pelos momentos de alegria, por fazer parte da minha vida e estar presente durante essa etapa importante. Te Amo!

A minha irmã **Danusa** pelo apoio, incentivo e ser minha fonte de inspiração.

Em especial, as amigas **Jussi** e **Dayane** pela nossa amizade verdadeira, tragos, festinhas, momentos de descontração (risadas) que não foram poucos, pela confiança, carinho, companherismo. Eu só sei que amo vocês e levarei para a vida toda no meu coração.

As minhas grandes amigas e colegas de faculdade **Fran**, **Edy** e **Rose**, lembrarei pra sempre dos momentos de estudos, festas, risadas, dos mates, dos almoços de domingo com a Rose e apoio nas horas que sempre foi preciso. Adoro vocês!

Aos Colegas de apê durante o mestrado **Charline** e **Fresh**. Pessoas incríveis, obrigado pelos momentos compartilhados e principalmente pela amizade.

Aos colegas de laboratório em especial **Mateus**, **Eveline**, **Lú** pela ajuda e colaboração com o meu trabalho, **Tanize** por todos os ensinamentos e paciência. Obrigado pela amizade, conversas trocadas, pelos sinceros sentimentos.

Aos demais colegas do NPPN: **Lizi**, **Denise**, **Carol**, **Janice**, **Pati**, **Sabrina**, **Adriano**, **Adri**, **Alessandra** e **Julia**, o qual dividi o mate de todas as manhãs, obrigado pela ajuda, respeito e contribuição de vocês.

Ao Professor **Dr. Ademir F. Morel** pela orientação e ensinamentos durante o mestrado.

A Professora **Dr^a Ionara Irion Dalcol** pela co-orientação

Ao funcionário **Ubiratan** (Bira) pela realização das análises de cromatografia gasosa, cromatografia líquida e espectrometria de massas

Aos colegas **Vini** e **Marcelo** e ao professor **Marco Aurélio** pelas análises de RMN

Ao colega **Guilherme Martins** pelas análises de espectrometria de massa

A colega **Carol Bender** pela análise de DSC

Ao Professor **Robert Burrow** pelas análises de difração de raios-X

Aos colegas **Alexandre** e **Eveline** pela realização das atividades antimicrobianas

A **Clarisse Mostardeiro** pelos ensinamentos das atividades antioxidante e disponibilidade em me ajudar, muito obrigado.

A colega **Josiane Moraes dos Santos** pela ensinamentos de RMN

Ao programa de pós-graduação em Química pela oportunidade

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro

Aos funcionários **Ademir** e **Valéria** que colaboraram para a realização desse trabalho

Aos demais que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho

“Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fê na vida”
(Maria, Maria - Milton Nascimento)

RESUMO

Análise Fitoquímica e estudo Biológico da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

Autor: Gabriele do Carmo

Orientador: Ademir Farias Morel

A proposta deste trabalho foi realizar um estudo fitoquímico do extrato bruto das folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius*, derivada do gênero pilocarpus, conhecida popularmente como jaborandi ou cutia-branca. Essa espécie encontra-se amplamente distribuída no continente americano, no estado do Rio Grande do Sul em formações vegetais naturais na região central e tem uso na medicina popular no tratamento de glaucoma e enfermidades digestivas. Nesse trabalho foram isolados compostos dos quais foram estudados o perfil cromatográfico, por cromatografia em coluna e CCD, e a identificação por análise de difração de raios-X, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, índice de rotação óptica e ponto de fusão. Os compostos begapteno **24** e xantotoxina **25** pertencente a classe das furanocumarinas, foram isolados da fração etérea ácida com diferentes gradientes de solvente (CHCl_3 -MeOH 1% para o bergapteno e CHCl_3 -MeOH 5% para a xantotoxina). O alcaloide imidazólico G01 **20** foi isolado pela primeira vez na espécie *Pilocarpus pennatifolius*, obtida da fração Acetato Básica com gradiente de solvente CHCl_3 -MeOH 15%. Através da hidrodestilação, fez-se também, a extração dos óleos essenciais da espécie *P. pennatifolius* nas diferentes estações do ano, com o intuito de comparar a constituição química do mesmo quanto a sazonalidade. Os principais constituintes encontrados foram α -humuleno e E-cariofileno. Ao passo que o limoneno se manifesta apenas no inverno e verão em baixas concentrações. As atividades antimicrobiana dos metabólitos, frações, extrato e óleos essenciais apresentaram bons potenciais antimicrobiano frente a alguns microorganismos. O metabólito xantotoxina quando testada frente a sua capacidade antioxidante apresentou um bom potencial antioxidante.

Palavras-chave: *pilocarpus pennatifolius* - isolamento – metabólitos- óleo essencial

ABSTRACT

Phytochemical Analysis and Biological study of species *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

Author: Gabriele do Carmo

Advisor: Ademir Farias Morel

The purpose of this study was to conduct a phytochemical study of the crude extract of the leaves of the species *Pilocarpus pennatifolius* derived the genus *Pilocarpus*, popularly known as jaborandi or agouti-white. This species is widely distributed in the Americas, in the state of Rio Grande do Sul in natural plant formations in the central region and has use in folk medicine in the treatment of glaucoma and digestive diseases. In this work were isolated molecules of which the chromatographic profile were studied by column chromatography and TLC, the identification and confirmation of the compounds, by analysis of diffraction X-rays, NMR ^1H and ^{13}C one and two dimensional, rotation optical of index and fusion points. The bergapten **24** and xanthotoxin **25** compounds belonging to the class of furanocoumarins were isolated in the acid ether fraction with different solvent gradient (CHCl_3 -MeOH 1% for bergapten e CHCl_3 -MeOH 5% for xanthotoxin). The imidazole alkaloid G01-20 was first isolated in *pennatifolius Pilocarpus* species, derived from the basic fraction acetate gradient solvent of CHCl_3 -MeOH 15%. Throught the hydrodestilation was the extraction of essential oils of the species *P.pennatifolius* in the different seasons, with the intention of compare the chemically the same as seasonality. The main constituents were found α -humolene and E-caryophyllene. While limonene manifests itself only the winter and summer at low concentrations. The antimicrobial activities of metabolites, fractions, extract and essential oils showed good antimicrobial potential against some microorganimos. The xanthotoxin metabolite when tested against their antioxidant capacity showed a good antioxidant potential.

Key-words: *Pilocarpus pennatifolius* - isolation – metabolites – essential oil

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- Graus Celsius
ATCC	- American Type Culture Collection
CC	- Cromatografia em Coluna
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	- Clorofórmio Deuterado
CG	- Cromatografia Gasosa
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLM	- Concentração Letal Mínima
CLSI	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
COSY	- Correlated Spectroscopy
d	- duplete
dd	- duplete duplo
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DSC	- Differential Scanning Calorimetry
EB	- Extrato Bruto
EMAR	- Espectrometria de Massa de Alta Resolução
FBR	- Fração Básica Resíduo
FCex	- Fração Cicloexanica
FCexB	- Fração Cicloexanica Básica
FDA	- Food and Drug Administration
FDiclAT	- Fração Dicloro Básica Alcaloides Totais
FDiclB	- Fração Dicloro Básica
FEA	- Fração Etérea Ácida
FEB	- Fração Etérea Básica
FEBAT	- Fração Etérea Básica Alcaloides Totais
Fig.	- Figura
HCl	- Ácido Clorídrico
Hz	- Hertz
<i>J</i>	- Constante de Acoplamento

m	- Multipleteo
m/z	- relação massa/carga
MeOH	- Metanol
MeOH- <i>d</i> ₄	- Metanol Deuterado
mg	- Miligramas
MHz	- Mega Hertz
n.	- Número
NH ₄ OH	- Hidróxido de Amônia
NOESY	- Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NPPN	- Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
pag.	- Página
P.F.	- Ponto de fusão
pH	- Potencial de hidrogênio
Ppm	- Parte por Milhão
RMN	- Ressonância Nuclear Magnética
s	- Simpleto
<i>sp.</i>	- Espécie
t	- Tripleteo
UFSM	- Universidade Federal de Santa Maria
UV	- Ultravioleta
v.	- Volume
δ	- Deslocamento Químico
μg	- micrograma
IC ₅₀	- concentração com 50% de inibição

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Folhas da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i>	5
Figura 2: Fracionamento Ácido-Base do extrato bruto obtido das folhas coletadas em julho .	26
Figura 3: Fracionamento Alcaloides Totais do extrato bruto obtido das folhas coletadas em janeiro.....	27
Figura 4: Redução do DPPH via Radical Livre.....	36
Figura 5: Espectro expandido de RMN de ^1H , região de δ 7,50 a 5,20 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 600 MHz	41
Figura 6: Expansão, região de δ 5,0 a 3,70 ppm, do espectro de RMN de ^1H do metabólito G01 em MeOH- d_4	42
Figura 7: Espectro expandido, região de 3,30 a 2,20 ppm, de RMN de ^1H do metabólito G01 em MeOH- d_4	43
Figura 8: Espectro de NOESY, região de δ 7,5 a 2 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 600 MHz.....	44
Figura 9: Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100 MHz.....	45
Figura 10: Espectro de Dept 135 do metabólito G01 em MeOH- d_4 em 100MHz	46
Figura 11: Espectro expandido 2D HSQC, região entre δ 7,7 a 6,4 ppm e δ 150 a 110 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz	47
Figura 12: Espectro expandido 2D de HSQC, região entre δ 5,7 a 2,0 ppm e δ 20 a 90 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100 MHz	48
Figura 13: Espectro expandido 2D COSY, região entre δ 7,8 a 1,0 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz	49
Figura 14: Expansão do espectro 2D COSY, região entre δ 7,6 a 6,3 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 400MHz	50
Figura 15: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 7,70 a 7,05 ppm e δ 35 a 170 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz	51
Figura 16: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 5,36 a 3,19 ppm e δ 30 a 180 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz	51
Figura 17: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 4,60 a 3,90 ppm e δ 20 a 190 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz	52
Figura 18: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 2,95 a 2,0 ppm e δ 5 a 190 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz	52

Figura 19: Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR) do metabólito G01.....	54
Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região de δ 8,30 a 4,20 ppm, da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 400MHz.....	56
Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 100MHz.....	57
Figura 22: Espectro de RMN Dept 135 da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 100MHz.....	57
Figura 23: Espectro 2D HSQC da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 100MHz.....	58
Figura 24: Expansão do espectro 2D HSQC, região de δ 8,4 a 6,0 ppm e δ 90 a 165 ppm, da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 100MHz.....	59
Figura 25: Espectro 2D COSY expandido, região de δ 6,0 a 8,4 ppm, da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 400 MHz.....	59
Figura 26: Espectro expandido 2D HMBC, região de δ 8,2 a 4,0 ppm e δ 55 a 165 ppm, da cumarina bergapteno (24) em CDCl_3 a 100 MHz.....	60
Figura 27: Cromatograma de massas do metabólito bergapteno (24).....	61
Figura 28: Espectro expandido de RMN de ^1H , região entre δ 8,0 a 4,0 ppm, da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 400MHz.....	63
Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 100MHz.....	64
Figura 30: Espectro de RMN Dept 135 da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 100MHz.....	64
Figura 31: Espectro expandido 2D HSQC, região de δ 7,80 a 4,0 ppm e δ 40 a 160 ppm, da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 100MHz.....	65
Figura 32: Espectro expandido 2D COSY, região entre δ 8,2 a 5,2 ppm, da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 100MHz.....	66
Figura 33: Espectro 2D HMBC expandido, região de δ 8,2 a 3,8 ppm e δ 75 a 175 ppm, da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 100MHz.....	67
Figura 34: Cromatograma de massa do metabólito xantotoxina (25).....	68
Figura 35: Representação ORTEP obtida por difrações de raios-X da xantotoxina (25), onde C são os carbonos; O são os oxigênios (vermelho) e H (branco).....	69
Figura 36: Termograma da xantotoxina (25) fluxo de calor (W/g)/temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	70
Figura 37: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da xantotoxina (25). a) $\lambda=200$ nm, b) $\lambda=220$ nm, c) $\lambda=250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H_2O , fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18.....	71
Figura 38: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da bergapteno (24). a) $\lambda=250$ nm, b) $\lambda=270$ nm, c) $\lambda=300$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H_2O , fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18.....	72

Figura 39: Cromatograma do óleo essencial de <i>Pilocarpus pennatifolius</i> extraído no inverno.	74
Figura 40: Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> extraído no outono.....	74
Figura 41: Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> extraído no verão.....	75
Figura 42: Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> extraído na primavera.....	75
Figura 43: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da pilocarpina. a) $\lambda= 200$ nm, b) $\lambda= 220$ nm, c) $\lambda= 250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H ₂ O, fluxo 1mL.min ⁻¹ , coluna C18.	91
Figura 44: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do extrato bruto da casca. a) $\lambda= 200$ nm, b) $\lambda= 220$ nm, c) $\lambda= 250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H ₂ O, fluxo 1mL.min ⁻¹ , coluna C18.....	92
Figura 45: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das folhas. a) $\lambda= 200$ nm, b) $\lambda= 220$ nm, c) $\lambda= 250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H ₂ O, fluxo 1mL.min ⁻¹ , coluna C18.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cumarinas nas espécies do gênero <i>pilocarpus</i>	11
Tabela 2: Exemplos de atividade farmacológicas encontradas em espécies de Rutaceae	18
Tabela 3: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Acetato Básica	28
Tabela 4: Separação CC da fração VI.....	29
Tabela 5: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Etérea Ácida	30
Tabela 6: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Dicloro Básica	31
Tabela 7: Microorganismos indicadores	36
Tabela 8: Meios de cultura.....	37
Tabela 9: Rendimento das frações resultantes do fracionamento 1.....	39
Tabela 10: Rendimento das Frações resultantes do fracionamento 2.....	39
Tabela 11: Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos do composto isolado G01 com o alcaloide (+)-isopilosina	53
Tabela 12: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de bergapteno, G09 24 (CDCl ₃ , ¹ H a 400MHz; ¹³ C a 100MHz)	61
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da xantotoxina, G05 25 (CDCl ₃ , ¹ H a 400MHz; ¹³ C a 100MHz)	68
Tabela 14: Composição química do óleo volátil da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> nas quatro estações (%).	73
Tabela 15: Dados de atividade antioxidante de frações e extrato (fracionamento 1) em $\mu\text{g/mL}$	77
Tabela 16: Dados de atividade antioxidante de frações e extrato (fracionamento 2) em $\mu\text{g/mL}$	77
Tabela 17: Capacidade Antioxidante da xantotoxina	80
Tabela 18: Concentração Inibitória Mínima do extrato e frações (fracionamento 1) da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a fungos.	82
Tabela 19: Concentração Letal Mínima do extrato e frações (fracionamento 1) da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a fungos.	82
Tabela 20: Concentração inibitória e letal mínima de extrato e frações (fracionamento 1) da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a bactérias.	83
Tabela 21: Concentração inibitória e letal mínima de extrato e frações (fracionamento 2) da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a bactérias.	84

Tabela 22: Concentração inibitória e letal mínima de extrato e frações (fracionamento 2) da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a fungos.	85
Tabela 23: Concentração inibitória mínima e letal mínima das substâncias isoladas frente a bactérias.	86
Tabela 24: Concentração inibitória mínima e letal mínima das substâncias isoladas frente a fungos.	87
Tabela 25: Concentração inibitória e letal mínima dos óleos voláteis da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a bactérias.	88
Tabela 26: Concentração inibitória e letal mínima dos óleos voláteis da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> frente a fungos.	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Capacidade Antioxidante do extrato bruto e frações da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> referente ao fracionamento 1.....	77
Gráfico 2: Capacidade Antioxidante do extrato bruto e frações da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> referente ao fracionamento 2.....	78
Gráfico 3: Valores de IC ₅₀ do extrato bruto e frações da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> referente ao fracionamento 1.....	78
Gráfico 4: Valores de IC ₅₀ do extrato bruto e frações da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> referente ao fracionamento 2.....	79

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1: Rota Biossintética da Pilocarpina proposto por Boit e Leet.....	9
--	---

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Metabólitos da espécie <i>Pilocarpus grandiflorus</i>	14
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Dados da determinação da estrutura a partir da difração de raios X	101
Anexo 2: Cromatograma do óleo extraído no inverno.....	102
Anexo 3: Cromatograma do óleo extraído no outono.....	102
Anexo 4: Cromatograma do óleo extraído no verão	103
Anexo 5: Cromatograma do óleo extraído na primavera	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.1.1 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 A Planta.....	4
3.1.1 A Família Rutaceae	4
3.1.2 A espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire.....	4
3.2 A Química da família Rutaceae	5
3.2.1 Alcaloides	6
3.2.2 Biossíntese dos Alcaloides Imidazólicos	9
3.2.3 Cumarinas.....	10
3.3 Óleo Volátil da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire	15
3.4 Atividades Farmacológicas	16
3.4.1 Atividade antioxidante	19
3.4.2 Atividade antimicrobiana	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	20
4.2 Materiais e Métodos Cromatográficos.....	21
4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC).....	21
4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	21
4.2.3 Cromatografia em Placa Preparativa (CCDP)	21
4.2.4 Reagentes e Solventes utilizados	22
4.3 Cromatografia Gasosa (CG).....	22
4.3.1 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa de alta resolução (EMAR)	22
4.3.2 Espectrometria de Massa (CG-EM).....	22
4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	23
4.5 Determinação do ponto de fusão	23
4.6 Determinação do índice de rotação óptica específica.....	23
4.7 Espectrômetro de Difração de Raios-X	24
4.8 Preparação do Material vegetal.....	24

4.9	Análise Cromatográfica das Frações obtidas	27
4.9.1	Fração Acetato Básica	28
4.9.2	Fração Etérea Ácida	29
4.9.3	Fração Dicloro Básica	31
4.10	Metabólitos isolados e identificados da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire .	32
4.10.1	Identificação do metabólito G01	32
4.10.2	Identificação do metabólito bergapteno, G09	33
4.10.3	Identificação do metabólito xantotoxina, G05	33
4.11	Óleo Volátil	34
4.11.1	Extração de óleos voláteis	34
4.12	Atividades Farmacológicas	35
4.12.1	Determinação da Atividade Antioxidante	35
4.13	Ensaio Biológico	36
4.13.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	36
4.13.2	Padrões utilizados nos Ensaio Microbiológicos	37
4.13.3	Meios de culturas empregados	37
4.13.4	Preparação dos inóculos e Determinação da CIM pelo método de microdiluição	38
4.13.5	Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)	38
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	39
5.1	Rendimento dos Extratos e Frações	39
5.2	Metabólitos isolados de <i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire	40
5.2.1	Metabólitos isolados da Fração Acetato Básica	40
5.2.2	Metabólitos isolados da Fração Etérea Ácida	55
5.3.	Óleos Voláteis da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire	73
5.3.1	Análise Química do óleo essencial	73
5.4	Atividade Antioxidante	76
5.5	Atividade Antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i>	80
5.6	Análise cromatográfica do extrato bruto das folhas e casca da espécie <i>Pilocarpus pennatifolius</i>	90
6.	Conclusão	94
7.	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Desde muito tempo, o homem busca recursos de fonte naturais, como plantas e minerais para tratar doenças. Embora a medicina alopática praticada na atualidade tenha sua origem na cultura grega, o uso de plantas na medicina foi também difundido pelos egípcios, indianos e chineses sendo posteriormente praticada em outras regiões do mundo (NASCIUTTI, 2012 apud BARBERATO, 2006).

A cultura chinesa tem-se destacado nos últimos cinco séculos pelo uso de ervas medicinais. Atualmente existem 5136 espécies de plantas medicinais que são utilizadas no país e que já foram identificadas e cerca de 300 espécies analisadas com seus princípios ativos conhecidos (FOGLIO et al., 2006).

Desde a antiguidade há registros do uso plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*) e outras. Entretanto, somente no século XIX iniciou-se o estudo dos princípios ativos presentes nas plantas, contribuindo para os primeiros medicamentos com as características que nós conhecemos atualmente (NASCIUTTI, 2012 apud CALIXTO, 2008).

O Brasil é o principal país dentre aqueles de mega biodiversidade, detendo em seu território entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta. Apresenta mais de 55 mil espécies da flora mundial e ecossistemas mais ricos em número de espécies vegetais como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. Segundo dados do ministério do meio ambiente a Floresta Amazônica brasileira, compreende cerca de 26% das florestas tropicais com mais de 30 mil espécies (MMA, 2013).

Devido a grande biodiversidade, e de poucos investimentos relacionados a área dos fitoterápicos, o país desperta um grande interesse mundial, já que exporta uma grande quantidade de extratos vegetais. Diante do fato de muitas substâncias naturais isoladas ou mesmo aquelas que servem como protótipos para os fármacos movimentarem cerca de milhões de dólares mundialmente, fato exemplificado por moléculas como o taxol isolado do *Taxus breavifolia*, utilizado no tratamento contra o câncer (PINTO et al., 2002).

As substâncias químicas dos vegetais têm origem do seu metabolismo, um conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente dentro de cada célula. Dessas reações originam-se os metabólitos primários e os metabólitos secundários (GARCIA & PEREZ, 2009).

Os metabólitos primários (aminoácidos, açúcares, nucleotídeos e lipídeos) são essenciais para a planta, executam funções como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os metabólitos secundários não têm uma função relacionada diretamente à fotossíntese e respiração. Em certos grupos apresentam uma quantidade restrita, ou seja, são sintetizados em menores quantidades e não generalizado. São constituídos de terpenos, saponinas, cumarinas, alcaloides, flavonóides. Alguns desses metabólitos têm função protetora contra predadores, também intervém no mecanismo de defesa frente a diferentes patógenos, atuando como pesticidas naturais (GARCIA & PEREZ, 2009).

Devido a importância das plantas no âmbito mundial como fonte medicinal, o estudo dos metabólitos secundários e suas respectivas atividades farmacológicas torna-se relevante.

Em vista disso, o grupo de Pesquisas em Produtos Naturais coordenado pelo professor Ademir Farias Morel tem consolidado o isolamento, identificação, e estudo de novos princípios ativos produzidos pelo metabolismo das plantas, realizando trabalhos que envolvem atividades biológicas que apresentem algum uso na medicina popular. O grupo vem realizando o estudo com espécies nativas do Rio Grande do Sul, as quais possuem efeitos medicinais relatados pela cultura popular.

Dentre as espécies estudadas pelo grupo selecionou-se a espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire, pertencente à família Rutaceae, conhecida popularmente como jaborandi, que é utilizada no tratamento do glaucoma, para um estudo de seus metabólitos. Sendo encontrada na região central do estado do Rio Grande do Sul.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho consistiu em realizar o estudo fitoquímico e de atividade biológica de extrato, frações e compostos isolados das folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire, pertencente à família Rutaceae, nativa do Rio Grande do Sul.

2.1.1 Objetivos específicos

- Realizar a extração dos metabólitos secundários das folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire, coletados no interior do município de Mata;
- Verificar a influência de dois tipos de fracionamento: o primeiro denominado ácido-base e o segundo denominado alcaloides totais na obtenção de metabólitos secundários;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire, fazendo uso de técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais, como RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135, COSY, HMQC, HMBC, NOESY, espectrometria de massas e difração de raios-X;
- obter o óleo essencial extraído das folhas da espécie quanto aos seus constituintes voláteis e comparar quanto a sazonalidade;
- realizar ensaios biológicos para a determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante do extrato bruto, das frações, metabólitos isolados da espécie e óleos essenciais extraídos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Planta

3.1.1 A Família Rutaceae

A família Rutaceae abrange cerca de 1900 espécies e cerca de 160 gêneros e tem uma grande diversidade morfológica (GROPPO et al., 2008). Essas espécies estão distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Dentre essas regiões encontra-se o Brasil, que tem aproximadamente cerca de 182 espécies e 29 gêneros (MELO & ZICKEL, 2004).

A família é caracterizada também por apresentar árvores e arbustos de grande valor econômico, como o *Citrus* na horticultura e o *Pilocarpus* na medicina. Além de algumas espécies de Rutaceae apresentarem compostos com potenciais antimicrobianos e herbicidas (MARQUES, 2006). As espécies pertencentes a essa família desenvolvem glândulas produtoras de óleos fortemente aromático, que tem a principal função de protegê-las contra os predadores (FERNANDES, 2011).

Rutaceae apresenta também um grande número de metabólitos secundários, dentre eles, alcaloides geralmente derivados do ácido antranílico e tirosina, cumarinas, flavonóides, lignanas e terpenos (MARQUES, 2006).

3.1.2 A espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

A espécie *Pilocarpus pennatifolius* é conhecida popularmente como jaborandi ou cutia-branca e deriva-se do gênero *pilocarpus* (SANTOS et al., 2004; SOUZA et al., 2003). O gênero *pilocarpus* está amplamente distribuída no continente americano desde a região sul do México até o sul da América, incluindo nesse território o Brasil (SANTOS & MORENO,

2004). No estado do Rio Grande do Sul, encontra-se em formações vegetais naturais na região central.

Existem várias espécies conhecidas desse gênero *pilocarpus*, dentre elas estão *Pilocarpus grandiflorus*, *Pilocarpus racemosus*, *Pilocarpus alatus*, *Pilocarpus jaborandi*, *Pilocarpus pennatifolius* e *Pilocarpus microphyllus*, sendo essa a espécie mais estudada (SANTOS & MORENO, 2004)

As espécies de *pilocarpus* caracterizam-se por serem arbustos ou pequenas árvores com longos racemos e que atingem 2 a 3 metros de altura (Figura 1) (SKORUPA, 1996; SOUZA et al., 2003). As flores são diminutas, pentâmeras de odor forte e desagradável, com sépalas reduzidas de cor verde, as pétalas e os estames são vermelhos e as anteras amarelas. A floração ocorre no período de fevereiro a julho, mas também é possível encontrar algumas espécies com botões em outros meses do ano (SOUZA et al., 2003). As folhas são compostas de folíolos coriáceos com cerca de 8-15 cm de comprimento (DUARTE et al., 2009).



Figura 1: Folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius*

(Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4507)

3.2 A Química da família Rutaceae

A família Rutaceae é conhecida pela sua diversidade morfológica e por apresentar diversas classes de metabólitos secundários como terpenos, lignanas, alcaloides, flavonóides e cumarinas (GROPPO et al., 2008).

Devido a essa variada classe de metabólitos secundários, muitos destes apresentam atividades farmacológicas, assim instigando o interesse do estudo de plantas dessa família.

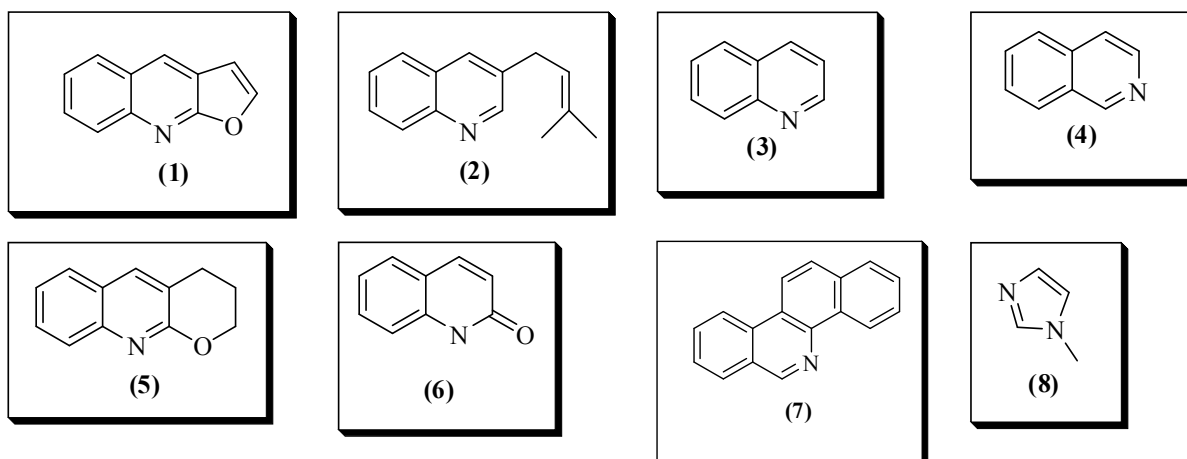
3.2.1 Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados de origem vegetal que apresentam alguma atividade farmacológica. Estes compostos são definidos como básicos por terem a presença de um nitrogênio amínico.

Os alcaloides estão distribuídos em vários órgãos das plantas, como raízes, folhas, caule subterrâneo, sementes e cascas. No reino vegetal a ocorrência de alcaloides se restringe a certas famílias e gêneros.

Essa classe de compostos tem a principal função no reino vegetal de protegê-las contra possíveis predadores, bem como fonte de nitrogênio e transporte de outros elementos fundamentais para a planta (ROBBERS et al., 1997).

Alguns dos principais esqueletos carbônicos dos alcaloides presentes na família Rutaceae são alcaloides furoquinolínicos (1), terpenoides (2), quinolínicos (3), isoquinolínicos (4), piranoquinolínicos (5), quinolonas (6), benzofenantridínicos (7) e imidazólicos (8) que podem ser encontrados nas espécies do gênero *Pilocarpus* (SIMÕES et al., 2004).



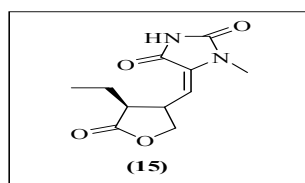
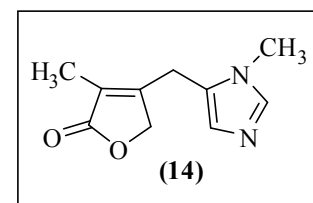
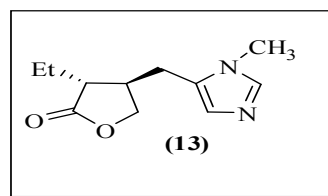
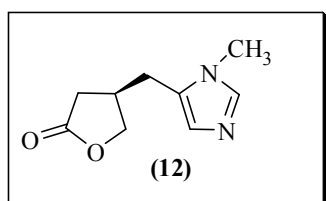
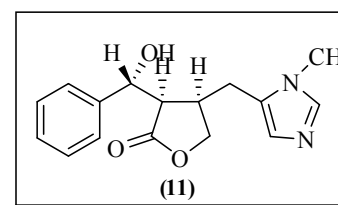
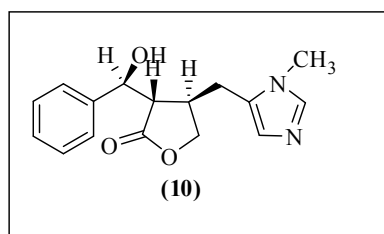
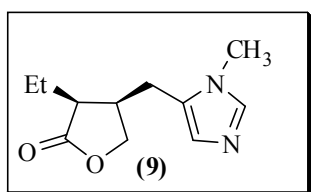
Em muitos estudos relatados do gênero *Pilocarpus*, os alcaloides imidazólicos derivados da histatina, precursor biossintético são encontrados com frequência (SANTOS & MORENO, 2004). Hardy e Gerrard (1875, apud DAVIES et al., 2009) isolaram pela primeira vez o alcaloide pilocarpina (9) das folhas da espécie *Pilocarpus jaborandi*.

Tedeschi et al. (1974) isolaram um novo alcaloide das folhas da espécie *Pilocarpus jaborandi* a epiisopilosina (10), um estereoisômero trans da pilosina (11). Posteriormente foi realizada a síntese da epiisopilosina.

Tem-se relatos de uma variedade de alcaloides imidazólicos encontrados nas espécies pilocarpus, como a pilocarpina (9), a Pilosinina (12) e isopilocarpina (13) (DAVIES et al., 2009).

Neto et al. (1996), em estudo realizado com *Pilocarpus trachyllophus*, isolaram um novo alcaloide imidazólico 13-nor-8-11-dihidropilocarpina (14) para a espécie, além de isolarem outros metabólitos já conhecidos.

Souza et al. (2005) isolaram um novo alcaloide na espécie *Pilocarpus grandiflorus*, 4,6-dehidro-1,2,4,5-tetrahidro-2,5-dioxopilocarpine (15) em conjunto com outros metabólitos já conhecidos da espécie.

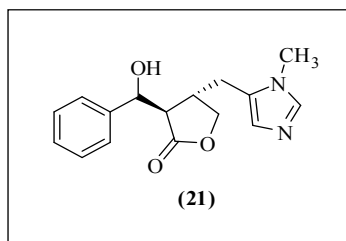
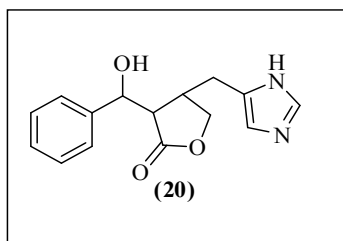
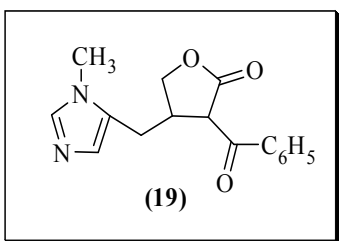
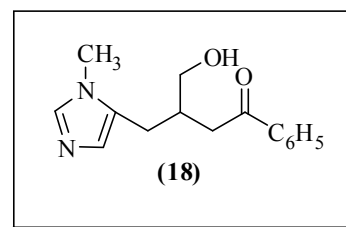
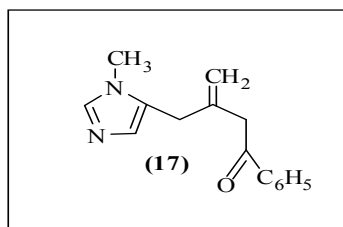
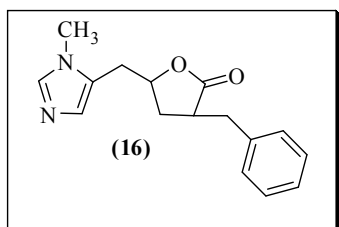


Abreu et al. (2007), realizaram um estudo da variação dos alcaloides imidazólicos na espécie *Pilocarpus microphyllus* em diferentes partes da planta e estações do ano. Os alcaloides foram identificados através da análise de espectrometria de massa de alta resolução. Os principais alcaloides encontrados foram: pilocarpina (9), pilosina (11), anidropilosina (16), 3-nor-8 (11) dihydropilocarpina (14), pilosinina (12), 3-(3-metil-3H-imidazol-4-metil) 1-fenil-but-3-em-1-one (17), 3-hidroximetil-4-(3-metil-3H-imidazol-4)1-fenil-butan-1-one (18) e 3-benzoila-4-(3 metil-3H-imidazol-4-metil)-diidro-furan-2-one (19).

Davies et al. (2009) realizaram a síntese racêmica dos alcaloides pilocarpina (9), isopilocarpina (13) e pilosinina (12).

Os isômeros do composto 3-(hidroxi-fenil-metil)-4-(3H-imidazol-4-metil-il)-diidro-furan-2-one (20), foram identificados na espécie *Pilocarpus pennatifolius*, através de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas seqüencial com ionização por eletrospray (SAWAYA et al., 2011).

Silva et al. (2013) isolaram o alcaloide epiisopiloturina (21) da espécie *Pilocarpus microphyllus* e testaram frente a atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva.

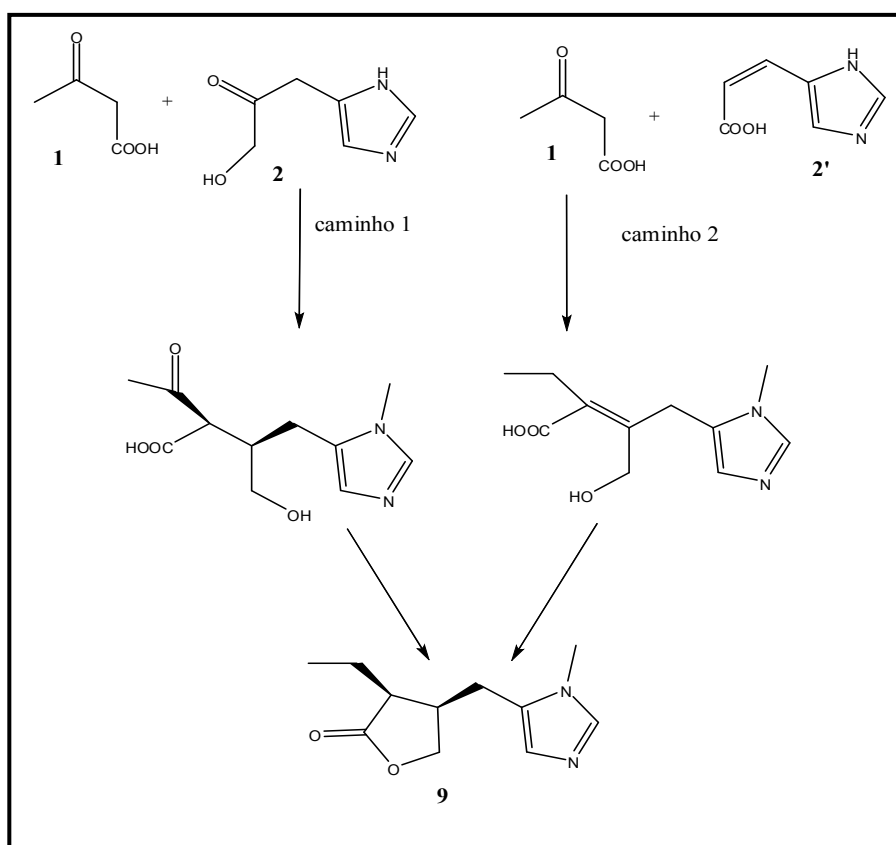


3.2.2 Biossíntese dos Alcaloides Imidazólicos

Poucos alcaloides imidazólicos são derivados da *L*-histidina. Um dos derivados mais importante é a pilocarpina (9). A primeira reportagem do isolamento da pilocarpina ocorreu por estudos de Hardy e Gerrard (1875 apud SANTOS, 2013) com as folhas da espécie *Pilocarpus Holmes*. Tem-se que alguns alcaloides encontrados nas espécies pilocarpus são derivadas biossinteticamente da *L*-histidina, embora a biossíntese desses alcaloides ainda não seja bem elucidada, alguns estudos relatam as possibilidades.

A primeira proposta da rota biossintética foi elucidada por Boit e Leet (apud SANTOS, 2013), que considerava o derivado de fosfato de 2-oxo-3-(5-imidazolil)-propanol-2, conhecido como ácido pirúvico imidazol, como precursor do anel imidazol. (Esquema 1 - caminho 1). Mais tarde essa proposta inicial foi melhorada detalhando a formação do anel da lactona através de uma condensação aldólica.

Por outro lado, uma nova abordagem biossintética proposta sugeria como rota de biossíntese a condensação do ácido-3-oxobutírico (1) com o ácido uracânico (parte imidazólica)(2'). (Esquema 1 - caminho 2).



Esquema 1: Rota Biossintética da Pilocarpina proposto por Boit e Leet

Em outros estudos (3-³H)-treonina e (3-³H) histidina foram utilizadas no estudo da biossíntese da pilocarpina (9). Após 12, 24 e 48 hs de incubação do extrato com os aminoácidos modificados, a pilocarpina foi extraída e analisada em CLAE acoplado a detectores de radioatividade. Os picos de pilocarpina nos diferentes tempos de incubação apresentaram radioatividade, sugerindo então os aminoácidos estarem envolvidos na biossíntese desse alcaloide.

Em um estudo com outro alcaloide imidazólico obtido de uma espécie de esponja, a *Teichaxinella morchella*, foi usado aminoácidos marcados como ¹⁴C-histidina, ¹⁴C- arginina e ¹⁴C-ornitina. Em torno de 0,2% desses aminoácidos foram incorporados ao alcaloide. A explicação para tal baixa percentagem é que parte desses aminoácidos podem ter participado na síntese das proteínas (SAWAYA et al., 2010).

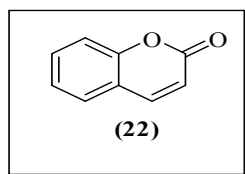
Abreu et al. (2005), aponta um estudo com caules de pendunculos onde esses foram imersos em meio líquido contendo uma solução Histadina e Treonina, ocorrendo um aumento significativo do teor dos alcaloides imidazólicos afirmando que os dois aminoácidos podem estar envolvidos na biossíntese desses alcaloides.

Em estudos metabólicos preliminares realizados com plantas jovens e adultas do jaborandi, verificou-se através de análises de RMN, espectrometria de massa com ionização por eletrospray, que a biossíntese da pilocarpina não depende do estágio de desenvolvimento da planta, enquanto que a biossíntese da pilosina (11) ocorre apenas na fase adulta da planta (SAWAYA et al., 2010).

3.2.3 Cumarinas

Cumarinas formam uma classe de metabólitos que estão distribuídos nos vegetais, principalmente em diversas espécies da família Rutaceae, Apiaceae, Astaraceae, Fabaceae e Leguminosae, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. A palavra cumarina deriva do caribenho “cumaru” nome popular da planta *Dipteryx odorata* Wild (SIMÕES et al., 2004).

As cumarinas são lactonas derivadas do ácido o-hidróxi-cinâmico, sendo a cumarina (1,2-benzopirona) (22) o derivado mais simples. Há muitos anos, a cumarina e os extratos da fava do cumaru eram utilizados como aromatizantes, contudo a FDA suspendeu o uso para esse fim devido a sua toxicidade (SIMÕES et al., 2004).

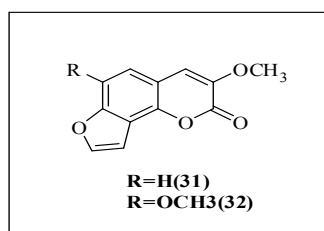


Algumas cumarinas têm sido bem reportadas no uso de tratamento para a repigmentação da pele e doença de chagas, e também apresentam propriedades antioxidantes, anti-HIV e antimicrobiana (SIMÕES et al., 2004; SANTOS & MORENO, 2004). Ainda, Santos e Moreno (2004) descrevem algumas cumarinas que apresentam atividades farmacológicas (Tabela 1).

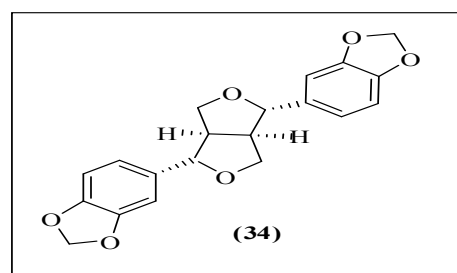
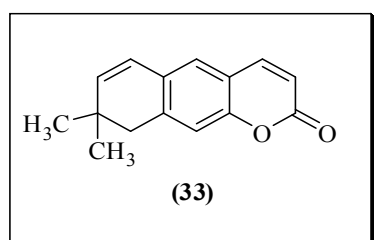
Tabela 1: Cumarinas nas espécies do gênero pilocarpus

Planta	Substância	Estrutura
<i>P. spicatus</i>	Xantoxiletina (23)	
<i>P. goudotianus</i>	Bergapteno (24)	
<i>P. goudotianus</i> e <i>P. racemosus</i>	Xantotoxina (25)	
<i>P. goudotianus</i> e <i>P. racemosus</i>	Isopimpinellina (26)	
<i>P. goudotianus</i>	Chapelina (27)	
	Umbeliferona (28)	
<i>P. riedelianus</i>	13,13-dimetil-6-metoxi-2H-8H-pirano-(2,3)-cromen-2-ona (29)	
	7-hidroxi-3-(1,1-dimetilalil)-8-metoxi-cumarina (30)	

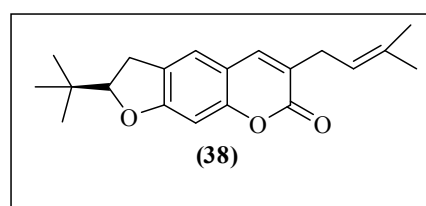
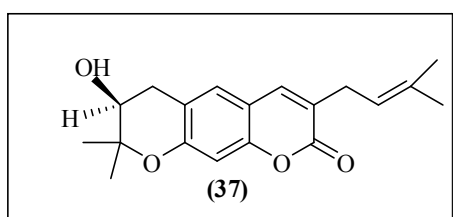
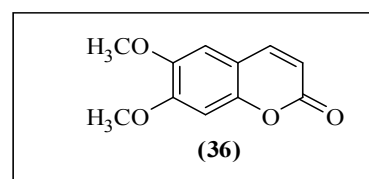
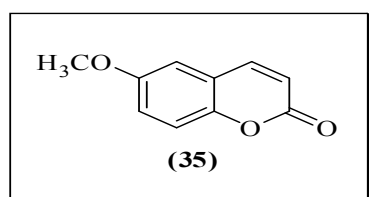
Muller et al. (1993) em estudo realizado com a espécie *Pilocarpus riedelianus* isolaram duas novas furanocumarinas: 3-metoxiangelicina (31) e 3,6-dimetoxiangelicina (32).



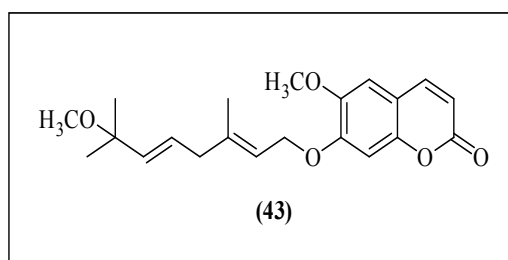
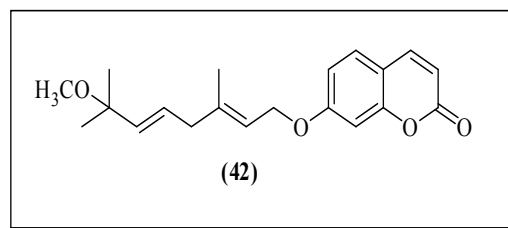
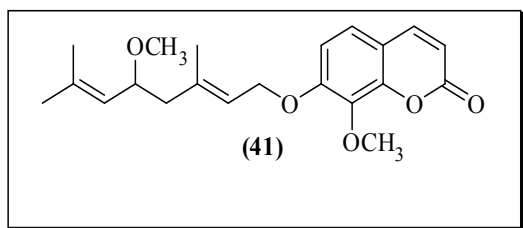
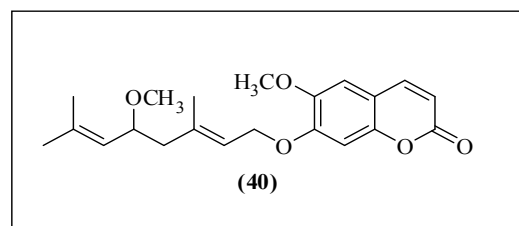
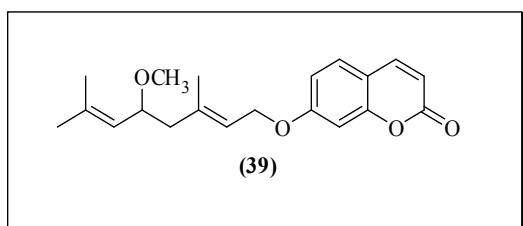
Diversas cumarinas também encontram-se distribuídos em vários gêneros da família Rutaceae, como *Esenbeckia*, *Helietta* e *Zanthoxylum*. Suarez et al. (2007) em estudo desenvolvido com a espécie *Esenbeckia alata* isolaram uma nova cumarina na espécie: a xantiletina (33) e ainda uma lignana sesamina (34).



Ferreira et al. (2010) relataram o isolamento de alcaloides furanoquinolínicos e cumarinas da espécie *Helietta apiculata*. As cumarinas isoladas da espécie foram: scopoletina (35), scoparona (36), (+)-3-(1'-dimetilalil)-decursinol (37) e (-)-heliettina (38).

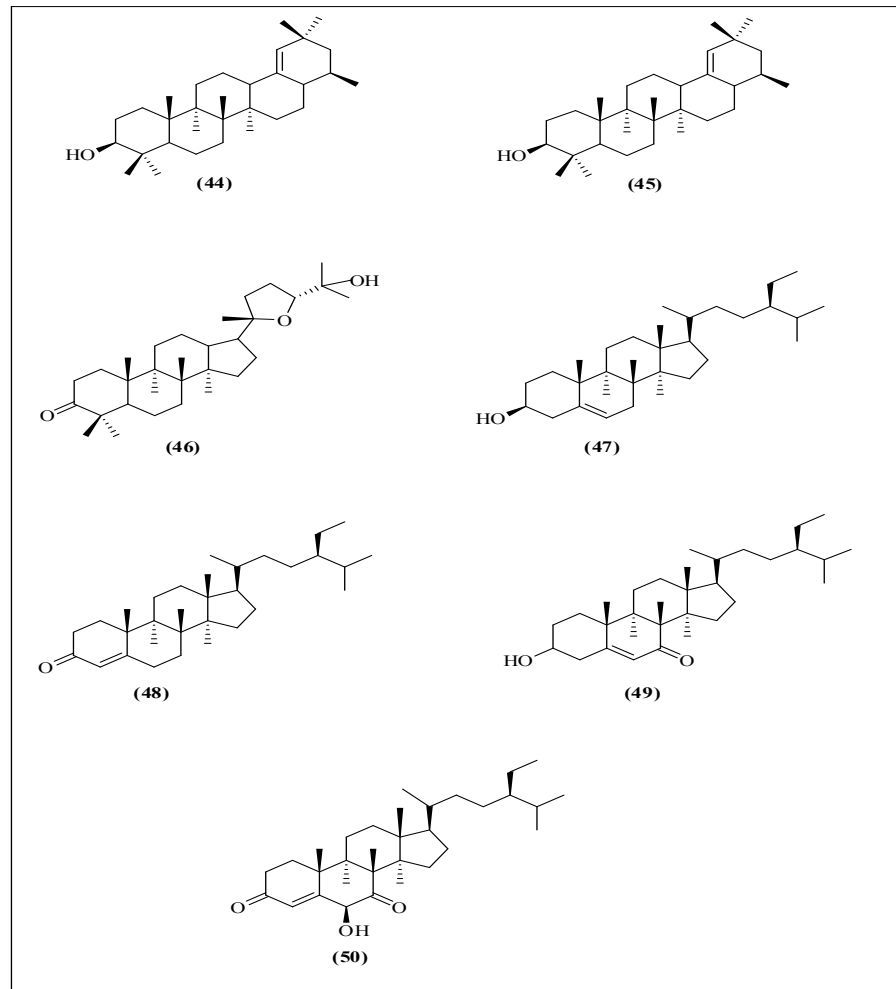


Cho et al. (2012) estudando a espécie *Zanthoxylum avicennae*, isolaram cinco novas cumarinas: 5'-metoxiauraptena (39), 6,5'-dimetoxiauraptena (40), 5'-metoxicollinina (41), 7-((2'E, 5'E)-7'-metoxi-3',7'-dimetilocta-2',5'-dieniloxi) cumarina (42), 6-metoxi-7-((2'E, 5'E)-7'-metoxi-3',7'-dimetilocta-2',5' dieniloxi) cumarina (43), além de outros metabólitos já conhecidos da espécie.

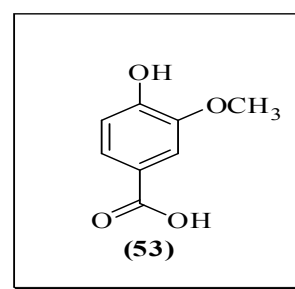
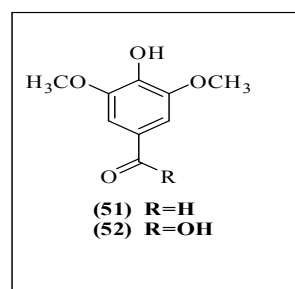


Comprovando a diversidade química apresentada por espécies do gênero *Pilocarpus*, estudos têm relatado o isolamento de outras classes de metabólitos como flavonóides, terpenos e lignanas. Souza et al. (2005) em estudo com a espécie *Pilocarpus grandiflorus* isolaram diversos metabólitos já conhecidos da espécie. Dentre eles, os terpenos germanicol (44), β -amirina (45) e os esteroides ocotilone (46), β -sitosterol (47), stigmast-4-en-3-ona (48), 3 β -hidroxi-stigmast-5-en-7-ona (49), 6 β -hidroxi-stigmast-4-en-3-ona (50).

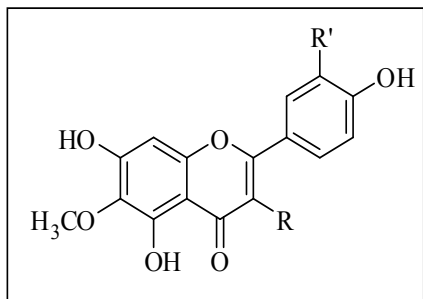
Quadro 1: Metabólitos da espécie *Pilocarpus grandiflorus*



Da mesma espécie, Souza et al. (2005) isolaram também alguns ácidos fenólicos siringaldeído (51), ácido siringico (52) e ácido vanílico (53).



Estudando a espécie *Pilocarpus trachylophus* Bertrand et al. (2001) isolaram dois flavonóides: 3,4', 5,7-tetrahidroxi-3',6-dimetoxiflavona -3-O- β -D-rutinoside (54) e 3,4',5,7'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona 3-O- β -D-rutinoside (55) das folhas da espécie.

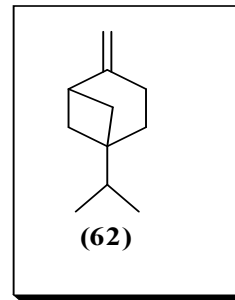
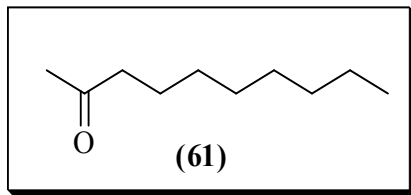
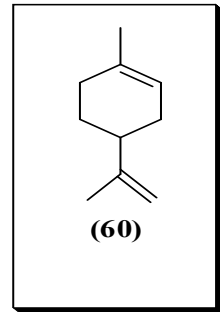
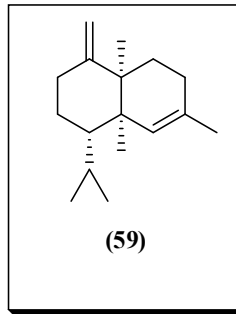
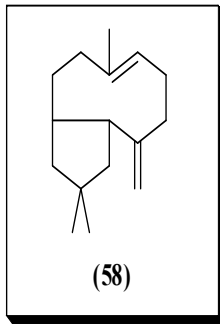
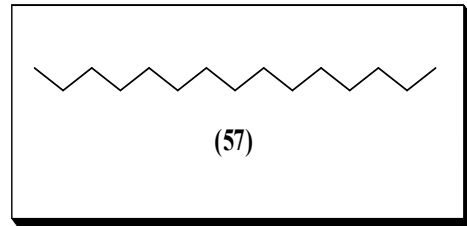
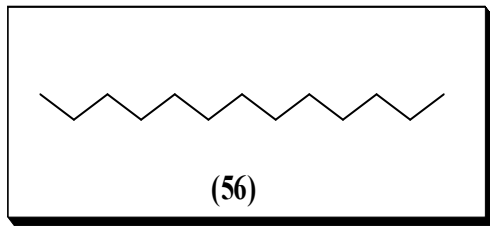


54 R' = OCH₃, R = 3-O- β -D-rutinosil
55 R' = H, R = 3-O- β -D-rutinosil

3.3 Óleo Volátil da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

Os óleos são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas resultante do metabolismo secundários das plantas. São designados também como óleos essenciais devido as suas características físico-químicas. Tem aroma agradável podendo ser chamado de essência, e são solúveis em solventes orgânicos apolares. Têm relevante importância devido ao crescimento na indústria de alimentos na forma de aromatizantes, na linha dos cosméticos em perfumes e produtos de higiene e na indústria farmacêutica como protótipos de substâncias farmacologicamente ativas (SIMÕES et al., 2004).

Ainda são poucos os relatos com estudo do óleo da espécie *Pilocarpus pennatifolius*. Em estudo realizado por Santos et al. (2004) com a espécie *Pilocarpus pennatifolius* demonstrou que há predominância dos compostos tridecano (56) e pentadecano (57), além de outros compostos em menor predominância como β -cariofileno (58), γ -muroleno (59). Com relação à outra espécie, a *Pilocarpus spicatus*, Oliveira et al. (2010) identificaram como compostos majoritários limoneno (60), 2-undecanona (61) e sabineno (62).



3.4 Atividades Farmacológicas

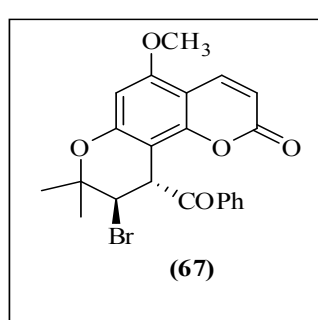
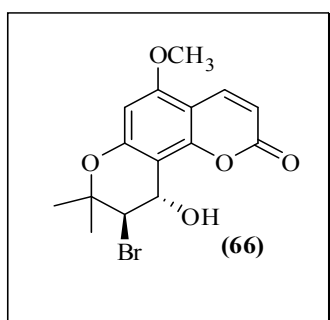
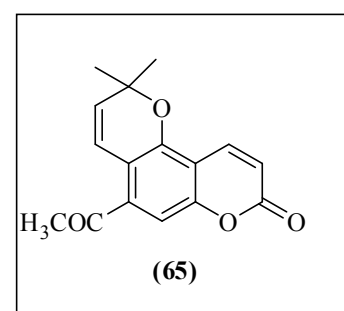
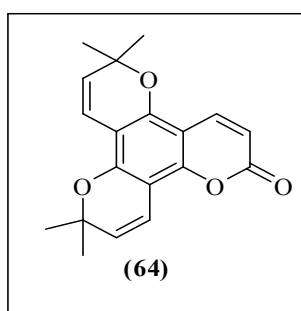
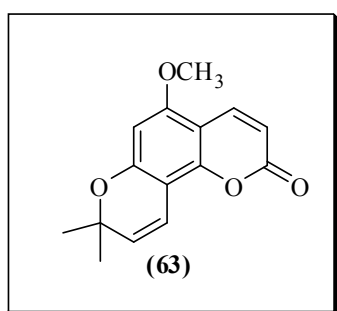
As propriedades farmacológicas do gênero pilocarpus começaram a ser estudadas em 1873, quando o gênero demonstrou ser um importante estimulante do sistema secretor, além de apresentar atividades diuréticas e sudoríficas. Desde então a infusão das folhas do Jaborandi têm sido usado na medicina popular, despertando assim o interesse para o estudo e identificação de seus constituintes químicos responsáveis por suas atividades farmacológicas (SANTOS & MORENO, 2004).

Diversas espécies da família Rutaceae têm reportado atividades farmacológicas. Vieira et al. (2000) em estudo com algumas espécies de Rutaceae dentre elas: *Pilocarpus spicatus*, *Pilocarpus giganteus*, *Zanthoxylum minutiflorum*, *conchocarpus longifolius*, demonstraram atividades contra o *Tripanossoma Cruzi*.

Gunatilaka e Kingston (1994) em estudo realizado com espécie de Rutaceae do Sri Lanka, isolaram cumarinas com atividades citotóxicas.

Fernandes et al. (2005) em estudo realizado com a espécie *Pilocarpus riedelianus*, verificaram atividades antimicrobianas e antifúngicas do extrato diclorometânico do caule da espécie e nos sesquiterpenos isolados desse extrato.

Magiatis et al. (2005) realizaram a síntese de piranocumarinas, os compostos sintetizados: 5-metoxiseselina (63), dipetalolactona (64), aloxantoxiletina (65), (\pm)trans-3'-bromo-4'-hidroxi-3',4'-dihidro-5-metoxiseselina (66) e (\pm)trans-3'-bromo-4'-benzoiloxi-3',4'-dihidro-5-metoxiseselina (67) apresentaram atividades antibacteriana frente a sete microorganismos. Os compostos (63), (64) e (65) também podem ser encontrados de forma natural em algumas espécies de Rutaceae.

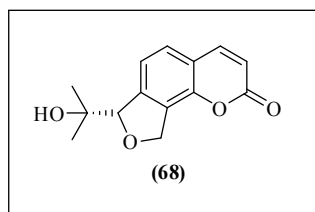


A tabela a seguir mostra mais exemplos relatados de atividades farmacológicas encontrados na literatura de algumas espécies pertencentes à família Rutaceae.

Tabela 2: Exemplos de atividade farmacológicas encontradas em espécies de Rutaceae

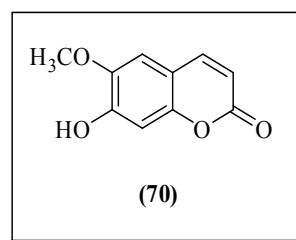
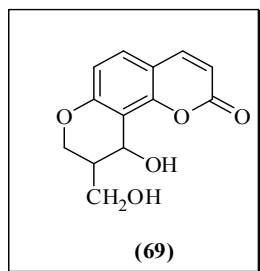
Espécie	Atividade	Substâncias	Referência
<i>Citrus paradisi.</i>	Antioxidante	Flavonóides, cumarinas	(YOU et al., 2012)
<i>Pilocarpus grandiflorus</i>	Antifúngica	Flavonóides siringaldeído (51) e ácido vanílico (53)	(SOUZA et al., 2005)
<i>Zanthoxylum chiloperone</i>	Antiinflamatória e antinociceptiva	Extrato das folhas	(SOUZA, 2007)
<i>Murraya Koenigii</i>	Antimicrobiana	Extrato das raízes	(VATS, SINGH, SARDANA., 2011)
<i>Helietta apiculata</i>	Antileishmanial	Cumarinas scopoletina (35), scoparona (36), (+)-3-(1'-dimetilalil)-decursinol (37) e (-)-heliettina (38)	(FEREIRA et al., 2010)
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	Antidiabética	Extrato das folhas	(CHAUDHARY, DEVI, VANDANA., 2010)

A cumarina Marmesina (68) isolada da espécie *Conchocarpus fontanesianus* (Rutaceae) por Young et al. (2012) apresentou atividade anticolinesterase.



As cumarinas 5'-metoxiauraptena (39), 6,5'-dimetoxiauraptena (40), 5'-metoxicollinina (41), 7-((2'E, 5'E)-7'-metoxi-3',7'-dimetilocta-2',5'-dieniloxi) cumarina (42) e 6-metoxi-7-((2'E, 5'E)-7'-metoxi-3',7'-dimetilocta-2',5' dieniloxi) cumarina (43), isoladas da espécie *Zanthoxylum avicennae* apresentaram atividades antiinflamatórias (CHO et al., 2012).

Em estudo realizado por Rhamani et al. (2013) com a espécie *Melicope glabra* pertencente a família Rutaceae as cumarinas glabranina (69), umbelliferona (28) e scopoletina (70) e a lignana sesamina (33) isoladas apresentaram atividade antioxidante.



Silva et al. (2013) isolaram o alcaloide imidazólico epiisopiloturina (21) que apresentou atividade antiinflamatória e antinociceptiva. O alcaloide apresentou também atividade contra *Schistosoma mansoni*, um platelminto causador da esquistossomose (VERAS et al., 2012).

3.4.1 Atividade antioxidante

O oxigênio molecular obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbicos, no entanto a formação de radicais livres *in vivo* em excesso, resulta no estresse oxidativo (MORAIS & BRAZ, 2012).

O estresse oxidativo (EO) ocorre quando a taxa de produção de agentes oxidantes e dos agentes deteriorantes, chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) está em desequilíbrio. Os fatores que influenciam são: predisposição genética, ambientais como radiação UV e propriedades intrínsecas específicas de grupo celulares que podem favorecer ou diminuir a capacidade das células de degradar estes agentes agressores (VICENTINO & MENEZES, 2007).

Os exemplos mais comuns encontrados de ERO são radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peroxila (RO_2^-), alkoxila (RO^-), hidroperoxila (HO_2^-). Moléculas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrato (ONOO) apesar de não serem radicais livres, podem levar a formação deles através de reações químicas (VICENTINO & MENEZES, 2007).

Testes *in vitro* são utilizados para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais utilizando um radical estável, por exemplo, o DPPH, medindo então a capacidade dos compostos naturais seqüestrarem esse radical (MENSOR et al., 2001).

3.4.2 Atividade antimicrobiana

Devido o surgimento de novas doenças infecciosas e o ressurgimento de doenças consideradas antes controladas, ressalta-se a necessidade de novas pesquisas de agentes antimicrobianos (DUARTE, 2006; VALGAS et al., 2007).

Os processos infecciosos que são causados por agentes microbianos, preocupam a classe médica, tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos, por serem responsáveis por diversas doenças oportunistas. Como exemplo pode-se considerar os fungos *Candida* e *Criptococcus* como as leveduras mais envolvidas em infecções micóticas, sendo a levedura *Candida*, um patógeno oportunista responsável por infecções em pacientes imunocomprometidos. A bactéria *Staphylococcus aureus* também é citado como um patógeno que causa infecções em ferimentos, representando a terceira causa mais comum de infecções hospitalares (DUARTE, 2006; LIMA et al., 2006; PONZI et al., 2010).

Diversas medidas tecnológicas vêm sendo sugerida para resolver o problema da resistência desses agentes microbianos, dentre elas a busca por novos medicamentos ou protótipos oriundos de espécies vegetais, uma vez as plantas produzem uma variedade de metabólitos com propriedades antimicrobianas. Sendo assim, a busca de novos constituintes químicos com atividades farmacológicas de suma importância (SILVA et al., 2010; OSTROSKY et al., 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. 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, NOESY) foram realizados em um Espectrômetro Bruker DPX-200, operando a 200,13 MHz para ^1H e 50,32 MHz para ^{13}C , um espectrômetro Bruker DPX 400, operando a 400,13 MHz para ^1H e 100, 62 MHz para ^{13}C , e um espectrômetro Bruker ASCEND 600, operando a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Para a preparação das amostras, utilizou-se quantidade 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 foi o clorofórmio (CDCl_3) e metanol ($\text{MeOH-}d_4$) deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de deslocamento (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 ^{13}C utilizou-se CDCl_3 (δ 77,00) e $\text{MeOH-}d_4$ (δ 49,05). Os espectros 1D e 2D foram processados com o software da Bruker TOPSPIN-NMR 3.2.

Os espectros 2D Homonuclear ($^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY-45) e Heteronuclear (HSQC, HMBC e NOESY) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e processados pelo software TOPSPIN-NMR 3.2 da Bruker.

4.2 Materiais e Métodos Cromatográficos

4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC)

Para as colunas cromatográficas utilizou-se sílica gel tipo 60 (Sorbent), 70-230 e 230-400 mesh, como adsorvente, produzida pela SILICYCLER, utilizando colunas com diferentes diâmetros interna e eluídas por solventes puros ou em sistemas gradientes, para a separação inicial de alguns dos compostos.

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada foi efetuada em cromatoplasas de folhas de alumínio, como suporte e sílica gel 60 GF₂₅₄ com 0,25 mm de espessura, como adsorvente.

As placas foram reveladas em lâmpada ultravioleta ($\lambda = 264$ e 365 nm, spectroline) reativo de Dragendorff para a revelação dos alcaloides e borrifação com solução $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a 5%, seguida de tratamento térmico para os demais metabólitos.

4.2.3 Cromatografia em Placa Preparativa (CCDP)

Para a purificação de alguns compostos utilizou-se placas de vidro (20 cm x 20 cm) recobertas com sílica gel 60 GF₂₅₄ (Sorbent) e água deionizada para a deposição.

4.2.4 Reagentes e Solventes utilizados

Os reagentes e solventes utilizados tem procedência Belga, Vetec e Tedia, de grau comercial, purificados por técnicas de destilação. O gradiente de misturas de solventes utilizados estão descritos no decorrer do texto.

4.3 Cromatografia Gasosa (CG)

Os experimentos de CG foram obtidos em cromatógrafo a gás Varian, modelo 3400 e 3800. Os sinais foram observados através de um detector de ionização de chama (DIC), utilizando hidrogênio ultrapuro como gás de arraste (fase móvel), com uma pressão do gás de arraste de 7 Psi, Split 10 temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 280 °C. As condições utilizadas estão descritas nos cromatogramas.

4.3.1 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa de alta resolução (EMAR)

As análises foram realizadas em um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução modelo Xevo G2 Q-TOF da Waters do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais/CEPETRO. A amostra foi introduzida em infusão em solução de Acetonitrila-H₂O (1:1) com 0,1 % de ácido fórmico a 5 μ L/min, em modo ESI (+), tensão do capilar 2 kV, cone de extração 1V, cone de amostragem 15V, a temperatura da fonte foi de 150 °C, a temperatura de dessolvatação de 500 °C, cone de gás a 10 L/hora, o gás de dessolvatação a 600 L/hora, utilizando-se como gás de dessolvatação nitrogênio.

4.3.2 Espectrometria de Massa (CG-EM)

As análises foram realizadas Cromatógrafo a Gás Varian CP-3800 acoplado com detector de massas Saturn 2200 MS/MS (Varian), com autosampler CP 8400 (Varian) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – Laboratório de Análises

Químicas Industriais e Ambientais / CEPETRO - equipado com injetor Split 1:20, coluna capilar VF-5MS 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme. Foi utilizado como gás de arraste hélio ultrapuro a 1,0 mL/min, sendo a temperatura do injetor de 280 °C e a programação de análise com T inicial = 50 °C e T final = 300 °C rampa de aquecimento de 15 °C/min. Os dados obtidos foram comparados com os dados da biblioteca de padrões NIST 2009 de espectros de massa.

4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1200 com detector DAD (210 a 380 nm), utilizando-se coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 nm; 5 μm) em forno a 40 °C. Foi utilizado um gradiente de solvente de MeOH:H₂O com fluxo de 1ml.min⁻¹. A amostra foi introduzida inicialmente sob infusão em um gradiente de solução de MeOH (95:05) com 0,1 % de ácido fórmico. No tempo de 15 min. essa proporção variou de MeOH a 100% de MeOH e se manteve até o final da análise (30 min).

4.5 Determinação do ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão das substâncias isoladas foram determinados em um aparelho MQAPF-301 da Microquímica.

4.6 Determinação do índice de rotação ótica específica

Para a determinação da rotação ótica das amostras foi realizada um polarímetro PerkinElmer 341 automático com lâmpada de mercúrio com precisão de 0,05 graus, em cubeta de 10 dm de comprimento, utilizando diclorometano e metanol como solventes dependendo da solubilidade das amostras. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais / CEPETRO da Universidade Federal de Santa Maria.

4.7 Espectrômetro de Difração de Raios-X

Os dados das medidas cristalográficas foram obtidas em aparelho Bruker kappa-Apex II CCD sistema difratômetro equipado com um monocromador de grafite e um cristal de Mo selado tubo cerâmico de raios- X ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) da Universidade Federal de Santa Maria – Laboratório de Cristalografia.

4.8 Preparação do Material vegetal

As folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmarie foram coletados no mês de julho de 2012 (2Kg) e janeiro de 2013 (2Kg) no interior do município de Mata. Sendo estas utilizadas para a obtenção do extrato bruto.

As folhas da espécie utilizadas para a obtenção de óleos voláteis, também foram coletadas no interior do município de Mata, porém em diferentes épocas do ano: abril para o outono, setembro para o inverno, outubro referente a primavera e janeiro para o verão.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo professor Renato Zachia do departamento de Biologia da UFSM considerando também que tem uma exsicata da planta do departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria, sob número 2753.

O material vegetal coletado (folhas) foi seco em estufa de ar circulante a 50°C e triturado em um liquidificador industrial. Os extratos brutos foram feitos a quente. Para a extração utilizou-se metanol como solvente e um aparelho de Soxlet.

Foram realizados dois tipos de fracionamento: ácido-base (figura 2) e alcaloides totais (figura 3). Para o fracionamento 1 (ácido-base), o extrato bruto (350g) foi solubilizado em água e após acidificado com ácido clorídrico HCl (2N) (pH ~2) e extraído com cicloexano (FCex) até exaustão, e posteriormente extraído com éter etílico (FEA).

Basificou-se o resíduo aquoso com hidróxido de amônio (NH₄OH) (pH ~ 9), e extraiu-se com éter etílico e acetato de etila, obtendo-se assim a fração etérea básica (FEB) e acetato básico (FAB) respectivamente, conforme figura 2.

Para o fracionamento 2 (alcaloides totais), foram realizadas três etapas, conforme figura 3. Na primeira etapa o extrato bruto (300g) foi solubilizado em água e basificado com NH₄OH (pH ~ 9), posteriormente extraído com cicloexano (FCexB) até a exaustão, após com diclorometano (FDiclB) e éter etílico (FEBAT). Na segunda etapa as frações (FDiclB) e

(FEBAT) foram submetidas a uma lavagem com uma solução ácida de HCl (2N) (pH ~ 2) exaustivamente, em um funil de extração, afim de esgotar da fase orgânica os alcaloides.

Na terceira etapa a solução aquosa ácida foi basificada com NH_4OH (pH ~ 9) e posteriormente extraída com diclorometano, obtendo assim a fração chamada de alcaloides totais (FDicLAT). A fase orgânica obtida na primeira etapa foi chamada de Resíduo (FBR).

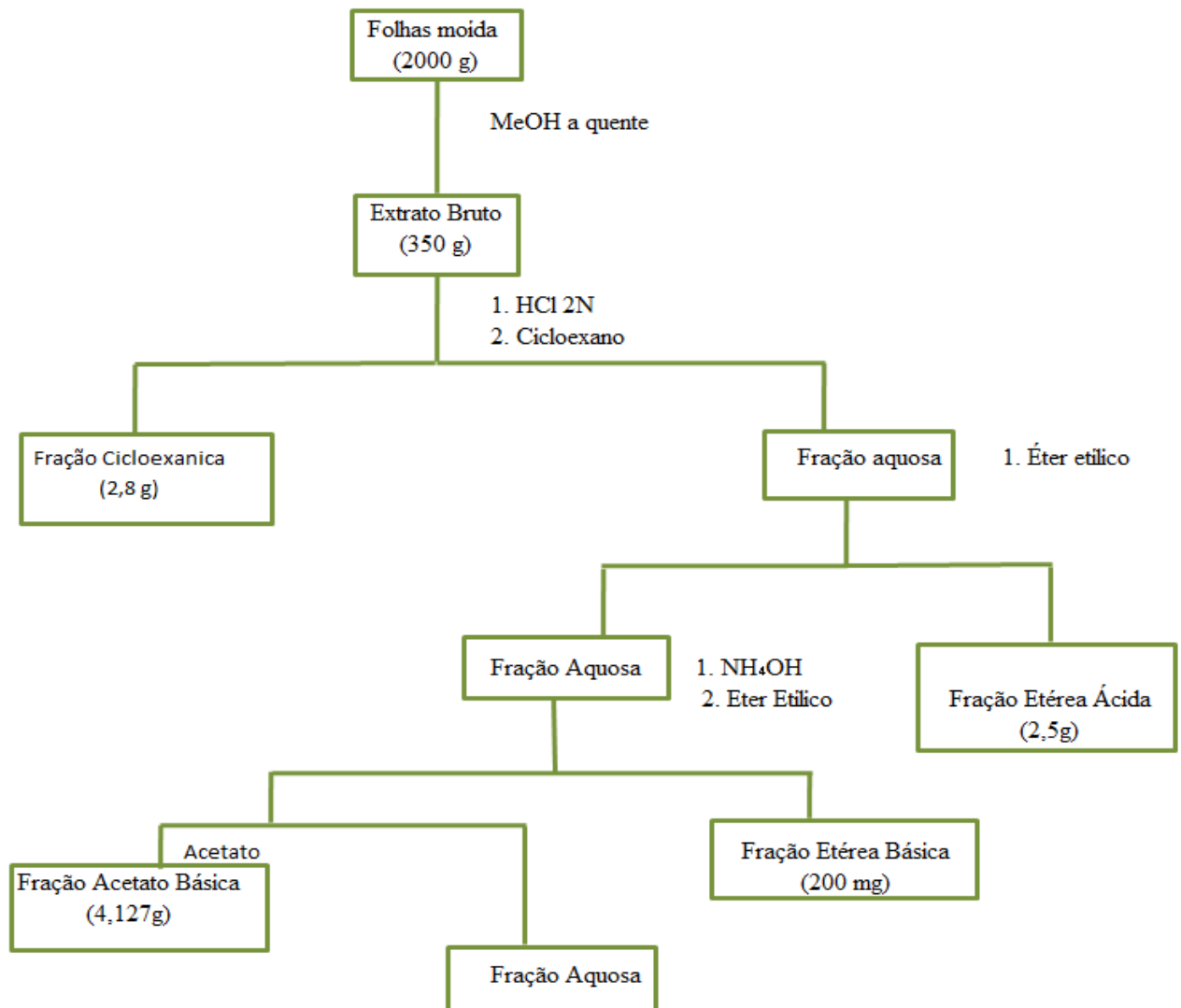


Figura 2: Fracionamento Ácido-Base do extrato bruto obtido das folhas coletadas em julho

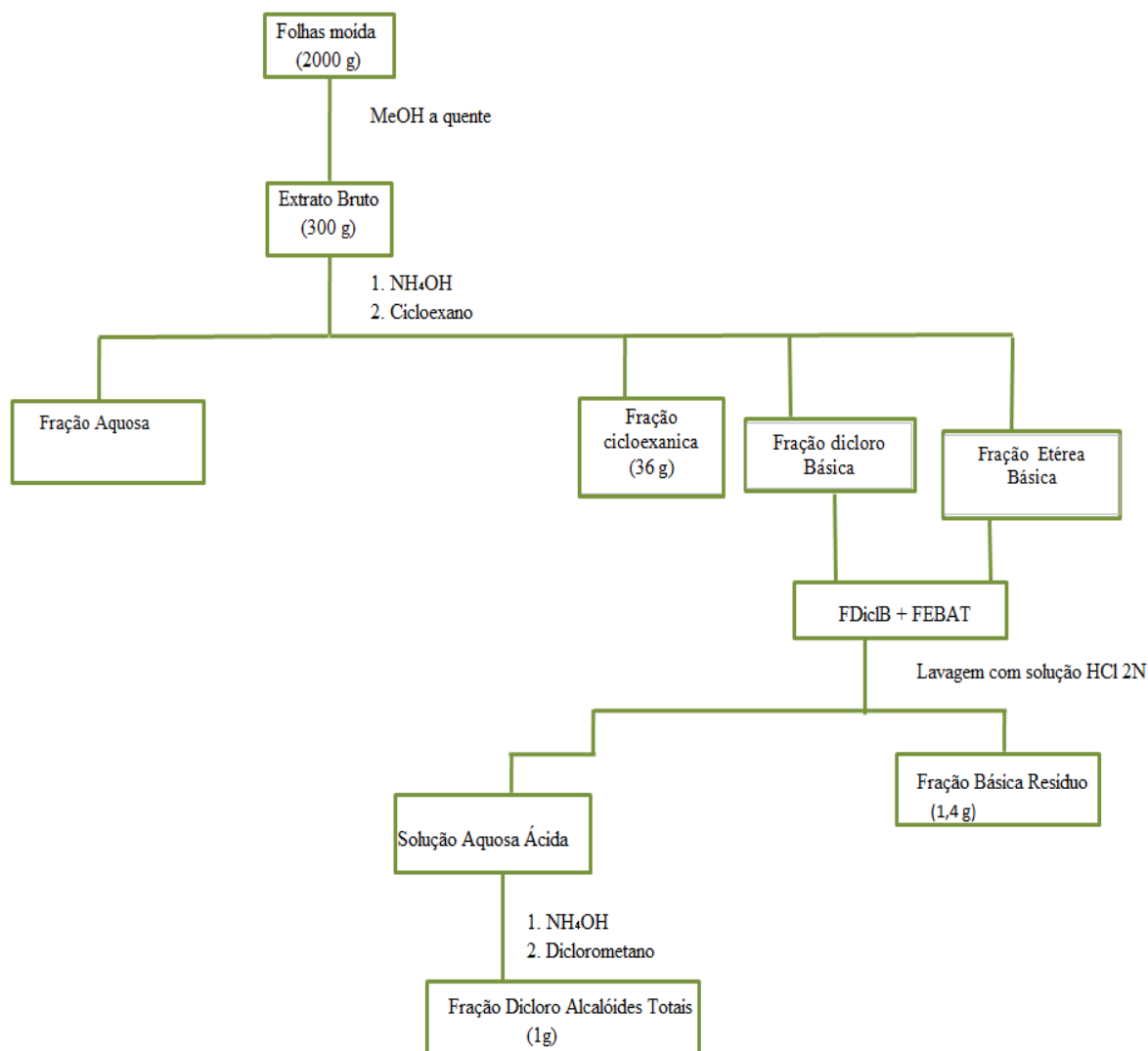


Figura 3: Fracionamento Alcalóides Totais do extrato bruto obtido das folhas coletadas em janeiro

4.9 Análise Cromatográfica das Frações obtidas

As frações obtidas foram analisadas por meio de CCD, em diferentes solventes e gradientes de misturas, e reveladas posteriormente em lâmpada UV 254nm e UV 365nm, reagente de Dragendorff para a identificação da presença de alcalóides e solução EtOH/H₂SO₄ a 5%, seguida de tratamento térmico para os demais metabólitos. A fração acetato básica (FAB) mostrou positividade para alcalóides e as frações etérea ácida (FEA) e dicloro básica (FDicIB) apresentou manchas escuras quando reveladas em ácido sulfúrico. Essas frações foram analisadas individualmente e submetidas a colunas cromatográficas para o isolamento e identificação destes.

4.9.1 Fração Acetato Básica

Esta fração (4,1251 g) obtida do fracionamento 1 foi cromatografada em coluna empregando sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano/ acetato/ metanol num gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas 98 frações e rotaevaporada. As frações foram comparadas em CCD e reunidas conforme suas similaridades (Tabela 3).

Tabela 3: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Acetato Básica

Frações	% Solventes	Substâncias	Peso (mg)
I-1 a 10	Hexano	Mistura	3,0
II- 11 a 39	Hexano/ Acetato 20%	Mistura	29,4
III- 40 a 54	Hexano/ Acetato 1:1	Mistura	65,2
IV- 55 a 70	Acetato	Mistura	289,3
V- 71 a 74	Actato/ Metanol 10%	Mistura	115,9
VI- 75 a 76	Acetato/ Metanol 10%	Mistura	515,0
VII- 77	Acetato/ Metanol 10%	Mistura	344,3
VIII- 78 a 79	Acetato/ Metanol 10%	Mistura	369,1
IX- 80 a 82	Acetato/ Metanol 10%	Mistura	598,0
X- 83 a 87	Acetato/ Metanol 20%	Mistura	431,0
XI- 88 a 92	Acetato/ Metanol 30%	Mistura	214,3
XII- 93 a 97	Acetato/ Metanol 1:1	Mistura	217,8
XIII- 98	Metanol	Mistura	150,0

Uma nova coluna foi realizada da fração VI, frações 75 e 76 (515 mg) proveniente da fração Acetato Básica, utilizando-se como gradiente de polaridade crescente de solvente, Clorofórmio/Metanol. As frações foram coletadas em frascos de 30 mL, as quais foram evaporadas lentamente a temperatura ambiente e reunidas conforme suas similaridades de acordo com a tabela 4.

Tabela 4: Separação CC da fração VI

Subfrações	% Solventes	Substâncias	Peso (mg)
1 a 11	Clorofórmio	Mistura	10,0
12 a 56	Clorofórmio/Metanol 5%	Mistura	108,6
57 a 59	Clorofórmio/Metanol 15%	Mistura	15,0
60 a 63	Clorofórmio/Metanol 15%	G01	6,0
64 a 78	Clorofórmio/Metanol 15%	Mistura	154,0
79 a 89	Clorofórmio/Metanol 20%	Mistura	47,0
90 a 94	Clorofórmio/Metanol 40%	Mistura	50,0
95 a 103	Clorofórmio/Metanol 1:1	Mistura	47,0
104 a 105	Metanol	Mistura	50,0

Nas subfrações 60 a 63 (6 mg) (Tabela 4), ocorreu a formação de cristais, e estes através de análises de CCD e frente a reativo de Dragendorff, mostrou positividade para alcaloides. O metabólito foi submetido a análises de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, comprovando a estrutura de um alcaloide chamado 3-(hidroxi-fenil-metil)-4-(3H-imidazol-4-metil-il)-diidro-furan-2-ona (20), sendo este um composto com dados de RMN de ^1H e ^{13}C pela primeira vez nas espécies *Pilocarpus*.

As frações IV, V, VII, VIII e IX também foram submetidas a análise por CC, mas não foi possível o isolamento de metabólitos em quantidades suficientes para análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

4.9.2 Fração Etérea Ácida

A fração Etérea ácida (2g) foi cromatografada em coluna empregando sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano/ dicloro/ metanol num gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas 80 frações e rotaevaporadas. As frações foram comparadas em CCD e reunidas conforme suas similaridades (Tabela 5).

Tabela 5: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Etérea Ácida

Frações	% Solventes	Substâncias	Peso (mg)
I-1 a 5	Hexano	Mistura	2,0
II-6 a 15	Hexano/Dicloro 10%	Mistura	17,0
III-16 a 22	Hexano/Dicloro 20%	Mistura	22,0
IV- 23 a 30	Hexano/Dicloro 1:1	Mistura	25,0
V-31 a 41	Dicloro	Mistura	20,0
VI-42 a 43	Dicloro/ Metanol 1%	G09	5,0
VII-44 a 49	Dicloro/ Metanol 1%	Mistura + G05	15,0
VIII-50 a 53	Dicloro/Metanol 5%	G05	20,0
IX-54 a 55	Dicloro/ Metanol 5%	G05 + pigmento	10,0
X-56 a 66	Dicloro/Metanol 10%	Mistura	314,0
XI-67 a 75	Dicloro/Metanol 1:1	Mistura	527,0
XII-76 a 80	Metanol	Mistura	900,0

Na fração VI, 42 a 43 (5 mg) (Tabela 5), através da análise de CCD verificou-se a presença de um metabólito puro. Este foi submetido a análises de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e, comparando com os dados relatados na literatura, identificou-se como sendo uma cumarina denominada bergapteno (24).

Na fração VIII, após a evaporação do solvente em temperatura ambiente ocorreu formação de cristais brancos, que através de análises de ^1H e ^{13}C foi possível identificar o metabólito como sendo uma cumarina denominada xantotoxina (25) conforme dados da literatura e medidas de difração de raios-X. Esse metabólito foi obtido também nas subfrações VII e IX. A fração VII foi submetido à CCDP com sistema de gradiente de solvente Clorofórmio e gotas de éter, com o objetivo de purificar o metabólito e a subfração IX foi submetida à lavagem com metanol para limpar o pigmento presente.

Foi possível identificar que os metabólitos isolados da fração VI e VIII são isômeros através da análise de RMN e espectrometria de massa.

4.9.3 Fração Dicloro Básica

Uma parte da fração Dicloro Básica (1g) obtida da primeira etapa do fracionamento 2 foi cromatografado em coluna empregando sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano/ dicloro/ metanol num gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas 149 frações e rotaevaporadas. As frações foram comparadas em CCD e reunidas conforme suas similaridades, conforme descreve a tabela 6.

Tabela 6: Separação em Coluna Cromatográfica da Fração Dicloro Básica

Frações	% Solventes	Substância	Peso (mg)
I-1 a 4	Hexano	Mistura	2,0
II-5 a 10	Hexano/ Dicloro 10%	Mistura	6,6
III-11 a 17	Hexano/ Dicloro 20%	Mistura	7,0
IV-18 a 26	Hexano/ Dicloro 30%	Mistura	8,0
V-27 a 34	Hexano/ Dicloro 1:1	Mistura	6,0
VI-35 a 43	Dicloro	Mistura	20,0
VII-44 a 51	Dicloro/ Metanol 1%	G05 + Mistura	28,2
VIII- 52 a 55	Dicloro/Metanol 1%	G05 + Mistura	14,0
IX--56 a 75	Dicloro/Metanol 5%	G05 + Mistura	63,0
X-76 a 104	Dicloro/ Metanol 10%	Mistura	125, 5
XI-105 a 120	Dicloro/ Metanol 15%	Mistura	246,6
XII-121 a 141	Dicloro/Metanol 20%	Mistura	70,0
XIII-142 a 147	Dicloro/Metanol 30%	Mistura	147,0
XIV-148 a 149	Metanol	Mistura	123,0

Na fração VIII, frações 52 a 55, ocorreu a formação de cristais, após a evaporação do solvente em temperatura ambiente. As frações foram submetidas à CCDP, sendo eluidas em um gradiente de solventes Hexano/Acetona 30%, demonstrando pureza após o procedimento.

As frações 44 a 51 também foi submetida a CCDP. quando Frente reativo de Dragendorff apresentou coloração alaranjada. Analisando os espectros de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, difração de raios-x e comparação com os dados da literatura, identificou-se o metabólito isolado sendo uma cumarina denominada xantotoxina (25).

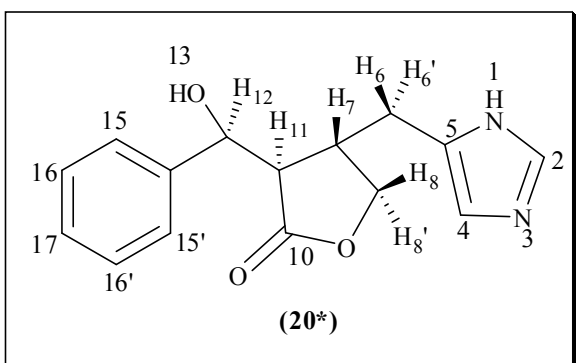
Nas frações 56 a 75, foi realizada CCDP, com gradiente de solvente Hexano/ Cetona 30% e Clorofórmio/ Cetona 5%, mas não foi possível separar a mistura, conforme análises em CCD e CLAE.

Em outras colunas e frações diferentes das relatadas nesse trabalho, foram obtidos o isolamento de outros metabólitos com diferentes Rfs, mas devido a quantidade obtida, não foi possível realizar análise de RMN ^1H e ^{13}C . A comparação através de análise de cromatografia Líquida (CLAE) também não foi possível, pois não havia os padrões de metabólitos isolados da planta em estudo.

4.10 Metabólitos isolados e identificados da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

4.10.1 Identificação do metabólito G01

6 mg, sólido amarelado cristalino, com ponto de fusão: 194,5 °C a 196,3 °C, índice de Rotação $[\alpha]_D^{20} = -85^\circ$ (em MeOH, concentração: 0,0002g/cm³), m/z: 272, 1252, isolado das

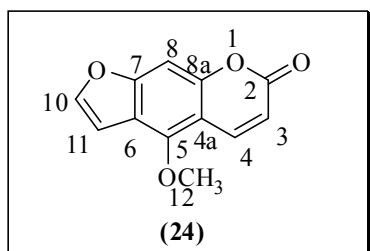


subfrações 60-63, proveniente da fração acetato básica (Clorofórmio/metanol 15%), RMN de ^1H a 600 MHz, MeOH-*d*₄, δ 7,40 ppm (H-2, s), δ 6,48 ppm (H-4, s), δ 2,39 ppm (H-6, dd, $J = 8,22\text{Hz}, 14,6\text{Hz}$), δ 2,26 ppm (H-6', dd, $J = 6,8\text{Hz}, 14,6\text{Hz}$), δ 2,92 ppm (H-7, m), δ 4,37 ppm (H-8, t, $J = 8,63\text{Hz}$), δ 4,02 ppm (H-

8', dd, $J = 5,48\text{Hz}, 8,71\text{Hz}$), δ 2,74 ppm (H-11, dd, $J = 2,73\text{Hz}, 5,91\text{Hz}$), δ 5,27 ppm (H-12, d, $J = 2,72\text{ Hz}$), δ 4,59 ppm (OH), δ 7,37 ppm (H-15,15', d, $J = 7,28\text{Hz}$), δ 7,32 ppm (H-16,16', t, $J = 7,83\text{Hz}$), δ 7,25 ppm (H-17, t, $J = 7,22\text{Hz}$), RMN de ^{13}C a 100MHz, MeOH-*d*₄, δ 136,23 ppm (C-2), δ 115 ppm (C-4), δ 145,2 ppm (C-5), δ 31,69 ppm (C-6), δ 36,03 ppm (C-7), δ 73,93 ppm (C-8), δ 180,14 ppm (C-10), δ 54,42 ppm (C-11), δ 72,74 ppm (C-12), δ 143,75 ppm (C-14), δ 126,62 ppm (C-15), δ 129,43 ppm (C-16), δ 126,31 ppm (C-17).

4.10.2 Identificação do metabólito bergapteno, G09

5 mg, sólido branco cristalino, com ponto de fusão: 161,4-162,3 °C (Lit. 188-189°C) (NAWAL & MAHROUS, 2009), m/z: 216,0482, isolado da fração etérea ácida (Dicloro/metanol 1%), RMN de ^1H a 400,13MHz, CDCl_3 , δ 6,28 ppm (1H, d, $J= 10\text{Hz}$, H-3), δ 8,16 ppm (1H, d, $J= 9,6\text{Hz}$, H-4), δ 7,14 ppm (1H, s, H-8), δ 7,59 ppm (1H, d, $J= 2,4\text{Hz}$, H-10), δ 7,01 ppm (1H, d, $J= 1,6\text{Hz}$, H-11), δ 4,26 ppm (3H, s, H-12); RMN de ^{13}C a

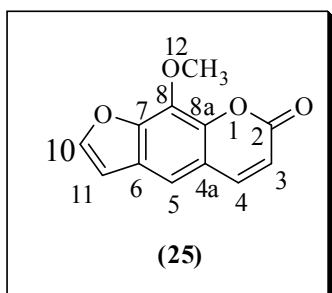


100,62MHz, CDCl_3 , δ 160,83 ppm (C-2), δ 112,33 ppm (C-3), δ 138,66 ppm (C-4), δ 106,20 ppm (C-4a), δ 149,30 ppm (C-5), δ 112,48 ppm (C-6), δ 158,10 ppm (C-7), δ 93,61 ppm

(C-8), δ 152,46 ppm (C-8a), δ 144,47 ppm (C-10), δ 104,66 ppm (C-11), δ 59,91 ppm (C-12).

4.10.3 Identificação do metabólito xantotoxina, G05

36 mg, sólido branco cristalino, com ponto de fusão: 145,4-147,1°C (Lit. 145-146°C) (NAWAL & MAHROUS, 2009), m/z: 216,0521, isolado da fração etérea ácida (dicloro/metanol 5%) e dicloro básica (dicloro/metanol 1%),



RMN de ^1H a 400,13 MHz, CDCl_3 , δ 6,36 ppm (1H, d, $J= 9,6\text{Hz}$, H-3), δ 7,75 ppm (1H, d, $J= 9,6\text{Hz}$, H-4), δ 7,33 ppm (1H, s, H-5), δ 7,67 ppm (1H, d, $J= 2,4\text{Hz}$, H-10), δ 6,80 ppm (1H, d, $J= 2,0\text{Hz}$, H-11), δ 4,20 ppm (3H, s, H-12); RMN de ^{13}C a

100,62MHz, CDCl_3 , δ 159,65 ppm (C-2), δ 114,10 ppm (C-3), δ 143,53 ppm (C-4), δ 115,86 ppm (C-4a), δ 112,19 ppm (C-5), δ 125,43 ppm (C-6), δ 147,09 ppm (C-7), δ 132,19 ppm (C-8), δ 142,41 ppm (C-8a), δ 145,92 ppm (C-10), δ 106,61 ppm (C-11), δ 60,61 ppm (C-12).

4.11 Óleo Volátil

4.11.1. Extração de óleos voláteis

Os óleos voláteis foram extraídos utilizando um aparelho de Clevenger modificado. As folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius* foram coletados nas quatro estações: verão (500 g), outono (502 g), primavera (550 g) e inverno (900 g). As folhas foram trituradas em um liquidificador industrial e colocadas em um balão de 5L com água para realizar a extração, num período de 6 horas. Após a extração o óleo e a água foram separados com éter etílico. A fase orgânica secou-se com sulfato de sódio e o solvente evaporado com gás nitrogênio (N₂). Os óleos foram injetados em CG/EM para a identificação dos constituintes e após armazenados em um refrigerador afim de evitar uma possível degradação do óleo.

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

$$IK = 100n + \Delta n \cdot (R_i - R_n) / (R_m - R_n)$$

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 antes da amostra

Os índices de retenção de Kovats dos constituintes dos óleos foram comparados com padrões de igual índice de retenção relatados na literatura (ADAMS, 1995).

4.12 Atividades Farmacológicas

4.12.1 Determinação da Atividade Antioxidante

Com o intuito de avaliar a capacidade antioxidante de frações, extratos e metabólitos isolados foi realizado o teste quantitativo. Realizou-se a leitura medida da absorbância das amostras, frente uma amostra Branco e um padrão (BHT) em espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices Corp.) em um determinado comprimento de onda de 517 nm. Utilizando o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) como radical livre.

4.12.1.1 Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo

Para a avaliação da capacidade antioxidante, as amostras testadas e o padrão BHT (di-terc-butil-fenol) foram preparados em concentrações de 1000 μ g/mL. Após, 200 μ L de cada amostra é transferida para a primeira linha da placa (96 poços) nos seis primeiros poços correspondente a amostra (triplicata), a seguir adiciona-se 100 μ L de metanol a partir da segunda linha da placa procedendo-se as diluições em série até se obter concentrações de 500 a 7,81 μ g/mL. A cada diluição são acrescentados nas colunas pares 100 μ L de solução de DPPH 0,004% e nas colunas ímpares 100 μ L.

As amostras permanecem à temperatura ambiente por 30 minutos sob proteção da luz. Após os 30 minutos as amostras ativas descolorem a solução passando de roxa para amarelada, resultando em uma atividade antioxidante positiva. A estrutura do DPPH e sua redução por um agente antioxidante é ilustrada na figura 4 a seguir.

Após esse tempo faz-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda 517 nm para medir a redução do radical livre, comparando com um branco específico para cada amostra, com as suas respectivas diluições. Como controle utilizou-se uma amostra de concentração de 200 μ L (100 solução metanólica 0,004% de DPPH + 100 MeOH), representando o 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] x 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 IC_{50} , sendo a concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH.

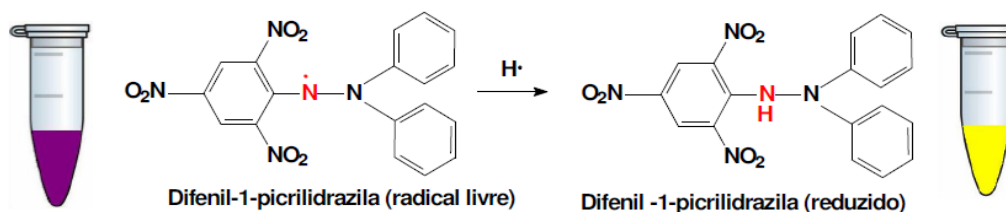


Figura 4: Redução do DPPH via Radical Livre

4.13 Ensaios Biológicos

4.13.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Os métodos utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e as concentrações letais mínimas (CLM) foram de microdiluição em caldo padronizados (M7-A6) e (M27-A2) pelo CLSI (NCCLS, 2006; NCCLS, 2002).

Os microorganismos que foram empregados para a realização da atividade antimicrobiana são cepas referência da American Type Collection (ATCC), constituídos de microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (Tabela 7).

Tabela 7: Microorganismos indicadores

Características	Microorganismo	ATCC
Gram – positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Enterococcus sp.</i>	6589
	<i>Bacillus cereus</i>	33019
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
Gram – negativas	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
	<i>Burkholderia cepacia</i>	17759
	<i>Morganella morganii</i>	25829
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1304
	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
Fungos	<i>Shigella Sonnei</i>	25931
	<i>Cândida albicans</i>	10231
	<i>Cândida tropicalis</i>	18803
	<i>Cândida krusei</i>	6258
	<i>Cândida parapslosis</i>	22018
	<i>Cryptococcus neofarmans</i>	28952
	<i>Cryptococcus Gatti</i>	2601
<i>Sacharomyces cervisiae</i>	2601	

4.13.2 Padrões utilizados nos Ensaio Microbiológicos

Os padrões utilizados forma preparados conforme FDA, sendo Levofloxacina para bactérias e Nistatina para fungos (FDA, 1991).

4.13.3 Meios de culturas empregados

Os meios foram preparados conforme instruções do fabricante e, esterilizados em autoclave a 121°C, 1atm, durante 20 minutos. As cepas dos microorganismos indicadores foram armazenados em geladeira, sendo utilizado meio Ágar Müller-Hinton para bactérias e meio Ágar Sabouraud para fungos para fazer o meio inclinado.

Tabela 8: Meios de cultura

Meio de cultura	Composição	Quantidade (g)
Repique de bactérias		
Meio Ágar nutriente	Cloreto de sódio	8,0
	Extrato de carne	3,0
	Peptona de gelatina	5,0
	Ágar bacteriológico	15,0
Repique de fungos		
Meio Ágar saboraud dextrosado	Dextrose	40,0
	Peptona de carne	5,0
	Peptona de caseína	5,0
	Ágar	15,0
Cultivo de bactérias		
Meio caldo de caseína de soja	Dextrose	2,5
	Cloreto de sódio	5,0
	Fosfato dibásico de potássio	2,5
	Peptona de caseína	17,0
	Peptona de soja	3,0
Cultivo de fungos		
Meio caldo sabouraud dextrosado	Peptona de caseína	40,0
	Peptona de carne	5,0
	Dextrose	5,0

4.13.4 Preparação dos inóculos e Determinação da CIM pelo método de microdiluição

Com o auxílio de uma alça de platina transferiu-se culturas dos microorganismos indicadores para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,8%. Os inóculos foram padronizados comparando com o tubo padrão 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL).

As amostras a serem testadas foram diluídas em meio líquido (Metanol, DMSO – 2,5mg/mL) com 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 (1×10^6 células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias e 48h a 27°C para fungos. Após a incubação, o crescimento microbiano foi visualizado pela turvação, podendo ser determinado o CIM, que é a menor concentração da substância que tem capacidade de inibir o crescimento de um microorganismo em específico.

A leitura foi realizada mediante comparação visual com o controle de crescimento positivo, determinando-se como CIM a menor concentração da(s) substância(s) testada(s) onde não foi visualizado crescimento do microrganismo e também pela medida da Densidade Ótica em um aparelho espectrofotômetro (Molecular Devices modelo SpectraMax M2). A microplaca de 96 poços foi colocada num Spectra Max M2 espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices Corp) programado para realizar as medições a 23°C. As densidades óticas das culturas celulares foram lidas utilizando com um comprimento de onda de 620 nm a cada 15 min, e agitação (30 s) entre cada uma das medições de leitura (LEHTTINEN et al., 2006).

4.13.5 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)

Nos poços que não apresentaram crescimento de microorganismos, fizeram-se repiques das diluições para placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton para bactérias e Sabourand para fungos. Após o período de incubação, foi possível determinar a menor concentração capaz de causar a morte dos microrganismos, determinando assim a CLM, nos testes com bactérias e fungos. Todos os testes foram realizados em duplicata, realizando-se a análise dos padrões simultaneamente.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Rendimento dos Extratos e Frações

Após coleta, secagem e moagem das folhas da espécie estudada, obteve-se 4kg de planta moída, resultantes de duas coletas realizadas em diferentes estações do ano, inverno e verão. Fez-se dois métodos de extração do material vegetal, um fracionamento ácido-base (1) e outro denominado alcaloides totais (2).

No fracionamento 1, conforme descrito anteriormente (pag.26) obteve-se 350 g do extrato bruto metanólico (EBM). A partir deste extrato partiu-se para uma extração ácido/base obtendo-se as frações: cicloexanica ácida (Fcex), etérea ácida (FEA), etérea básica (FEB) e acetato básica (FAB).

No fracionamento 2, obteve-se 300g de extrato bruto metanólico (EBM), e a partir de uma extração obteve-se as seguintes frações: fração cicloexanica básica (FCexB), Fração dicloro básica (FDicLB), fração etérea básica (FEB), fração dicloro alcaloides totais (FDcilAT) e fração básica resíduo (FBR).

Os rendimentos em relação a planta moída e o extrato bruto estão descritos na tabelas abaixo.

Tabela 9: Rendimento das frações resultantes do fracionamento 1

Frações	Quantidade Obtida (g)	Folhas Secas (%)	Extrato Bruto (%)
Cicloexanica Ácida	2,8	0,14	0,8
Etérea Ácida	2,5	0,12	0,71
Etérea Básica	0,2	0,01	0,05
Acetato Básica	4,12	0,21	1,17

Tabela 10: Rendimento das Frações resultantes do fracionamento 2

Frações	Quantidade Obtida (g)	Folhas Secas (%)	Extrato Bruto (%)
Cicloexanica Básica	36	1,85	12
Dicloro Básica	2	0,10	0,66
Etérea Básica	1	0,05	0,33
Dicloro Alcaloides Totais	1	0,05	0,33
Resíduo Básica	1,4	0,71	0,46

5.2 Metabólitos isolados de *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

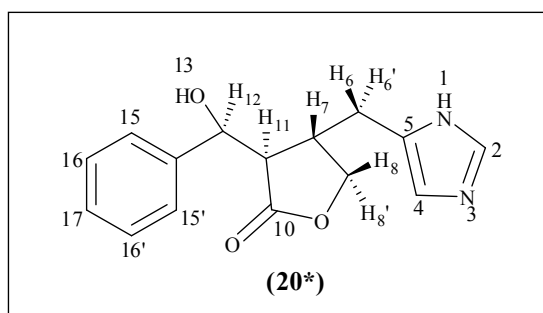
5.2.1 Metabólitos isolados da Fração Acetato Básica

5.2.1.1 Alcaloide imidazólico G01

Este composto foi obtido sob a forma de cristais amarelados, resultante de um fracionamento da fração VI proveniente da fração acetato básica, utilizando uma mistura de solventes clorofórmio/metanol 15%. O composto apresentou ponto de fusão: 194,5 a 196,3 °C e rendimento de 6mg (0,001%) em relação à 350g de extrato bruto.

A estrutura do composto foi determinada com base em análises de RMN uni e bidimensionais e espectrometria de massas, onde seu EMAR exibe [M+ H, m/z 273,1252] que em combinação com dados de RMN sugere uma fórmula molecular C₁₅H₁₆N₂O₃.

Até então, se tem relatos do composto **20*** apenas por identificação através de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas seqüencial com ionização por eletrospray (SAWAYA et al., 2011).



Estrutura proposta para G01, 3-(hidroxi-fenil-metil)-4-(3H-imidazol-4-metil-il)-diidrofuran-2-one. (*a numeração acima foi utilizada apenas para a atribuição dos sinais).

Através do espectro de RMN de ¹H (Figura 5) e Dept 135 (Figura 10) observam-se os sinais característicos de hidrogênios aromáticos, correspondendo a um anel monosubstituído. Assim pelo sinal em δ 7,37 ppm na forma de um duplete com constante de acoplamento de 7,28Hz e integração para dois hidrogênios, correspondendo aos H-15 e H-15', bem como pela presença dos sinais em δ 7,32 ppm e δ 7,25 ppm em forma de dupletos duplos referentes aos hidrogênios H-16, H-16'(dd, $J= 7,46$ Hz e $J= 7,85$ Hz, 2H) e H-17 (dd, $J= 7,29$ Hz e $J= 7,22$ Hz, 2H) respectivamente (Figura 5).

Ainda na região de aromáticos tem-se um simpleto em δ 7,40 ppm referente ao H-2 do imidazol.

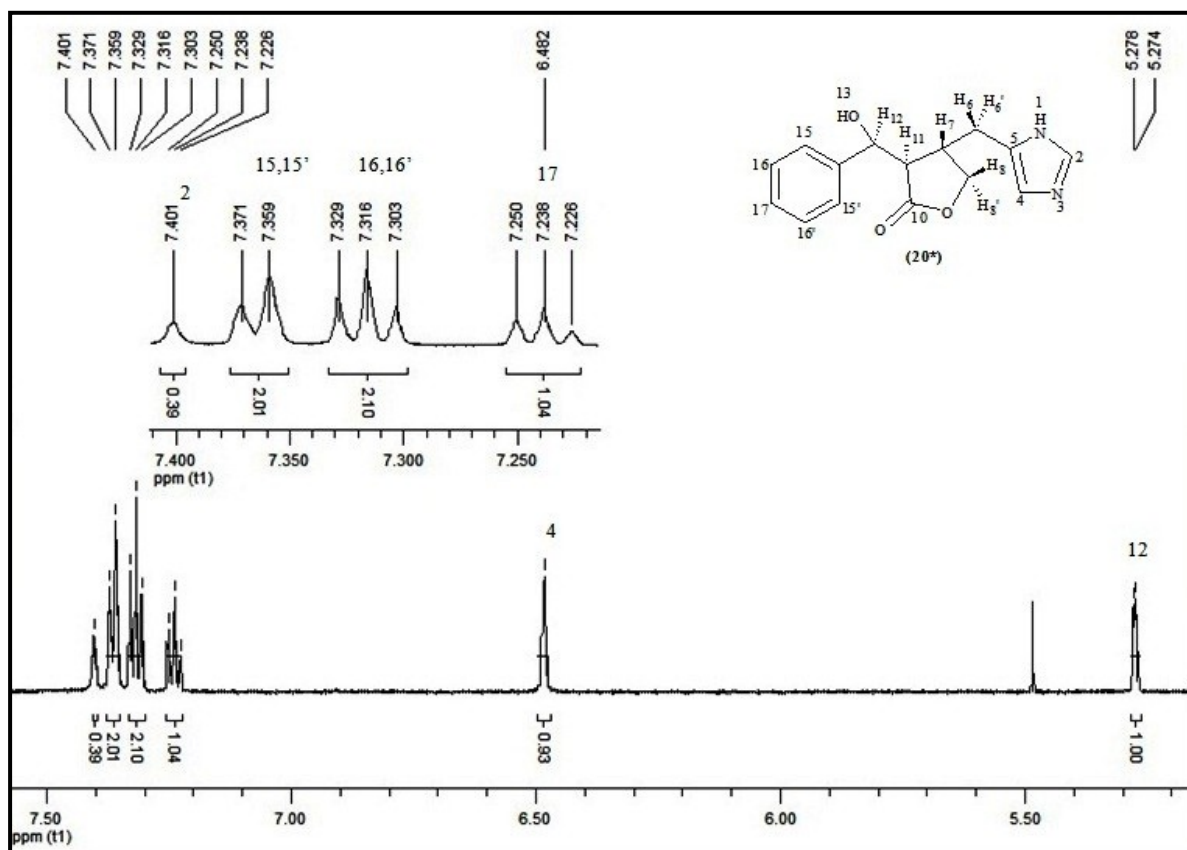


Figura 5: Espectro expandido de RMN de ^1H , região de δ 7,50 a 5,20 ppm, do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$ a 600 MHz

O sinal do hidrogênio H-4 referente ao anel imidazol encontra-se na forma de um simpleto em δ 6,48 ppm (Figura 5). O sinal em δ 5,27 ppm com $J = 2,72$ Hz referente ao hidrogênio H-12 na forma de um duplete devido ao acoplamento com o hidrogênio ligado ao C-11 (Figura 5). Já em campo mais alto temos os hidrogênios diastereotópicos H-8 e H-8' que encontram-se em δ 4,37 ppm (dd, $J = 8,09$ Hz, $J = 8,63$ Hz) e δ 4,02 ppm (dd, $J = 5,48$ Hz, $J = 8,63$ Hz) respectivamente. O hidrogênio H-8 na forma de duplete duplo devido ao acoplamento com os H-8' e H-7. O sinal referente a H-8' esta na forma de um duplete duplo devido ao acoplamento com o H-8 ($J = 8,71$ Hz) e H-7 ($J = 5,48$ Hz) (Figura 6).

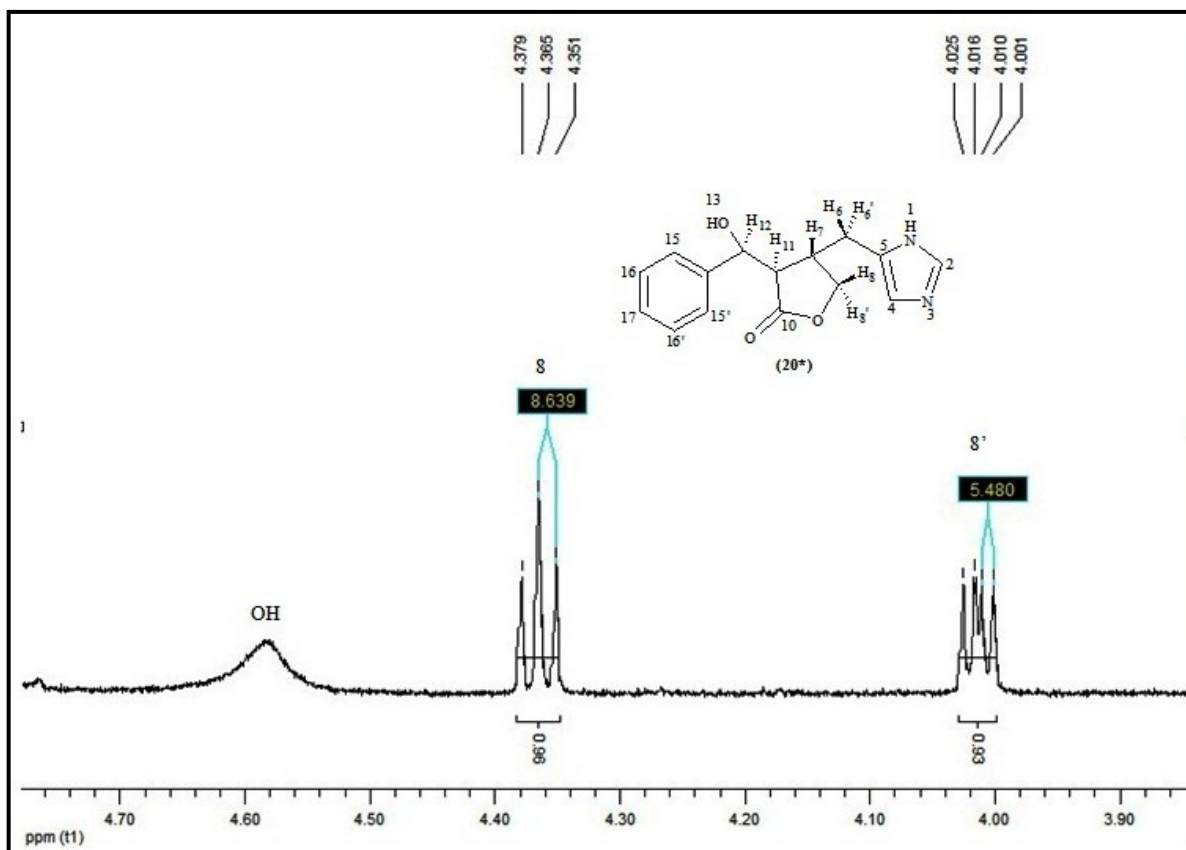


Figura 6: Expansão, região de δ 5,0 a 3,70 ppm, do espectro de RMN de ^1H do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$.

O sinal referente ao H-7 em δ 2,92 ppm (m, H-7), aparece como um multiplete devido ao acoplamento com os hidrogênios diastereotópicos H-6 e H-6', H-8 e H-8' e com o H-11. Os hidrogênios diastereotópicos H-6 e H-6' aparecem em δ 2,39 ppm (dd) e δ 2,26 ppm (dd), respectivamente. Os H-6 e H-6' acoplam entre si com $J=14,6\text{Hz}$. Em relação ao H-7, o acoplamento com o H-6 apresenta um $J= 8,2\text{Hz}$ (H-6) e com o H-6' um $J= 6,8\text{Hz}$, propondo que o H-7 está *syn* em relação ao H-6 (Figura 7).

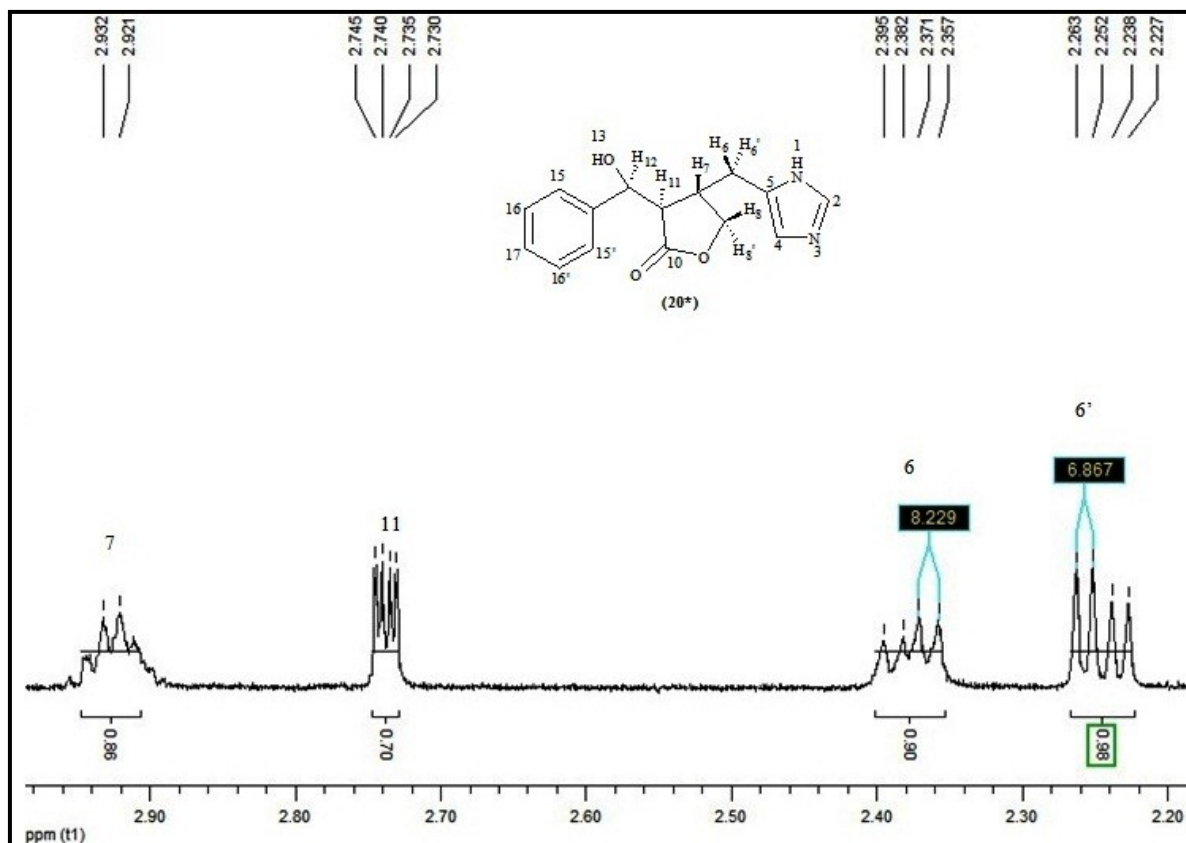


Figura 7: Espectro expandido, região de 3,30 a 2,20 ppm, de RMN de ^1H do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$.

Todas estas atribuições foram confirmadas nos espectros de RMN 2D pelas correlações $^1\text{H-}^1\text{H}$ apresentadas COSY-45 e $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ no espectro de HSQC e HMBC que serão discutidos posteriormente.

Apesar da dificuldade da análise do espectro de NOESY, a estrutura do metabólito (G01) foi proposta com base nas correlações visualizadas nesse experimento e valores de constante de acoplamento.

A partir dos dados do espectro de NOESY propõe-se que o H-8 está em uma relação *syn* ao H-7, pois apresenta uma correlação espacial neste espectro de intensidade bem mais acentuada que a existente entre o H-8' e H-7, este fato também é comprovado pelo valor da constante de acoplamento de 8,63Hz no espectro de RMN ^1H . Sendo assim, o H-8' está em uma relação *anti* ao H-7, conforme pode-se visualizar na figura (8), e o fato de apresentarem um sinal de correlação neste experimento provavelmente se deva ao fato destes dois átomos estarem afastados a uma distância inferior a 5 Angstroms.

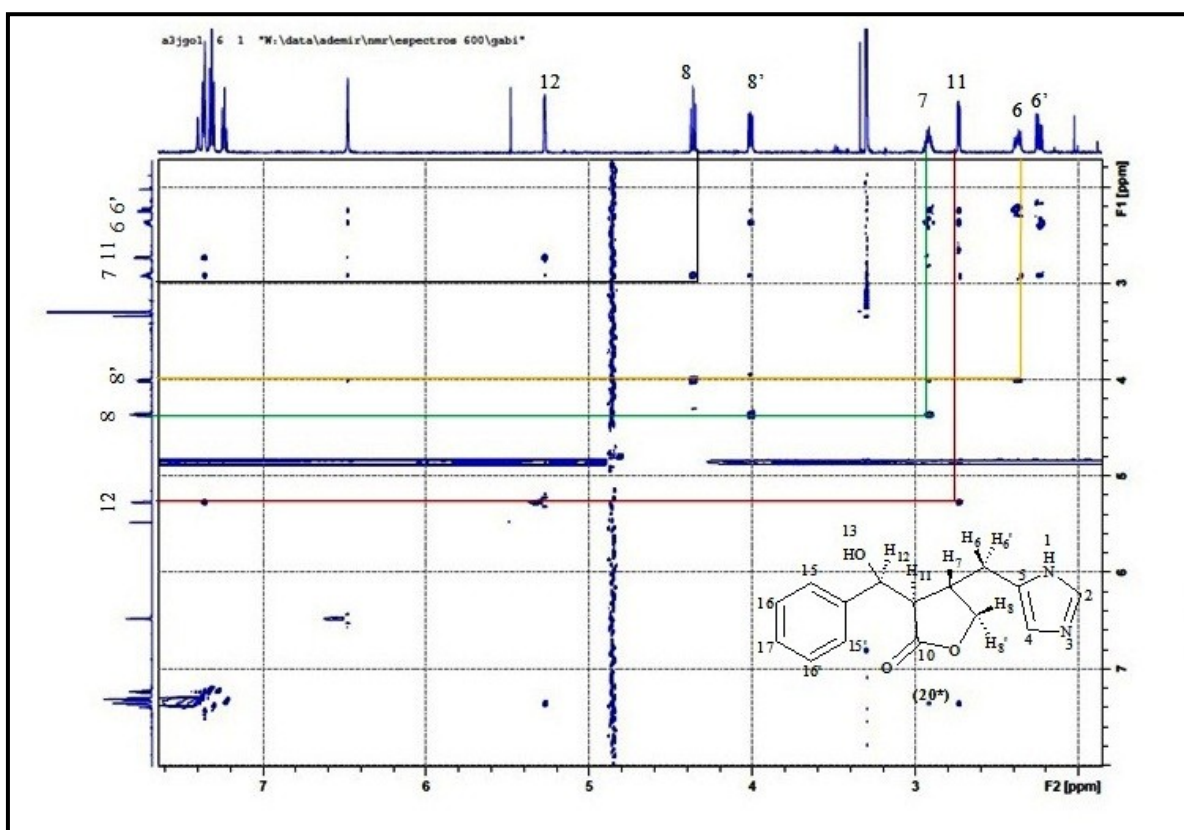


Figura 8: Espectro de NOESY, região de δ 7,5 a 2 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 600 MHz.

Na região de δ 2,74 ppm um duplete duplo (dd) correlaciona ao H-11, pois este acopla com o H-7 a uma constante de $J= 2,73\text{Hz}$, propondo que estes hidrogênios estão em uma relação *anti*. Enquanto que o hidrogênio H-12 que possui uma constante de acoplamento $J= 5,91\text{Hz}$, e apresenta uma relação *syn* com o H-11, o que pode ser visualizado no espectro de NOESY pela presença do sinal de correlação espacial mais intenso com o H-12 do que com H-7 conferindo a proximidade destes átomos de hidrogênio.

Ainda pelo espectro de NOESY observa-se que o H-6 acopla a longa distância com o H-8'. A estereoquímica relativa do metabólito G01 não pode ser confirmada através do espectro de NOESY, sendo assim, foi proposta apenas a correlação espacial dos hidrogênios.

Através do espectro de ^{13}C (Figura 9) confirma-se a presença de 13 carbonos, sendo nove carbonos metínicos, dois carbonos metilênicos, uma carbonila e um carbono quaternário. Porém, dois carbonos referentes ao núcleo imidazol, C-4 e C-5, não se observa. Entretanto no espectro de 2D de HSQC, pode-se visualizar a presença do acoplamento do H-4 com seu respectivo carbono C-4. O C-5 deveria aparecer em torno de δ 145,2 ppm.

Em δ 180,74 ppm observa-se a carbonila C-10 pertencente ao anel lactônico. Na região de aromáticos o C-2 pertencente ao núcleo imidazol é observado em δ 136,23 ppm. Os C-16 e C-15 aparecem em δ 129,43 ppm e δ 126,62 ppm e o C-17 em δ 126,31 ppm.

Os sinais em δ 72,74 ppm e δ 73,93 ppm são sugestivos para os C-12 ligado ao grupamento hidroxila e C-8 metilênico vizinho a um oxigênio do anel lactônico.

O sinal com deslocamento químico de δ 54,42 ppm atribui o C-11 ligado ao C-12 hidroxilado. Os sinais em δ 36,03 ppm e δ 31,69 ppm são atribuídos aos C-7 e C-6.

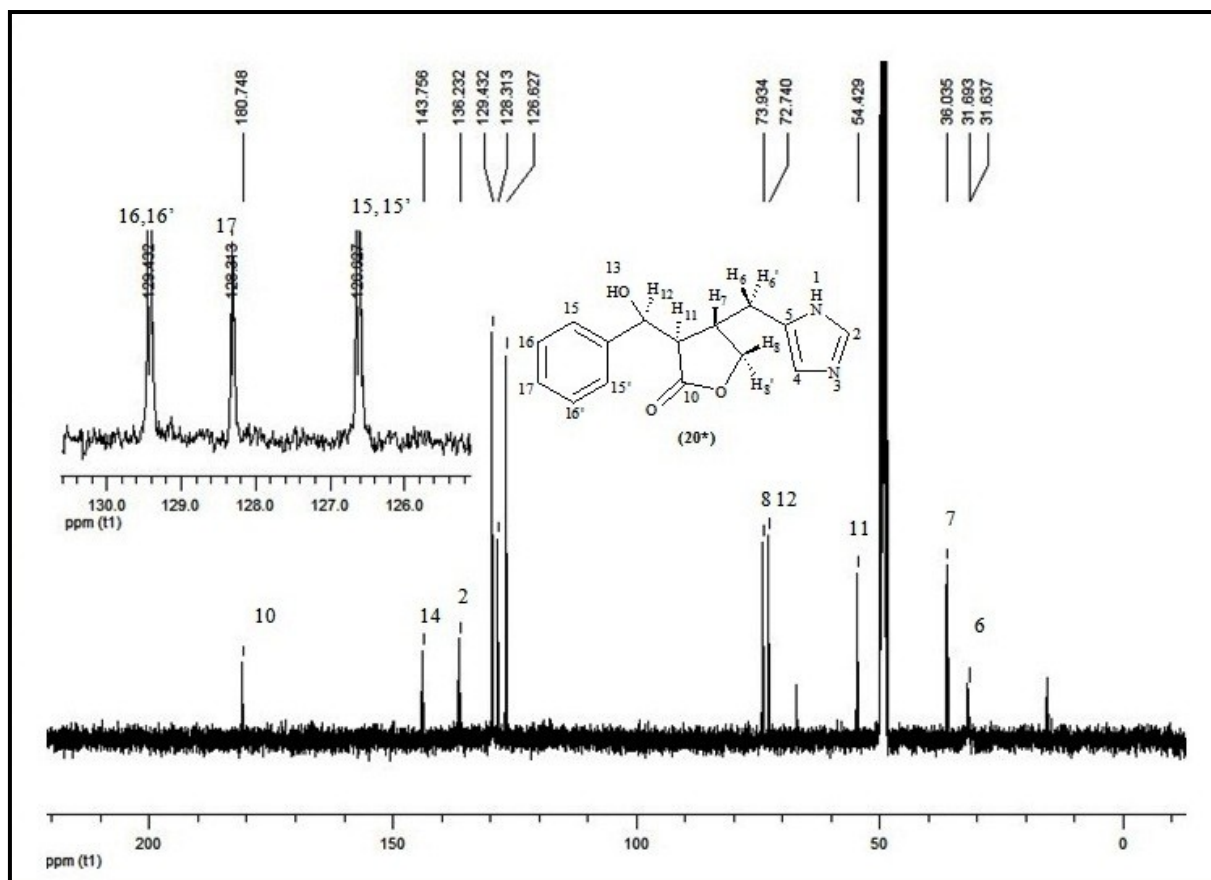


Figura 9: Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$ a 100 MHz.

O espectro de Dept 135 (Figura 10) possibilitou a atribuição dos sinais dos respectivos carbonos, onde confirma-se a presença de nove carbonos hidrogenados, sendo nove carbonos metínicos com amplitude positiva e um dos carbonos metilênicos com amplitude negativa, onde C-6 não apresentou um sinal intenso. Foi possível evidenciar a presença do carbono C-14 em δ 143,75 ppm não hidrogenado, já que este não se observa no Dept 135.

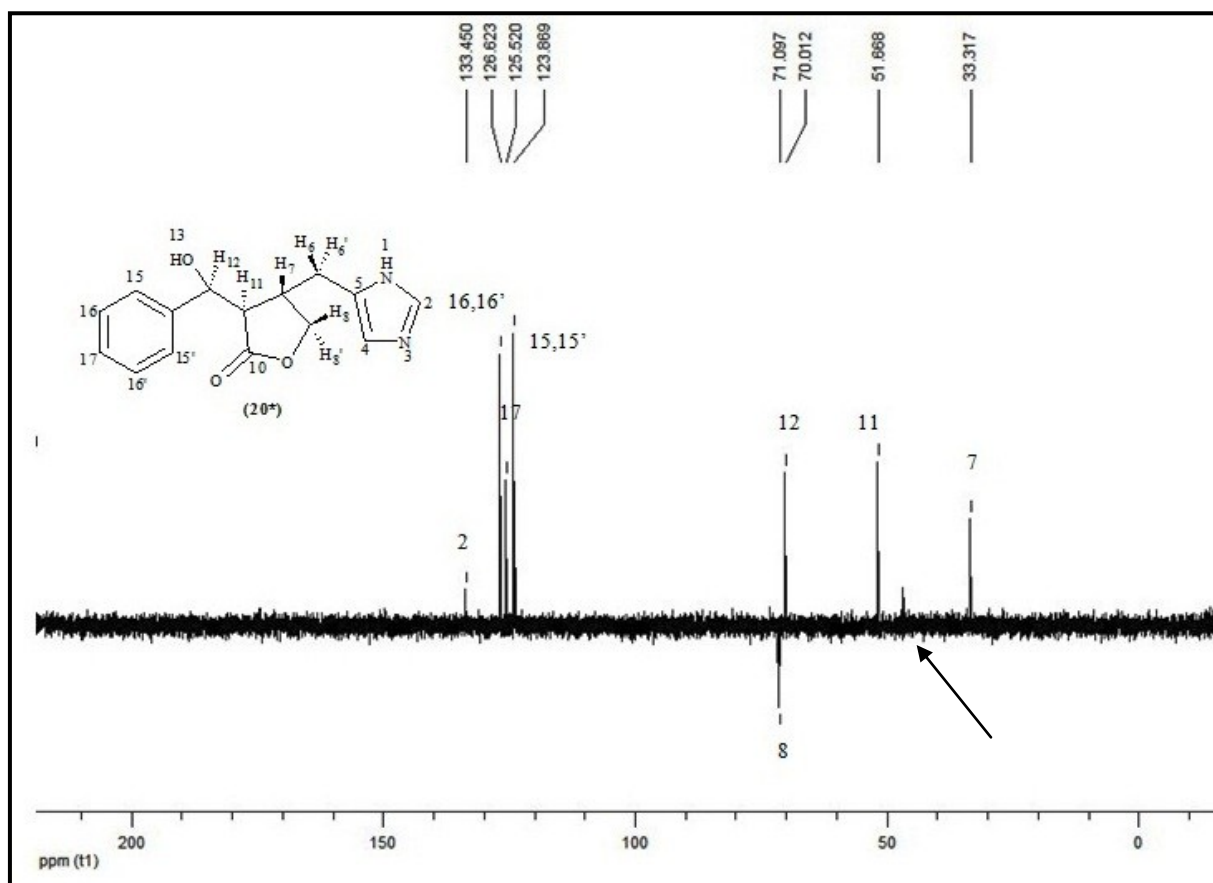


Figura 10: Espectro de Dept 135 do metabólito G01 em MeOH-*d*₄ em 100MHz

O experimento de RMN 2D de HSQC (Figura 11) mostra a correlação direta dos carbonos com seus respectivos hidrogênios. Desta forma torna-se possível a identificação dos carbonos aromáticos referente ao anel aromático e ao imidazol. O sinal de H-2 tem correlação com o C-2 (δ 136,23 ppm), o H-17 tem correlação com o C-17 que está em δ 126,31 ppm. Os H-15, 15' apresentam correlação com C-15 em δ 126,62 ppm. E o H-16,16' apresenta correlação com os C-16 em δ 129,43 ppm, confirmando a atribuição do espectro de ^{13}C .

É possível visualizar também o acoplamento do H-4 com o seu respectivo C-4 (δ 115 ppm), carbono que encontra-se oculto no espectro de RMN de ^{13}C .

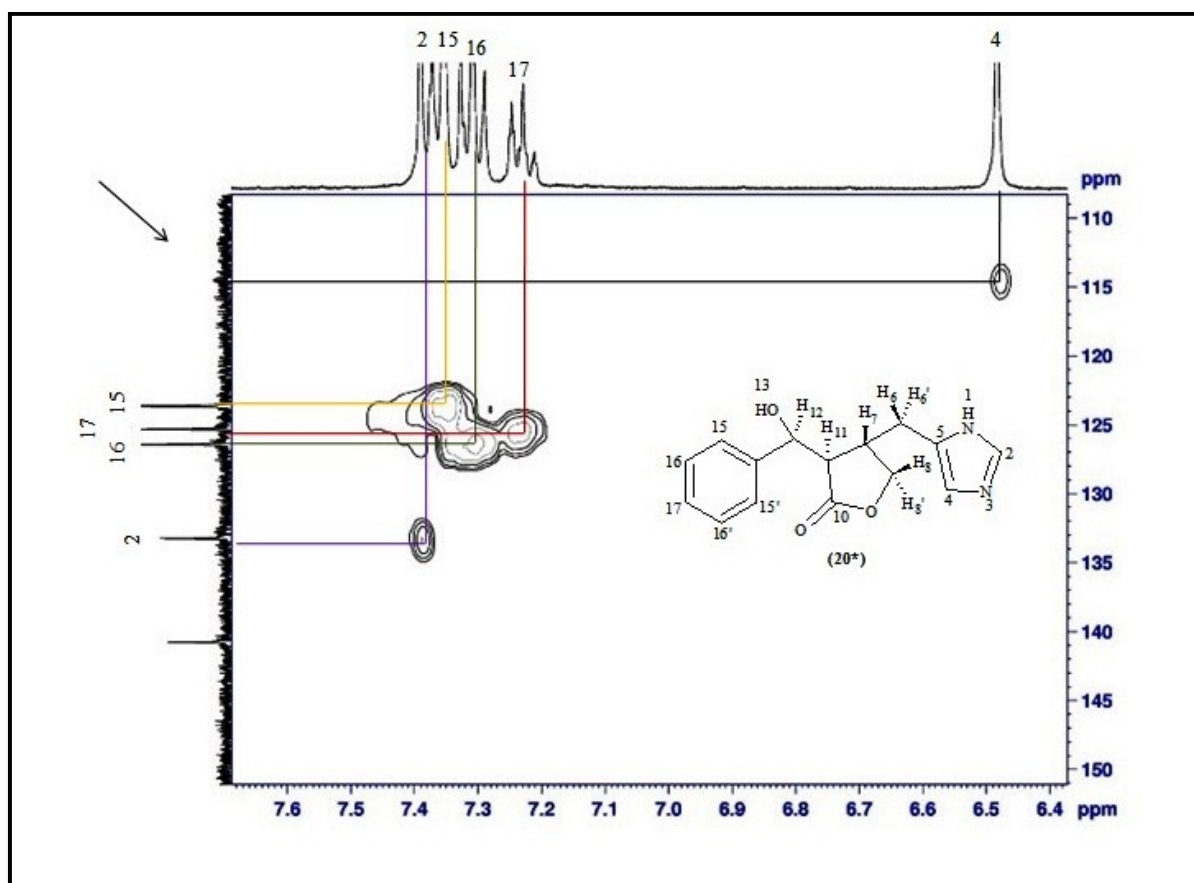


Figura 11: Espectro expandido 2D HSQC, região entre δ 7,7 a 6,4 ppm e δ 150 a 110 ppm, do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$ a 100MHz

Ainda no espectro 2D de HSQC (Figura 12) é possível fazer a correlação dos outros carbonos com seus respectivos hidrogênios. O H-12 atribui o C-12 em δ 72,74 ppm, os H-8 e H-8' diasterotópicos atribuem o C-8 em δ 73,93 ppm, o H-7 ao carbono metínico C-7 em δ 36,03 ppm, o H-11 atribui ao C-11 em δ 54,42 ppm. E os H-6, 6' diasterotópicos atribuem ao carbono metilênico C-6 em δ 31,69 ppm.

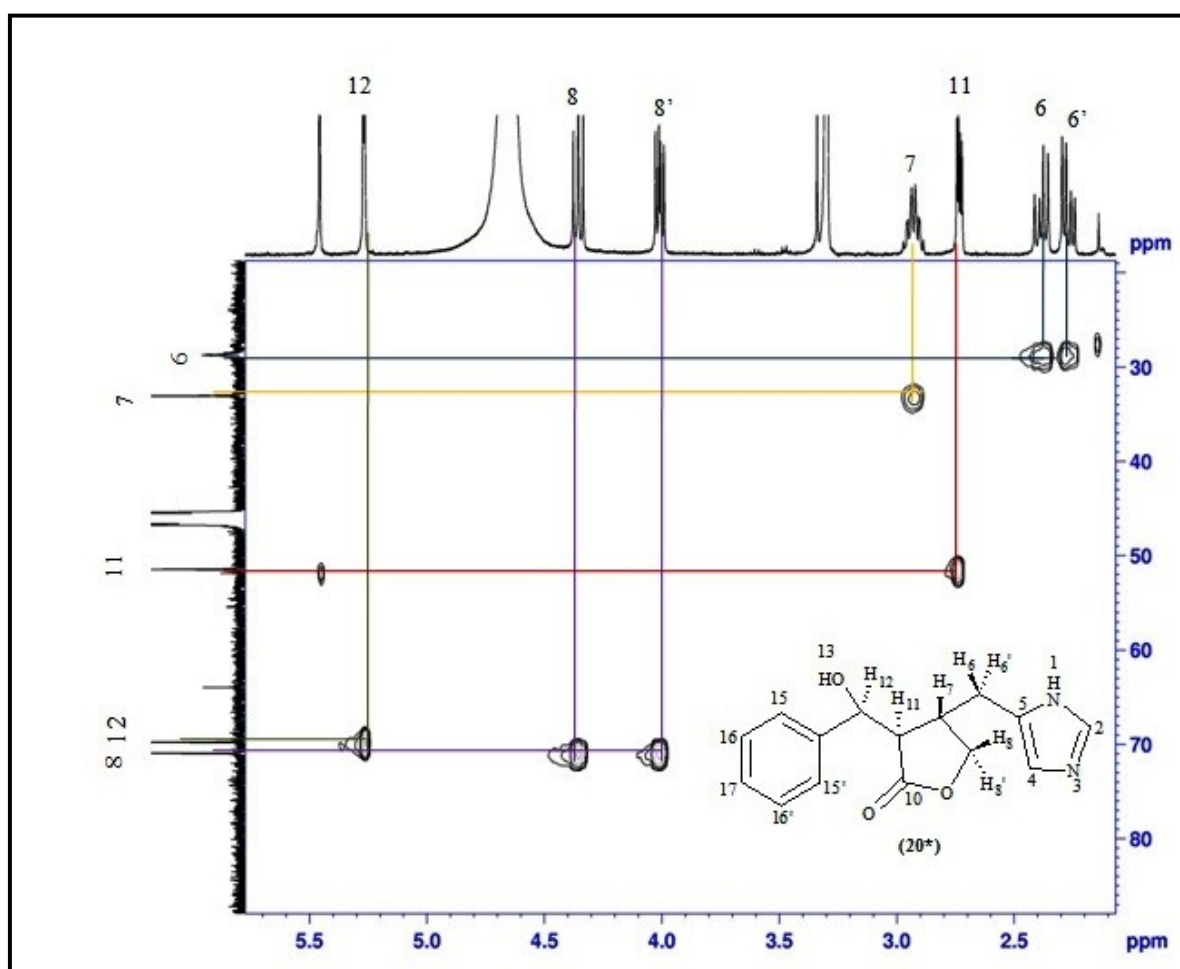


Figura 12: Espectro expandido 2D de HSQC, região entre δ 5,7 a 2,0 ppm e δ 20 a 90 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100 MHz

No espectro de 2D COSY (Figura 13), é possível verificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos em um mesmo sistema de spins. Destaca-se para o acoplamento dos H-8 e H-8' diastereotópicos com o H-7 e os H-6 e H-6' também diastereotópicos acoplando com o H-7. O sistema de spins do anel aromático pode ser visualizado, pelo acoplamento dos H-15 e H-15' e H-16 e H-16' e do H-17 com os H-16 e H-16'.

Ainda pelo espectro de HSQC pode-se observar o acoplamento do H-4 e dos hidrogênios pertencentes ao anel aromático H-15, H-16 e H-17 (Figura 14).

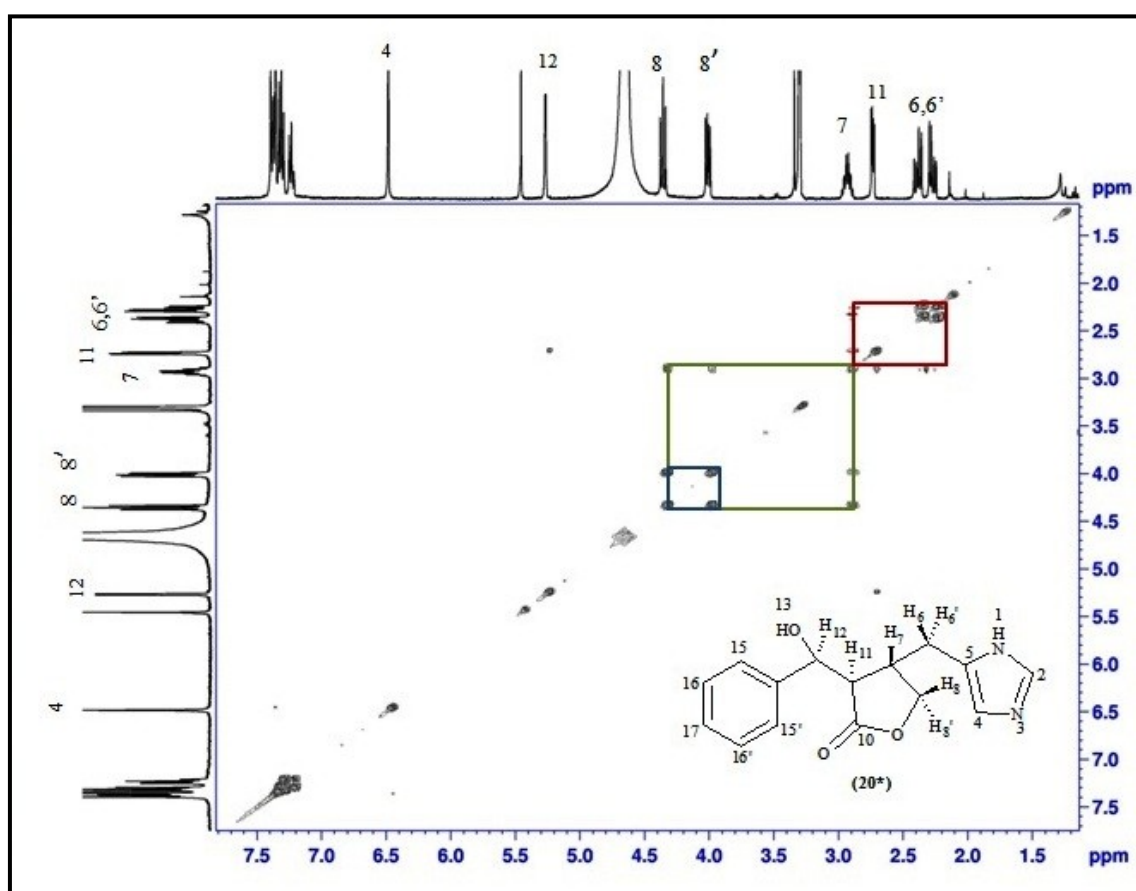


Figura 13: Espectro expandido 2D COSY, região entre δ 7,8 a 1,0 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz

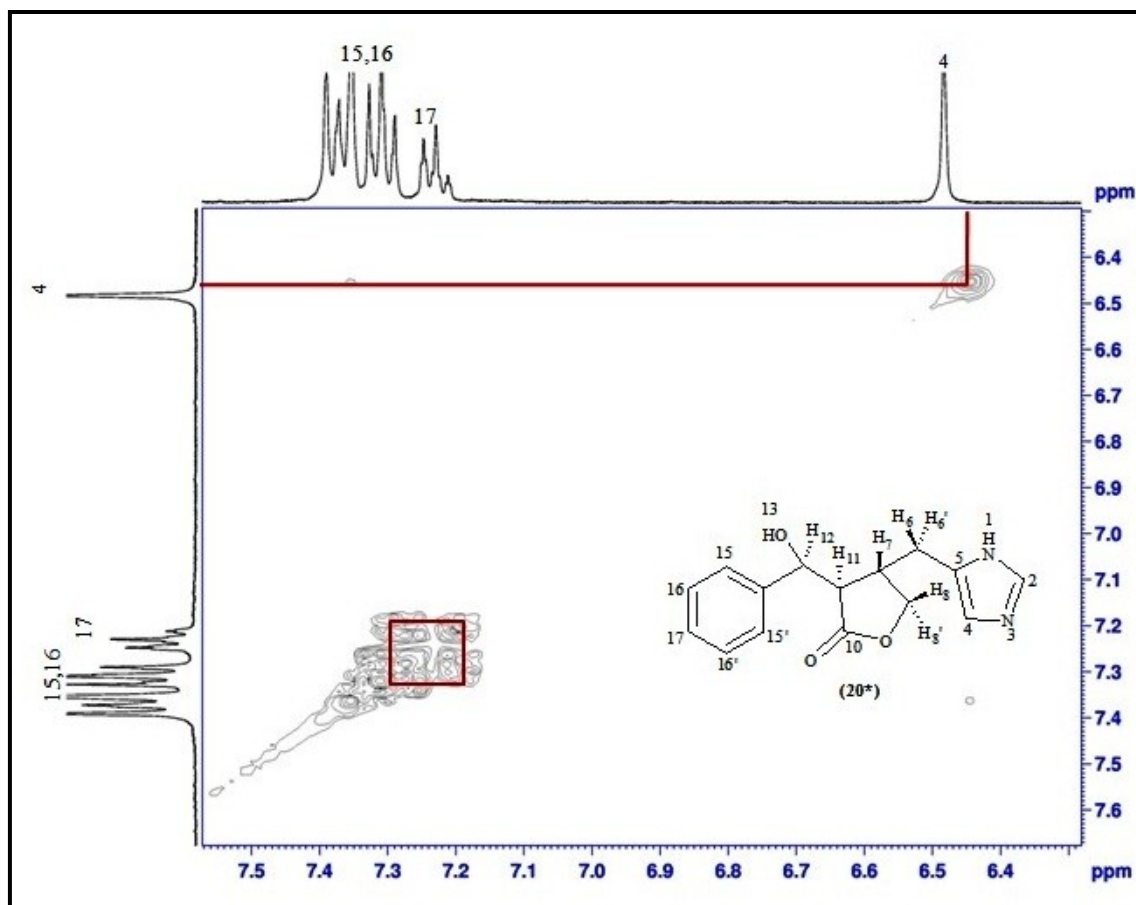


Figura 14: Expansão do espectro 2D COSY, região entre δ 7,6 a 6,3 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 400MHz

Através de experimento de 2D HMBC (Figura 15) foi possível identificar o acoplamento dos carbonos com os hidrogênios vizinhos a duas ou três ligações.

Na região de aromáticos observa-se o acoplamento do H-15 com os C-12 e C-17. O acoplamento do H-16 com os C-14 e C-15 também pode ser observado, assim como a correlação do H-17 com o C-15 (Figura 15).

Os hidrogênios diastereotópicos ligados ao C-6 correlacionam-se com os C-7, C-11 e C-8 (Figura 18). Os outros hidrogênios diastereotópicos H-8 e H-8' correlacionam-se C-6 e C-10 e o H-8' apresenta correlação também com o C-7 (Figura 17).

Ainda no espectro de 2D HMBC é possível visualizar a correlação do H-11 com os C-10, C-6 e C-8 (Figura 18) e a correlação entre o H-12 com os C-10, C-14, C-15, C-7 e C-11 (Figura 16).

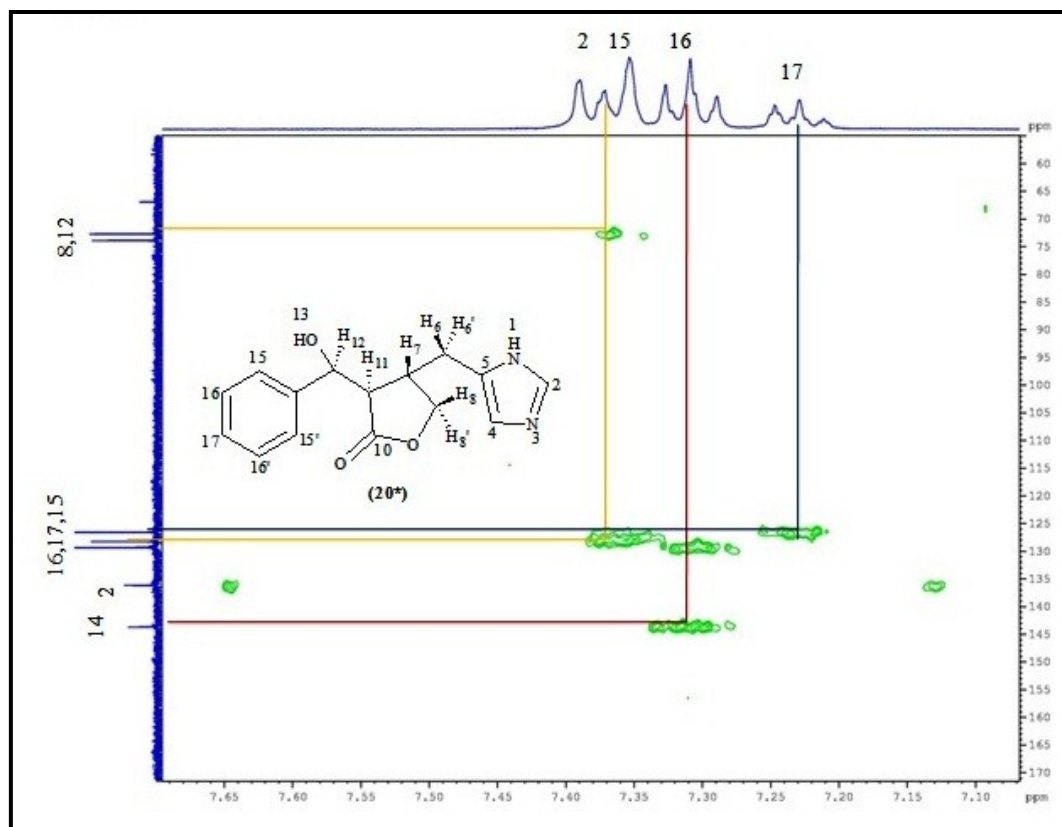


Figura 15: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 7,70 a 7,05 ppm e δ 35 a 170 ppm, do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$ a 100MHz

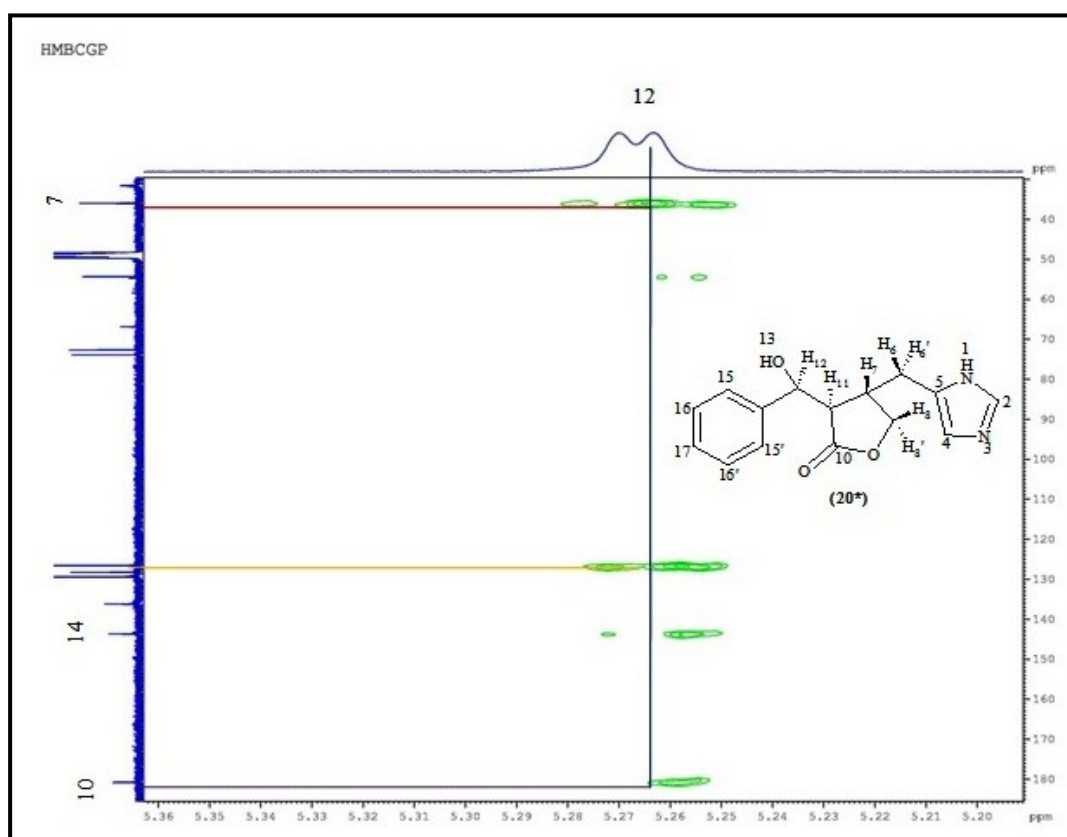


Figura 16: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 5,36 a 3,19 ppm e δ 30 a 180 ppm, do metabólito G01 em $\text{MeOH-}d_4$ a 100MHz

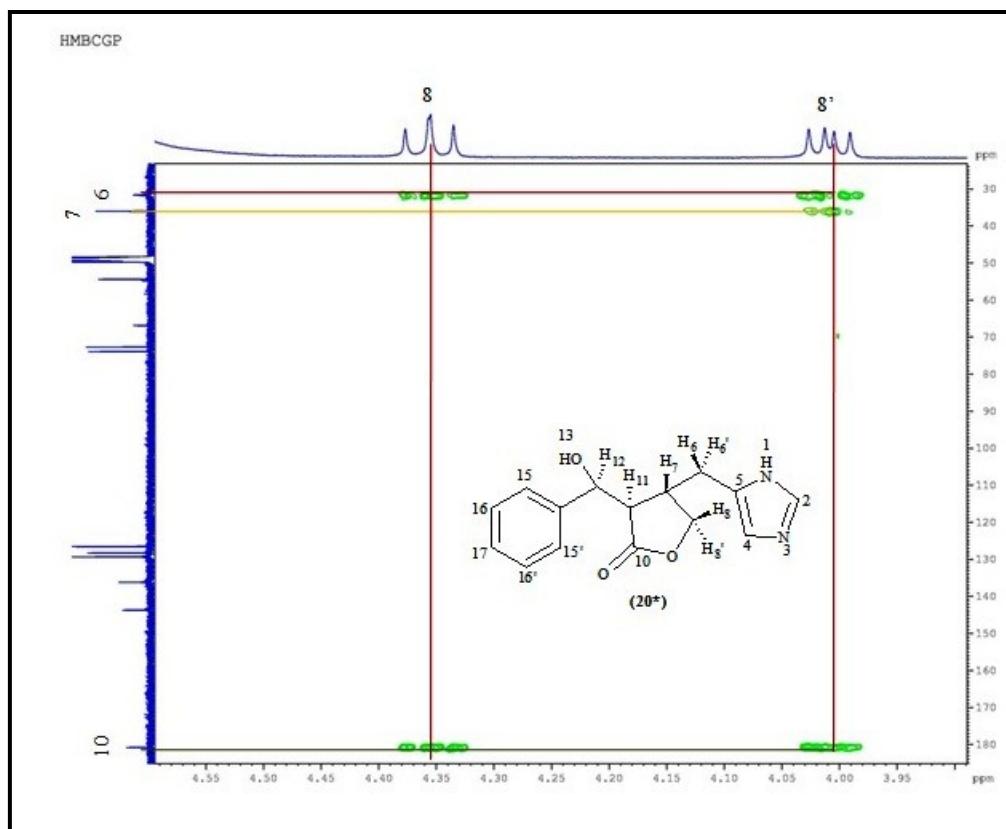


Figura 17: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 4,60 a 3,90 ppm e δ 20 a 190 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz

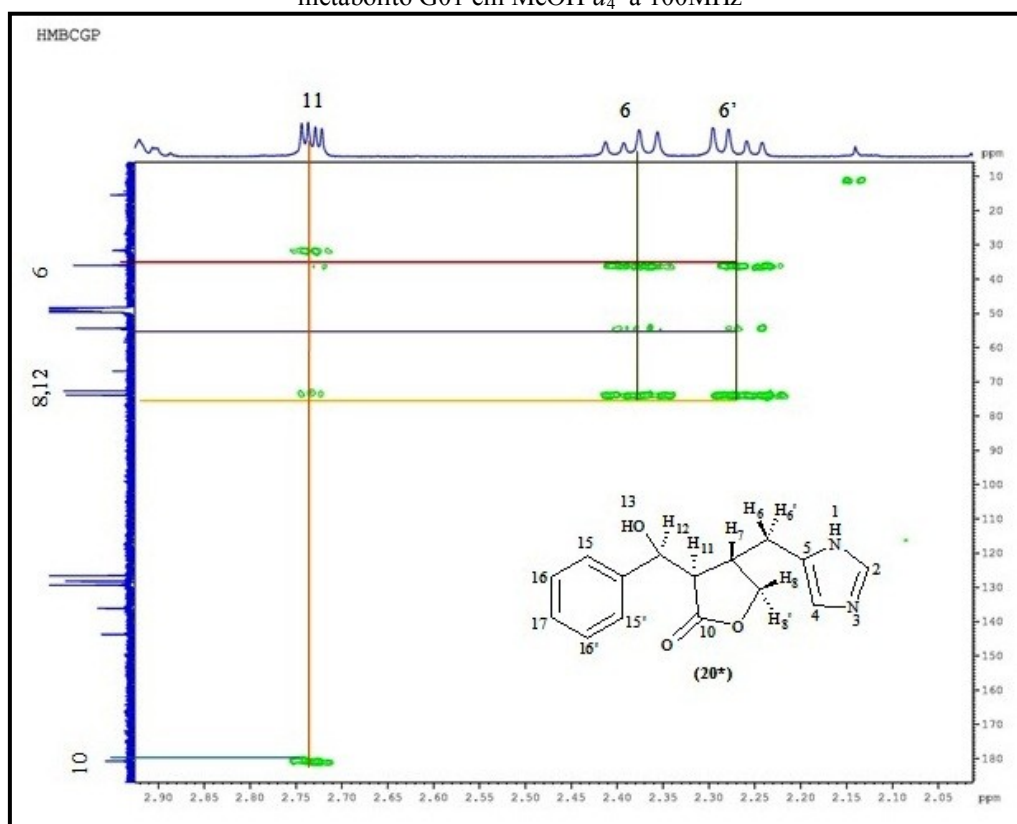


Figura 18: Expansão do espectro 2D HMBC, região de δ 2,95 a 2,0 ppm e δ 5 a 190 ppm, do metabólito G01 em MeOH- d_4 a 100MHz

A tabela a seguir mostra os valores de deslocamentos químicos obtidos do composto isolado comparado com os valores de RMN de ^1H da (+)-isopilosina relatado na literatura.

Tabela 11: Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos do composto isolado G01 com o alcaloide (+)-isopilosina

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H}^* (ppm)
1	-	-	-
2	7,40 (s)	136,23	7,48 (s)
3	-	-	-
4	6,48 (s)	NI	6,68 (s)
5	-	NI	-
6	2,39 (dd, $J= 8,22\text{Hz}$, $J= 14,6\text{Hz}$)	31,69	2,45-2,95
6'	2,26 (dd, $J= 6,8\text{Hz}$, $J= 14,6\text{Hz}$)	31,69	2,45-2,95
7	2,92 (m)	36,03	-
8	4,37 (dd, $J=8,09\text{Hz}$, $J= 8,63\text{Hz}$)	73,93	4,04 (dd, $J= 6,5$) $J_{\text{gem}}= 9$
8'	4,02 (dd, $J=5,48$, $J=8,63\text{Hz}$)	73,93	3,81 (dd, $J= 5,5$) $J_{\text{gem}}= 9$
10	-	180,74	-
11	2,74 (dd, $J= 2,73\text{Hz}$, $J= 5,91\text{Hz}$)	54,42	-
12	5,27 (d, $J= 2,72\text{Hz}$)	72,74	4,97
13	4,59	-	5,80
14	-	143,75	-
15 e 15'	7,37 (d, $J= 7,28\text{Hz}$)	126,62	7,15-7,40
16 e 16'	7,32 (dd, $J= 7,46\text{Hz}$ e $J=7,85\text{Hz}$)	129,43	7,15-7,40
17	7,25(dd, $J= 7,22\text{Hz}$ e $J=7,29\text{Hz}$)	126,31	7,15-7,40

δ_{H}^* (DMSO, 100 MHz) conforme (BERNAUER, 1972).

A realização de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) confirma o peso molecular do composto sendo G01 [$M=272,1252$] com perda de H_2O sinalizando o pico em [$M+H=255,1214$]

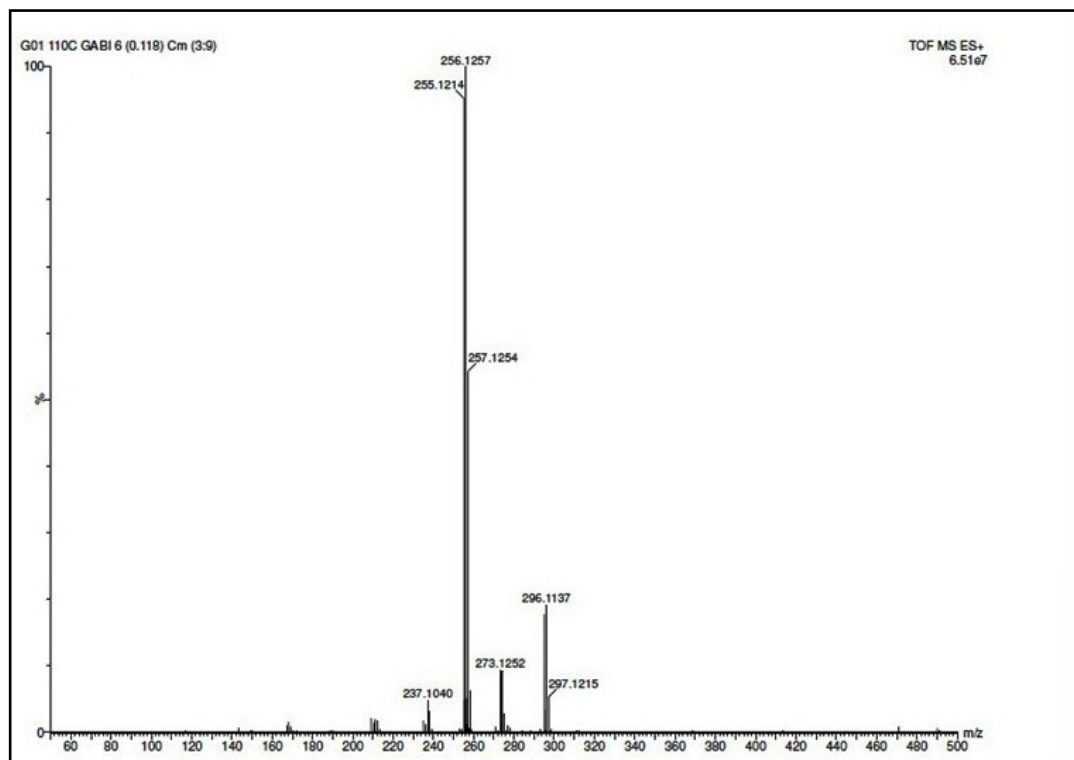


Figura 19: Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR) do metabólito G01

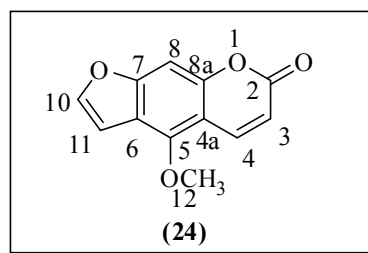
5.2.2 Metabólitos isolados da Fração Etérea Ácida

Na fração etérea ácida foram isolados duas furanocumarinas. Através de análises de espectrometria de massa de alta resolução, cromatografia líquida de alta eficiência e análises de RMN ^1H e ^{13}C , confirmou-se as furanocumarinas bergapteno **24** e xantotoxina **25** como sendo isômeros de posição.

5.2.2.1 Bergapteno

A cumarina bergapteno **24** pertencente a classe furanocumarina foi isolada da Fração Etérea Ácida obtido do extrato bruto da espécie *Pilocarpus pennatifolius*, resultante do fracionamento 1, conforme descrito na pag.(26), na forma de cristais brancos e finos.

Após isolamento, o composto foi submetido a técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, e por comparação com os dados da literatura já obtidos anteriormente e espectrometria de massa de alta resolução, foi possível identificar o metabólito como sendo uma furanocumarina denominada bergapteno **24**, com fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$.



No espectro de RMN de ^1H , (Figura 20) da furanocumarina **24**, nota-se a presença de oito hidrogênios através da integração de sinais. Três desses hidrogênios pertencem a metoxila, com deslocamento químico de δ 4,26 ppm. Quatro hidrogênios apresentam-se na forma de dupletos, sendo dois desses hidrogênios em δ 7,59 ppm e

δ 7,01 ppm com $J= 2,4$ Hz, característico de hidrogênios de anel furano (H-10 e H-11). Os outros dois hidrogênios aparecem em δ 8,16 ppm e δ 6,28 ppm, referente aos H-4 e H-3 respectivamente, com $J= 10$ Hz. Ainda na região de aromáticos tem-se um simpleto em δ 7,14 ppm correlacionando com o H-8. Através da análise de RMN ^{13}C (Figura 21), confirma-se a presença de doze carbonos estando em concordância com a estrutura **24**. Em δ 59,8 ppm, tem-se a presença da metoxila que está ligada ao C-12 do anel aromático.

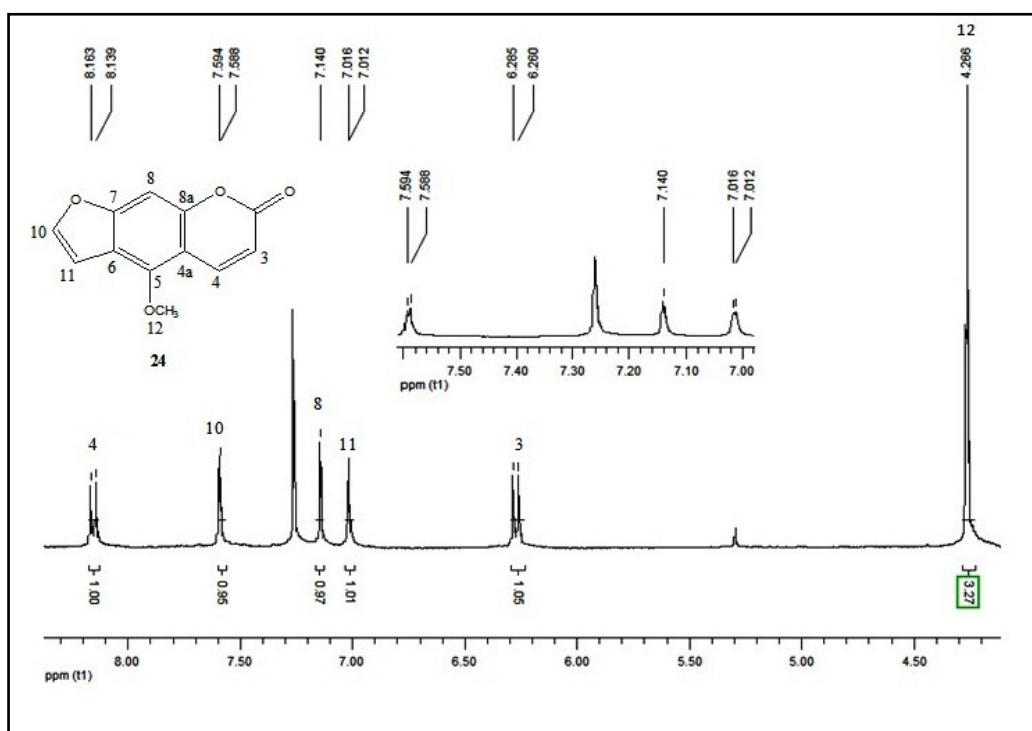


Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^1H , região de δ 8,30 a 4,20 ppm, da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl_3 a 400MHz.

Os carbonos do anel furano aparecem em δ 144,47 ppm para o C-10 e δ 104,66 ppm para o C-11. Sendo o C-10 mais desblindado devido a eletronegatividade do oxigênio do anel. Os carbonos hidrogenados C-4 e C-3 aparecem em δ 138,66 ppm e δ 112,33 ppm confirmando os sinais na região de alcenos. Na região dos aromáticos têm-se a presença dos carbonos C-7 em δ 158,10 ppm, C-8a em δ 152,46 ppm, C-5 em δ 149,30 ppm, C-6 em δ 112,48 ppm que aparece ao lado do C-3, C-4a em δ 106,20 ppm sendo todos carbonos quaternários. O C-8 hidrogenado observa-se em δ 93,61 ppm. Em δ 160,83 ppm têm-se o C-2, caracterizando sinal de carbonila de lactona na região espectral presente na estrutura (Figura 21).

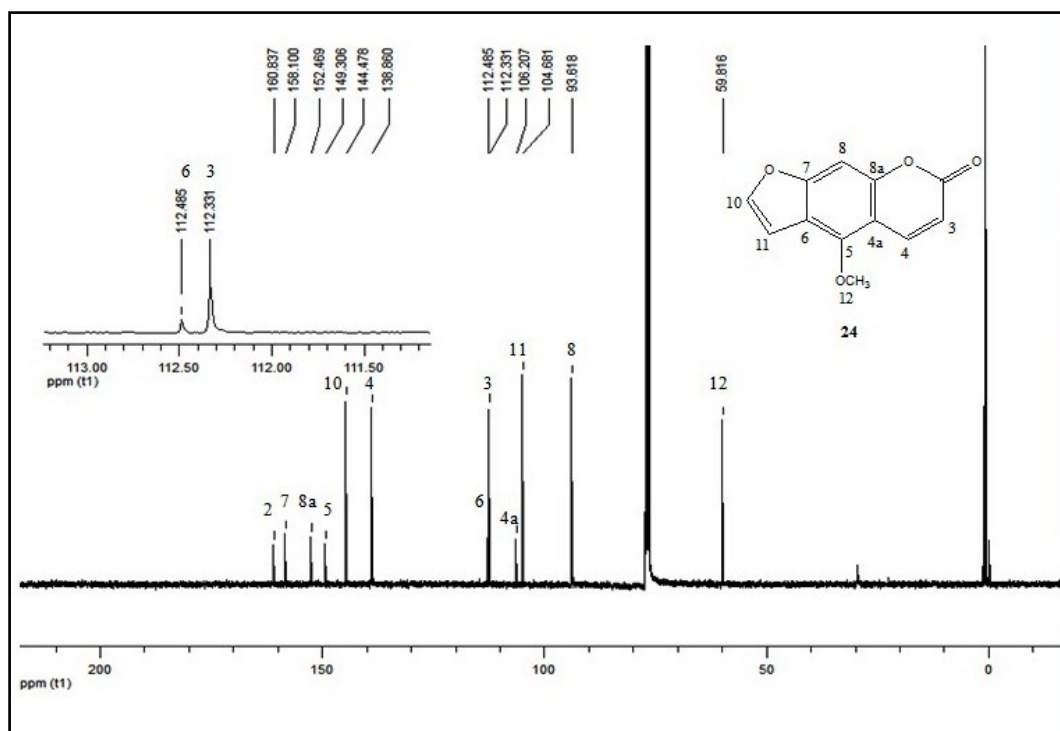


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl_3 a 100MHz.

A presença de cinco carbonos hidrogenados e a metoxila podem ser confirmados através de análise de Dept 135 (Figura 22).

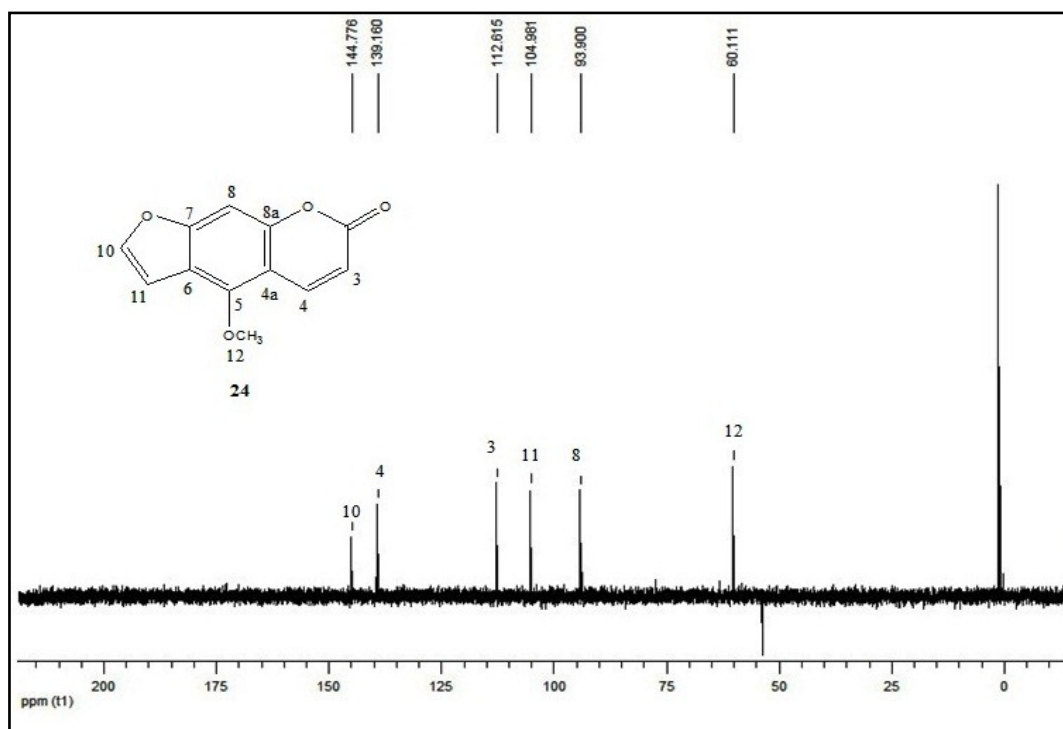


Figura 22: Espectro de RMN Dept 135 da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl_3 a 100MHz

A confirmação dos carbonos hidrogenados e com seus respectivos deslocamentos químicos foi através da análise de HSQC. Onde, o H-4 correlaciona-se com o C-4 em δ 138,66 ppm e o H-3 correlaciona-se com o C-3 em δ 138,63 ppm. O hidrogênio simpleto que aparece em δ 7,14 ppm correlaciona-se com o C-8 em δ 93,61 ppm. Os carbonos pertencentes ao anel furano são correlacionados pelos H-10 e H-11 observando-se o C-10 em δ 144,47 ppm e C-11 em δ 104,66 ppm (Figura 23).

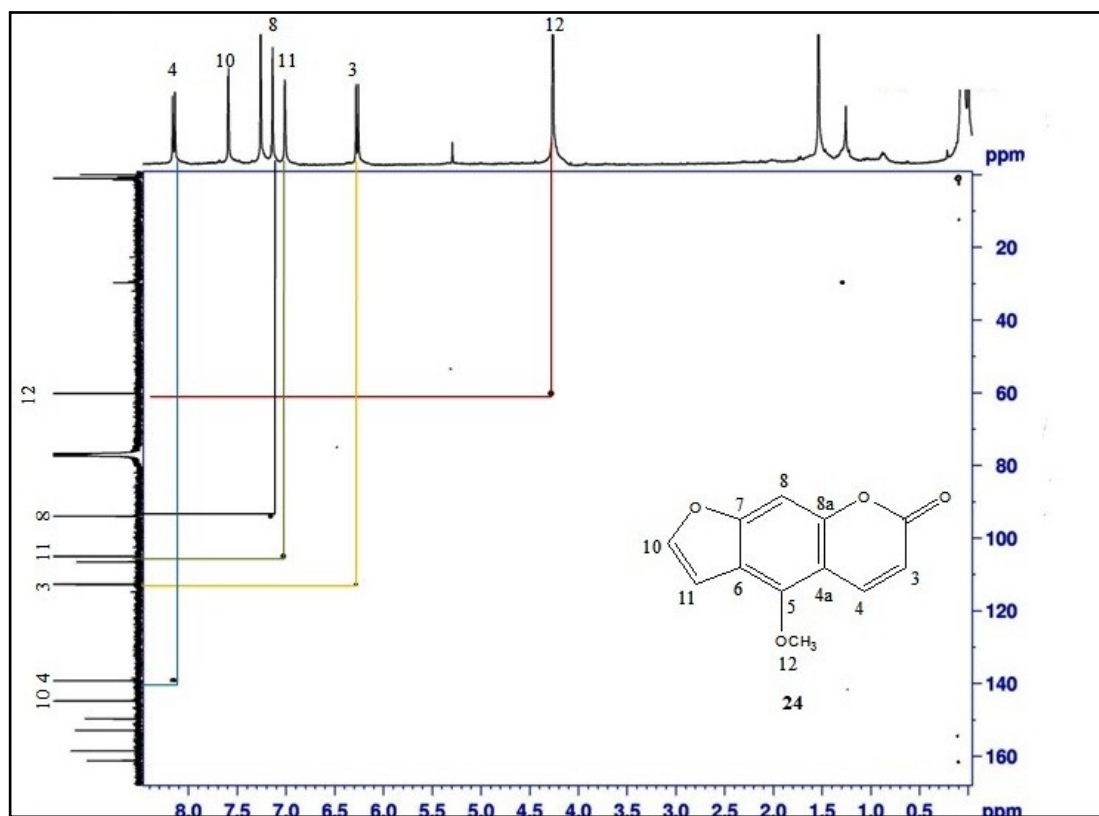


Figura 23: Espectro 2D HSQC da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl₃ a 100MHz

Na expansão do espectro de HSQC é possível visualizar o acoplamento do C-10 e H-10 (Figura 24).

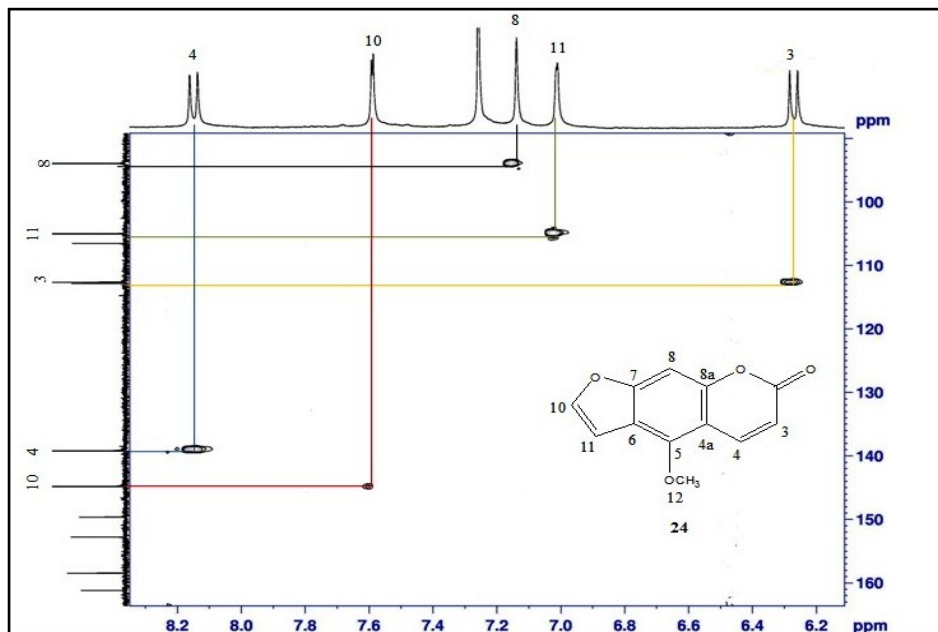


Figura 24: Expansão do espectro 2D HSQC, região de δ 8,4 a 6,0 ppm e δ 90 a 165 ppm, da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl_3 a 100MHz

O espectro bidimensional homonuclear COSY H-H (Figura 25), apresenta a correlação entre os hidrogênios H-10 e H-11 do anel furano e a correlação entre os H-3 e H-4 do anel lactônico.

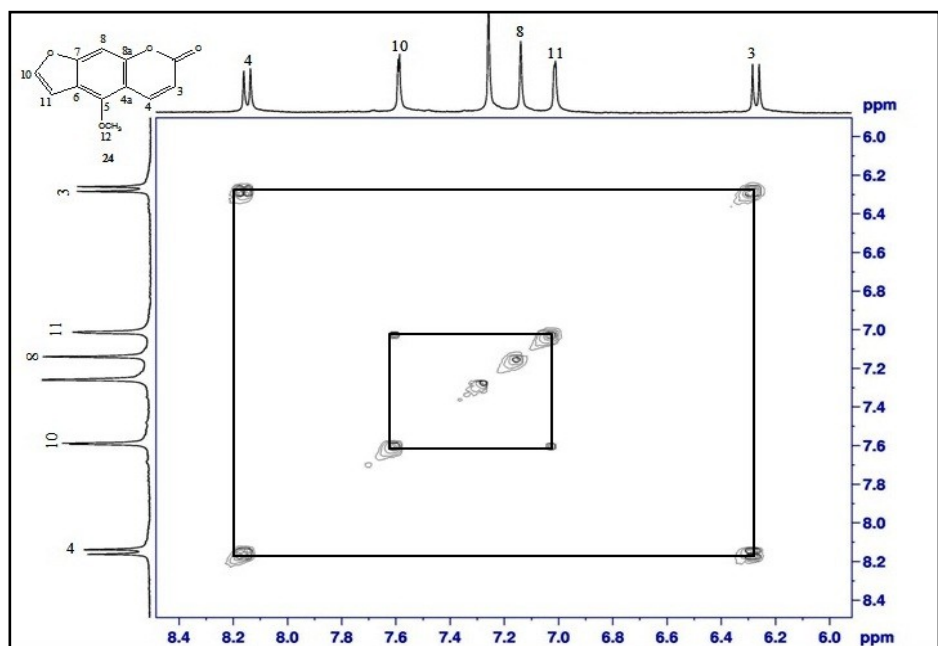


Figura 25: Espectro 2D COSY expandido, região de δ 6,0 a 8,4 ppm, da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl_3 a 400 MHz

Para se confirmar a estrutura fez-se necessário a análise do espectro do HMBC, onde foi possível identificar as correlações existentes entre os H-12 da metoxila com o C-5. Observa-se também o acoplamento do H-8 com o C-6, C-8a e C-7. A análise do HMBC permitiu atribuir os carbonos quaternários sendo possível visualizar os acoplamentos dos H-3 e H-4 com carbonos a 2-3 ligações e os acoplamentos dos H-10 e H-11 do anel furano com carbonos a 2-3 ligações (Figura 26).

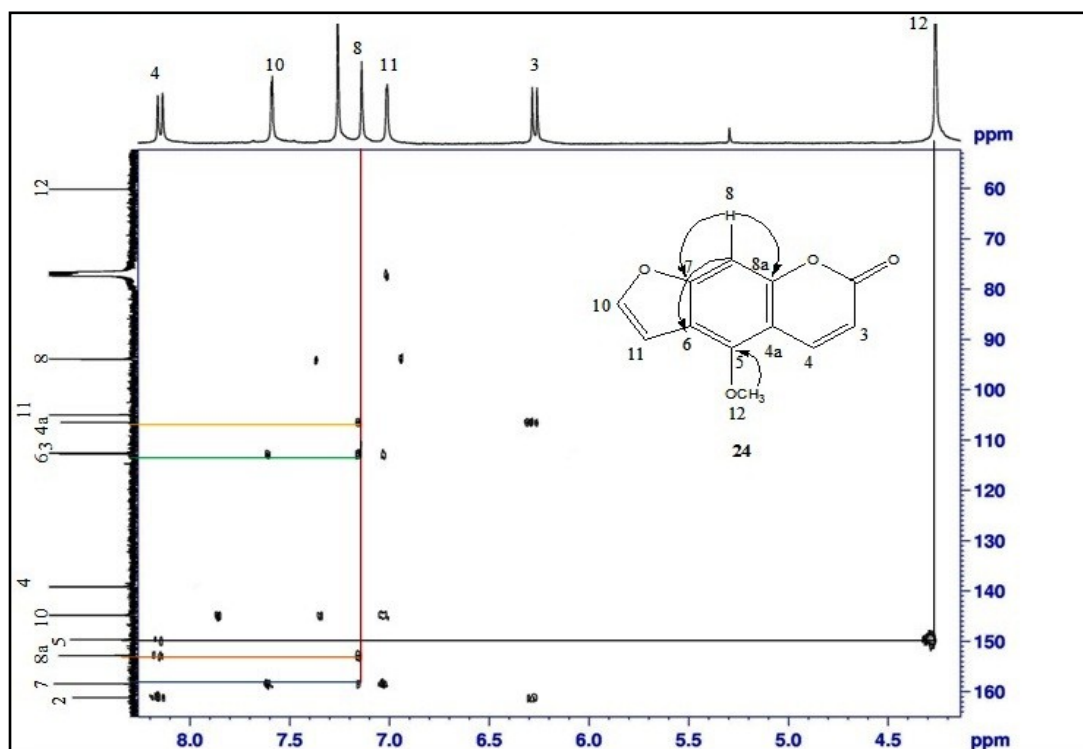


Figura 26: Espectro expandido 2D HMBC, região de δ 8,2 a 4,0 ppm e δ 55 a 165 ppm, da cumarina bergapteno (**24**) em CDCl_3 a 100 MHz

A partir da análise do cromatograma de massas do metabólito isolado tem-se a identificação da substância com massa 217,0482 [M+H], confirmando a fórmula molecular C₁₂H₈O₄ do metabólito **24**. A clivagem da metoxila confirma o pico em 202 [M+H].

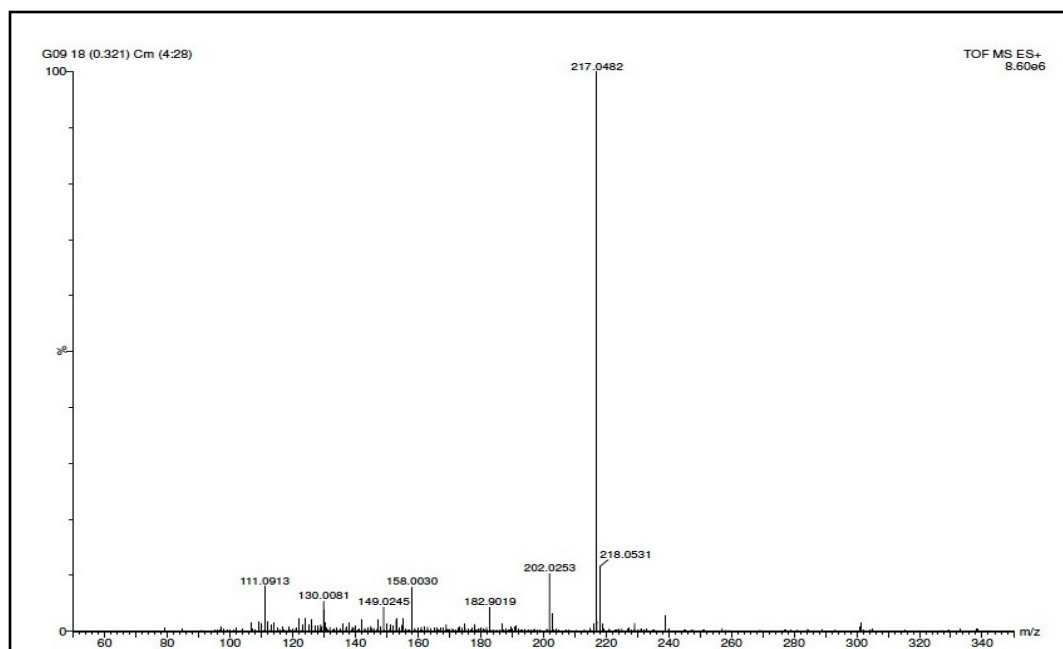


Figura 27: Cromatograma de massas do metabólito bergapteno (**24**).

Na tabela a seguir estão listados os dados espectroscópicos do metabólito isolado bergapteno **24** comparados com dados da literatura.

Tabela 12: Dados de RMN de ¹H e ¹³C de bergapteno, G09 **24** (CDCl₃, ¹H a 400MHz; ¹³C a 100MHz)

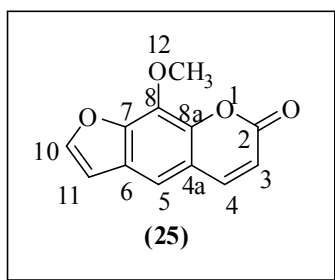
Posição	δ_H (ppm)	δ_H^* (ppm)	δ_C (ppm)	δ_C^* (ppm)
2	-	-	160,83	160,3
3	6,28(d, $J= 10$ Hz)	6,26 (d, $J= 10,0$ Hz)	112,33	112,8
4	8,16 (d, $J= 10$ Hz)	8,13 (d, $J= 10,0$ Hz)	138,66	139,4
4 ^a	-	-	106,20	106,7
5	-	-	149,3	149,6
6	-	-	112,48	113,0
7	-	-	158,10	158,5
8	7,14 (s)	7,10 (s)	93,61	94,0
8 ^a	-	-	152,46	152,7
10	7,59 (d, $J= 2,4$ Hz)	7,58 (d, $J= 2,3$ Hz)	144,47	145,0
11	7,01 (d, $J= 2,4$ Hz)	7,02 (d, $J= 2,3$ Hz)	104,66	105,3
12	4,26 (s)	4,26 (s)	59,91	60,3

δ_H^* do bergapteno (CDCl₃, 300MHz) conforme (SERKEROV, 2011), δ_C^* do bergapteno (CDCl₃, 22,64MHz) conforme (ELGAMAL et al., 1979).

5.2.2.1 Xantotoxina

A furanocumarina xantotoxina **25** foi isolada da Fração Etérea Ácida e Fração Dicloro Básica obtidas do extrato bruto da espécie *Pilocarpus pennatifolius*, resultante do fracionamento 1 e 2 respectivamente, conforme descrito nas pags.(26) e (27), na forma de cristais brancos.

Após isolamento, o composto foi submetido a técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, e por comparação com os dados da literatura já obtidos anteriormente e espectrometria de massa de alta resolução, foi possível identificar o metabólito como sendo uma furanocumarina denominada xantotoxina **25**, com fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$, sendo esta um isômero da furanocumarina bergapteno **24**.



No espectro de RMN de ^1H (Figura 28) da furanocumarina **25** observa-se a presença de oito hidrogênios através da integração de sinais. Três hidrogênios pertencem a metoxila, com deslocamento químico de δ 4,20 ppm, referente ao H-12. Outros dois hidrogênios apresentam-se na forma de dupletos em δ 7,67 ppm e δ 6,80 ppm com $J= 2,4\text{Hz}$, sendo característico de hidrogênios de anel furano. Na região dos aromáticos tem-se, ainda, a presença de outros dois hidrogênios na forma de duplete em δ 7,75 ppm referente ao H-4 e δ 6,36 ppm referente ao H-3 com $J= 9,6\text{ Hz}$. Em δ 7,33 ppm observa-se um simpleto referente ao H-5.

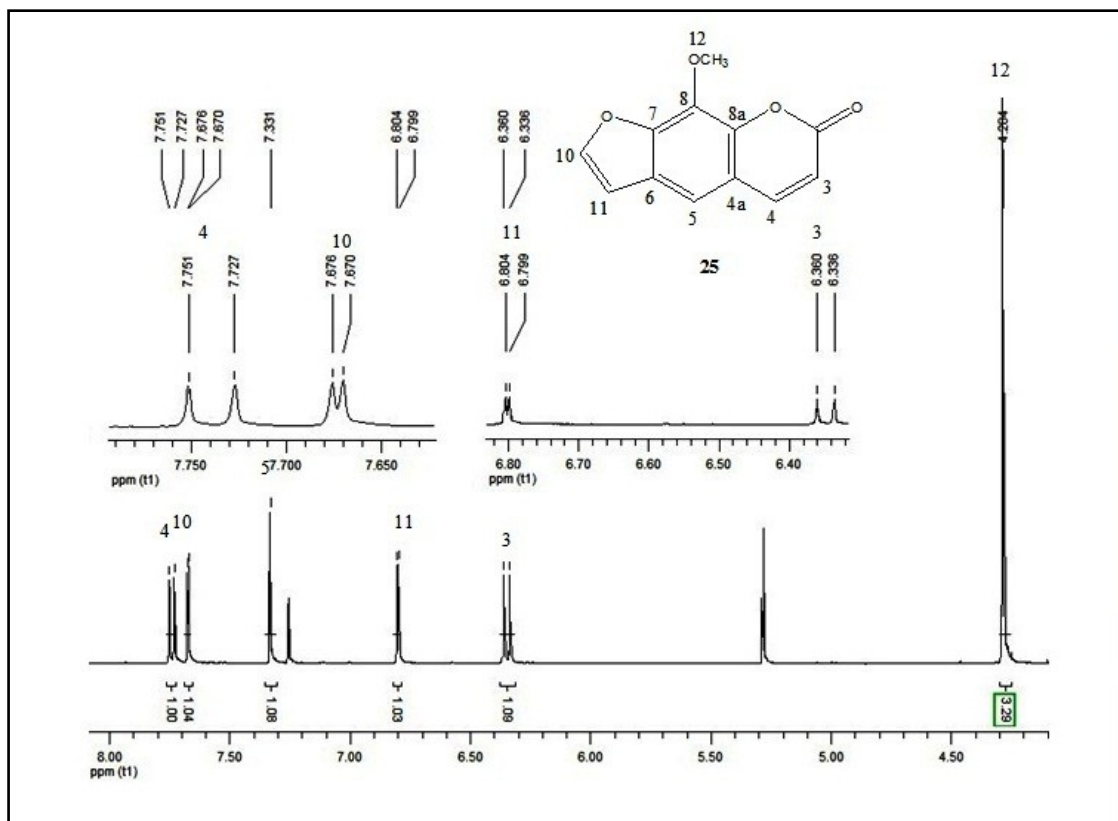


Figura 28: Espectro expandido de RMN de ¹H, região entre δ 8,0 a 4,0 ppm, da cumarina xantotoxina (**25**) em CDCl₃ a 400MHz.

Através da análise de RMN de ¹³C (Figura 29), visualiza-se a presença de doze carbonos confirmando a fórmula molecular C₁₂H₈O₄. Em δ 60,61 ppm tem-se a presença de uma metoxila ligada ao C-8 (δ 132,19 ppm) do anel aromático. Os carbonos do anel furano C-10 e C-11 aparecem em δ 145,92 ppm e δ 106,61 ppm. Os C-4 e C-3 do apontam em δ 143,53 ppm e δ 114,10 ppm respectivamente enquanto o C-5 em δ 112,19 ppm. A carbonila lactônica C-2 aparece em δ 159,25 ppm.

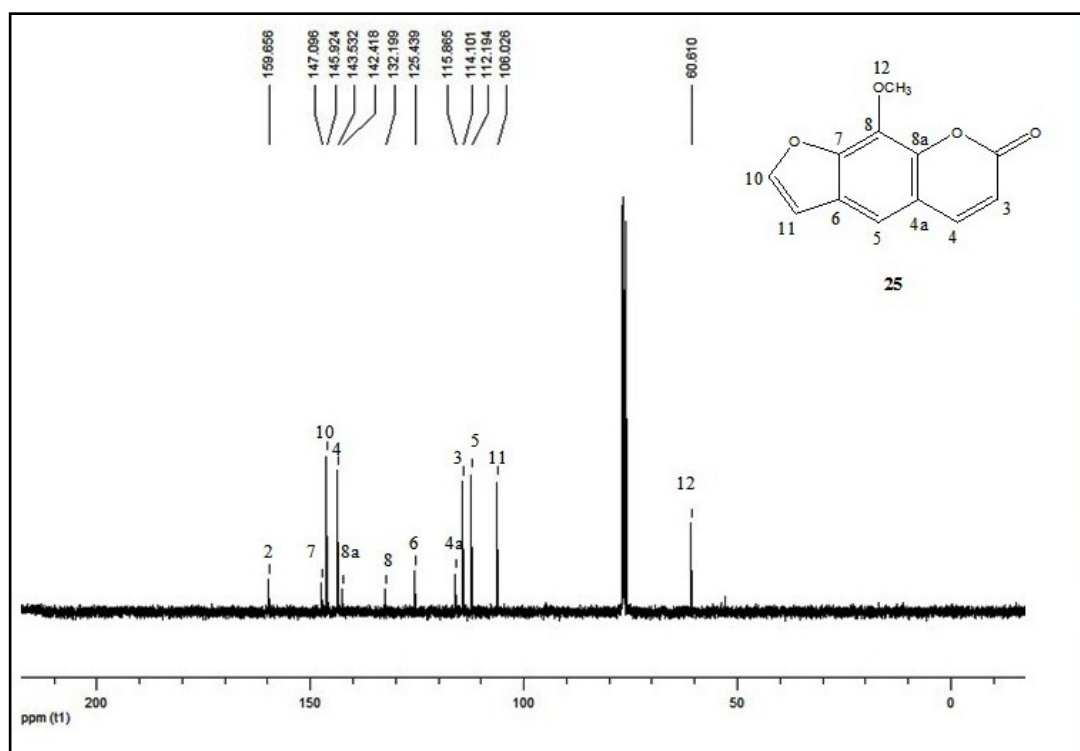


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C da cumarina xantotoxina (**25**) em CDCl_3 a 100MHz

Analisando o Dept 135 (Figura 30) confirma-se a presença de cinco carbonos hidrogenados e uma metila em δ 60,61 ppm pertencente a metoxila.

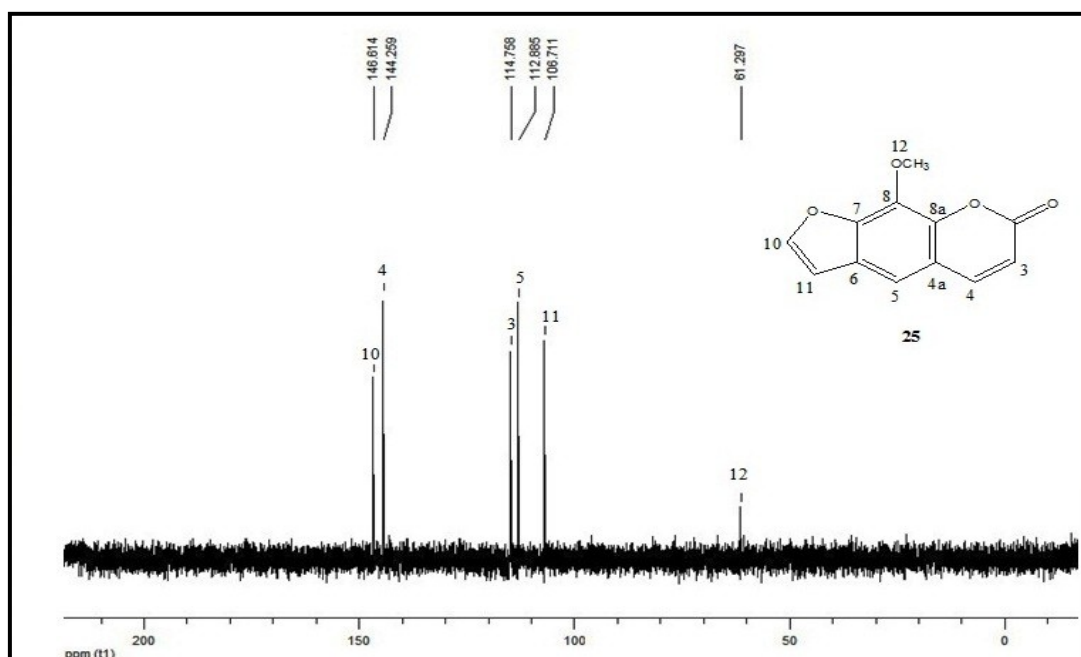


Figura 30: Espectro de RMN Dept 135 da cumarina xantotoxina (**25**) em CDCl_3 a 100MHz.

A análise do HSQC permitiu a correlação dos carbonos hidrogenados C-10, C-4, C-3, C-5, C-11 e C-12 (Figura 31).

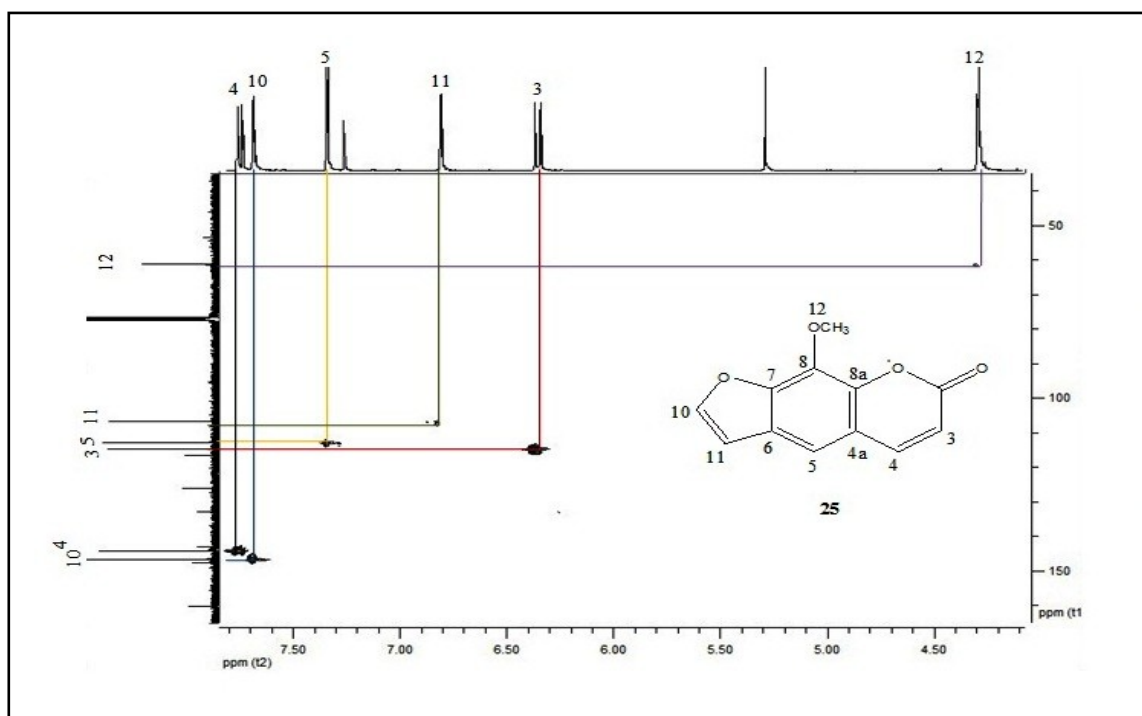


Figura 31: Espectro expandido 2D HSQC, região de δ 7,80 a 4,0 ppm e δ 40 a 160 ppm, da cumarina xantotoxina (25) em CDCl_3 a 100MHz

O espectro bidimensional homonuclear, COSY H-H (Figura 32) apresenta apenas dois sistemas de spins na estrutura **25**.

O primeiro sistema de spins mostra o acoplamento entre o H-4 (δ 7,75 ppm) e o H-3 (δ 6,36 ppm), enquanto que o segundo sistema de spins mostra o acoplamento entre os H-10 (δ 7,67 ppm) e o H-11 (δ 6,8 ppm) do anel furano.

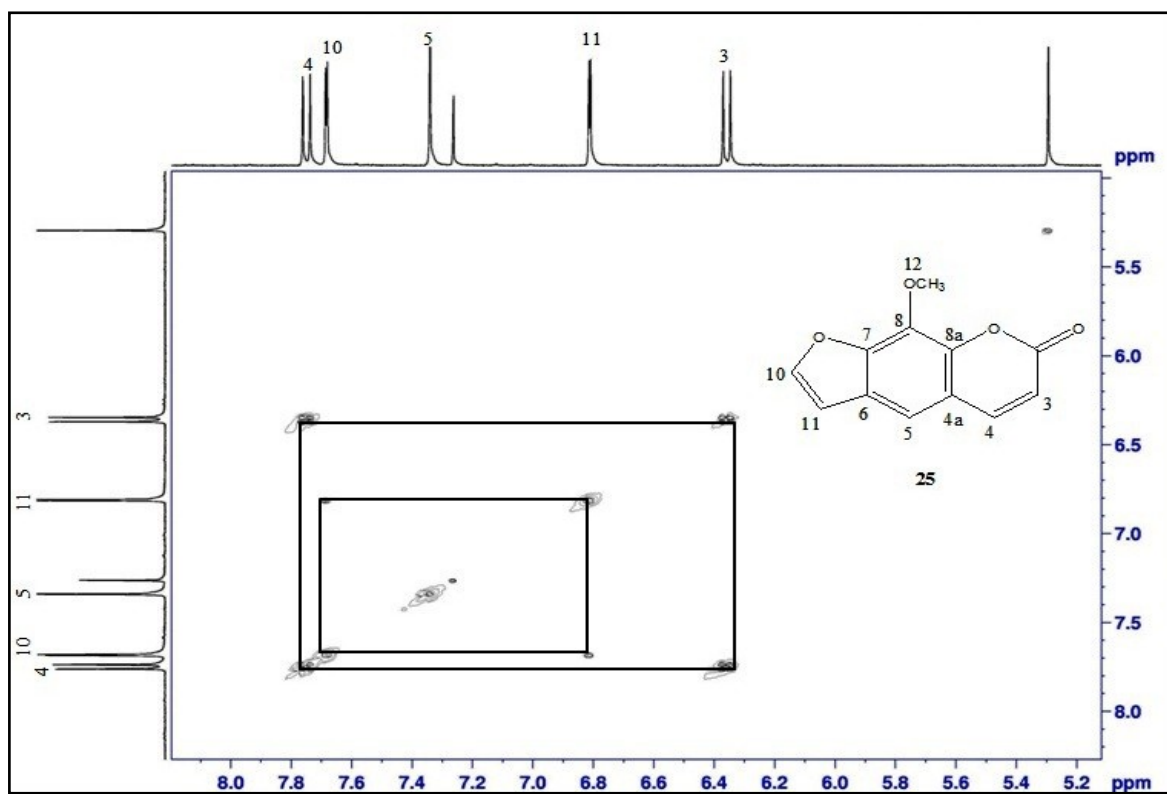


Figura 32: Espectro expandido 2D COSY, região entre δ 8,2 a 5,2 ppm, da cumarina xantotoxina (**25**) em CDCl₃ a 100MHz

A análise do espectro 2D de HMBC permite visualizar o acoplamento dos H-12 com o C-8 referente a metoxila, confirmando a posição da metoxila. Ainda, pode-se observar o acoplamento do H-5 com os C-4a, C-11, C-4, C-8 e C-7. O acoplamento dos H-10 e H-11 do anel furano com o C-7 pode-se também ser visualizado (Figura 33).

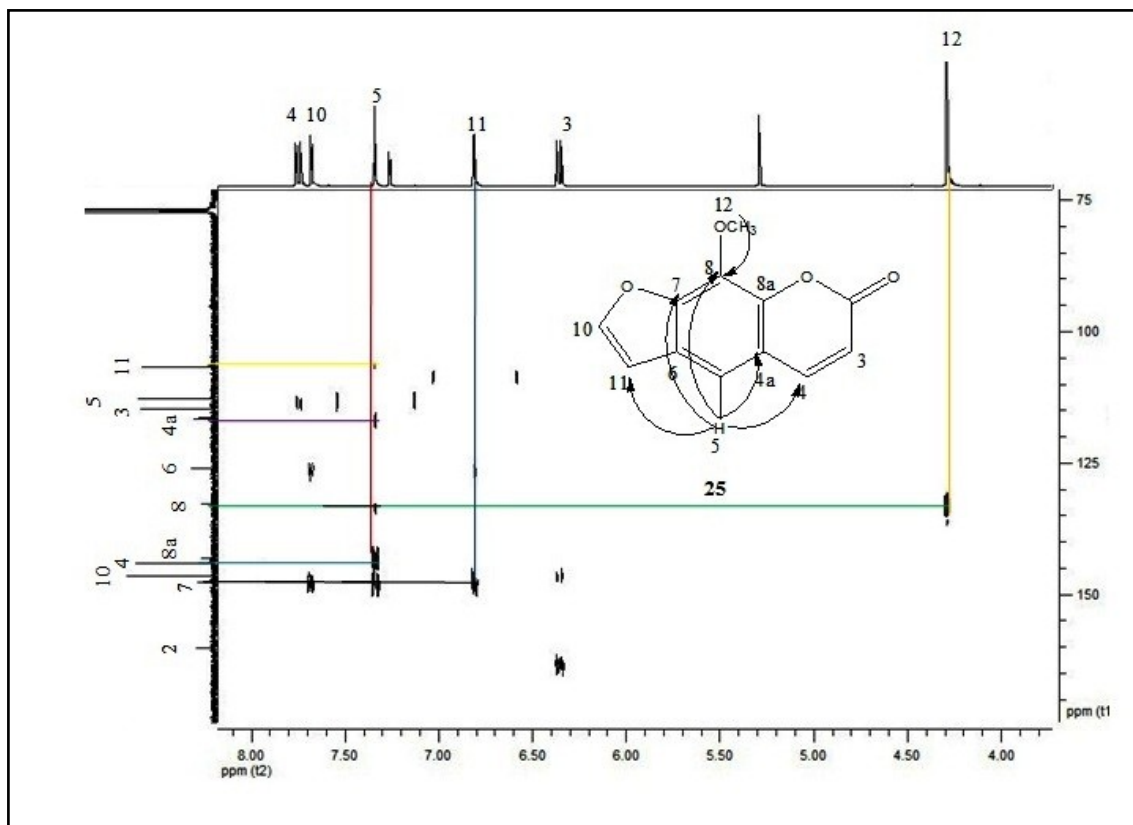


Figura 33: Espectro 2D HMBC expandido, região de δ 8,2 a 3,8 ppm e δ 75 a 175 ppm, da cumarina xantotoxina (**25**) em CDCl₃ a 100MHz

A tabela a seguir mostra a comparação dos dados obtidos da xantotoxina **25** com os valores encontrados na literatura.

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da xantotoxina, G05 **25** (CDCl_3 , ^1H a 400MHz; ^{13}C a 100MHz)

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{H}^* (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C}^* (ppm)
2	-	-	159,65	160,4
3	6,36 (d, $J= 9,6\text{Hz}$)	6,35 (d, $J= 10,0\text{Hz}$)	114,10	114,5
4	7,75 (d, $J= 9,6\text{Hz}$)	7,77 (d, $J= 10,0\text{Hz}$)	143,53	144,4
4 ^a	-	-	115,86	116,5
5	7,33 (s)	7,35 (s)	112,19	113,1
6	-	-	125,43	126,2
7	-	-	147,09	147,6
8	-	-	132,19	132,7
8 ^a	-	-	142,41	142,9
10	7,67 (d, $J= 2,4\text{Hz}$)	7,64 (d, $J= 2,3\text{Hz}$)	145,92	146,6
11	6,80 (d, $J= 2,4\text{Hz}$)	6,82 (d, $J= 2,3\text{Hz}$)	106,61	106,8
12	4,20 (s)	4,28 (s)	60,61	61,2

δ_{H}^* da xantotoxina (CDCl_3 , 300MHz) conforme (SERKEROV, 2011), δ_{C}^* da xantotoxina (CDCl_3 , 22,64MHz) conforme (ELGAMAL et al., 1979).

Através da análise do cromatograma de massas, pode-se confirmar a estrutura de fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ com massa m/z 217,0521 $[\text{M}+\text{H}]$. A fragmentação da metoxila sinaliza o pico em 202. Pode-se visualizar também a formação de aduto de sódio, acrescentando em 23, 01g/mol no espectro de massa do composto.

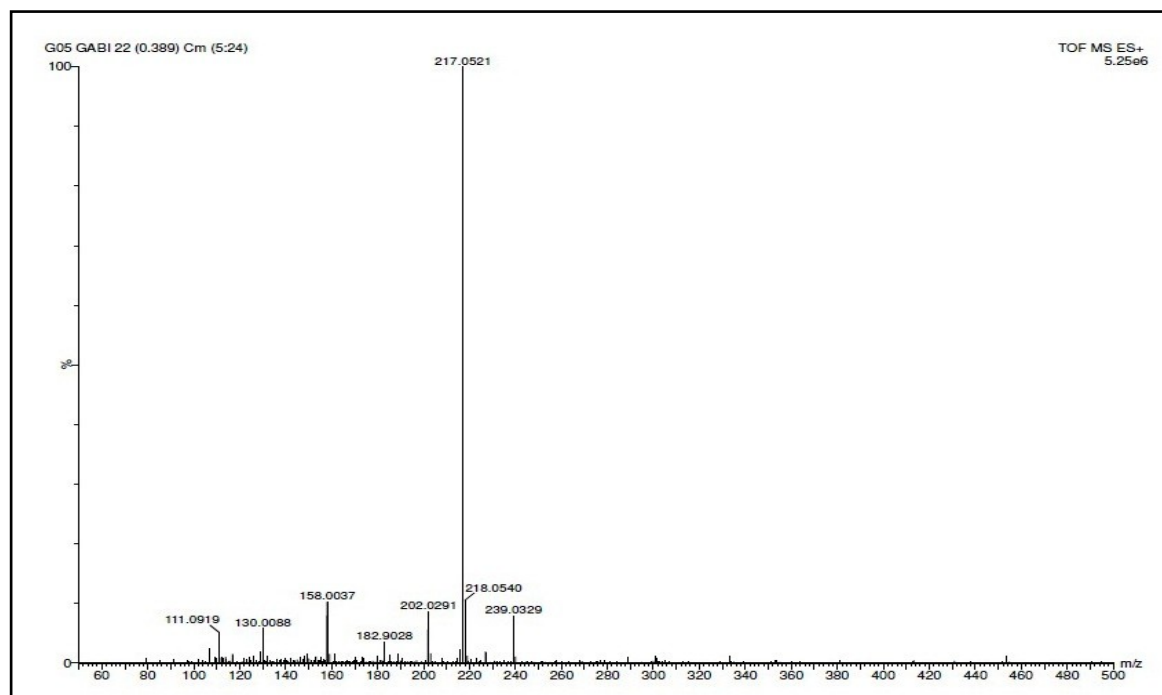


Figura 34: Cromatograma de massa do metabólito xantotoxina (**25**)

O metabólito xantotoxina foi isolado na forma de cristais brancos, o que permitiu as análises de difração de raios-x (Figura 35). A cristalização ocorreu através da evaporação lenta da mistura de solventes Clorofórmio/Metanol 10% a temperatura ambiente. O cristal apresentou características de Polimorfismo, o que resulta em dois sistemas cristalinos o Monoclínico e o Ortorrômico, o que pode ser verificado através de análise de (DSC, differential scanning calorimetry).

A técnica de DSC tem elevada sensibilidade e permite medir as transições de fase, no caso sólido-líquido e líquido sólido em uma determinada temperatura. Mudanças na amostra tais como ponto de fusão e cristalização são registrados sob a forma de picos e a presença de transições vítreas é registrado como um deslocamento da linha base. É durante essa mudança de fase, como pode ser verificado no termograma (Figura 36), que ocorre a variação do sistema cristalino. Apenas o sistema cristalino Monoclínico teve 100% da estrutura confirmada, apresentando uma geminação no cristal submetido à análise. A figura 35 apresenta as estruturas obtidas para a xantotoxina.

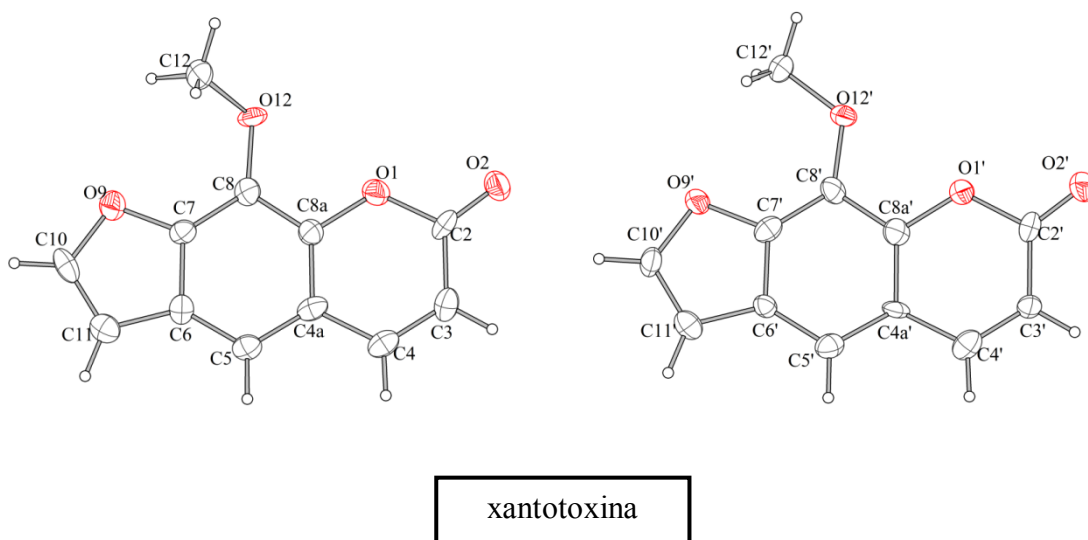


Figura 35: Representação ORTEP obtida por difrações de raios-X da xantotoxina (**25**), onde C são os carbonos; O são os oxigênios (vermelho) e H (branco).

Os dados cristalográficos da xantotoxina no sistema cristalino monoclinico apresenta um grupo espacial $P2_1$ com parâmetros de cela unitária $a=12.404(18)$ Å, $b=6.088(7)$ Å, $c=12.609(18)$ Å e ângulos $\alpha = \gamma = 90^\circ$ e $\beta=98.22(4)^\circ$.

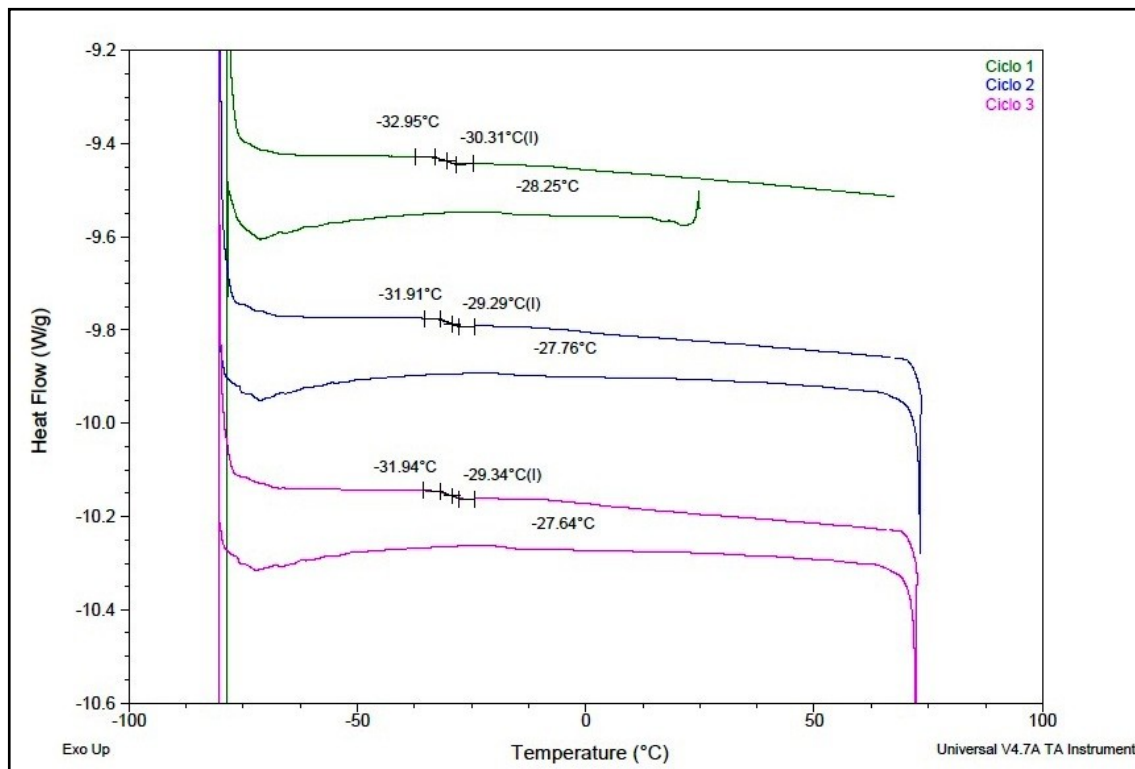


Figura 36: Termograma da xantotoxina (**25**) fluxo de calor (W/g)/temperatura (°C)

5.2.2.2 Comparação dos isômeros bergapteno e xantotoxina

Através de análises de espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear confirmou-se os metabólitos **24** e **25** como sendo isômeros de posição. Ambos têm a mesma fórmula molecular $C_{12}H_8O_4$.

Nos cromatogramas de massa figuras 27 e 34 referente ao bergapteno e xantotoxina respectivamente, nota-se, que ocorre a mesma fragmentação sinalizando um pico em 202 [M+], referente a quebra da metoxila. No espectro de massa do metabólito xantotoxina apresentado anteriormente (Figura 34), pode-se visualizar ainda a formação de aduto de Na (23g/mol), correspondendo a um acréscimo na massa total do metabólito. Isso se deve a uma possível interação da amostra ao sódio durante a ionização dos elétrons.

Em comparação através de CLAE, nas figuras 37 e 38, pode-se visualizar nos cromatogramas dos metabólitos **24** e **25** os respectivos tempos de retenção sinalizado em 13,302 min corresponde a xantotoxina **25** e 14,240 min corresponde a berpapteno **24**, confirmando a presença de dois compostos diferentes, que mais tarde pode ser verificado também através de análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

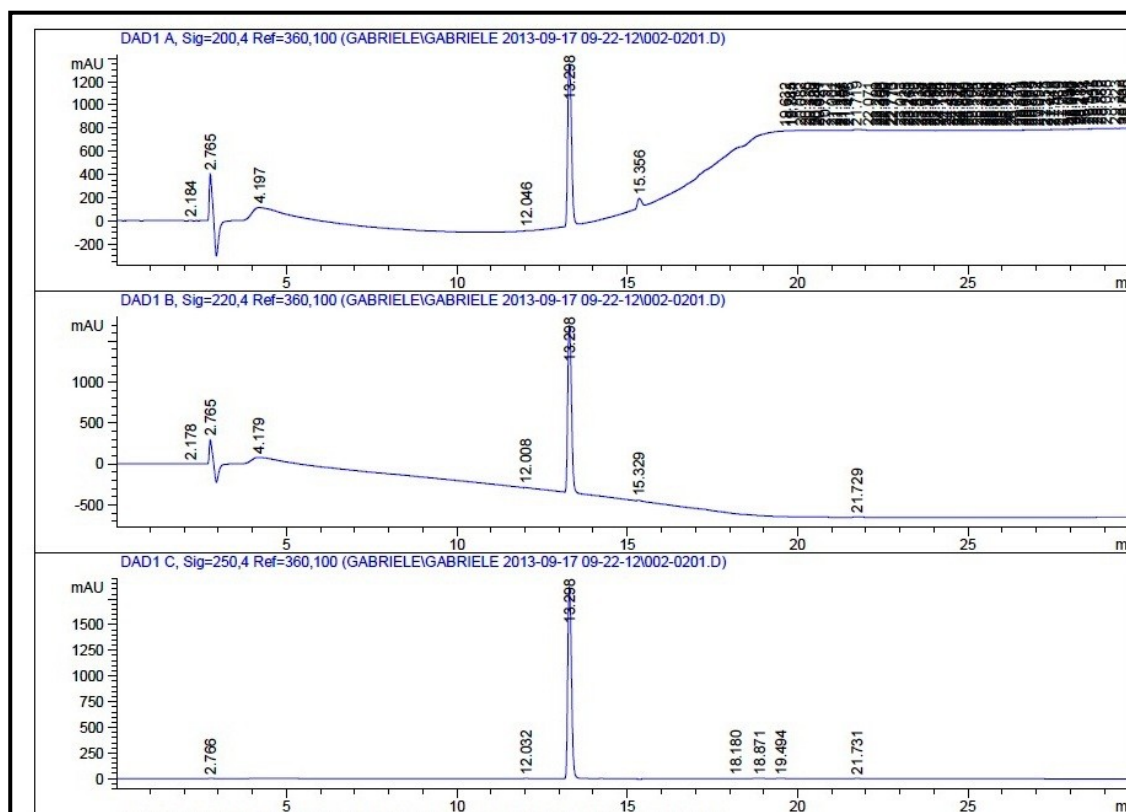


Figura 37: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da xantotoxina (**25**). a) $\lambda=200$ nm, b) $\lambda=220$ nm, c) $\lambda=250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H_2O , fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18.

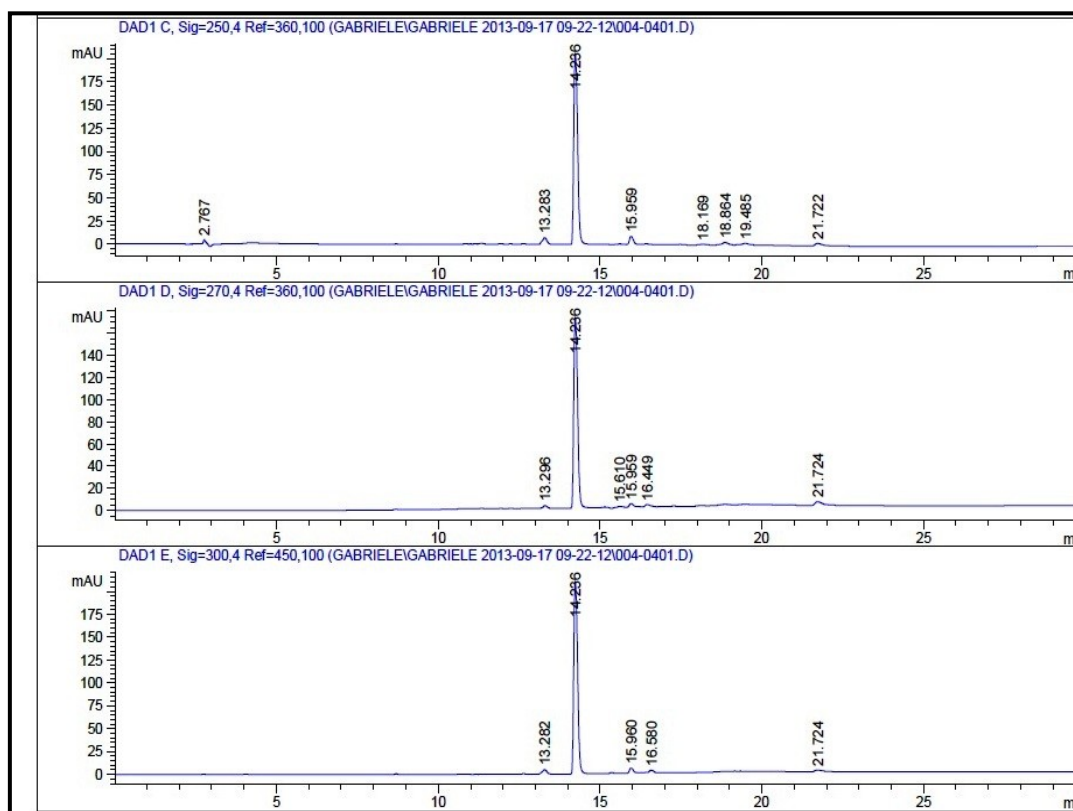


Figura 38: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da bergapteno (**24**). a) $\lambda = 250$ nm, b) $\lambda = 270$ nm, c) $\lambda = 300$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H₂O, fluxo 1 mL.min⁻¹, coluna C18.

Em estudo de espécies *Citrus* Dugrand et al. (2013) determinaram e quantificaram 27 metabólitos (cumarinas e furanocumarinas) utilizando CLAE acoplado a detector de massa, com coluna C18 de fase reversa e utilizando gradientes de solventes 0,1% de ácido fórmico em água e metanol. Os metabólitos bergapteno **24** e xantotoxina **25** foram identificados com m/z 217 [M+H]⁺.

Em análise dos espectros de RMN de ¹³C referente a **24** e **25**, pode-se notar a diferença dos deslocamentos químicos principalmente dos C-5 e C-8. No espectro de ¹³C do metabólito Bergapteno (figura 21) o C-5 sinaliza em δ 149,3 ppm, já o C-5 referente a Xantotoxina (figura 29) sinaliza em δ 112,19 ppm. Com relação ao C-8, no espectro de bergapteno esse sinaliza em δ 93,91 ppm e δ 132,19 ppm na xantotoxina.

5.3. Óleos Voláteis da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire

5.3.1 Análise Química do óleo essencial

A tabela 14 ilustra a composição química do óleo volátil da espécie *Pilocarpus pennatifolius* nas quatro estações. Os resultados foram obtidos com base no cálculo do índice de Kovats, comparados com padrões relatados na literatura e cromatograma com espectrometria de massa (ADAMS, 1995; OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2004).

Tabela 14: Composição química do óleo volátil da espécie *Pilocarpus pennatifolius* nas quatro estações (%).

	Substância	IK ^a	IK ^b	Outono	Inverno	Primavera	Verão
1	Hexanol	802	864	N.I	N.I	N.I	2
2	α -pineno	903	935	22	N.I	N.I	N.I
3	Sabineno	1000	974	10	N.I	N.I	N.I
4	β -Mirceno	1001	984	2	N.I	N.I	5
5	Limoneno	1000	1031	N.I	1,72	N.I	0,037
6	β (Z)-Ocimeno	1000	1037	0,7	8	N.I	0,1
7	β (E)-Ocimeno	1000	1047	0,67	12,72	N.I	N.I
8	Undecanona	1291	1301	8,56	25,54	10,5	4,1
9	Undecanal	1303	1301	5,38	1,64	4,4	4,56
10	Δ -elemeno	1307	1339	0,42	5	N.I	N.I
11	α -humuleno	1405	1442	22,66	1,92	35,25	27,1
12	E-Cariofileno	1405	1418	19,8	23,69	55,74	26,56
13	β -Selieno	1501	1485	1,18	13	1,4	3,2
14	γ -Cadineno	1502	1513	0,7	0,68	4,54	5
15	α -Muroleno	1501	1499	N.I	N.I	7	N.I
16	Δ -cadineno	1515	1515	2,31	1,27	2,16	1,12
17	β -Germacreno	1556	1546	2,55	0,7	7,73	12,25
18	Spathulenol	1600	1576	N.I	N.I	3,19	N.I
19	Germacreno-4-ol	1602	1574	N.I	N.I	N.I	2
% Total de Compostos Identificados				97,99	95,88	96,66	93,02

^aIK literatura

^bIK calculado

A diversidade na composição química pode ser verificada nos cromatogramas das quatro estações do ano, nas figuras a seguir.

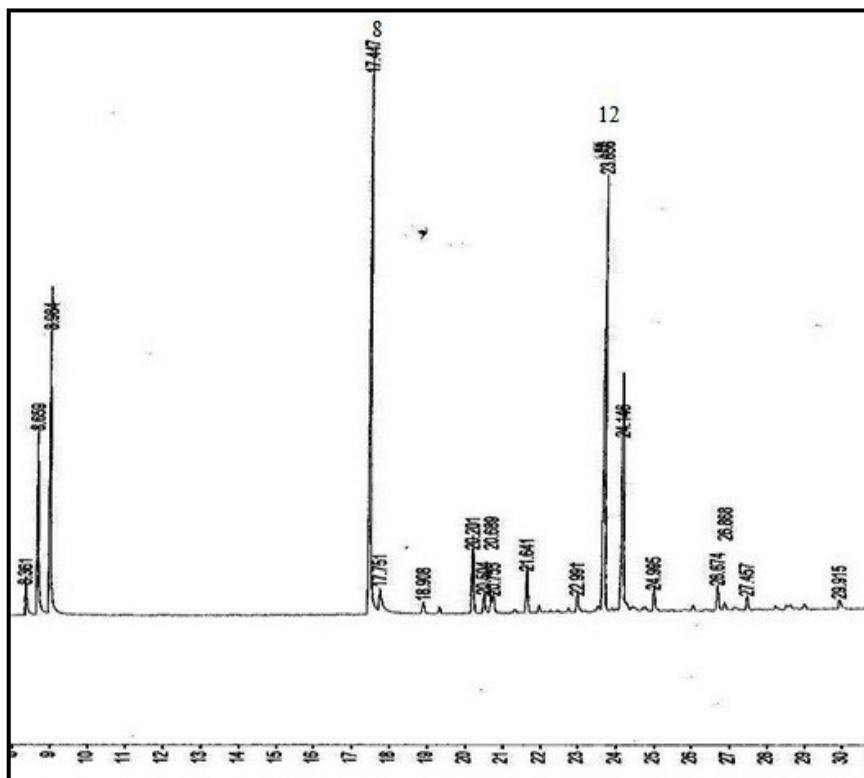


Figura 39: Cromatograma do óleo essencial de *Pilocarpus pennatifolius* extraído no inverno.

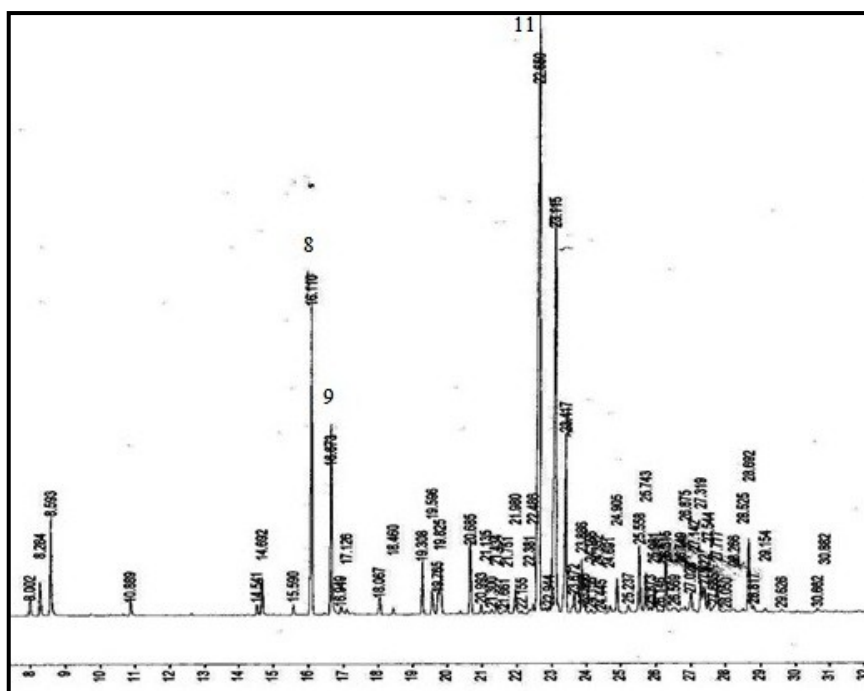


Figura 40: Cromatograma do óleo essencial da espécie *Pilocarpus pennatifolius* extraído no outono

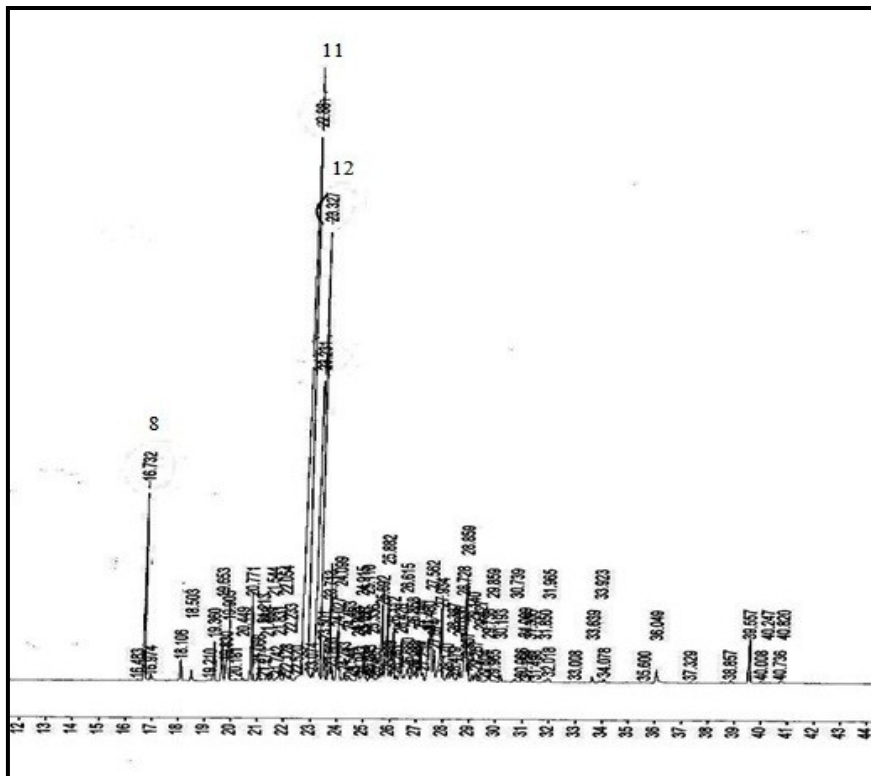


Figura 41: Cromatograma do óleo essencial da espécie *Pilocarpus pennatifolius* extraído no verão

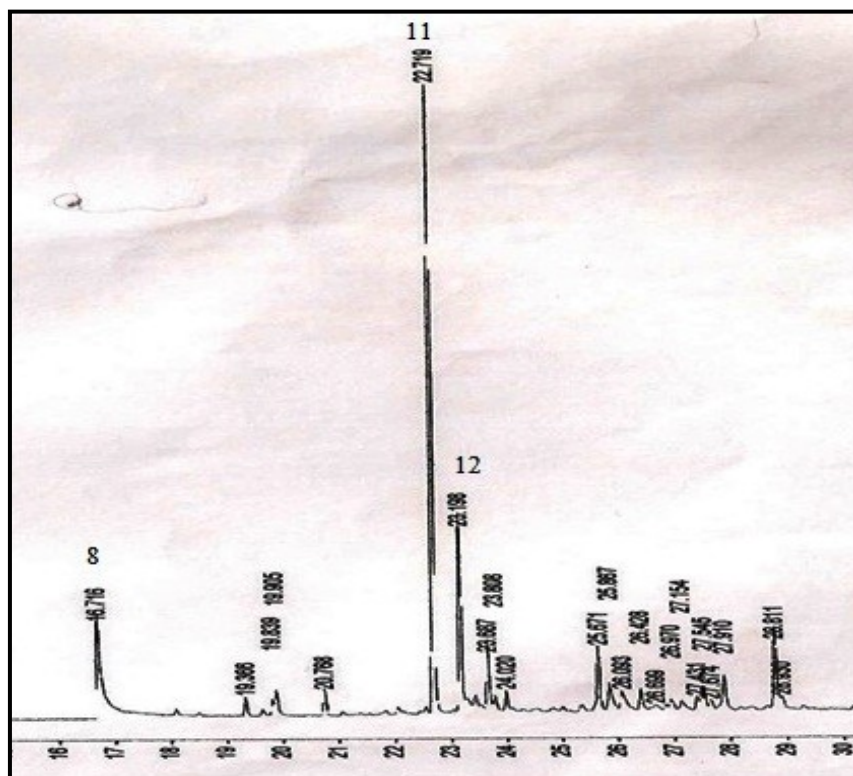


Figura 42: Cromatograma do óleo essencial da espécie *Pilocarpus pennatifolius* extraído na primavera.

Analisando a composição química dos óleos propõe-se os compostos majoritários: Undecanona, aparecendo em torno de 13% no outono, 25,54% no inverno, 10,5% na primavera e 4,1% no verão. O composto β -Germacreno também aparece em todas as estações, 12,25% no verão, 7,73% na primavera, 2,55% no outono, e no inverno em menor quantidade 0,7%. O composto α -humuleno aparece em alta concentração na primavera 35,25%, no outono 22,66% e no verão 27,1%, e em menores concentrações no inverno 1,92%. O composto E-Cariofileno se manifesta em todas as estações em torno de 23,69% no inverno, 55,74% na primavera, 26,56% no verão e 19,8% no outono. O Limoneno em baixas concentrações e somente nas estações do inverno (1,72%) e verão (0,03%).

Analisando a seguir estudos com a espécie *Pilocarpus pennatifolius* e *Pilocarpus spicatus*, têm-se alguns dos compostos identificados.

Santos et al. (2004) em estudo com a mesma espécie, mas essa coletada na Universidade de Campinas, SP, verificou-se os compostos majoritários como tridecano (56,8%) e pentadecano (25,5%), e compostos em menores concentrações como β -cariofileno (1,2%), α -humuleno (0,1%) e β -Germacreno (0,3%).

Oliveira et al. (2010) em estudo com a espécie *Pilocarpus spicatus* coletada no Parque Nacional Restinga de Jurubatiba (RJ), obteve os compostos α -Pineno (5,08%), Limoneno (41,87%), Undecanona-2 (11%), (Z)- β -Ocimeno (1,05%) e Sabineno (10,78%) como alguns dos compostos majoritários.

Através da comparação de estudos realizados dos óleos extraídos com as espécies *Pilocarpus pennatifolius* e *Pilocarpus spicatus* pode-se verificar que, os compostos majoritários encontrados diferem em parte dos compostos identificados no óleo da planta em estudo. Isso pode estar relacionado com diversos fatores extrínsecos dentre eles: tipo de solo, região da coleta, estação do ano, temperatura.

5.4 Atividade Antioxidante

Com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante da planta, realizou-se o estudo do extrato bruto e frações obtidas da espécie *Pilocarpus pennatifolius*. Esses foram analisados pelo método de DPPH, descrito na página 35. Devido a quantidade suficiente de extrato e frações, foi possível realizar um ensaio quantitativo. A leitura foi

realizado em um aparelho espectrofotômetro (Molecular Devices modelo SpectraMax M2).

Tabela 15: Dados de atividade antioxidante de frações e extrato (fracionamento 1) em $\mu\text{g/mL}$.

Concentração	% de inibição					
	BHT	EB	FCex	FEA	FEB	FAB
500	94,5387	86,4393	54,4458	95,1278	94,8030	93,78880
250	93,7585	58,4652	32,7649	95,006	77,0198	90,4993
125	93,4334	35,0791	19,2448	94,4782	49,4518	71,8635
62,5	91,3529	21,0718	10,6780	79,0499	30,4912	49,6954
31,25	86,3467	13,0328	7,3081	49,2082	19,9350	32,8461
15,6	57,2849	6,5773	3,6540	27,4056	11,3276	19,7726
7,81	36,8051	6,9427	1,4616	18,9606	7,0645	12,3020

Tabela 16: Dados de atividade antioxidante de frações e extrato (fracionamento 2) em $\mu\text{g/mL}$.

Concentração	% de inibição				
	BHT	EB	FCexB	FRB	FDiclAT
500	94,5387	74,6650	80,8769	75,7612	91,9610
250	93,7585	47,2594	49,4518	54,8111	71,3763
125	93,4334	28,1364	29,8416	35,2009	45,676
62,5	91,3529	14,7381	16,3215	23,3861	28,8672
31,25	86,3467	9,6224	7,1863	15,2253	18,6358
15,6	57,2849	4,2630	7,9171	9,3788	9,0133
7,81	36,8051	2,4360	3,6540	6,0901	6,2119

Gráfico 1: Capacidade Antioxidante do extrato bruto e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius* referente ao fracionamento 1.

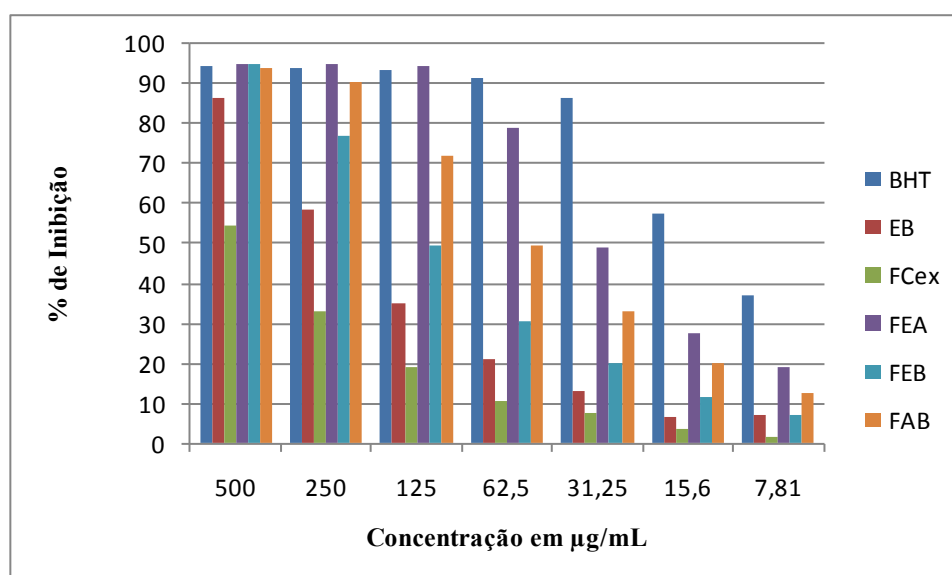


Gráfico 2: Capacidade Antioxidante do extrato bruto e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius* referente ao fracionamento 2.

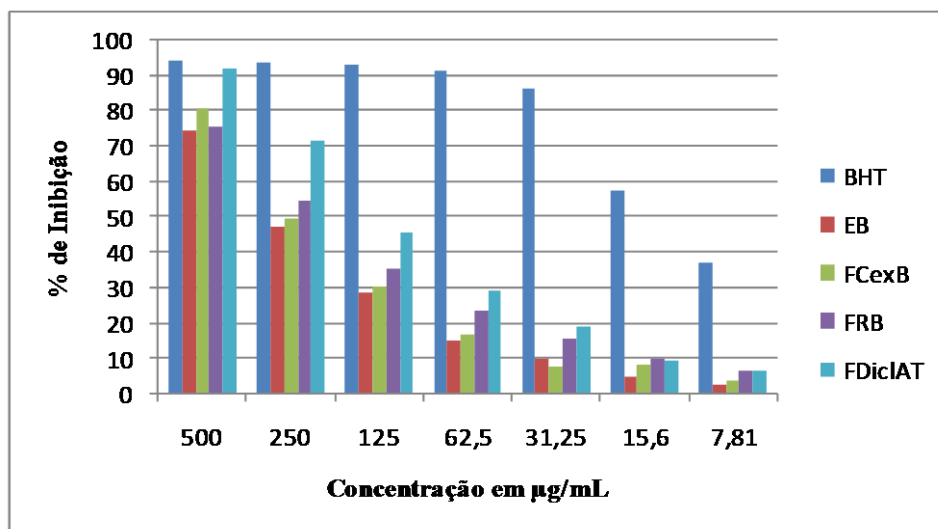


Gráfico 3: Valores de IC_{50} do extrato bruto e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius* referente ao fracionamento 1.

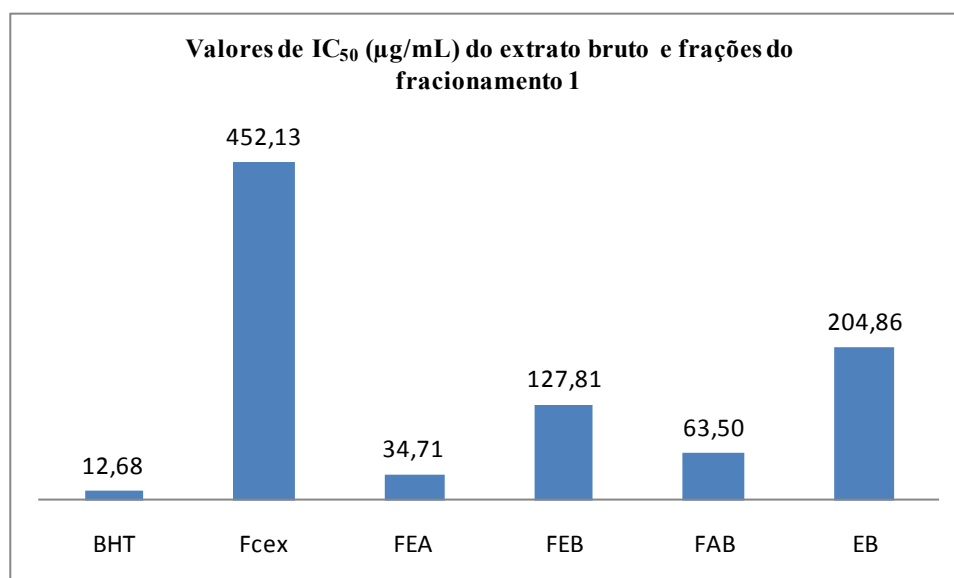
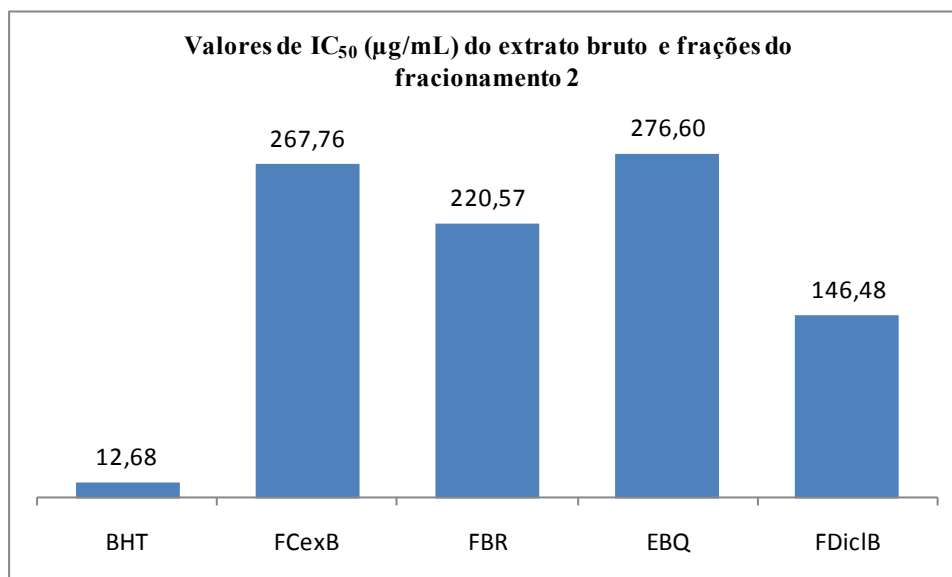


Gráfico 4: Valores de IC₅₀ do extrato bruto e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius* referente ao fracionamento 2.



A partir da análise dos valores obtidos de concentração inibitória referente aos dois fracionamentos, verificou-se que as frações etérea ácida e acetato básica apresentaram bons resultados de IC₅₀ sendo estes 34,71 µg/mL e 63,50 µg/mL respectivamente, próximo ao padrão BHT 12,68 µg/mL. As frações Dicloro Básica Alcaloides Totais (146,48 µg/mL) e Etérea Básica (127,81 µg/mL) também apresentaram capacidade antioxidante.

A substância xantotoxina isolada da fração etérea ácida foi testada frente a sua capacidade antioxidante e apresentou IC₅₀ 42,34 µg/mL quando comparado com o padrão BHT que apresentou um valor de 11,97 µg/mL. Nota-se na tabela 17, quando diminui a concentração da amostra aumenta a percentagem de inibição do radical DPPH. Pode-se dizer que a substância xantotoxina tem capacidade antioxidante nas concentrações menores que 62,5 µg/mL.

Sendo assim, analisando os resultados preliminares encontrados na fração etérea ácida, verifica-se que a capacidade antioxidante encontrada para essa fração está relacionada com o metabólito obtido xantotoxina.

Tabela 17: Capacidade Antioxidante da xantotoxina

Concentração	% de inibição	
	xantotoxina	BHT
250	23,4885	94,8488
125	24,6682	94,3887
62,5	35,6225	91,9052
31,25	57,8681	78,0154
15,6	87,8660	57,9625
7,81	90,8995	41,0371
3,09	95,4497	22,9159

5.5 Atividade Antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da espécie *Pilocarpus pennatifolius*

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana da espécie *Pilocarpus pennatifolius*, fez-se um estudo bioguiado da atividade antimicrobiana dos extratos e frações obtidos da planta em estudo. Para a realização deste teste, fez-se o uso do método de microdiluição em caldo, conforme descrito na página 38.

Todas as amostras testadas apresentaram potenciais antimicrobianos.

As tabelas 18 e 19 apresentam os resultados da atividade antifúngica do extrato e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius* obtidos no fracionamento 1. Das amostras testadas pode-se destacar o potencial antimicrobiano da Fração Etérea Ácida, frente aos microorganismos *Candida Krusei* com CIM 31,2 $\mu\text{g/mL}$ e *Cryptococcus neoformans* com CIM 125 $\mu\text{g/mL}$. A fração Acetato Básica apresentou bom potencial antimicrobiano frente aos microorganismos *Cryptococcus Gatti* e *Candida Krusei* com valores de CIM 125 $\mu\text{g/mL}$. A fração etérea básica foi mais ativa frente as leveduras *Candida Krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus Gatti* com CIM 125 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Na tabela 20, quando testadas frente a bactérias, as frações etérea ácida (FEA) e acetato básica (FAB) foram mais ativas frente a mais microorganismos comparando com as outras frações. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* e *Morganella morganii* foram inibidos com CIM 250 $\mu\text{g/mL}$.

Com relação as frações obtidas no fracionamento 2 (Tabela 22), as frações dicloro alcaloides totais (FDiclAT) e cicloexanica básica (FCexB) apresentaram bons potenciais bacteriostáticos frente as leveduras *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* com valores de CIM 125µg/mL. O extrato bruto demonstrou ser mais ativo frente a levedura *Cryptococcus neoformans* com valor de CIM 125µg/mL.

Quando testadas frente a bactérias, destacam-se principalmente a fração cicloexanica básica, onde foi mais ativa frente ao microorganismo gram-positivo *Enterococcus spp.* com valor de CIM 62,5 µg/mL e as frações resíduo básico, dicloro alcaloides totais e extrato bruto mais ativos frente aos microorganismos *Bacillus cereus* e *Enterococcus spp* (Tabela 21).

A partir dessa análise pode-se concluir que o extrato bruto e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius* apresentam atividade antimicrobiana, tanto para microorganismo como bactérias ou fungos. Sendo assim realizou o estudo da atividade antimicrobiana com os metabólitos isolados a fim de comprovar a atividade apresentada no extrato e frações.

De acordo com os dados apresentados na tabela 24, o microorganismo *Cryptococcus neoformans* foi mais sensível quanto ao poder antimicrobiano da furanocumarina xantotoxina com CIM 25µg/mL. *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapslosis* foram mais sensíveis frente a xantotoxina com CIM de 50µg/mL. Já o composto isolado bergapteno apresentou bons potenciais antimicrobianos frente aos microorganismos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Sacharomyces cerevisiae* apresentando um CIM de 50µg/mL e CLM 100µg/mL.

As substâncias xantotoxina e bergapteno foram testados frente a bactérias, onde demonstraram potenciais antimicrobianos frente as todos os microorganismos. Os microorganismos Gram-positivos *Bacillus cereus* e *Enterococcus spp* foram mais sensíveis apresentando valores de CIM 25µg/mL inferior e igual respectivamente ao padrão ampicilina, o que pode-se considerar um bom resultado (Tabela 23). Frente ao microorganismo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, os metabólitos xantotoxina e bergapteno apresentaram bom poder bacteriostático com valor de CIM 50µg/mL (Tabela 23).

O estudo da atividade antimicrobiana de diversas cumarinas realizado por Souza et al. (2005), a furanocumarina xantotoxina apresentou atividades antimicrobianas frente aos microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Escherichia*

coli, corroborando com o ensaio realizado nesse trabalho, já que o metabólito xantotoxina apresentou bom potencial antimicrobiano frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

Fez-se ainda o estudo da atividade antimicrobiana dos óleos obtidos nas estações inverno, primavera e outono.

De acordo com a tabela 25, pode-se verificar que os óleos inverno, outono e primavera demonstraram bom potencial antimicrobiano frente ao microorganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* com valor de CIM 62,5µg/mL e 125 µg/mL frente ao microorganismo Gram-negativo *Morganella morganii*. O óleo extraído no inverno apresentou ainda um bom potencial antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* com CIM de 125 µg/mL. Quando testados frente a leveduras (Tabela 26) os óleos inverno e primavera demonstraram mais suscetíveis a *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* com valores de CIM 125 µg/mL e CLM 500 µg/mL.

Tabela 18: Concentração Inibitória Mínima do extrato e frações (fracionamento 1) da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a fungos.

Microorganismos	Extrato e Frações (CIM µg/mL)					Padrão ^a
	EB	FCex	FEA	FEB	FAB	
<i>Candida albicans</i>	500	500	500	500	500	0,77
<i>Candida krusei</i>	125	125	31,2	125	125	0,77
<i>Cryptococcus neofarmans</i>	250	250	125	250	250	1,52
<i>Cryptococcus Gatti</i>	>500	>500	250	250	125	3,1
<i>Sachoromyces cerivisae</i>	500	250	250	500	500	1,52
<i>Candida parapslosis</i>	500	500	500	500	500	0,77

^a Nistatina

Tabela 19: Concentração Letal Mínima do extrato e frações (fracionamento 1) da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a fungos.

Microorganismos	Extrato e Frações (CLM µg/mL)					Padrão ^a
	EB	FCex	FEA	FEB	FAB	
<i>Candida albicans</i>	>500	>500	500	>500	>500	3,1
<i>Candida krusei</i>	>500	>500	>500	>500	>500	0,77
<i>Cryptococcus neofarmans</i>	>500	500	500	>500	500	3,1
<i>Cryptococcus Gatti</i>	500	500	250	500	500	3,1
<i>Sachoromyces cerivisae</i>	>500	>500	500	>500	>500	3,1
<i>Candida parapslosis</i>	>500	500	500	>500	>500	1,52

^a Nistatina

Tabela 20: Concentração inibitória e letal mínima de extrato e frações (fracionamento 1) da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a bactérias.

Microorganismos	Extrato e frações (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)													
	FCex		FEA		FEB		FAB		Ampicilina		Azitromicina		Levofloxacina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Gram-positivos														
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	>500	250	>500	500	500	250	>500	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77
<i>Bacillus subtilis</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77
<i>Bacillus cereus</i>	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77
<i>Enterococcus</i> spp.	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77
Gram-negativos														
<i>Escherichia coli</i>	>500	>500	250	>500	>500	>500	250	>500	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	500	250	500	250	>500	250	>500	25	50	12,5	25	0,77	0,77
<i>Burkholderia cepacia</i>	500	>500	500	>500	>500	>500	500	>500	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Shigella sonnei</i>	500	>500	250	>500	250	>500	250	>500	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77
<i>Salmonella typhimurium</i>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77
<i>Morganella morganii</i>	250	>500	250	500	250	>500	250	>500	0,77	6,2	3,1	6,2	0,77	0,77

Tabela 21: Concentração inibitória e letal mínima de extrato e frações (fracionamento 2) da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a bactérias.

Microorganismos	Extrato e frações (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)													
	FDiclAT		FBR		EB		FCexB		Ampicilina		Azitromicina		Levofloxacina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Gram-positivos														
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	>500	250	500	250	500	250	500	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77
<i>Bacillus subtilis</i>	125	>500	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77
<i>Bacillus cereus</i>	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77
<i>Enterococcus spp.</i>	125	>500	125	>500	125	>500	62,5	500	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	500	50	50	12,5	12,5	0,77	0,77
Gram-negativos														
<i>Escherichia coli</i>	250	>500	250	>500	500	>500	500	>500	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Enterobacter cloacae</i>	500	>500	500	>500	500	>500	>500	-	50	50	0,77	1,55	0,77	0,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	>500	250	>500	250	>500	500	>500	25	50	12,5	25	0,77	0,77
<i>Burkholderia cepacia</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Shigella sonnei</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77
<i>Salmonella typhimurium</i>	500	>500	500	>500	500	>500	>500	-	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77
<i>Morganella morganii</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	6,2	3,1	6,2	0,77	0,77

Tabela 22: Concentração inibitória e letal mínima de extrato e frações (fracionamento 2) da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a fungos.

Microorganismos	Extrato e frações (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)									
	FDiclAT		FBR		EB		FCexB		Nistatina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Leveduras										
<i>Cândida albicans</i>	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500	0,77	1,52
<i>Cândida tropicalis</i>	250	500	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	1,52
<i>Cândida krusei</i>	125	>500	250	>500	250	>500	125	>500	0,77	1,52
<i>Cândida parapslosis</i>	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	1,52	3,1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	500	250	>500	125	>500	125	500	0,77	3,1
<i>Cryptococcus Gatti</i>	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	0,77	1,52
<i>Sacharomyces cerivisae</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	3,1

Tabela 23: Concentração inibitória mínima e letal mínima das substâncias isoladas frente a bactérias.

Microorganismos	Substâncias (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)									
	xantotoxina		bergapteno		Ampicilina		Azitromicina		Levofloxacina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Gram-positivos										
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	>100	50	>100	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77
<i>Bacillus subtilis</i>	50	>100	25	100	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77
<i>Bacillus cereus</i>	25	>100	25	>100	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77
<i>Enterococcus spp.</i>	25	100	25	100	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77
<i>Enterobacter aerogenes</i>	50	>100	50	>100	50	50	12,5	12,5	0,77	0,77
Gram-negativos										
<i>Escherichia coli</i>	100	>100	100	>100	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Enterobacter cloacae</i>	50	>100	100	>100	50	50	0,77	1,55	0,77	0,77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	>100	50	>100	25	50	12,5	25	0,77	0,77
<i>Burkholderia cepacia</i>	100	>100	100	>100	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Shigella sonnei</i>	50	>100	100	>100	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	>100	50	>100	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77
<i>Morganella morganii</i>	100	>100	50	>100	0,77	6,2	3,1	6,2	0,77	0,77

Tabela 24: Concentração inibitória mínima e letal mínima das substâncias isoladas frente a fungos.

Microorganismos	Substâncias (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)					
	xantotoxina		bergapteno		Nistatina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Leveduras						
<i>Cândida albicans</i>	50	>100	50	>100	0,77	1,52
<i>Cândida tropicalis</i>	100	>100	50	>100	0,77	1,52
<i>Cândida krusei</i>	50	>100	50	>100	0,77	1,52
<i>Cândida parapslois</i>	50	>100	100	>100	1,52	3,1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	25	>100	50	>100	0,77	3,1
<i>Cryptococcus gatti</i>	100	>100	100	>100	0,77	1,52
<i>Sacharomyces cervisiae</i>	>100	-	50	>100	0,77	3,1

Tabela 25: Concentração inibitória e letal mínima dos óleos voláteis da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a bactérias.

Microorganismos	Óleos voláteis (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)											
	Óleo Inverno		Óleo outono		Óleo primavera		Ampicilina		Azitromicina		Levofloxacina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Gram-positivos												
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	500	250	500	250	500	0,77	50	0,77	50	0,77	0,77
<i>Bacillus subtilis</i>	125	500	250	500	250	500	0,77	50	0,77	0,77	0,77	0,77
<i>Bacillus cereus</i>	250	>500	250	>500	250	>500	50	50	1,55	1,55	0,77	0,77
<i>Enterococcus spp.</i>	62,5	250	62,5	500	62,5	500	25	50	1,55	6,2	0,77	0,77
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	>500	250	>500	250	>500	50	50	12,5	12,5	0,77	0,77
Gram-negativos												
<i>Escherichia coli</i>	500	>500	500	>500	500	>500	3,1	25	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Enterobacter cloacae</i>	250	>500	250	>500	250	>500	50	50	0,77	1,55	0,77	0,77
<i>Pseudomonas saeroginosa</i>	250	500	250	500	250	500	25	50	12,5	25	0,77	0,77
<i>Burkholderia cepacia</i>	250	>500	250	>500	500	>500	50	50	1,55	3,1	0,77	0,77
<i>Shigella sonnei</i>	250	500	250	500	250	>500	25	50	3,1	3,1	0,77	0,77
<i>Salmonella typhimurium</i>	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	0,77	3,1	6,2	0,77	0,77
<i>Morganella morganii</i>	125	>500	125	>500	125	>500	0,77	6,2	3,1	6,2	0,77	0,77

Tabela 26: Concentração inibitória e letal mínima dos óleos voláteis da espécie *Pilocarpus pennatifolius* frente a fungos.

Microorganismos	Óleos voláteis (CIM/CLM $\mu\text{g/mL}$)							
	Óleo Inverno		Óleo outono		Óleo primavera		Nistatina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
	Leveduras							
<i>Cândida albicans</i>	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	1,52
<i>Cândida tropicalis</i>	250	>500	500	>500	500	>500	0,77	1,52
<i>Cândida krusei</i>	125	500	250	>500	125	>500	0,77	1,52
<i>Cândida parapslosis</i>	250	>500	250	>500	500	>500	1,52	3,1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	500	250	>500	125	>500	0,77	3,1
<i>Cryptococcus sgatti</i>	500	>500	500	>500	250	>500	0,77	1,52
<i>Sacharomyces cervisiae</i>	250	>500	250	>500	250	>500	0,77	3,1

5.6 Análise Cromatográfica do extrato bruto das folhas e casca da espécie *Pilocarpus pennatifolius*

Os extratos brutos obtidos das folhas e casca da espécie *Pilocarpus pennatifolius* foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de verificar a presença de pilocarpina (9) na espécie.

A pilocarpina foi obtida através de um colírio (medicamento comercial) denominado Allergan que apresenta em sua composição 1% de cloridrato de pilocarpina. O medicamento é usado para o tratamento de glaucoma.

Os extratos da casca e das folhas da espécie *Pilocarpus pennatifolius* e o padrão pilocarpina foram injetados nas condições descritas na pag. 23.

Na figura 43, referente ao cromatograma da pilocarpina, verifica-se que o tempo de retenção em 5,0 min corresponde a pilocarpina. Comparando-se com os cromatogramas correspondentes ao extrato bruto das folhas (Figura 45) e o extrato bruto da casca (Figura 44) pode-se visualizar que não há a presença de pilocarpina, já que o pico em 5,0 min não foi identificado.

Enquanto que Sawaya et al. (2011) em estudo com diversas espécies do gênero pilocarpus, identificou e quantificou a percentagem de alcaloides e de pilocarpina presente nos extratos brutos através de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial com ionização por eletrospray. A espécie *Pilocarpus pennatifolius* coletada no estado de São Paulo, apresentou cerca de 14,2% de pilocarpina no extrato bruto obtido das folhas já a espécie *Pilocarpus jaborandi* apresentou a maior percentagem de pilocarpina no extrato cerca de 70,8%.

O que se pode afirmar é que a constituição química da espécie estudada varia conforme os fatores extrínsecos, já que não foi possível a identificação da pilocarpina na espécie estudada.

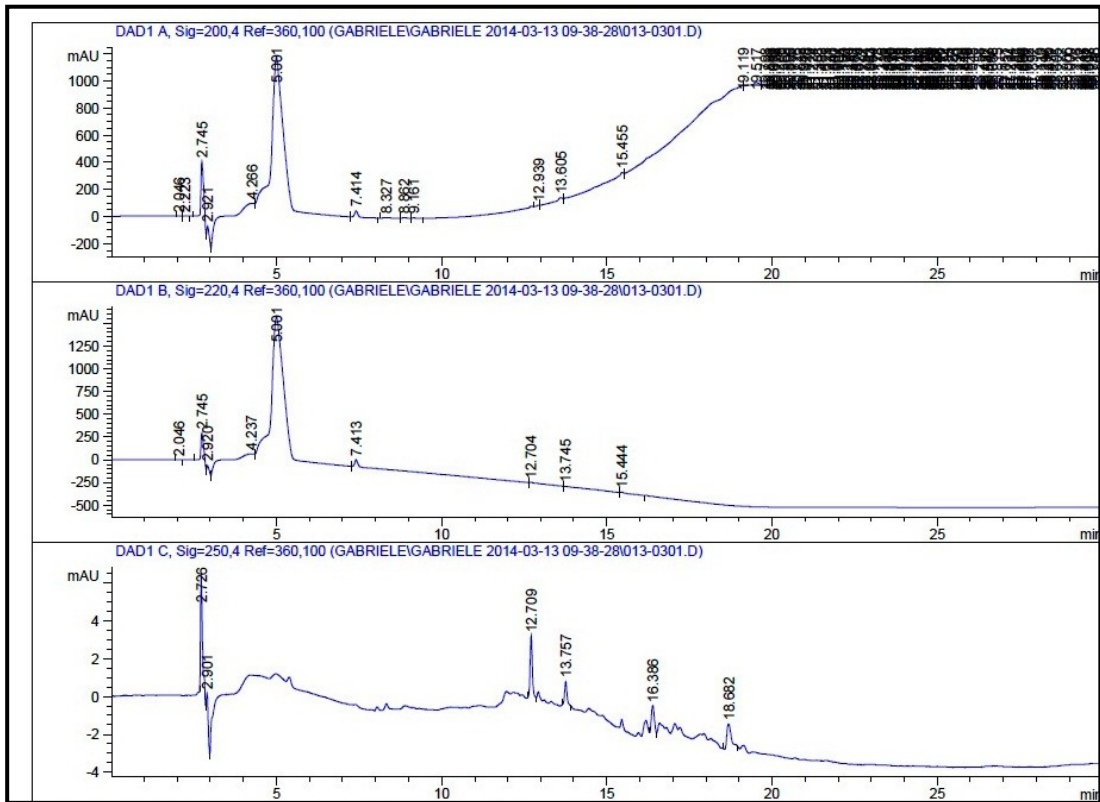


Figura 43: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da pilocarpina. a) $\lambda=200$ nm, b) $\lambda=220$ nm, c) $\lambda=250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H₂O, fluxo 1mL.min⁻¹, coluna C18.

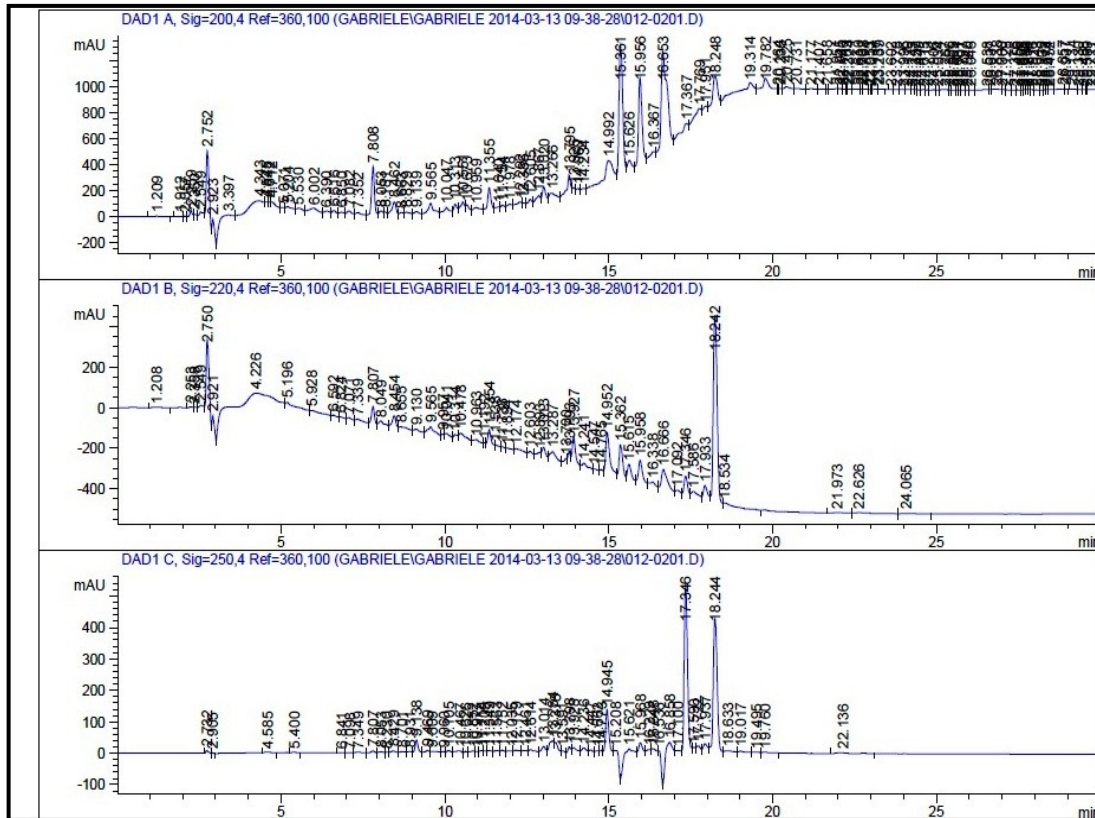


Figura 44: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do extrato bruto da casca. a) $\lambda = 200$ nm, b) $\lambda = 220$ nm, c) $\lambda = 250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H₂O, fluxo 1 mL.min⁻¹, coluna C18

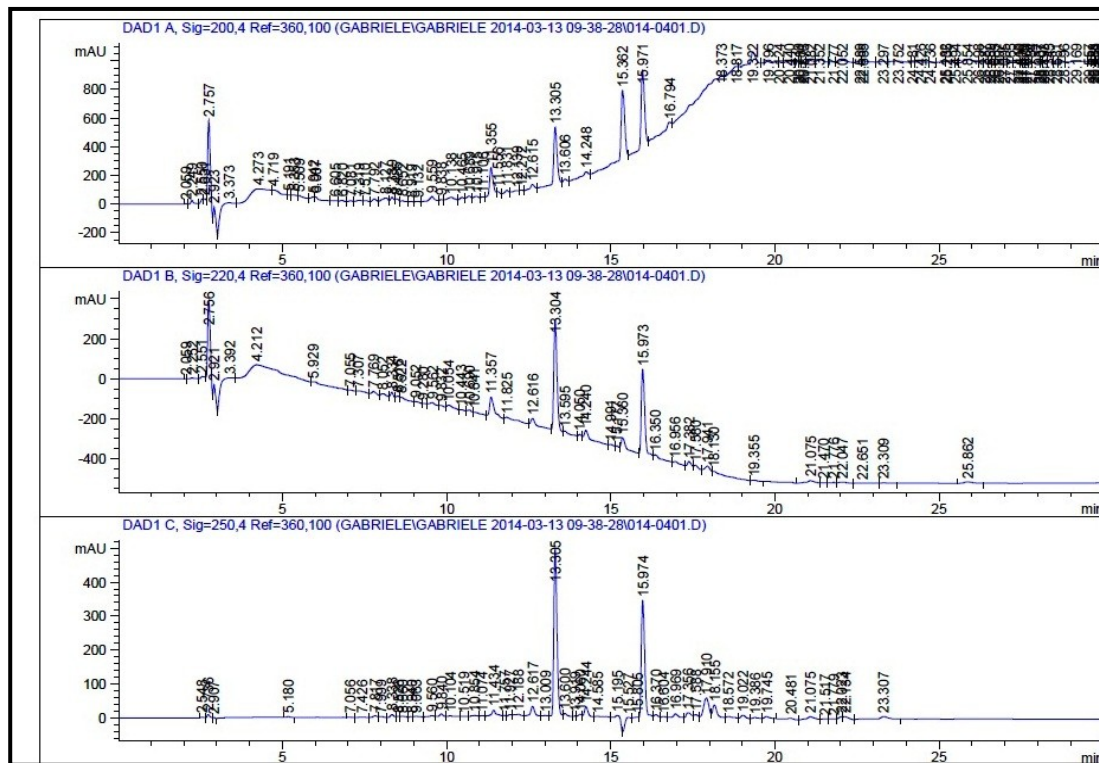


Figura 45: Espectro de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das folhas. a) $\lambda = 200$ nm, b) $\lambda = 220$ nm, c) $\lambda = 250$ nm. Sistemas de solventes: gradiente 95:05% MeOH em H₂O, fluxo 1 mL.min⁻¹, coluna C18.

6. Conclusão

A análise fitoquímica da espécie *Pilocarpus pennatifolius* levou aos seguintes resultados:

- Através do fracionamento ácido-base foi possível o isolamento de dois metabólitos pertencentes a classe das furanocumarinas e um alcalóide imidazólico.
- O fracionamento alcalóides totais levou ao isolamento de um metabólito pertencente a classe das furanocumarinas que também foi obtido no fracionamento ácido-base.
- Isolamento e determinação estrutural de um alcaloide imidazólico (G01) pela primeira vez
- Através da comparação sazonal realizada a partir da extração, por hidrodestilação, do óleo essencial da espécie *Pilocarpus pennatifolius*, pode-se perceber a diferença na composição química, onde α -humuleno e E-cariofileno aparece em todas as estações em quantidades relevantes, ao passo que o limoneno se manifesta apenas no inverno e verão em baixas concentrações.
- Através do método de DPPH foi avaliada a atividade dos extratos e frações da espécie *Pilocarpus pennatifolius*. Avaliando os valores encontrados através do cálculo do IC₅₀, dá-se destaque para as frações etérea ácida e acetato básica, resultando em valores próximos ao padrão BHT. Pode-se dizer que a substância xantotoxina é responsável pela capacidade antioxidante encontrada na fração etérea ácida, já que apresentou o IC₅₀ 42,34 $\mu\text{g/mL}$ próximo ao padrão BHT.
- A ação antimicrobiana do extrato bruto, frações e compostos isolados foram testados pelo método de microdiluição em caldo. As frações etérea ácida e acetato básica obtidas no fracionamento 1 foram as mais ativas quando testadas frente a levedura e bactérias. Já as frações alcalóides totais e cicloexanica básica foram as mais ativas quando comparadas com as outras frações obtidas do fracionamento 2. As substâncias isoladas xantotoxina e bergapteno apresentaram bons potenciais antimicrobianos, destacam-se frente aos microorganismos *Bacillus cereus* e *Enterococcus spp* com valor de CIM 25 $\mu\text{g/mL}$.
- Devido a pouca quantidade e a necessidade de realizar outras análises de RMN de ¹H e ¹³C, não poder ser realizado o ensaio antimicrobiano e antioxidante do alcaloide imidazólico G01.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, I. N. et al. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1205-1213, 2007.

ABREU, I. N., SAWAYA, A. C. H. F., EBERLIN, M. N. and MAZZAFERA, P. Production of pilocarpine in callus of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 806-811, 2005.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois, 456p., 1995.

BERNAUER, K.; LINK, H. Über die Synthese der Pilocarpus-Alkaloide Isopilosin und Pilocarpin, sowie die absolute Konfiguration des (+)- isopilosins. **Helvetica Chimica Acta**, v. 55, n. 4, p. 1053-1062, 1972.

BERTRAND, C.; FABRE, N.; MOULIS, C. Constituents of *Pilocarpus trachylophus*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 844-847, 2001.

CHAUDHARY, A. K.; DEVI, R.; VANDANA, S. Antidiabetic activity of *Pilocarpus microphyllus* extract on streptozotocin-induced diabetic mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, n. 13, 2010.

CHO, J. I. et al. New coumarins and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum avicennae*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 17-23, 2012.

DAVIES, G. S. et al. A practical and scalable total synthesis of the jaborandi alkaloid (+)-pilocarpine. **Tetrahedron**, v. 65, p. 8283-8296, 2009.

DAVIES, S. G. et al. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosine. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 3509-3512, 2009.

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.

DUARTE, M. R.; GOLAMBIUK, G.; COSTA, R. E. Ilustração de Caracteres Microscópicos de Drogas Vegetais para o Controle de Qualidade Farmacognóstico. IV. Jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lem.; Rutaceae). **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 2, p.7-14, 2009.

DUGRAND, A. et al. Coumarin and Furanocoumarin Quantitation in Citrus Peel via Ultrapformance Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry (UPLC-MS). **Journal of Agricultural Food and Food Chemistry**, v. 61, p. 10677-10684, 2013.

ELGAMAL, M. H. A.; ELEWA, E. A. M.; DUDDECK, H. ^{13}C NMR Chemical Shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones. **Phytochemistry**, v. 18, p. 139-143, 1979.

FDA (Food and Drugs Administration: Code of Federal Regulations). Cap. 21, 300, 1991.

FERNANDES, J. B. et al. Sesquiterpenos do caule de *Pilocarpus riedelianus* e atividades sobre microorganismos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 986-990, 2005.

FERNANDES, T. S. **Análise Fitoquímica e Estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima Acetilcolinesterase da espécie *Helietta apiculata* Benth.** 2011, 139p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.

FERREIRA, M. E. et al. Antileishmanial activity of furanoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 375-378, 2010.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, 2006.

GARCIA, A. A.; PEREZ, E. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia)**, Série Fisiologia vegetal, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GROPPO, M. et al. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 985-1005, 2008.

GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Biological activity of some coumarins from Sri Lanka Rutaceae. **Journal Natural Products.**, v. 57, n. 4, p. 518-520, 1994

LEHTINEN, J., et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 381–389, 2006.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MAGIATIS, P. et al. Natural and Synthetic 2,2-dimethylpyranocoumarins with Antibacterial Activity. **Journal Natural Products**, v. 68, p. 78-82, 2005.

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, SP, 2006.

MELO, M. F. F.; ZICKEL, C. S. Os gêneros *Zanthoxylum* e *Esenbeckia* (Rutaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 73-90, 2004.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Fitoterapia**, v. 15, p.127-130, 2001.

MMA (Ministério do meio ambiente). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-e-promo%C3%A7%C3%A3o-do-uso-da-diversidade-gen%C3%A9tica/plantas-para-o-futuro>. Acesso em: 8 de dezembro de 2013.

MORAIS, S. M. de, BRAZ-FILHO, R. **Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos**. Editora da Universidade Estadual do Ceará (EdUECE), Ceará, Fortaleza, 2007.

MULLER, A. H. et al. Methoxyfurocoumarins from *Pilocarpus Riedelianus*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 2, p. 585-586, 1993.

NASCIUTTI, P. R. Desenvolvimento de novos fármacos. Goiânia, 2012. Disponível em: http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_1%C2%B0_Semin%C3%A1rio_PRISCILLA_NASCIUTTI.pdf?1350665635. Acesso em: 8 de dezembro de 2013.

NAWAL, H. M.; MAHROUS, A. E. Chemical constituents of *Descurainia Sophia* L. and its Biological Activity. **Records Natural Products**, v.3, n.1, p. 58-67, 2009.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard; 7th ed. CLSI document M7-A7, Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2006.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeast**: approved standard; 7th ed. CLSI document M27-A2. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

NETO, A. M.; MENDES, P. H.; SILVEIRA, E. R. An Imidazole Alkaloid and other constituents from *Pilocarpus Trachyllophus*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 885-887, 1996.

OLIVEIRA, A. P. et al. Chemical and Biological Investigations of *Pilocarpus spicatus* essential oils. **Boletín Latinoamericano y 98 el Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 3, p. 206-211, 2010.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PONZI, E. A. C. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Revista Circular e Traumatologia Buco-Maxilo-facial**, v. 10, n. 1, p. 89-94, 2010.

RHAMANI, M. et al. Antioxidant activity – guided separation of coumarins and lignin from *Melicope glabra*. **Food Chemistry**, v. 139, p. 87-92, 2013.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editora Premier: a ciência em livros, 1997.

SANTOS, A. P. et al. Analises of the volatile oil from *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire (Rutaceae) leaves by GC-MS. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 325-326, 2004.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. H. R. *Pilocarpus* spp.: A Survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, 2004.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. Alkaloids Derived from Histidine: Imidazole (Pilocarpine, Pilosine). In: **Natural Products**. Springer Berlin Heidelberg, p. 861-882 2013.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Pilocarpine and Related Alkaloids in *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae). **Alkaloids**. Cap. 3, p. 63 a 80, 2010.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of Pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genet Resour Crop Evol**, v. 58, p. 471-480, 2011.

SERKEROV, S.V.; KASUMOVA, G.K. A new natural methoxyfurocoumarin from *Heracleum pastinacifolium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p. 358-359, 2011.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal Natural Products**, v. 76, p. 1071-1077, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SKORUPA, L. A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae)**, 1996, 426p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, SP, 1996.

SOUZA, L. A. et al. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira Botanica.**, v. 26, n. 2, p. 175-184, 2003.

SOUZA, O. V. et al. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 236-241, 2007.

SOUZA, R. C. et al. A New Imidazole Alkaloid and other constituents from *Pilocarpus grandiflorus* and their Antifungal Activity. **Z. Naturforsch**, 60b, p. 787-791, 2005.

SOUZA, S. M.; MONACHE, F. D.; JUNIOR, A. S. Antibacterial Activity of Coumarins. **Z. Naturforsch**, 60c, p. 693-700, 2005.

SUÁREZ, L. H. C.; BARRERA, C. A. C. Metabolites isolated from *Esenbeckia alata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 386-388, 2007.

TEDESHI, E. et al. Isolation, Characterization, and Synthesis of trans-Pilosine Stereoisomers Occurring in Nature. Circular Dichroism and Mass Spectral Studies. **Journal Organic Chemistry**, v. 39, n. 13, p. 1864-1870, 1974.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VATS, M.; SINGH, H.; SARDANA, S. Phytochemical screening and antimicrobial activity of roots of *Murraya Koenigii* (Linn.) Spreng. (Rutaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1569-1573, 2011.

VERAS, L. M. et al. Activity of Epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2051-2058, 2012.

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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

VIEIRA, P. C. et al. In Vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Tripanossoma Cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 335-340, 2000.

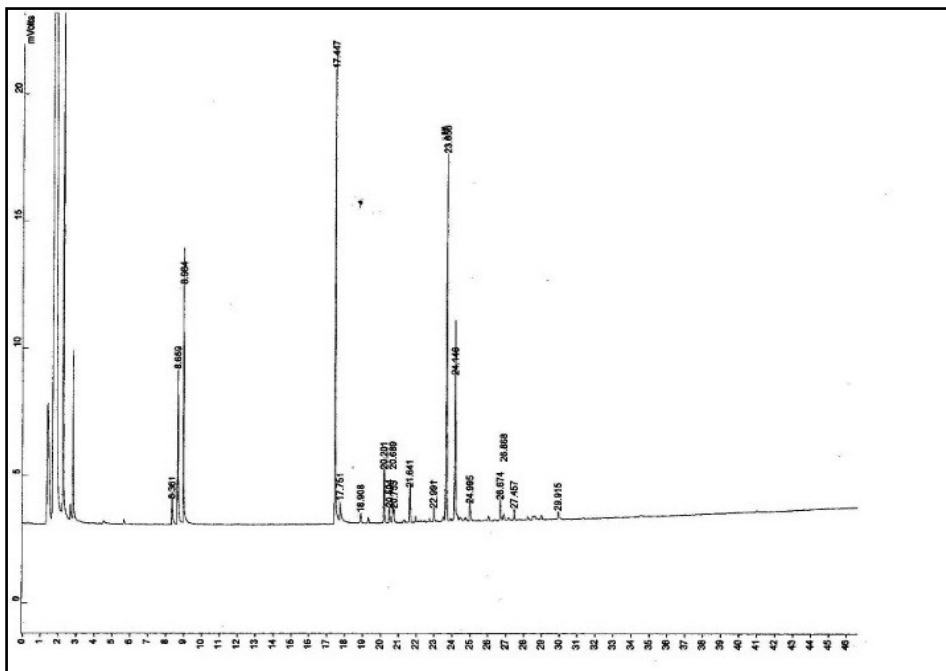
YOUNG, M. C. M. et al. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 374-380, 2012.

YU, J. et al. Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2009-2014, 2005.

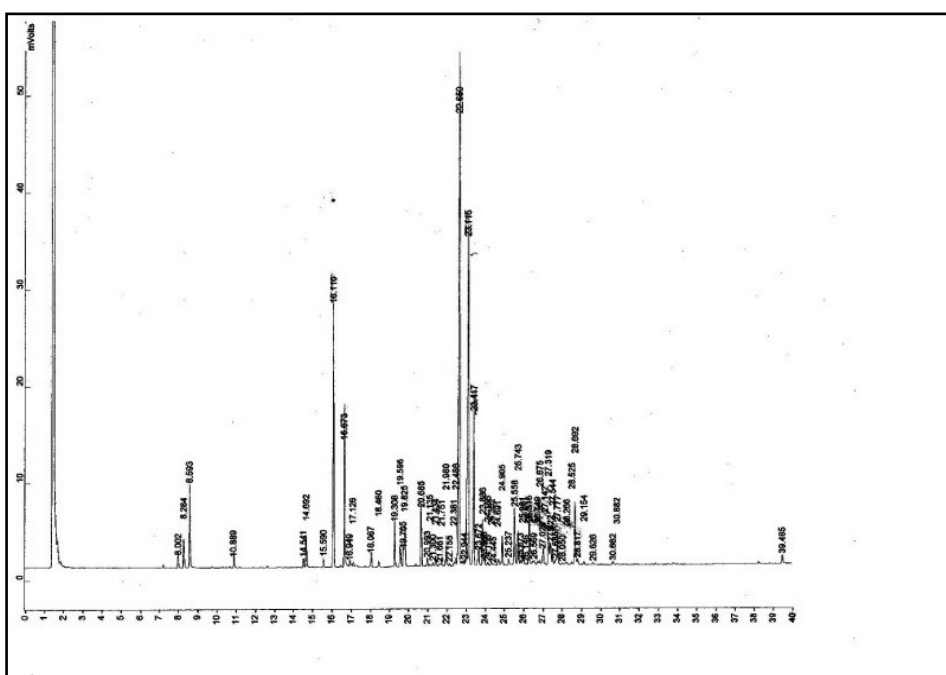
ANEXOS

Anexo 1: Dados da determinação da estrutura a partir da difração de raios X

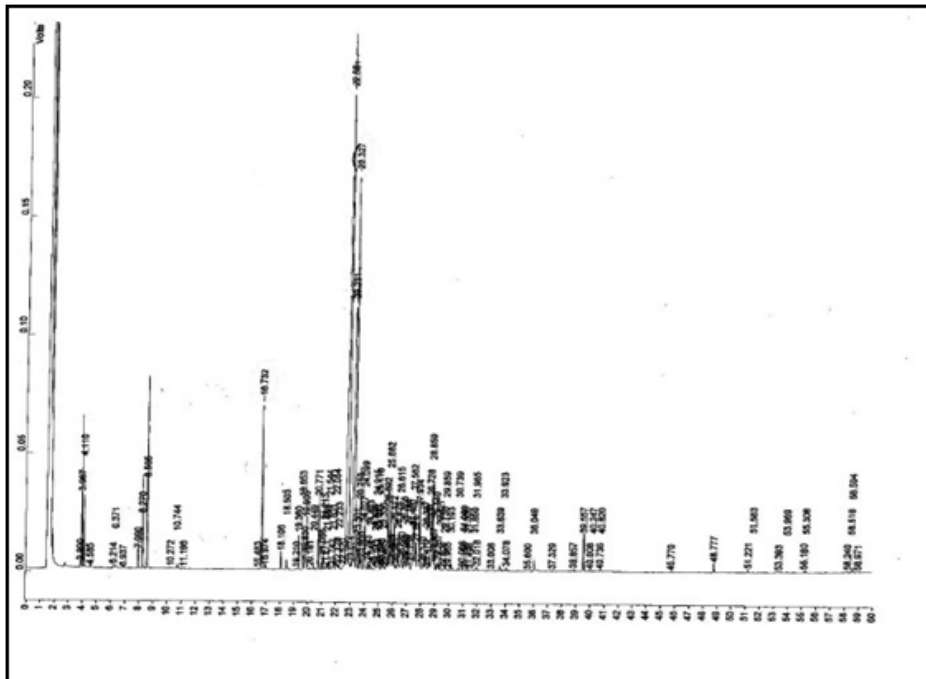
Xantotoxina	
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₈ O ₄
Peso molecular	216.18
Temperatura (K)	100(2)K
Radiação, λ (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Dimensões da célula unitária (Å)	a= 12.404(18) $\alpha=90^\circ$
	b= 6,088 (7) $\beta= 98.22 (4)^\circ$
	c= 12.609 (18) $\gamma=90^\circ$
Volume (Å ³)	942(2)
Z	4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1.524
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,116
F(000)	448
Dimensão do cristal (mm ³)	0,300x 0,110 x 0,069
Região de varredura de θ	1,63 a 28,33°.
Índices limitantes	-14<=h<=13;-7<=k<=5;-11<=l<=15.
Reflexões medidas	4625
Reflexões independentes	2914 [R (int)= 0,0802]
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restrições/ parâmetros	2914/ 1/ 291
Goodness-of-fit on F ²	1,049
Final R indices [I>2 σ (I)]	R ₁ = 0,0661, wR ₂ = 0,1291
R indices (todos os dados)	R ₁ = 0,1792, wR ₂ = 0,1706
Densidade eletrônica residual (e. Å ⁻³)	0,369 e -0,539



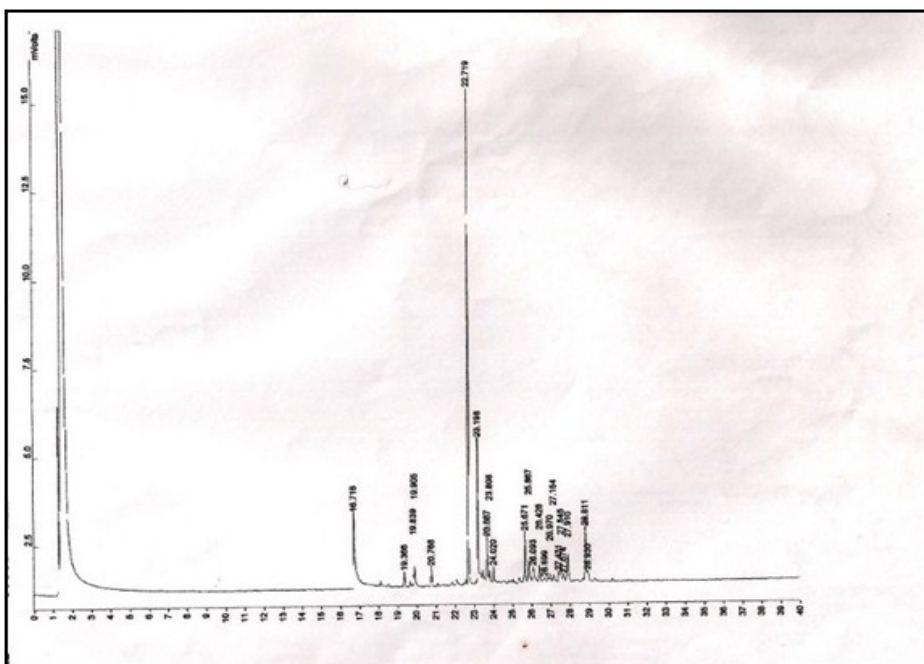
Anexo 2: Cromatograma do óleo extraído no inverno



Anexo 3: Cromatograma do óleo extraído no outono



Anexo 4: Cromatograma do óleo extraído no verão



Anexo 5: Cromatograma do óleo extraído na primavera