

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Rauia nodosa* E *Spiranthera atlantica*
(RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA
DOS EXTRATOS E ALCALOIDES ISOLADOS

MICHELLE RODRIGUES E ROCHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
AGOSTO- 2015

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Rauia nodosa* E *Spiranthera atlantica*
(RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA
DOS EXTRATOS E ALCALOIDES ISOLADOS**

MICHELLE RODRIGUES E ROCHA

"Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais."

**Orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira
Co-Orientador: Prof. Dr. Raimundo Braz Filho**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

61/2015

Rocha, Michelle Rodrigues e

Estudo fitoquímico de *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica* (Rutaceae) e avaliação da atividade anticancerígena dos extratos e alcaloides isolados / Michelle Rodrigues e Rocha. – Campos dos Goytacazes, 2015.

xxvii, 273 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2015.

Orientador: Ivo José Curcino Vieira.

Coorientador: Raimundo Braz Filho.

Área de concentração: Biorgânica.

Bibliografia: f. 263-273.

1. ALCALOIDES 2. ESTEROIDES 3. RMN 4. ESI(+)-MS 5. ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

CDD 547.72

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Rauia nodosa* E *Spiranthera atlantica*
(RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA
DOS EXTRATOS E ALCALOIDES ISOLADOS**

MICHELLE RODRIGUES E ROCHA

"Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais."

Aprovado em 5 de agosto de 2015.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Jucimar Jorgeane de Souza (Dr^a. Ciências Naturais) - UNESA

Prof^a. Heloísa Alves Guimarães (Dr^a. Ciências Naturais) - IFF

Prof^a. Daniela Barros de Oliveira (Dr^a. Química de Produtos Naturais) - UENF

Prof. Raimundo Braz Filho (Dr. Química Orgânica) - UENF

CO-ORIENTADOR

Esta Tese de Doutorado foi orientada pelo Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira

A minha mãe, Andrea Maria, por compartilhar comigo o prazer da leitura, ao meu pai, José Virque, por me fazer sorrir nos momentos mais difíceis e ao meu avô, Tico-Tico, por toda a ajuda.

AGRADECIMENTOS

- A Deus;
- Aos meus pais, pelo incentivo e companheirismo diante às dificuldades;
- Ao Prof. Ivo pela orientação e acima de tudo pelo apoio e amizade;
- Ao Prof. Raimundo Braz Filho pelo auxílio e ensinamentos inestimáveis;
- Ao professor Milton M. Kanashiro pela colaboração na realização deste trabalho;
- Aos amigos Amanda, Hádria, Gilles, Jucimar, Lara, Rafaela, Sarah, Vinícius e Wallas pela ajuda, companheirismo e amizade;
- Aos companheiros de laboratório por toda a ajuda nestes anos;
- As professoras Daniela Barros de Oliveira, Jucimar Jorgeane de Souza e Heloisa Alves Guimarães que fizeram parte da banca;
- A UENF, CAPES e FAPERJ pela estrutura e concessão de bolsa;
- Ao Pedro por todo carinho, companheirismo e paciência.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxiii
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xxv
RESUMO.....	xxvi
ABSTRACT.....	xxvii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Importância dos produtos naturais e do estudo fitoquímico de novas espécies.....	1
1.2. Justificativa para os estudos de novas substâncias naturais no tratamento do câncer.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3.REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. Família Rutaceae.....	4
3.2. Subtribo Galipenae e seus gêneros.....	4
3.2.1. <i>Adiscanthus</i>	6
3.2.1.1. Estudos Fitoquímicos.....	6
3.2.1.2. Atividades Biológicas.....	7
3.2.2. <i>Almeidea</i>	7
3.2.2.1. Estudos Fitoquímicos.....	7
3.2.2.2. Atividades Biológicas.....	11
3.2.3. <i>Andreodoxa</i>	13
3.2.3.1. Estudos fitoquímicos.....	13
3.2.4. <i>Angostura</i>	14
3.2.4.1. Estudos Fitoquímicos.....	14
3.2.4.2. Atividades Biológicas.....	15
3.2.5. <i>Conchocarpus</i>	15
3.2.5.1. Estudos Fitoquímicos.....	15
3.2.5.2. Atividades Biológicas.....	20
3.2.6. <i>Desmotes</i>	23

3.2.6.1. Estudos Fitoquímicos.....	23
3.2.6.2. Atividades Biológicas.....	23
3.2.7. <i>Ertela</i>	24
3.2.7.1. Estudos Fitoquímicos.....	24
3.2.7.2. Atividades Biológicas.....	24
3.2.7.3. Levantamento Etnofarmacológico.....	27
3.2.8. <i>Erythrochiton</i>	27
3.2.8.1. Estudos Fitoquímicos.....	27
3.2.8.2. Levantamento Etnofarmacológico.....	27
3.2.9. <i>Euxylophora</i>	28
3.2.9.1. Estudos Fitoquímicos.....	28
3.2.10. <i>Galipea</i>	30
3.2.10.1. Estudos Fitoquímicos.....	30
3.2.10.2. Atividades biológicas.....	35
3.2.10.3. Levantamento Etnofarmacológico.....	39
3.2.11. <i>Leptothyrsa</i>	39
3.2.11.1. Estudos Fitoquímicos.....	39
3.2.12. <i>Neoraputia</i>	40
3.2.12.1. Estudos Fitoquímicos.....	40
3.2.12.2. Atividade Biológicas.....	43
3.2.13. <i>Raputia</i>	44
3.2.13.1. Estudos Fitoquímicos.....	44
3.2.14. <i>Rauia</i>	46
3.2.14.1. Estudos Fitoquímicos.....	46
3.2.14.2. Atividades Biológicas.....	48
3.2.15. <i>Ravenia</i>	49
3.2.15.1. Estudos Fitoquímicos.....	49
3.2.15.2. Atividades Biológicas.....	50
3.2.16. <i>Sigmanthus</i>	51
3.2.16.1. Estudos Fitoquímicos.....	51
3.2.16.2. Atividades Biológicas.....	52
3.2.17. <i>Spiranthera</i>	52
3.2.17.1. Estudos Fitoquímicos.....	52
3.2.17.2. Atividades Biológicas.....	54

3.2.17.3. Levantamento Etnofarmacológico.....	59
3.2.18. <i>Ticorea</i>	60
3.2.18.1. Estudos Fitoquímicos.....	60
3.3. O câncer e os principais produtos naturais empregados no seu tratamento.....	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1. Materiais.....	66
4.1.1. Reagentes, Solventes e Vidrarias.....	66
4.1.2. Equipamentos.....	66
4.2. Métodos.....	67
4.2.1. Coleta do material vegetal e identificação botânica.....	67
4.2.2. Secagem e moagem.....	67
4.2.3. Isolamento e purificação das substâncias orgânicas por técnicas cromatográficas.....	67
4.2.4. Análises espectrométricas de Infravermelho.....	68
4.2.5. Análises espectrométricas de Ressonância Magnética Nuclear.....	68
4.2.6. Análises de espectrometria de massas.....	68
4.2.7. Preparação dos Extratos Brutos.....	69
4.2.8. Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos da espécie <i>Rauia nodosa</i>	69
4.2.8.1. Resumo dos constituintes químicos isolados do extrato em hexano dos galhos de <i>Rauia nodosa</i> (4,70 g)	69
4.2.8.2. Análise detalhada das frações obtidas do extrato em hexano (4,70 g) dos galhos de <i>Rauia nodosa</i>	72
4.2.8.3. Resumo dos constituintes químicos isolados do extrato em metanol dos galhos de <i>Rauia nodosa</i> (118,9 g)	79
4.2.8.4. Análise detalhada das frações obtidas do extrato em metanol (55,53 g) dos galhos de <i>Rauia nodosa</i>	81
4.2.9. Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos da espécie <i>Spiranthera atlantica</i>	83
4.2.9.1. Resumo dos constituintes químicos isolados do extrato em metanol dos galhos de <i>Spiranthera atlantica</i> (100,48 g)	83
4.2.9.2. Análise detalhada das frações obtidas do extrato em metanol (43,48	

g) dos galhos de <i>Spiranthera atlantica</i>	85
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	91
5.1. Substâncias isoladas e identificadas da espécie <i>Rauia nodosa</i>	91
5.1.1. Alcaloides isolados de <i>R. nodosa</i>	91
5.1.2. Cumarina isolada de <i>R. nodosa</i>	91
5.1.3. Esteroides isolados de <i>R. nodosa</i>	92
5.2. Substâncias isoladas e identificadas da espécie <i>Spiranthera atlantica</i>	93
5.2.1. Alcaloides isolados de <i>S. atlantica</i>	94
5.2.2. Triterpeno isolado de <i>S. atlantica</i>	95
5.3. Determinação estrutural das substâncias isoladas.....	95
5.3.1. Alcaloides.....	95
5.3.1.1. Alcaloides isolados da espécie <i>Rauia nodosa</i>	97
5.3.1.1.1. Determinação estrutural da substância RN-01.....	97
5.3.1.1.2. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias RN-02 e RN-03.....	107
5.3.1.2. Alcaloides isolados da espécie <i>Spiranthera atlantica</i>	119
5.3.1.2.1. Determinação estrutural da substância SA-01.....	119
5.3.1.2.2. Determinação estrutural da substância SA-02.....	129
5.3.1.2.3. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias SA-03, SA-04 e SA-05.....	139
5.3.1.2.4. Determinação estrutural da substância SA-06.....	155
5.3.1.2.5. Determinação estrutural da substância SA-07.....	167
5.3.1.2.6. Determinação estrutural da substância SA-08.....	179
5.3.2. Cumarinas.....	195
5.3.2.1. Cumarina isolada da espécie <i>Rauia nodosa</i>	196
5.3.2.1.1. Determinação estrutural da substância RN-04.....	196
5.3.3. Esteroides.....	208
5.3.3.1. Esteroides isolados da espécie <i>R. nodosa</i>	209
5.3.3.1.1. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias RN-05 e RN-06.....	209
5.3.3.1.2. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias RN-07 e RN-08.....	214
5.3.3.1.3. Determinação estrutural da substância RN-09.....	219
5.3.3.1.4. Determinação estrutural da substância RN-10.....	231

5.3.4. Triterpeno.....	249
5.3.4.1. Triterpeno isolado da espécie <i>Spiranthera atlantica</i>	249
5.3.4.1.1. Determinação estrutural da substância SA-09.....	249
6. ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	254
6.1. Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas e dos extratos brutos frente às células em cultura.....	254
6.1.1. Descongelamento de células leucêmicas humanas.....	254
6.1.2. Cultura de linhagens de células leucêmicas humanas.....	255
6.1.3. Congelamento de células leucêmicas humanas.....	255
6.1.4. Avaliação das atividades anticancerígenas das substâncias isoladas e dos extratos brutos através do ensaio Metabólico com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium)	255
6.1.5. Resultados obtidos por ensaio metabólico com MTT.....	257
7. CONCLUSÕES.....	261
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	263

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias isoladas da espécie <i>Adiscanthus fusciflorus</i>	6
Figura 2. Substâncias isoladas da espécie <i>Almeidea coerulae</i>	9
Figura 3. Substâncias isoladas da espécie <i>A. guyanensis</i>	10
Figura 4. Substâncias isoladas da espécie <i>A. rubra</i>	11
Figura 5. Substâncias isoladas da espécie <i>A. flava</i>	14
Figura 6. Substâncias isoladas da espécie <i>A. paniculata</i>	14
Figura 7. Substâncias isoladas da espécie <i>C. heterophyllus</i>	16
Figura 8. Substâncias isoladas da espécie <i>C. marginatus</i>	17
Figura 9. Substâncias isoladas da espécie <i>C. inopinatus</i>	17
Figura 10. Substâncias isoladas das espécies <i>C. macrocarpus</i> e <i>C. cuneifolius</i>	18
Figura 11. Substâncias isoladas da espécie <i>C. longifolius</i>	19
Figura 12. Substâncias isoladas da espécie <i>C. gaudichaudianus</i>	20
Figura 13. Substâncias isoladas do fungo endofítico das folhas de <i>D. incomparabilis</i>	23
Figura 14. Substâncias isoladas da espécie <i>Ertela trifólia</i>	25
Figura 15. Substâncias isoladas da espécie <i>Erythrochiton brasiliensis</i>	27
Figura 16. Substâncias isoladas da espécie <i>Euxylophora paraensis</i>	28
Figura 17. Substâncias isoladas da espécie <i>Euxylophora paraensis</i>	29
Figura 18. Substâncias isoladas da espécie <i>Euxylophora paraensis</i>	30
Figura 19. Substâncias isoladas da espécie <i>Galipea bracteata</i>	31
Figura 20. Substâncias isoladas da espécie <i>Galipea longiflora</i>	32
Figura 21. Substâncias isoladas da espécie <i>Galipea trifoliata</i>	32
Figura 22. Substâncias isoladas da espécie <i>Galipea officinalis</i>	34
Figura 23. Substâncias isoladas da espécie <i>Galipea panamensis</i>	35
Figura 24. Substâncias isoladas da espécie <i>Leptothyrsa sprucei</i>	40
Figura 25. Substâncias isoladas da espécie <i>Neoraputia alba</i>	41
Figura 26. Substâncias isoladas da espécie <i>Neoraputia magnifica</i>	42
Figura 27. Substâncias isoladas da espécie <i>Neoraputia paraensis</i>	43
Figura 28. Substâncias isoladas da espécie <i>Raputia simulans</i>	45
Figura 29. Substâncias isoladas da espécie <i>Raputia pratermissa</i>	46
Figura 30. Substâncias isoladas da espécie <i>Rauia resinosa</i>	47
Figura 31. Substâncias isoladas da espécie <i>Rauia nodosa</i>	48

Figura 32. Substâncias isoladas da espécie <i>Ravenia spectabilis</i>	50
Figura 33. Substâncias isoladas da espécie <i>Sigmanthus trifoliatu</i> s.....	51
Figura 34. Substâncias isoladas da espécie <i>Spiranthera odoratissima</i>	54
Figura 35. Substâncias isoladas da espécie <i>Ticorea predicellata</i>	60
Figura 36. Substâncias isoladas da espécie <i>Ticorea longiflora</i>	61
Figura 37. Estruturas da vimblastina (285) e vincristina (286).....	63
Figura 38. Estrutura do taxol (287).....	64
Figura 39. Esquema de síntese do taxol (287) realizado por Holton e colaboradores.....	65
Figura 40. Proposta de biossíntese para alguns tipos de alcaloides furoquinolínicos e piranoquinolínicos angulares, ambos derivados do ácido antranílico (DEWICK, 2002; PASSADOR, 1995).....	96
Figura 41. Proposta de biossíntese para os alcaloides 2-fenilquinolinos, derivados do ácido antranílico (BLASCHKE-COBET & LUCKNER, 1973).....	96
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).....	100
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).....	101
Figura 44. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina) (região de 5,0 a 8,2 ppm).....	102
Figura 45. Espectro de HSQC (CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).....	103
Figura 46. Espectro de HMBC (CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).....	104
Figura 47. Ampliação do espectro de HMBC (CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina) (região de 20 a 180 ppm).....	105
Figura 48. Espectro de H ¹ -H ¹ -COSY (CDCl ₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).....	106
Figura 49. Espectro de massas (CG-MS) obtido para a substância RN-01 (vepressina).....	107
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina) e RN-03 (zantobungeanina).....	112
Figura 51. Ampliação de espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina) e RN-03 (zantobungeanina) (região	

de 6,45 a 8,1 ppm).....	113
Figura 52. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina) e RN-03 (zantobungeanina).....	114
Figura 53. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina) e RN-03 (zantobungeanina).....	115
Figura 54. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina) e RN-03 (zantobungeanina).....	116
Figura 55. Espectro de H ¹ -H ¹ -COSY (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina) e RN-03 (zantobungeanina).....	117
Figura 56. Espectro de massas (CG-MS) obtido para a substância RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina).....	118
Figura 57. Espectro de massas (CG-MS) obtido para a substância RN-03 (zantobungeanina).....	118
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	122
Figura 59. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	123
Figura 60. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina) (região 6,5 a 8,2 ppm).....	124
Figura 61. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	125
Figura 62. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	126
Figura 63. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina) (região de 80 a 200 ppm).....	127
Figura 64. Espectro de H ¹ -H ¹ -COSY (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	128
Figura 65. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	129
Figura 66. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).....	133
Figura 67. Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-02 (esquimianina) (região de 105 a 190 ppm).....	134

Figura 68. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).....	135
Figura 69. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).....	136
Figura 70. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).....	137
Figura 71. Espectro de $\text{H}^1\text{-H}^1$ COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).....	138
Figura 72. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).....	139
Figura 73. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	144
Figura 74. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05 (região de 6,7 a 8,1 ppm).....	145
Figura 75. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	146
Figura 76. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	147
Figura 77. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05 (região de 10 a 65 ppm).....	148
Figura 78. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	149
Figura 79. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05 (região de 0 a 145 ppm).....	150
Figura 80. Espectro de $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	151
Figura 81. Espectro de ESI(+)-MS obtido em acetonitrila para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	152
Figura 82. Espectro de ESI(+)-MS/MS do pico em m/z 274 obtido em acetonitrila para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	153
Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).....	159
Figura 84. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).....	160

Figura 85. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 6,0 a 8,7 ppm).....	161
Figura 86. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).....	162
Figura 87. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).	163
Figura 88. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 100 a 180 ppm).	164
Figura 89. Espectro de $\text{H}^1\text{-H}^1\text{COSY}$ (500 MHz, CDCl_3) obtido para as substâncias SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).....	165
Figura 90. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).....	166
Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)	171
Figura 92. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 95 a 165 ppm)	172
Figura 93. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)	173
Figura 94. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 6,3 a 8,1 ppm)	174
Figura 95. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)	175
Figura 96. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)	176
Figura 97. Espectro de $\text{H}^1\text{-H}^1\text{-COSY}$ (500 MHz, CDCl_3) obtido para as substâncias SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)	177
Figura 98. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)	178
Figura 99. Espectro na região do infravermelho obtido para a substância SA-08 (atlanticol)	183

Figura 100. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol)	184
Figura 101. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol)	185
Figura 102. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol) (região de 7,05 a 7,9 ppm)	186
Figura 103. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol)	187
Figura 104. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol) (região de 10 a 145 ppm)	188
Figura 105. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol)	189
Figura 106. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticol) (região de 102 a 168 ppm)	190
Figura 107. Espectro de H ¹ -H ¹ -COSY (500 MHz, CDCl ₃) obtido para as substâncias SA-08 (atlanticol)	191
Figura 108. Espectro de ESI(+)-MS obtido em solução de água:metanol (1:1) para a substância SA-08 (atlanticol)	192
Figura 109. Espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o pico em <i>m/z</i> 336 em solução de água:metanol (1:1) para a substância SA-08 (atlanticol).....	192
Figura 110. Espectro de ESI(+)-MS obtido em solução de água:metanol (1:1) para o derivado acetilado SA-08a	193
Figura 111. Espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o pico em <i>m/z</i> 420 em solução de água:metanol (1:1) para o derivado acetilado SA-08a	194
Figura 112. Espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o pico em <i>m/z</i> 420 em solução de água:metanol (1:1) para o derivado acetilado SA-08a	194
Figura 113. Proposta de biossíntese para as cumarinas: cumarina e umbeliferona (DEWICK, 2002).....	196
Figura 114. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol)	200
Figura 115. Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol) (região de 90 a 170 ppm).....	201
Figura 116. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol)	202

Figura 117. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol) (região de 6,0 a 8,0 ppm).....	203
Figura 118. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol) (região de 0 a 2,8 ppm).....	204
Figura 119. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol)	205
Figura 120. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol)	206
Figura 121. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol)	207
Figura 122. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol)	208
Figura 123. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a mistura das substâncias RN-05 (β-sitosterol) e RN-06 (estigmasterol)	212
Figura 124. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a mistura das substâncias RN-05 (β-sitosterol) e RN-06 (estigmasterol)	213
Figura 125. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a mistura das substâncias RN-07 (sitostenona) e RN-08 (estigmastenona)	217
Figura 126. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a mistura das substâncias RN-07 (sitostenona) e RN-08 (estigmastenona).....	218
Figura 127. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol)	223
Figura 128. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol)	224
Figura 129. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol) (região de 3,6 a 8,0 ppm).....	225
Figura 130. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol)	226
Figura 131. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol) (região de 10 a 60 ppm).....	227
Figura 132. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol)	228
Figura 133. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) obtido para a substância RN-09 (peróxido de ergosterol) (região de 10 a 85 ppm)	229

Figura 134. Espectro de H^1-H^1 COSY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para as substâncias RN-09 (peróxido de ergosterol)	230
Figura 135. Interações espaciais observadas no espectro de $^1H-^1H$ -NOESY referente a estereoquímica da substância RN-10	234
Figura 136. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi)	235
Figura 137. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi) (região de 06 a 70 ppm).....	236
Figura 138. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi)	237
Figura 139. Ampliação do espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi) (região de 4,9 a 5,7 ppm).....	238
Figura 140. Espectro de HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi)	239
Figura 141. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi) (região de 10 a 75 ppm)	240
Figura 142. Espectro de HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi)	241
Figura 143. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi) (região de 20 a 145 ppm).....	242
Figura 144. Espectro de H^1-H^1 COSY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para as substâncias RN-10 (rauianodoxi)	243
Figura 145. Espectro de $^1H-^1H$ -NOESY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi)	244
Figura 146. Ampliação do espectro de $^1H-^1H$ -NOESY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxi)	245
Figura 147. Espectro de ESI(+)-MS obtido em solução de água:metanol (1:1) para a substância RN-10 (rauianodoxi)	246
Figura 148. Representações em 3D da estrutura da substância RN-10	248
Figura 149. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância SA-09 (lupeol)	252
Figura 150. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para a substância SA-09 (lupeol)	253
Figura 151. Esquema da redução do MTT a formazan pela succinato	

desidrogenase mitocondrial (Albrecht et al., 2004)	256
Figura 152. Estrutura dos alcaloides furoquinolínicos, γ -fagarina (SA-01) e esquimianina (SA-02)	259
Figura 153. Estrutura dos alcaloides 2-alquilquinolinos, 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (SA-06) e 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (SA-07)	260

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gêneros que constituem a subtribo Galipenae e o levantamento dos dados encontrados para cada gênero.....	5
Tabela 2. Quantidade de material vegetal coletado e de extratos brutos obtidos da madeira das espécies <i>Rauia nodosa</i> e <i>Spiranthera atlantica</i>	69
Tabela 3. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do extrato bruto em hexano dos galhos de <i>R. nodosa</i> (RNH)....	72
Tabela 4. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH-9.....	73
Tabela 5. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH9-5.....	74
Tabela 6. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH95-8.....	75
Tabela 7. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH-10.....	76
Tabela 8. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH10-4.....	77
Tabela 9. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH104-6.....	77
Tabela 10. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH-19.....	78
Tabela 11. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH19-5.....	79
Tabela 12. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do extrato bruto em metanol dos galhos de <i>R. nodosa</i> (RNM)..	81
Tabela 13. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do extrato bruto em metanol dos galhos de <i>S. atlantica</i> (EMSA)	85
Tabela 14. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA-4.....	86
Tabela 15. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA4-6.....	87

Tabela 16. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA4-8.....	88
Tabela 17. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA4-10.....	89
Tabela 18. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância RN-01 (vepressina), em CDCl ₃ , em comparação com os dados da literatura da substância <i>N</i> -metilflindersina (Mo-1) (ISIDORO et. al., 2012). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i> , entre parênteses) estão em Hz.....	99
Tabela 19. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância RN-02 , em CDCl ₃ , em comparação com os dados da literatura para a substância <i>N</i> -metilflindersina (Mo-1) (ISIDORO et. al., 2012). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i> , entre parênteses) estão em Hz.....	109
Tabela 20. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância RN-03 , em CDCl ₃ , em comparação com os dados da literatura da substância zantobungeanina (Mo-1) (CAMPBELL et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i> , entre parênteses) estão em Hz.....	111
Tabela 21. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância SA-01 , em CDCl ₃ , em comparação com os dados da literatura da substância γ -fagarina (Mo-1) (RIBEIRO, 2006). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i> , entre parênteses) estão em Hz.....	121
Tabela 22. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância SA-02 , em CDCl ₃ , em comparação com os dados da literatura da substância esquimianina (Mo-1) (CUCA et. al., 1998). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i> , entre parênteses) estão em Hz.....	132
Tabela 23. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância SA-03 (1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina), em CDCl ₃ , em comparação com os dados da literatura da substância 8-metoxiflindersina (Mo-1) (CAMPBELL et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em	

ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	142
Tabela 24. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância SA-04 , em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância 8-metoxiflindersina (Mo-1) (CAMPBELL et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	143
Tabela 25. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (Mo-1) (TEREZAN, 2007). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	158
Tabela 26. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (Mo-1) (TEREZAN, 2007). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	170
Tabela 27. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância SA-08 (atlanticol), em CDCl_3 , Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	182
Tabela 28. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância aurapteno (Mo-1) (MISSAU, 2008). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	199
Tabela 29. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) das substâncias RN-05 e RN-06 , em comparação com os dados da literatura para o β -sitosterol (Mo-1) e para o estigmasterol (Mo-2) (KOJIMA et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.....	211
Tabela 30. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) das substâncias RN-07 e RN-08 , em comparação com os dados da literatura para a sitostenona (Mo-1) e para a estigmastenona (Mo-2) (VIEIRA, 1995). Os deslocamentos	

químicos (δ) estão em ppm.....	216
Tabela 31. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância RN-09 , em CDCl_3 , e comparação com os dados da literatura da substância peróxido de ergosterol (Mo-1) (RÖSECKE; KÖNIG, 2000). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	222
Tabela 32. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância RN-10 (rauianodoxi), em CDCl_3 , e comparação com os dados da literatura da substância estigmasterol (Mo-1) (KOJIMA et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.....	233
Tabela 33. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) da substância SA-09 , em comparação com os dados da literatura para o esteroide lupeol (Mo-1) (MAHATO et. al., 1994). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.....	251
Tabela 34. EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) obtido para as substâncias testadas após o período de 48 h de incubação.....	258

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância RN-01 (vepressina).....	107
Esquema 2. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância RN-02 (<i>N</i> -metilflindersina).....	118
Esquema 3. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância RN-03 (zantobungeanina).....	118
Esquema 4. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância SA-01 (γ -fagarina).....	129
Esquema 5. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância SA-02 (esquimianina).....	139
Esquema 6. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para a mistura das substâncias SA-03 , SA-04 e SA-05	154
Esquema 7. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).....	166
Esquema 8. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).....	178
Esquema 9. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para a substância SA-08 (atlanticol).....	193
Esquema 10. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para o derivado acetilado SA-08^a	195
Esquema 11. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais	

picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância RN-04 (<i>O</i> -geranilostenol).....	208
Esquema 12. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para a substância RN-10 (rauianodoxi).....	247

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Substâncias isoladas do extrato em hexano dos galhos de <i>R. nodosa</i> (RNH).....	70
Fluxograma 2. Estudo cromatográfico do extrato em hexano dos galhos de <i>R. nodosa</i> (RNH) e da fração RNH-10.....	70
Fluxograma 3. Estudo cromatográfico da fração RNH-9 obtida do extrato em hexano dos galhos de <i>R. nodosa</i>	71
Fluxograma 4. Estudo cromatográfico da fração RNH-19 obtida do extrato em hexano dos galhos de <i>R. nodosa</i>	71
Fluxograma 5. Substâncias isoladas do extrato em metanol dos galhos de <i>R. nodosa</i> (RNM).....	80
Fluxograma 6. Estudo cromatográfico do extrato em metanol dos galhos de <i>R. nodosa</i> (RNM).....	80
Fluxograma 7. Substâncias isoladas do extrato em metanol dos galhos de <i>S. atlantica</i> (EMSA).....	83
Fluxograma 8. Estudo cromatográfico do extrato em metanol dos galhos de <i>S. atlantica</i> (EMSA) e das frações EMSA-3 e EMSA-4.....	84
Fluxograma 9. Estudo cromatográfico da fração EMSA4-8 obtida do extrato em metanol dos galhos de <i>S. atlantica</i>	84
Fluxograma 10. Estudo cromatográfico da fração EMSA4-10 obtida do extrato em metanol dos galhos de <i>S. atlantica</i>	85

RESUMO

Neste trabalho foi apresentado o estudo fitoquímico das espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica* pertencentes à família Rutaceae, ambas sem estudo prévio descrito na literatura, com o intuito de contribuir com o conhecimento quimiosistemático destes dois gêneros. Este estudo resultou no isolamento de dezenove substâncias, sendo as substâncias rauianodoxi, 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina e atlanticol inéditas na literatura. Dos extratos em hexano e metanol dos galhos de espécie *R. nodosa* foram isoladas dez substâncias, sendo elas: os esteroides β -sitosterol, estigmasterol, sitostenona, estigmastenona, peróxido de ergosterol e rauianodoxi; a cumarina *O*-geranilostenol; e a mistura dos alcaloides *N*-metilflindersina, zantobungeanina e vepressina. Com relação a espécie *S. atlantica*, o estudo do extrato metanólico dos seus galhos resultou no isolamento de nove substâncias, sendo elas: os alcaloides γ -fagarina, esquimianina, 8-metoxiflindersina, 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina, 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina, 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona, 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona e atlanticol; e o triterpeno lupeol. As estruturas destas substâncias foram elucidadas com base na análise dos dados obtidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) incluindo análises bidimensionais, espectrometria de massas acoplada a cromatógrafo gasoso (CG-MS), espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) e espectroscopia na região do infravermelho. Além disso, foram investigadas as atividades anticancerígenas dos extratos brutos metanólicos das duas espécies e de oito alcaloides isolados frente às linhagens de células leucêmicas humanas (THP-1 e U937), através da técnica de ensaio metabólico com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium). Os extratos e alcaloides testados apresentaram apenas moderadas e/ou baixas atividades inibitórias frente às linhagens de células testadas.

Palavras-chave: alcaloides, esteroides, RMN, ESI(+)-MS, atividade anticancerígena.

ABSTRACT

Here are presents the phytochemical study of the species *Rauia nodosa* and *Spiranthera atlantica* both belonging to Rutaceae family, in order to contribute to the chemosystematic knowledge of these two gennera, both without previous investigations described in the literature. This study resulted on the isolation of nineteen substances and the rauianodoxy, 1',2'-epoxy-8-methoxyflindersine and atlanticol substances unpublished in the literature. From hexane and methanol extracts of *R. nodosa* branches ten substances were isolated, namely: the steroids β -sitosterol, stigmasterol, sitostenone, stigmastenone, ergosterol peroxide and rauianodoxy; the cumarine *O*-geranilosthenol; and the mixture of the alkaloids *N*-methylflindersine, zantobungeanine and vepressine. Regarding *S. atlantica* species the study of methanol extracts of the branches resulted on the isolation of nine substances, namely: the alkaloids γ -fagarine, esquimianine, 8-methoxyflindersine, 1',2'-epoxy-8-methoxyflindersine, 1',2'-dihidro-8-methoxyflindersine, 2-phenyl-1-methyl-7-methoxy-quinolin-4-ona, 2-phenyl-1-methyl-8-methoxy-quinolin-4-ona and atlanticol; and the triterpene lupeol. The structures of these compounds were elucidated based on data analysis data obtained by Nucelar Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C NMR) including bidimensional analysis, mass spectrometry coupled with gas chromatography (GC-MS), high resolution mass spectrometry with electrospray ionization (ESI (+) – MS and ESI (+) – MS/MS) and spectrography in the infrared region. Furthermore, the anticancer activity of methanolic crude extracts of the two species were investigated, besides of eight isolated alkaloids, against human leukemic cell lines (THP-1 and U937) by metabolic assay technique with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-bromide diphenyltetrazolium). The tested extracts and alkaloids revealed only moderate and/or low inhibitory activities against the tested cell lines.

Keywords: alkaloids, steroids, NMR, ESI(+)-MS, anticancer activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos produtos naturais e do estudo fitoquímico de novas espécies

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 56.000 espécies de plantas superiores, o que significa um total de 19% do total existente no planeta. Em função disso e, sobretudo pela grande tradição do uso das plantas medicinais pela medicina popular no Brasil, o interesse pelos estudos das propriedades terapêuticas das plantas, vem sendo explorado extensivamente pelos pesquisadores brasileiros e pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008).

O estudo fitoquímico de espécies mostra-se cada vez mais necessário, pois auxilia no posicionamento sistemático (ordem, família, gênero, etc.) dessas espécies. O estudo fitoquímico também tem sido muito focado pelo fato de produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (CASTRO, 2001).

A importância dos produtos naturais é evidenciada nas áreas de câncer e doenças infecciosas, onde 60 a 75% das drogas, respectivamente, são de origem natural (NEWMAN et al., 2003).

Assim visando os interesses econômicos, biológicos e químicos, este trabalho tem como principal objetivo a investigação fitoquímica de duas espécies pertencentes a família Rutaceae, *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica*. Esta família é conhecida por apresentar uma grande diversidade de metabólitos secundários, destacando-se os alcaloides, cumarinas, lignanas, flavonoides, terpenos e limonoides com largo espectro de atividades biológicas (WATERMAN, 1999).

1.2. Justificativa para os estudos de novas substâncias naturais no tratamento do câncer

Dentre as várias enfermidades que são infligidas ao homem, o câncer tem mostrado ser uma das doenças de maior incidência e que possui um dos mais difíceis tratamentos, visto que ainda não estão disponíveis no mercado fármacos ou métodos de controle mais efetivos (MURAD e KATZ, 2000).

Em função disso, a identificação de novos agentes antitumorais mais potentes, seletivos e menos tóxicos, permanece como uma das mais urgentes metas para o combate ao câncer. Devido a esta necessidade muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de se isolar substâncias oriundas de diferentes espécies de plantas e testar suas atividades antitumorais frente a diferentes linhagens de células cancerígenas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como principal objetivo o isolamento e identificação dos constituintes químicos das espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica* (Rutaceae), bem como a avaliação das atividades anticancerígenas dos seus extratos e de substâncias isoladas frente a duas linhagens de células humanas, causadoras de leucemia, U937 e THP-1.

2.2. Objetivos específicos

- Estudo fitoquímico das espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica*, com a finalidade de se obter conhecimento sobre as suas composições químicas, pois até o presente momento não há estudo fitoquímico de ambas as espécies;
- Isolamento e identificação das substâncias orgânicas pelas técnicas de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C incluindo análises bidimensionais, espectroscopia na região do infravermelho, espectrometria de massas acoplada a cromatógrafo gasoso (CG-MS) e espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS).
- Avaliar a porcentagem de morte celular induzida pelos extratos brutos e pelas substâncias isoladas frente às linhagens humanas de células leucêmicas (U937 e THP-1) através do ensaio metabólico com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium).

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Família Rutaceae

A família Rutaceae inclui 160 gêneros com cerca de 1900 espécies largamente distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas de todo o Mundo e com diversas características morfológicas (GROPPO et al., 2008). No Brasil são encontrados 33 gêneros e aproximadamente 192 espécies (PIRANI et al., 2010).

A classificação botânica para a família Rutaceae apresentada por Engler (1931) considera a existência de sete subfamílias: Rutoideae, Toddalioidae, Aurantioideae (Citroideae), Spathelioideae, Dictyolonatoideae, Flindersioideae e Rhabdodendroideae. Esta divisão foi baseada principalmente em características morfológicas, como o número de conação dos carpelos, histologia glandular e características dos frutos. Porém a quimiosistemática desta família tem sido constantemente revisada e alterada, devido ao crescente número de estudos moleculares que apresentam diversas subfamílias da família Rutaceae como não monofiléticas (GROPPO et al., 2008).

Uma das alterações na divisão da família Rutaceae foi a exclusão da subfamília Rhabdodendroideae (FAY et al., 1997). Apesar de muitas propostas, a divisão em seis subfamílias ainda é largamente aceita, ressalvando algumas alterações (BAYER et al., 2009).

A família Rutaceae tem se destacado pelo fornecimento de vários metabólitos secundários, tais como: alcaloides (especialmente os derivados do ácido antranílico), cumarinas (principalmente furo e pirano cumarinas), lignanas, limonoides, flavonoides, terpenoides (mono e triterpenos) e óleos voláteis, o que tem atraído a atenção de vários grupos de pesquisadores devido à importância química, biológica e quimiosistemática de muitos desses metabólitos (WATERMAN, 1975).

3.2. Subtribo Galipenae e seus gêneros

A subtribo Galipenae (Tribo Galipeae, Subfamília Rutoideae, Família Rutaceae) constitui um grupo exclusivamente neotropical com 25 gêneros e aproximadamente 130 espécies, sendo o grupo de Rutaceae mais diverso dos neotrópicos. Dos 25 gêneros (Tabela 1), 10 são monoespecíficos e 8 possuem cinco ou menos espécies. Em compensação apenas o gênero *Conchocarpus* possui 45-47

espécies, a grande maioria encontrada em território brasileiro (GROPPO et al., 2008).

Tabela 1. Gêneros que constituem a subtribo Galipenae e o levantamento dos dados encontrados para cada gênero.

Gêneros	Estudo Fitoquímico	Atividade Biológica	Levantamento Etnofarmacológico
<i>Adiscanthus</i>	X	X	-
<i>Almeidea</i>	X	X	-
<i>Andreadoxa</i>	X	-	-
<i>Angostura</i>	X	X	-
<i>Apoucalon</i>	-	-	-
<i>Conchocarpus</i>	X	X	-
<i>Decagonocarpus</i>	-	-	-
<i>Desmotes</i>	X	X	-
<i>Ertela</i>	X	X	X
<i>Erythrochiton</i>	X	-	X
<i>Euxylophora</i>	X	-	-
<i>Galipea</i>	X	X	X
<i>Leptothyrsa</i>	X	-	-
<i>Lubaria</i>	-	-	-
<i>Naudinia</i>	-	-	-
<i>Neoraputia</i>	X	X	-
<i>Raputia</i>	X	-	-
<i>Raputiarana</i>	-	-	-
<i>Rauia</i>	X	X	-
<i>Ravenia</i>	X	X	-
<i>Raveniopsis</i>	-	-	-

<i>Sigmatanthus</i>	X	X	-
<i>Spiranthera</i>	X	X	X
<i>Ticorea</i>	X	-	-
<i>Toxosiphon</i>	-	-	-

3.2.1. *Adiscanthus*

3.2.1.1. Estudos Fitoquímicos

O estudo fitoquímico do extrato do caule (incluindo cascas) de *Adiscanthus fusciflorus*, uma espécie arbórea da região amazônica, relatou o isolamento dos alcalóides: 4-metoxi-2-quinolona (**1**), 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (**2**), dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) e *N*-metilflindersina (**6**) e do ácido dihidrocinâmico 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':4',3')fenil]-propiónico (**7**) e o seu éster metil (**8**) (Figura 1) (VIEIRA et al., 1980).

Também foram realizados estudos fitoquímicos com o extrato das raízes e galhos de *A. fusciflorus*, que permitiram novamente o isolamento do ácido 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':4',3')fenil]-propiónico (**7**) (SILVA et al, 2003) e do alcalóide esquimianina (**5**) (NAPOLITANO et al., 2003a) e ainda revelou a presença da cumarina 5,8-dimetoxi-psoraleno (**9**) (Figura 1) (NAPOLITANO et al., 2003b).

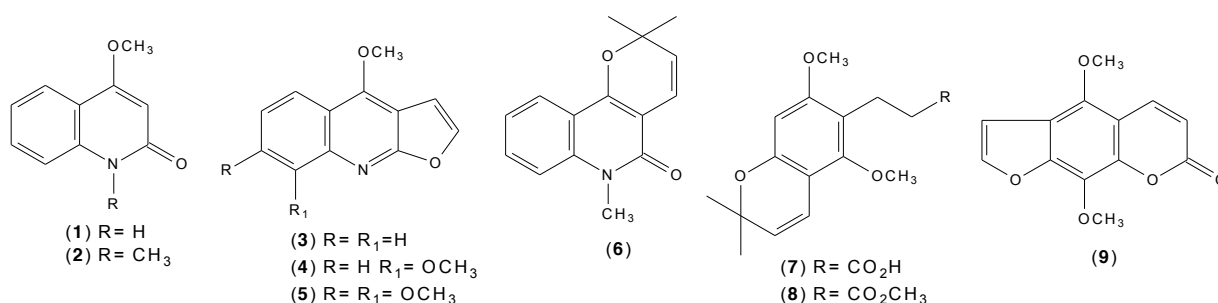


Figura 1. Substâncias isoladas da espécie *Adiscanthus fusciflorus*.

3.2.1.2. Atividades Biológicas

O alcaloide esquimianina (5), o ácido 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':4',3')fenil]-propiónico (7) e a cumarina 5,8-dimetoxi-psoraleno (9) (Figura 1), isoladas do extrato das raízes e galhos da espécie *Adiscanthus fusciflorus* tiveram suas atividades biológicas investigadas frente a enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT), retirada do parasita *Leishmania tarentolae* causador da doença Leishmaniose (SILVA et al, 2003; NAPOLITANO et al., 2003A; NAPOLITANO et al., 2003B).

O ácido 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':4',3')fenil]-propiónico (7) apresentou CI_{50} (concentração mínima inibitória de 50% da população) de 147 μ M frente a enzima APRT de *L. tarentolae* (SILVA et al, 2003). Já as substâncias esquimianina (5) e 5,8-dimetoxi-psoraleno (9) apresentaram as respectivas atividades inibitórias de 50% (NAPOLITANO et al., 2003^b) e 68% (NAPOLITANO et al., 2003^a) frente a enzima APRT de *L. tarentolae*, ambas testadas na concentração de 50 μ g/mL.

3.2.2. Almeidea

3.2.2.1. Estudos Fitoquímicos

Foi relatado na literatura um estudo fitoquímico dos extratos em hexano e em diclorometano das folhas de *Almeidea coerulae* permitiu o isolamento de um novo triterpeno e cinco alcaloides, sendo dois destes descritos pela primeira vez na literatura. Do extrato em hexano foi isolado um novo triterpeno 3- β -*O*-tiglyl-24-metilcicloartanol (10) e dois novos alcalóides: 7-*O*-acetilhaplofilidina (11) e 7-metoxi-8-(3',3'-dimetilalil)-dictamina (12), além do alcalóide dutadrupina (13). Já do extrato em metanol foram isolados os alcaloides dutadrupina (13), isodutadrupina (14) e arborinina (15) (Figura 2) (SANTOS et al., 1998).

Outro estudo fitoquímico realizado com o extrato em diclorometano das folhas de *A. coerulae* resultou no isolamento das substâncias: 7-metoxi-8-(3',3'-dimetilalila)-dictamina (12), 7-hidroxi-8-(3',3'-dimetilalila)-dictamina (16), dutaduprina (13), coerulina (17), evolitrina (18), kokusagina(19), edulinina (20), óxido de cariofileno

(**21**), mistura da α e β -amirina (**22** e **23**) e mistura do β -sitosterol e estigmasterol (**24** e **25**) (Figura 2) (MAFEZOLI, 2001).

Também foi realizado um estudo fitoquímico com o extrato em diclorometano do caule da espécie *A. coerulea* resultando no isolamento do alcalóide 20-hidroxi-dihidrolupeol (**26**), dictamina (**3**) e esquimianina(**5**) além da mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmaterol (**24** e **25**) (Figura 2) (CORTEZ et al., 2006).

Do extrato em diclorometano do caule de *A. coerulea* também foi possível o isolamento do alcalóide 11-hidroxirutaecarpina (**27**). Além destas substâncias foram isolados novamente os alcalóides dictamina (**3**) e esquimianina (**5**) (Figura 1), a mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmaterol (**24** e **25**) e o triterpeno 20-hidroxi-dihidrolupeol (**26**) (Figura 2) (CORTEZ et al., 2011).

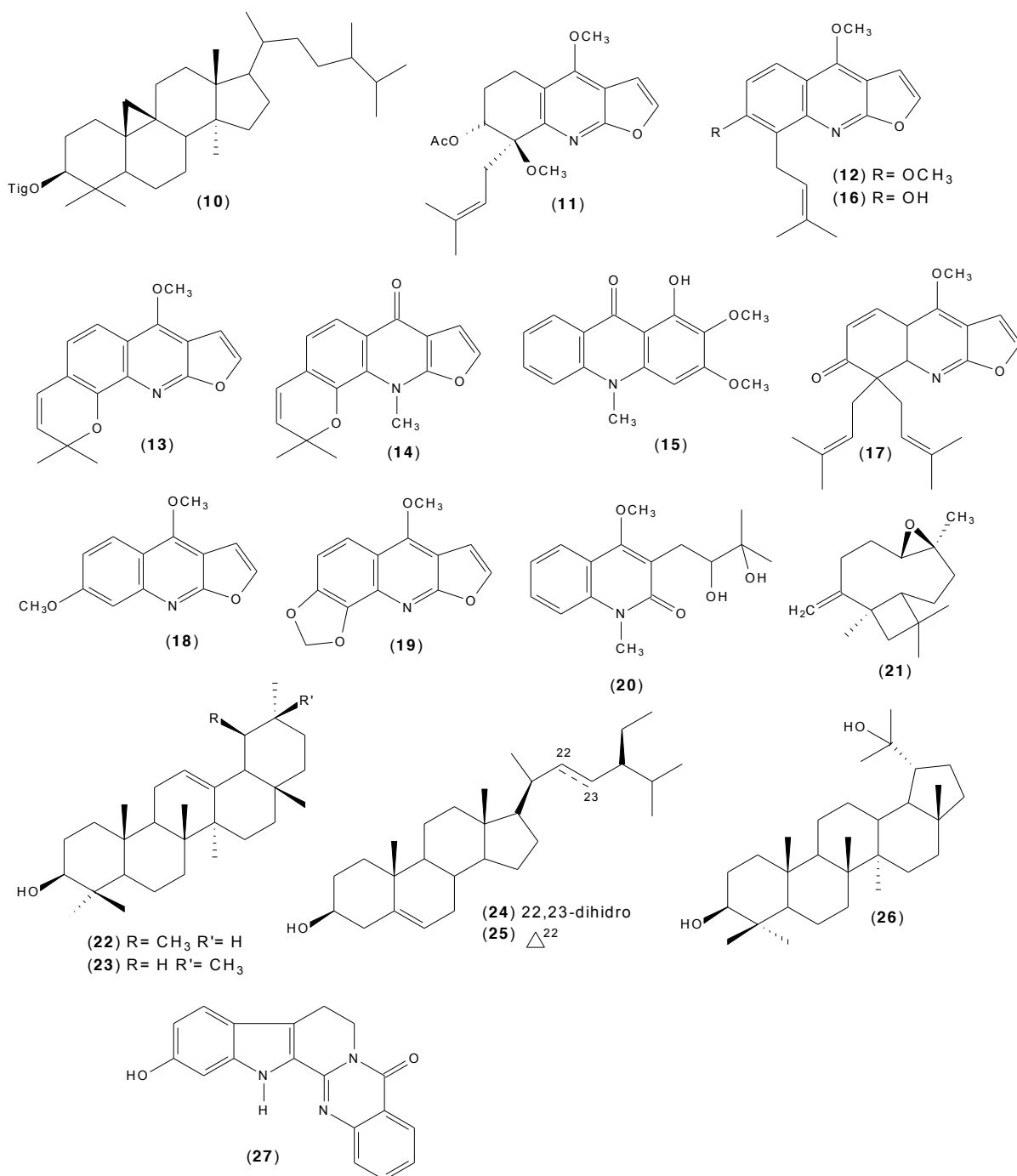


Figura 2. Substâncias isoladas da espécie *Almeidea coerulae*.

Foi verificado na literatura um estudo fitoquímico a partir dos extratos metanólicos do caule e da raiz da espécie *A. guyanensis*. Este estudo relatou o isolamento das substâncias: *N*-metilflindersina (6) (Figura 1), *N*-metilatanina (28), *N*-metilhaplofolina (29) e da substância 4-dimetil-*N*-metilatanina (30) (Figura 3). Além disso, foi isolada a substância 4-isopropenil-*N*-metil-3,4-dihidro-furo-2-quinolona (31)

denominada almeina, relatada pela primeira vez na literatura nesta ocasião (Figura 3) (MOULIS et al., 1983).

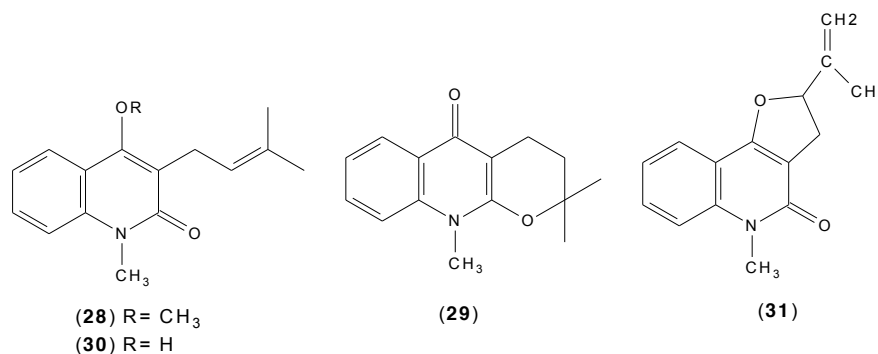


Figura 3. Substâncias isoladas da espécie *A. guyanensis*.

A espécie *Almeidea rubra* também apresentou um estudo fitoquímico dos extratos das suas folhas obtidos em diclorometano e em metanol. Destes extratos foram isolados os alcaloides: esquimianina (**5**) (Figura 1), arborinina (**15**), evolitrina (**18**), kokusagina (**19**) (Figura 2), metilarborinina (**32**) e folinina (**33**) (Figura 4) (SANTOS et al., 1998).

Também foi observado na literatura um estudo fitoquímico da fração em acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *A. rubra*, permitindo o isolamento pela primeira vez dos alcaloides: 4-metoxi-6-[2-(metilamino)fenil]-2H-pirran-2-ona (**34**) e acetato de rel-(7R,8R)-8-[(E)-3-hidroxi-3-metil-1-butenil]-4,8-dimetoxi-5,6,7,8-tetraidrofur[2,3-b]quinolin-7-ila (**35**) (Figura 4) e dos alcaloides esquimianina (**5**) (Figura 1), isodutaduprina (**14**), arborinina (**15**), kokusagina (**19**) (Figura 2), *N*-metil-1-hidroxi-3-metoxiacridona (**36**), isoesquimianina (**37**) e isokokusagina (**38**) (Figura 4) (AMBROZIN et al., 2005).

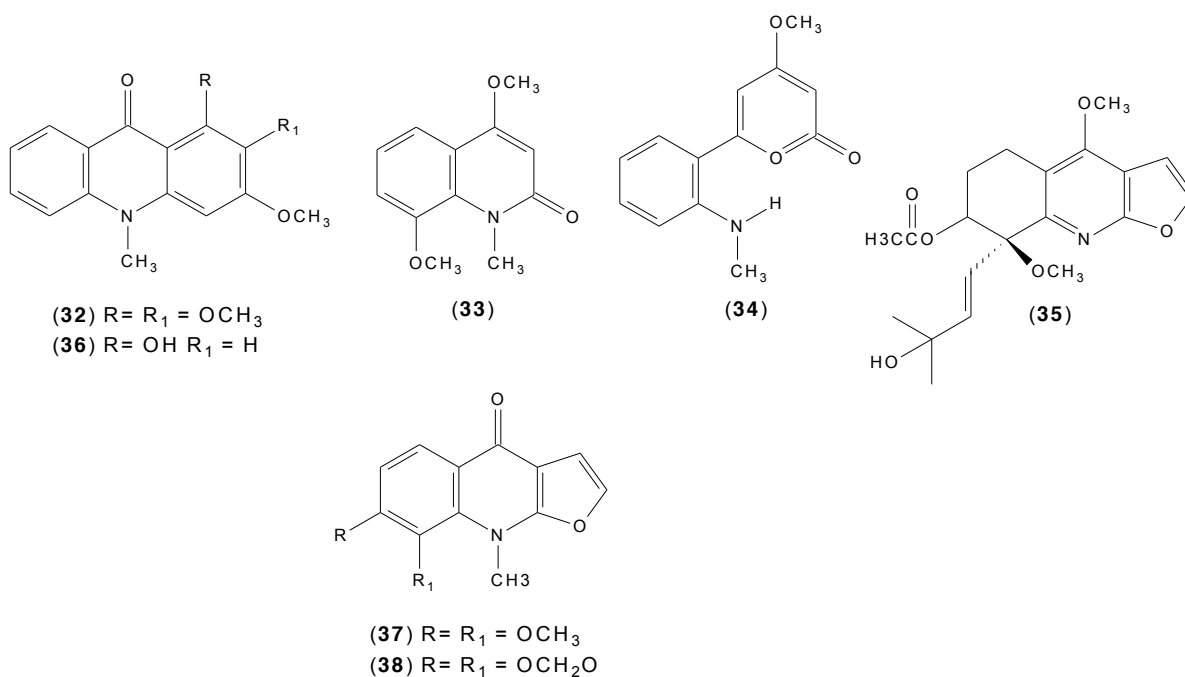


Figura 4. Substâncias isoladas da espécie *A. rubra*.

Foi verificado na literatura apenas um estudo fitoquímico da espécie *Almeidea lilacina*, que resultou no isolamento do alcalóide γ -fagarina (4) (Figura 1) usando a técnica de cromatografia de contracorrente (VIEIRA et al., 1996).

3.2.2.2. Atividades Biológicas

Os extratos das folhas e galhos de *A. coeruleae* apresentaram atividade inibitória *in vitro* sobre as formas tripomastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Foram avaliadas as atividades inibitórias dos extratos das folhas em hexano e diclorometano na concentração de 4 mg/mL, obtendo respectivamente valores de CI₅₀ de 1,49 e 2,10 mg/mL (MAFEZOLI et al., 2000).

Os extratos dos galhos de *A. coeruleae* obtidos em hexano, diclorometano e metanol foram testados também na concentração de 4 mg/mL e apresentaram valores de CI₅₀ respectivamente de 3,32, 9,17 e 6,65 mg/mL frente a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Devido ao resultado promissor obtido com o extrato bruto em hexano das folhas de *A. coeruleae*, foram realizadas partições deste extrato em acetato de etila e butanol. As frações obtidas também tiveram suas atividades inibitórias testadas frente a forma tripomastigota de *T. cruzi*, porém empregando a concentração de 2 mg/mL. Os resultados de CI₅₀ obtidos foram respectivamente de

2,35 e 0,94 mg/mL para as frações em acetato de etila e butanol (MAFEZOLI et al., 2000).

Outro estudo investigou novamente a atividade inibitória *in vitro* dos extratos das folhas e dos galhos de *A. coeruleae* sobre as formas tripomastigotas do protozoário *T. cruzi* e também frente a enzima glicolítica glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) presente no protozoário. Os extratos das folhas obtidos em hexano e diclorometano na concentração de 4 mg/mL apresentaram respectivamente 80,5% e 70% de atividade inibitória frente ao protozoário. Já o extrato em hexano dos galhos apresentou apenas 55,6% de atividade inibitória frente ao *T. cruzi*, nesta mesma concentração (VIEIRA et al., 2001).

As atividades inibitórias dos extratos das folhas e dos galhos de *A. coeruleae* frente a enzima gGAPDH do *T. cruzi* foram investigadas nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. Na concentração de 100 µg/mL, os extratos das folhas obtidos em hexano e diclorometano apresentaram respectivamente 0,00% e 7,9% e o extrato hexânico dos galhos apresentou 13,2% de atividade inibitória frente a enzima gGAPDH. Quando empregado a concentração de 200 µg/mL foram obtidos os resultados de 30,1%, 38,6% e 9,5% respectivamente para os extratos das folhas em hexano e diclorometano e para o extrato hexânico dos galhos de *A. coeruleae* frente a enzima gGAPDH de *T. cruzi* (VIEIRA et al., 2001).

Também foi relatado na literatura um estudo sobre a atividade tripanocida das substâncias puras 7-metoxi-8-(3',3'-dimetilalila)-dictamina (**12**), 7-hidroxi-8-(3',3'-dimetilalila)-dictamina (**16**), dutaduprina (**13**), coerulina (**17**), evolitrina (**18**), kokusagina (**19**), edulinina (**20**) e das misturas da α e β -amirina (**22** e **23**) e do β -sitosterol e estigmasterol (**24** e **25**), todas isoladas do extrato das folhas de *A. coeruleae* (Figura 2). Este estudo resultou nos valores de IC₅₀ de 0,13, 2,38, 0,08, 74,14, 0,14, 3,39, 0,27 e 1,00 mg/mL para as respectivas substâncias citadas acima frente ao protozoário *T. cruzi* (MAFEZOLI, 2001).

O extrato do caule de *A. coeruleae* também teve a sua atividade inibitória investigada *in vitro* frente o protozoário *T. cruzi*. Os resultados das atividades inibitórias foram de 29,91 % e 55,11 %, usando a concentração de 4 mg/mL para os respectivos extratos em hexano e metanol do caule de *A. coeruleae*. Posteriormente o extrato metanólico sofreu partições em diclorometano, acetato de etila e metanol, que apresentaram as respectivas atividades inibitórias de 100%, 68,6% e 12,9 %, empregando a concentração de 2 mg/mL (AMBROZIN et al., 2004).

Este mesmo estudo também investigou as atividades inibitórias em hexano e metanol das folhas e do caule da espécie *Almeidea rubra* frente ao *T. cruzi*. Os extratos em hexano e metanol das folhas apresentaram atividade inibitória respectivamente de 35,43 % e 54,33 %, enquanto que os extratos em hexano e metanol do caule causaram 40,94 % e 55,90 % de inibição (AMBROZIN et al., 2004).

Também foi realizado um estudo das atividades inibitórias das substâncias 4-metoxi-6-[2-(metilamino)fenil]-2H-piran-2-ona (**34**), acetato de rel-(7*R*,8*R*)-8-[(*E*)-3-hidroxi-3-metil-1-butenil]-4,8-dimetoxi-5,6,7,8 tetraidrofuro[2,3-*b*]quinolin-7-ila (**35**), arborinina (**15**), *N*-metil-1-hidroxi-3-metoxiacridona (**36**), esquimianina (**5**) e kokusagina (**19**) (Figura 4) isoladas do extrato metanólico das folhas de *A. rubra*, sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O estudo resultou nos valores de CI_{50} de 1,27, 0,98, 1,23, 2,6, 1,45 e 0,56 mmol/L para as respectivas substâncias citadas acima, assim sugerindo uma atividade tripanocida moderada (AMBROZIN et al., 2005).

Já as atividades dos extratos em hexano e metanol das folhas e do caule das espécies *A. coerulae* e *A. rubra* frente a enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) de *T. cruzi*, quando testados na concentração de 100 µg/mL, não apresentaram atividade inibitória (LEITE et al., 2009).

3.2.3. *Andreadoxa*

3.2.3.1. Estudos fitoquímicos

O estudo fitoquímico do extrato em hexano dos galhos de *Andreadoxa flava* resultou no isolamento dos alcaloides *N*-metilflindersina (**6**) e 8-metoxi-*N*-metilflindersina (**39**). Já o estudo fitoquímico do extrato metanólico dos galhos permitiu o isolamento dos alcaloides 4-metoxi-*N*-metilquinolona (**2**) e dictamina (**3**). O extrato hexânico das folhas e o extrato metanólico das flores apresentaram apenas os alcaloides 8-metoxiflindersina (**40**) e zantofilina (**41**) (Figura 5) (HOHLEMWERGER et al., 2004).

Outro estudo fitoquímico também com o extrato das folhas de *A. flava* contribuiu com o isolamento dos alcaloides 8-metoxi-*N*-metilflindersina (**39**), 8-

metoxiflindersina (**40**), zantofilina (**41**) e 5-metoxialmene (**42**) (Figura 5) usando o método com fluido de CO₂ supercrítico (SANTANA et al., 2006).

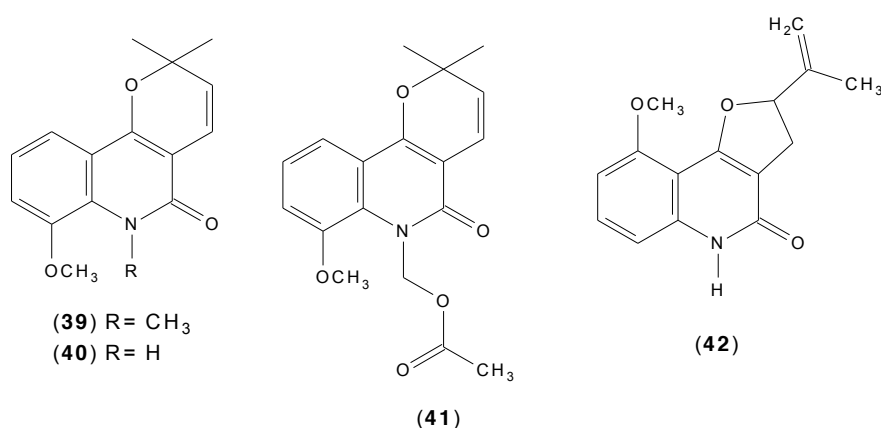


Figura 5. Substâncias isoladas da espécie *A. flava*.

3.2.4. *Angostura*

3.2.4.1. Estudos Fitoquímicos

Foi verificado na literatura um estudo fitoquímico com o extrato em diclorometano das folhas de *Angostura paniculata*, que relatou pela primeira vez o isolamento dos alcaloides 1-Hidroxi-2,3,5,6-tetametoxi-9-acridona (cuspanina) (**43**) e 1,2,3,5,6-pentametoxi-9-acridona (cusculina) (**44**) (VIEIRA e KUBO, 1992).

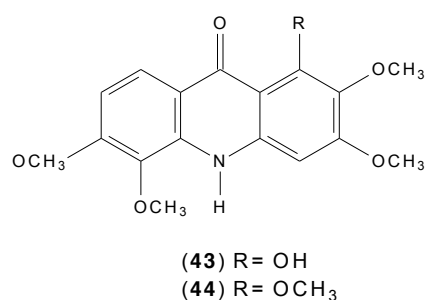


Figura 6. Substâncias isoladas da espécie *A. paniculata*

3.2.4.2. Atividades Biológicas

Foi realizado um estudo das atividades moluscicidas dos alcaloides cuspanina (43) e cusculina (44) (Figura 6) isolados das folhas de *A. paniculata* sobre *Biomphalaria glabrata*, uma espécie aquática de caracol. Este estudo resultou nos valores de CL₅₀ (concentração mínima para matar 50% da população) de 5 ppm (partes por milhão) e 20 ppm para os respectivos alcaloides. Também foi investigada as atividades inibitórias destes dois alcaloides frente às células HeLa, de carcinoma epitelial, obtendo os valores de CI₅₀ de 2,5 e 8,5 µg/mL respectivamente para os alcaloides cuspanina (43) e cusculina (44). Este estudo também relatou que ambos os alcaloides inibiram o crescimento da linhagem celular BT-20, causadora de câncer de mama (VIEIRA e KUBO, 1992).

Um estudo avaliou a atividade inibitória dos extratos das folhas de *A. trifoliata* sobre a forma tripomastigota do protozoário *T. cruzi* e também frente a enzima glicolítica glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) deste protozoário. Os extratos das folhas obtidos em diclorometano, éter de petróleo e metanol na concentração de 4 mg/mL não apresentaram atividade inibitória frente as formas tripomastigotas do protozoário (VIEIRA et al., 2001).

As atividades inibitórias dos extratos das folhas *A. trifoliata* frente a enzima gGAPDH do *T. cruzi* foram investigadas nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. Na concentração de 100 µg/mL, os extratos das folhas obtidos em diclorometano, éter de petróleo e metanol apresentaram respectivamente 9,8%, 16,6% e 0,0% de atividade inibitória. Empregando a concentração de 200 µg/mL foram obtidos os resultados de 39,9%, 26,8% e 63,3% de inibição frente a enzima gGAPDH do *T. cruzi*, para os respectivos extratos das folhas descritos acima (VIEIRA et al., 2001).

3.2.5. *Conchocarpus*

3.2.5.1. Estudos Fitoquímicos

O estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* permitiu o isolamento das substâncias: flavona (45) e 7-metoxiflavona (46) (Figura 7) (AMBROZIN et al., 2004).

Do extrato hexânico do caule de *C. heterophyllus* foram isolados os esteróides β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**) (Figura 2) e da fração em acetato de etila do extrato metanólico do caule foram isoladas as substâncias: flavona (**45**), 7-metoxiflavona (**46**), haplotusina (**47**) e o alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**48**) (Figura 7). Já a fração diclorometânica proveniente do extrato hexânico das folhas permitiu o isolamento do benzoato de β -sitosterila (**49**) e a mistura das piranoflavonas 6-decil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**50**), 6-dodecil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**51**), 6-heptadecil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**52**), 6-(16-octadecen-1-il)-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**53**) e 6-octadecil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**54**) (Figura 7), até então inéditas na literatura. O estudo da fração em acetato de etila deste mesmo extrato permitiu o isolamento das substâncias flavona (**45**), 7-metoxiflavona (**46**) e 5-hidroxi-7-metoxiflavona (**55**) (Figura 7) (AMBROZIN et al., 2008).

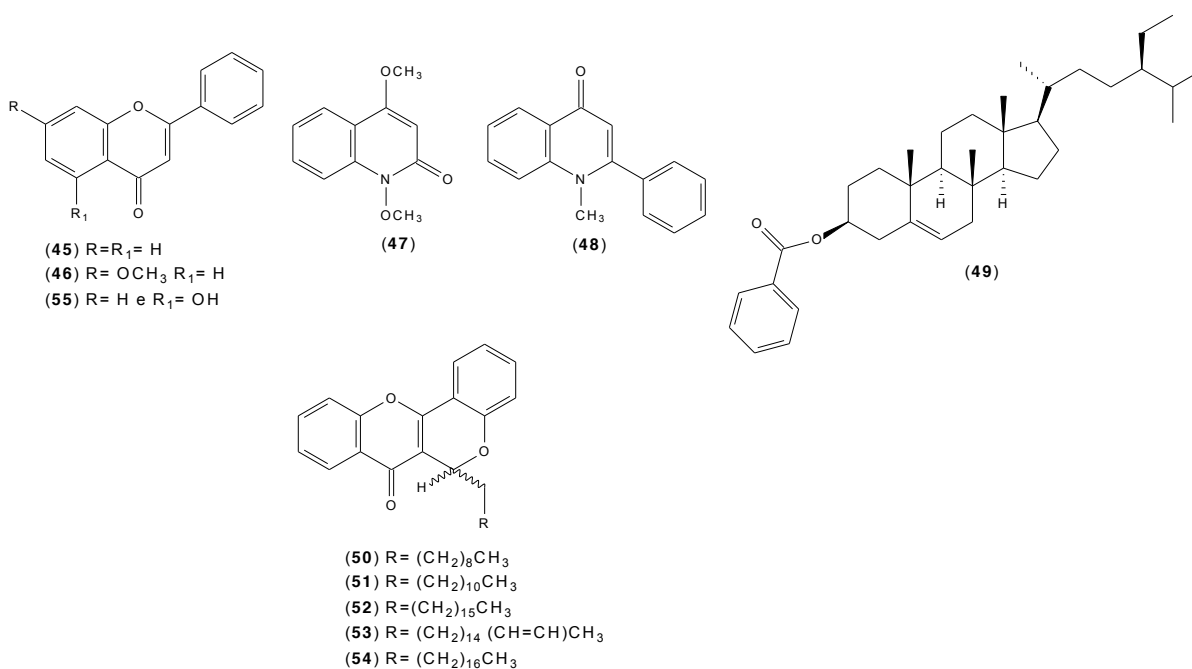


Figura 7. Substâncias isoladas da espécie *C. heterophyllus*.

O estudo fitoquímico do extrato em diclorometano das folhas de *Conchocarpus marginatus* resultou no isolamento dos alcaloides arborinina (**15**) (Figura 2), metilarborinina (**32**) (Figura 4) e 1-hidroxi-3-metoxi-*N*-metil acridona (**56**) (Figura 8). Já do extrato em diclorometano dos galhos foi possível o isolamento dos alcaloides

arilquinolin-4-onas: 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**48**) e 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**57**) (Figura 8) (BELLET et al., 2012).

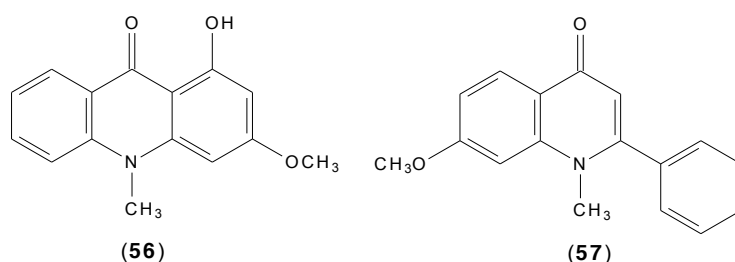


Figura 8. Substâncias isoladas da espécie *C. marginatus*.

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Conchocarpus inopinatus* resultou no isolamento dos alcaloides arborinina (**15**), metilarborinina (**32**), 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona (**56**), xanthoxolina (**58**), 1,2,3,5-tetrametoxi-N-metilacridona (**59**), toddaliopsina C (**60**) e o alcalóide denominado inopinatina (**61**) (Figura 9), descrito pela primeira vez na literatura. Além disso, também foi possível o isolamento da cumarina escopoletina (**62**). Do extrato metanólico do caule foi possível isolar as substâncias metilarborinina (**32**), 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**48**), dictamina (**3**), escopoletina (**62**) e marmesina (**63**) (Figura 9) (BELLET et al., 2012).

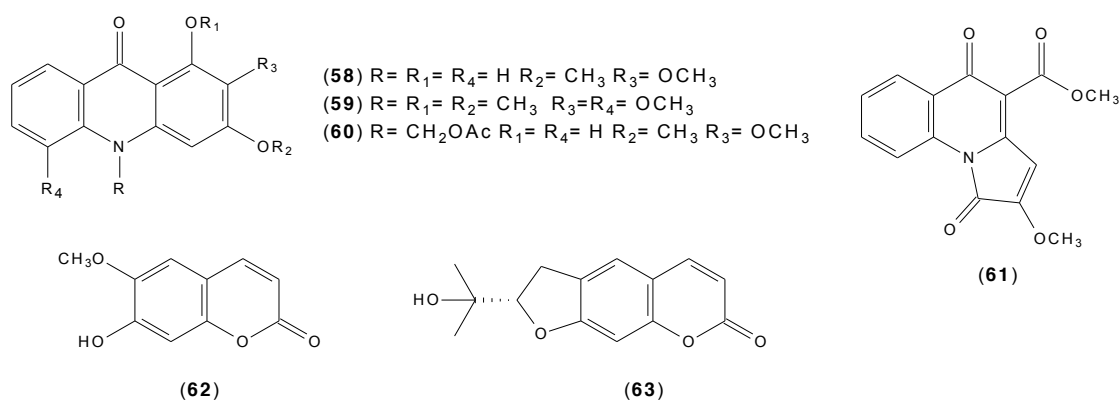


Figura 9. Substâncias isoladas da espécie *C. inopinatus*.

Do extrato em diclorometano do caule de *Conchocarpus macrophyllus* foram isolados os alcaloides acridônicos arborinina (**15**) (VELOZO, 1995) e metilarborinina (**32**) e a mistura dos esteroides β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**) (ALBARICI, 2006).

O estudo fitoquímico de *Conchocarpus macrocarpus* e *Conchocarpus cuneifolius* levou ao isolamento das substâncias: 3-[2-(3-hidroxi-7,7-dimetil-3,7-dihidro-pirano[3,2-e]indol-1-il)-etil]-1H-quinazolina-2,4-diona (**64**), 3-(2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-il)etil)-1-metil-1H-quinazolina-2,4- diona (**65**), 1-(7-hidroxi-5-metoxi-2,2-dimetil-3,8 α -dihidro-2H-cromen-8-il)-etanona (**66**), 1-(5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-3,8 α -dihidro-2H-cromen-8-il)-etanona (**67**), 1-(5-hidroxi-7-metoxi-2,2-dimetil-3,8 α -dihidro-2H-cromen-6-il)-etanona (**68**), 1-(5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-3,8 α -dihidro-2H-cromen-6-il)-etanona (**69**), 6,8-diglicosil-7,4'-hidroxiflavona (**70**), 6-diglicosil-7-metoxi-4'-hidroxiflavona (**71**) e 6-diglicosil-7-metoxi-4'-acetilflavona (**72**) (Figura 10) (VELOZO, 1995).

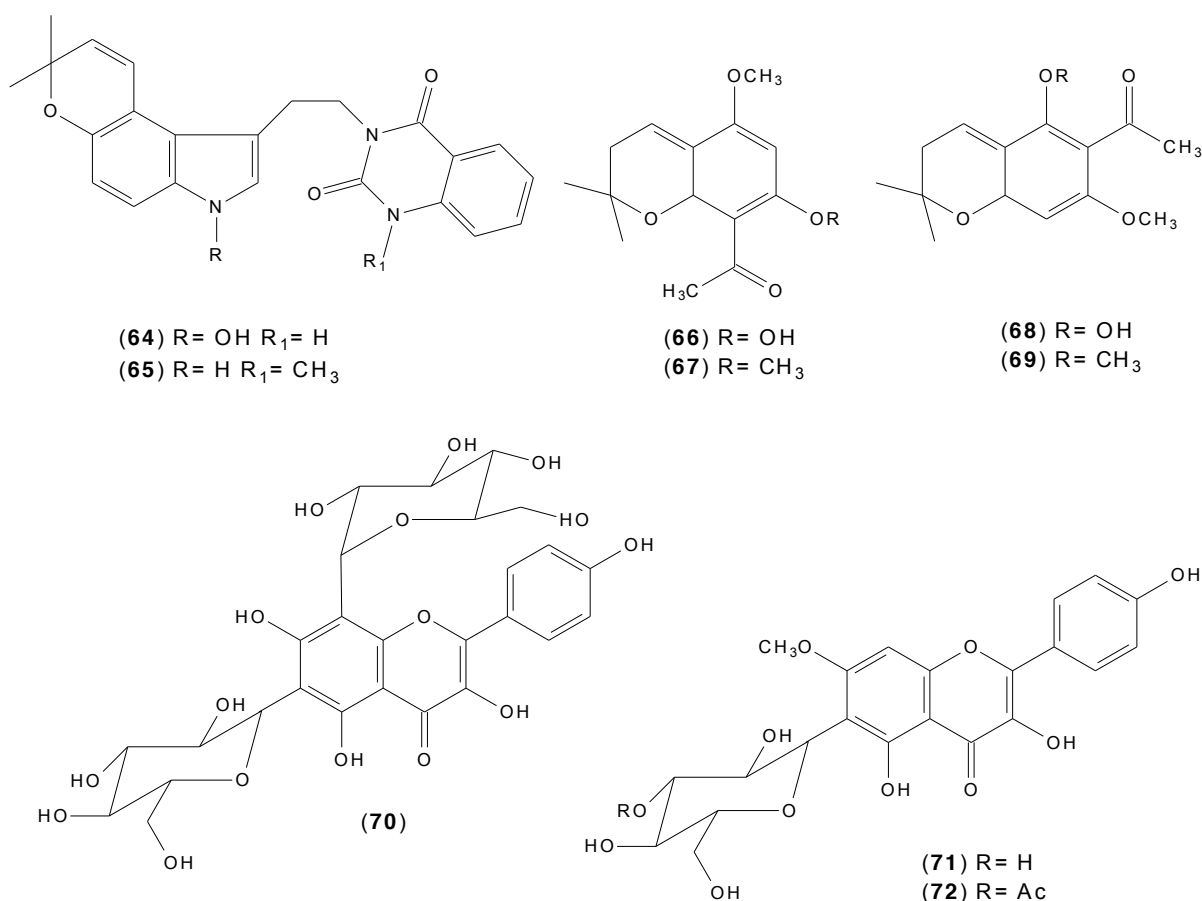


Figura 10. Substâncias isoladas das espécies *C. macrocarpus* e *C. cuneifolius*.

De *Conchocarpus longifolius*, foram isoladas as cumarinas: 3-metoxiangelicina (**73**), 3,6-dimetoxiangelicina (**74**), esfodina (**75**), pimpinelina (**76**), isobergapteno (**77**), umbeliferona (**78**), escopanona (**79**), escopoletina (**62**), 5,6-diamino-4,9-dimetoxi-furo[3,2-g]cromen-7-ona (**80**), quiahucumarina D (**81**) e

aurapteno (**82**) (Figura 11). Também foi possível o isolamento dos alcaloides: candicina (**83**), *N*-metil-4,6-dimetoxi-2-quinolona (**84**), 4,6-dimetoxi-2-quinolona (**85**), 6-metoxihaplotusina (**86**), *N*-metilhaplamina (**87**), *N*-metoxihaplamina (**88**) (Figura 11) e esquiminina (**5**) (Figura 1) (MAFEZOLI, 2001; FACCHINI, 2005).

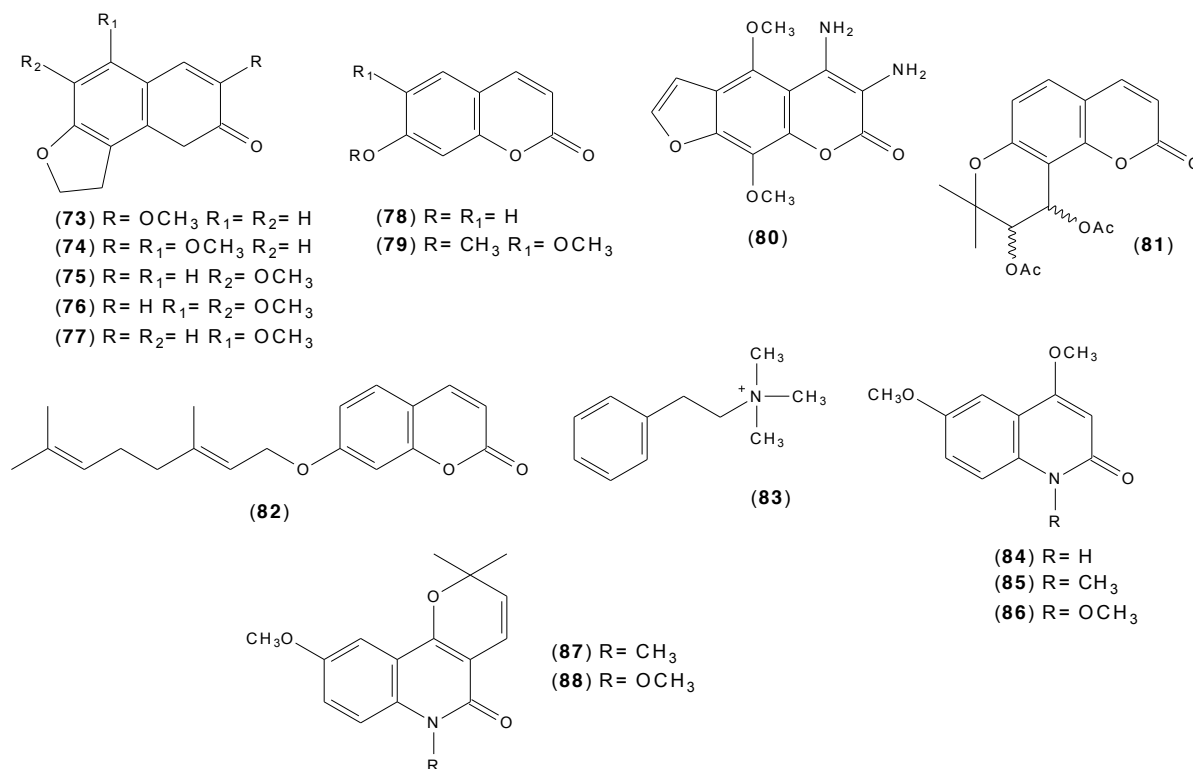


Figura 11. Substâncias isoladas da espécie *C. longifolius*.

Do extrato metanólico dos galhos de *Conchocarpus gaudichaudianus* foram isolados os alcaloides 3-(2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-il)etil)-1-metil-quinazolina-2,4(1H, 3H)-diona (**65**) (Figura 10), 3-(2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-il)etil)-quinazolina-2,4(1H, 3H)-diona (**89**), 3-(2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-il)etil)-1-hidroxi-quinazolina-2,4(1H, 3H)-diona (**90**) e 4-metoxi-1-metil-3-(3',7'-dimetil-6',7'-dihidroxi-2'-octenil-2-quinolona (**91**) e as duas amidas, *N*-trans-cumaroiltiramina (**92**) e *N*-trans-feruloiltiramina (**93**) (Figura 12) (CORTEZ et al., 2009).

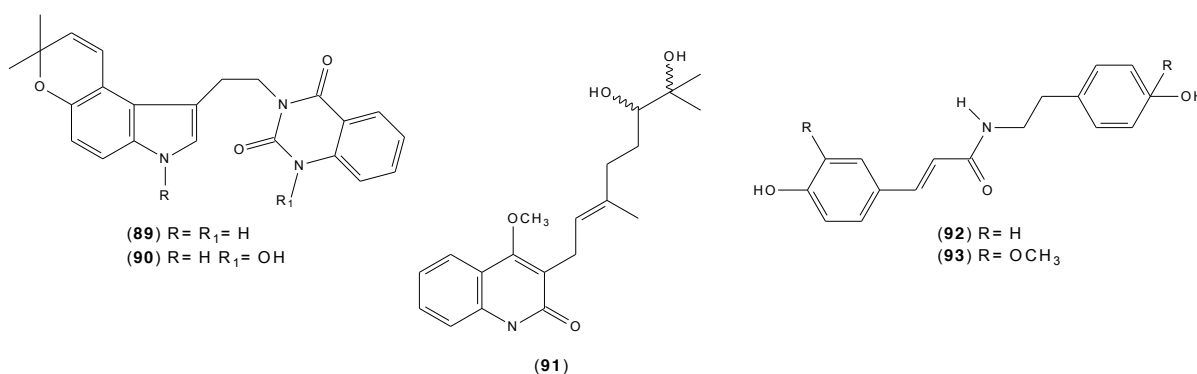


Figura 12. Substâncias isoladas da espécie *C. gaudichaudianus*.

Dos galhos de *Conchocarpus fontanesianus* foi possível isolar os alcaloides dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) (Figura 1) e 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**48**) (Figura 7) e a cumarina marmesina (**63**) (Figura 9) (CABRAL et al., 2012).

3.2.5.2. Atividades Biológicas

Foram avaliadas as atividades anticolinesterásicas do extrato etanólico dos galhos de *C. fontanesianus*, das frações e das substâncias puras obtidas do seu fracionamento. A inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase é o método mais eficaz para otimizar o sistema colinérgico em pacientes que sofrem da doença de Alzheimer, assim diminuindo os efeitos da doença. Foram investigadas as atividades anticolinesterásicas do extrato bruto em etanol, da fração em hexano, da fração de alcaloides e das substâncias dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**), 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**48**) e marmesina (**63**). A técnica de CCD (Cromatografia em Camada Delgada) foi empregada para uma avaliação qualitativa e para quantificar a taxa de reação foi usada a placa de Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay) (CABRAL et al., 2012).

O extrato bruto, a fração hexânica e de alcaloides apresentaram inibição da atividade acetilcolinesterásica, porém a fração com alcaloides provocou o maior potencial inibidor, obtendo um CI_{50} de 31,73 $\mu\text{g/mL}$. Todas as substâncias puras também apresentaram potencial inibitório, mas o alcalóide esquimianina se destacou apresentando um CI_{50} de 74,09 $\mu\text{g/mL}$, porém este valor ainda é alto quando comparado ao controle positivo, fisostigmina com CI_{50} de 0,61 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL et al., 2012).

Os extratos do caule e das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* tiveram as suas atividades inibitórias investigadas *in vitro* frente o protozoário *T. cruzi*. Os extratos em hexano e metanol das folhas apresentaram atividade inibitória respectivamente de 99,22% e 59,44%, enquanto que os extratos em hexano e metanol do caule causaram 71,65% e 68,89% de inibição, todos na concentração de 4 mg/mL. Posteriormente o extrato hexânico das folhas sofreu partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, que apresentaram as respectivas atividades inibitórias de 25,7%, 45,0%, 100% e 7,1%, empregando a concentração de 2 mg/mL. O mesmo foi realizado com o extrato metanólico das folhas resultando respectivamente em 97,1%, 25,6%, 56,4% e 98,6% de inibição (AMBROZIN et al., 2004).

Já o extrato metanólico dos galhos foi fracionado em apenas acetato de etila e metanol obtendo 100% e 37% de atividade tripanocida. Também foram avaliados os potenciais inibitórios das substâncias: flavona (**45**) e 7-metoxiflavona (**46**) (Figura 7), isoladas das folhas de *C. heterophyllus*, nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/ml resultando nos valores de CI_{50} de 2116,0 e 787,1 µg/mL, respectivamente (AMBROZIN et al., 2004).

Os extratos em hexano e metanol das folhas e do caule da espécie *C. heterophyllus* tiveram suas atividades inibitórias avaliadas frente a enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) de *T. cruzi*, quando testados na concentração de 100 µg/mL, não apresentaram atividade inibitória significativa (LEITE et al., 2009).

As substâncias β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**), flavona (**45**), 7-metoxiflavona (**46**), haplotusina (**47**), 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**48**), benzoato de β -sitosterila (**49**) e a mistura das piranoflavonas: 6-decil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**50**), 6-dodecil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**51**), 6-heptadecil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**52**), 6-(16-octadecen-1-il)-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**53**) e 6-octadecil-6*H*,7*H*-[1]benzopirano[4,3-*b*][1]benzopiran-7-ona (**54**) (Figura 7), isoladas dos extratos do caule e das folhas de *C. heterophyllus*, foram testadas sob a forma tripomastigota do *T. cruzi* nas concentrações de 500, 250 e 100 mg/mL. Os resultados obtidos para as substâncias testadas indicaram que as mais ativas foram os alcaloides haplotusina (**47**) e 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**48**), apresentando valores de CI_{50} de 136,9 e 144,9 µM, respectivamente. Entretanto, as substâncias

testadas não se mostraram potentes agentes tripanocidas quando comparadas ao controle positivo utilizado, a violeta de genciana com CI_{50} de 83 μ M (AMBROZIN et al., 2008).

A atividade tripanocida das espécies *C. gaudichaudianus*, *C. heterophyllus*, *C. obovatus*, *C. longifolius* e *C. inopinatus* foram avaliadas na concentração de 4 mg/mL sob a forma tripomastigota do protozoário *T. cruzi*. Para a espécie *C. gaudichaudianus* foram obtidos valores de CI_{50} de 1,36 e 4,00 mg/mL para os extratos em hexano e metanol dos galhos, de 1,52 e >10 mg/mL para os extratos em hexano e metanol das folhas e de 7,24 e 5,52 mg/mL para os extratos em hexano e metanol do caule, respectivamente. Os extratos metanólicos dos galhos e folhas de *C. heterophyllus* apresentaram os respectivos valores de CI_{50} de 3,82 e 2,46 mg/mL. Enquanto que os extratos em hexano, diclorometano e metanol dos galhos de *C. obovatus* obtiveram respectivamente os valores de CI_{50} de 1,58, 2,86 e 4,54 mg/mL e os extratos em hexano e metanol das folhas apresentaram CI_{50} de 2,83 e 2,23 mg/mL. Com relação a espécie *C. longifolius* foram obtidos valores de IC_{50} de 2,85, 3,34, >10 e 9,89 mg/mL respectivamente para os extratos em hexano e metanol dos seus galhos e para os extratos em hexano e metanol das suas folhas. Já a espécie *C. inopinatus* apresentou CI_{50} de 9,25 e 4,63 mg/mL para os respectivos extratos em hexano e metanol dos galhos e CI_{50} de >10 e 1,39 mg/mL para os respectivos extratos em hexano e metanol das folhas (MAFEZOLI et al., 2000).

Um segundo teste foi realizado com frações dos extratos das espécies *C. gaudichaudianus*, *C. obovatus* e *C. inopinatus* sob as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, desta vez empregando a concentração de 2 mg/mL. O extrato em hexano das folhas de *C. gaudichaudianus* resultou em frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol que apresentaram os respectivos valores de CI_{50} de >10, 3,23, 4,99 e >10 mg/mL. Já o extrato em hexano das folhas dessa mesma espécie também foram fracionados em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, obtendo os respectivos valores de CI_{50} de >10, 4,07, 3,69 e 8,97 mg/mL. De *C. obovatus* foram obtidos as frações em hexano, acetato de etila e butanol do extrato em hexano dos seus galhos, os quais resultaram em valores CI_{50} de 2,55, 1,46 e 2,29 mg/mL, respectivamente. Da espécie *C. inopinatus* foram obtidos do extrato das suas folhas frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, que apresentaram os respectivos valores de CI_{50} de >10, 1,29, 1,44 e >10 mg/mL. Os

resultados obtidos revelaram um grande potencial tripanocida para as espécies testadas (MAFEZOLI et al., 2000).

3.2.6. *Desmotes*

3.2.6.1. Estudos Fitoquímicos

Foi encontrado apenas um estudo fitoquímico com o fungo endofítico *Mycoleptodiscus sp.* F0194 obtido das folhas de *Desmotes incomparabilis*, que resultou no isolamento dos alcaloides micoleptodiscina A (**94**) e micoleptodiscina B (**95**) (Figura 13), relatados pela primeira vez na literatura (ORTEGA et al., 2013).

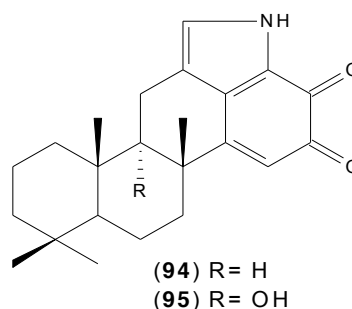


Figura 13. Substâncias isoladas do fungo endofítico das folhas de *D. incomparabilis*.

3.2.6.2. Atividades Biológicas

O extrato do fungo endofítico 85 (CSIRO (M) E7391) isolado das folhas da espécie *Desmotes incomparabilis* teve sua atividade inibitória investigada frente aos parasitas *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani*. Os resultados obtidos indicaram que o extrato do fungo não possui atividade inibitória frente aos parasitas *P. falciparum*, causador da malária, e frente ao *T. cruzi*, causador da doença de Chagas. Porém provocou inibição de 93,4% do crescimento do protozoário *L. donovani*, responsável pela Leishmaniose. Este estudo também avaliou a atividade inibitória do fungo 85 frente à linhagem de células cancerígenas MCF-7, mas este não provocou a inibição do crescimento das células (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011).

Foi verificado na literatura um estudo que avaliou a atividade inibitória do alcaloide micoleptodiscina B (**95**) (Figura 13), isolado do fungo endofítico *Mycocleptodiscus sp.* F0194 obtido das folhas de *D. incomparabilis*. Este estudo obteve os valores de CI_{50} de 0,660, 0,780 0,630 e 0,600 μM para o alcalóide micoleptodiscina B (**95**) frente às linhagens de células humanas cancerígenas H460, A2058, H522-T1 e PC-3, respectivamente. O mesmo estudo também avaliou a citotoxicidade do alcaloide frente a IMR-90 (fibroblastos humanos), obtendo um CI_{50} de 0,41 μM . Devido a sua alta toxicidade, o alcalóide micoleptodiscina B (**95**) não foi considerado um potencial agente anticancerígeno (ORTEGA et al., 2013).

3.2.7. Ertela

3.2.7.1. Estudos Fitoquímicos

Foi relatado na literatura um estudo que descreve o isolamento apenas do alcaloide acridônico arborina (**15**) (Figura 2) dos galhos e folhas da espécie *Ertela baihensis* (ROSEGHINI et al., 2006).

Da espécie *Ertela trifólia* foi encontrado na literatura um estudo fitoquímico dos extratos dos seus galhos, folhas e flores que resultou no isolamento das substâncias conhecidas: γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) (Figura 1), chaplofitina-B (**96**), 7-(2'-hidroxi-3'-metoxi-preniloxi)-4,8-dimetoxifuroquinolina (**97**), 7-isopenteniloxi-c-fagarina (**98**), tecleanatalesina B (**99**), metilinkolbisina (**100**), 1-hidroxi-2,3-dimetoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (**101**), sesamina (**102**) e fargesina (**103**) e relatou o isolamento pela primeira vez dos alcaloides 7-(2'-Hidroxi-3'-cloropreniloxi)-4,8-dimetoxifuroquinolina (**104**) e 6-(2'-hidroxi-3'-cloropreniloxi)-4,7-dimetoxifuroquinolina (**105**) (Figura 14) (CAO et al., 2008).

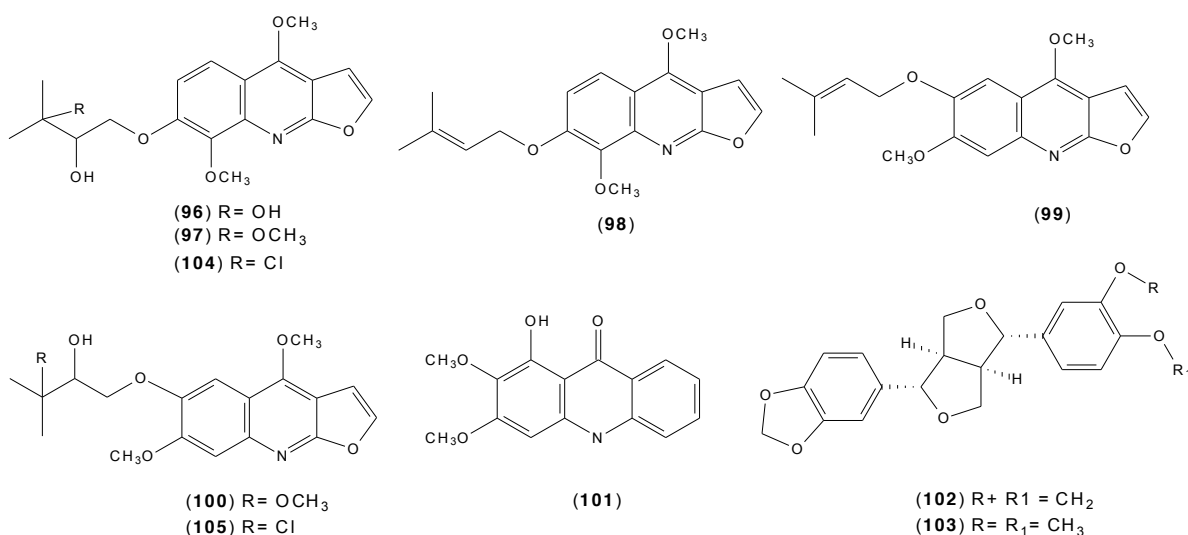


Figura 14. Substâncias isoladas da espécie *Ertela trifolia*.

3.2.7.2. Atividades Biológicas

Na literatura foi verificado um estudo que avaliou os efeitos de três concentrações (10 nM, 1 μ M e 10 μ M) do alcaloide acridônico arborina (**15**), isolado dos galhos e folhas de *Ertela baihensis*, sobre células do baço e do timo obtidas de ratos Male Wistar. As células foram estimuladas ou não por três estimulantes mutagênicos distintos. A viabilidade celular foi avaliada por indução de necrose e/ou apoptose e a função celular foi mensurada pela proliferação e produção de citocinas. Para compreender a ação do alcaloide arborina (**15**) nas populações de células T (linfócitos encontrados no timo) e células B (linfócitos encontrados no baço) foram usados os agentes mutagênicos: concanavalina A (ConA) (10 μ g/mL), um agente mutagênico específico das células T; pokeweed (PWM) (5 μ g/mL), um agente mutagênico de células T e B e o agente lipopolissacarídeo (LPS) (5 μ g/mL) específico para células B (ROSEGHINI et al., 2006).

O alcaloide arborina (**15**) suprimiu a proliferação de células estimuladas com ConA e estas células apresentaram também uma diminuição pequena mas significativa na produção de IFN- γ (Interferon-gama), uma citocina produzida por células T ativadas, e uma diminuição acentuada na produção de níveis de IL-10 (Interleucina-10), outra citocina conhecida por regular a resposta imune. Porém, não foi observada qualquer alteração seja de apoptose ou necrose sob esse tipo de células (ROSEGHINI et al., 2006).

Um pequeno efeito inibidor causado pela arborina (**15**) foi observado sobre a proliferação de células do baço estimuladas com PWM após um período 48 horas de incubação, sendo observado a apoptose destas células após 24 h e uma diminuição na produção dos níveis IL-10 em 48 h. O alcaloide arborinina (**15**) também demonstrou efeitos sob as células de baço estimuladas por LPS, um ativador de células B. O aumento da proliferação e diminuição da apoptose de células de baço estimuladas por LPS em 48 h em contraste com a diminuição da produção de IFN- γ por estas células também em 48 h e 72 h sugere que arborinina (**15**) pode ter diversos efeitos diferentes sob as populações de células distintas. Estes resultados indicam que o alcaloide arborinina (**15**) interfere preferencialmente por um modo inibidor da proliferação celular e morte de células sobre a produção de citocinas, especialmente na produção de IL-10, por células do sistema imunológico sob estimulação mitogênica e não induzindo a necrose das células (ROSEGHINI et al., 2006).

Um segundo estudo com o alcaloide arborina (**15**), também isolado dos galhos e folhas de *E. bahensis*, investigou o seu efeito sobre hibridomas de células B obtidas de ratos. Os hibridomas são linhagens desenvolvidas através de células de mieloma e células B com o objetivo de produzir grandes quantidades do anticorpo escolhido e crescem indefinidamente, por isso são usados como modelos de tumores. Infelizmente o alcalóide não provocou uma diminuição significativa do anticorpo monoclonal e também não reduziu a proliferação de hibridomas de células B, em nenhuma das concentrações testadas (ROSEGHINI et al., 2009).

Foi relatado na literatura também um estudo das atividades inibitórias das substâncias 7-(2'-Hidroxi-3'-cloropreniloxi)-4,8-dimetoxifuroquinolina (**97**), 6-(2'-hidroxi-3'-cloropreniloxi)-4,7-dimetoxifuroquinolina (**105**), 7-isopenteniloxi- γ -fagarina (**98**), esquimianina (**5**), tecleanatalesina B (**99**), metilnkolbisina (**100**) e 1-hidroxi-2,3-dimetoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (**101**), isoladas do extrato dos galhos, folhas e flores da espécie *Ertela trifolia*, frente a linhagem celular A2780, responsável pelo câncer de ovário. Os valores de Cl_{50} obtidos foram de 13, 9, 13, 13, 16, 14 e 12 $\mu\text{g/mL}$ para as respectivas substâncias citadas acima, sugerindo uma atividade anticancerígena moderada (CAO et al., 2008).

3.2.7.3. Levantamento Etnofarmacológico

A espécie *Ertela baihensis* é usada popularmente como agente diurético, antitérmico, antidiabético e expectorante (ROSEGHINI et al., 2006).

3.2.8. *Erythrochiton*

3.2.8.1. Estudos Fitoquímicos

Um estudo fitoquímico relatou o isolamento do alcalóide γ -fagarina (**4**) (Figura 1) das cascas das raízes da espécie *Erythrochiton brasiliensis* cultivadas em estufas (JOHNE; HARTLING, 1977).

Outro estudo fitoquímico foi realizado com os extratos dos galhos, cascas, folhas, flores e frutos da espécie *E. brasiliensis*. Com exceção do extrato dos frutos, as substâncias estachidrina (**106**) e homoestachidrina (**107**) foram isolados em todos os demais extratos (Figura 15). Do extrato das folhas foi isolado o isofitol (**108**) e o ácido *N*-metilpípecólico (**109**) (Figura 15), sendo este último isolado pela primeira vez em uma planta. O esteróide β -sitosterol (**24**) (Figura 2) foi isolados dos extratos dos galhos, cascas e folhas. Além disso, foi relatado a presença de aminoácidos livres nas folhas e hidrocarbonetos, ácidos graxos e álcoois primários na cera dos frutos de *E. brasiliensis* (SARGENTI et al., 1993).

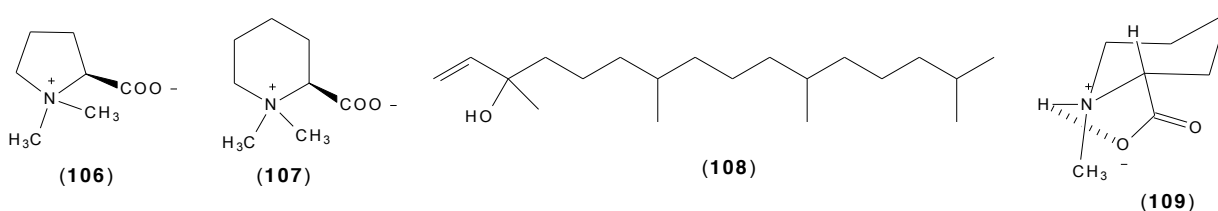


Figura 15. Substâncias isoladas da espécie *Erythrochiton brasiliensis*.

3.2.8.2. Levantamento Etnofarmacológico

O chá da casca da raiz da espécie *Erythrochiton brasiliensis* é usada na medicina popular como vermífugo (CORREA, 1984).

3.2.9. *Euxylophora*

3.2.9.1. Estudos Fitoquímicos

Um estudo fitoquímico com o extrato das cascas da espécie *Euxylophora paraensis* permitiu o isolamento dos alcaloides euxiloforina A (**110**), euxiloforicina A (**111**) e euxiloforicina B (**112**) (Figura 16), relatados pela primeira vez na literatura (CANONICA et al., 1968). Posteriormente um segundo estudo com o extrato metanólico das cascas de *E. paraensis* relatou o isolamento dos alcaloides indolopiridiquinazolinos euxiloforicina C (**113**) e euxiloforina B (**114**) (Figura 16), também descritos pela primeira vez na literatura (DANIELI et al., 1972). Ainda com o extrato das cascas de *E. paraensis*, foi possível o isolamento pela primeira vez dos alcaloides euxiloforina C (**115**), euxiloforina D (**116**), euxiloforicina D (**117**) e euxiloforicina E (**118**) (DANIELI, et al., 1973), 1-hidroxiturtaecarpina (**119**) (DANIELI et al., 1974) e euxiloforicina F (**120**) (Figura 16) (DANIELI et al., 1976).

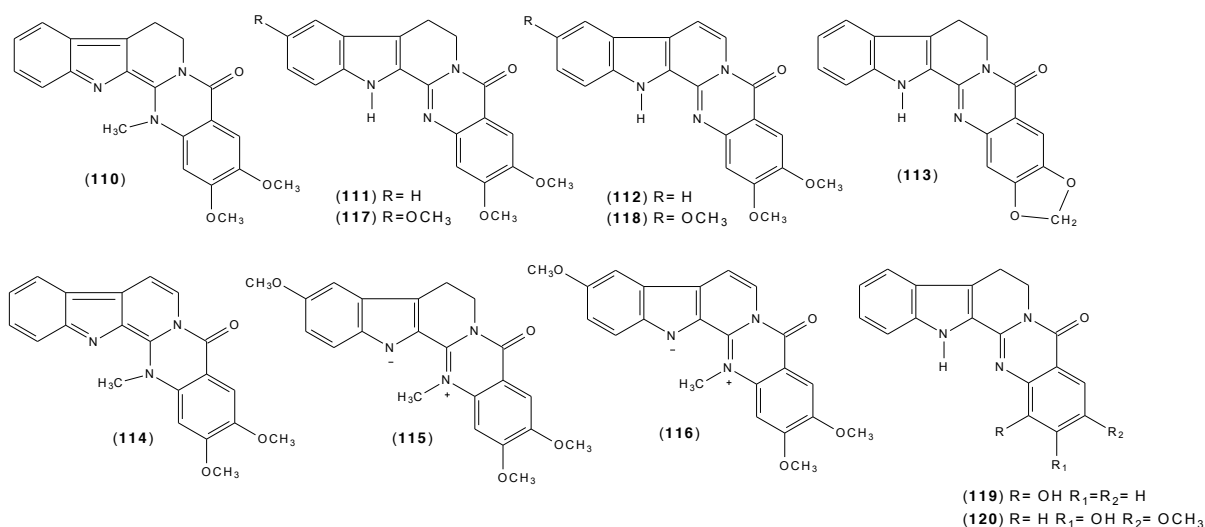


Figura 16. Substâncias isoladas da espécie *Euxylophora paraensis*.

Outros estudos com o cerne da espécie *E. paraensis* também relataram o isolamento dos alcaloides esquimianina (**5**), *N*-metilflindersina (**6**), 4-(2,3-diidroxi-3-metilbutoxi)-1-metilquinolin-2(1H)-ona (**121**), 4-hidroxi-2,2,6-trimetil-3,4,5,6-tetraidro-2H-piranol[3,2-*c*]quinolin-5-ona (**122**), paraensina (**123**), 2,3,3-trimetil-2,3,4,5-tetraidrofurano[3,2-*c*]quinolin-4-ona (**124**), 2,3,3,5-tetrametil-2,3,4,5-tetraidrofurano[3,2-*c*]quinolin-4-ona (**125**) e também outros da série de alcaloides

bis-quinolin-2-ona hexacíclicos: paraensidimerina A-G (**126-132**) (JURD;WONG, 1981; JURD et al., 1982; JURD; BENSON, 1983).

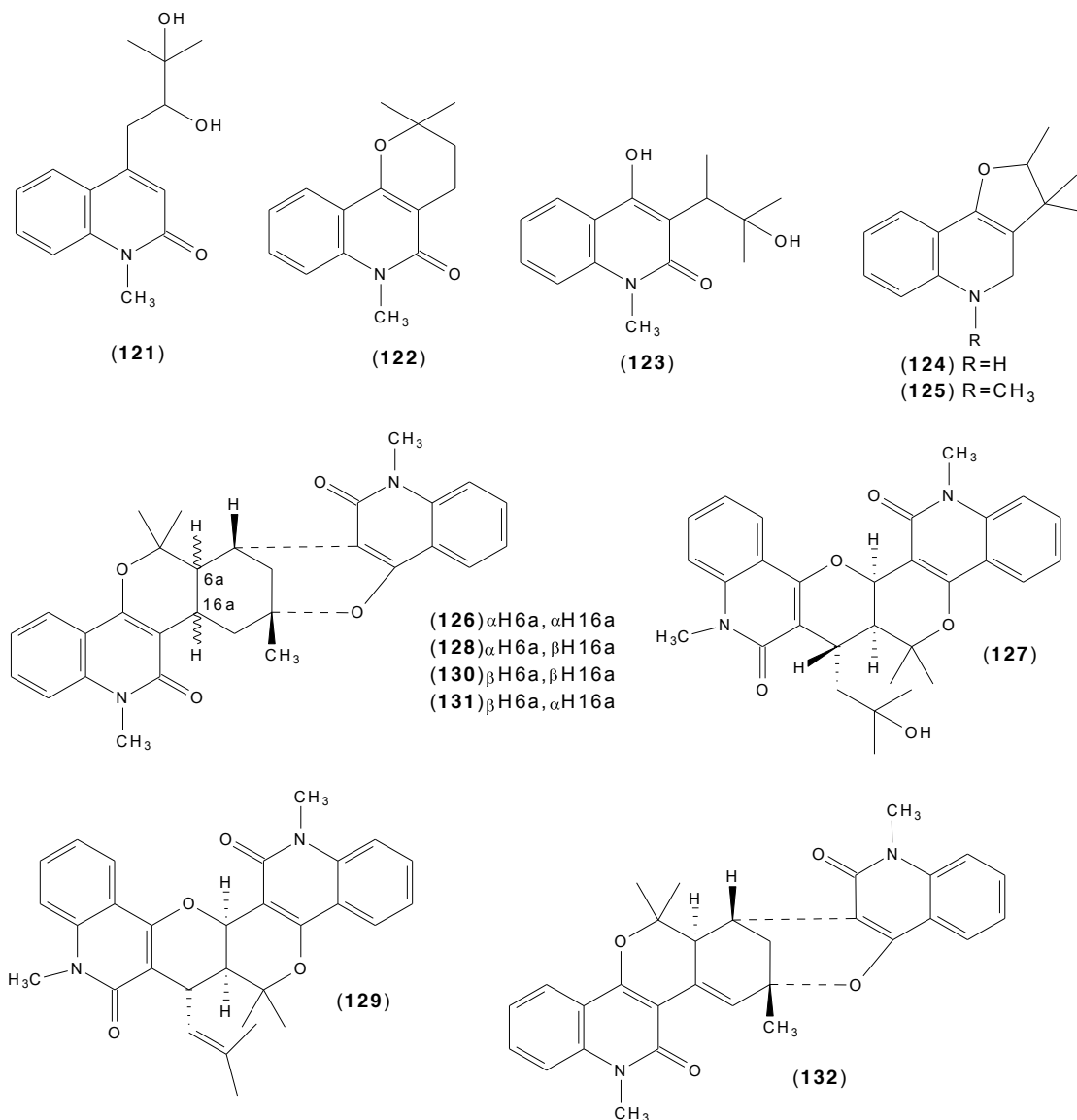


Figura 17. Substâncias isoladas da espécie *Euxylophora paraensis*.

O único estudo fitoquímico com as folhas de *E. paraensis* permitiu o isolamento das cumarinas: marmesina (**63**) (Figura 9) xantotoxina (**133**), isopimpenilina (**134**), iso-oxipeucedanina (**135**), oxipeucedanina hidratada (**136**), 8-metóxi-marmesina (**137**); dos flavonoides: quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (**138**), miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (**139**) e hesperidina (**140**); dos alcaloides: esquimianina (**5**) e N-metilfindersina (**6**) e do limonoide limonina (**141**) (Figura 18) (ISIDORO et al., 2012).

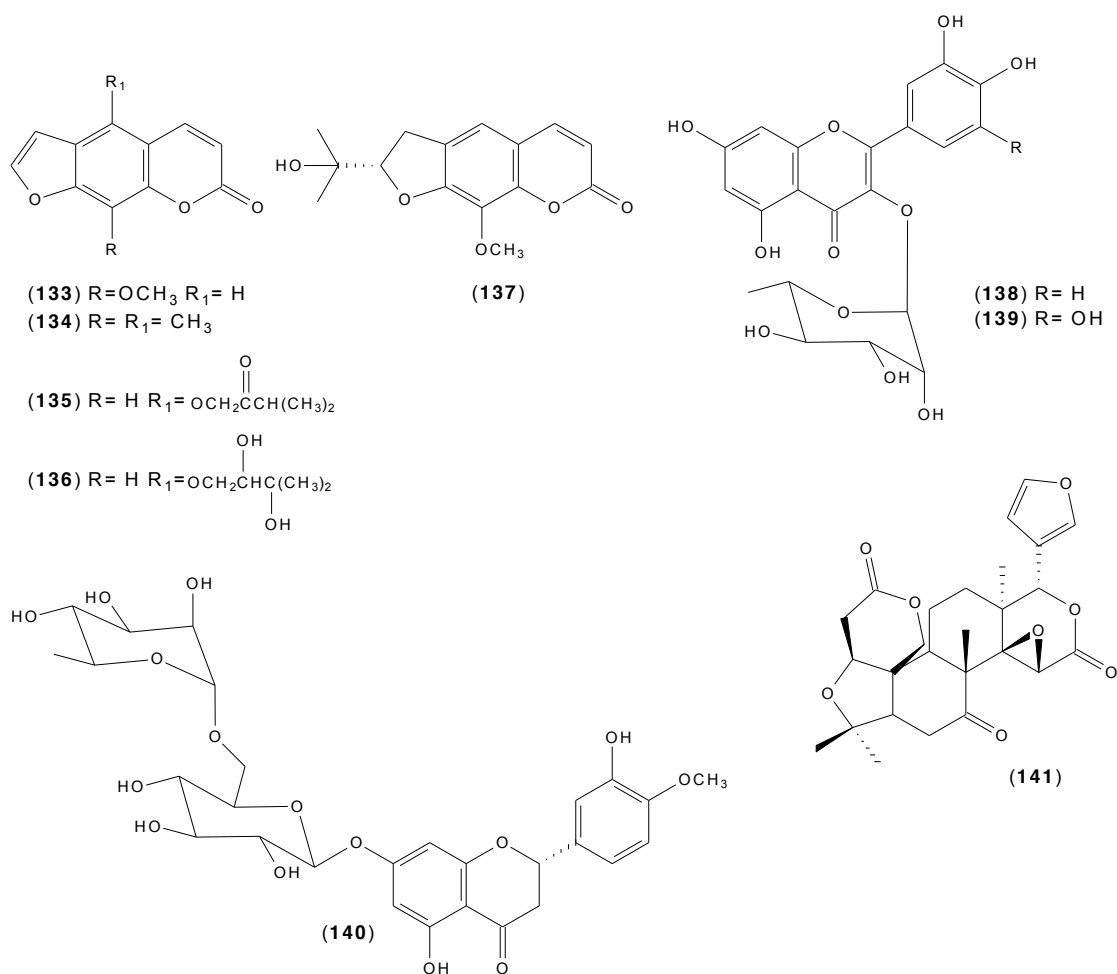


Figura 18. Substâncias isoladas da espécie *Euxylophora paraensis*.

3.2.10. *Galipea*

3.2.10.1. Estudos Fitoquímicos

Foi realizado um estudo fitoquímico com o extrato em diclorometano dos galhos da espécie *Galipea bracteata* permitindo os isolamentos dos alcaloides 2-*n*-propilquinolina (142), 2-*n*-pentilquinolina (143) e 2-(1'-pentenil)-quinolina (144). Além de relatar pela primeira vez o isolamento do alcaloide 2-(3',4' metilenodioxifeniletíl)-quinolina (145) (Figura 19) (VIEIRA et al., 1990).

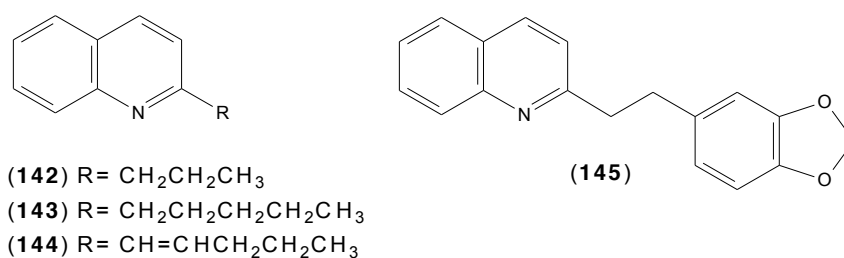


Figura 19. Substâncias isoladas da espécie *Galipea bracteata*.

Dos galhos da espécie *Galipea longiflora* foram isolados os alcaloides esquimianina (**5**) (Figura 1), evolitrina (**18**) (Figura 2), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-quinolína (**145**) (Figura 19), 2-fenilquinolína (**146**) 2-fenil-4-metoxiquinolína (**147**), 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolína (**148**), 2-(3',4'-metilenodioxistiril)-4-metoxiquinolína (**149**), 2-*n*-amil-4-metoxiquinolína (**150**), 2-(1',2'-pentenil)-4-metoxiquinolína (**151**) e 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-4-metoxiquinolína (cusparina) (**152**) (Figura 20) (VAGNEUR et al., 1989).

Um segundo estudo fitoquímico com os galhos, raízes e folhas de *G. longiflora* permitiu o isolamento de treze alcaloides: esquimianina (**5**), 2-*n*-propilquinolína (**142**), 2-*n*-pentilquinolína (**143**), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-quinolína (**145**), 2-fenilquinolína (**146**), 2-fenil-4-metoxiquinolína (**147**), 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolína (**148**), 4-metoxi-2-*n*-pentilquinolína (**150**), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-4-metoxiquinolína (**152**), 4-metoxi-2-*n*-propilquinolína (chimanina A) (**153**), 2-(*E*)-prop-1'-enilquinolína (chimanina B) (**154**), 4-metoxi-2-(*E*)-prop-1'-enilquinolína (chimanina C) (**155**) e 2-(1',2'-trans-epoxipropil)-quinolína (chimanina D) (**156**), os quatro últimos estavam sendo descritos pela primeira vez na literatura (Figura 20) (FOURNET et al., 1993).

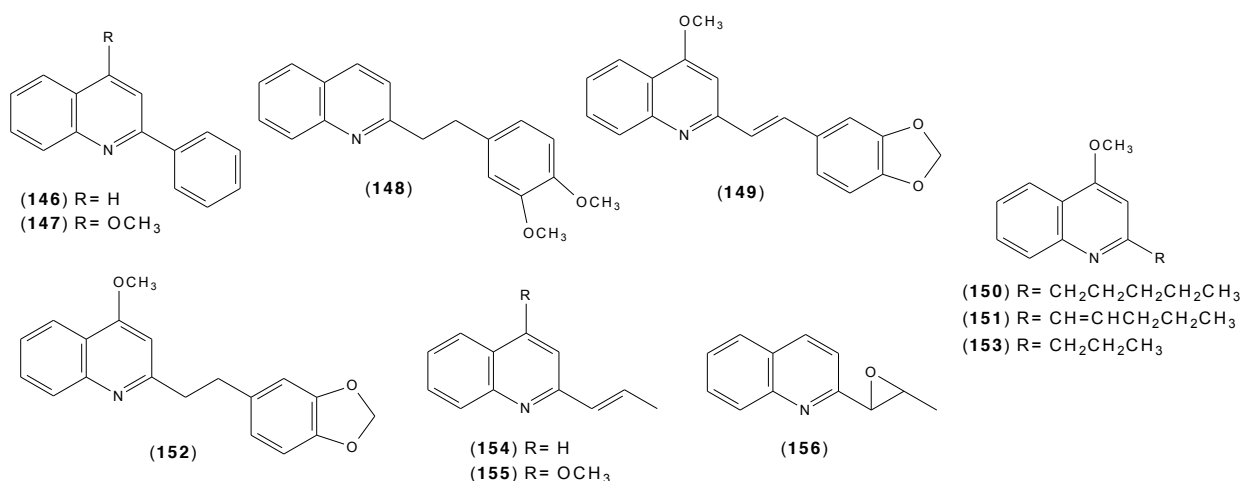


Figura 20. Substâncias isoladas da espécie *Galipea longiflora*.

Já o estudo fitoquímico das cascas das raízes e galhos da espécie *Galipea trifoliata* resultou no isolamento das cumarinas ramosina (**157**), febalosina (**158**) e galipeina (**159**) (Figura 21), esta última relatada pela primeira vez na literatura (WIRASUTISNA et al., 1987).

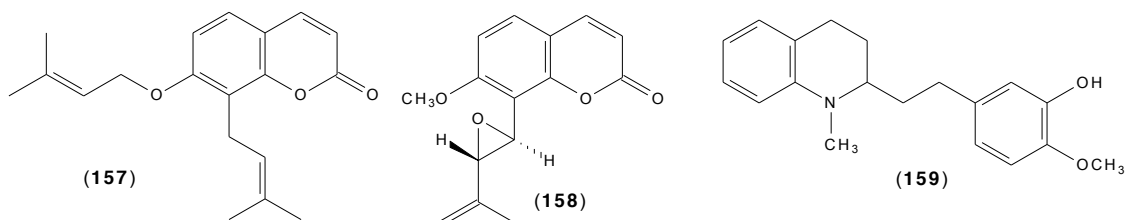


Figura 21. Substâncias isoladas da espécie *Galipea trifoliata*.

Do extrato das cascas da espécie *Galipea officinalis* foram isoladas as substâncias 2-*n*-pentil-quinolina (**143**) (Figura 19), quinolina (**160**), 2-metil-quinolina (**161**) e *N*-metil-2-quinolona (**162**) (SPATH & PIKL, 1930). Também foi possível o isolamento das substâncias 3,5-dihidroxi-5-etoxi-2-siringoil-1-metil-4-*O*- β -*D*-glucopiranosil-ciclopentano (**163**) e 3,5-dihidroxi-5-etoxi-2-vaniloil-1-metil-4-*O*- β -*D*-glucopiranosil-ciclopentano (**164**) das cascas desta mesma espécie (Figura 22) (BRIESKORN & BECK, 1971).

Outro estudo fitoquímico com a espécie *G. officinalis* relatou o isolamento dos alcaloides 4-metoxi-2-pentilquinolina (**150**), cusparina (**152**) (Figura 20), *N*-metil-2-quinolona (**162**), cuspareina (**165**), galipina (**166**) e allocuspareina (galipinina)

(167) (Figura 22), extraídos das suas cascas, sendo que o último alcaloide foi descrito pela primeira vez na literatura nesta ocasião (HOUGHTON et al., 1998). O estudo do extrato das cascas desta espécie também permitiu o isolamento dos alcaloides galipeina (159) (Figura 21) e angustureina (168) (JACQUEMOND-COLLET et al., 1999), *N*-metil-4-hidroxi-3-(2',3'-epoxiisobutil)-2-quinolona (169) e candicina (170) (Figura 22) (JACQUEMOND-COLLET et al., 2000).

Um estudo empregando a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas identificou quinze substâncias presentes no extrato das cascas do tronco de *G. officinalis*. Foram identificados os alcaloides: 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-quinolona (145) (Figura 19), 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolona (148), 4-metoxi-2-n-pentilquinolona (150) (Figura 20), galipeina (159) (Figura 21), 1-metil-2-quinolona (162), cuspareina (165), galipina (166), galipinina (167), angustureina (168), 2-n-propil-2,3,4-tetrahydro-1-metilquinolona (171), 2-n-pentil-1,2,3,4-tetrahydroquinolona (172), maculosidina (173), 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolona (174), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolona (175) e 2-(3'-hidroxi-4'-metoxifeniletil)-4-metoxiquinolona (176) (Figura 22) (JACQUEMOND-COLLET, et. al., 2001). Por último, outro estudo fitoquímico com as cascas de *G. officinalis* relatou o isolamento novamente dos alcaloides galipeina (159) (Figura 21), cuspareina (165), galipinina (167) e angustureina (168) (Figura 22) (JACQUEMOND-COLLET et al., 2002).

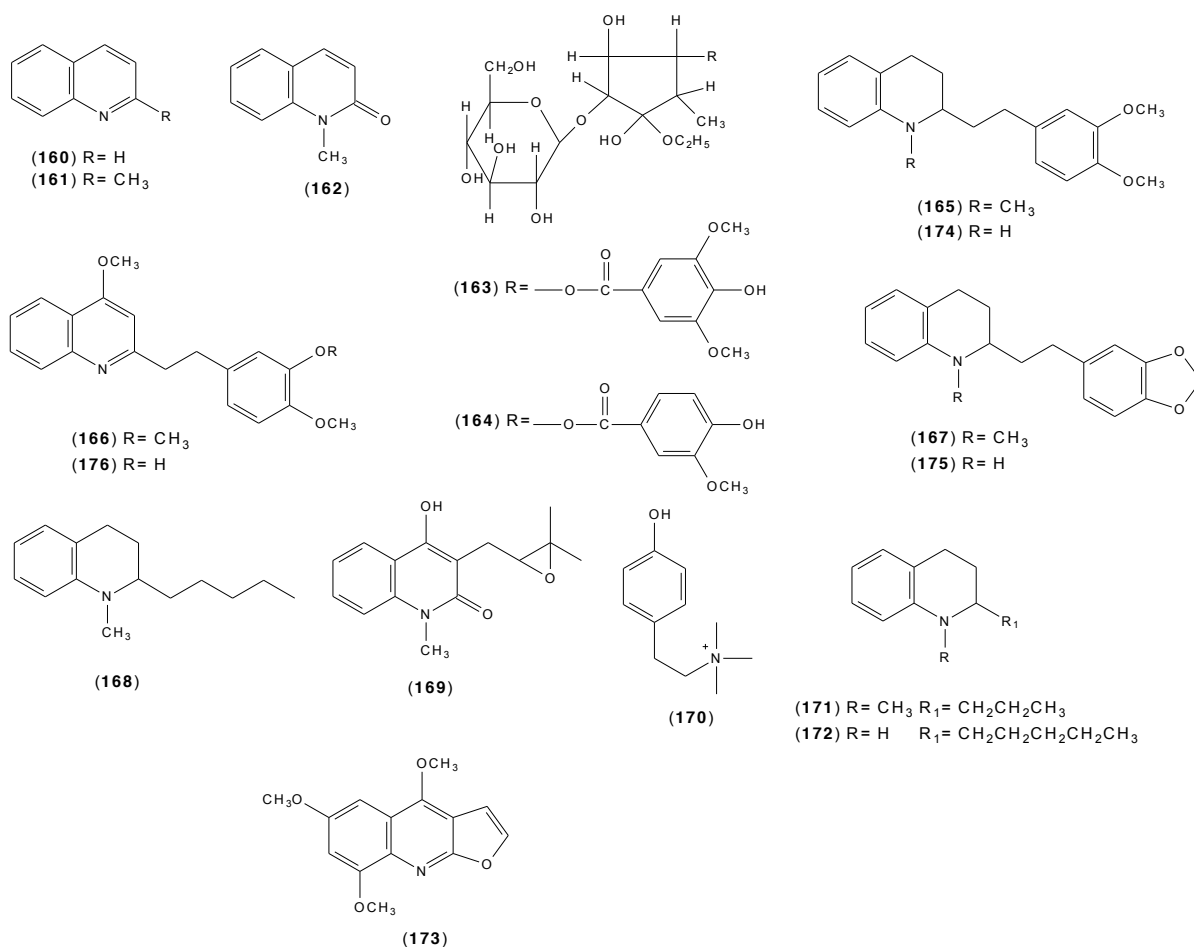


Figura 22. Substâncias isoladas da espécie *Galipea officinalis*.

Com a espécie *Galipea panamensis* foi realizado um estudo fitoquímico com o extrato em acetato de etila das suas folhas, resultando no isolamento das cumarinas: febalosina (**158**) (Figura 21), murralongina (**177**), acetato de murrangatina (**178**), 7-[[[(2R*)-3,3-dimetiloxiran-2-il]metoxi]-8-[(2R*,3R*)-3-isopropeniloxiran-2-il]-2H-chromen-2-ona (**179**) e 7-metoxi-8-(4-metil-3-furil)-2H-chromen-2-ona (**180**) (Figura 23), sendo que as duas últimas foram relatadas pela primeira vez na literatura nesta ocasião (ARANGO et al., 2010).

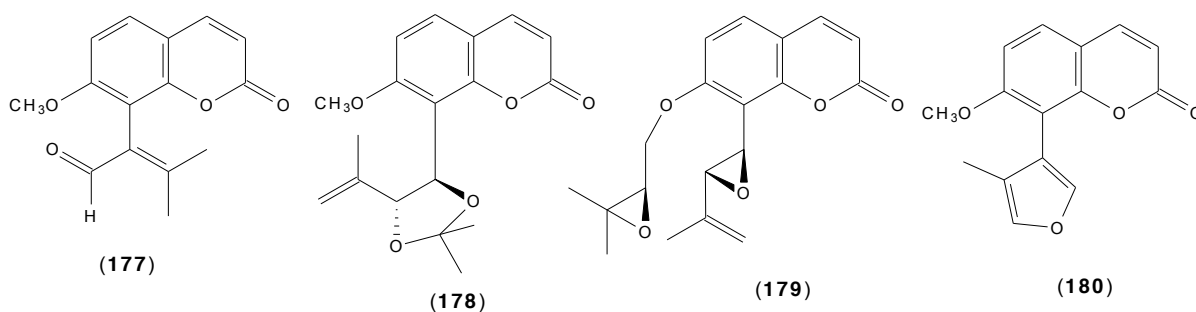


Figura 23. Substâncias isoladas da espécie *Galipea panamensis*.

3.2.10.2. Atividades biológicas

Um estudo investigou a atividade moluscicida dos alcaloides 2-*n*-propilquinolina (**142**), 2-*n*-pentilquinolina (**143**), 2-(1'-pentenil)-quinolina (**144**) e 2-(3',4' metilenodioxifeniletil)-quinolina (**145**) (Figura 19), isolados dos galhos de *Galipea bracteata*, contra a espécie de caracol aquático *Biomphalaria glabrata*, envolvido na transmissão da esquistossomose. As substâncias 2-*n*-pentilquinolina (**143**), 2-(1'-pentenil)-quinolina (**144**) e 2-(3',4' metilenodioxifeniletil)-quinolina (**145**) apresentaram atividade moluscicida nas respectivas concentrações de 20 ppm, 10 ppm e 5 ppm (partes por milhão). Já a substância 2-*n*-propilquinolina (**142**) não apresentou atividade moluscicida mesmo empregando a concentração de 100 ppm (VIEIRA et al., 1990).

Os extratos do caule e das folhas de duas amostras de *Galipea carinata*, coletadas em janeiro de 1993 (amostra A) e maio de 2000 (amostra B), tiveram as suas atividades inibitórias investigadas *in vitro* frente ao protozoário *T. cruzi*. Com relação à amostra A, os extratos em hexano e metanol das folhas apresentaram atividade inibitória respectivamente de 61,42% e 64,56%, enquanto que os extratos em hexano e metanol do caule causaram 51,97% e 44,09% de inibição, todos testados na concentração de 4 mg/mL. Já para a amostra B, os extratos em hexano e metanol das folhas apresentaram atividade inibitória respectivamente de 54,33% e 20,47% e os extratos em hexano e metanol do caule causaram 50% e 62,99% de inibição do protozoário (AMBROZIN et al., 2004).

Posteriormente o extrato metanólico das folhas da amostra A sofreu partições em diclorometano, acetato de etila e metanol, apresentando as respectivas atividades inibitórias de 82,6%, 96,4% e 50% na concentração de 2 mg/mL. O

extrato hexânico obtido das folhas da amostra B sofreu partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, resultando respectivamente em 100 %, 9,3%, 11,3% e 65,6% de inibição e o seu extrato metanólico dos galhos foi fracionado em apenas diclorometano, acetato de etila e metanol obtendo 100 %, 44,4 % e 31,1 % de atividade tripanocida, todos na concentração de 2 mg/mL. (AMBROZIN et al., 2004).

Já os extratos em hexano e metanol das folhas e do caule da espécie *Galipea carinata*, na concentração de 100 µg/mL, não apresentaram atividade inibitória significativa frente à enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) obtida do protozoário *T. cruzi* (LEITE et al., 2009).

Um estudo avaliou as atividades biológicas *in vitro* de doze alcaloides obtidos dos extratos dos galhos, raízes e folhas de *Galipea longiflora* frente os protozoários *L. braziliensis* e *T. cruzi*. Foram obtidos valores de CI_{90} (concentração inibitória de 90% da população) de 100 µg/mL para os alcaloides: esquimianina (**5**), 2-*n*-pentilquinolina (**143**), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-quinolina (**145**), 2-fenilquinolina (**146**), 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina (**148**), 4-metoxi-2-*n*-pentilquinolina (**150**), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-4-metoxiquinolina (**152**) e 4-metoxi-2-*n*-propilquinolina (chimanina A) (**153**) (Figura 20). Para os alcalóides 2-*n*-propilquinolina (**142**) e 2-fenil-4-metoxiquinolina (**147**) foram obtidos um CI_{90} de 50 µg/mL, enquanto que os demais alcaloides 2-(*E*)-prop-1'-enilquinolina (chimanina B) (**154**) e 2-(1',2'-trans-epoxipropil)-quinolina (chimanina D) (**156**) resultaram em um IC_{90} de 25 µg/mL (FOURNET et al., 1993).

Um segundo estudo avaliou as atividades leishmanicidas *in vivo* de frações dos extratos brutos e alcaloides obtidos dos extratos dos galhos, raízes e folhas de *G. longiflora* frente às espécies *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania venezuelensis*. Os alcaloides testados foram o 2-*n*-propilquinolina (**142**), 2-*n*-pentilquinolina (**143**), 2-fenilquinolina (**146**) e chimanina B (**154**). Foram utilizados para os testes, ratos BALB/c previamente infectados com *L. amazonensis* ou *L. venezuelensis* por um período de 4 a 6 semanas, para garantir que a infecção estivesse estabelecida e as lesões visíveis. Os tratamentos testados foram realizados por via oral, administrados duas vezes ao dia durante um intervalo de 15 dias, ou por cinco injeções intralesionais em intervalos de 4 dias, ambos empregando a concentração de 50 mg/kg de tratamento por massa corporal do indivíduo. O fármaco de referência utilizado nos experimentos foi o *N*-metilglucamina

antimonato (Glucantime), administrado por meio de injeções subcutâneas ou intralesionais diárias (FOURNET et al., 1996).

O alcaloide chimanina B (**154**) administrado por via oral permitiu a redução da lesão em 70% e uma redução de 95 % nas taxas parasitárias enquanto que quando administrado por via das injeções intralesionais provocou 74% da redução da lesão e 90% da taxa parasitária, em ratos infectados com *L. amazonensis*. Infelizmente o restante dos alcaloides e as frações dos extratos testados apresentaram apenas baixas e intermediárias atividades leishmanicidas (FOURNET et. al., 1996).

As atividades inibitórias *in vitro* dos alcaloides 2-n-propilquinolina (**142**), 2-n-pentilquinolina (**143**), 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-quinolina (**145**), 2-fenilquinolina (**146**) e 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-4-metoxiquinolina (**152**), todos isolados de *G. longiflora*, também foram avaliadas frente a células humanas HUT-102 infectadas com o vírus HTLV-1, causador de doenças degenerativas e leucemia. As substâncias foram testadas nas concentrações de 50 μ M e 10 μ M, mas apenas o alcalóide 2-(3',4'-metilenodioxifeniletil)-quinolina (**145**) apresentou uma atividade inibitória moderada, com cerca de 50% de inibição das células, sendo o restante das substâncias testadas inativas (FOURNET et al., 2003).

O extrato de alcaloides extraído da casca de *G. longiflora* conforme e o alcaloide 2-fenilquinolina (**146**), o maior constituinte deste extrato, tiveram suas atividades biológicas investigadas frente a forma promastigota do protozoário *Leishmania braziliensis*. Os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando a concentração de 20 μ g/mL dos tratamentos e um período de 48 h de incubação, resultando em 69% de inibição provocada pelo extrato de alcalóides e 33% de inibição provocada pelo alcalóide 2-fenilquinolina (**146**) sobre o protozoário (CALLAMAGARINOS et al., 2009).

As frações do extrato das cascas da espécie *G. officinalis* e os alcaloides 4-metoxi-2-pentilquinoleina (**150**), cusparina (**152**), N-metil-2-quinolona (**162**), cuspareina (**165**), galipina (**166**) e allocuspareina (**167**) (Figura 21), isolados deste extrato, tiveram suas atividades inibitórias investigadas frente a dez cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. As frações dos extratos e os alcaloides testados foram incubados em diferentes concentrações durante um período de 14 dias com as diferentes cepas de *M. tuberculosis*, resultando na determinação da CMI (concentração mínima inibitória) de cada um dos tratamentos. A melhor atividade

bactericida foi obtida para a fração não básica do extrato bruto das cascas, obtendo o maior valor de CMI de 25 µg/mL e o menor valor de CMI de 6,25 µg/mL. Os demais tratamentos testados apresentaram moderadas atividades inibitórias (HOUGHTON et al., 1998).

Um estudo investigou as atividades biológicas dos extratos em hexano e clorofórmio das cascas do tronco de *G. trifoliata* e dos alcaloides galipeina (**159**), cuspareina (**165**), galipinina (**167**) e angustureina (**168**), isolados deste extrato, frente ao protozoário *Plasmodium falciparum*, causador da malária. A atividade antiplasmodial dos tratamentos testados foram avaliadas frente as cepas *Nigerian* (sensível à cloroquina), *FcM29* (resistente a cloroquina) e *FcB1* (resistente à cloroquina) de *P. falciparum*. Os valores de CI_{50} foram obtidos após 24 h e 72 h de incubação entre os tratamentos e as cepas do protozoário (JACQUEMOND-COLLET et al., 2002).

O alcaloide galipinina (**167**) apresentou os valores mais promissores de CI_{50} de 1,8, 0,09 e 0,7 µg/mL para as respectivas cepas *Nigerian* (sensível à cloroquina), *FcM29* (resistente à cloroquina) e *FcB1* (resistente à cloroquina) após o intervalo de 72 h de incubação. Após 72 h de incubação, o alcaloide galipeina (**159**) também apresentou valores significativos de CI_{50} de 3,0, 0,1 e 1,0 µg/mL para as respectivas cepas *Nigerian* (sensível à cloroquina), *FcM29* (resistente à cloroquina) e *FcB1* (resistente à cloroquina). Já os extratos brutos e os demais alcaloides apresentaram valores altos de CI_{50} frente às três cepas do protozoário testadas (JACQUEMOND-COLLET et al., 2002).

Foi realizado um estudo que investigou a atividade biológica das cumarinas 7-[[$(2R^*)$ -3,3-dimetiloxiran-2-il]metoxi]-8-[[$(2R^*, 3R^*)$ -3-isopropeniloxiran-2-il]-2H-cromen-2-ona (**179**), 7-metoxi-8-(4-metil-3-furil)-2H-cromen-2-ona (**180**), febalosina (**158**) e murralongina (**177**) (Figura 23), isoladas das folhas de *Galipea panamensis*, frente a forma amastigota do protozoário *Leishmania panamensis*. Os experimentos foram realizados utilizando a técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) e as atividades inibitórias foram avaliadas após 72 h de incubação, utilizando as concentrações de 3,1-100 µg/mL. As três primeiras cumarinas obtiveram valores de EC_{50} (quantidade do tratamento necessária para induzir a morte em 50% da população das células) de 9,9, 10,5 e 14,1 µg/mL, respectivamente, enquanto a cumarina murralongina (**177**) não apresentou atividade inibitória significativa frente ao protozoário. Este mesmo estudo investigou também

as atividades inibitórias das cumarinas 7-[[*(2R*^{*})-3,3-dimetiloxiran-2-il]metoxi]-8-[[*(2R*^{*},*3R*^{*})-3-isopropeniloxiran-2-il]-2H-chromen-2-ona (**179**), 7-metoxi-8-(4-metil-3-furil)-2H-chromen-2-ona (**180**) e febalosina (**158**) frente a linhagem de células cancerígenas U937, resultando nos respectivos valores de CI₅₀ de 9,7, 33,0 e 20,7 µg/mL (ARANGO et al., 2010).

3.2.10.3. Levantamento Etnofarmacológico

As cascas da espécie *Galipea multiflora*, conhecida também como quina falsa, jasmim do mato, Ticoró e guamixinga, são largamente utilizadas na medicina popular para tratar malária, infecções, indigestão, febre e atonia gástrica. O estudo de revisão do Dr. Monteiro da Silva relatou a utilização das cascas desta espécie como um substituinte eficiente para a quina no tratamento na malária, porém mais fraco que *Peruvian chinchona* (BOTSARIS, 2007).

3.2.11. *Leptothyrsa*

3.2.11.1. Estudos Fitoquímicos

Foi observado na literatura apenas um estudo fitoquímico com as folhas de *Leptothyrsa sprucei*, resultando no isolamento das substâncias: 5-metoxipsoraleno (**181**), 8-metoxipsoraleno (**182**), imperatorina (**183**), isoimperatorina (**184**), kaempferol 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (**185**), clematina (**186**), cnidiosida B (**187**) e do alcaloide 3-hidroxiturtaecarpina (**188**) (Figura 24), este último relatado pela primeira vez na literatura nesta ocasião (LI et al., 2001).

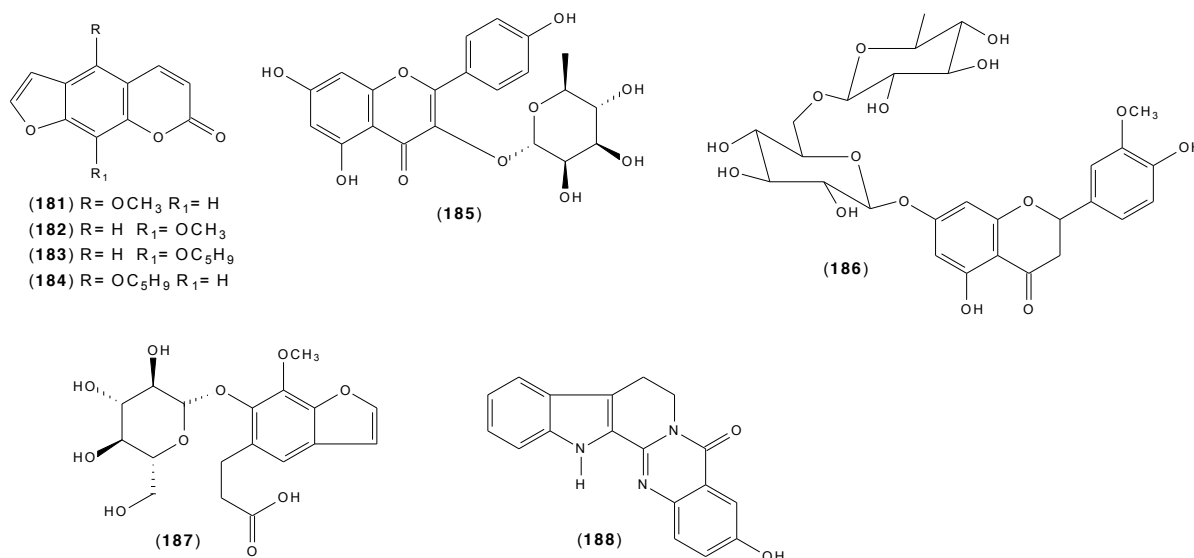


Figura 24. Substâncias isoladas da espécie *Leptothyrsa sprucei*.

3.2.12. *Neoraputia*

3.2.12.1. Estudos Fitoquímicos

Os estudos fitoquímicos com o extrato das folhas da espécie *Neoraputia alba* permitiram o isolamento pela primeira vez das flavonas 7,8,3',4'-tetrametoxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (**189**) e 7,8,3',4',5'-pentametoxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (**190**) (Figura 25), juntamente com o esteroide β -sitosterol (**24**) (Figura 2) (ARRUDA et al., 1991) e das substâncias 3',4'-metilenodióxi-5,5',6,7-tetrametoxiflavona (**191**), 3',4',5,5',7-pentametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (**192**), 4',5,7,8-tetrametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (**193**), 3',4',5,5',7,8-pentametoxiflavona (**194**), 3',4',5,5',7,8-hexametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (**195**) e 3',4',5,5',7-pentametoxiflavonona (**196**), além das três flavonas 3',4'-metilenodioxo-6,5-(2'',2''-dimetilpirano)-7-metoxiflavona (**197**), 3',4',8-trimetoxi-5-hidroxi-6,7-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (**198**) e 3',4'-metilenodioxo-5,7,8-trimetoxiflavona (**199**) (Figura 25), descritas pela primeira vez na literatura nesta ocasião (ARRUDA et al., 1993).

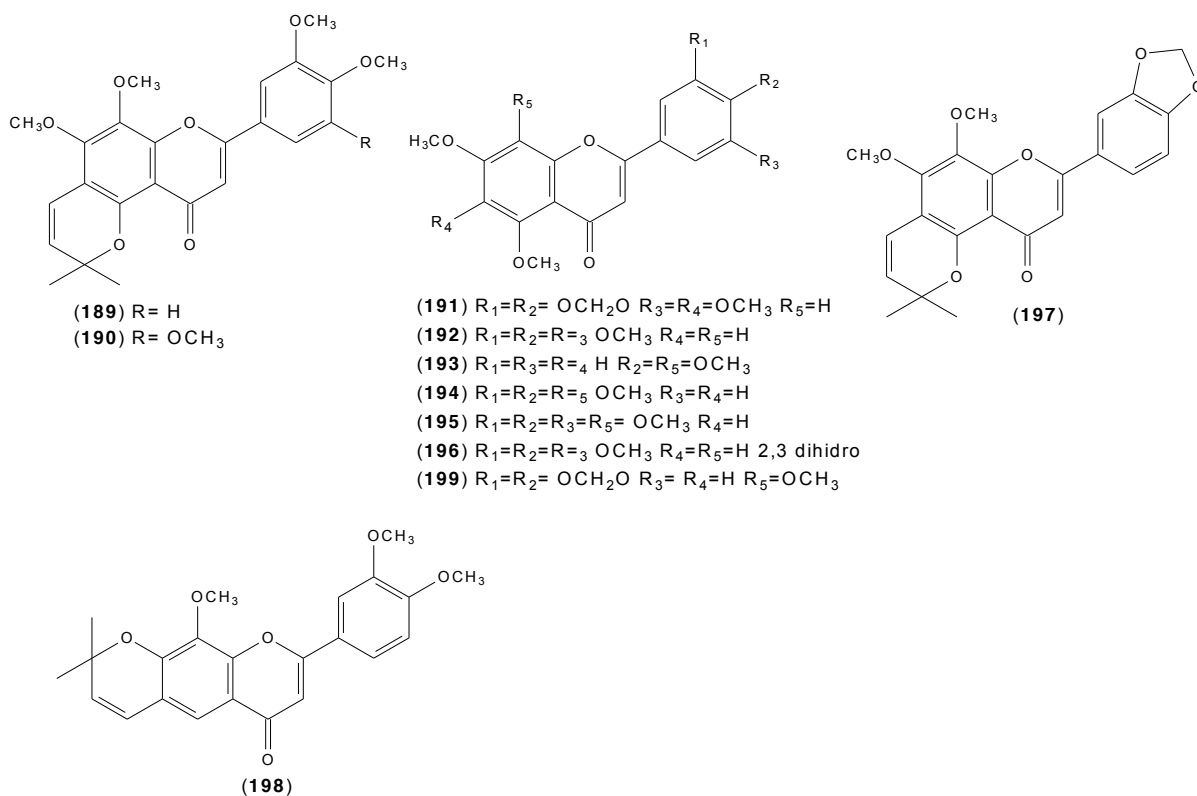


Figura 25. Substâncias isoladas da espécie *Neoraputia alba*.

O extrato hexânico dos galhos da espécie *Neoraputia magnifica* permitiu o isolamento do flavonoide 2'-hidroxi-3,4,4',5-tetrametoxi-5',6'-(2'',2'')-dimetil-pirano) chalcona (**200**), relatado pela primeira vez na literatura nesta ocasião, e das substâncias 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavonona (**201**) 2'-hidroxi-3,4,4',5,6'-pentametoxichalcona (**202**) (Figura 26), 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavonona (**192**) (Figura 25), β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**) (Figura 2) (PASSADOR et. al., 1997).

Um segundo estudo fitoquímico com o extrato dos frutos de *N. magnifica* resultou no isolamento dos flavonoides 2'-hidroxi-4,4'-dimetoxi-5',6'-(2'',2'')-dimetil-pirano)chalcona (**203**), 2'-hidroxi-3,4,4'-trimetoxi-5',6'-(2'',2'')-dimetil-pirano)chalcona (**204**) e 3',4'-metilenedioxi-5,7-dimetoxiflavona (**205**) (Figura 26), até então inéditos na literatura, e dos flavonoides: 3',4'-metilenedióxi-5,5',6,7-tetrametoxiflavona (**191**), 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (**192**) (Figura 25), 2'-hidroxi-3,4,4',5-tetrametoxi-5',6'-(2'',2'')-dimetil-pirano)chalcona (**200**), 2'-hidroxi-3,4,4',5,6'- pentametoxichalcona (**202**) e 3',4'-metilenedióxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**206**) (Figura 26) (TOMAZELA et al., 2000).

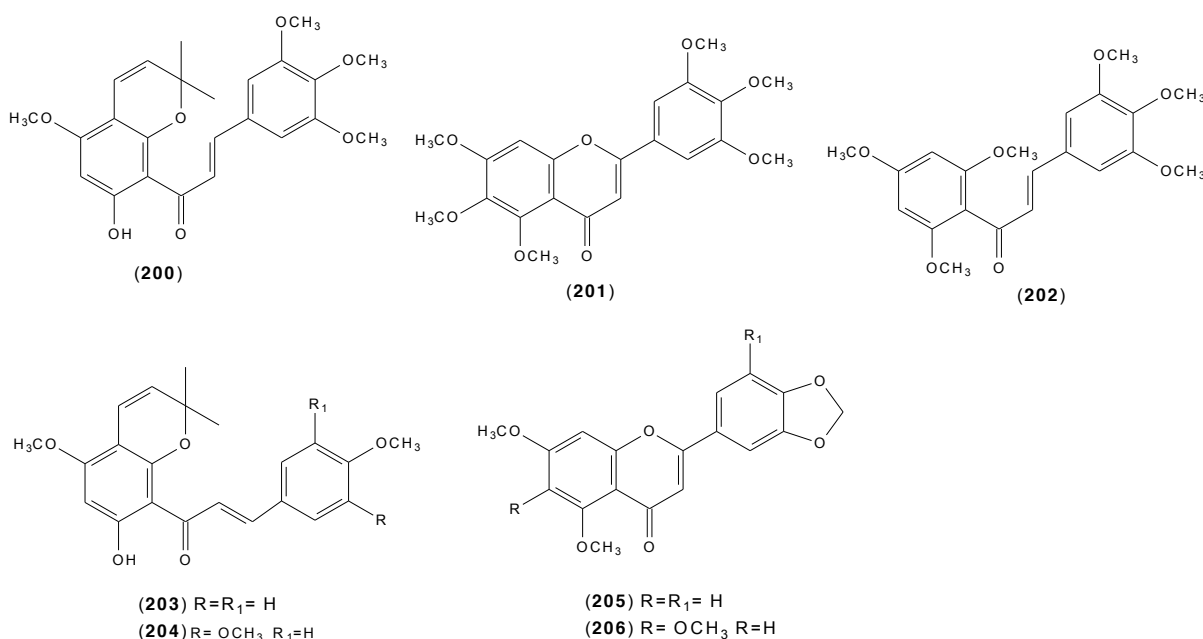


Figura 26. Substâncias isoladas da espécie *Neoraputia magnifica*.

As folhas de *Neoraputia paraensis* revelaram pela primeira vez as flavonas 5,7,5'-Trimetoxi-6-(3''-hidroxi,3''-metil-trans-but-1''-enil)-3',4'-metilenodioxi-flavona (207) e 5,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxi-6,7-(2'',2''-dimetil-pirano) flavona (208) (Figura 27) e dos galhos foi possível isolar a flavona 5,4'-dihidroxi-8,3',5'-trimetoxi-6,7-(2'',2''-dimetil-pirano)flavona (209), também sendo descrita pela primeira vez na literatura (Figura 27) (SOUZA et al., 1999).

Outro estudo com o caule de *N. paraensis* permitiu o isolamento dos alcaloides dictamina (3), esquimianina (5) (Figura 1), 8-metoxiflindersina (40) (Figura 5) e flindersina (210) (Figura 27). Enquanto que o estudo do extrato das suas folhas resultou no isolamento das substâncias: 3',4',7,8-tetrametoxi-5,6-(2'',2''-dimetilpirano)-flavona (189), 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (192), 3',4',5,7,8-pentametoxiflavona (194) (Figura 25), 2'-hidroxi-3,4,4',5-tetrametoxi-5',6'-(2'',2''-dimetilpirano)chalcona (200), 3',4'-metilenodioxi-5,7-dimetoxi-flavona (205), 3',4'-metilenodioxi-5,6,7-trimetoxiflavona (206) (Figura 26), 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona (211) e 5-hidroxi-3',4'-metilenodioxi-6,7-dimetoxiflavona (212) (Figura 27) (MORAES et al., 2003).

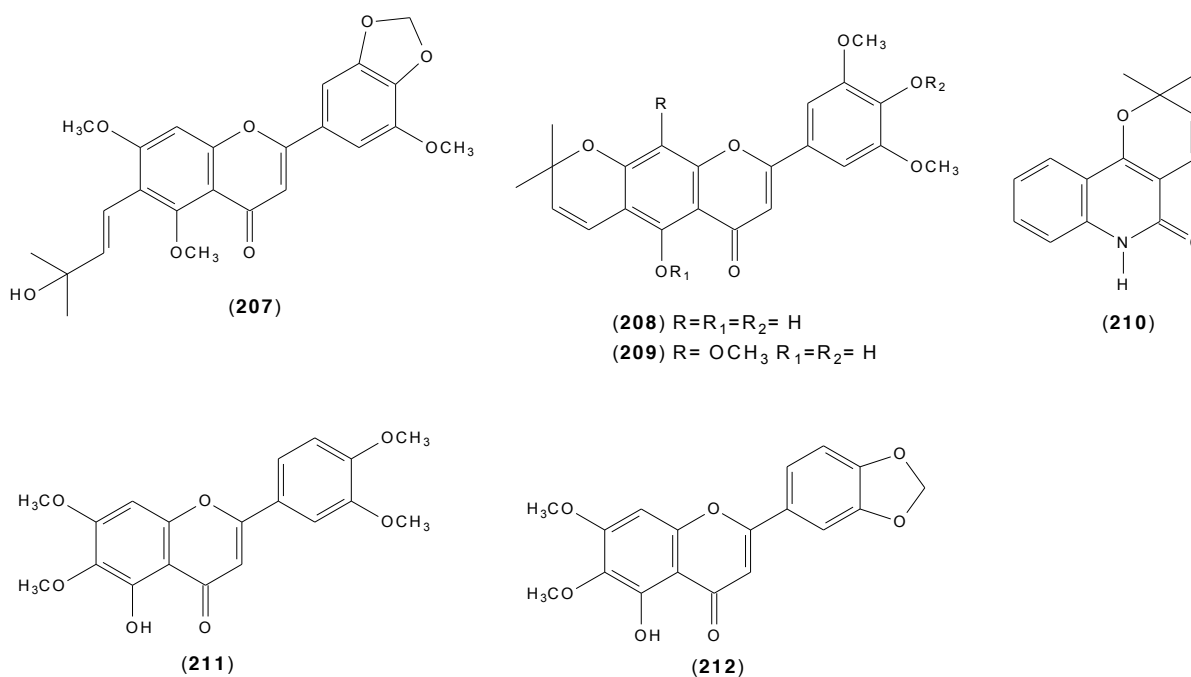


Figura 27. Substâncias isoladas da espécie *Neoraputia paraensis*.

3.2.12.2. Atividades Biológicas

Foi realizado um estudo que investiga as atividades inibitórias *in vitro* dos flavonoides isolados dos frutos de *Neoraputia magnifica* frente a enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) do protozoário *Trypanosoma cruzi*. As atividades inibitórias apresentadas na concentração de 100 µg/mL foram de 99% para a substância pura 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (**192**) e de 100% para a mistura das substâncias 3',4'-metilenodióxi-5,5',6,7-tetrametoxiflavona (**191**) e 3',4'-metilenodióxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**206**). Na concentração de 105 µg/mL para a mistura das substâncias 2'-hidroxi-3,4,4',5-tetrametoxi-5',6'-(2'',2''-dimetil-pirano)chalcona (**200**) e 2'-hidroxi-3,4,4'-trimetoxi-5',6'-(2'',2''-dimetil-pirano)chalcona (**204**) (Figura 26) foi obtido apenas 45% de atividade inibitória (TOMAZELA et al., 2000).

Posteriormente também foram avaliadas as atividades inibitórias dos flavonoides 3',4',7,8-tetrametoxi-5,6-(2'',2''-dimetilpirano)-flavona (**189**), 3',4',5,7,8-pentametoxiflavona (**194**) e 3',4'-metilenodioxido-5,6,7-trimetoxiflavona (**206**) isolados de *Neoraputia paraensis*, nas respectivas concentrações de 35, 50 e 100 µg/mL, resultando em 68%, 45% e 36% de inibição frente a enzima gGAPDH de *T. cruzi*. No

mesmo estudo, também foram investigadas as atividades dos flavonoides 3',4'-metilenodioxo-5,7-dimetoxi-flavona (**205**), 2'-hidroxio-3,4,4',5-tetrametoxi-5',6'-(2'',2''-dimetilpirano)chalcona (**200**) e 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (**192**) isolados de *N. paraensis*, na concentração de 100 µg/mL, obtendo respectivamente 26%, 65% e 99% de inibição (MORAES et al., 2003).

Os flavonoides, 3',4',7,8-tetrametoxi-5,6-(2'',2''-dimetilpirano)-flavona (**189**), 3',4'-metilenodioxo-5,7,8-trimetoxiflavona (**199**) isolado de *N. alba* (ARRUDA et al., 1993), 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (**201**) isolado de *N. magnífica* (PASSADOR et al., 1997) e 3',4'-metilenodioxo-5,7-dimetoxiflavona (**205**) e isolados de *N. paraensis* (MORAES et al., 2003), tiveram suas atividades inibitórias investigadas frente a coleóptilos de trigo. O único flavonoide que apresentou atividade inibitória significativa foi o 3',4'-metilenodioxo-5,7-dimetoxiflavona (**205**), obtendo -76% frente os coleóptilos de trigo. Assim, sua atividade inibitória também foi investigada frente às espécies de testes padrão: *Lepidium sativum* (agrião), *Lactuca sativa* (alface), *Lycopersicon esculentum* (tomate) e *Allium cepa* (cebola). Em todos os experimentos foi utilizado como padrão interno o inseticida comercial Logran. O flavonoide apresentou atividade inibitória próximo a -85% frente *L. sativum*, porém não foi ativo frente as demais espécies testadas (NEBO et al., 2014).

3.2.13. *Raputia*

3.2.13.1. Estudos Fitoquímicos

Um estudo fitoquímico das cascas do caule e das raízes de *Raputia simulans* resultou no isolamento pela primeira vez da série de alcaloides raputindoies A-D (**213-216**) (Figura 28) (VOUGOGIANNIPOULOU et al., 2010). Posteriormente, foi relatado o isolamento dos indoloalcaloides: indolo-5-carbaldeido (**217**), 7-prenilindolo (**218**), 5-prenilindolo (**219**), verticilatina B (**220**) (Figura 28) e dos alcaloides descritos pela primeira vez: 5-(but-3'-en-2'-ona)indolo (**221**), 5-(2'-metilbut-3'-en-1'-ol)indolo (**222**), 5-[metil-4'-(2'-metil-4-oxobutanoato)]indolo (**223**), 5-[4-(metil)furan-2-il]indolo (**224**), 5-[4-(metoximetil)furan-2-il]indolo (**225**), 5-[5'-(3-metilfuran-2'(5'H)-ona)]indolo (**226**) e 5-(4'-metil-2',5'-dihidrofuran-2'-il)indolo (**227**) (Figura 28), isolados também

das cascas do caule da espécie *R. simulans* (VOUGOGIANNOPOULOU et al., 2011).

Recentemente, o extrato em diclorometano do caule de *R. simulans* revelou os alcalóides caulindoles E (228), F (229) e G (230) (Figura 28), descritos pela primeira vez na literatura (VOUGOGIANNOPOULOU et al., 2014).

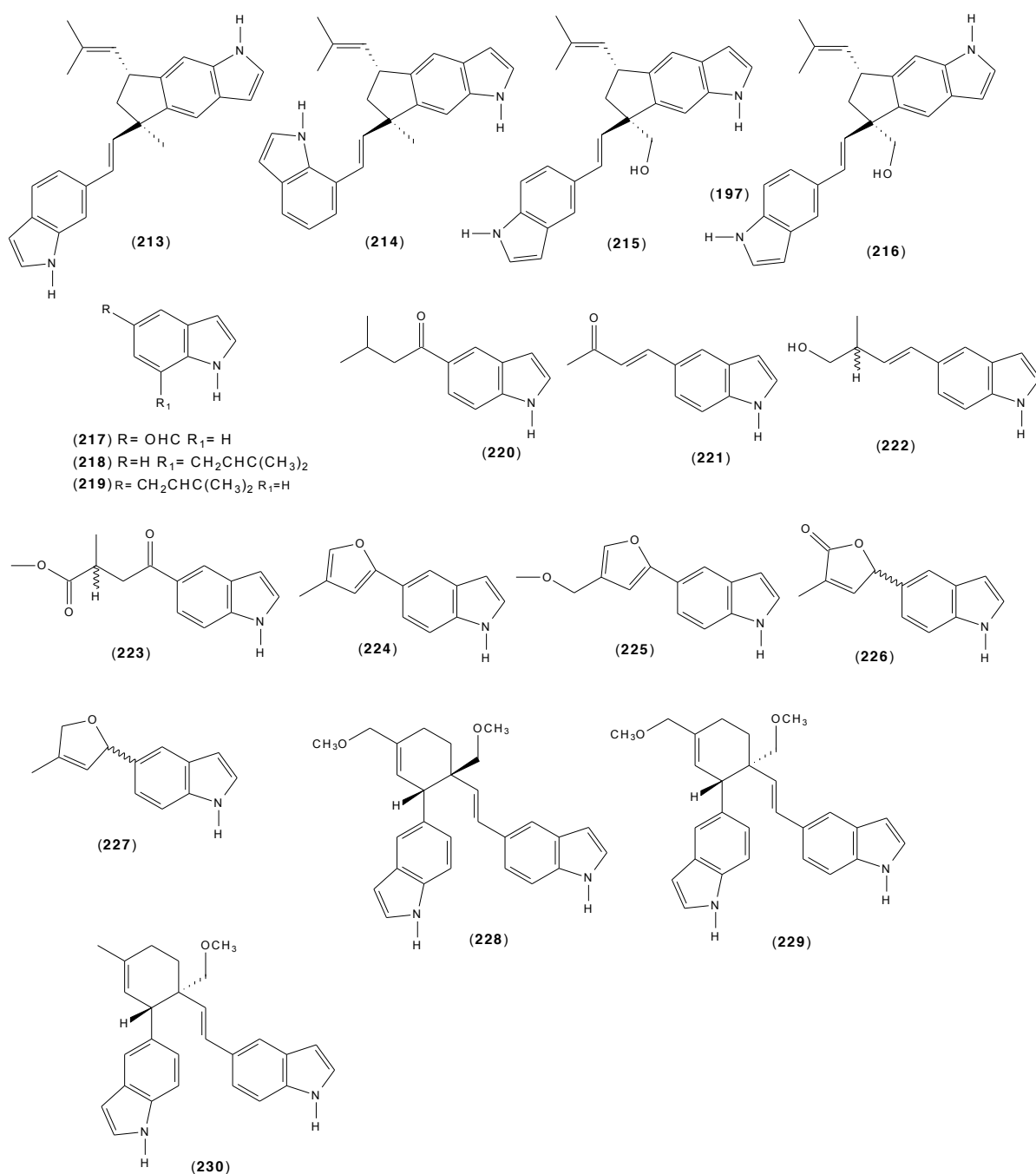


Figura 28. Substâncias isoladas da espécie *Raputia simulans*.

O extrato em diclorometano do caule de *Raputia praetermissa* permitiu isolamento pela primeira vez dos alcaloides: 4-desoxi-raputindol C (**231**), raputimonindol A (**232**), raputimonindol B (**233**), hexadecanil 2-hidróxi-4-metóxi-cinnamato (**234**) juntamente com os alcalóides robustina (**235**) (Figura 29), dictamina (**3**) (Figura 1), evolitrina (**18**) (Figura 2), maculosidina (**173**) (Figura 22), 5-(4-metóxi-metilfuran-2-il)-1H-indol (raputimonindol C) (**225**) (Figura 28). O estudo do extrato em hexano resultou no isolamento das substâncias *N*-metil-4-metoxiquinolín-2(1H)-ona (**2**), esquimianina (**5**) (Figura 1), β -sitosterol (**24**), estigmasterol (**25**) (Figura 2), cicloartenona (**236**) e sitostenona (**237**) (Figura 29) (ROSAS et al., 2011).

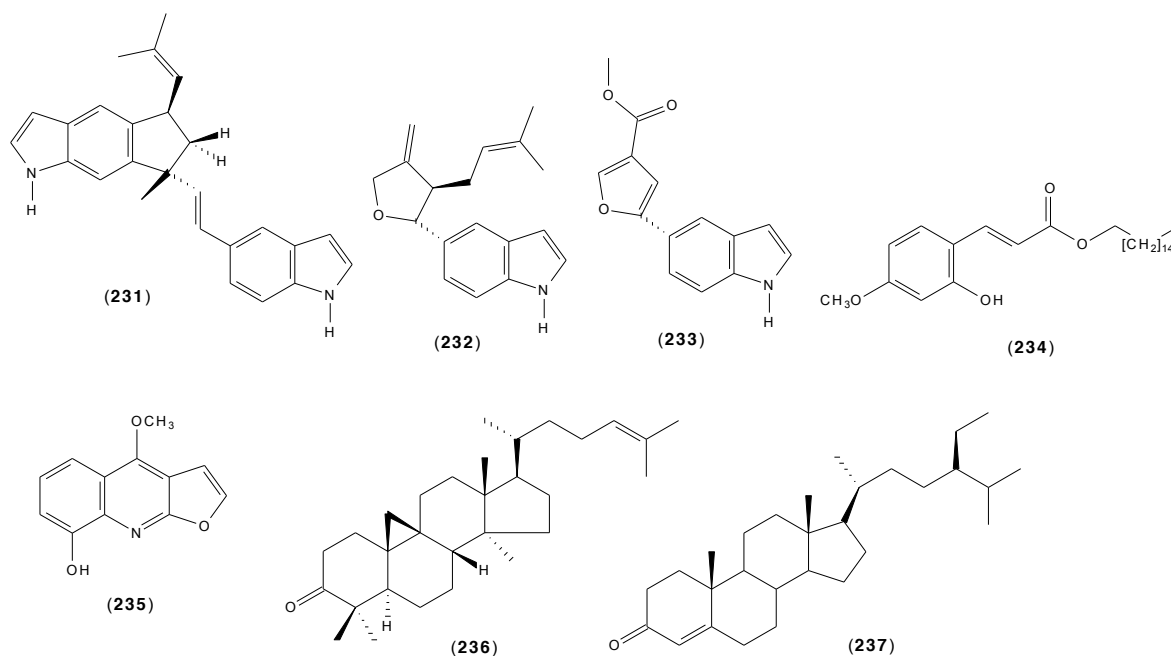


Figura 29. Substâncias isoladas da espécie *Raputia praetermissa*.

3.2.14. *Rauia*

3.2.14.1. Estudos Fitoquímicos

O extrato das folhas de *Rauia resinosa* permitiu o isolamento das cumarinas umbeliferona (**78**) (Figura 11) e rauianina (**238**) (Figura 30). Já o estudo do extrato do caule resultou no isolamento das substâncias: *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona (**2**), dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) (Figura 1), murralongina (**177**), acetato

de murrangatina (**178**) (Figura 23), murrangatina (**239**), munomicrolina (**240**), mirtopsina (**241**), Z-rhoifolinato de dimetila (**242**), zantodiolina (**243**), zantobungeanina (**244**), veprissina (**245**) e 8-hidroxi-*N*-metilfindersina (**246**) (Figura 30), sendo este último descrito pela primeira vez como produto natural em mistura com os esteroides β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**) (Figura 2). Além disso, foi possível o isolamento do alcalóide 7-hidroxi-8-metoxi-*N*-metilfindersina (**247**) e da cumarina 3-etilrauiianina (**248**) (Figura 30), relatados pela primeira vez na literatura nesta ocasião (ALBARICI et al., 2010).

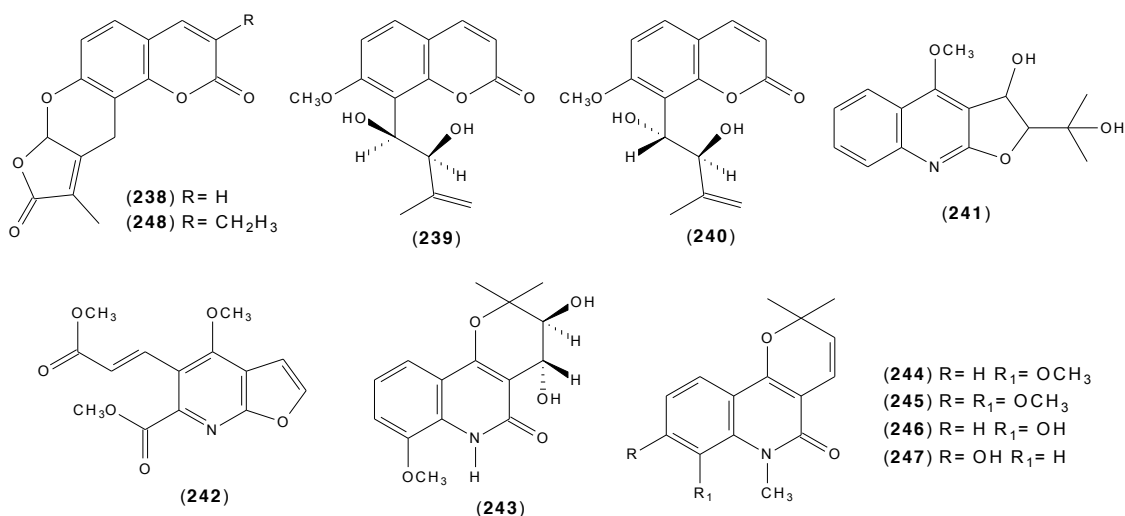


Figura 30. Substâncias isoladas da espécie *Rauia resinosa*.

Um estudo fitoquímico realizado pelo grupo de pesquisa de Química de Produtos Naturais da UENF com o extrato do caule da espécie *Rauia nodosa* resultou no isolamento das substâncias: *N*-metilfindersina (**6**) (Figura 1), sitosterol (**24**), estigmasterol (**25**) (Figura 2), sistostenona (**237**) (Figura 29), zantobungeanina (**244**), veprissina (**245**), estigmastenona (**249**) (Figura 30), peróxido de ergosterol (**250**), *O*-geranilostenol (**251**) e do esteroide rauianodoxi (**252**), este último descrito pela vez na literatura nesta publicação (Figura 31) (ROCHA et al., 2014).

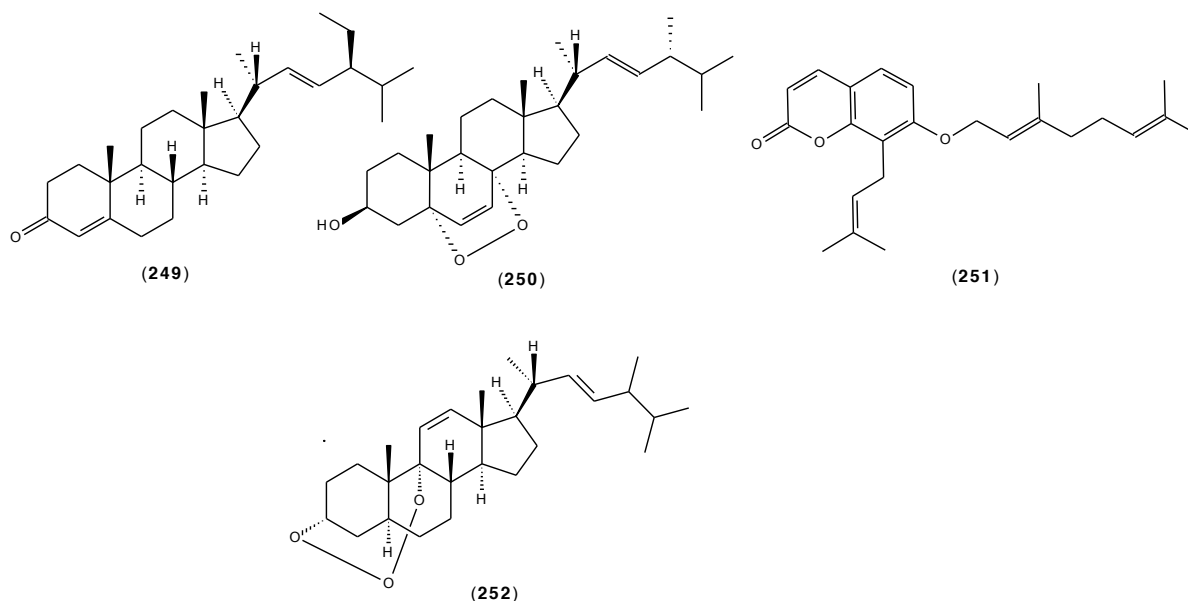


Figura 31. Substâncias isoladas da espécie *Rauia nodosa*.

3.2.14.2. Atividades Biológicas

Um estudo investigou a atividade inibitória *in vitro* dos extratos das folhas e dos galhos de *Rauia resinosa* sob as formas tripomastigotas do protozoário *T. cruzi* e também frente a enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) obtida do protozoário. O extrato dos galhos obtido em metanol na concentração de 4 mg/mL apresentou 72,4% de atividade inibitória. Já o extrato em metanol das folhas, na mesma concentração, apresentou 49,8% de atividade inibitória frente ao protozoário (VIEIRA et al., 2001).

Outro estudo utilizando diretamente o extrato bruto hidroetanólico de *Rauia resinosa*, investigou a possível formação de ligações e interações moleculares entre produtos naturais presentes nesse extrato e a proteína BSA (Albumina de Soro Bovino). Esse estudo empregou diferentes técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), entre elas as técnicas de STD, NOESY, tr-NOESY e 2D STD-TOCSY, seguido da técnica de separação CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para acompanhar a formação de ligações entre substâncias ativas e a proteína testada. Foi utilizado 1 mg do extrato bruto em 1 mL da solução alvo, com concentração de 50 μ M, com o objetivo de simular ligações nas regiões Thr190, Arg198, Arg217, Trp213, Arg256, Ala290 e Tyr451 da proteína. Os resultados

indicaram que a técnica de RMN é excelente para a determinação inicial de compostos ativos (TANOLI et al., 2013).

A cumarina rauianina (**238**) (Figura 30) isolada da espécie *Rauia resinosa* (VELOZO et al., 1997; ALBARACI et al., 2010), teve sua atividade inibitória investigada frente a coleótilos de trigo na concentração de 1000 µM, obtendo cerca de -76% de inibição (NEBO et al., 2014).

3.2.15. *Ravenia*

3.2.15.1. Estudos Fitoquímicos

Foi realizado um estudo fitoquímico com as folhas de *Lemonia spectabilis* (sinônimo de *Ravenia spectabilis*) resultando no isolamento dos alcaloides γ -fagarina (**4**) (Figura 1), atanina (**253**), ravenina (**254**) e espectabilina (**255**) (Figura 32), sendo o último descrito pela primeira vez na literatura (TALAPATRA et al., 1969). Um segundo estudo com as folhas desta mesma espécie permitiu o isolamento pela primeira vez do alcaloide 3,4,5,6-tetrahidro-7-hidroxi-2,2,6-trimetil-5-oxo-2H-pirano[3,2-c]quinolino (**256**) (Figura 32), denominado de ravesilona (BHATTACHARYYA & CHOWDHURY, 1984).

Dos galhos de *R. spectabilis* também foram isoladas as substâncias γ -fagarina (**4**) (Figura 1), arborinina (**15**), estigmasterol (**25**) (Figura 2) e estigmasta-4,22-dien-3-ona (**257**) (Figura 32) (SOHRAB et al., 2004).

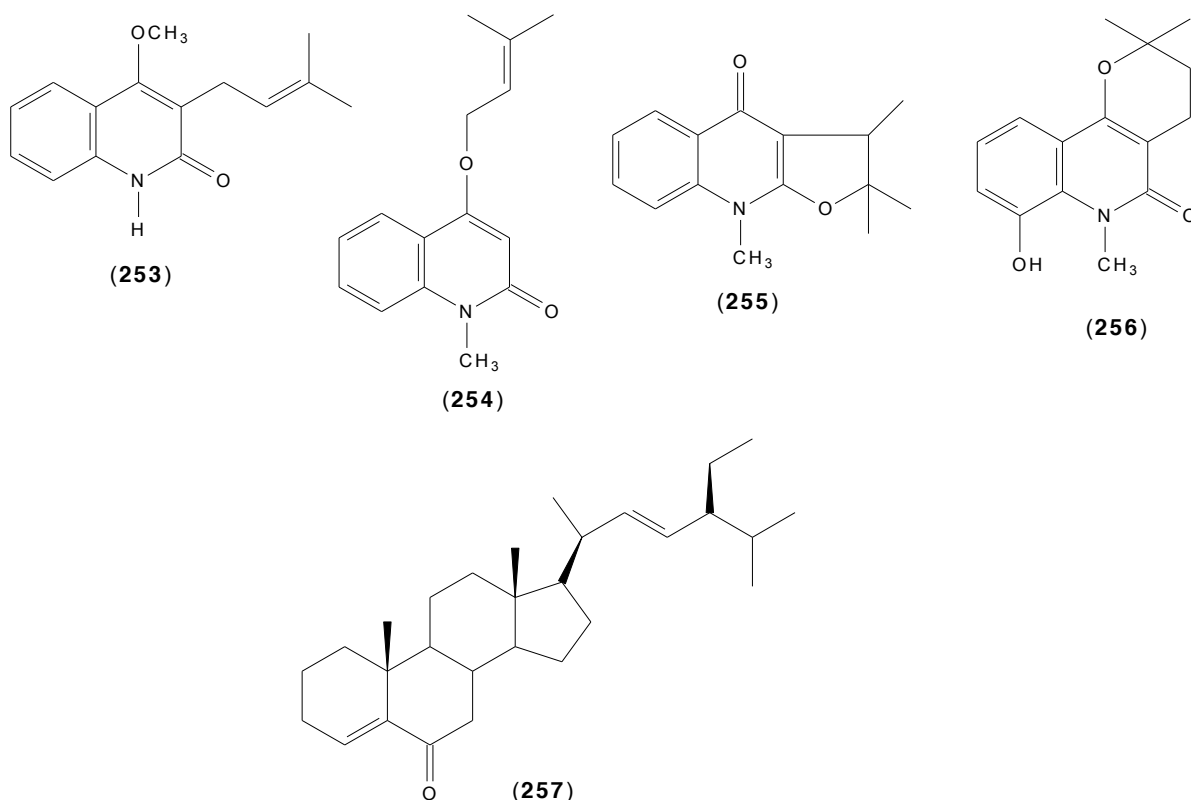


Figura 32. Substâncias isoladas da espécie *Ravenia spectabilis*.

3.2.15.2. Atividades Biológicas

Foi realizado um estudo que investigou a atividade inibitória *in vitro* dos extratos metanólicos dos galhos, flores e folhas de *Ravenia infelix* sobre as formas tripomastigotas do protozoário *T. cruzi* e também frente à enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) obtida do protozoário. Os extratos foram testados na concentração de 4 mg/mL e resultaram em 88%, 87% e 88,8% de inibição, respectivamente para os extratos dos galhos, flores e folhas. O extrato dos galhos apresentou 10,4% de atividade inibitória frente a enzima gGAPDH na concentração de 100 µg/mL, porém os demais extratos não provocaram inibição. Empregando a concentração de 200 µg/mL foram obtidos os resultados de 10,4%, 25,6% e 55,4% respectivamente para os extratos dos galhos, flores e folhas (VIEIRA et al., 2001).

O extrato dos galhos de *R. spectabilis*, o alcaloide arborinina (15) e uma fração contendo γ -fagarina (4) e arborinina (15), isolados deste extrato, tiveram suas atividades inibitórias investigadas frente a diversos microorganismos, bem como a

sua citotoxicidade avaliada através do estudo com *Artemia salina*. Os microorganismos testados foram *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhi*, *Sarcina lútea*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* e *Vibrio parahemolyticus*, através do método por difusão de disco (SOHRAB et al., 2004).

O diâmetro do halo de inibição provocado pelo extrato de *R. spectabilis* foi em torno de 8–28 mm, na concentração de 500 µg/disco, frente aos microorganismos testados. As atividades mais significativas foram contra *Bacillus cereus*, *B. megaterium* e *Vibrio mimicus*, obtendo halos com 28, 25 e 25 mm, respectivamente. A fração contendo γ -fagarina (**4**) e arborinina (**15**) apresentou um halo de inibição significativo contra *Bacillus cereus* (17 mm), *B. subtilis* (18 mm), *Aeromonas hydrophila* (17 mm), *Escherichia coli* (23 mm), *Salmonella paratyphi A* (24 mm), *S. paratyphi B* (19 mm), *Shigella dysenteriae* (22 mm) e *Vibrio mimicus* (21 mm). O alcaloide puro arborinina (**15**) apresentou zonas de inibição de apenas 7 mm e 9 mm, respectivamente para *Escherichia coli* e *Shigella dysenteriae*. O extrato cru e a fração de alcaloides apresentaram os respectivos valores de CL₅₀ de 76,26 e 14,98 µg/mL frente *Artemia salina* (SOHRAB et al., 2004).

3.2.16. *Sigmanthus*

3.2.16.1. Estudos Fitoquímicos

Um estudo fitoquímico relata o isolamento da piranocumarina seselina (**258**) (Figura 33) das raízes da espécie *Sigmanthus trifoliatum* (LIMA, et. al., 2006).

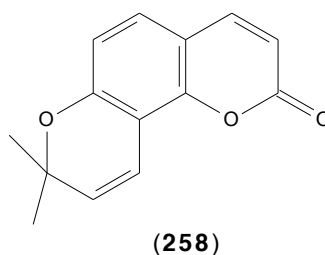


Figura 33. Substâncias isoladas da espécie *Sigmanthus trifoliatum*.

3.2.16.2. Atividades Biológicas

A atividade antiinflamatória da cumarina seselina (**258**) (Figura 33), isolada das raízes da espécie *Sigmanthus trifoliatu*s, foi investigada através dos testes de contorção, de formalina e da placa quente em ratos Male Swiss. O teste de contorção seguiu a metodologia proposta por Collier e o teste da placa quente seguiu o método de Eddy e Leimbach. Nos testes de contorção e com formalina foram usados também morfina e indometacina para efeitos de comparação (LIMA et al., 2006).

Os efeitos da cumarina seselina (**258**) foram avaliados nas concentrações de 0,5, 4,5 ou 40,5 mg/kg para o teste de contorção induzida por ácido acético, provocando uma inibição significativa do número de contrações de 19,5%, 26,2% e 41,4%, nas respectivas concentrações. Empregando as mesmas concentrações, a seselina (**258**) causou uma expressiva inibição da resposta a formalina na segunda fase (inflamatória) de respectivamente 90,3%, 97,8% e 95,3% e na fase inicial (neurogenica) causou 34, 4% e 66,9% respectivamente para as maiores doses testadas. Por último, no teste de placa quente não foi observado nenhum efeito após o tratamento com seselina (**258**) (LIMA et al., 2006).

3.2.17. *Spiranthera*

3.2.17.1. Estudos Fitoquímicos

Foi realizado um estudo fitoquímico com a espécie *Spiranthera odoratissima* utilizando a técnica de CG-MS para identificar os componentes presentes no óleo essencial obtido das suas folhas. Foram identificadas as substâncias: pineno (**259**), canfeno (**260**), limoneno (**261**), mirceno (**262**), copaeno (**263**), espatulenol (**264**), germacreno B (**265**) e D (**266**), β -cariofileno (**267**) e óxido de cariofileno (**268**) (Figura 34). O estudo do extrato em diclorometano do rizoma resultou no isolamento das cumarinas aurapteno (**82**) (Figura 11), ostol (**269**) e brailina (**270**) (Figura 34) e dos alcaloides furoquinolinos γ -fagarina (**4**) e esquimianina (**5**) (Figura 1) (FREITAS et al., 2003).

Das raízes de *S. odoratissima* foram isoladas as substâncias: dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) (Figura 1), β -sitosterol (**24**) (Figura 2), aurapteno (**82**)

(Figura 11), 1-hidroxitutaecarpina (**119**) (Figura 16), limonina (**141**) (Figura 18), rutaecarpina (**271**) e evodiamina (**272**) (Figura 34). Também foi possível o isolamento dos limonoides (**273**) e (**274**) (Figura 34), descritos pela primeira vez na literatura nesta publicação (RIBEIRO et al., 2005).

O estudo fitoquímico dos extratos em hexano, diclorometano e metanol dos galhos da *S. odoratissima* permitiu o isolamento dos alcaloides: dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) (Figura 1) e do 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona (**48**) (Figura 7) e dos limonoides: limonina (**141**) (Figura 18) e ácido limonéxico (**275**) (Figura 34) (TEREZAN et al., 2010).

Do extrato hexânico dos frutos de *S. odoratissima* foi relatado o isolamento das substâncias esquimianina (**5**) (Figura 1), aurapteno (**82**) (Figura 11) e limonina (**141**) (Figura 18) (SANTOS et al., 2011). Já o estudo com o extrato das folhas de *S. odoratissima* resultou no isolamento das substâncias β -sitosterol (**24**) (Figura 2) sesamina (**102**) (Figura 14), e 6 α -acetoxi,1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (**276**), além das duas substâncias denominadas espiranthenonas A (**277**) e B (**278**), ambas sendo relatadas pela primeira vez na literatura (Figura 34) (ALBERNAZ et al., 2012).

O óleo essencial obtido das folhas de *S. odoratissima* foi analisado por CG/EM apresentando o β -cariofileno (**267**) (Figura 34) como maior constituinte (GALDINO et al., 2012).

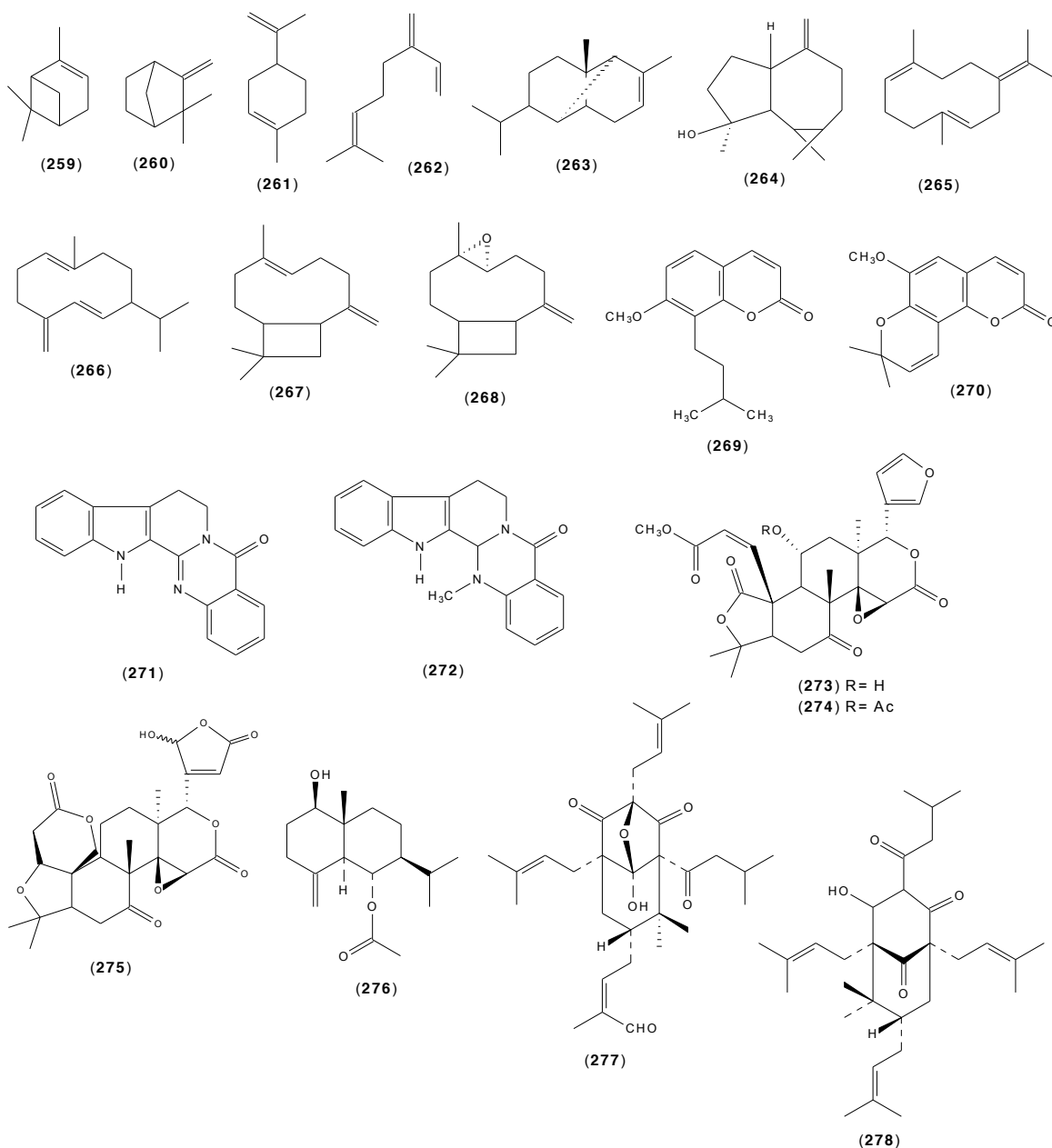


Figura 34. Substâncias isoladas da espécie *Spiranthera odoratissima*.

3.2.17.2. Atividades Biológicas

Os extratos das folhas, caule e rizoma obtidos em hexano e metanol e também o extrato em clorofórmio das folhas de *S. odoratissima* tiveram suas atividades antimicrobianas investigadas. Foram utilizados os seguintes microrganismos cepas-padrão ATCC (“American Type Culture Collection”): *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella cholerae*

suis (ATCC 10708) e *Candida albicans* (ATCC 10231). O método utilizado foi o de difusão em disco de papel de filtro, sendo os discos devidamente impregnados com 10, 20 e 30 µL da solução dos extratos na concentração de 100 µg/mL. Infelizmente os extratos de *S. odoratissima* não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microorganismos testados (SILVA et al., 2010).

A atividade repelente do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* foi avaliada frente ao carrapato *Amblyomma cajennense*. As fêmeas do carrapato foram coletadas de infestações em equinos e incubadas durante o período da postura dos ovos. Em seguida as larvas foram colocadas para se alimentar de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), sendo posteriormente coletadas e incubadas para os testes de repelência. Os resultados obtidos revelaram que o extrato de *S. odoratissima* não possui ação repelente significativa sobre as ninfas da espécie de carrapato testada (SOARES et al., 2010).

Também foram investigadas as atividades inseticidas e/ou fungicidas dos extratos brutos dos galhos de *S. odoratissima* e das substâncias dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**), 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona (**48**), ácido limonético (**275**) e limonina (**141**), isoladas destes extratos, sob a espécie de formiga *Atta sexdens rubropilosa* e o seu fungo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus*. Os extratos brutos em hexano, diclorometano e metanol, na concentração de 1000 µg/mL, apresentaram 100 % de atividade inibitória frente ao fungo. Porém apenas os extratos em diclorometano e metanol, na concentração de 2000 µg/mL, apresentaram atividade inseticida significativa sobre a população de formigas (TEREZAN et al., 2010).

Os alcaloides dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**) e esquimianina (**5**) apresentaram atividades fungicidas relevantes na concentração de 50 µg/mL, sendo que os dois primeiros inibiram respectivamente 100 % e 80% do crescimento do fungo, em contraste não apresentaram atividade inseticida significativa na concentração de 100 µg/mL. As substâncias 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona (**48**), ácido limonético (**275**) e limonina (**141**) tiveram investigadas apenas as suas atividades inseticidas sobre a formiga *A. sexdens rubropilosa*, obtendo os respectivos valores promissores de S_{50} (média de sobrevivência abaixo de 50 %) de 7,0, 3,0 e 4,0 dias com a concentração de 500 µg/mL, enquanto o controle utilizado apresentou S_{50} igual a 12 dias (TEREZAN et al., 2010).

Foi realizado um estudo que investigou a atividade inibitória *in vitro* do extrato hexânico dos frutos (Fhf), dos extratos metanólicos das folhas (Lmf) e da raiz (Rmf) de *S. odoratissima* e das substâncias isoladas: aurapteno (**82**), esquimianina (**5**) e limonina (**141**), contra as formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. Foram utilizadas as formas promastigotas das espécies *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. lansonii* e *L. pifanoi*. Os compostos foram avaliados nas concentrações de 0,5 a 250 µg/mL após períodos de 24, 48 e 72 h de incubação. Foi utilizada a técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) para avaliação da atividade leishmanicida. Também foram avaliados os índices de citotoxicidade e de seletividade destes extratos e substâncias através de testes com a cepa J774 A.1 de macrófagos, obtidos de ratos (SANTOS et al., 2011).

A fração Fhf e a esquimianina (**5**) apresentaram os melhores resultados, entre todos os extratos e substâncias testados. Foram obtidos respectivamente os valores de CI_{50} de 0,972 e 0,783 µg/mL para espécie *L. braziliensis*, contra a qual ambos se mostraram mais eficientes. Os valores da concentração da citotoxicidade para 50% (CC_{50}) obtidos foram de 58,94 µg/mL e 54,73 µg/mL respectivamente, sugerindo que a fração Fhf e o alcalóide esquimianina (**5**) sejam usados abaixo de 50 µg/mL. Os índices de seletividades (IS) obtidos também foram satisfatórios, indicando uma boa atividade leishmanicida de Fhf e da esquimianina (**5**) frente à forma promastigota de *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2011).

Neste mesmo estudo, posteriormente o extrato hexânico dos frutos de *S. odoratissima* (Fhf) e o alcalóide esquimianina (**5**) tiveram suas atividades leishmanicidas investigadas contra a forma amastigota de *L. braziliensis*. Os testes foram realizados utilizando a cepa J774 A.1 de macrófagos obtidos de ratos infectados com a forma promastigota do parasita. As concentrações avaliadas foram de 1,6, 8,0 e 40 µg/mL, nos períodos de 24, 48 e 72 h de incubação e foram utilizados como padrão a LPS (lipopolissacarídeo) (50 ng/mL) e IFN- γ (100U/mL). Os resultados apresentaram um crescente aumento na produção de NO (óxido nítrico) pelo os macrófagos na presença de Fhf e da esquimianina (**5**), em todos os períodos de incubação. Isto é um indicativo de atividade leishmanicida, pois a produção de NO e de outras substâncias nitrogenadas são um dos principais mecanismos de defesa da célula contra a presença de parasitas. Para confirmar, um segundo teste realizado adicionou aminoguanidina, um inibidor seletivo da enzima NOS2 (óxido nítrico sintase 2) responsável pela produção de NO nos macrófagos, juntamente

com a fração Fhf e a esquimianina (**5**). Este teste resultou em um aumento de parasitas no interior das células. Também foi avaliada a presença da citocina anti-inflamatória IL10 produzida pelos macrófagos quando infectados. Os resultados obtidos apresentam uma redução na produção de IL10 pelos macrófagos quando estão na presença da fração Fhf e da esquimianina (**5**). Este conjunto de resultados indica uma alta atividade leishmanicida do extrato heânico dos frutos (Fhf) de *S. odoratissima* e do seu alcaloide esquimianina (**5**) frente a forma amastigota da espécie *L. braziliensi*, devido a um mecanismo de ação na enzima NOS2 (SANTOS et al., 2011).

Outro estudo também investigou a atividade antiprotozoária do extrato das folhas de *S. odoratissima* e das substâncias isoladas: 6 α -acetoxi,1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (**276**), espiranthenonas A (**277**) e B (**278**) (Figura 34), sesamina (**102**) e β -sitosterol (**24**) frente aos protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* e *Plasmodium falciparum* (ALBERNAZ et al., 2012).

Foram utilizados como controle: cloroquina, benznidazol e miltefosina. O extrato bruto, sesamina (**102**) e β -sitosterol (**24**) apresentaram valores de IC₅₀ próximos a 9,0 μ g/mL frente a *P. falciparum*. Já as substâncias espiranthenonas A (**277**) e B (**277**) e 6 α -acetoxi,1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (**276**) apresentaram uma menor atividade, obtendo os respectivos valores de CI₅₀ de 23,4, 25,5 e 13,9 μ g/mL frente ao protozoário *P. falciparum*. Porém a substância 6 α -acetoxi,1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (**276**) foi a que apresentou os melhores resultados frente os protozoários *T. cruzi* e *L. chagasi*, obtendo respectivamente os valores de CI₅₀ de 96,8 e 58,3 μ g/mL. O extrato bruto e as demais substâncias apresentaram atividades antiprotozoárias moderadas ou fracas frente a ambos os protozoários. Todas as substâncias e o extrato bruto testados não exibiram citotoxicidade frente à linhagem celular NIH-3T3 (ALBERNAZ et al., 2012).

A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* foi investigada através de diversas técnicas visando propor um mecanismo de ação sobre as fosfolipases A₂ (PLA_{2s}), que catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos presentes na membrana celular, considerada a principal causa de processo inflamatório. O extrato etanólico bruto inicialmente foi fracionado obtendo-se uma fração hidrometanólico (FHM), que em seguida foi fracionada gerando a fração denominada Sub-Fr₁₀₋₂₈. O teste de contorções induzidas por ácido acético em camundongos Swiss resultou na diminuição das contorções de 84,3% (grupo

controle) para 69,8% e 43,4% respectivamente nas concentrações de 150 e 500 mg/kg da fração FHM e usou como padrão o medicamento indometacina (BARBOSA et al., 2012).

A fração FHM não alterou a latência da reação à dor observada nos camundongos no teste da placa quente, foi utilizado morfina como padrão. No teste de pleurisia induzida por carregenina, a fração FHM e Sub-Fr₁₀₋₂₈ provocaram uma diminuição da migração de leucócitos na cavidade pleural de $6,03 \times 10^6$ leucócitos/mL (padrão) para $2,97 \times 10^6$ leucócitos/mL e $2,79 \times 10^6$ leucócitos/mL respectivamente para as concentrações de 500 mg/kg da fração FHM e 40 mg/kg da fração Sub-Fr₁₀₋₂₈, utilizou-se dexametasona como padrão (BARBOSA et al., 2012).

Já no teste de dor nos camundongo induzido por formalina, a fração Sub-Fr₁₀₋₂₈ (20 mg/kg) não diminui o tempo de resposta na fase neurogênica (tempo de lambida na pata após injeção de formalia) porém diminuiu o tempo de resposta na fase inflamatória de 163,2 s (grupo controle) para 116,7s; a morfina usada como padrão diminuiu os tempos de respostas em ambas as fases. Para o teste de redução de edema nas orelhas dos camundongos induzido por óleo de cróton, a fração Sub-Fr₁₀₋₂₈ (20 mg/kg) provocou 21,25% de redução e no teste de permeabilidade vascular reduziu em 49,51% da concentração da solução do corante azul Evans, empregou-se a dexametasona como padrão em ambos os testes. As frações FHM (1500 µg/mL) e Sub-Fr₁₀₋₂₈ (600 µg/mL) provocaram respectivamente 26,1% e 66,9 % de redução nos halos formados no teste de placa em gel da fosfolipase A₂. Estes resultados indicam que a inibição das atividades das PLA_{2s} é um mecanismo que envolve a atividade anti-inflamatória apresentada pelas frações do extrato etanólico das folhas de *S. odoratissima* (BARBOSA et al., 2012).

A atividade farmacológica e um possível efeito ansiolítico do óleo essencial obtido das folhas de *S. odoratissima* e do seu maior constituinte, β -cariofileno (**267**) (Figura 34), foram avaliados sobre o sistema nervoso central dos ratos. No teste de campo aberto foi observado nos indivíduos um aumento na frequência dos cruzamentos e no tempo passado no centro provocado pelo óleo essencial (500 mg/kg) e pelo β -cariofileno (**267**) (50,100 e 200 mg/kg). Já no teste de rota-rod, o óleo essencial e o β -cariofileno (**267**) não alteraram o número de quedas da barra giratória. No teste de sono induzido por pentobarbital, o β -cariofileno (**267**) nas concentrações de 200 e 400 mg/kg provocou um aumento no tempo para o início do sono e uma diminuição na duração do sono. Porém o óleo essencial conseguiu

aumentar o tempo de latência do sono somente na concentração de 500mg/kg, nas concentrações mais baixas (125 e 250 mg/kg) provocou apenas a redução do tempo de sono dos ratos. Nos testes de ansiedade, o óleo essencial (500 mg/kg) e o β -cariofileno (**267**) (100 e 200 mg/kg) aumentaram o número de imersões na hole-board, as entradas, o tempo gasto no labirinto em cruz elevado, o número de transições e o tempo gasto na parte iluminada de uma caixa dividida em região escura e iluminada, todos estes testes utilizaram o diazepam como padrão (GALDINO et al., 2012).

Para investigar um possível mecanismo, a atividade ansiolítica do óleo essencial e do β -cariofileno (**267**) foram investigadas em ratos previamente tratados com fumazil (antagonista dos receptores GABAA/benzodiazepina) ou com NAN-190 (antagonista dos receptores 5-HT_{1A}). A atividade ansiolítica do óleo essencial foi significativamente reduzida com NAN-190 e não sofreu alteração com fumazil. Já a atividade ansiolítica exibida pelo β -cariofileno (**267**) não foi alterada pelo uso de NAN-190 e fumazil. Estes resultados indicam que a atividade ansiolítica provocada pelo óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* atua por um mecanismo via 5-HT_{1A} e a do β -cariofileno (**267**) por mecanismos diferentes dos receptores 5-HT_{1A} e benzodiazepina (GALDINO et al., 2012).

3.2.17.3. Levantamento Etnofarmacológico

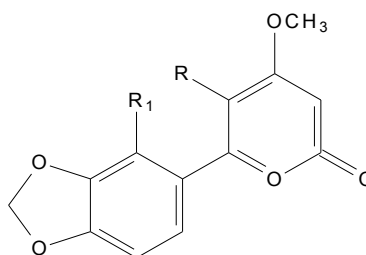
Na medicina popular a espécie *S. odoratissima*, popularmente conhecida como manacá, é utilizada para tratar a sífilis, reumatismo, infecções renais, retenção urinária, dores abdominais, acne e febre (RIBEIRO et al., 2005).

As folhas de *S. odoratissima* são comumente usada como purgante e no tratamento de doenças renais e hepáticas. Já as raízes são utilizadas para estimular o apetite e tratar de dores de estômago, cabeça e musculares além de disfunção hepática e reumatismo (GALDINO et al., 2012).

3.2.18. *Ticorea*

3.2.18.1. Estudos Fitoquímicos

Foi realizado um estudo fitoquímico com as folhas da espécie *Ticorea predicellata* que resultou no isolamento das substâncias 4,5-dimetoxiparacotoin (**279**), 4,5,2'-trimetoxiparacotoin (**280**) e 4,2'-dimetoxiparacotoin (**281**) (Figura 35), descritos pela primeira vez na literatura (BEVALOT et al., 1983).



(**279**) R = OCH₃ R₁ = H

(**280**) R = R₁ = OCH₃

(**281**) R = H R₁ = OCH₃

Figura 35. Substâncias isoladas da espécie *Ticorea predicellata*.

Outro estudo com os galhos de *Ticorea longiflora* permitiu o isolamento das substâncias 4-metoxi-*N*-metil-2-quinolona (**2**), dictamina (**3**), γ -fagarina (**4**), esquimianina (**5**) (Figura 1), evolitrina (**18**) (Figura 2), ostol (**269**), brailina (**270**) (Figura 34), (-)-6-metoxi-trans-khelactona (**282**), *O*-metilcedrelopsina (**283**) e trimetoxifloroglucinol (**284**) (Figura 36). Do extrato das folhas foram isoladas as substâncias esquimianina (**5**), γ -fagarine (**4**) (Figura 1), evolitrina (**18**), β -sitosterol (**24**), estigmasterol (**25**) (Figura 2) e brailina (**270**) (Figura 34) (TORO et al., 1997).

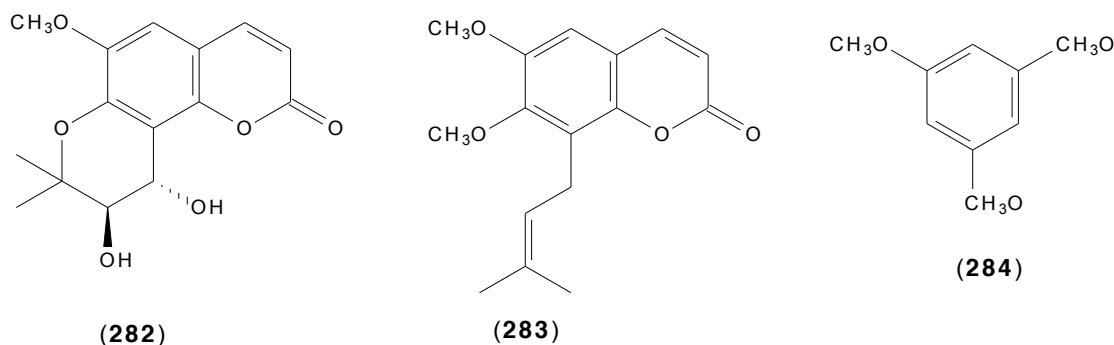


Figura 36. Substâncias isoladas da espécie *Ticorea longiflora*.

3.3. O câncer e os principais produtos naturais empregados no seu tratamento

O câncer, derivado da palavra latina “cancrum” que significa caranguejo, possui como sua principal característica o crescimento desordenado e difuso de células anormais, causados por diversos fatores, sejam eles externos (produtos químicos, tabaco, radiações e infecções) ou internos como, por exemplo, mutações herdadas ou que podem ocorrer durante o metabolismo, pela ação de hormônios e condições imunológicas. Fatores como esses podem atuar juntos ou em seqüência, promovendo assim o início da carcinogênese (COTRAN et al., 2000).

Os diversos tipos de câncer são considerados uma doença genética. Independente das suas diferentes causas, todas exercem um efeito comum em uma classe especial de genes contida na seqüência de nucleotídeos da molécula de DNA. Esta classe é denominada de gene do câncer ou proto-oncogenes (GRIFFITHS, 2000).

O câncer é considerado um dos principais problemas mundiais de saúde e uma das mais importantes causas de enfermidades e mortes em crianças e adultos. Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (MURAD; KATZ, 2000). Outros métodos também podem ser usados, como a fotorradiação com derivados hematoporfíricos (HTP) (MACHADO, 2000) e a imunoterapia (SALMONM, 1998).

O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde se associam mais do que um tipo de tratamento. Um terço dos pacientes alcança a cura total através de medidas

locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase, ou seja, atingiu outros tecidos e regiões do organismo por ocasião do tratamento. Todavia, na maioria dos casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (CHABNER; LONGO, 1996; SPENCE; JONHSTON, 2001).

A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase; no caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia incluindo transplante de medula. A radioterapia é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada. Entretanto, o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (MURAD; KATZ, 2000).

A quimioterapia contra o câncer ou antineoplásica refere-se à administração de drogas citotóxicas, capazes de promover morte celular ou pelo menos inibir o crescimento celular. O tratamento quimioterápico tem como objetivo erradicar o tumor ou reduzir seu crescimento, diminuindo dessa forma os sintomas relacionados ao câncer, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente (NYGREN, 2001).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (ALMEIDA et al., 2005).

A maior falha da quimioterapia antineoplásica ocorre devida à resistência às drogas. Esta resistência ocorre ou porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação), ou porque são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes quando expostas às drogas, o que lhes permite enveredar por vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas. É também observada resistência nos casos em que o tratamento é descontinuado, quando a

população tumoral é ainda sensível às drogas, em que a quimioterapia é aplicada a intervalos irregulares e em que doses inadequadas são administradas. Um importante alvo quimioterápico são os microtúbulos das células cancerígenas, pois possuem uma importância fundamental na replicação celular. Dentre alguns produtos naturais citotóxicos usados clinicamente no tratamento de neoplasias, têm-se os alcaloides vegetais como: a vimblastina (**285**) e a vincristina (**286**) (isolados de *Catharanthus roseus*) e o taxol (**287**) (isolado de *Taxus brevifolia*) (SOUZA, 2004; ALMEIDA, 2005).

No Brasil, a espécie *Catharanthus roseus* é também utilizada como planta ornamental, sendo conhecida comumente por outros nomes populares, como beijo e vinca. Os alcaloides vimblastina e vincristina (Figura 37) atuam pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase. Estas substâncias são comercializadas com os nomes de Vincapan® da Rhône- Poulenc para vimblastina e de Oncovin® ou Velban® da Eli Lilly e Vincristina® da Asofarma para a vincristina (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

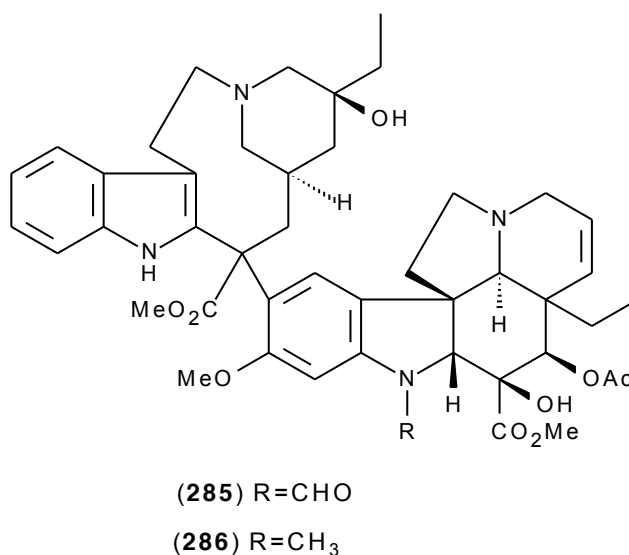


Figura 37. Estruturas da vimblastina (**285**) e vincristina (**286**).

O taxol (**287**) (Figura 38), um diterpeno alcaloídico isolado de *Taxus brevifolia* atua através da inibição do fuso mitótico, da dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolimerização, assim resultando no

bloqueio da multiplicação celular. Este produto natural mostrou-se eficaz contra uma série de tumores em concentrações nanomolares, como por exemplo, em tumores de mama e ovário obtendo-se valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50% da população celular) de 5,7 nM para a linhagem celular MAD-MB-435 e 11,5 nM para a linhagem SK-OV-3 respectivamente (SOUZA, 2004).

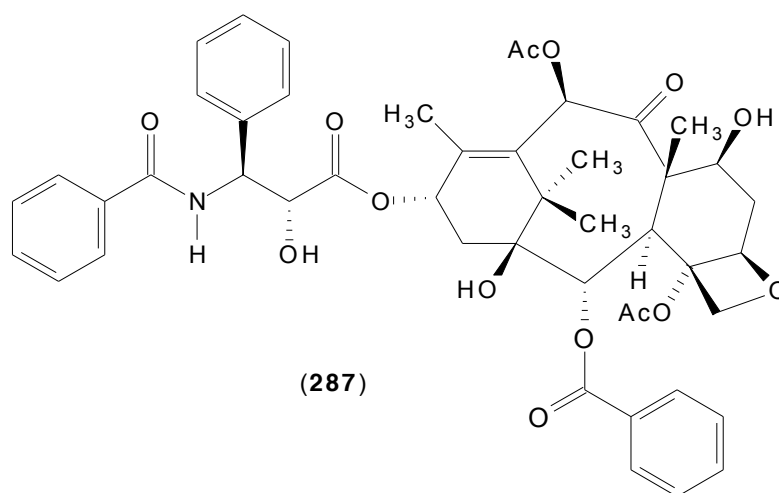


Figura 38. Estrutura do taxol (287).

Um grande problema na extração do taxol residu no fato de que a espécie *Taxus brevifolia* demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade e encontra-se em extinção. Para a obtenção de 1 kg do taxol são necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da *Taxus brevifolia*, sendo necessário abater cerca de 3.000 árvores. Essa quantidade poderia ser utilizada no tratamento de apenas 500 pacientes durante o período de um ano, sendo um número muito reduzido de pessoas a serem beneficiadas (SOUZA, 2004).

Uma solução para este problema foi encontrada nas folhas da árvore *Taxus baccata*, da qual se pode extrair a substância 10-desacetilbacatina-III que apresenta o esqueleto estrutural básico e as funcionalidades do taxol. Pode-se obter, via semi-síntese e em poucas etapas, o taxol pela acetilação da posição 10 da 10-desacetilbacatina-III e pela introdução da cadeia lateral em posição C-13 (SOUZA, 2004).

Uma vantagem deste método para a obtenção do taxol é que não é necessário se abater as árvores, sendo uma fonte renovável, pois para se obter 1 kg

de 10-desacetilbacatina-III são necessários cerca de 3.000 kg das folhas de *Taxus baccata* (KINGSTON, 2000). Esta semi-síntese foi desenvolvida por diferentes grupos de pesquisa, um exemplo é o esquema de síntese desenvolvido por Holton (Figura 39) (SOUZA, 2004).

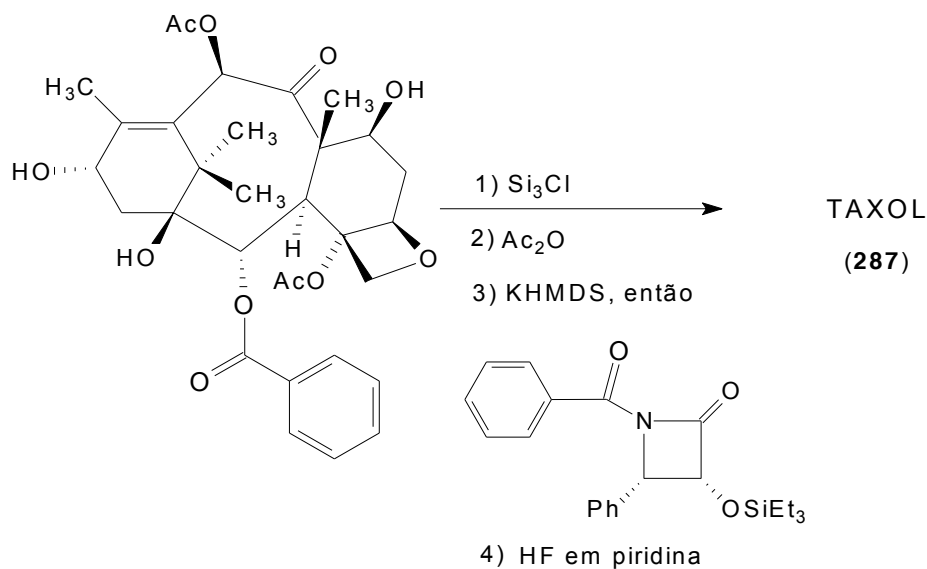


Figura 39. Esquema de síntese do taxol realizado por Holton e colaboradores

Devido à sua eficácia, este produto natural foi comercializado pela companhia americana Bristol-Meyer Squibb com o nome de Taxol, na década de 90, e atualmente está disponível como medicamento em mais de 60 países. Usado com sucesso em diferentes tipos de tumores sólidos, foi o primeiro medicamento no mercado capaz de impedir a despolimerização da tubulina (SOUZA, 2004).

Assim fica evidente o importante papel desempenhado pelos produtos naturais obtidos a partir de extratos vegetais no tratamento contra o câncer. O sucesso do taxol funciona como grande motivação para o estudo fitoquímico de novas espécies e a avaliação antitumoral dos seus extratos e constituintes na busca de novos fármacos que auxiliem no combate ao câncer.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes, Solventes e Vidrarias

- Acetato de etila P.A.
- Clorofórmio deuterado
- Cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄
- Diclorometano P.A.
- Hexano P.A.
- Metanol P.A.
- Sílica gel (0,063–0,200 mm)
- Solução de nitrato básico de bismuto III em ácido acético diluído com iodeto de potássio (Reagente de Dragendorff)
- Solução de Vanilina a 2% em ácido sulfúrico concentrado
- Colunas cromatográficas de vidro de tamanhos variados
- Frascos de vidro

4.1.2. Equipamentos

- Espectrômetro de infravermelho Shimadzu IRA ffinity-1. As amostras foram analisadas em filme sob pastilha de KBr.
- Espectrômetro de massas acoplado ao Cromatógrafo em fase gasosa do modelo CG/EM–QP–5050, marca SHIMADZU, utilizando impacto de elétrons a 70 eV.
- Espectrômetro de massas acoplado ao Cromatógrafo em fase gasosa do modelo CG-17A, marca SHIMADZU, utilizando impacto de elétrons a 70 eV.
- Espectrômetro de massas de alta resolução por ionização por *eletrospray* (ESI-MS) Q-TOF (Synapt HDMS, Waters), utilizando o sistema Synapt HDMS (High Definition Mass Spectrometry) – Waters e modo positivo de análise.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Brüker, modelo DRX-500 (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Brüker, modelo Avance IIIHD (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C).
- Evaporador rotativo Büchi modelo R-114

- Lâmpada ultravioleta (Aldrich) a 254 nm e 365 nm
- Moinho de martelos, da marca Tecnal

4.2. Métodos

As espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica* foram escolhidas por serem espécies da família Rutaceae. Esta família é considerada rica em cumarinas e alcaloides com diversas atividades biológicas. Além disso, ambas as espécies não possuíam estudos fitoquímicos relatados na literatura.

4.2.1. Coleta do material vegetal e identificação botânica

As espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica*, foram coletadas em maio de 2011 na Reserva Florestal da Companhia Vale em Linhares – ES.

A exsicata das espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica* encontram-se depositadas no herbário da Companhia Vale em Linhares com os respectivos códigos, CRVD-3301 e CVRD 9927, respectivamente.

4.2.2. Secagem e moagem

A secagem do material vegetal foi feita ao ar livre logo após a coleta, para evitar a presença de fungos. Após secagem, o material foi triturado usando moinho de martelos.

4.2.3. Isolamento e purificação das substâncias orgânicas por técnicas cromatográficas

Foram utilizadas técnicas de Cromatografia em Coluna a pressão normal, utilizando colunas de vidro com diversos tamanhos. Nas análises de Cromatografia em Coluna, foram utilizadas sílica gel 60 (0,063–0,200 mm) (SOUZA, 2006).

As análises de Cromatografia em Camada Delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas de Alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄. As substâncias foram visualizadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (Aldrich) a 254 nm e 365 nm e/ou através da aplicação dos seguintes reagentes cromogênicos (SOUZA, 2006):

- Dragendorff (solução de nitrato básico de bismuto III em ácido acético diluído com iodeto de potássio).
- H₂SO₄ conc./Vanilina, seguido de aquecimento.

4.2.4. Análises espectrométricas de Infravermelho

A análise de infravermelho foi realizada utilizando-se um Espectrômetro de Infravermelho Shimadzu IRAffinity-1, situado no Laboratório de Ciências Química da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. A amostra foi analisada em filme sob pastilha de KBr.

4.2.5. Análises espectrométricas de Ressonância Magnética Nuclear

As análises espectrométricas de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Brüker, modelo DRX-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C), situado no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Brüker, modelo Avance IIIHD (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C), situado no Laboratório de Ciências Química da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), usando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

4.2.6. Análises de espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos, usando dois modelos diferentes de Espectrômetro de Massas acoplado ao Cromatógrafo em Fase Gasosa da marca SHIMADZU, ambos utilizando impacto de elétrons a 70 eV. As análises espectrométricas foram realizadas no aparelho modelo CG-17A, situado no Laboratório de Ciências Química da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro e no aparelho modelo CG/EM-QP-5050, situado no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os espectros de massas de alta resolução por ionização por *eletrospray* foram obtidos usando o espectrômetro de massas Q-TOF (Synapt HDMS, Waters), utilizando o sistema Synapt HDMS (High Definition Mass Spectrometry) – Waters e modo positivo de análise. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

4.2.7. Preparação dos Extratos Brutos

Os extratos brutos foram preparados a frio (maceração) por extrações sucessivas com diferentes solventes orgânicos. Os extratos de *R. nodosa* foram obtidos após sucessivas extrações, utilizando como solvente hexano e metanol em ordem crescente de polaridade. O extrato de *S. atlantica* foi obtido após sucessivas extrações, utilizando apenas metanol como solvente. As soluções obtidas foram destiladas a pressão reduzida em evaporador rotativo, fornecendo os respectivos extratos brutos.

A quantidade de material vegetal coletado e as massas dos extratos brutos obtidos para ambas as espécies estudadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de material vegetal coletado e de extratos brutos obtidos da madeira das espécies *Rauia nodosa* e *Spiranthera atlantica*.

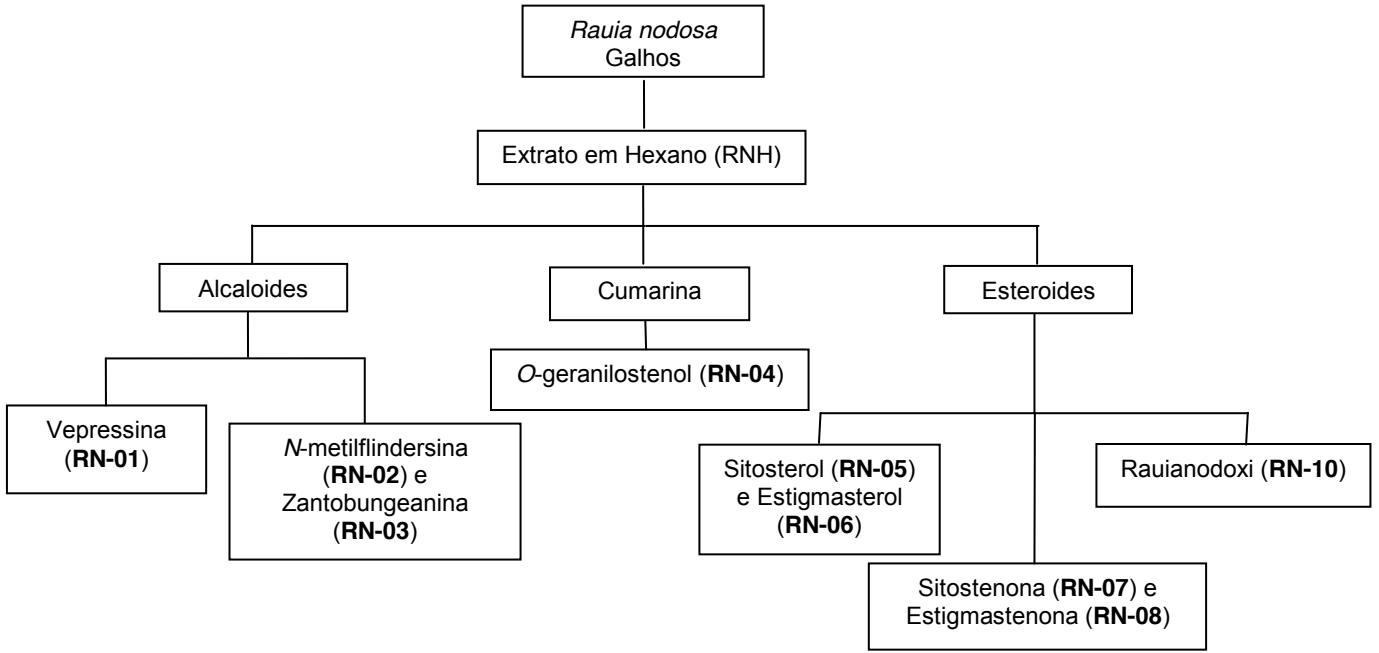
Espécie Botânica	Parte Botânica	material (Kg)	Solventes	extratos (g)
<i>Rauia nodosa</i>	Galhos	4, 80 Kg	a	4,70 g
			b	118, 96 g
<i>Spiranthera atlantica</i>	Galhos	5, 10 Kg	b	100,48 g

a- Hexano

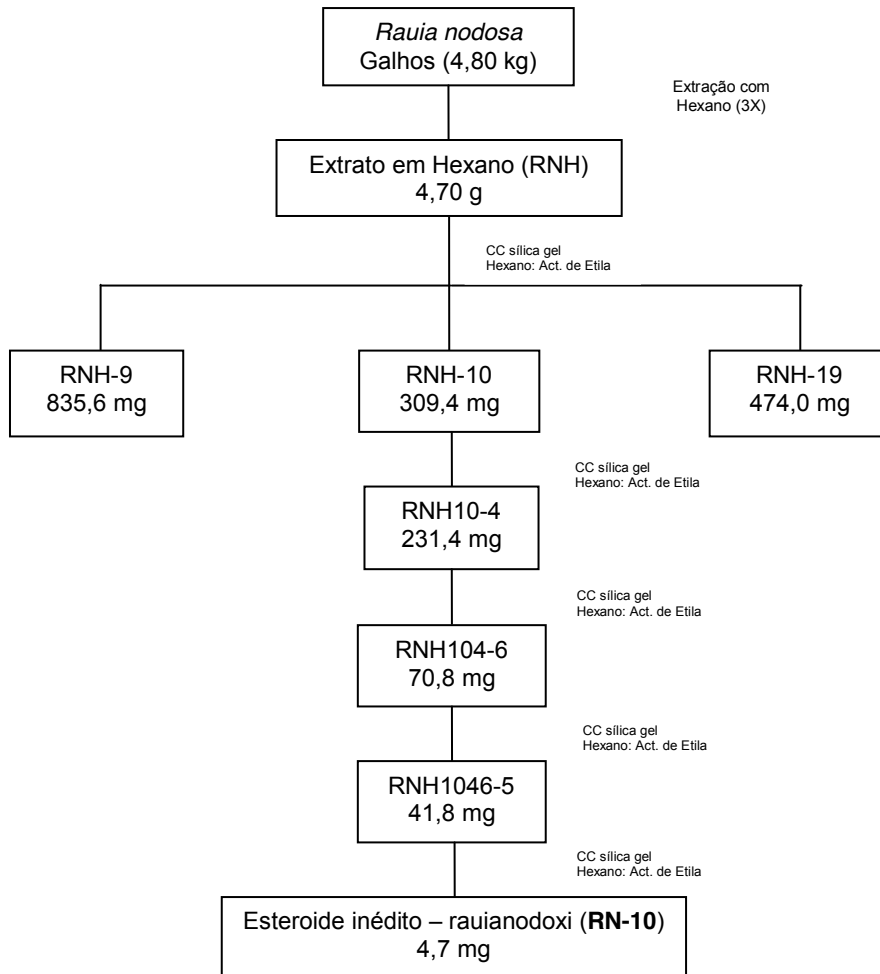
b- Metanol

4.2.8. Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos da espécie *Rauia nodosa*.

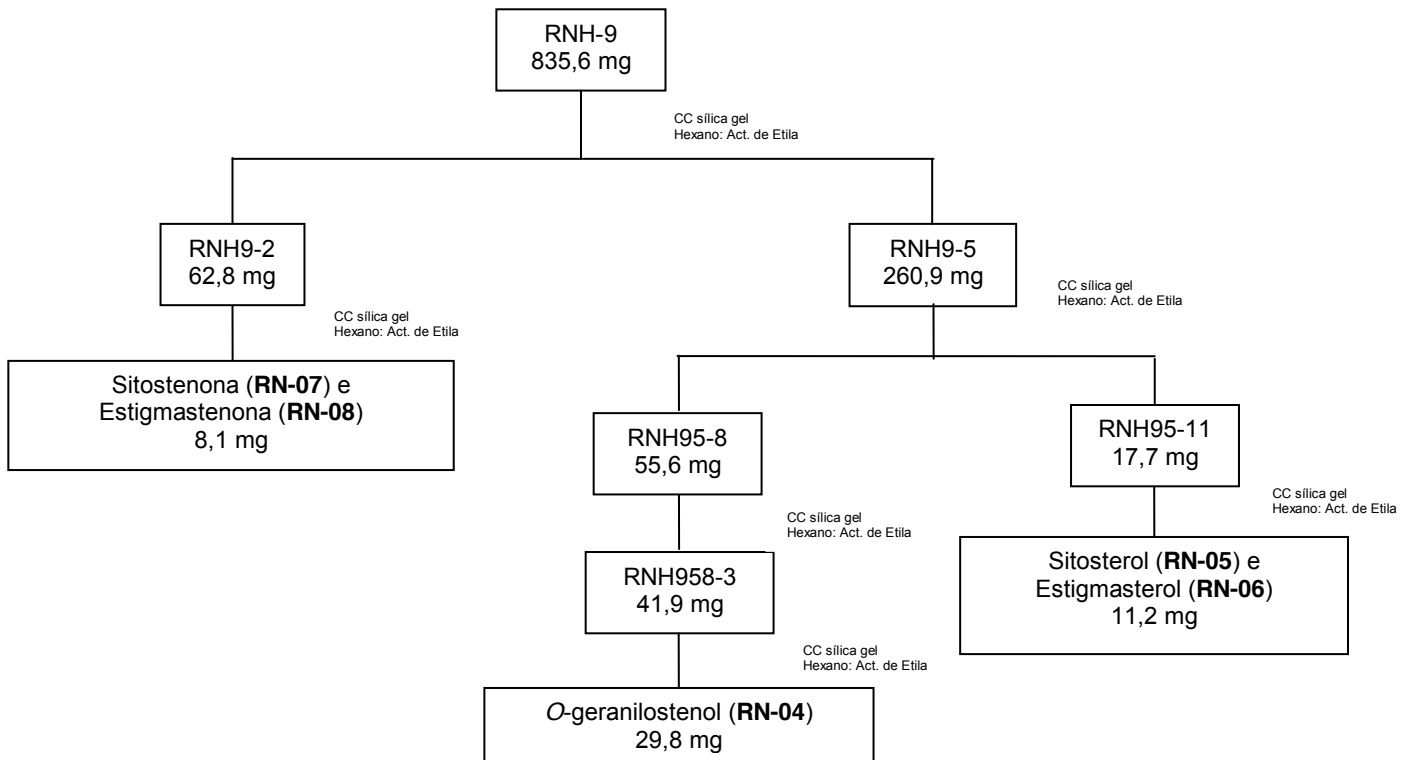
4.2.8.1. Resumo dos constituintes químicos isolados do extrato em hexano dos galhos de *Rauia nodosa* (4,70 g).



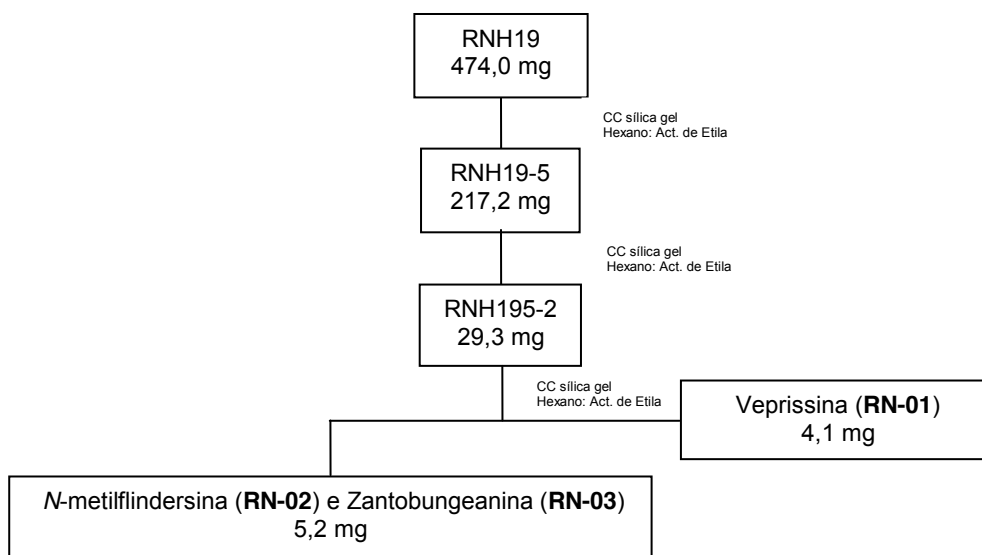
Fluxograma 1. Substâncias isoladas do extrato em hexano dos galhos de *R. nodosa* (RNH).



Fluxograma 2. Estudo cromatográfico do extrato em hexano dos galhos de *R. nodosa* (RNH) e da fração RNH-10.



Fluxograma 3. Estudo cromatográfico da fração RNH-9 obtida do extrato em hexano dos galhos de *R. nodosa*.



Fluxograma 4. Estudo cromatográfico da fração RNH-19 obtida do extrato em hexano dos galhos de *R. nodosa*.

4.2.8.2. Análise detalhada das frações obtidas do extrato em hexano (4,70 g) dos galhos de *Rauia nodosa*.

Inicialmente o extrato em hexano (4,70 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 30 frações, que posteriormente foram reunidas em 20 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do extrato bruto em hexano dos galhos de *R. nodosa* (RNH).

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-5	RNH-1	2,5	*
6-7	RNH-2	20,1	*
8	RNH-3	9,1	*
9	RNH-4	12,1	*
10	RNH-5	496,9	✓
11	RNH-6	107,6	✓
12	RNH-7	174,7	✓
13	RNH-8	505,2	✓
14	RNH-9	835,6	✓
15	RNH-10	309,4	✓
16-17	RNH-11	227,2	✓
18-19	RNH-12	64,3	✓
20	RNH-13	59,2	✓
21	RNH-14	15,8	✓
22-23	RNH-15	123,2	✓
24	RNH-16	82,41	✓

25	RNH-17	195,1	✓
26	RNH-18	61,1	✓
27-28	RNH-19	474,0	✓
29-30	RNH-20	72,3	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNH-9 (835,6 mg)

A fração RNH-9 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 80 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 4 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 4. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH-9.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-9	RNH9-1	3,3	*
10-28	RNH9-2	62,8	✓
29	RNH9-3	4,2	*
30-47	RNH9-4	59,2	✓
48-57	RNH9-5	260,9	✓
58-80	RNH9-6	133,5	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNH9-2 (62,8 mg)

A fração RNH9-2 foi purificada através de uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 40 frações, que posteriormente foram reunidas em 10 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração RNH92-10 (8,1 mg) foi identificada como sendo a mistura dos esteroides sitostenona (**RN-07**) e estigmastenona (**RN-08**).

Análise da fração RNH9-5 (260,9 mg)

A fração RNH9-5 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 77 frações, que posteriormente foram reunidas em 10 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 5 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 5. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH9-5.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-3	RNH95-1	3,1	*
4-5	RNH95-2	2,8	*
6-19	RNH95-3	8,1	*
20-24	RNH95-4	7,0	*
25-39	RNH95-5	13,1	*
40-47	RNH95-6	6,2	*
48-50	RNH95-7	3,5	*
51-72	RNH95-8	55,6	✓
73-76	RNH95-9	2,0	*
77	RNH95-10	17,7	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNH95-8 (55,6 mg)

A fração RNH95-8 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 56 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 6 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 6. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH95-8.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-3	RNH958-1	3,2	*
4	RNH958-2	5,3	*
5-33	RNH958-3	41,9	✓
34-41	RNH958-4	2,0	*
42-56	RNH958-5	3,1	*

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Fração estudada.

Análise da fração RNH958-3 (41,9 mg)

A fração RNH958-3 foi purificada através de uma coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 82 frações, que posteriormente foram reunidas em 3 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração RNH9583-2 (29,8 mg) foi identificada como sendo a cumarina *O*-geranilostenol (**RN-04**).

Análise da fração RNH95-11 (17,7 mg)

A fração RNH95-11 foi purificada através de uma coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 22 frações, que posteriormente foram reunidas em 2 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A

fração RNH9511-1 (11,2 mg) foi identificada como sendo a mistura dos esteroides β -sitosterol (**RN-05**) e estigmasterol (**RN-06**).

Análise da fração RNH-10 (309,4 mg)

A fração RNH-10 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 65 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por cromatografia Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 7 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 7. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH-10.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-19	RNH10-1	7,7	*
20-29	RNH10-2	3,9	*
30-38	RNH10-3	7,4	*
39-50	RNH10-4	231,4	✓
51-65	RNH10-5	94,6	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNH10-4 (231,4 mg)

A fração RNH10-4 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 116 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 8 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 8. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH10-4.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-8	RNH104-1	7,9	*
9-20	RNH104-2	7,2	*
21-52	RNH104-3	63,2	✓
53-82	RNH104-4	48,3	✓
83-94	RNH104-5	13,8	✓
95-116	RNH104-6	70,8	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNH104-6 (70,8 mg)

A fração RNH104-6 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até hexano:acetato de etila (83:17, v/v), sendo coletadas 98 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 9 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 9. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH104-6.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-21	RNH1046-1	2,7	*
22-46	RNH1046-2	7,8	*
47-61	RNH1046-3	13,2	*
62-73	RNH1046-4	3,1	*
74-98	RNH1046-5	41,8	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Fração estudada.

Análise da fração RNH1046-5 (41,8 mg)

A fração RNH1046-5 foi purificada através de uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 35 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração RNH10465-3 (4,7 mg) foi identificada como o sendo o esteroide denominado rauianodoxi (**RN-10**), inédito na literatura.

Análise da fração RNH-19 (474,0 mg)

A fração RNH-19 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 44 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 10 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 10. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH-19.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-5	RNH19-1	16,6	✓
6-10	RNH19-2	21,4	✓
11-13	RNH19-3	10,7	*
13-15	RNH19-4	8,3	*
16-31	RNH19-5	217,2	✓
32-44	RNH19-6	80,4	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNH19-5 (217,2 mg)

A fração RNH-19 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até

acetato de etila puro, sendo coletadas 97 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 11 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 11. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração RNH19-5.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1	RNH195-1	4,2	*
2-10	RNH195-2	29,3	✓
11-25	RNH195-3	44,4	•
27-53	RNH195-4	82,6	•
54-82	RNH195-5	60,1	•

* Fração não estudada por apresentar pouca massa.

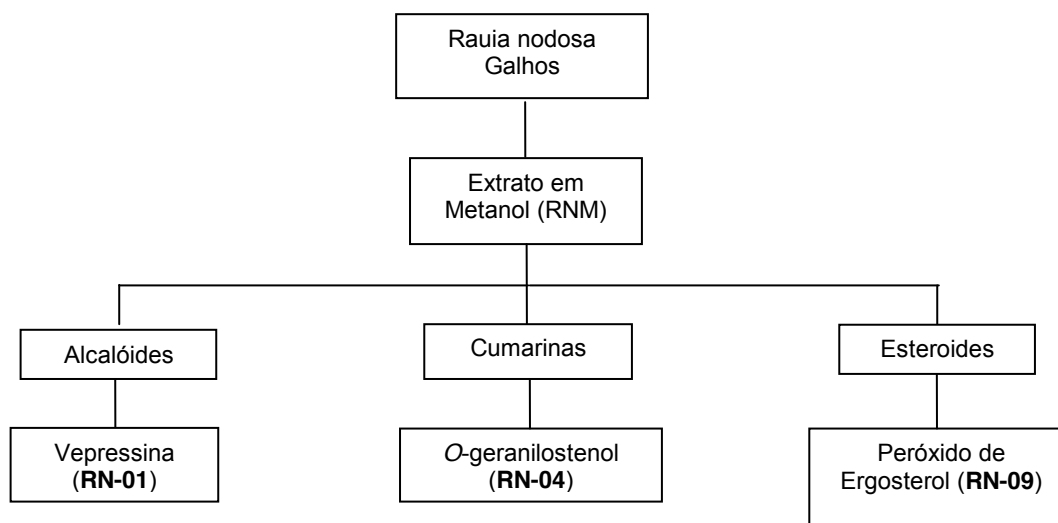
• Frações não estudadas por serem semelhantes a fração RNH195-2, que se encontrava mais pura.

✓ Fração estudada.

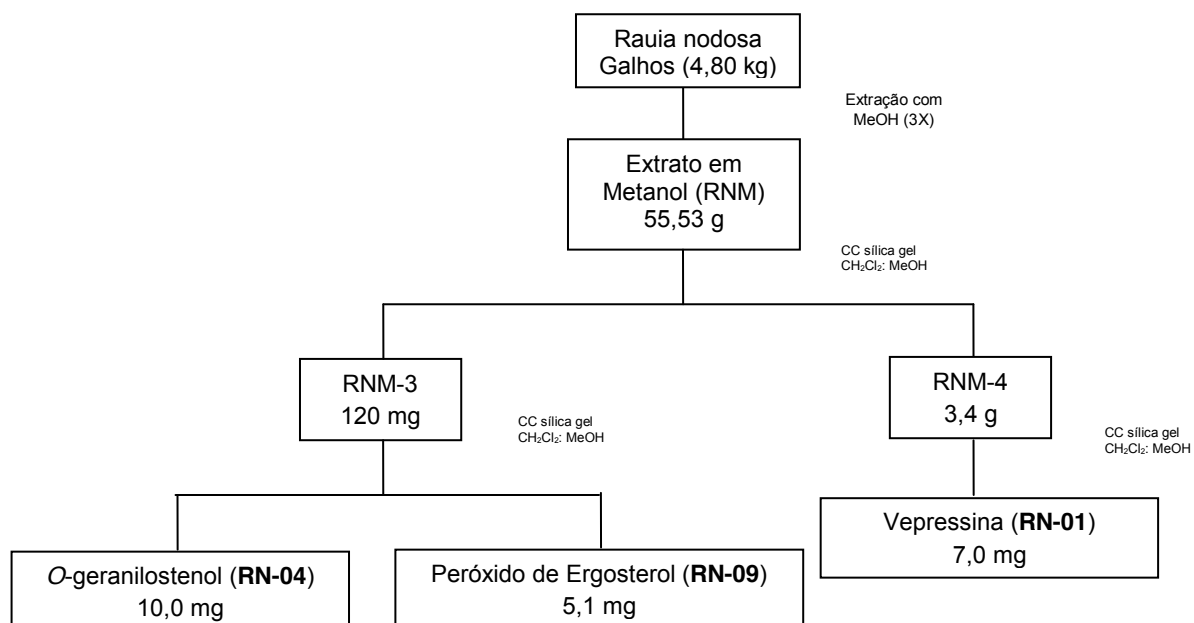
Análise da fração RNH195-2 (29,3 mg)

A fração RNH195-2 foi purificada através de uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente hexano puro, com gradiente de eluição até acetato de etila puro, sendo coletadas 72 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. As frações RNH1952-2 (5,2 mg) e RNH1952-3 (4,1 mg) foram identificadas como sendo respectivamente a mistura de alcaloides *N*-metilflindersina (**RN-02**) e zantobungeanina (**RN-03**) e o alcaloide veprissina (**RN-01**).

4.2.8.3. Resumo dos constituintes químicos isolados do extrato em metanol dos galhos de *Rauia nodosa* (118,9 g).



Fluxograma 5. Substâncias isoladas do extrato em metanol dos galhos de *R. nodosa* (RNM).



Fluxograma 6. Estudo cromatográfico do extrato em metanol dos galhos de *R. nodosa* (RNM).

4.2.8.4. Análise detalhada das frações obtidas do extrato em metanol (55,53 g) dos galhos de *Rauia nodosa*.

Inicialmente, apenas uma parte do extrato bruto em metanol dos galhos de *R. nodosa* (55,53 g) foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 12 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 12 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 12. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do extrato bruto em metanol dos galhos de *R. nodosa* (RNM).

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (g)	
1-2	RNM-1	0,4	✓
3	RNM-2	0,5	✓
4-5	RNM-3	0,12	✓
5-6	RNM-4	3,4	✓
7-9	RNM-5	5,2	✓
10-12	RNM-6	3,7	✓

✓ Frações estudadas.

Análise da fração RNM-3 (120 mg)

A fração RNM-3 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 51 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração RNM3-2 (10,0 mg) foi identificada como sendo a cumarina *O*-geranilostenol (**RN-04**) e a fração RNM3-4 (5,1 mg) foi identificada como sendo o esteroide peróxido de ergosterol (**RN-09**).

Análise da fração RNM-4 (3,4 g)

A fração RNM-4 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 35 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração RNM4-5 (7,0 mg) foi identificada como sendo o alcaloide vepressina (**RN-01**).

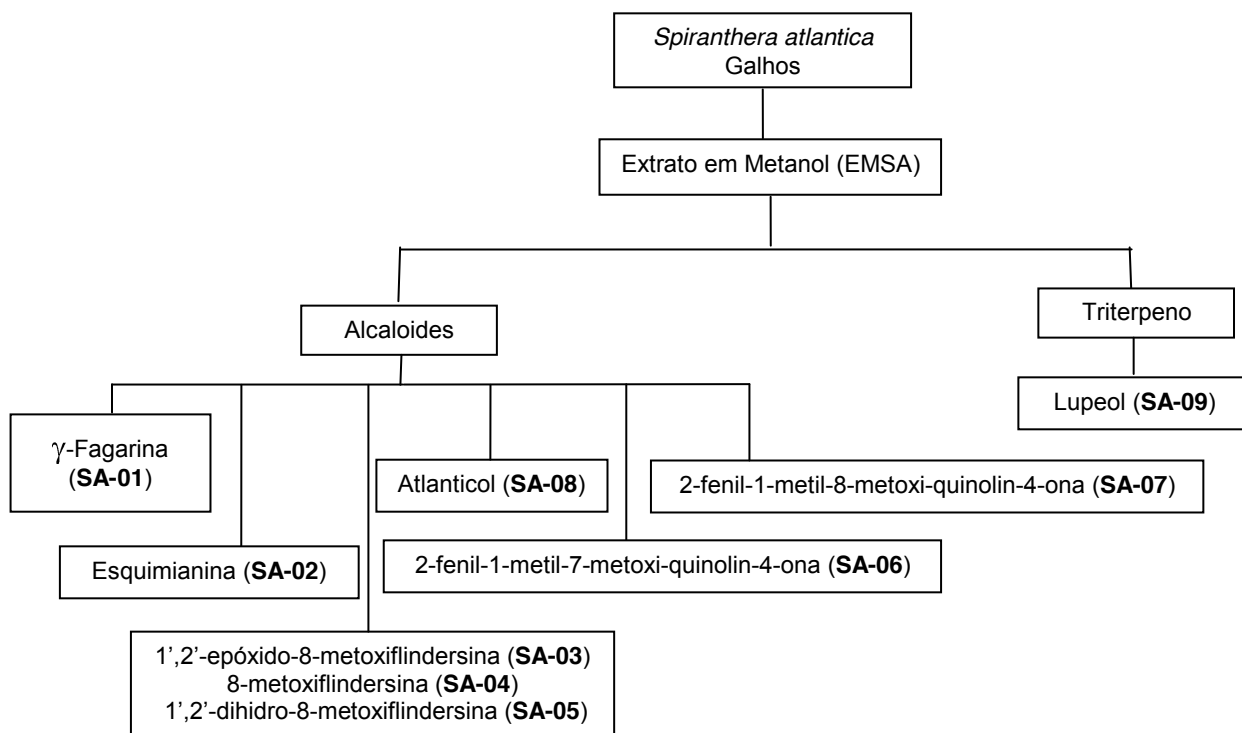
Análise das demais frações obtidas do extrato bruto em metanol dos galhos de *R. nodosa*.

Todas as frações obtidas da coluna cromatográfica inicial de parte do extrato bruto em metanol dos galhos de *R. nodosa* (55,53 g) foram estudadas, com exceção da última fração RNM-6. Porém, foi possível o isolamento de apenas uma substância, peróxido de ergosterol (**RN-09**).

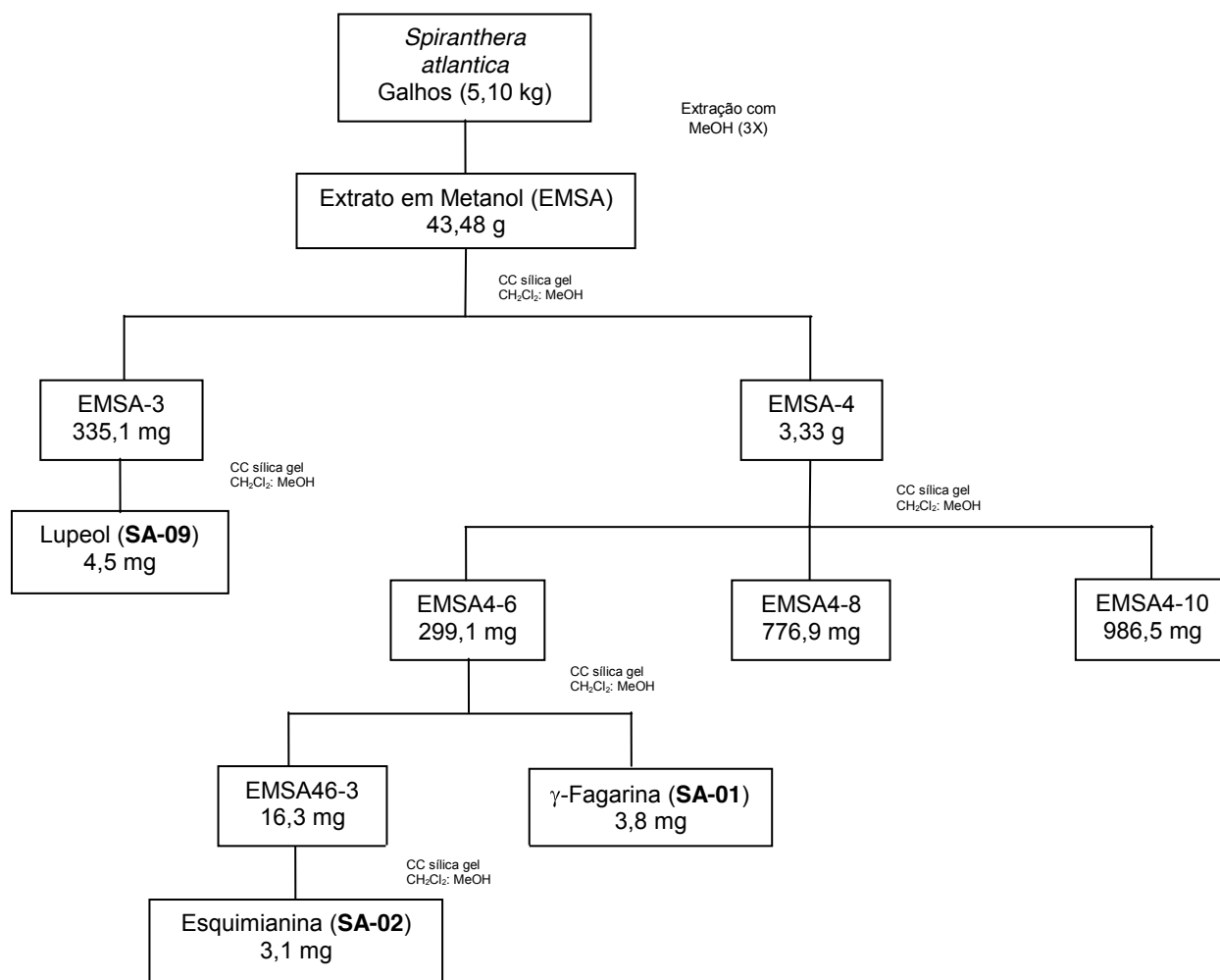
Também foi realizada uma segunda tentativa para isolar um número maior de substâncias do extrato bruto em metanol de *R. nodosa*. Para isso foi realizada a cromatografia em coluna da segunda metade do extrato em metanol dos galhos de *R. nodosa* (61,3 g). O estudo das frações obtidas permitiu apenas o isolamento da cumarina *O*-geranilostenol (**RN-04**) e do alcaloide vepressina (**RN-01**), ambos isolados anteriormente do extrato em hexano.

4.2.9. Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos da espécie *Spiranthera atlantica*.

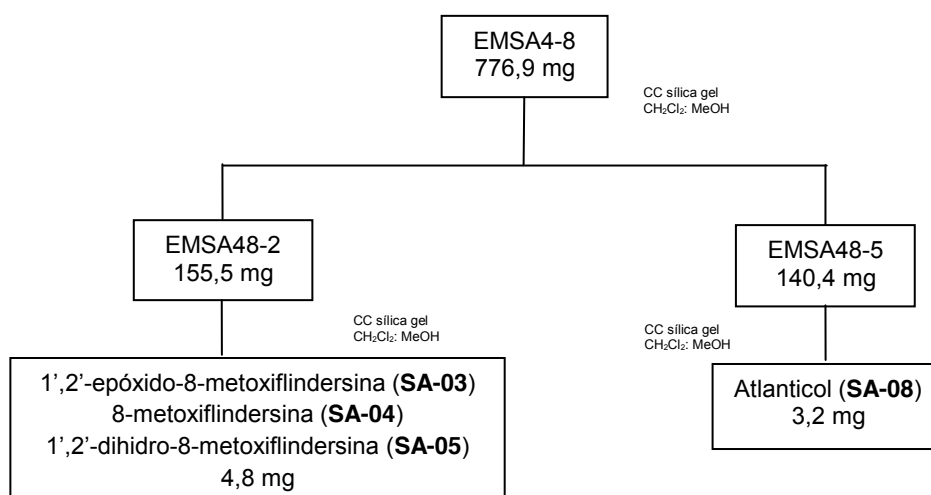
4.2.9.1. Resumo dos constituintes químicos isolados do extrato em metanol dos galhos de *Spiranthera atlantica* (100,48 g).



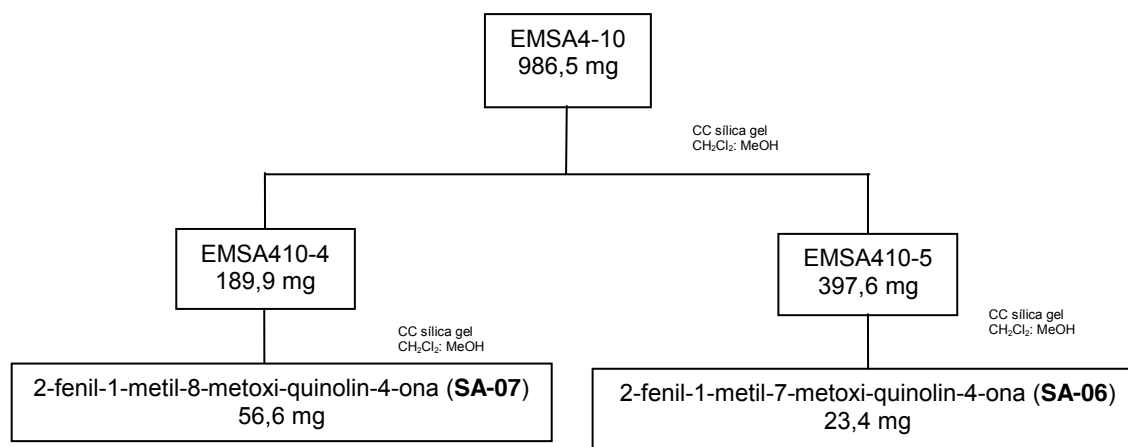
Fluxograma 7. Substâncias isoladas do extrato em metanol dos galhos de *S. atlantica* (EMSA).



Fluxograma 8. Estudo cromatográfico do extrato em metanol dos galhos de *S. atlantica* (EMSA) e das frações EMSA-3 e EMSA-4.



Fluxograma 9. Estudo cromatográfico da fração EMSA4-8 obtida do extrato em metanol dos galhos de *S. atlantica*.



Fluxograma 10. Estudo cromatográfico da fração EMSA4-10 obtida do extrato em metanol dos galhos de *S. atlantica*.

4.2.9.2. Análise detalhada das frações obtidas do extrato em metanol (43,48 g) dos galhos de *Spiranthera atlantica*.

Apenas uma parte do extrato bruto em metanol dos galhos de *S. atlantica* (43,48 g) foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 16 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 13 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 13. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do extrato bruto em metanol dos galhos de *S. atlantica* (EMSA).

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (g)	
1	EMSA-1	0,25	✓
2	EMSA-2	0,35	✓
3-6	EMSA-3	0,33	✓
7	EMSA-4	3,33	✓
8	EMSA-5	2,58	✓
9-10	EMSA-6	5,47	✓
11-16	EMSA-7	3,53	✓

✓ Frações estudadas.

Análise da fração EMSA-3 (335,1 mg)

A fração RNM-3 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 65 frações, que posteriormente foram reunidas em 5 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração EMSA3-2 (4,5 mg) foi identificada como sendo o triterpeno lupeol (**SA-09**). Todas as demais frações foram devidamente estudadas, porém não resultaram no isolamento de outras substâncias.

Análise da fração EMSA-4 (3,33 g)

A fração RNM-4 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 40 frações, que posteriormente foram reunidas em 12 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 14 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 14. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA-4.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-11	EMSA4-1	171,1	✓
12-15	EMSA4-2	87,4	✓
16	EMSA4-3	13,5	*
17-23	EMSA4-4	175,2	✓
24-25	EMSA4-5	146,7	✓
26-27	EMSA4-6	299,1	✓
28	EMSA4-7	14,5	*
29-33	EMSA4-8	776,9	✓
34	EMSA4-9	84,2	✓
35-36	EMSA4-10	986,5	✓

37	EMSA4-11	68,2	✓
39-40	EMSA4-12	261,4	✓

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração EMSA4-6 (299,1 mg)

A fração EMSA4-6 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 92 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 15 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas. A fração EMSA46-2 (3,8 mg) foi identificada como sendo o alcaloide γ -fagarina (**SA-01**).

Tabela 15. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA4-6.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-5	EMSA46-1	3,1	*
6-8	EMSA46-2	3,8	γ -fagarina (SA-01)
9	EMSA46-3	16,3	✓
11-23	EMSA46-4	111,8	✓
24-37	EMSA46-5	39,8	•
39-59	EMSA46-6	42,8	•
60-83	EMSA46-7	54,2	✓

* Fração não estudada por apresentar pouca massa.

• Frações não estudadas por serem semelhantes as frações EMSA46-4 e EMSA46-7.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração EMSA46-3 (16,3 mg)

A fração EMSA46-3 foi purificada através de Cromatografia em Coluna empacotada com sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 52 frações, que posteriormente foram

reunidas em 6 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração EMSA463-5 (3,1 mg) foi identificada como sendo o alcaloide esquimianina (**SA-02**).

Análise da fração EMSA4-8 (776,9 mg)

A fração EMSA4-8 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 21 frações, que posteriormente foram reunidas em 8 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 16 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 16. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA4-8.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-2	EMSA48-1	22,1	✓
3	EMSA48-2	155,5	✓
4-7	EMSA48-3	146,7	✓
8-9	EMSA48-4	58,3	•
10-12	EMSA48-5	140,4	✓
13-15	EMSA48-6	65,4	•
16-20	EMSA48-7	62,3	•
21	EMSA48-8	31,6	•

• Frações não estudadas por serem semelhantes às demais frações obtidas.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração EMSA48-2 (155,5 mg)

A fração EMSA48-2 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 67 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração EMSA482-6 (4,8 mg) foi

identificada como sendo a mistura dos alcaloides 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina (**SA-03**), 8-metoxiflindersina (**SA-04**) e 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (**SA-05**). As demais frações obtidas foram devidamente estudadas, porém não resultaram no isolamento de outras substâncias.

Análise da fração EMSA48-5 (140,4 mg)

A fração EMSA48-5 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com sílica gel, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 89 frações, que posteriormente foram reunidas em 8 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração EMSA48-8 (3, 2 mg) foi identificada como sendo o alcaloide atlanticol (**SA-08**), inédito na literatura. As demais frações obtidas foram devidamente estudadas, porém não resultaram no isolamento de outras substâncias.

Análise da fração EMSA4-10 (986,5 mg)

A fração EMSA4-10 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 36 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A Tabela 17 apresenta o estudo cromatográfico das frações obtidas.

Tabela 17. Estudo cromatográfico das frações obtidas a partir da fração EMSA4-10.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	
1-10	EMSA410-1	15,3	*
11-12	EMSA410-2	9,2	*
13-17	EMSA410-3	23,3	✓
18-22	EMSA410-4	189,9	✓
23-32	EMSA410-5	397,6	✓
33	EMSA410-6	47,7	✓

34-36	EMSA410-7	97,6	✓
-------	-----------	------	---

* Frações não estudadas por apresentarem pouca massa.

✓ Frações estudadas.

Análise da fração EMSA410-4 (189,9 mg)

A fração EMSA410-4 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 101 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração EMSA4104-2 (56,6 mg) foi identificada como sendo o alcaloide 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**). As demais frações obtidas foram semelhantes a fração EMSA4104-2, com um nível de pureza menor, por isso não foram estudadas.

Análise da fração EMSA410-5 (397,6 mg)

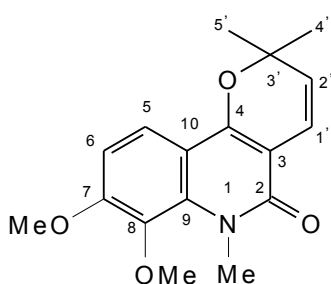
A fração EMSA410-5 foi submetida a uma Cromatografia em Coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como solvente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro, sendo coletadas 60 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. A fração EMSA4105-2 (23,4 mg) foi identificada como sendo o alcaloide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**). As demais frações obtidas foram semelhantes a fração EMSA4105-2, com um nível de pureza menor, por isso não foram estudadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

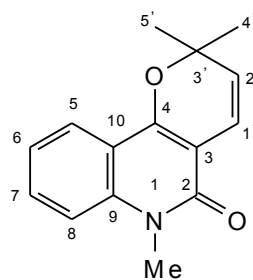
5.1. Substâncias isoladas e identificadas da espécie *Rauia nodosa*.

O estudo fitoquímico do extrato em hexano e em metanol dos galhos da espécie *Rauia nodosa* permitiu o isolamento e a identificação de 10 substâncias: 6 esteroides, 3 alcaloides e 1 cumarina. Foram isoladas as substâncias: vepressina (**RN-01**), *N*-metilfindersina (**RN-02**), zantobungeanina (**RN-03**), *O*-geranilostenol (**RN-04**), β -sitosterol (**RN-05**), estigmasterol (**RN-06**), sitostenona (**RN-07**), estigmastenona (**RN-08**), peróxido de ergosterol (**RN-09**) e rauianodoxi (**RN-10**). Sendo as substâncias *O*-geranilostenol (**RN-04**), *N*-metilfindersina (**RN-03**) e peróxido de ergosterol (**RN-09**) inéditas no gênero *Rauia* e o esteroide rauianodoxi (**RN-10**) inédito na literatura.

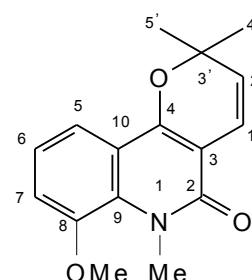
5.1.1. Alcaloides isolados de *R. nodosa*.



RN-01

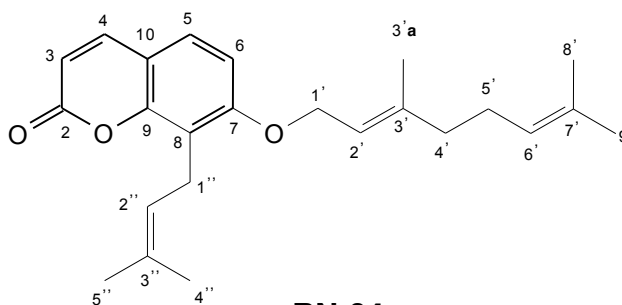


RN-02

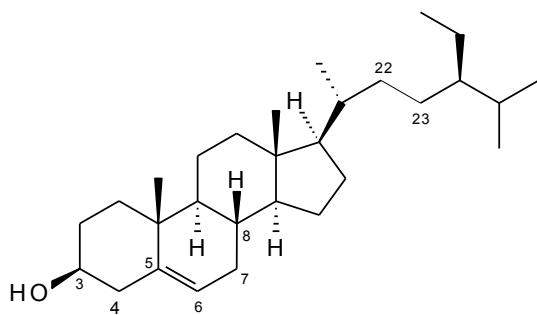


RN-03

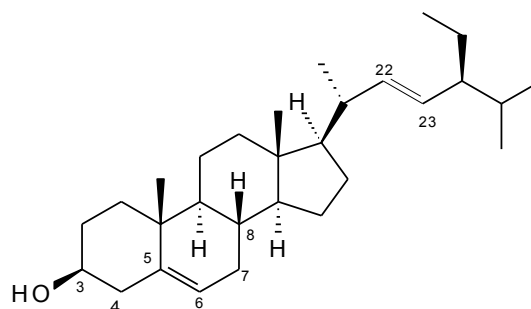
5.1.2. Cumarina isolada de *R. nodosa*.



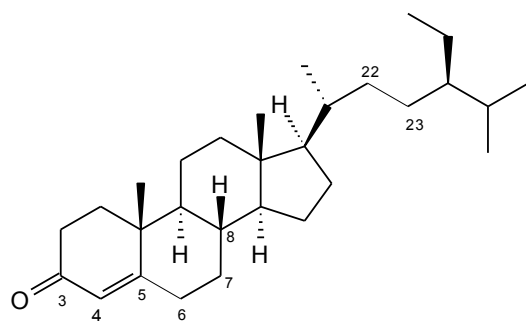
RN-04

5.1.3. Esteroides aislados de *R. nodosa*.

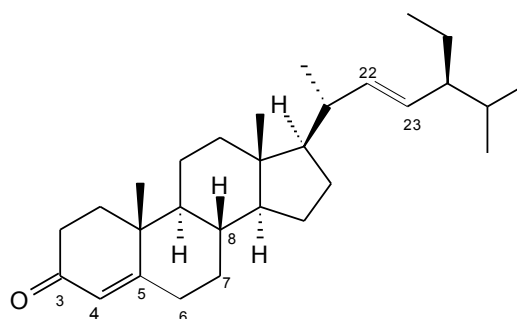
RN-05



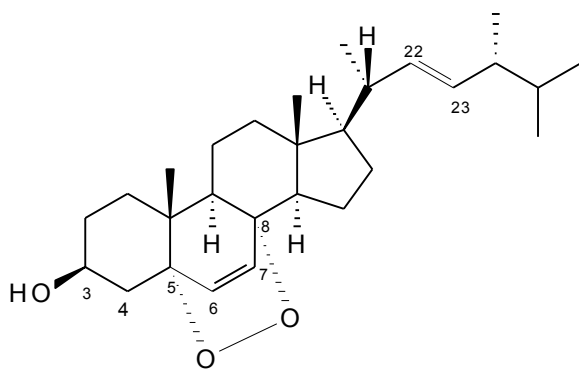
RN-06



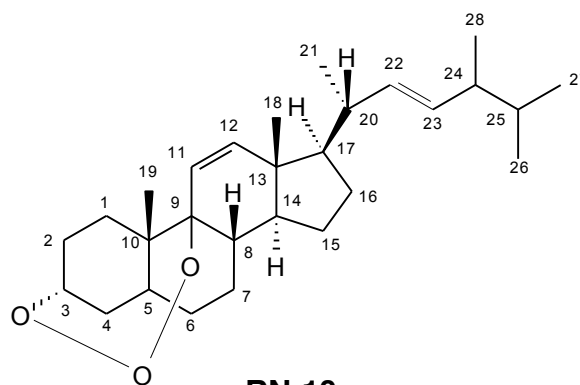
RN-07



RN-08



RN-09



RN-10

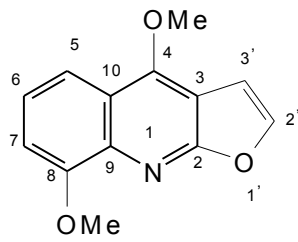
Esteroides rauianodoxi
(RN-10) inédito na literatura.

5.2. Substâncias isoladas e identificadas da espécie *Spiranthera atlantica*.

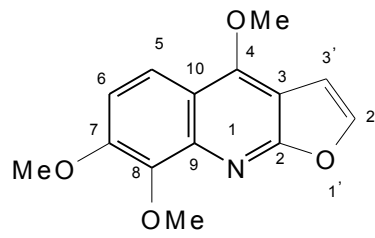
O estudo fitoquímico do extrato em metanol dos galhos da espécie *Spiranthera atlantica* permitiu o isolamento e a identificação de 9 substâncias: 1 triterpeno e 8 alcaloides. Foram isoladas as substâncias: γ -fagarina (**SA-01**), esquimianina (**SA-02**), 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina (**SA-03**), 8-metoxiflindersina (**SA-04**), 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (**SA-05**), 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**), 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**) e atlanticol (**SA-08**) e o lupeol (**SA-09**). Sendo os alcaloides 8-metoxiflindersina (**SA-04**) e 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) inéditos no gênero *Spiranthera*.

Além disso, foi possível isolar o alcaloide 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (**SA-05**) obtido pela primeira vez como produto natural e os alcaloides, 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina (**SA-03**) e atlanticol (**SA-08**), inéditos na literatura.

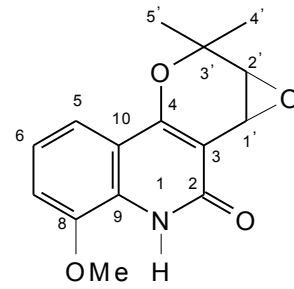
5.2.1. Alcaloides isolados de *S. atlantica*.



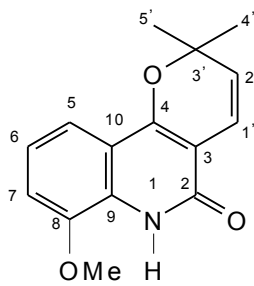
SA-01



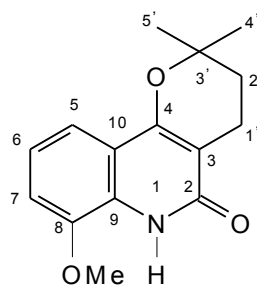
SA-02



SA-03

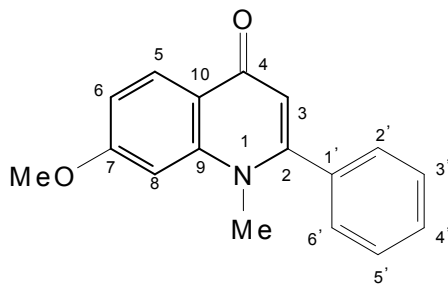


SA-04

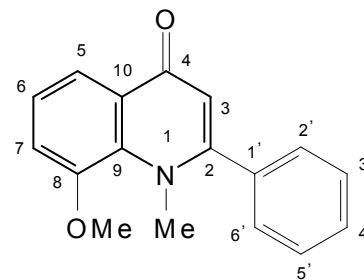


SA-05

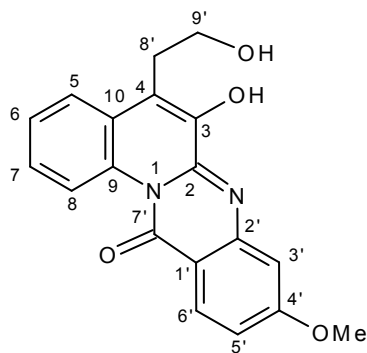
Alcaloide 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina (**SA-03**) inédito na literatura.



SA-06



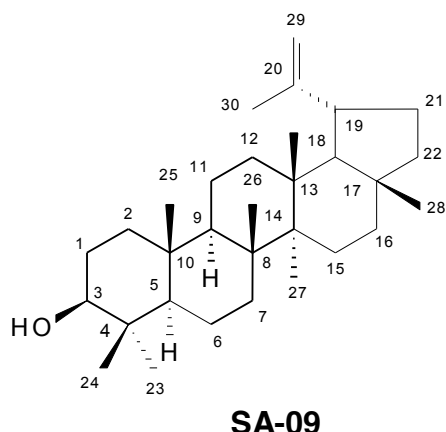
SA-07



SA-08

Alcaloide atlântico (**SA-08**) inédito na literatura.

5.2.2. Triterpeno isolado de *S. atlantica*.



5.3. Determinação estrutural das substâncias isoladas.

5.3.1. Alcaloides

A família Rutaceae é notoriamente conhecida por apresentar um grande número de alcaloides com diversas estruturas. Os alcaloides desta família podem ser derivados do ácido antranílico, triptofano, fenilalanina e/ou tirosina, histidina, ácido nicotínico, ornitina e lisina (WATERMAN e GRUDON, 1983).

Porém os alcaloides derivados do ácido antranílico são considerados marcadores quimiotaxômicos da família Rutaceae, pois não são encontrados em outras famílias pertencentes a ordem Rurales (WATERMAN, 1999). Este grupo de alcaloides é dividido em três tipos: quinazolínicos, quinolínicos e acridônicos (DEWICK, 2002). As rotas biosintéticas dos alcaloides furoquinolínicos, piranoquinolínicos e 2-alquilquinolinos estão descritas nas Figuras 40 e 41.

Este estudo resultou no isolamento de onze alcaloides derivados do ácido antranílico, sendo dois alcaloides furoquinolínicos: γ -fagarina (**SA-01**) e esquimianina (**SA-02**); seis alcaloides piranoquinolínicos angulares: veprissina (**RN-01**), *N*-metilflindersina (**RN-02**), zantobugeanina (**RN-03**), 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina (**SA-03**), 8-metoxiflindersina (**SA-04**) e 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (**SA-05**); dois alcaloides 2-fenilquinolinos: 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) e 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**); e um alcaloide quinazolínico: atlanticol (**SA-08**), inédito na literatura.

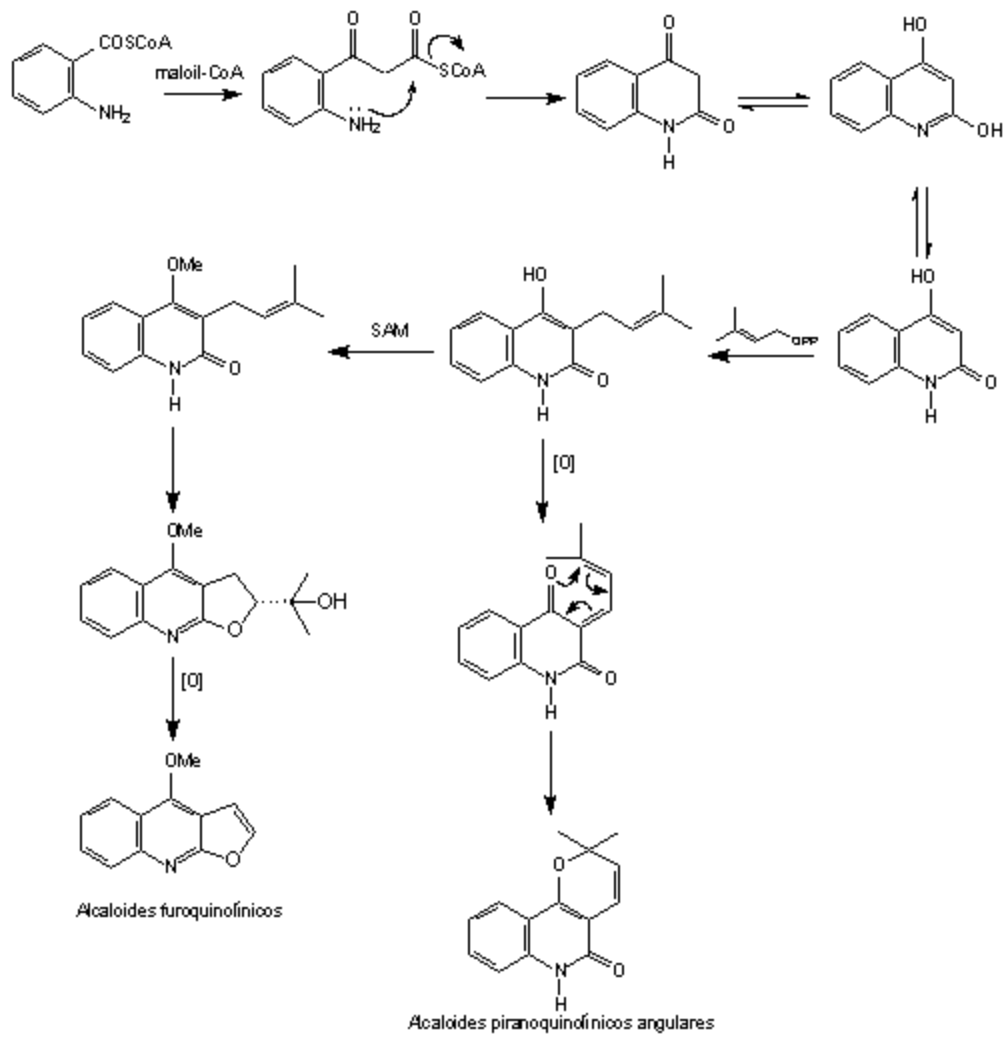


Figura 40. Proposta de biossíntese para alguns tipos de alcaloides furoquinolínicos e piranoquinolínicos angulares, ambos derivados do ácido antranílico (DEWICK, 2002; PASSADOR, 1995).

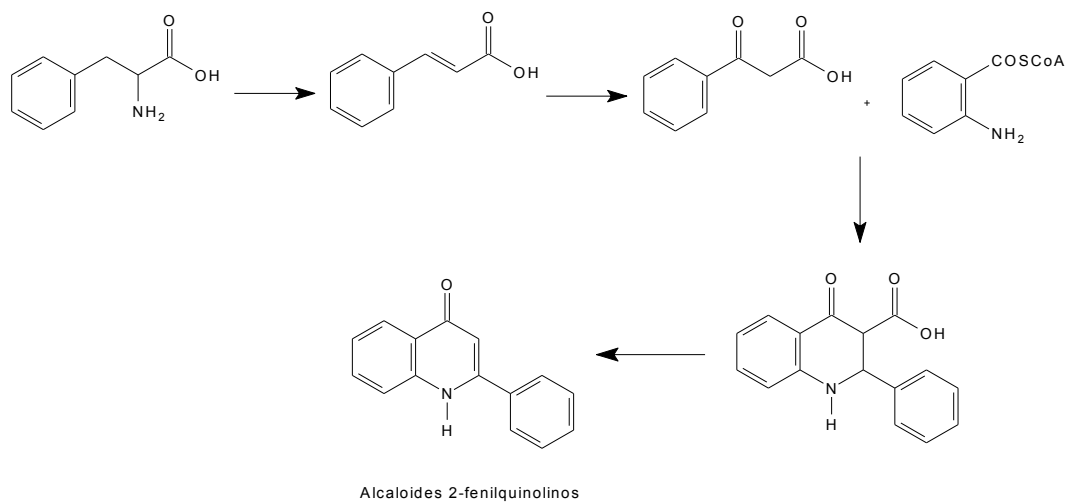
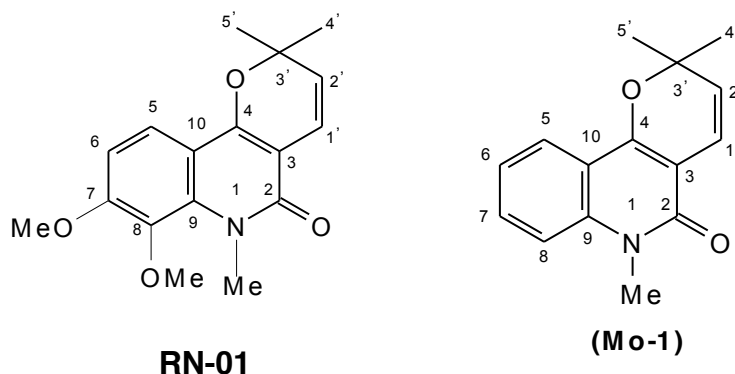


Figura 41. Proposta de biossíntese para os alcaloides 2-fenilquinolinos, derivados do ácido antranílico (BLASCHKE-COBET e LUCKNER, 1973).

5.3.1.1. Alcaloides isolados da espécie *Rauia nodosa*.

5.3.1.1.1. Determinação estrutural da substância RN-01.



A substância **RN-01** foi isolada do extrato em hexano da espécie *Rauia nodosa*, na forma de um óleo incolor, e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C (DEPT-Q) para a substância **RN-01** (Figura 42) permitiu reconhecer a presença de 17 átomos de carbono, sendo cinco carbonos metílicos (três deles ligados a heteroátomo), quatro carbonos metínicos (sp^2) e oito carbonos quaternários (um sp^3 e sete sp^2 , dos quais um carbonílico) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et al., 2010).

Os valores de deslocamento dos átomos de carbono confirmam claramente a presença do carbono carbonílico C-2 em δ_{C} 162,6 ppm, e dois carbonos aromáticos C-7 e C-8 ligados a grupos metoxila, respectivamente em δ_{C} 155,6 ppm e 136,0 ppm.

Também foi possível observar o deslocamento característico do átomo de carbono C-4 em δ_{C} 155,1 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Os sinais referentes aos carbonos metílicos MeO-7, MeO-8 e Me-N também foram observados em δ_{C} 56,3, 61,7 e 33,6 ppm, respectivamente. Já os átomos de carbono metílicos CH_3 -4' e CH_3 -5' apresentaram deslocamento próximos a δ_{C} 28 ppm (Tabela 18).

O espectro de RMN ^1H para a substância **RN-01** (Figuras 43 e 44) apresentou na região aromática dois dupletos em δ_{H} 7,73 ppm e 6,90 ppm (1H, $J = 8,9$ Hz), que acoplam entre si, confirmado através da análise do mapa de correlação

homonuclear ^1H - ^1H -COSY) (Figura 56). Estes sinais foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-5 e H-6, devido as correlações observadas entre os respectivos dupletos e os sinais de átomos de carbonos metínicos em 119,0 ppm (CH-5) e 107,2 ppm (CH-6), no mapa de correlação heteronuclear a uma ligação (J_{CH}), HSQC (Figura 45).

Foram observadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 46), as correlações a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos, C-7 (δ_{C} 155,6)/H-5(δ_{H} 6,73), C-9 (δ_{C} 134,63)/H-5 (δ_{H} 6,73), C-8 (δ_{C} 136,0)/H-6 (δ_{H} 6,90) e C-10 (δ_{C} 112,13)/ H-6 (δ_{H} 6,90), sendo todos átomos de carbono quaternários. Assim sugerindo a presença de um anel aromático tetrasubstituído.

Também foi possível observar no espectro de RMN ^1H a presença de dois dupletos em δ_{H} 6,75 ppm (1H, $J = 9,9$ Hz) e 5,51 ppm (1H, $J = 9,9$ Hz) e um singlete em δ_{H} 1,52 ppm (6H). No mapa de correlação heteronuclear HSQC foram observadas as correlações entre estes dupletos e os átomos de carbono olefínicos, CH-1' (δ_{C} 118,0)/H-1'(δ_{H} 6,75) e CH-2' (δ_{C} 125,6)/H-2'(δ_{H} 5,51), e entre o singlete e os átomos de carbono metílicos CH₃-4'/CH₃-5'(δ_{C} 28,0)/3H-4'/3H-5'(δ_{H} 1,52).

No mapa de correlação heteronuclear HMBC apresentou as correlações a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos C-4(δ_{C} 155,1)/ H-1'(δ_{H} 6,75), C-3'(δ_{C} 78,7)/1H-1'(δ_{H} 6,75) e C-3(δ_{C} 104,0)/ H-2'(δ_{H} 5,51) e a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre os átomos C-3'(δ_{C} 78,7)/3H-4'/3H-5'(δ_{H} 1,52). As correlações observadas são compatíveis com a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno.

No espectro de RMN ^1H observou-se a presença de dois singletos referentes a dois grupos metoxila em δ_{H} 3,99 ppm (3H, MeO-7) e 3,80 ppm (3H, MeO-8) e tiveram suas posições confirmadas com as correlações a uma ligação (J_{HC}), MeO-7 (δ_{C} 56,3)/3H-MeO-7(δ_{H} 3,99) e MeO-8 (δ_{C} 61,7)/3H-MeO-8(δ_{H} 3,80) e a três ligações ($^2J_{\text{HC}}$), C-7 (δ_{C} 155,6)/3H-MeO-7(δ_{H} 3,99) e C-8 (δ_{C} 136,0)/3H-MeO-8(δ_{H} 3,80).

O singlete em δ_{H} 3,96 ppm (3H) foi atribuído a metila Me-N devido a correlação com átomo de carbono carbonílico C-2 em δ_{C} 162,6 ppm . Esses dados sugerem uma estrutura de um alcaloide piranoquinolínico angular com duas metoxilas.

Os dados descritos acima em conjunto com os dados obtidos do espectro de massas (CG/EM) (Figura 49 e Esquema 1), o qual apresentou o pico do íon

molecular ($[M^+]$) com $m/z= 301$ Dalton, permitiram propor a fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_4$ para a substância **RN-01**.

Após comparação com os dados encontrados na literatura conclui-se que a substância **RN-01** corresponde ao alcaloide vepressina, isolado também na espécie *Rauia resinosa* (ALBARACI et al., 2010).

Tabela 18. Dados de RMN 1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **RN-01** (vepressina), em $CDCl_3$, em comparação com os dados da literatura da substância *N*-metilflindersina (**Mo-1**) (ISIDORO et. al., 2012). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C
C					
2	162,6	-		H-1'; MeN	161,0
3	104,0	-		H-2'	106,2
4	155,1	-		H-1'; H-5	155,0
7	155,6	-	H-6	H-5; MeO-7	-
8	136,0	-		H-6; MeO-8	-
9	134,6	-		H-5	139,5
10	112,1	-		H-6	116,2
3'	78,7	-	H-2; 3H-4'/3H-5'	H-1'	78,8
CH					
5	119,1	7,73 (d, 8,9)			123,0
6	107,2	6,90 (d, 8,9)			122,0
7	-	-			131,0
8	-	-			114,0
1'	118,0	6,75 (d,9,9)			117,9
2'	125,6	5,51 (d, 9,9)		3H-4'/3H-5'	125,5
CH₃					
MeO-7	56,3	3,99 (s)			-
MeO-8	61,7	3,80 (s)			-
Me-N	33,6	3,96 (s)			28,0
4'/5'	28,0	1,52 (s)		H-2'	29,2

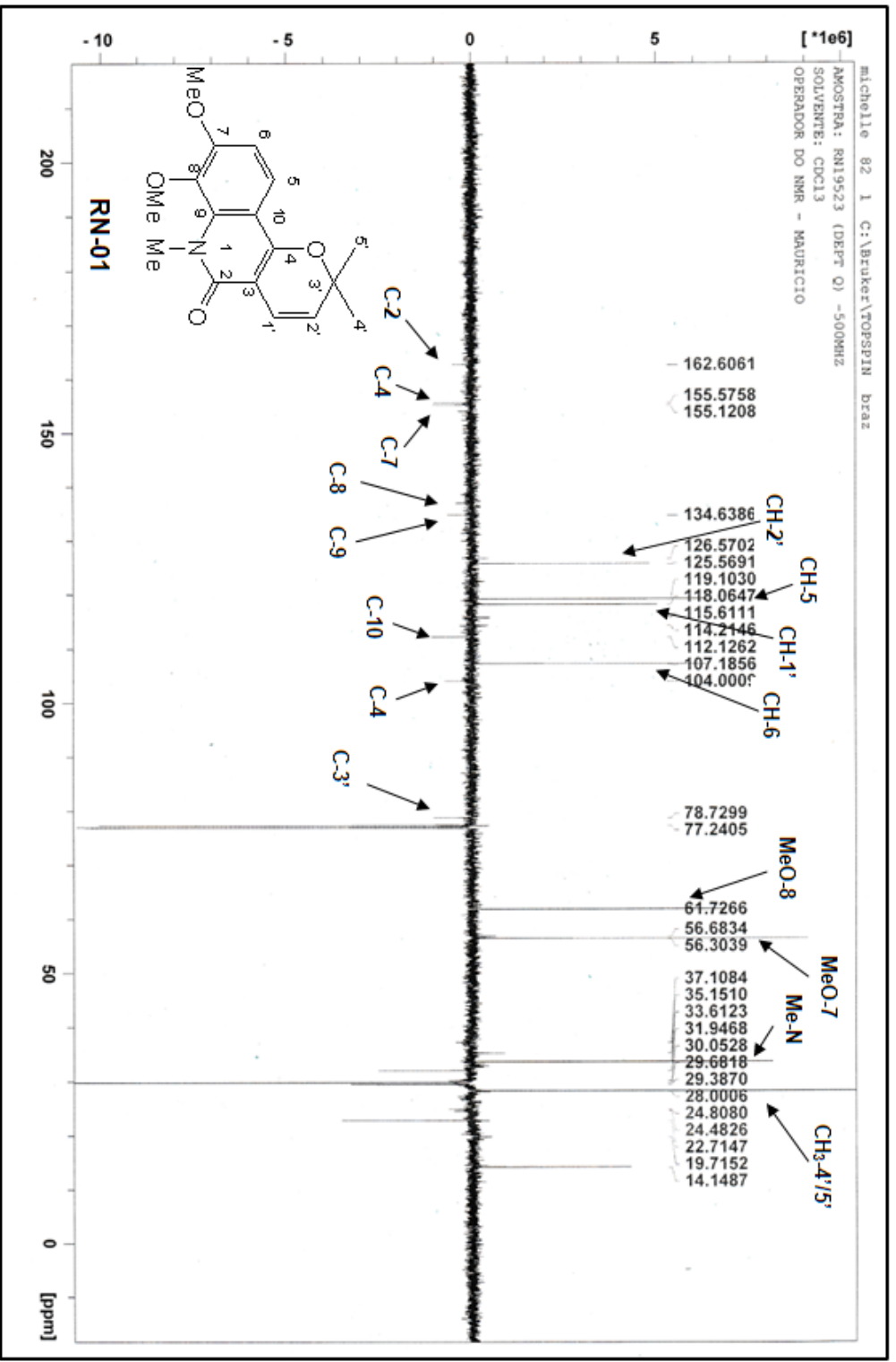


Figura 42. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).

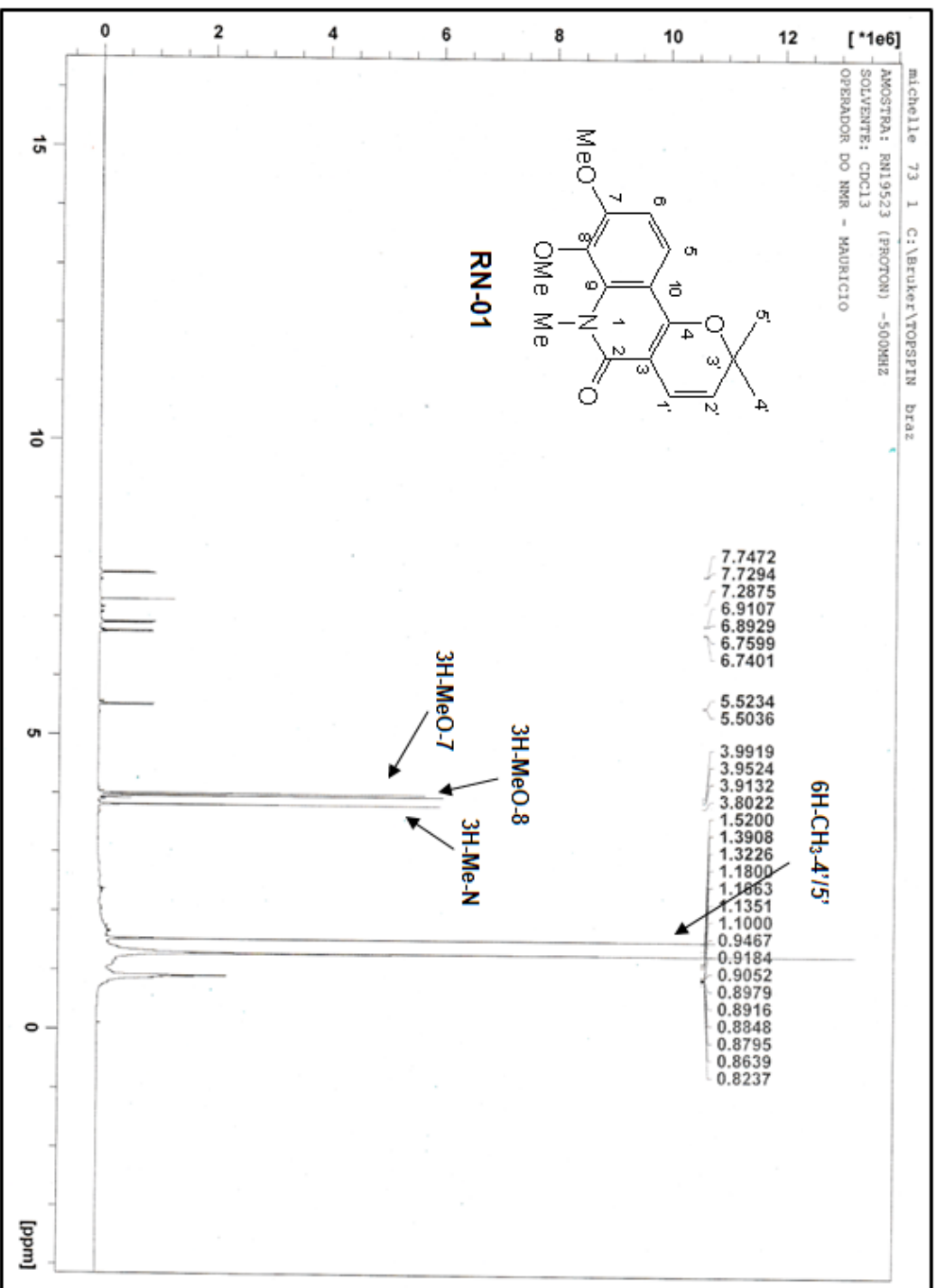


Figura 43. Espectro de RMN ¹H (500 MHz; CDCl₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).

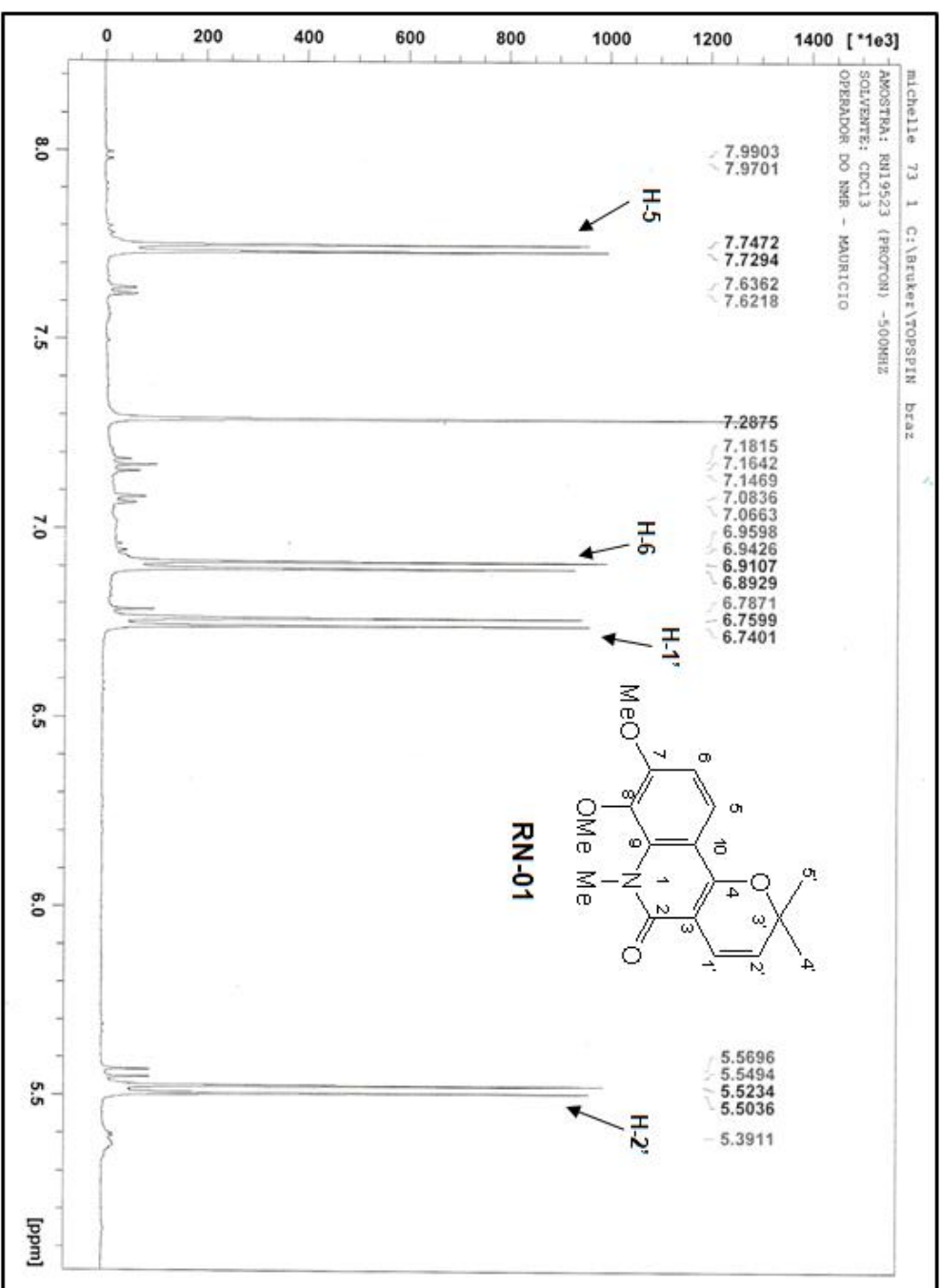


Figura 44. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância RN-01 (vepressina) (região de 5,0 a 8,2 ppm).

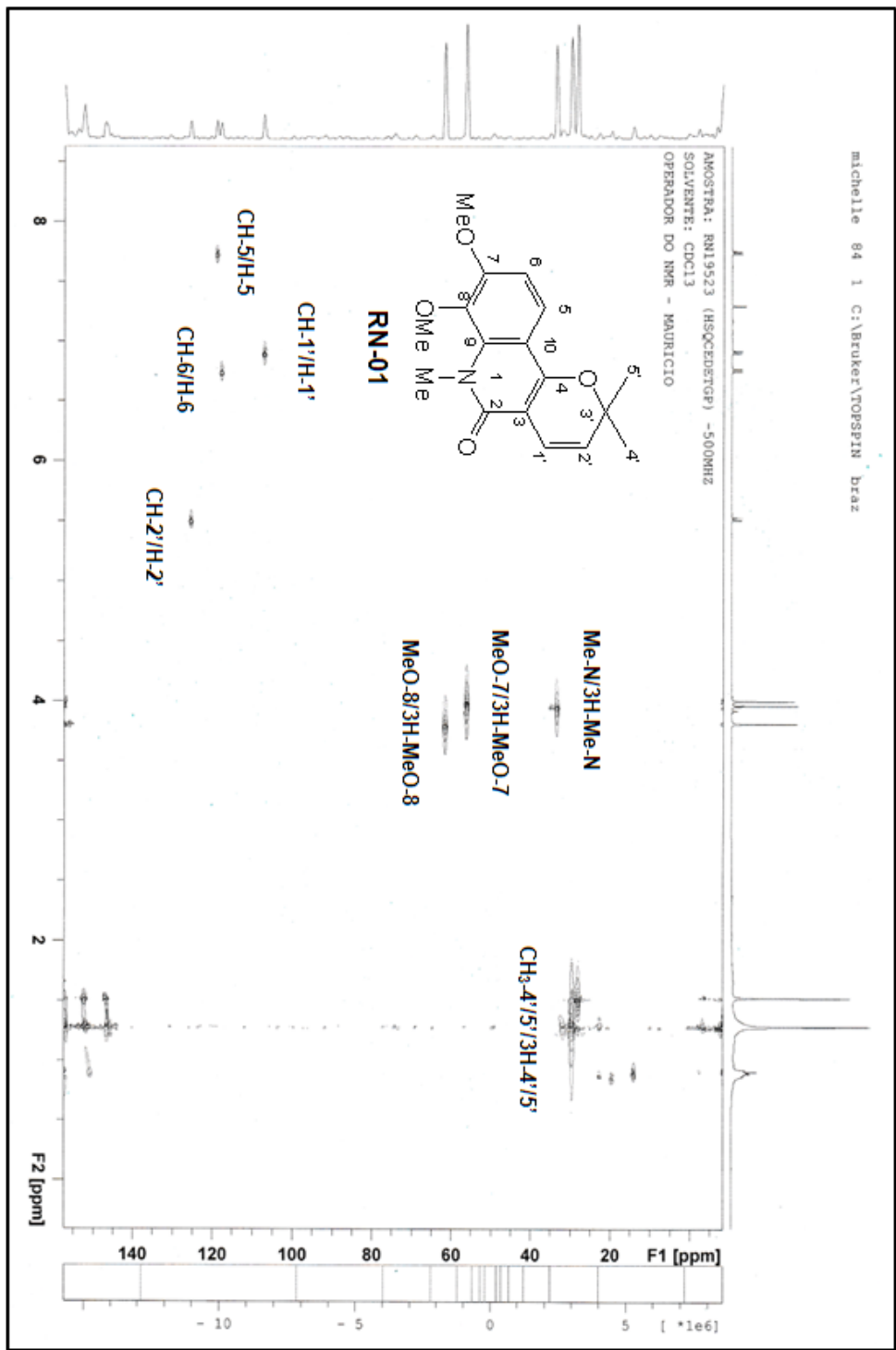


Figura 45. Espectro de HSQC (CDCl₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).

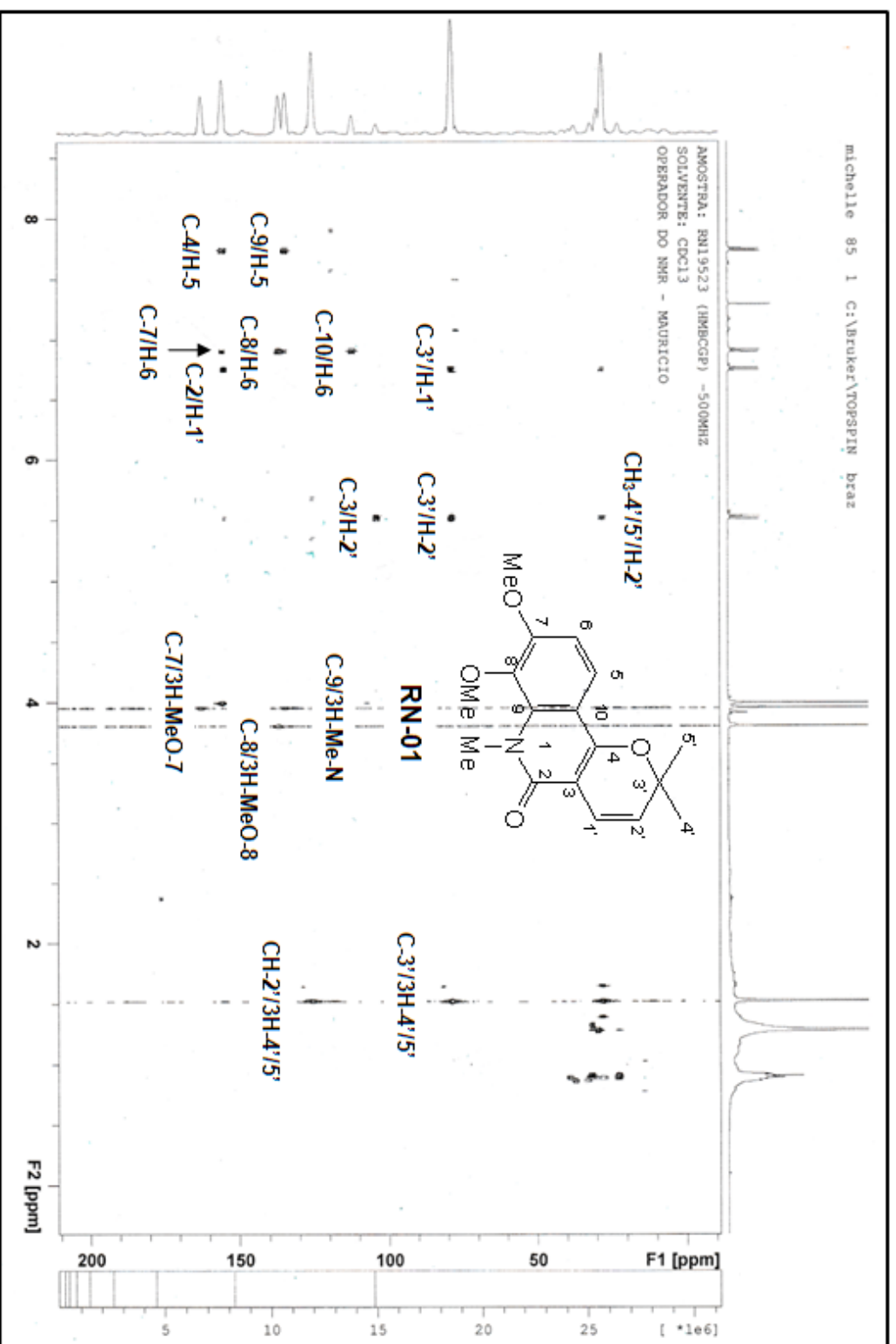


Figura 46. Espectro de HMBC (CDCl₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina).

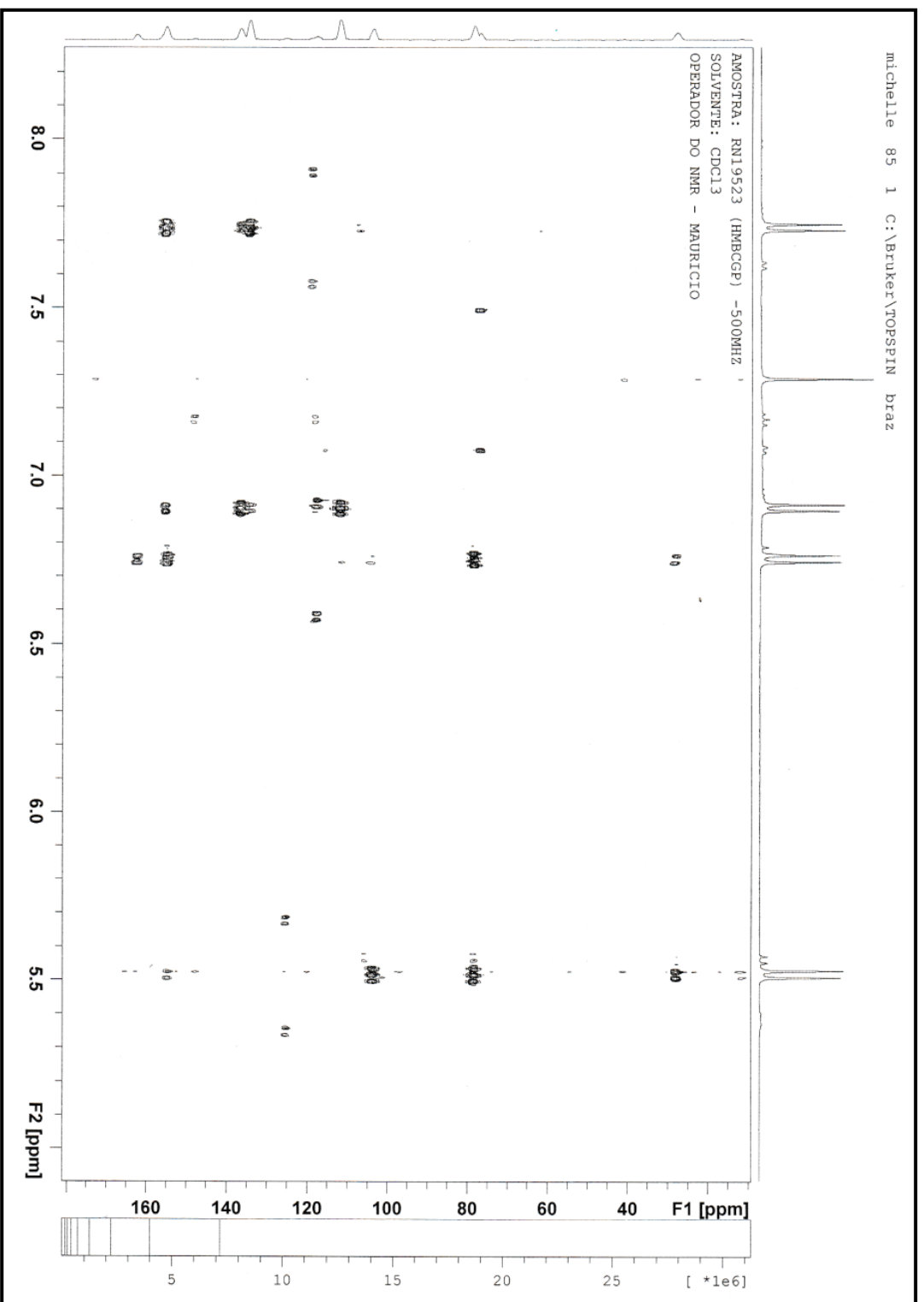


Figura 47. Ampliação do espectro de HMBC (CDCl₃) obtido para a substância RN-01 (vepressina) (região de 20 a 180 ppm).

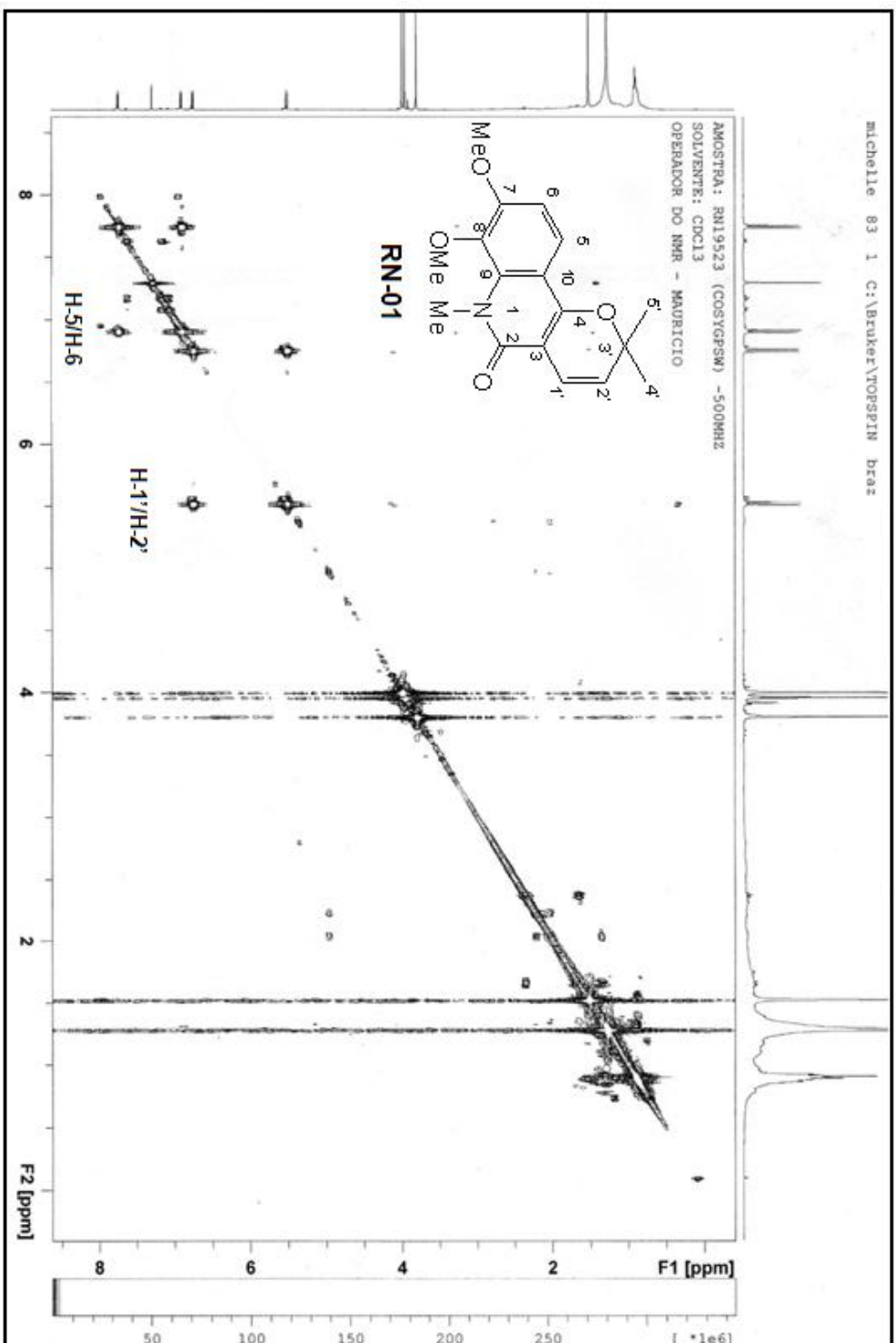


Figura 48. Espectro de H^1 - H^1 -COSY ($CDCl_3$) obtido para a substância RN-01 (vepressina).

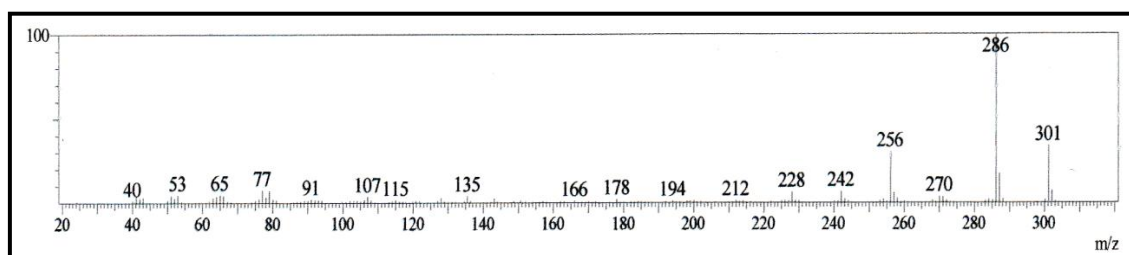
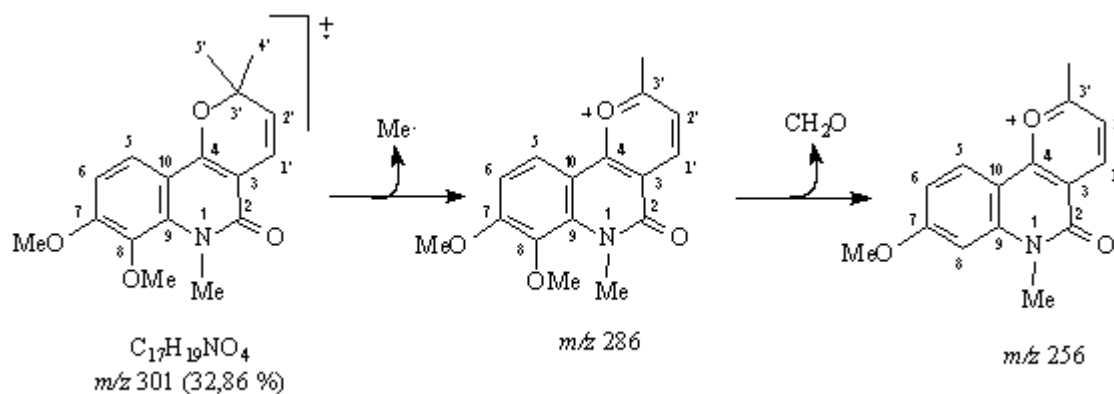
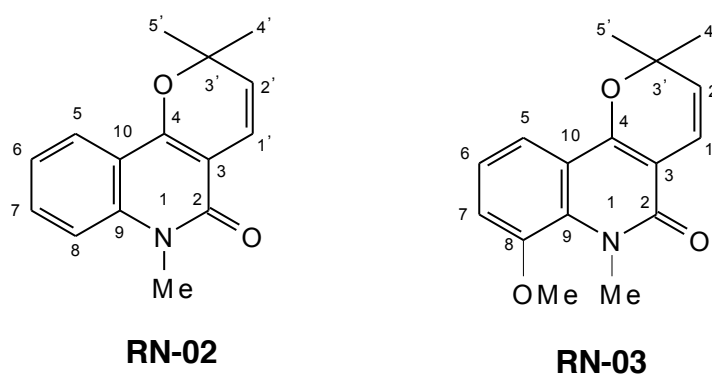


Figura 49. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância RN-01 (vepressina).



Esquema 1. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **RN-01** (vepressina).

5.3.1.1.2. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias RN-02 e RN-03



As substâncias **RN-02** e **RN-03** foram obtidas na forma de mistura, do extrato em hexano da espécie *Rauia nodosa*, com o aspecto de um óleo amarelo e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

A mistura de alcaloides foi elucidada principalmente pela análise por CG-EM, que apresenta grande sensibilidade. O espectro de massas registrou os íons moleculares ($[M^+]$) em m/z 241 (75%) e 271 (10%) (Figuras 56 e 57). Os valores de m/z observados são muito próximos do valor de m/z 301 encontrado para a substância **RN-01** descrita anteriormente, identificada como o alcaloide vepressina.

Assim esses dados sugeriram a presença dos alcaloides *N*-metilflindersina (**RN-02**) (m/z 241) (Esquema 2) com fórmula molecular $C_{15}H_{15}NO_2$ e zantobungeanina (**RN-03**) (m/z 271) (Esquema 3) com fórmula molecular $C_{16}H_{17}NO_3$ na mistura isolada.

Estes alcaloides diferem da substância **RN-01** (vepressina) apenas com relação à presença e número de metoxilas em suas estruturas.

A análise de espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) obtido para a mistura dessas substâncias (Figura 52) não foi muito útil para determinação estrutural, pois o espectro apresentou poucos sinais.

Os sinais dos carbonos quaternários não foram observados, provavelmente pela pequena massa da amostra, visto que o tempo de relaxação desses carbonos exigem maiores tempos de acumulação para que se tenha uma boa visualização (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

As atribuições dos sinais referentes aos átomos de carbono apresentados nas Tabelas 19 e 20 para ambas as substâncias presentes na mistura, foram realizadas através das correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares a uma ligação (J_{HC}) (HSQC) e a duas ($^2J_{HC}$) e três ligações ($^3J_{HC}$) (HMBC).

O espectro de RMN 1H obtido para a mistura destas substâncias (Figura 50) apresentou oito dupletos, três tripletos e cinco simpletos.

A análise do espectro de RMN 1H para a substância **RN-02** (*N*-metilflindersina) apresentou na região aromática um duplete em δ_H 8,00 ppm (1H, $J = 7,8$) atribuído ao átomo de hidrogênio H-5a e um triplete em δ_H 7,26 ppm (1H, $J = 7,8$) atribuído ao átomo de hidrogênio H-6a, indicando um acoplamento na posição orto. Também foi possível observar um triplete em δ_H 7,58 ppm (1H) e um duplete em δ_H 7,35 ppm (1H, $J = 8,4$) referentes aos átomos de hidrogênio H-7a e H-8a, indicando a presença de um anel benzênico 1,2-disubstituído (Tabela 19).

Estas atribuições foram realizadas através das correlações a uma ligação (J_{HC}) observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 53), entre os átomos CH-5a(δ_C 122,9)/H-5a(δ_H 8,00), CH-6a(δ_C 121,7)/H-6a(δ_H 7,26), CH-7a(δ_C 130,8)/H-7a(δ_H 7,58) e CH-8a(δ_C 113,7)/H-8a(δ_H 7,35).

Os sinais referentes aos átomos de hidrogênio H-1'a e H-2'a presentes no anel pirânico foram observados no espectro de RMN 1H , em δ_H 6,79 ppm (*d*, 1H, $J=9,9$) e δ_H 5,57 ppm (*d*, 1H, $J=9,9$), sendo confirmados pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-1'a(δ_C 117,5)/H-1a'(δ_H 6,79) e CH-2'a (δ_C 126,3)/H-2'a(δ_H 5,57). Ainda foram observados dois simpletos em δ_H 3,73 ppm (3H) e em δ_H 1,57 ppm (6H), devido à integração e ao deslocamento, o primeiro foi atribuído aos hidrogênios metílicos Me-Na e o segundo singleto as metilas CH3-4'a e CH3-5'a. Estes sinais são compatíveis com a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno na estrutura da substância **RN-02**.

Tabela 19. Dados de RMN 1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **RN-02**, em $CDCl_3$, em comparação com os dados da literatura para a substância *N*-metilflindersina (**Mo-1**) (ISIDORO et. al., 2012). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C
C					
2	-	-	-	-	161,0
3	-	-	-	-	106,2
4	-	-	-	-	155,0
9	-	-	-	-	139,5
10	-	-	-	-	116,2
3'	-	-	-	-	78,8
CH					
5	122,9	8,00 (<i>d</i> , 7,8)	-	-	123,0
6	121,7	7,26 (<i>t</i> , 7,8)	-	-	122,0
7	130,8	7,58 (<i>t</i>)	-	-	131,0
8	113,7	7,35 (<i>d</i> , 8,4)	-	-	114,0
1'	117,5	6,79 (<i>d</i> , 9,9)	-	-	117,9
2'	126,3	5,57 (<i>d</i> , 9,9)	-	-	125,5
CH₃					
Me-N	29,2	3,73 (<i>s</i>)	-	-	28,0
4''/5'	28,0	1,57 (<i>s</i>)	-	-	29,2

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 50 e 51) para a substância **RN-03** (zantobungeanina) apresentou também um duplete em δ_{H} 7,63 ppm (1H, $J = 7,8$) e um tripleto em δ_{H} 7,17 ppm (1H, $J = 7,8$) atribuídos aos átomos de hidrogênio H-5b e H-6b. Porém o átomo de hidrogênio H-7b desta substância, foi observado na forma de um duplete em δ_{H} 7,08 ppm (1H, $J = 7,8$) e não foi observado o duplete referente ao átomo de hidrogênio H-8b, sugerindo a presença de anel benzênico trissubstituído.

Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 53), entre os átomos CH-5b(δ_{C} 115,6)/H-5b(δ_{H} 7,63), CH-6b(δ_{C} 122,3)/H-6b(δ_{H} 7,17), CH-7b(δ_{C} 114,1)/H-7b(δ_{H} 7,58) (Tabela 20).

No espectro de RMN ^1H (Figura 50 e 51) também foi possível observar dois dupletos em δ_{H} 6,78 ppm (1H, $J = 9,9$) e δ_{H} 5,56 ppm (1H, $J = 9,9$) acoplando entre si, observados no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 55). Estes sinais foram atribuídos respectivamente aos átomos de hidrogênio olefínicos H-1'b e H-2'b em função das correlações entre os átomos CH-1'b(δ_{C} 117,8)/H-1'b(δ_{H} 6,78) e CH-2'b (δ_{C} 126,4)/H-2'b(δ_{H} 5,56), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC.

O duplete atribuído a H-1'b apresentou no mapa HMBC (Figura 54), a correlação a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) com o átomo de carbono C-2b em δ_{C} 160,9 ppm, confirmando a presença da carbonila na estrutura da substância **RN-03**.

Na região alifática do espectro de RMN ^1H (Figura 50 e 51) para a substância **RN-03** (zantobungeanina) foram observados três simpletos. O simpleto em δ_{H} 3,93 ppm (3H) apresentou uma correlação no mapa de correlação heteronuclear HSQC com o átomo de carbono em δ_{C} 56,3 ppm, sugerindo a presença de uma metoxila.

Os simpletos em 3,96 ppm (3H) e 1,53 ppm (6H) foram atribuídos respectivamente aos átomos de hidrogênio metílicos Me-Nb e CH₃-4'b/CH₃-5'b, devido a integração e as correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos Me-Nb(δ_{C} 35,0)/3H-Me-Nb(δ_{H} 3,96) e CH₃-4'/5b'(δ_{C} 28,0)/3H-4'b/3H-5'b(δ_{H} 1,53).

A análise do mapa correlação heteronuclear HMBC obtido para a substância **RN-03** apresentou ainda as correlações entre os átomos C-3b(δ_{C} 106,4)/ H-2'b(δ_{H} 5,56) e C-3'b(δ_{C} 78,50)/3H-5'(δ_{H} 1,53), desta forma confirmando a

presença do anel 2,2-dimetilcromeno também na estrutura da substância **RN-03** (Tabela 20).

Após a análise dos dados descritos acima e comparação com a literatura foi possível concluir que as substâncias **RN-02** e **RN-03** correspondem respectivamente aos alcaloides *N*-metilflindersina (RIBEIRO, 2006; ISIDORO, et. al., 2012) e zantobungeanina (CAMPBELL et. al., 1990; ALBARICI et. al., 2010). Vale ressaltar que o alcaloide *N*-metilflindersina foi isolado pela primeira vez no gênero *Rauia*.

Tabela 20. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **RN-03**, em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância zantobungeanina (**Mo-1**) (CAMPBELL et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J, entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	160,9	-	-	H-1'	162,0
3	106,4	-	-	H-2'	105,9
4	-	-	-	-	154,7
8	-	-	-	-	148,4
9	-	-	-	-	130,9
10	-	-	-	-	118,2
3'	78,5	-	H-2'; 3H-4'/3H-5'	H-1'	78,6
CH					
5	115,6	7,63 (d, 7,8)	-	-	115,5
6	122,3	7,17 (t, 7,8)	-	-	122,2
7	114,1	7,08 (d, 7,8)	-	-	114,1
1'	117,8	6,78 (d, 9,9)	-	-	117,9
2'	126,4	5,56 (d, 9,9)	-	3H-4'/3H-5'	126,5
CH₃					
MeO-8	56,3	3,93 (s)	-	-	56,6
Me-N	35,0	3,96 (s)	-	-	35,1
4''/5'	28,0	1,53 (s)	-	-	28,2

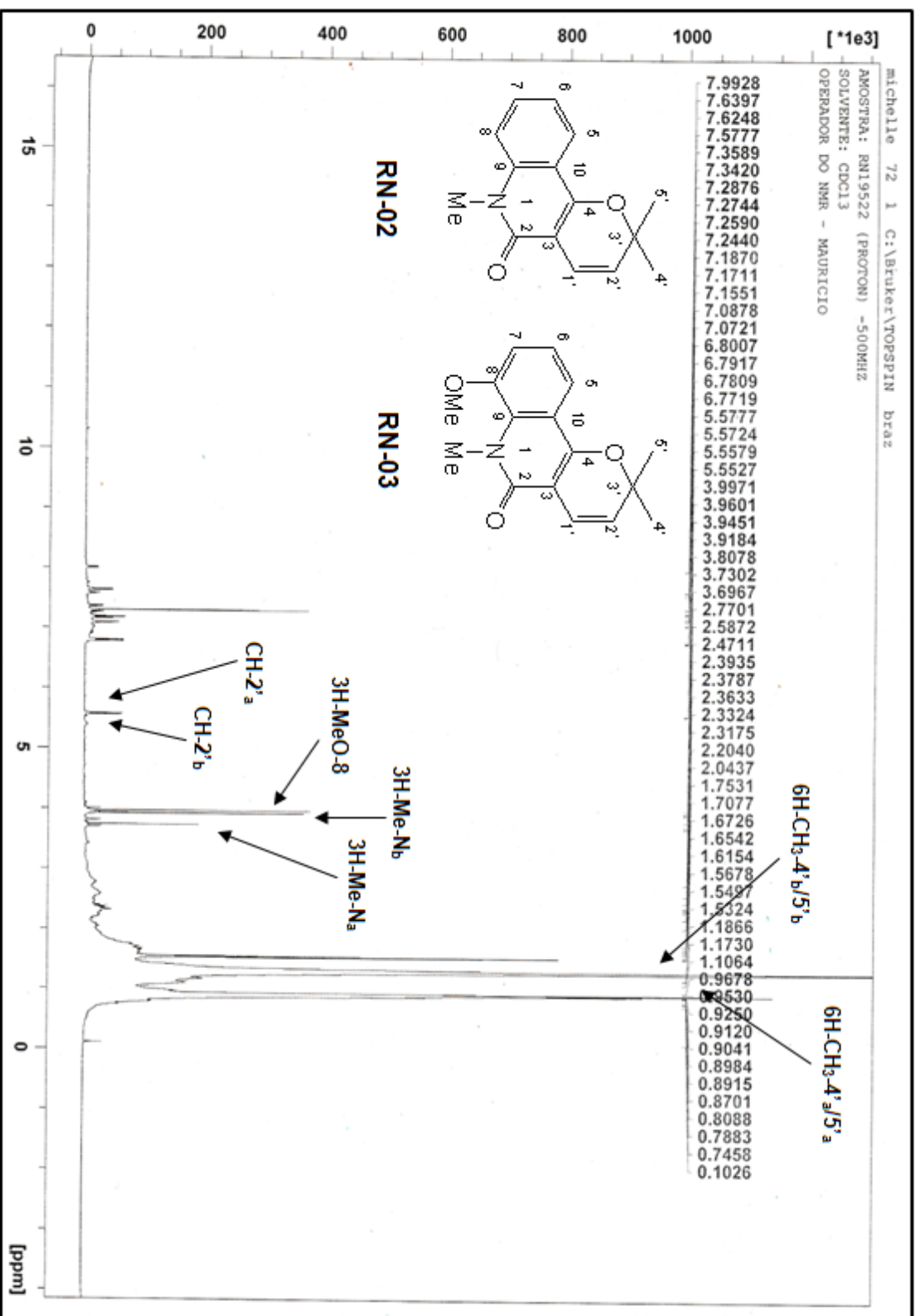


Figura 50. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para as substâncias RN-02 (N-metilfindersina) e RN-03 (zantobungeanina).

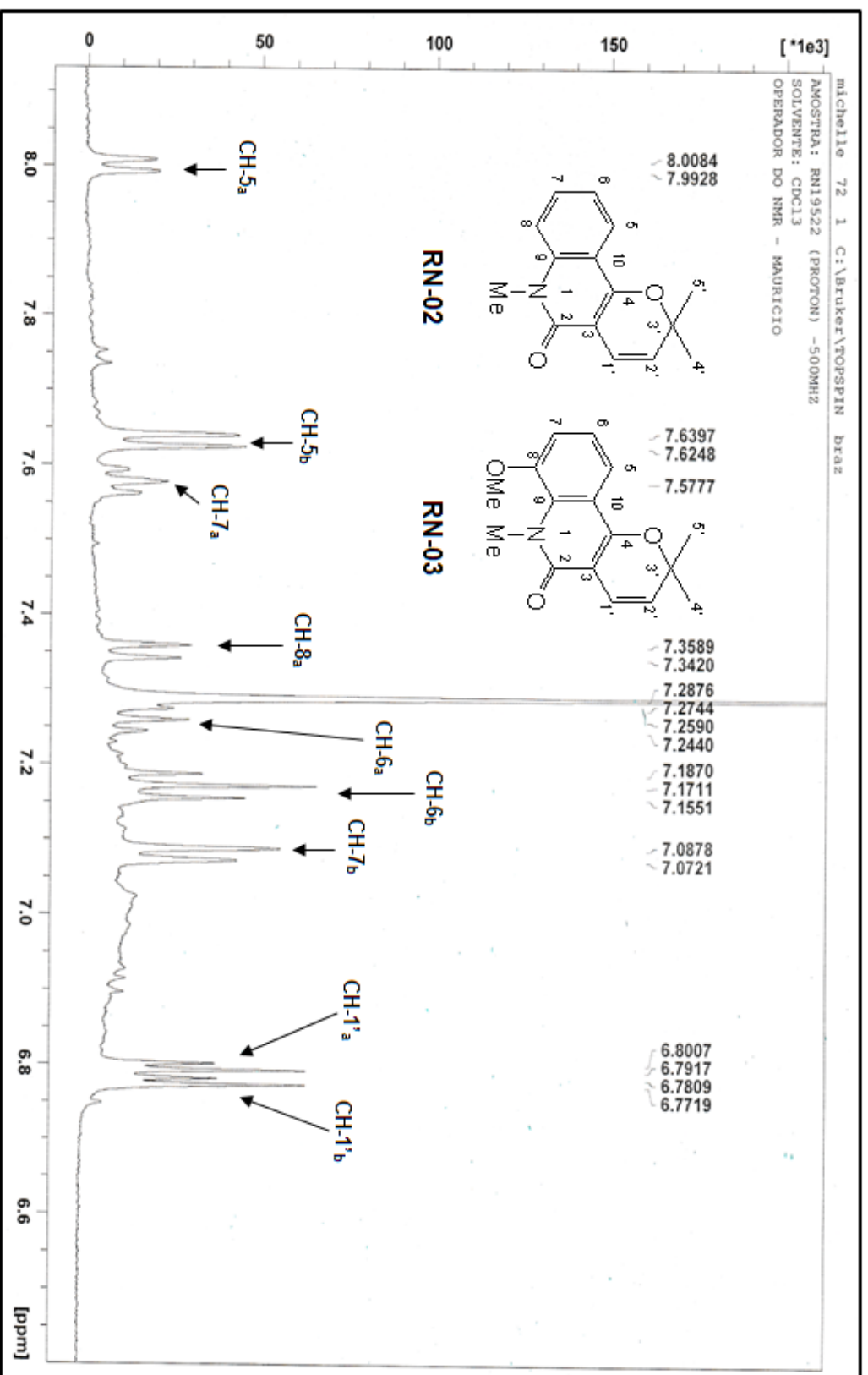


Figura 51. Ampliação de espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para as substâncias **RN-02** (N-metilflindersina) e **RN-03** (zantobungeanina) (região de 6,45 a 8,1 ppm).

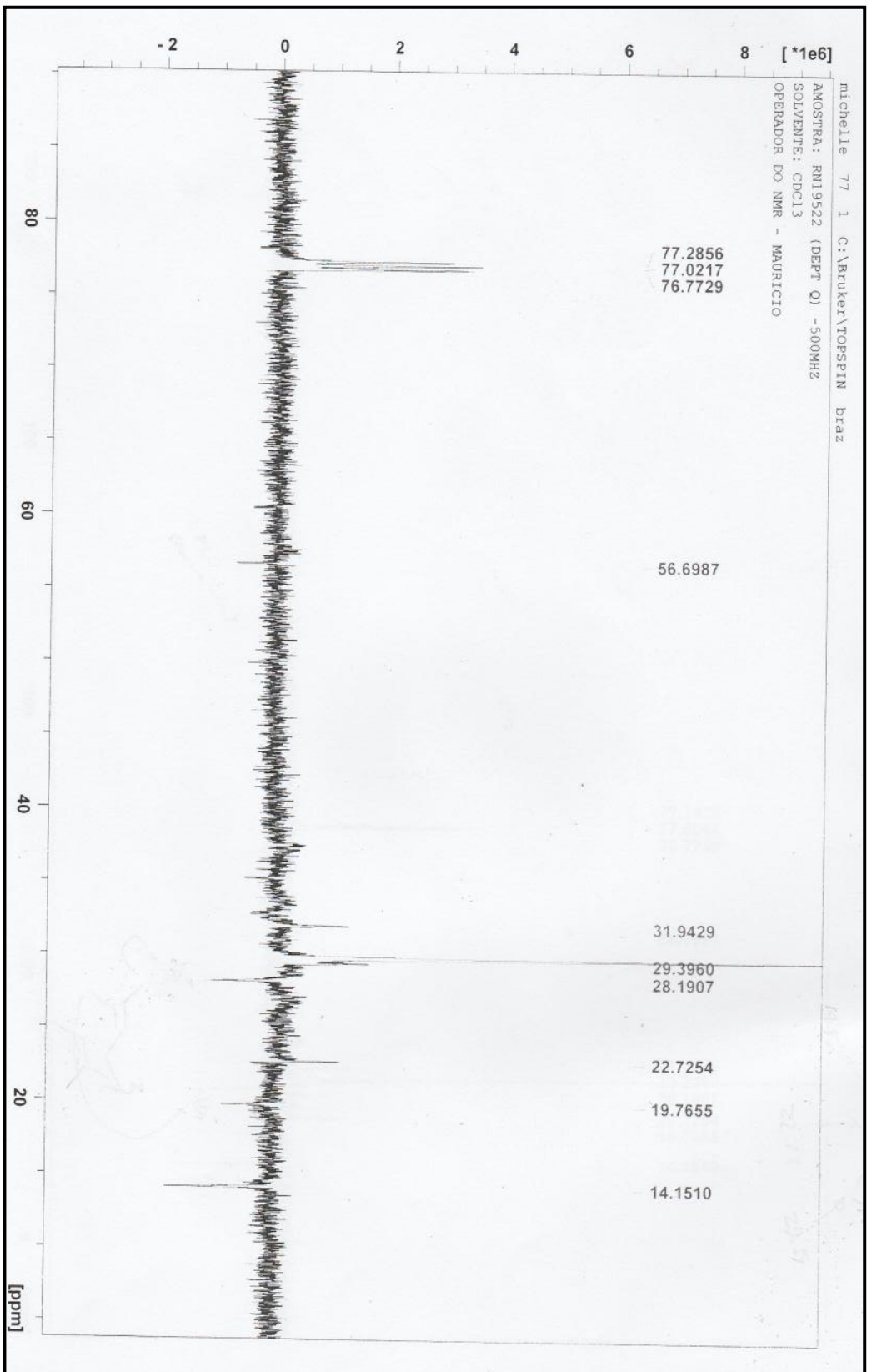


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) obtido para as substâncias **RN-02** (N-metilflindersina) e **RN-03** (zantobungeanina).

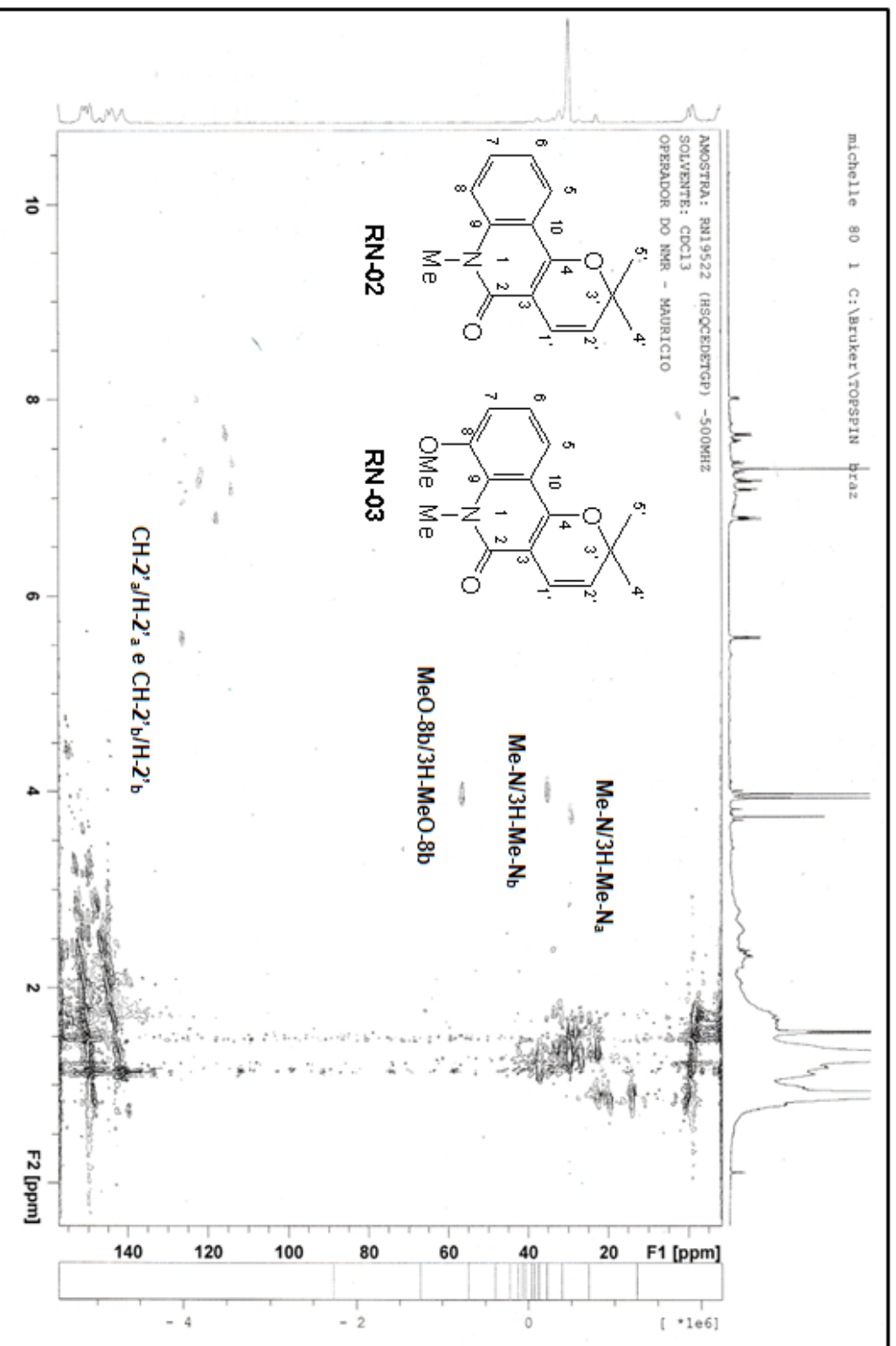


Figura 53. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para as substâncias **RN-02** (N-metilflindersina) e **RN-03** (zantobungeanina).

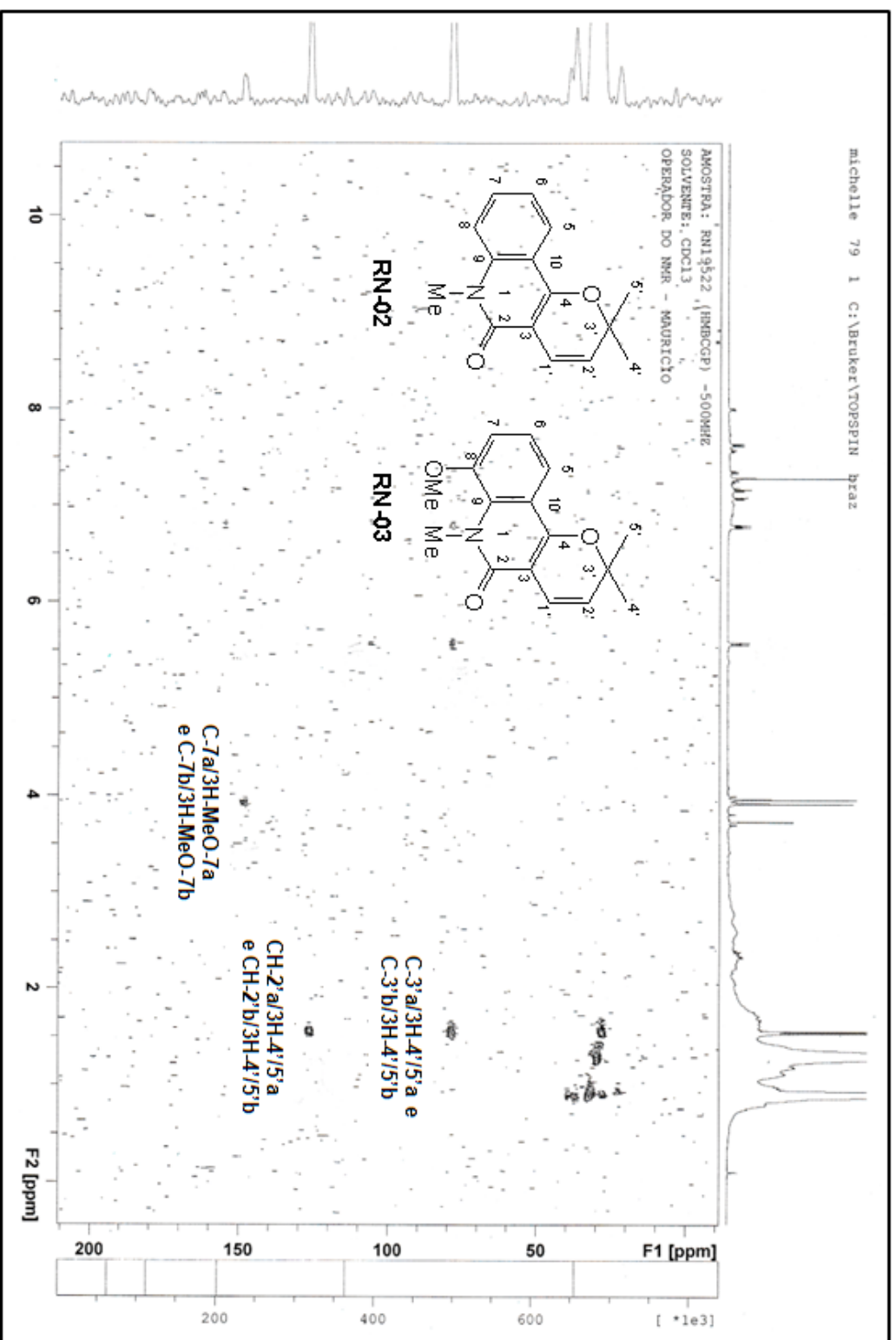


Figura 54. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para as substâncias **RN-02** (*N*-metilflindersina) e **RN-03** (zantobungeanina).

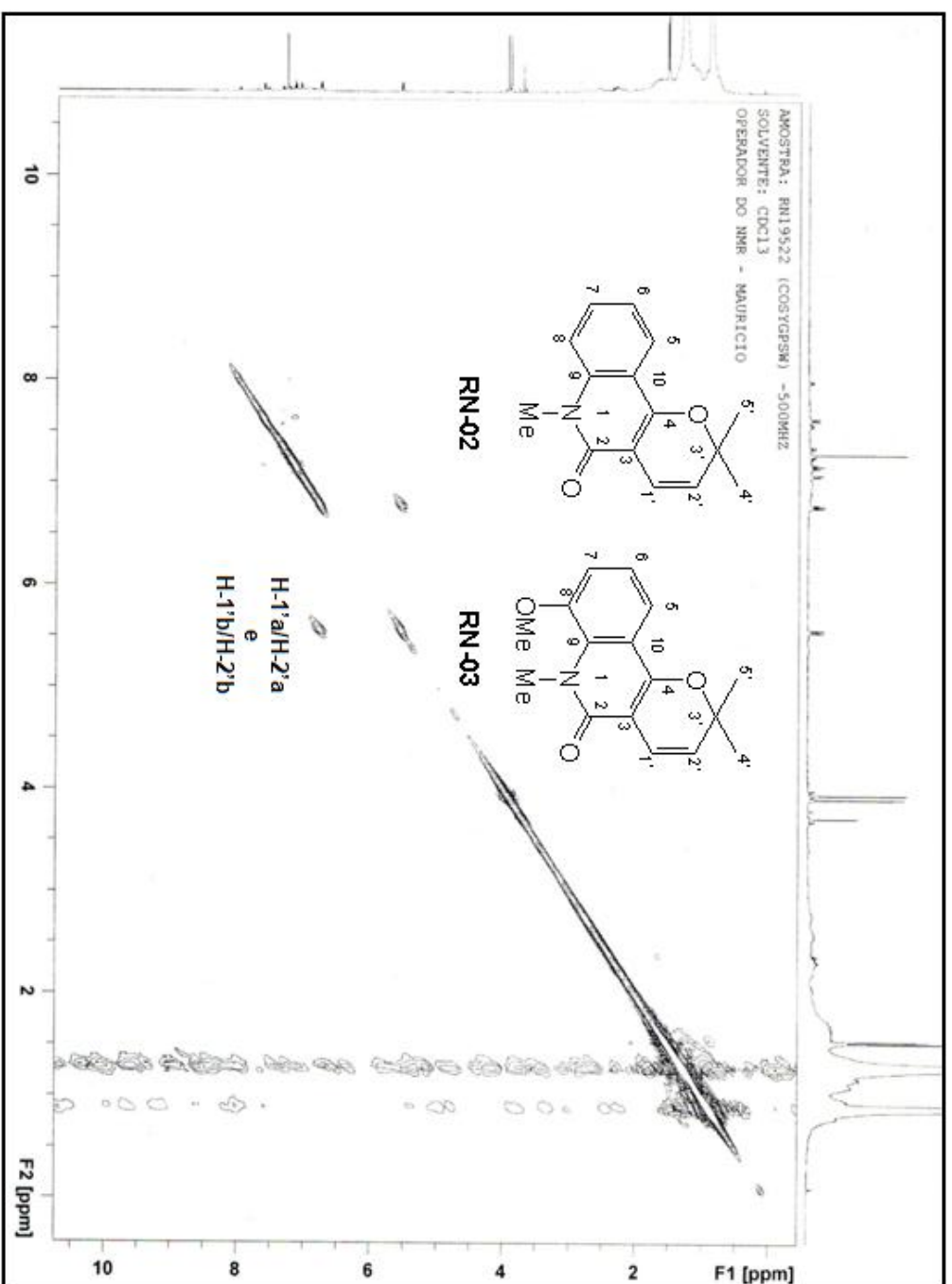


Figura 55. Espectro de H^1-H^1 -COSY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para as substâncias **RN-02** (N-metilflindersina) e **RN-03** (zantobungeanina).

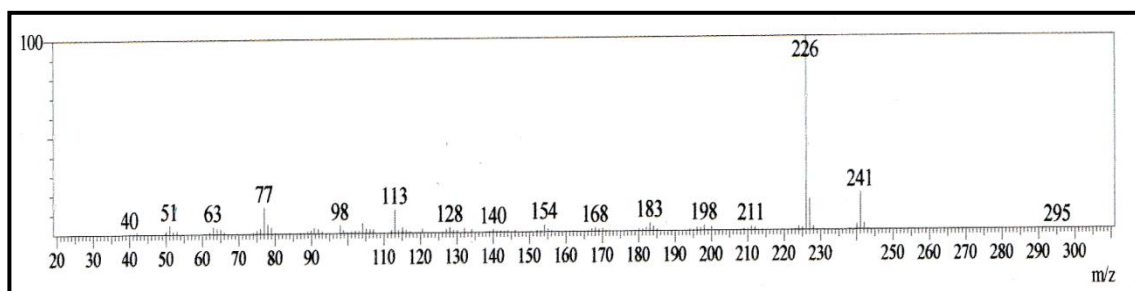
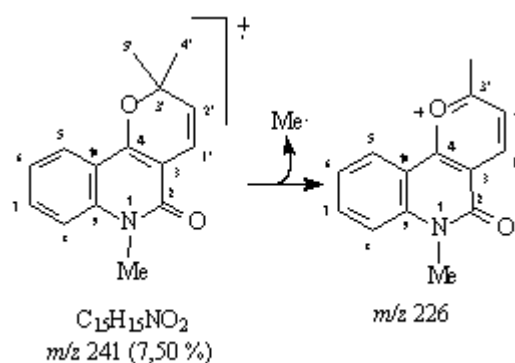


Figura 56. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **RN-02** (*N*-metilfindersina).



Esquema 2. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **RN-02** (*N*-metilfindersina).

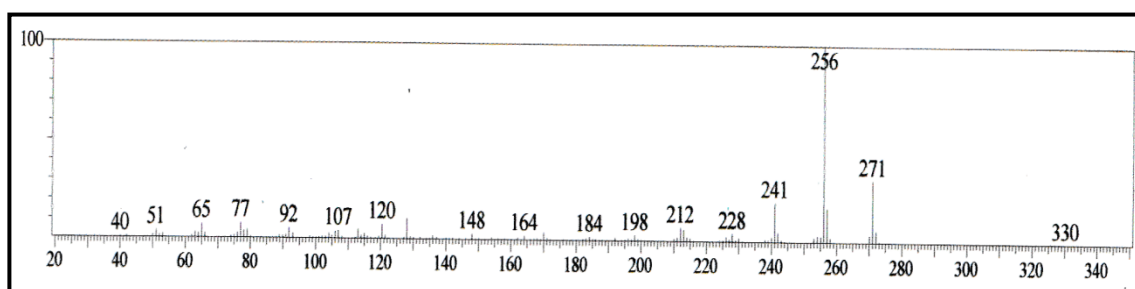
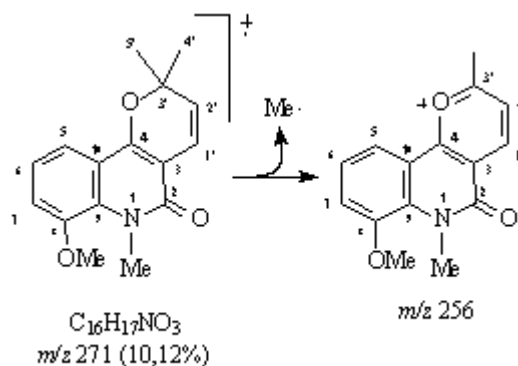


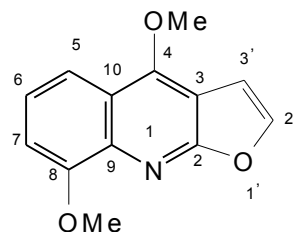
Figura 57. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **RN-03** (zantobungeanina).



Esquema 3. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **RN-03** (zantobungeanina).

5.3.1.2. Alcaloides isolados da espécie *Spiranthera atlantica*.

5.3.1.2.1. Determinação estrutural da substância SA-01.



SA-01

A substância **SA-01** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*, na forma de um óleo amarelo claro, e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) para a substância **SA-01** (Figura 58) permitiu reconhecer a presença de 13 átomos de carbono, sendo dois carbonos metílicos (referente a dois grupos metoxila), cinco carbonos metínicos (sp^2) e seis carbonos quaternários (sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Vale ressaltar, que o espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) não apresentou claramente todos os sinais correspondentes aos átomos de carbono, principalmente os carbonos quaternários. Porém todas as atribuições referentes aos átomos de carbono foram realizadas utilizando também as correlações observadas nos mapas de correlação heteronuclear a uma ligação (J_{HC}) HSQC (Figura 61) e a duas ($^2J_{\text{HC}}$) e três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) HMBC (Figura 62).

Os sinais referentes aos átomos de carbono C-4 e C-8 são observados respectivamente em δ_{C} 157,5 ppm e 155,1 ppm. Os átomos de carbono metoxílicos MeO-4 e MeO-8 foram observados em δ_{C} 59,0 ppm e 56,0 ppm. Os átomos de carbono do anel furano CH-2' e CH-3' apresentam os sinais em δ_{C} 143,9 ppm e 104,5 ppm (Tabela 21).

A análise do espectro de RMN ^1H obtido para a substância **SA-01** (Figuras 59 e 60) apresentou quatro dupletos e um duplodupletos na região aromática.

Os dois dupletos são referentes aos hidrogênios H-5 e H-7 do anel aromático, respectivamente em δ_{H} 7,88 ppm (1H, $J = 8,5$) e 7,09 ppm (1H, $J = 7,7$).

O H-5 apresentou o maior deslocamento devido a presença da metoxila na posição 4.

O átomo de hidrogênio H-6 foi observado na forma de um duplodoubleto em δ_H 7,39 ppm (1H, $J=8,5$ e $J=7,7$) indicando um acoplamento na posição orto com H-5 e H-7 (Tabela 21).

Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-5(δ_C 114,1)/H-5(δ_H 7,88), CH-6(δ_C 123,5)/H-6(δ_H 7,39) e CH-7(δ_C 107,7)/H-7(δ_H 7,09), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 61).

No mapa de correlação heteronuclear a duas ($^2J_{HC}$) e três ligações ($^3J_{HC}$), HMBC (Figura 62), foram observadas as correlações entre os átomos C-8(δ_C 155,1)/H-7(δ_H 7,09), C-9(δ_C 138,0)/H-7(δ_H 7,09) e C-10(δ_C 115,0)/H-6(δ_H 7,39), de carbono quaternários, sugerindo a presença de um anel benzênico trissubstituído.

Os dois dupletos restantes são observados em δ_H 7,68 ppm e 7,12 ppm (1H, $J=2,7$) e apresentaram correlações a uma ligação (J_{HC}) com os respectivos átomos de carbono olefínicos em δ_C 143,9 ppm (CH-2') e 104,5 ppm (CH-3'). O mapa de HMBC apresentou a correlação a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre os átomos C-3 (δ_C 104,0)/H-3'(δ_H 7,12) indicando um anel furano dissubstituído.

O simpleto em δ_H 4,49 ppm (3H) foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila MeO-4, o qual apresentou correlação a uma ligação (J_{HC}) com o átomo de carbono metílico em δ_C 59,0 ppm (MeO-4) e correlação a três ligações ($^2J_{HC}$) com o átomo de carbono em δ_C 157,5 (C-4), confirmando a presença da metoxila na posição C-4.

O segundo simpleto em δ_H 4,11 ppm (3H) foi atribuído ao grupo metoxila MeO-8, confirmada pela correlação a uma ligação (J_{HC}) com átomo de carbono em δ_C 56,0 ppm (MeO-8) e a três ligações ($^2J_{HC}$) com o átomo de carbono quaternário em δ_C 155,0 ppm (C-8), confirmando a proposta estrutural com uma metoxila na posição C-8 resultando em anel benzênico trissubstituído (Tabela 21).

O mapa de correlação homonuclear, 1H - 1H -COSY (Figura 64) também confirmou a estrutura proposta para substância **SA-01**.

O espectro de CG/EM obtido para a substância **SA-01** (Figura 65 e Esquema 4) apresentou o pico do íon molecular ($[M^+]$) com $m/z=229$, confirmando a proposta estrutural com fórmula molecular igual a $C_{13}H_{11}NO_2$.

A análise dos dados descritos acima permitiu definir um esqueleto furoquinolínico com a presença de duas metoxilas para esta substância. Após comparação com a literatura concluiu-se que a substância **SA-01** corresponde ao alcaloide γ -fagarina, amplamente conhecido na família Rutaceae (CUCA et al., 1998; RIBEIRO, 2006).

Tabela 21. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **SA-01**, em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância γ -fagarina (**Mo-1**) (RIBEIRO, 2006). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
C					
2	-	-			163,2
3	104,0	-	H-3'	H-2'	103,8
4	157,5	-		MeO-4	156,8
8	155,1	-	H-7	H-6, MeO-8	154,5
9	138,2	-		H-7	137,5
10	115,0	-		H-6	119,5
CH					
5	114,1	7,88 (d, 8,5)		H-7	114,0
6	123,4	7,39 (dd, 8,5,7,7)			123,4
7	107,7	7,09 (d,7,7)		H-5	107,7
2'	143,9	7,68(d,2,7)	H-3'		143,8
3'	104,5	7,12 (d, 2,7)	H-2'		103,8
CH₃					
MeO-4	59,0	4,49 (s)			59,0
MeO-8	56,0	4,11 (s)			55,9

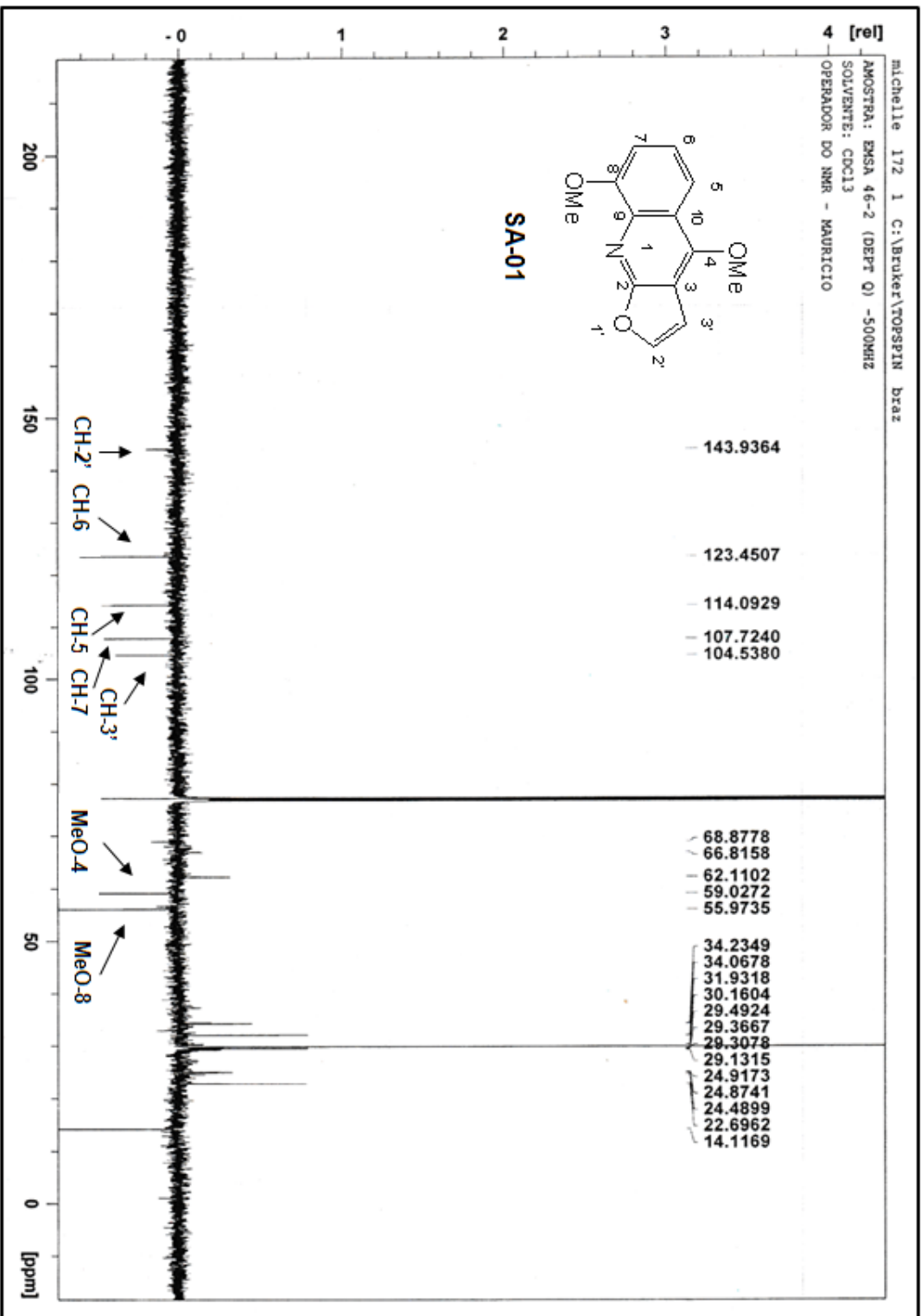


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).

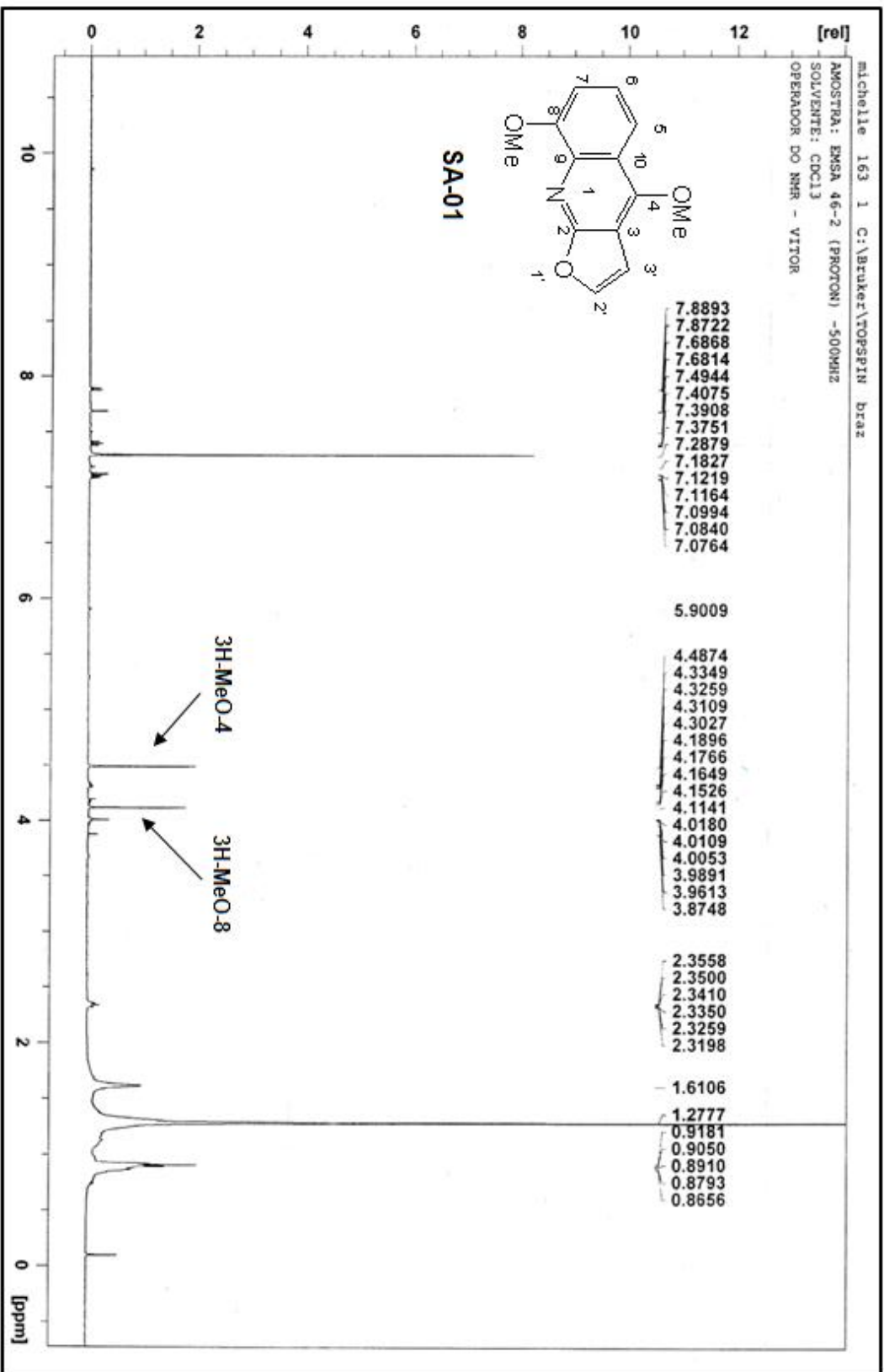


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).

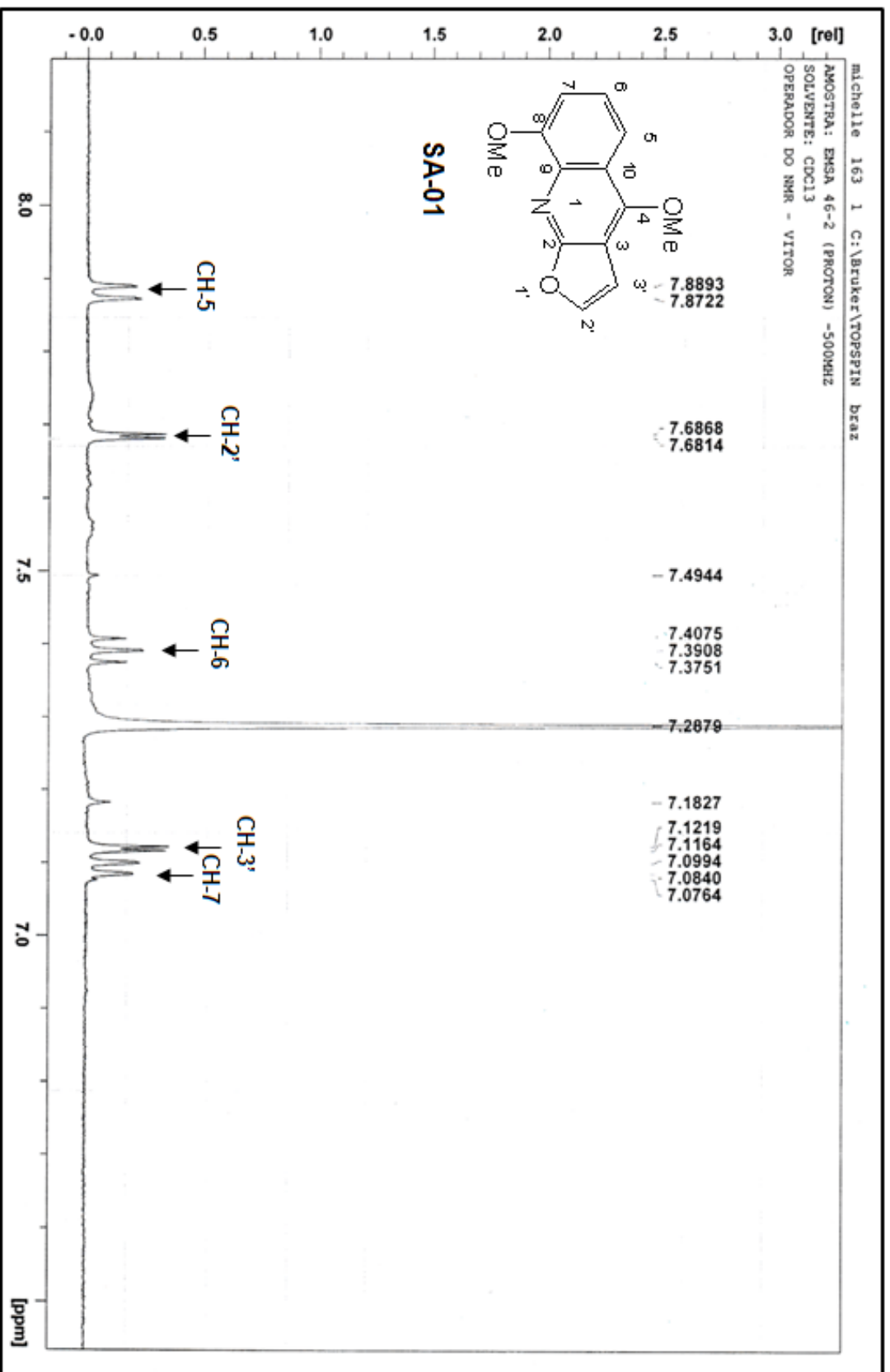


Figura 60. Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **SA-01** (γ-fagarina) (região 6,5 a 8,2 ppm).

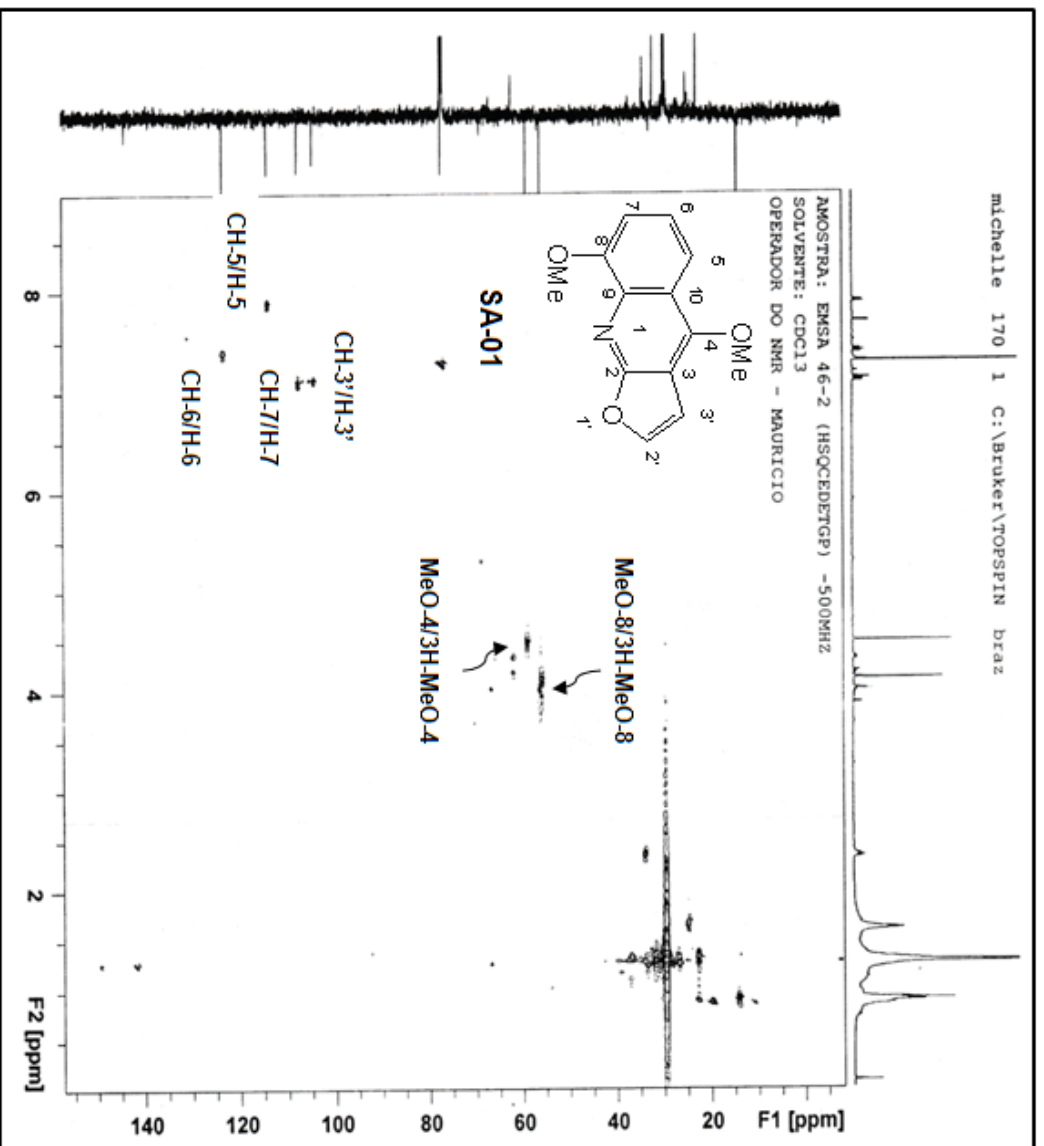


Figura 61. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).

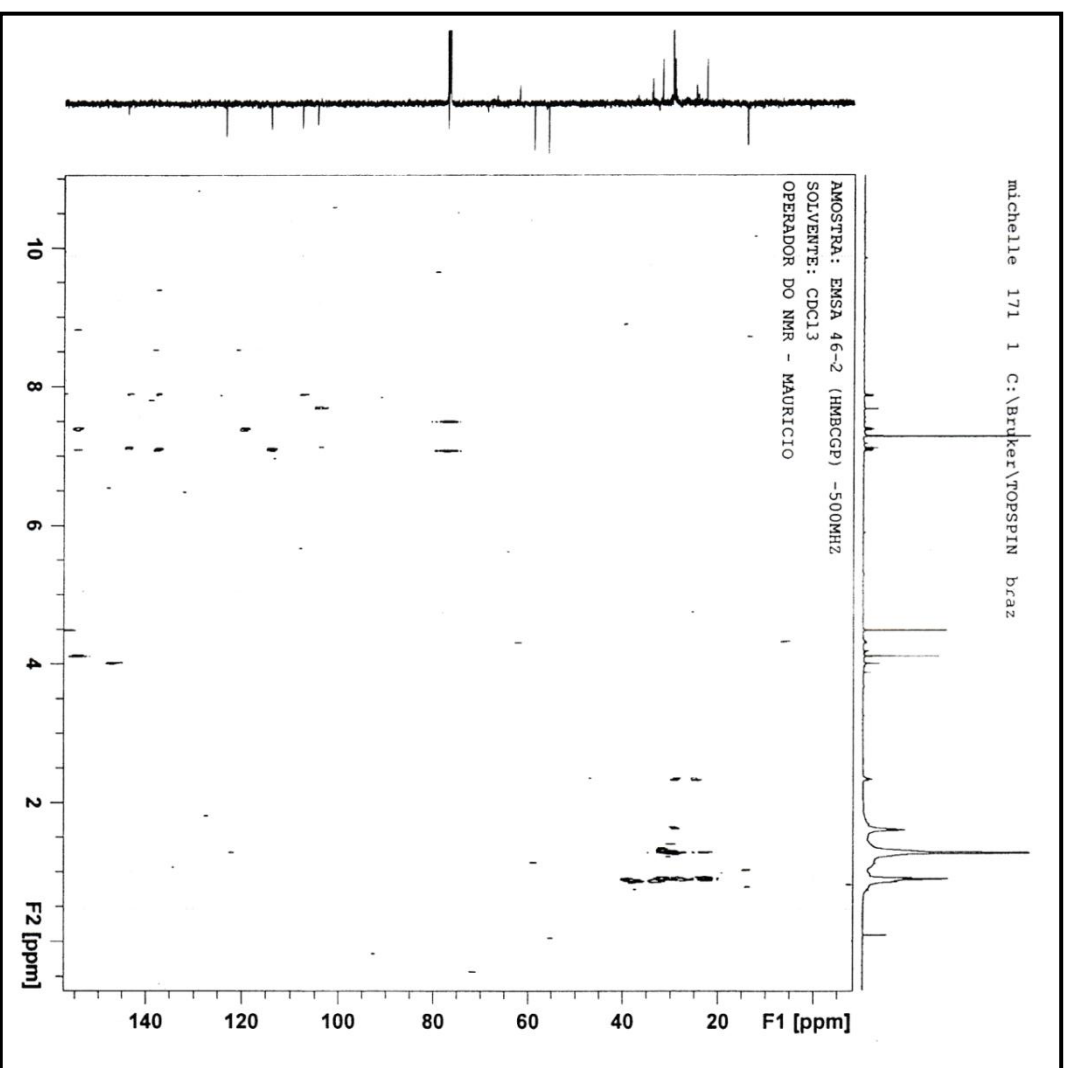


Figura 62. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).

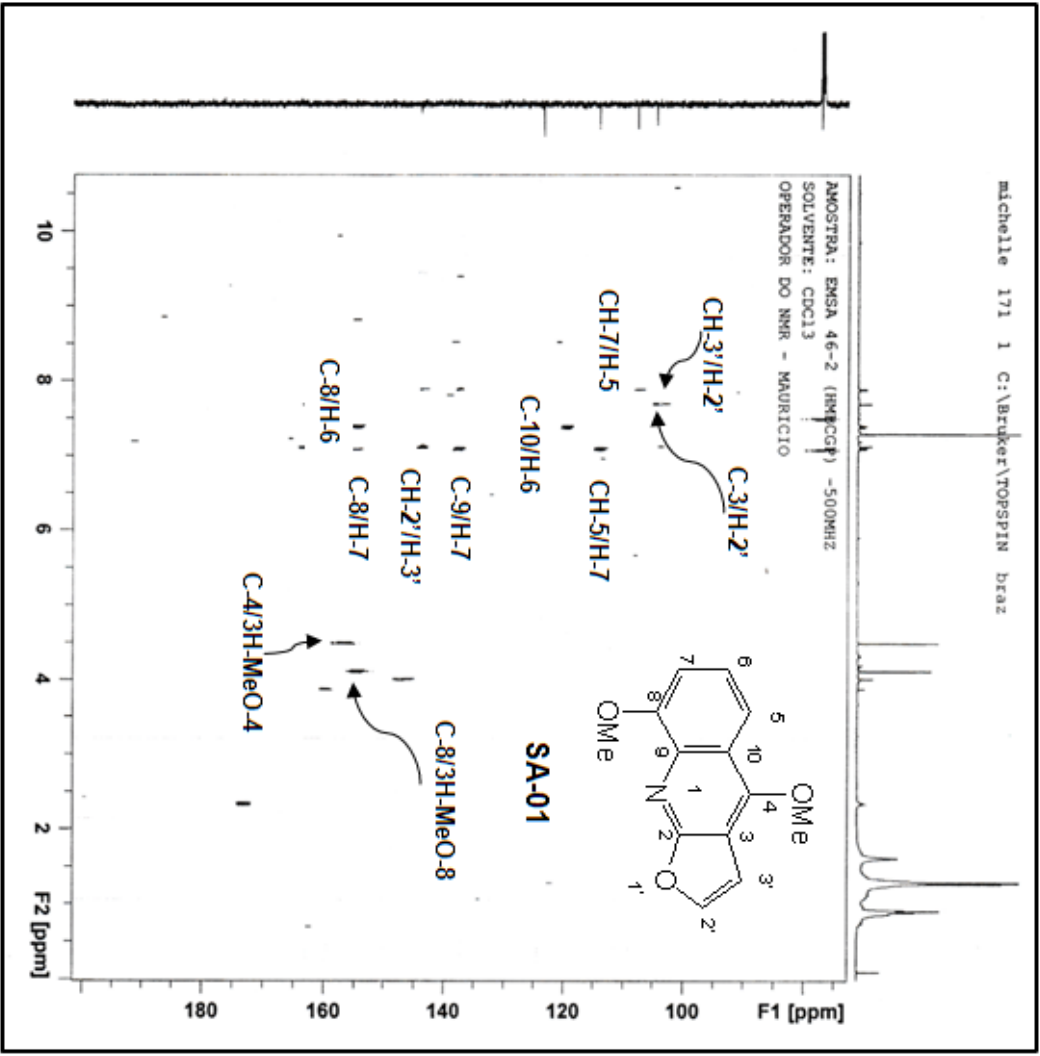


Figura 63. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina) (região de 80 a 200 ppm).

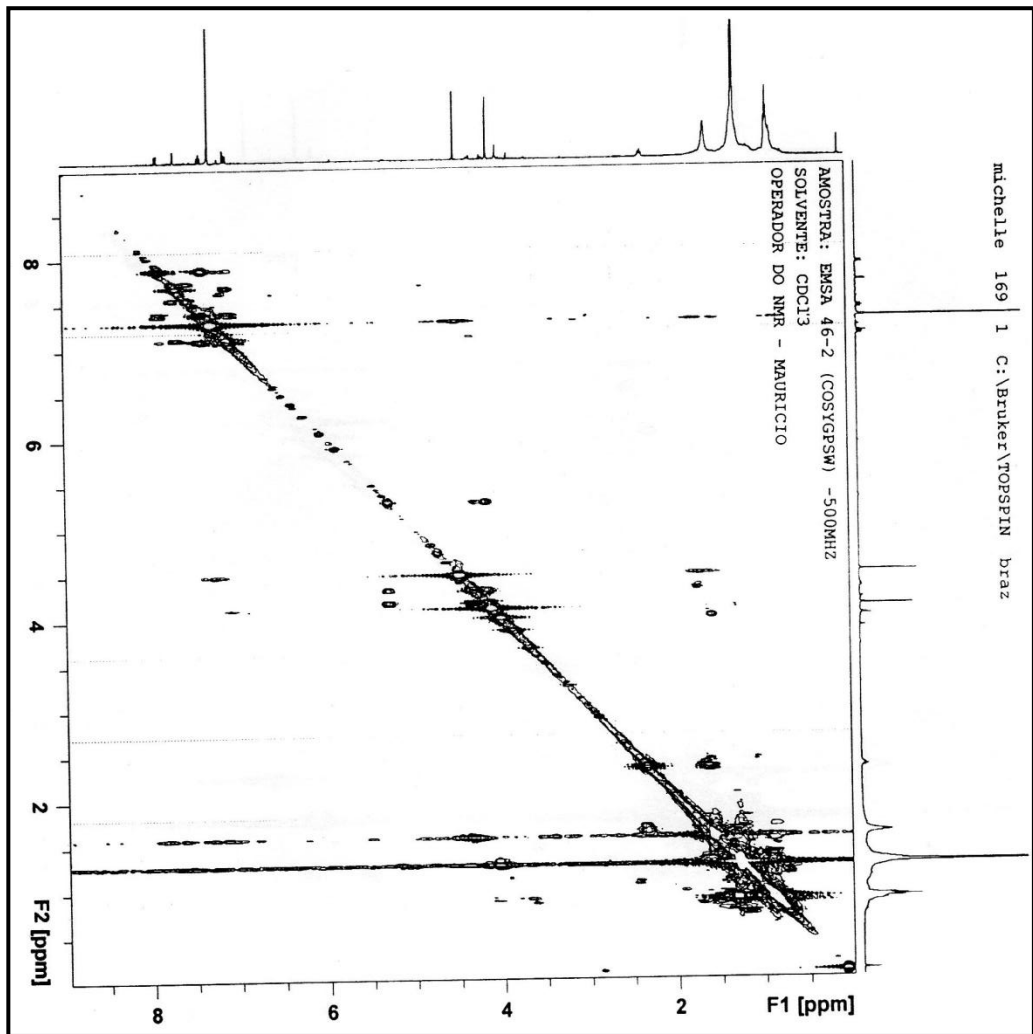


Figura 64. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-01 (γ -fagarina).

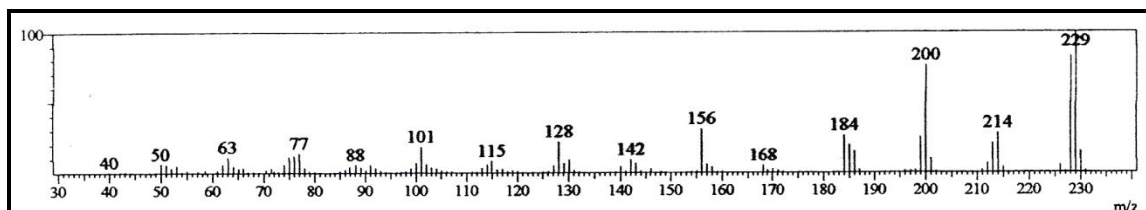
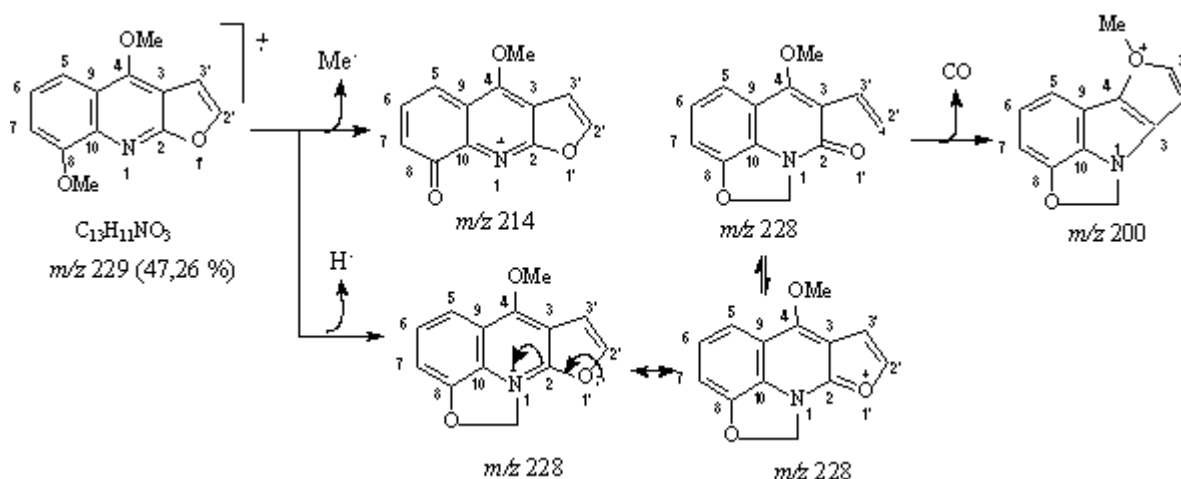
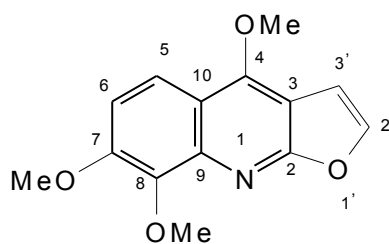


Figura 65. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **SA-01** (γ -fagarina).



Esquema 4. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **SA-01** (γ -fagarina).

5.3.1.2.2. Determinação estrutural da substância **SA-02**.



SA-02

A substância **SA-02** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*, na forma de um óleo amarelo claro, e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figuras 66 e 67) obtido para a substância **SA-02** apresentou grande semelhança com o espectro obtido para a substância **SA-01** (γ -fagarina), descrita anteriormente. Esta análise permitiu reconhecer a presença de 14 átomos de carbono, sendo três carbonos metílicos

(referentes a grupos metoxila), quatro carbonos metínicos (sp^2) e sete carbonos quaternários (sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Vale ressaltar, que o espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) não apresentou claramente todos os sinais correspondentes aos átomos de carbono, principalmente os carbonos quaternários. Porém todas as atribuições referentes aos átomos de carbono foram realizadas utilizando também as correlações observadas nos mapas de correlação heteronuclear a uma ligação (J_{HC}) HSQC (Figura 69) e a duas ($^2J_{HC}$) e três ligações ($^3J_{HC}$) HMBC (Figura 70).

Foram observados três sinais característicos de grupos metoxila em δ_C 59,0 ppm, 56,8 ppm e 61,7 ppm atribuídos a MeO-4, MeO-7 e MeO-8 sugerindo a presença de uma metoxila a mais na posição 7, em comparação com a estrutura da substância **SA-01** (γ -fagarina).

A análise do espectro de RMN 1H obtido para a substância **SA-02** (Figura 68) apresentou quatro dubletos na região aromática e três singletos na região alifática.

Os sinais referentes aos átomos de carbono aromáticos C-7 e C-8 são observados respectivamente em δ_C 151,1 ppm e 145,4 ppm, indicando a presença de uma terceira metoxila em C-7. Os átomos de carbono do anel furano CH-2' e CH-3' foram observados em δ_C 143,1 ppm e 104,9 ppm (Tabela 22).

Os hidrogênios H-5 e H-6 são observados na forma de dois dupletos em δ_H 8,01 ppm e 7,76 ppm (1H, $J = 9,4$) acoplado entre si e observados no espectro de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY (Figura 71) sugerindo um acoplamento em posição orto. Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-5 (δ_C 118,3)/H-5 (δ_H 8,01) e CH-6 (δ_C 112,2)/H-6 (δ_H 7,76), observadas no mapa HSQC (Figura 69).

O espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 70) contribuiu com as correlações a três ligações ($^3J_{HC}$) entre os átomos C-7 (δ_C 151,1)/ H-5 (δ_H 8,01), C-9 (δ_C 139,7)/ H-5 (δ_H 8,01), C-8 (δ_C 145,4)/ H-6 (δ_H 7,76) e C-10 (δ_C 109,0)/ H-6 (δ_H 7,76), indicando um anel aromático tetrasubstituído.

Os dois dupletos observados em δ_H 7,64 ppm e 7,08 ppm (1H, $J = 2,8$) atribuídos aos hidrogênios, H-2' e H-3', apresentaram correlações a uma ligação entre com os átomos de carbono em δ_C 143,1 ppm (CH-2') e 104,9 ppm (CH-3') (Tabela 22).

O espectro de correlação heteronuclear HMBC apresenta as correlações a duas ($^2J_{\text{HC}}$) e três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) respectivamente entre os átomos C-3(δ_{C} 103,0)/ H-3'(δ_{H} 7,08) e C-2(δ_{C} 164,3)/ H-3'(δ_{H} 7,08), indicando um anel furano dissubstituído.

Os simpletos observados em δ_{H} 4,06 ppm (3H) e 4,14 ppm (3H) foram atribuídos as metoxilas MeO-7 e MeO-8, corroboradas pelas correlações entre os átomos MeO-7(δ_{C} 56,8)/3H-MeO-7(δ_{H} 4,06), C-7(δ_{C} 151,1)/3H-MeO-7(δ_{H} 4,06), MeO-8(δ_{C} 61,7)/3H-MeO-8 e C-8(δ_{C} 145,4)/3H-MeO-8(δ_{H} 4,14).

O simpleto observado em δ_{H} 4,47 ppm (3H) foi atribuído a metoxila MeO-4, pois possui deslocamento característico de metoxilas e ainda apresentou a correlação entre C-4(δ_{C} 157,1)/ 3H-MeO-4(δ_{H} 4,47) (Tabela 22).

O espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **SA-02** (Figura 72 e Esquema 5) apresentou o pico do íon molecular ($[M^+]$) com $m/z= 259$, confirmando a proposta com fórmula molecular igual a $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3$.

A análise dos dados descritos acima permitiu definir um esqueleto furoquinolínico com a presença de três metoxilas para a substância **SA-02**. Após comparação com a literatura concluiu-se que esta substância corresponde ao alcaloide esquimianina, também amplamente conhecido na família Rutaceae (CUCA et. al., 1998; RIBEIRO, 2006; ISIDORO et. al., 2012).

Tabela 22. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **SA-02**, em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância esquimianina (**Mo-1**) (CUCA et. al., 1998). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	164,3	-		H-3'	164,4
3	103,0	-	H-3'		115,0
4	157,1	-		MeO-4	157,2
7	151,1			H-5; MeO-7	141,6
8	145,4	-		H-6; MeO-8	141,3
9	139,7	-		H-5	152,2
10	109,0			H-6	101,8
CH					
5	118,3	8,01 (d, 9,4)			118,2
6	112,2	7,76 (d, 9,4)			111,6
2'	143,1	7,64 (d, 2,8)	H-3'		143,0
3'	104,9	7,08 (d, 2,8)			104,6
CH₃					
MeO-4	59,0	4,47 (s)			58,9
MeO-7	56,8	4,06 (s)			56,8
MeO-8	61,7	4,14 (s)			61,7

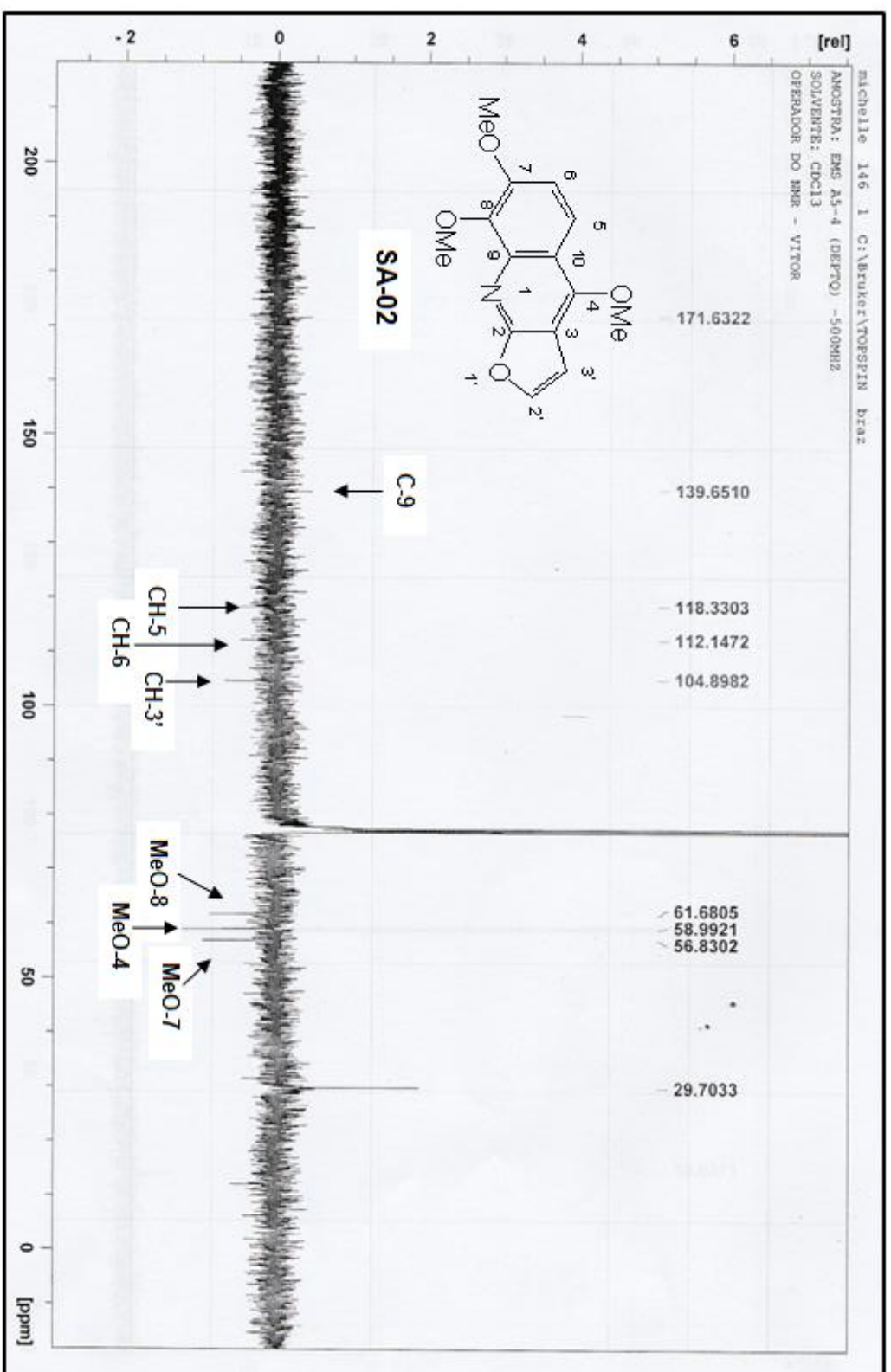


Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).

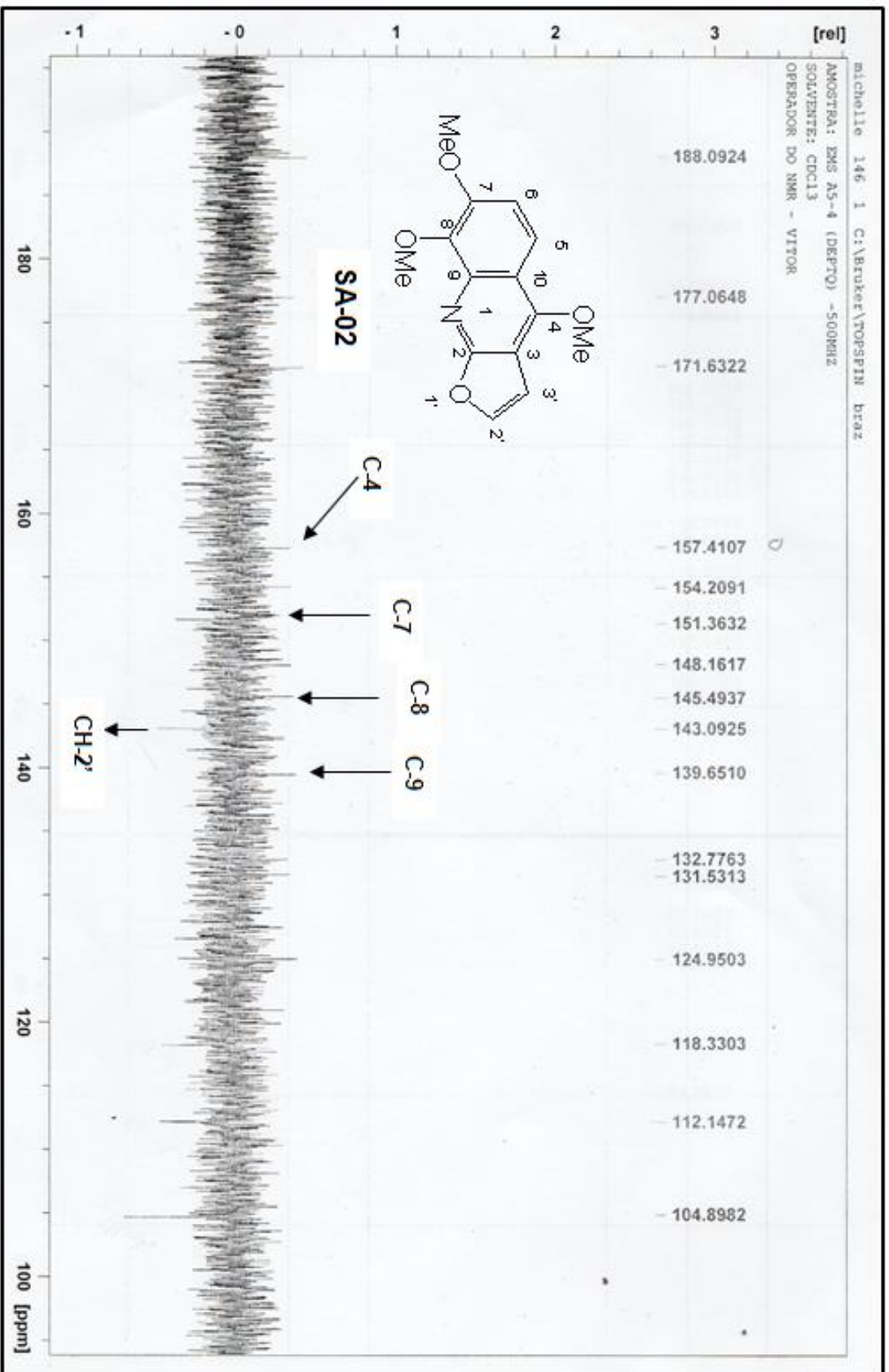


Figura 67. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **SA-02** (esquimianina) (região de 105 a 190 ppm).

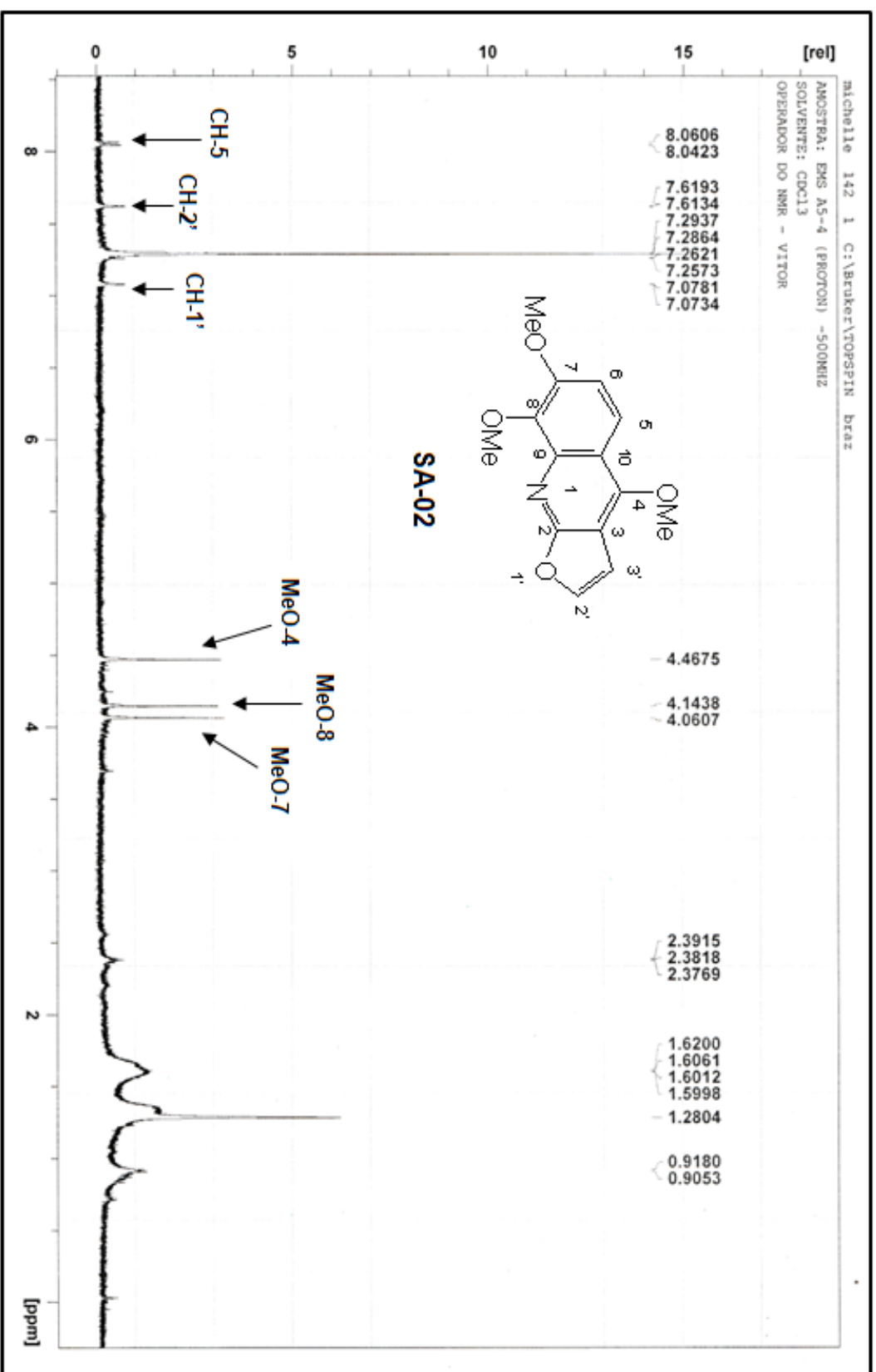


Figura 68. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).

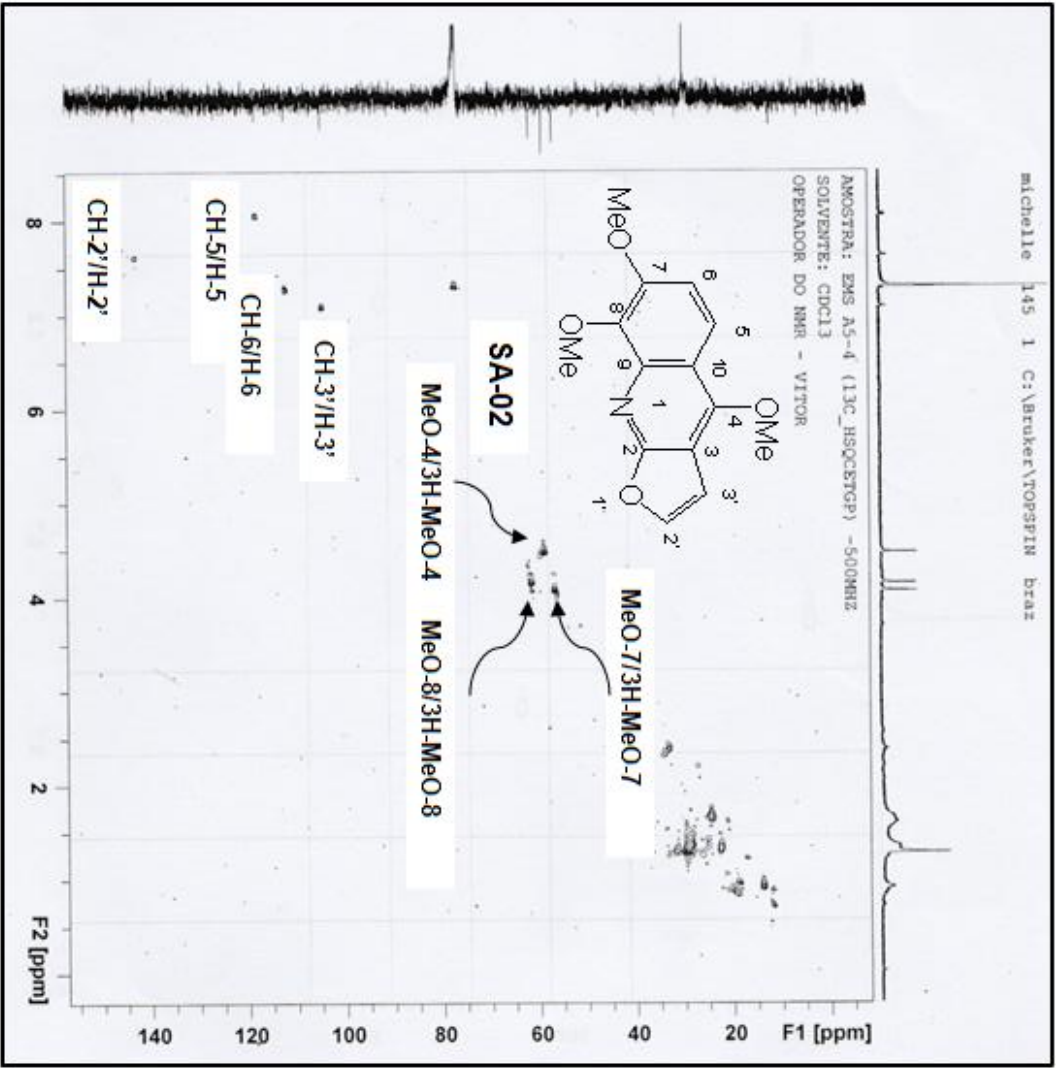


Figura 69. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).

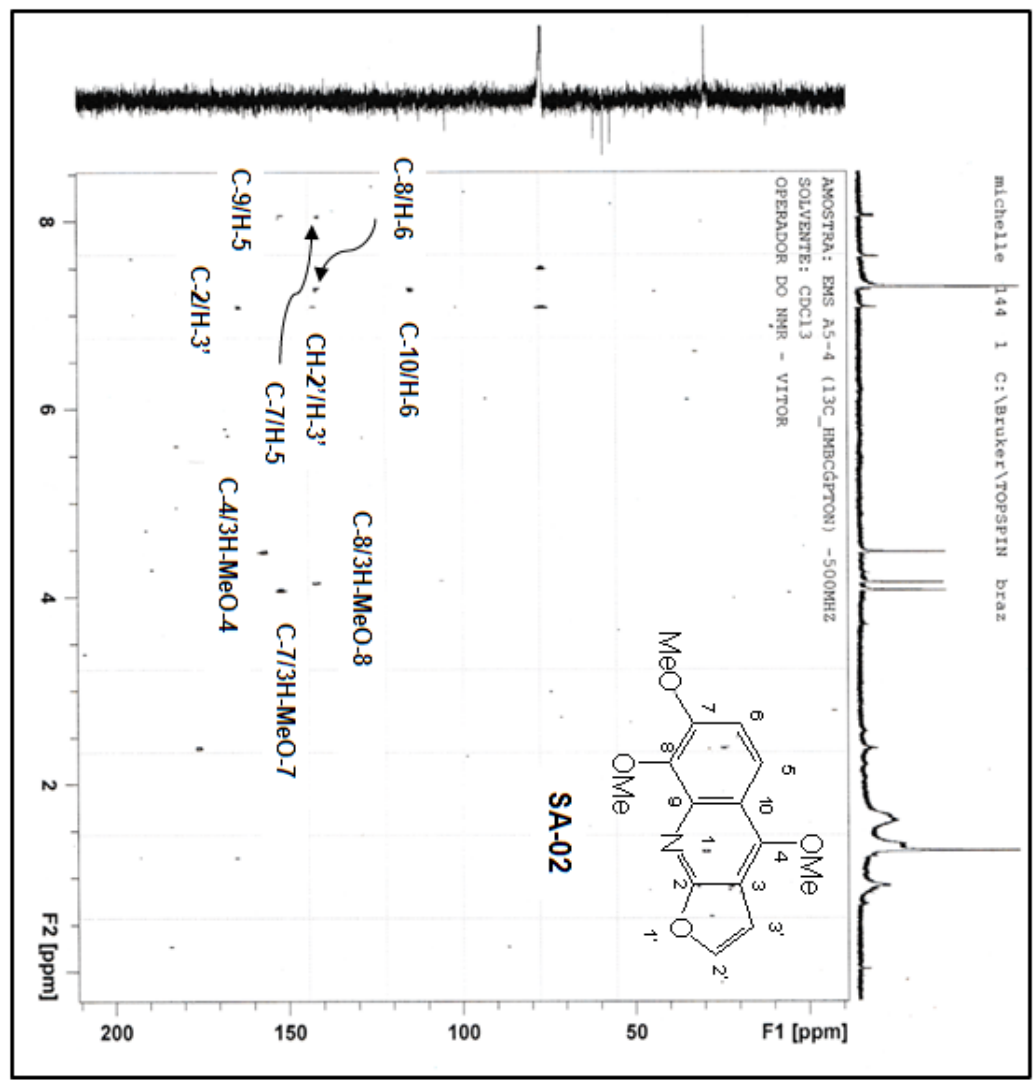


Figura 70. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).

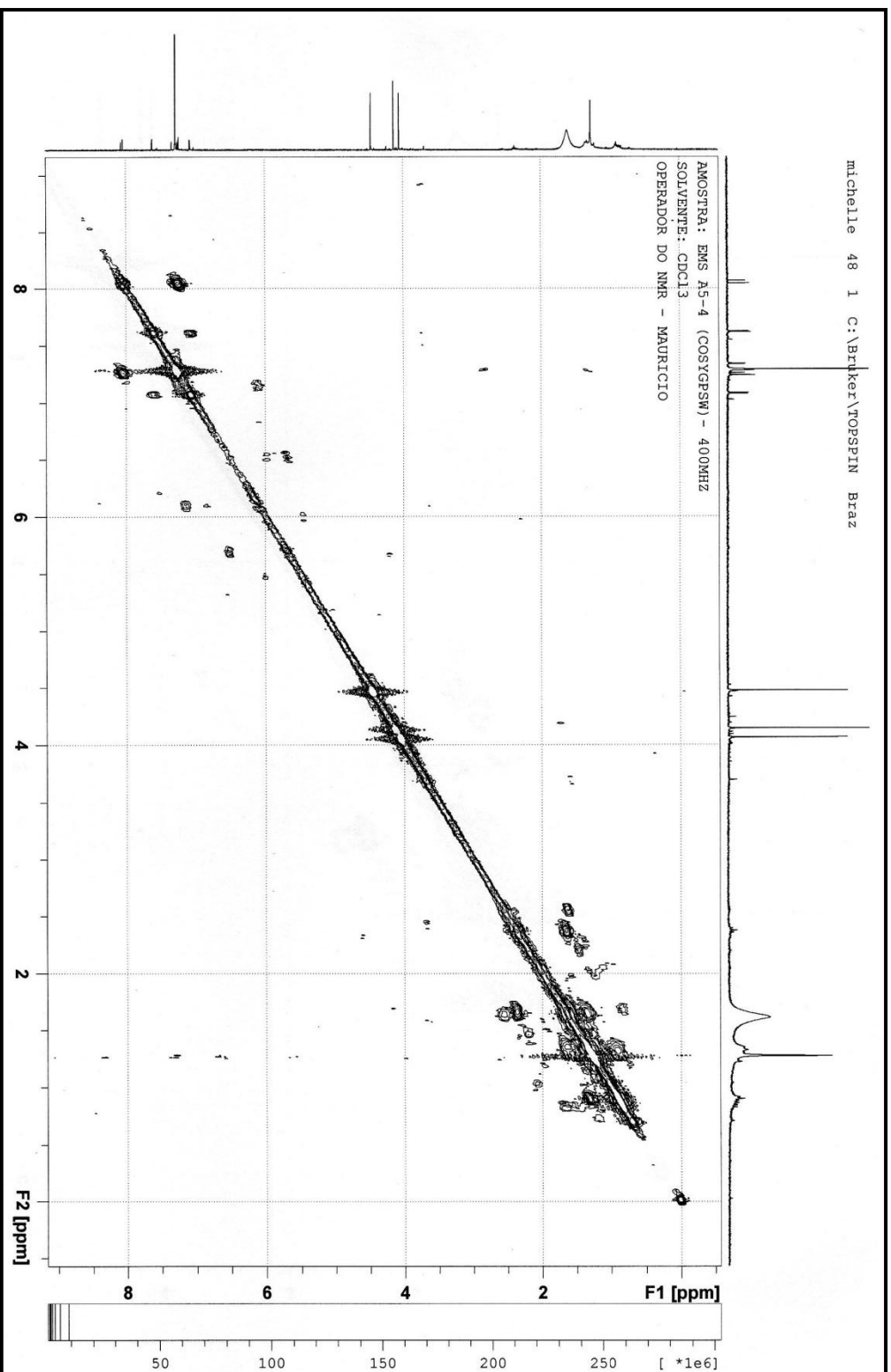


Figura 71. Espectro de H¹-H¹ COSY (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).

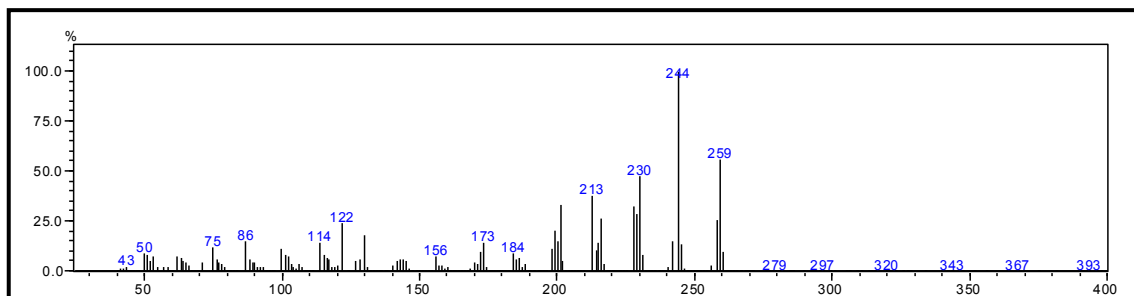
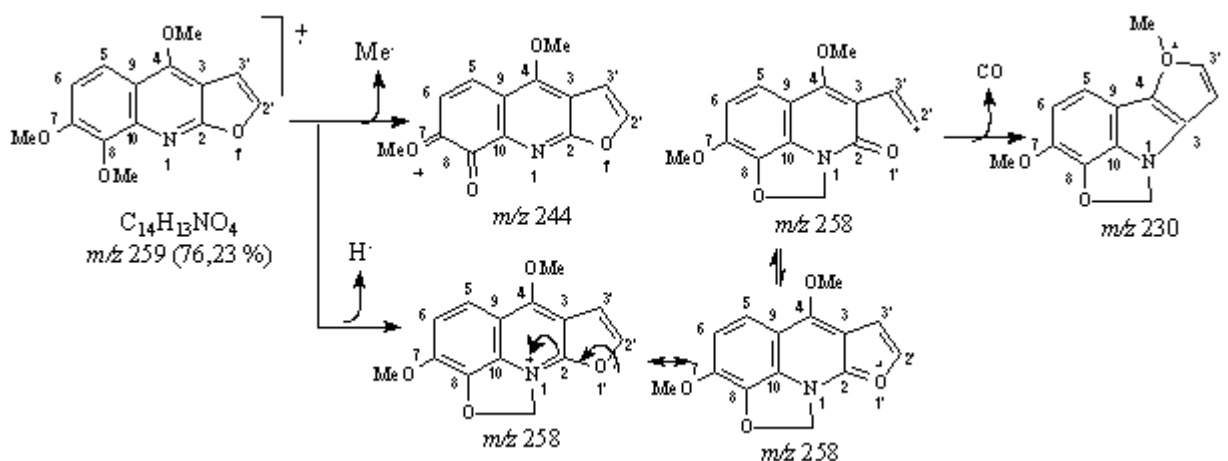
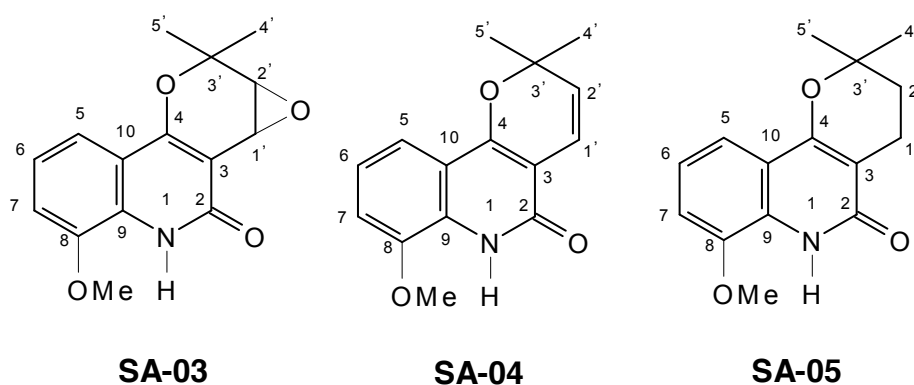


Figura 72. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância SA-02 (esquimianina).



Esquema 5. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância SA-02 (esquimianina).

5.3.1.2.3. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias SA-03, SA-04 e SA-05.



A mistura das substâncias SA-03, SA-04 e SA-05 foi obtida do extrato em metanol da espécie *S. atlantica*, na forma de um óleo amarelo e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

A mistura de alcaloides foi elucidada principalmente pela análise de ESI-(+)-MS, que apresenta maior sensibilidade, sendo detectadas na análise de RMN (^1H e ^{13}C -DEPTQ) apenas as substâncias **SA-03** e **SA-04**, que são os componentes predominantes da mistura.

A análise de espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) obtido para a mistura dessas substâncias (Figura 83) não foi muito útil para a determinação estrutural, pois não apresentou todos os sinais correspondentes aos átomos de carbono. Infelizmente não foi possível observar os sinais da maioria dos carbonos quaternários. Porém foi possível observar a presença do átomo de carbono carbonílico C-2 em δ_{C} 160,8 ppm.

As atribuições dos sinais referentes aos átomos de carbono apresentados nas Tabelas 23 e 24 foram realizadas principalmente através das correlações observadas nos mapas de correlação heteronuclear a uma ligação (J_{HC}) (HSQC) e a duas ($^2J_{\text{HC}}$) e três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) (HMBC).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 73 e 74) obtido para a mistura destas substâncias apresentou no total, seis dupletos, um tripleto e quatro simpletos.

A análise do espectro de RMN ^1H para a substância **SA-03** (1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina) apresentou quatro dupletos, um tripleto e três simpletos. Na região aromática do espectro, foi observado o duplete em δ_{H} 7,49 ppm (1H, $J = 7,8$ Hz) referente ao átomo de hidrogênio H-5b, o tripleto em δ_{H} 7,18 ppm (1H, $J = 7,8$ Hz) referente ao átomo de hidrogênio H-6b e o duplete em δ_{H} 6,97 ppm (1H, $J = 7,8$ Hz) referente ao átomo de hidrogênio H-7b (Tabela 23).

Estas atribuições foram realizadas com base na análise do mapa de correlação HSQC (Figuras 76 e 77), no qual foram observadas as correlações a uma ligação (J_{CH}) entre os átomos de carbono do anel benzênico, C-5b(δ_{C} 115,0)/H-5b (δ_{H} 7,49), C-6b(δ_{C} 122,7)/H-6b (δ_{H} 7,18) e C-7b(δ_{C} 111,5)/H-7b (δ_{H} 6,97). O mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 78 e 79) apresentou as correlações a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos C-7b(δ_{C} 111,5)/H-5b (δ_{H} 7,49), C-8b(δ_{C} 146,0)/H-6b (δ_{H} 7,18) e C-9b(δ_{C} 128,1)/H-7b (δ_{H} 6,97), confirmando a presença do anel benzênico trissubstituído na estrutura da substância **SA-03**.

Também foi verificado no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 80) a correlação entre os átomos de hidrogênio H-1'b e H-2'b, observados respectivamente em δ_{H} 5,40 ppm (1H, $J = 2,9$ Hz) e δ_{H} 4,50 ppm (1H, $J = 2,9$ Hz).

A análise do mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HSQC apresentou as correlações entre estes dupletos e os respectivos átomos de carbono em δ_C 52,7 (CH-1'b) e 63,7 ppm (CH-2'b), deslocamentos estes, característicos de carbonos ligados a heteroátomos de oxigênio. Desta forma, fica evidente a ausência de uma possível ligação dupla entre os carbonos CH-1'b e CH-2'b e indica a presença de um átomo de oxigênio. Já no mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 78 e 79) foi possível observar a correlação a três ligações ($^3J_{HC}$) entre os átomos C-3b(δ_C 105,0)/H-2'b(δ_H 4,50) confirmando a presença de um anel epóxido.

Os simpletos observados em δ_H 1,77 ppm (3H) e 1,70 ppm (3H) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio metílicos 3H-4'b e 3H-5'b devido as correlações a uma ligação (J_{HC}) observadas entre os átomos CH₃-4'b (δ_C 26,6)/3H-4'b(δ_H 1,77) e CH₃-5'b(δ_C 26,4)/3H-5'b(δ_H 1,70).

No mapa de correlação heteronuclear HMBC foi possível observar as correlações a duas ligações ($^2J_{HC}$) entre os átomos C-3'b(δ_C 78,0)/3H-4'b(δ_H 1,77) e C-3'b(δ_C 78,0)/3H-5'b(δ_H 1,70), confirmando a posição das metilas em C-3'b (Tabela 23).

Já o simpleto em δ_H 3,99 (3H) refere-se aos átomos de hidrogênio da metoxila MeO-8, confirmada pela a correlação a uma ligação (J_{HC}) observada entre os átomos MeO-8b (δ_C 56,2)/3H-MeO-8b(δ_H 3,99), e pela correlação a três ligações ($^3J_{HC}$) entre C-8b(δ_C 146,0)/ 3H-MeO-8b (δ_H 3,99).

O espectro bidimensional homonuclear de 1H - 1H COSY (Figura 80) apresentou as correlações entre os átomos de hidrogênio do anel epóxido, H-1'b e H-2'b, presentes na estrutura da substância **SA-03**.

Tabela 23. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **SA-03** (1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância 8-metoxiflindersina (**Mo-1**) (CAMPBELL et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
C		-			
2	160,8	-			160,4
3	105,0	-		H-2'	106,2
4		-			156,8
10		-			115,5
8	146,0	-		H-6; MeO-8	145,3
9	128,1	-		H-5; H-7	127,8
3'	78,0	-	3H-4'; 3H-5'		78,9
CH					
5	115,0	7,49 (d, 7,8)	H-6	H-7	114,2
6	122,7	7,08 (t, 7,8)			121,4
7	111,5	6,97 (d, 7,8)			110,0
1'	52,7	5,40 (d, 2,9)			117,1
2'	63,7	4,50 (d, 2,9)		3H-4'; 3H-5'	126,0
CH₃					
4'	26,6	1,77 (s)		3H-5'	28,2
5'	26,4	1,70 (s)		3H-4'	28,2
MeO-8	56,2	3,99 (s)			55,9

Já a análise do espectro de RMN ^1H para a substância **SA-04** (8-metoxiflindersina) apresentou dois dupletos acoplado entre si, em δ_{H} 6,71 ppm (1H, $J=9,9$ Hz) e δ_{H} 5,56 ppm (1H, $J=9,9$), atribuídos aos átomos de hidrogênio H-1'a e H-2'a, indicando um acoplamento na posição vicinal, confirmado pelo mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 80). Estas atribuições são confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre estes dupletos e os sinais dos átomos de carbono em δ_{C} 115,0 (CH-1'a) ppm e 126,3 ppm (CH-2'a) (Tabela 24), com deslocamentos característicos de átomos de carbono com hibridização sp^2 . Desta forma confirmando a presença da ligação dupla entre estes átomos de carbono e a ausência do heteroátomo de oxigênio na substância **SA-04**.

Também foi possível observar um simpleto em δ_{H} 1,57 ppm (6H) referente aos átomos de hidrogênios metílicos 3H-4'a e 3H-5'a, confirmado pelas correlações entre os átomos CH₃-4'a/CH₃-5'a (δ_{C} 28,3)/3H-4'a/-3H-5'a(δ_{H} 1,57) e C-3'a(δ_{C} 80,0)/3H-4'/3H-5'a(δ_{H} 1,57) (Tabela 24).

O segundo simpleto observado em δ_{H} 3,99 ppm (3H) corresponde aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila em C-8, confirmado pelas correlações entre os átomos MeO-8a(δ_{C} 56,5)/3H-MeO-8a(δ_{H} 3,99) e C-8a(δ_{C} 147,0)/ 3H-MeO-8a(δ_{H} 3,99) (Tabela 24). Porém a integração deste simpleto resulta em seis átomos de hidrogênio, assim indicando também a presença do alcaloide **SA-05** na mistura, o qual possui três átomos de hidrogênio no mesmo ambiente químico.

No espectro bidimensional homonuclear de ¹H-¹H-COSY (Figura 80) também foi possível observar as correlações entre os átomos de hidrogênio H-1'a e H-2'a para a substância **SA-04**.

Tabela 24. Dados de RMN ¹H (500 MHz) e RMN ¹³C (125 MHz) da substância **SA-04** (8-metoxiflindersina), em CDCl₃, em comparação com os dados da literatura da substância 8-metoxiflindersina (**Mo-1**) (CAMPBELL et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
C					
2		-			160,4
3		-			106,2
4		-			156,8
10		-			115,5
8	147,0	-		H-6; MeO-8	145,3
9		-			127,8
3'	80,0	-	H-2'; 3H-4'/3H-5		78,9
CH					
5	114,0				114,2
6	122,7				121,4
7	111,7				110,0
1'	115,0	6,72 (d, 9,9)			117,1
2'	126,3	5,56 (d, 9,9)		3H-4'/3H-5	126,0
CH₃					
4'	28,3	1,57 (s)		3H-5'	28,2
5'	28,3	1,57 (s)		3H-4'	28,2
MeO-8	56,5	3,99 (s)			55,9

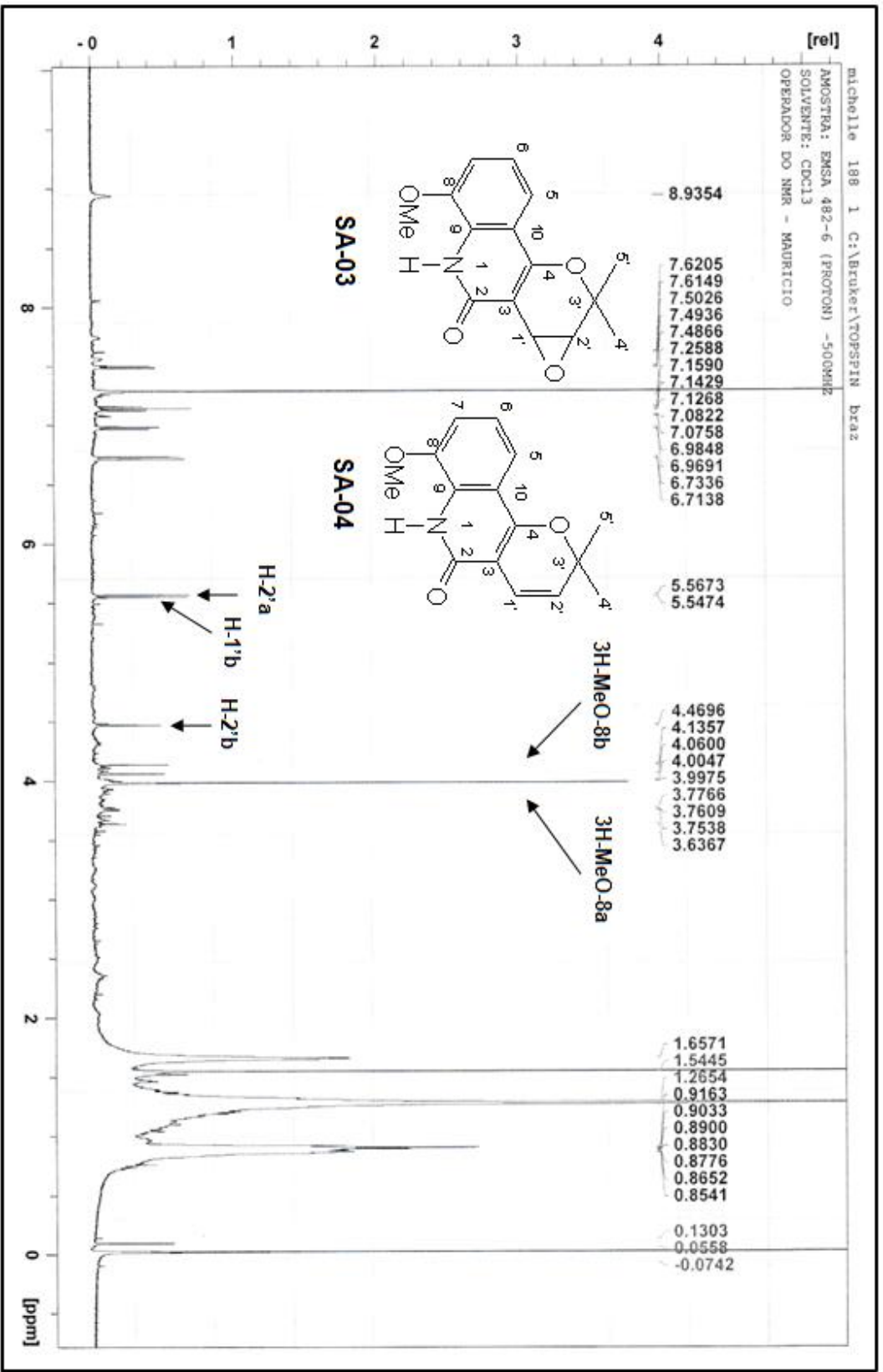


Figura 73. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias SA-03, SA-04 e SA-05.

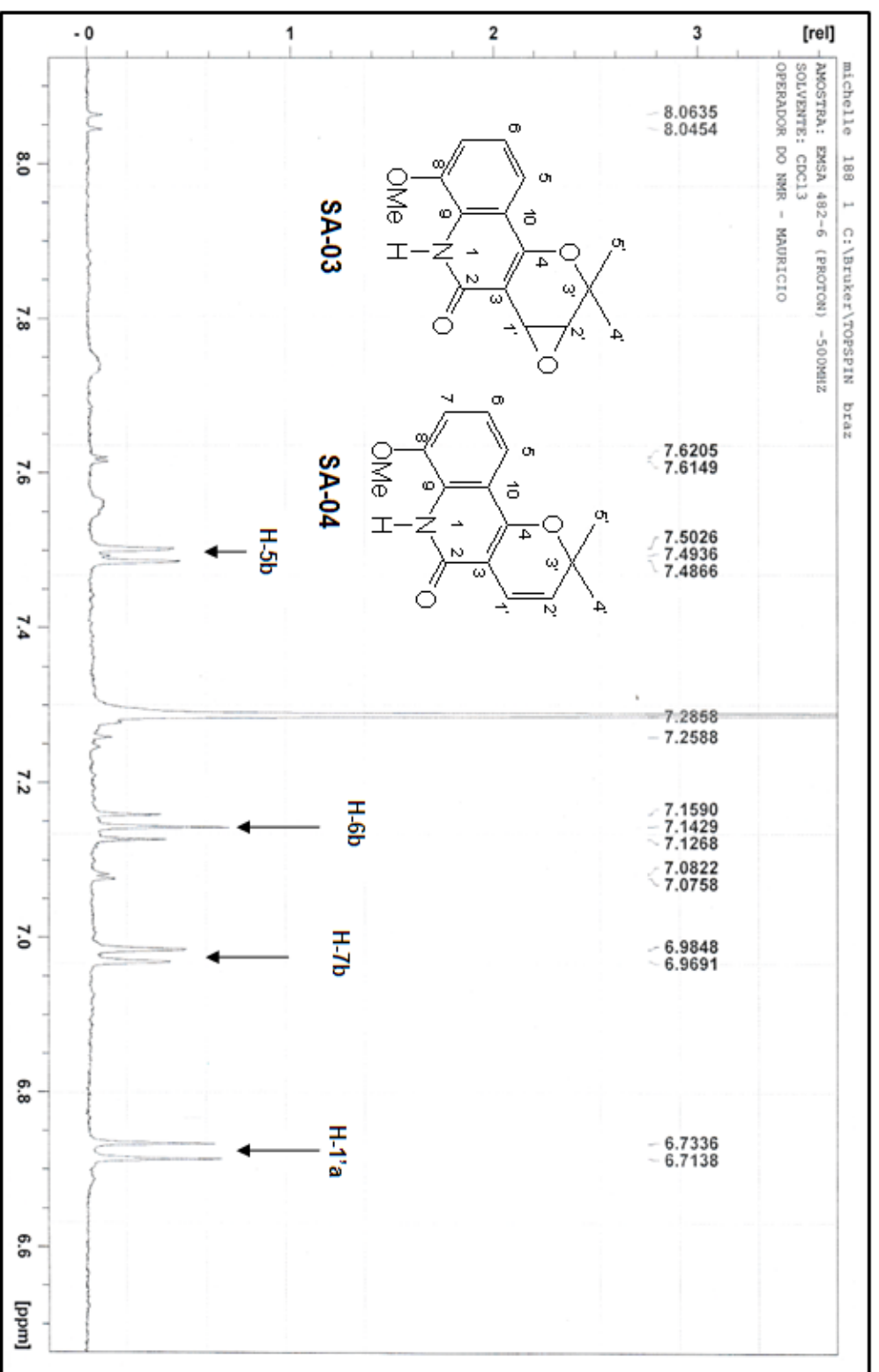


Figura 74. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias **SA-03**, **SA-04** e **SA-05** (região de 6,7 a 8,1 ppm).

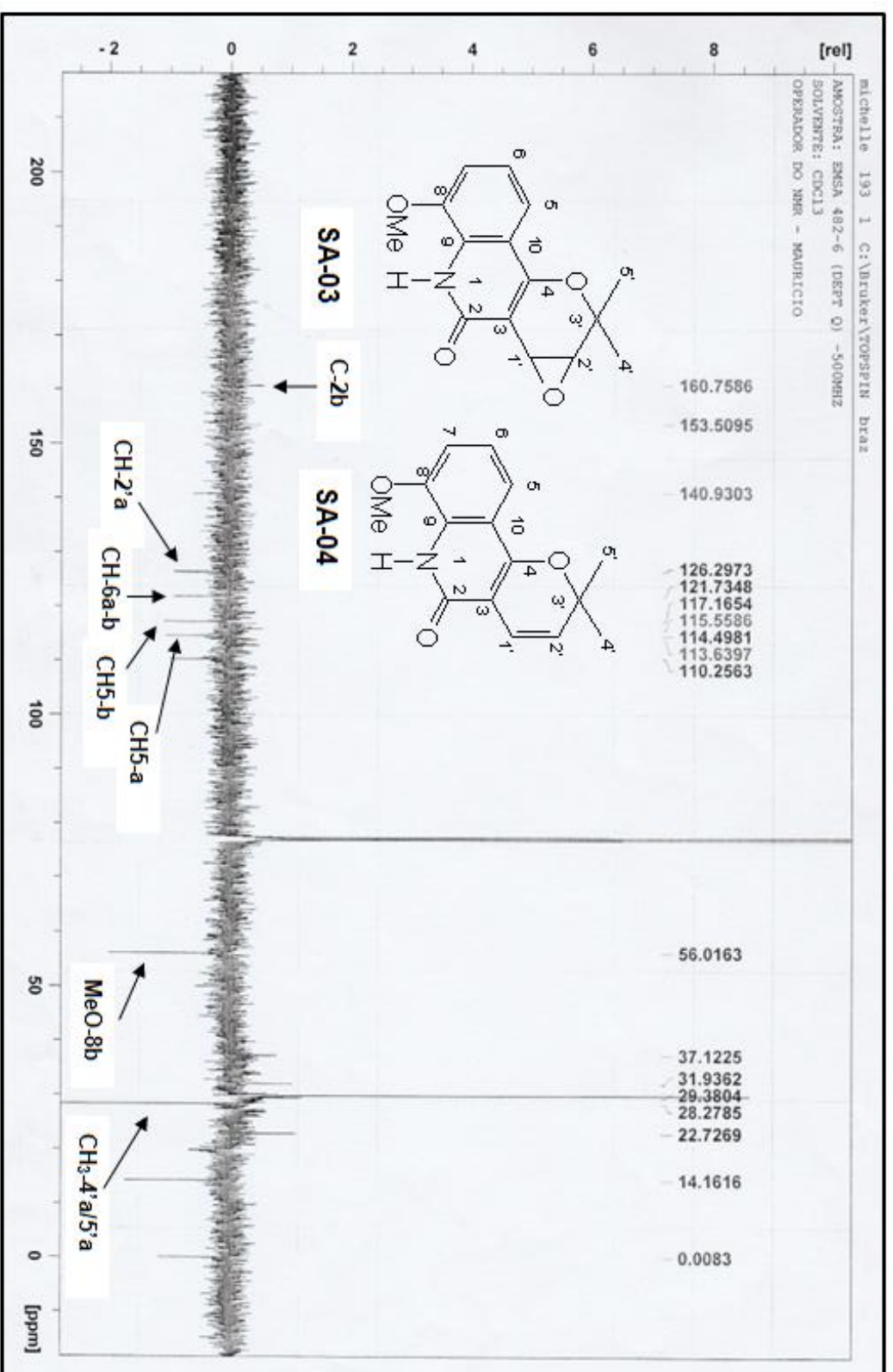


Figura 75. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias SA-03; SA-04 e SA-05.

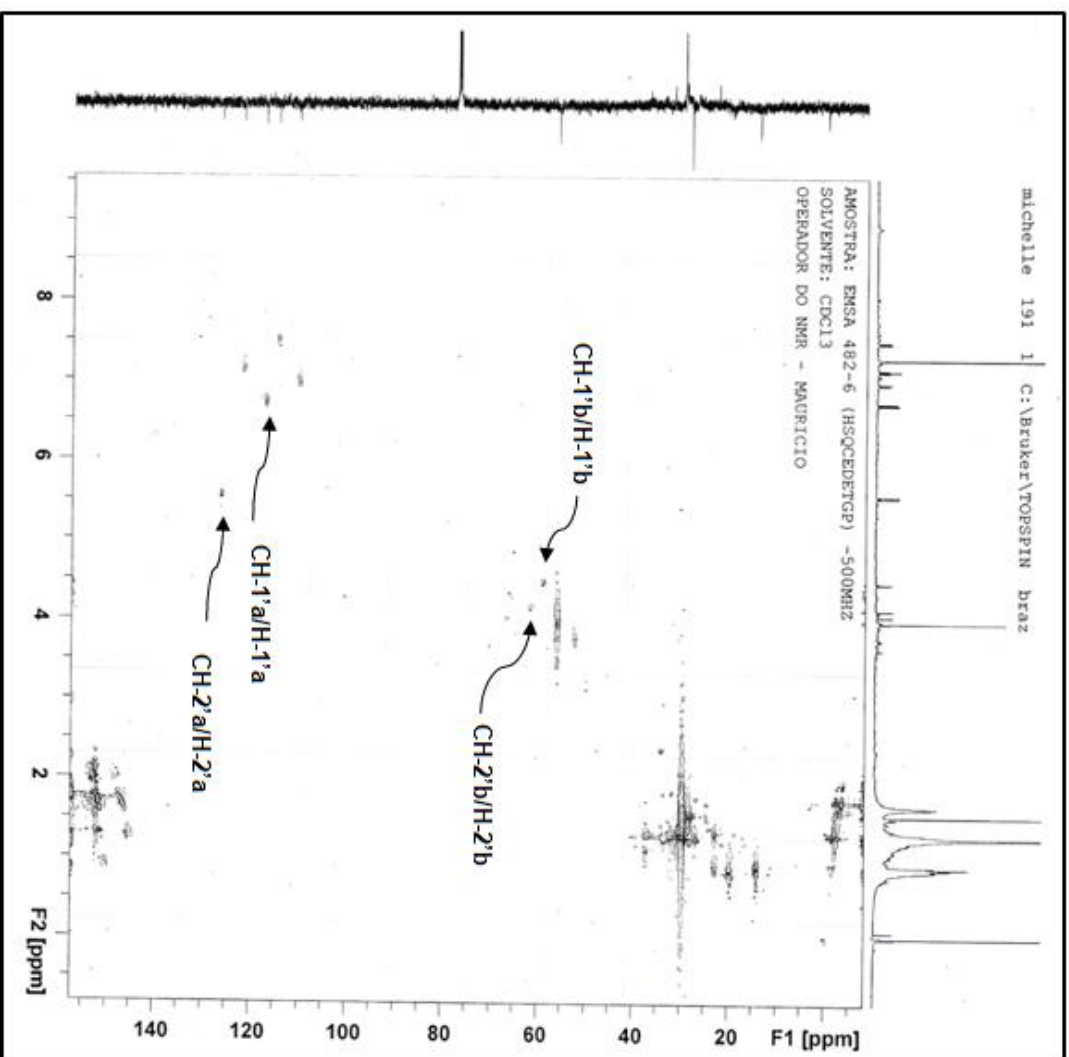


Figura 76. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias SA-03, SA-04 e SA-05.

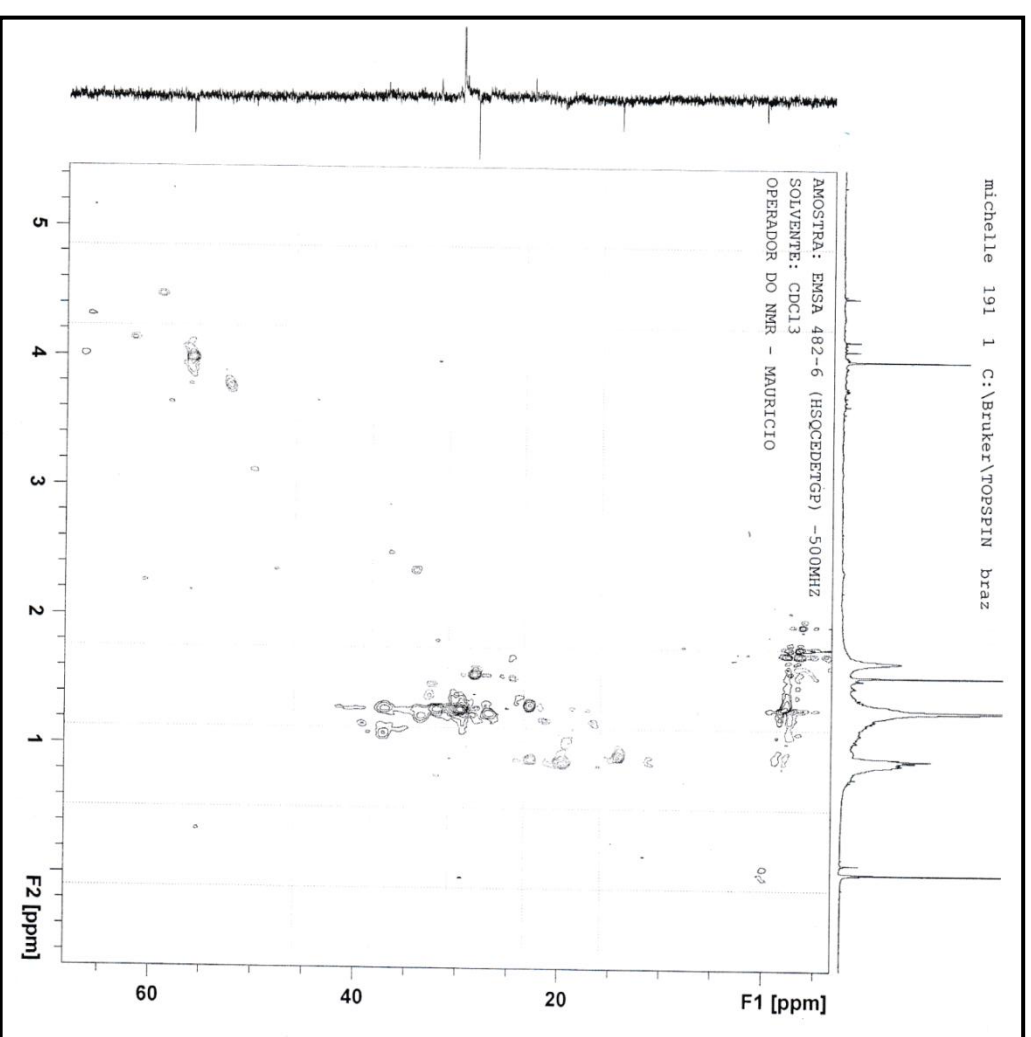


Figura 77. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias SA-03; SA-04 e SA-05 (região de 10 a 65 ppm).

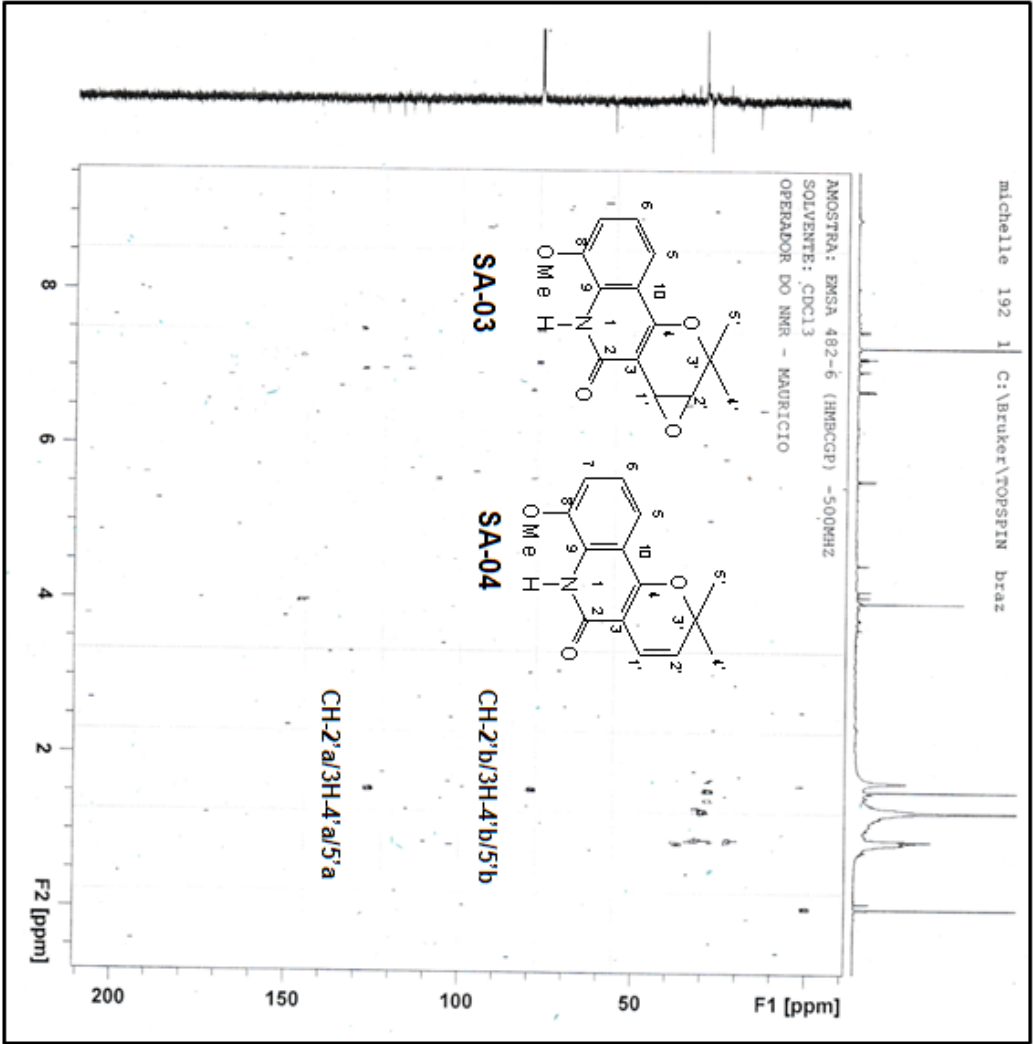


Figura 78. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias SA-03, SA-04 e SA-05.

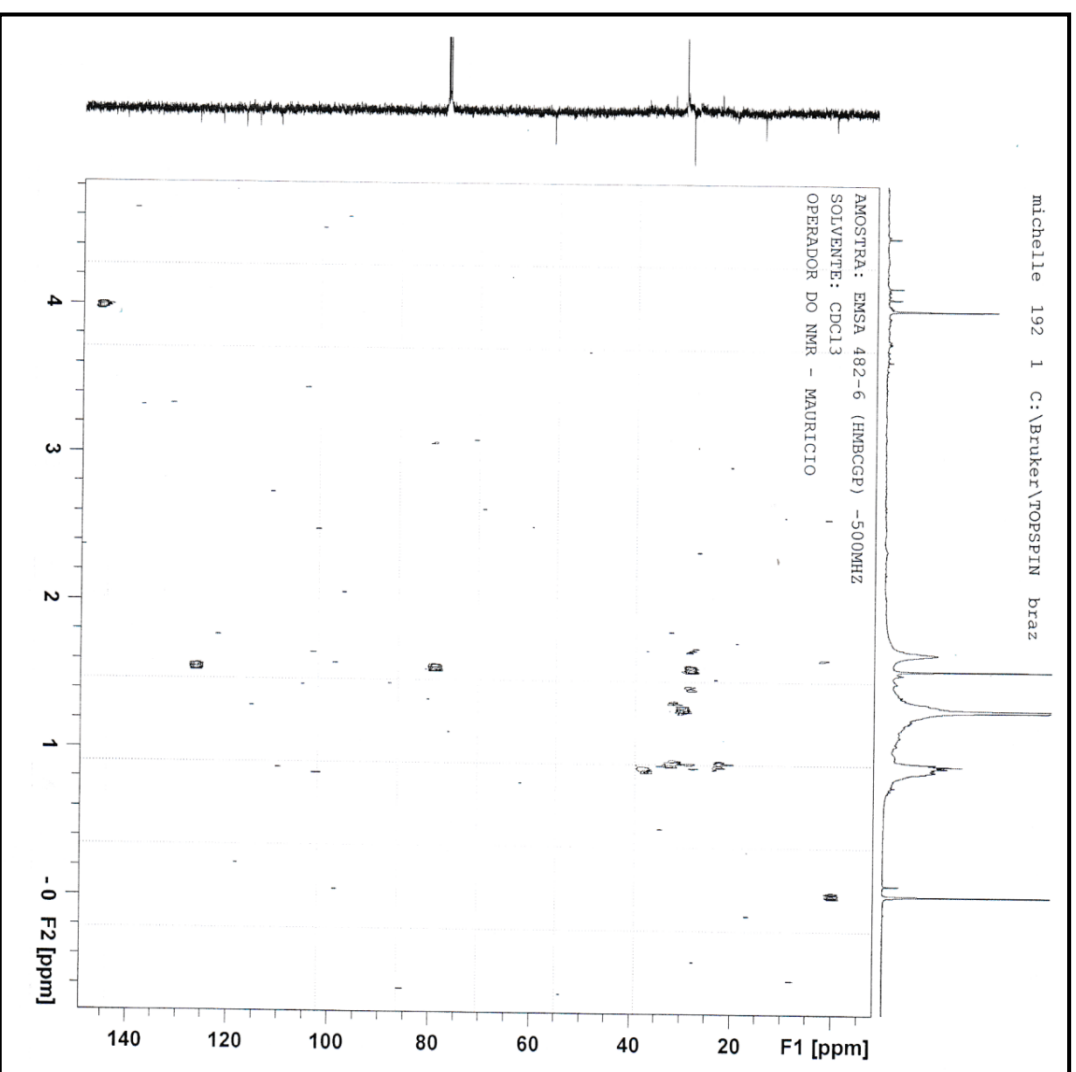


Figura 79. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias SA-03, SA-04 e SA-05 (região de 0 a 145 ppm).

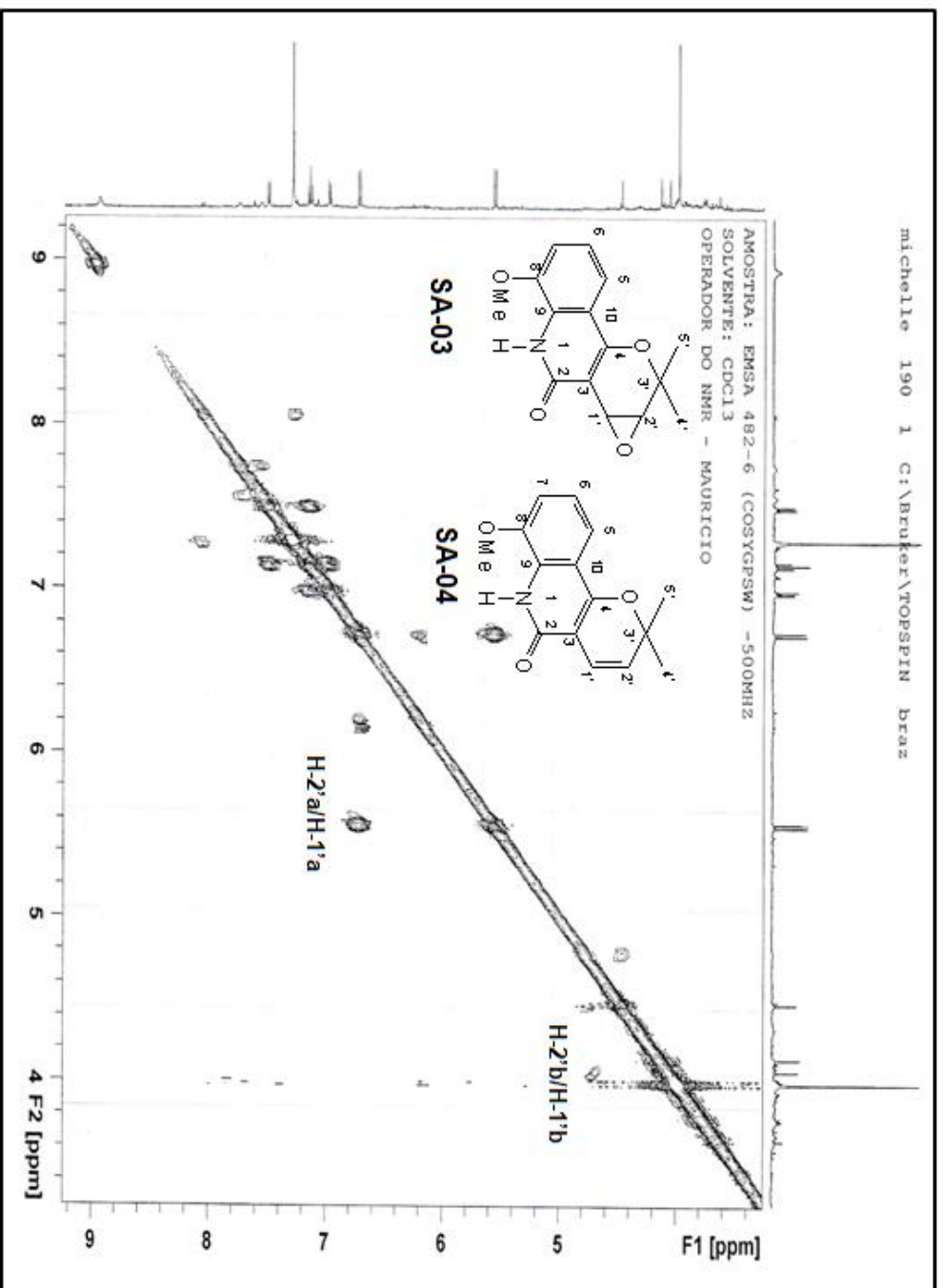


Figura 80. Espectro de ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura das substâncias **SA-03**, **SA-04** e **SA-05**.

A análise de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS (Figuras 81 e 82) realizada em acetonitrila, foi fundamental para elucidação estrutural de todos os componentes desta mistura, sendo possível observar a presença das três substâncias **SA-03**, **SA-04** e **SA-05**.

O espectro de ESI(+)-MS apresentou os picos dos três íons moleculares ($[M^+]$), com $m/z= 258,1111$, $m/z= 260,0714$ e $m/z= 274,1051$. O pico mais intenso possui $m/z= 260,0714$ e corresponde ao íon molecular da estrutura da substância **SA-05** (1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina), com fórmula molecular igual a $C_{15}H_{17}NO_3$. Assim confirmando a presença desta terceira substância na mistura de alcaloides.

O pico com $m/z= 258,1111$ corresponde ao íon molecular da estrutura da substância **SA-04** (8-metoxiflindersina), confirmando a proposta com fórmula molecular igual a $C_{15}H_{15}NO_3$. Já pico com $m/z= 274,1051$, apresenta a menor intensidade e corresponde ao íon molecular da estrutura da substância **SA-03** (1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina), confirmando a fórmula molecular igual a $C_{15}H_{15}NO_4$. A proposta de fragmentação para as três substâncias pode ser observada no Esquema 6.

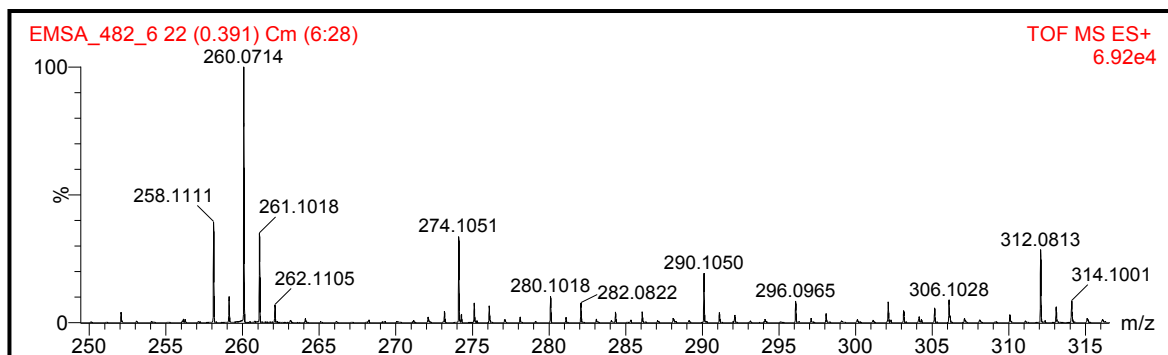


Figura 81. Espectro de ESI(+)-MS obtido em acetonitrila para a mistura das substâncias **SA-03**, **SA-04** e **SA-05**.

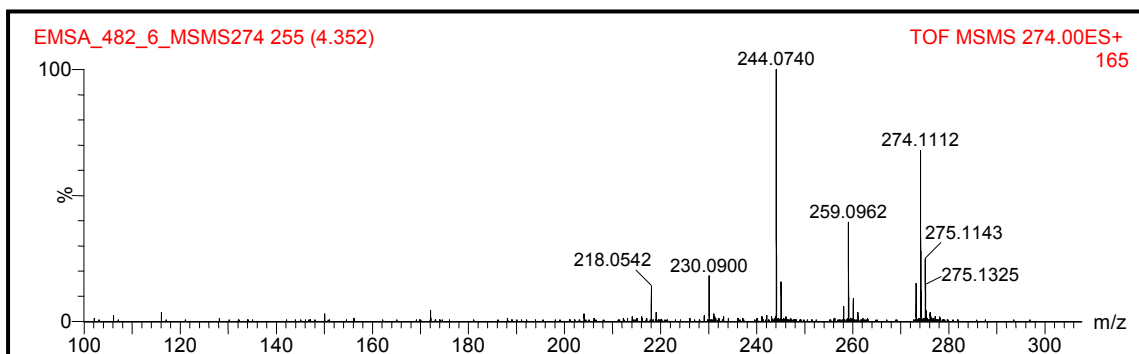
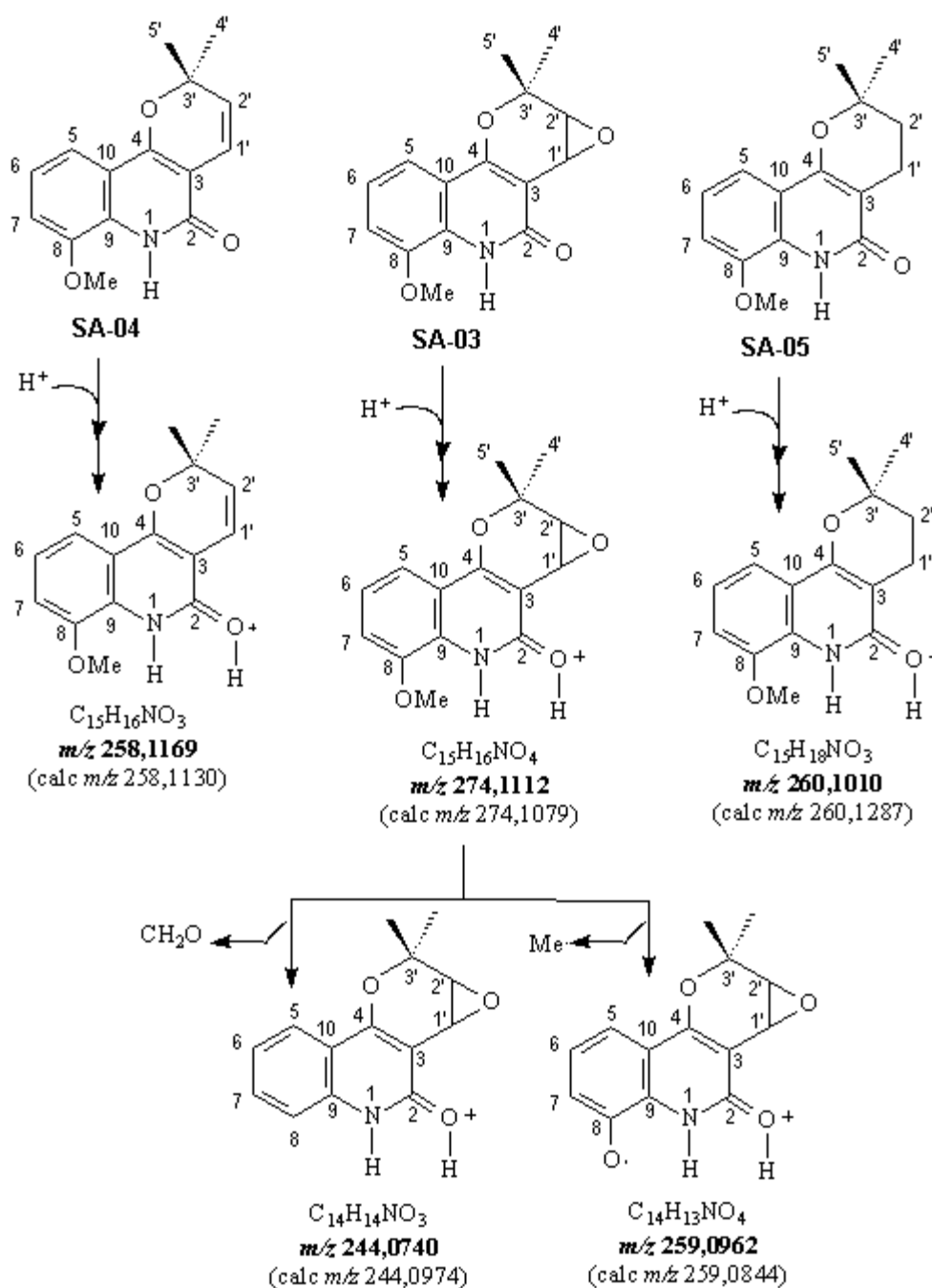


Figura 82. Espectro de ESI(+)-MS/MS do pico em m/z 274 obtido em acetonitrila para a mistura das substâncias **SA-03**, **SA-04** e **SA-05**.



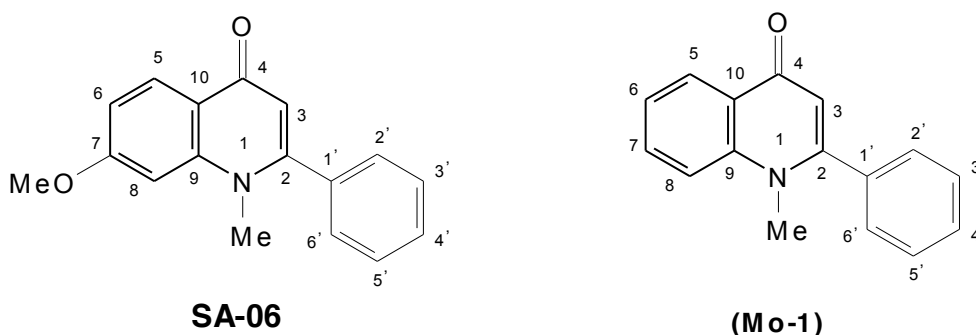
Esquema 6. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para a mistura das substâncias **SA-03**, **SA-04** e **SA-05**.

Após todas as análises descritas acima, foi realizada uma pesquisa na literatura que concluiu que a substância **SA-04** corresponde ao alcaloide 8-metoxiflindersina (CAMPBELL et. al., 1990), isolado pela primeira vez no gênero *Spiranthera*. Também foi possível concluir que a substância **SA-05** corresponde

ao alcaloide 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (BHAITACHARYYA & CHOWDHURY, 1985) isolado pela primeira vez como produto natural.

Por ultimo, conclui-se que substância **SA-03** corresponde a um alcaloide inédito na literatura, denominado 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina.

5.3.1.2.4. Determinação estrutural da substância SA-06.



A substância **SA-06** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*, na forma de um óleo amarelo e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

A análise do espectro de RMN ^{13}C para esta substância (Figura 83), permitiu reconhecer a presença de 17 átomos de carbono, sendo dois carbonos metílicos (referentes a metoxila MeO-7 e Me-N), nove carbonos metínicos (sp^2) e seis carbonos quaternários (sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Os valores de deslocamento dos átomos de carbono indicam a presença do carbono carbonílico C-4 em δ_{C} 177,3 ppm, e de um carbono quaternário C-7 em δ_{C} 163,2 ppm. O carbono da metoxila MeO-7 foi observado em δ_{C} 55,8 ppm e o sinal referente ao segundo carbono metílico foi observado em δ_{C} 37,5 ppm, atribuído ao átomo de carbono ligado ao heteroátomo de nitrogênio (Me-N).

Também foi possível observar o deslocamento dos átomos de carbono metínicos aromáticos simétricos, CH-2'/CH-6' e CH-3'/CH-5', próximos a δ_{C} 128,0 ppm e do átomo de carbono aromático CH-4' em δ_{C} 129,7 ppm (Tabela 25).

O espectro de RMN ^1H obtido para a substância **SA-06** (Figuras 84 e 85) apresenta dois dupletos, um duplo duplete, três multipletos e um simpleto na região aromática (Tabela 25).

O duplete observado em δ_{H} 8,41 ppm (1H, $J = 8,9$ Hz) foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-5, indicando um acoplamento na posição orto. Já o átomo de hidrogênio H-6 foi observado na forma de um duploduplete em δ_{H} 7,03 ppm (1H, $J = 8,9$, $J = 2,1$ Hz), confirmando o acoplamento em orto com H-5, e indicando um segundo acoplamento na posição meta. O segundo duplete observado em δ_{H} 6,88 ppm (1H, $J = 2,1$ Hz) corresponde a H-8, o valor da constante de acoplamento (J) confirma o acoplamento com H-6, confirmado pelo mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 89).

Estas atribuições são confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-5(δ_{C} 128,8)/H-5(δ_{H} 8,41), CH-6(δ_{C} 112,2)/H-6(δ_{H} 7,03) e CH-8(δ_{C} 99,3)/H-8(δ_{H} 6,88), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 86).

Já o mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 87 e 88) observa-se as correlações a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$) e três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos C-4(δ_{C} 177,3)/ H-5(δ_{H} 8,41), C-9(δ_{C} 143,8)/ H-8(δ_{H} 6,88), C-7(δ_{C} 163,2)/H-6(δ_{H} 7,03), C-7(δ_{C} 163,2)/H-8(δ_{H} 6,88), C-7(δ_{C} 163,2)/H-5(δ_{H} 8,41) e CH-6(δ_{C} 112,2)/H-8(δ_{H} 6,88) (Tabela 25). Desta forma sugerindo a presença de um anel benzênico trissubstituído, com um dos substituintes em C-7, na estrutura da substância **SA-06**.

Foi observado um simpleto em δ_{H} 6,24 ppm (1H), o qual apresentou correlação a uma ligação (J_{HC}) com o átomo de carbono metínico em δ_{C} 112,6 ppm (CH-3), ambos com deslocamentos característicos de C-H olefínicos. Este dado aliado as correlações a duas ($^2J_{\text{HC}}$) e três ligações ($^3J_{\text{HC}}$), observadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC, entre os átomos C-2(δ_{C} 152,8)/H-3(δ_{H} 6,24), C-4(δ_{C} 177,3)/H-3(δ_{H} 6,24) e C-10(δ_{C} 121,2)/ H-3(δ_{H} 6,24) permitiram atribuir este simpleto ao átomo de hidrogênio H-3.

Os três multipletos observados na região aromática foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos δ_{H} H-2' e H-6' (2H, 7,41 ppm), H-3' e H-5' (2H, 7,50 ppm) e H-4' (1H, 7,50 ppm), confirmados pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-2'/6'(δ_{C} 128,7)/H-2'/6'(δ_{H} 7,41), CH-3'/5'(δ_{C} 129,0)/H-3'/5'(δ_{H} 7,50), CH-4'(δ_{C} 129,7)/H-4'(δ_{H} 7,50) (Tabela 25), evidenciando claramente a presença de um anel aromático monosubstituído.

O mapa de correlação heteronuclear de HMBC (Figuras 87 e 88) apresentou uma correlação a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos C-2(δ_{C} 154,8)/H-2'/6'(δ_{H} 7,41) confirmando a presença do anel benzênico na posição C-2.

Na região alifática do espectro RMN ^1H foram observados apenas dois simpletos em δ_{H} 3,95 ppm (3H) e δ_{H} 3,56 ppm (3H). O simpleto em δ_{H} 3,95 ppm (3H) foi atribuído aos átomos de hidrogênio da metoxila MeO-7, devido a correlação a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos MeO-7(δ_{C} 55,8)/3H-MeO-7(δ_{H} 4,95) e a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre C-7(δ_{C} 163,2)/ 3H-MeO-7(δ_{H} 3,85), confirmando a presença de uma metoxila na posição C-7 do anel benzênico trissubstituído (Tabela 25).

O segundo simpleto em δ_{H} 3,56 ppm (3H) foi atribuído aos átomos de hidrogênio da metila Me-N, confirmado pela correlação a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos Me-N(δ_{C} 37,5)/3H-Me-N(δ_{H} 3,56) e a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) observadas entre C-2(δ_{C} 154,8)/ Me-N(δ_{H} 3,56) e C-9(δ_{C} 143,8)/ Me-N(δ_{H} 3,56) (Tabela 25).

O espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **SA-06** (Figura 90 e Esquema 7) apresentou o pico do íon molecular ($[\text{M}^+]$) com $m/z= 265$, confirmando a proposta com fórmula molecular igual a $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_2$.

Após comparação com a literatura conclui-se que a substância **SA-06** corresponde ao alcaloide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (GOODWIN et. al., 1959), isolado pela primeira vez no gênero *Spiranthera*.

Tabela 25. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **SA-06** (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**Mo-1**) (TEREZAN, 2007). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
C					
2	154,8	-	H-3	H-2'/H-6'; Me-N	154,7
4	177,3	-	H-3	H-5	177,6
7	163,2	-	H-6; H-8	H-5; MeO-7	-
9	143,8	-	H-8	H-5; Me-N	142,0
10	121,2	-	-	H-3; H-6; H-8	126,9
1'	136,1	-	H-2/H-6'	H-3; H-3'/H-5'	136,0
CH					
3	112,6	6,24 (s)	-	-	112,8
5	128,8	8,41 (d, 8,9)	-	-	126,9
6	112,2	7,03 (dd, 8,9, 2,1)	-	H-8	123,9
7	-	-	-	-	132,4
8	99,3	6,88 (d, 2,1)	-	H-6	115,9
2'/6'	128,7	7,41 (m)	H-3'/H-5'	H-4'	128,6
3'/5'	129,0	7,50 (m)	-	H2'/H-6'; H-4'	128,8
4'	129,7	7,50 (m)	-	H-2/H-6'	129,6
CH₃					
Me-N	37,5	3,56 (s)	-	-	37,2
MeO-7	55,8	3,95 (s)	-	-	-

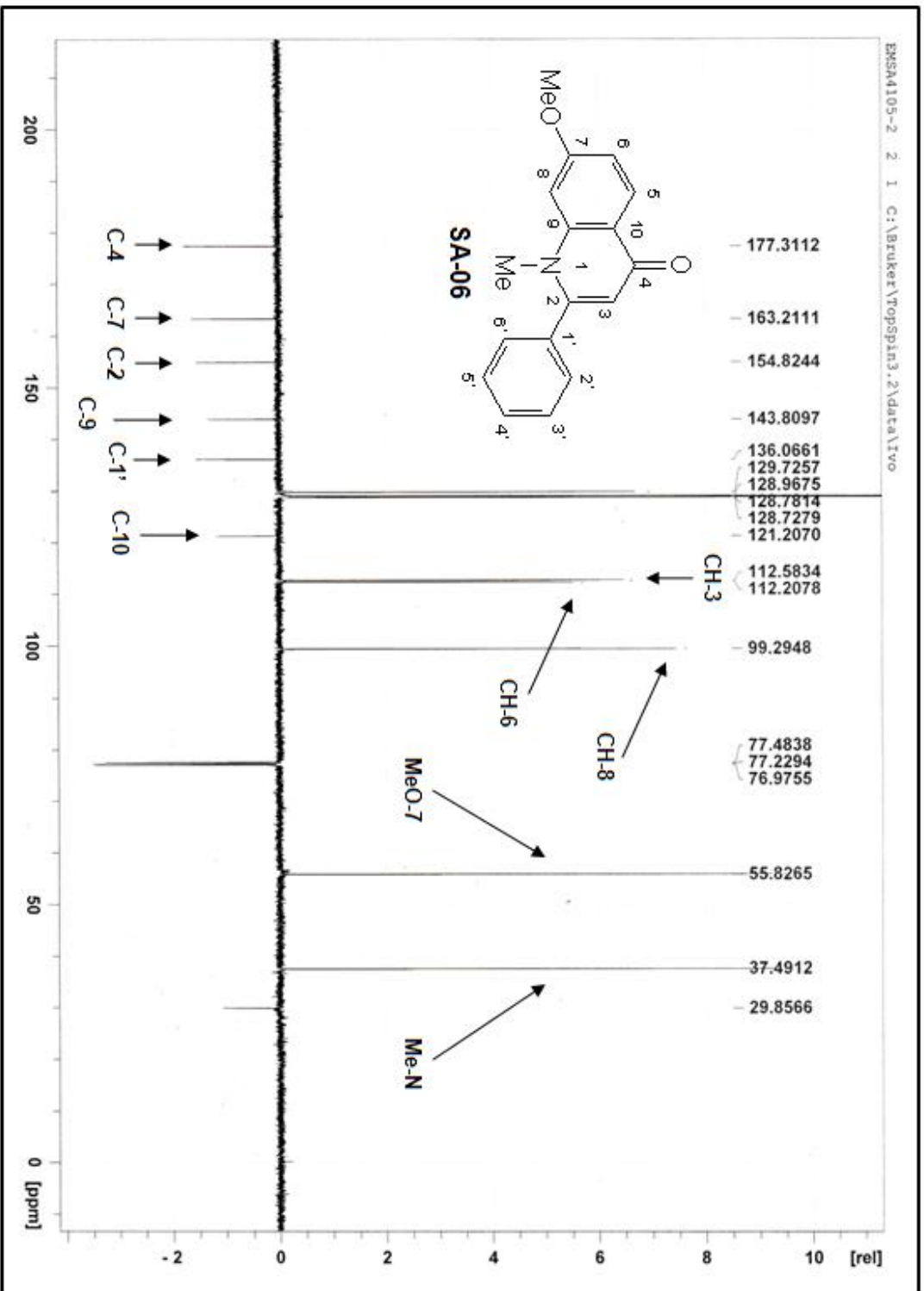


Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).

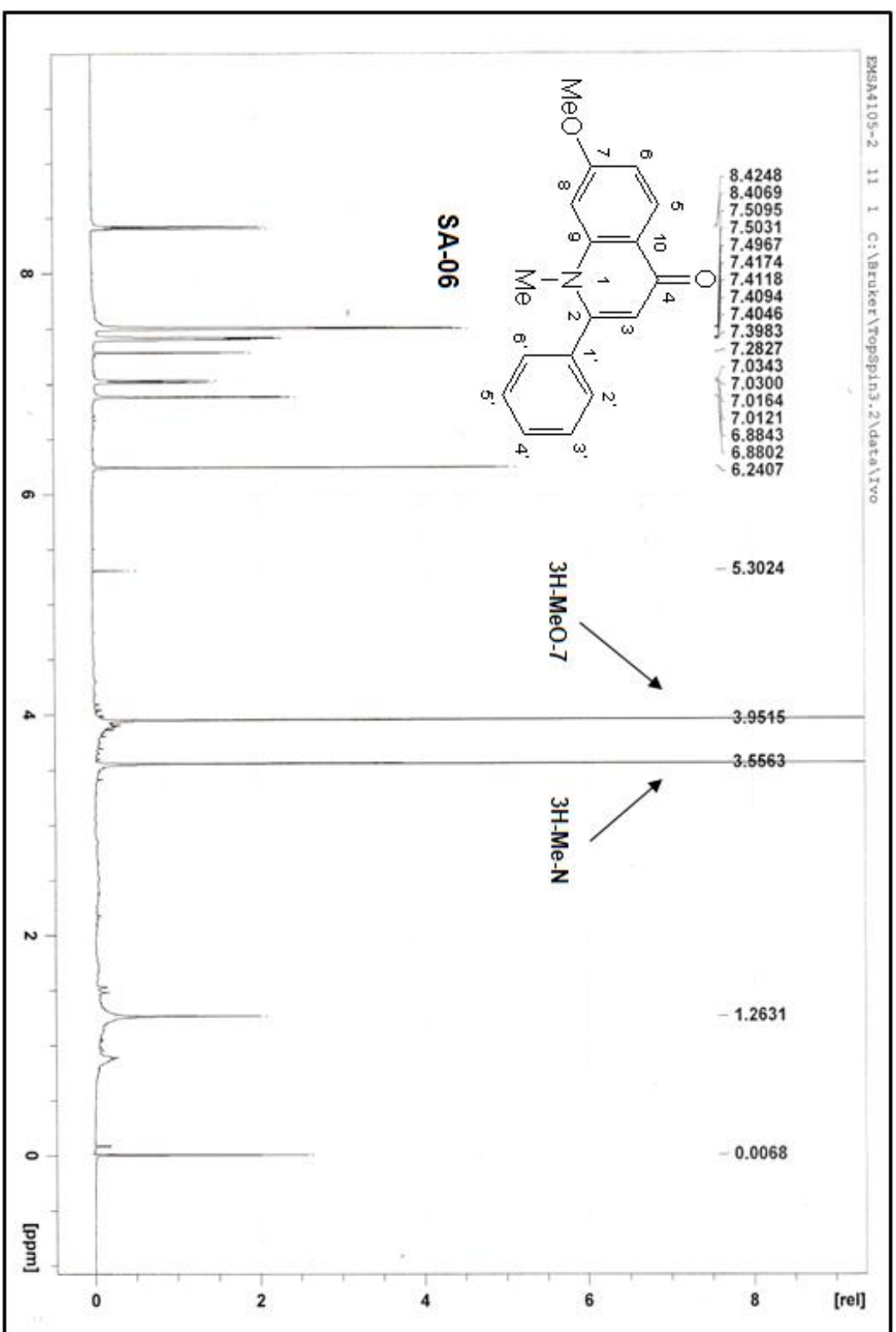


Figura 84. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **SA-06** (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).

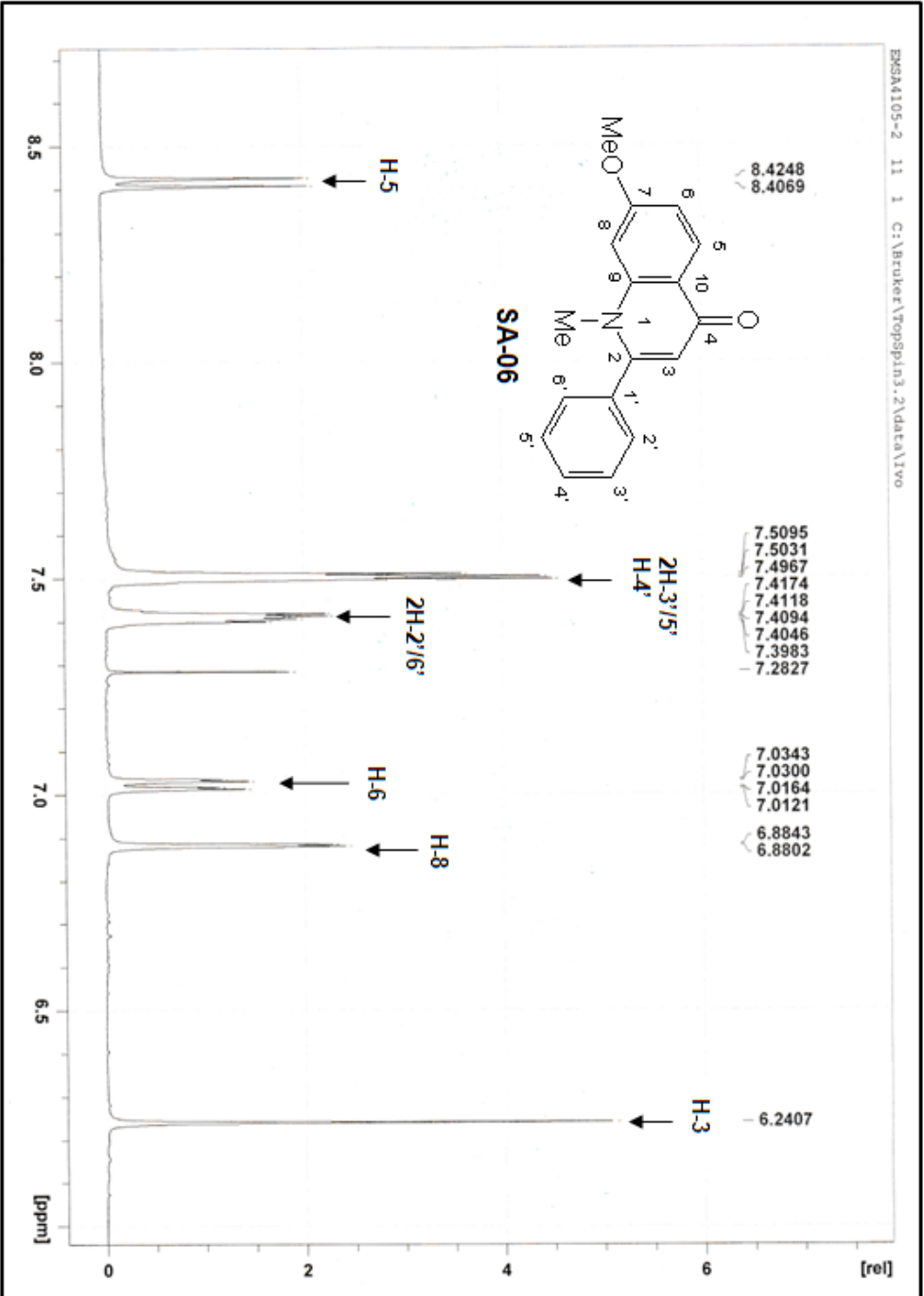


Figura 85. Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 6,0 a 8,7 ppm).

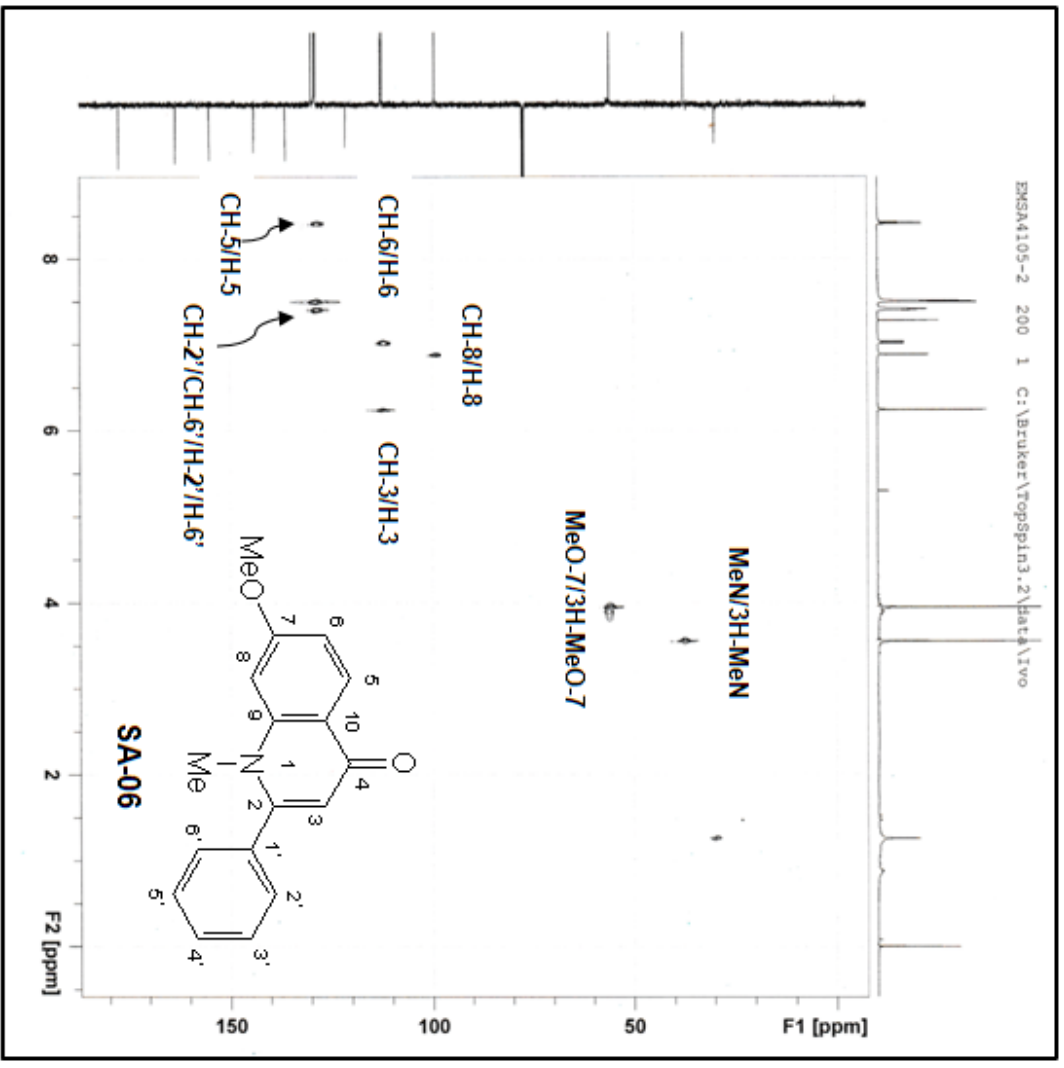


Figura 86. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxiquinolín-4-ona).

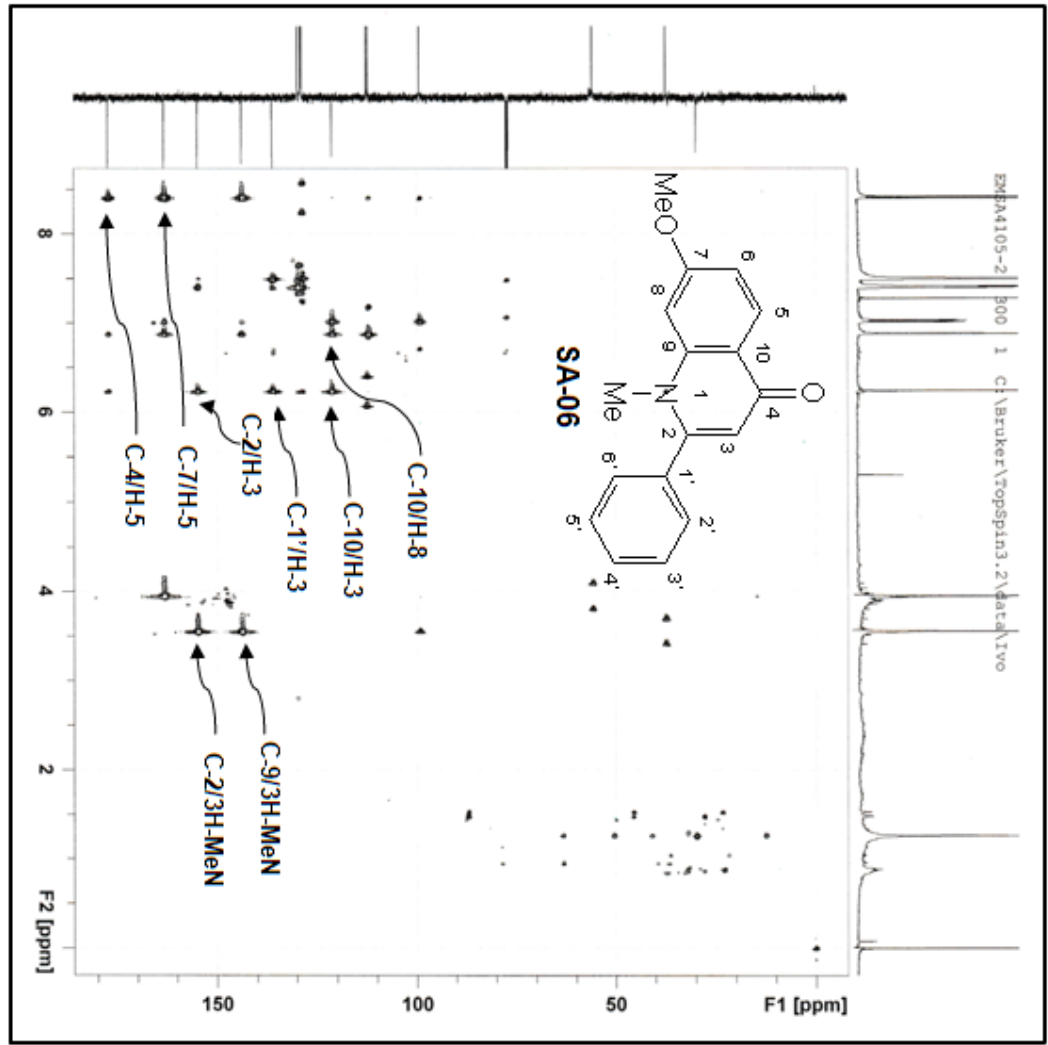


Figura 87. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).

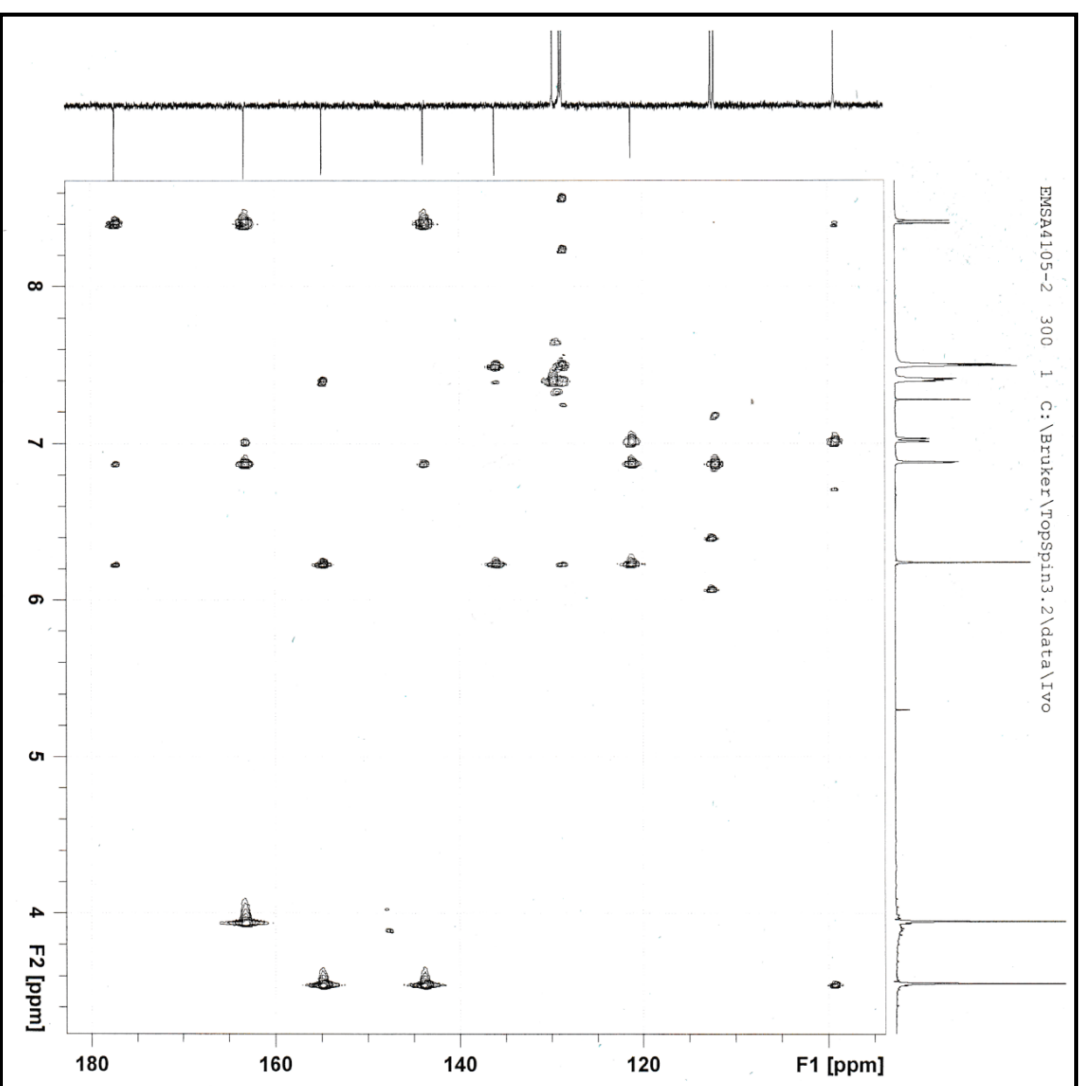


Figura 88. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **SA-06** (2-fenil-1-metil-7-metoxiquinolin-4-ona) (região de 100 a 180 ppm).

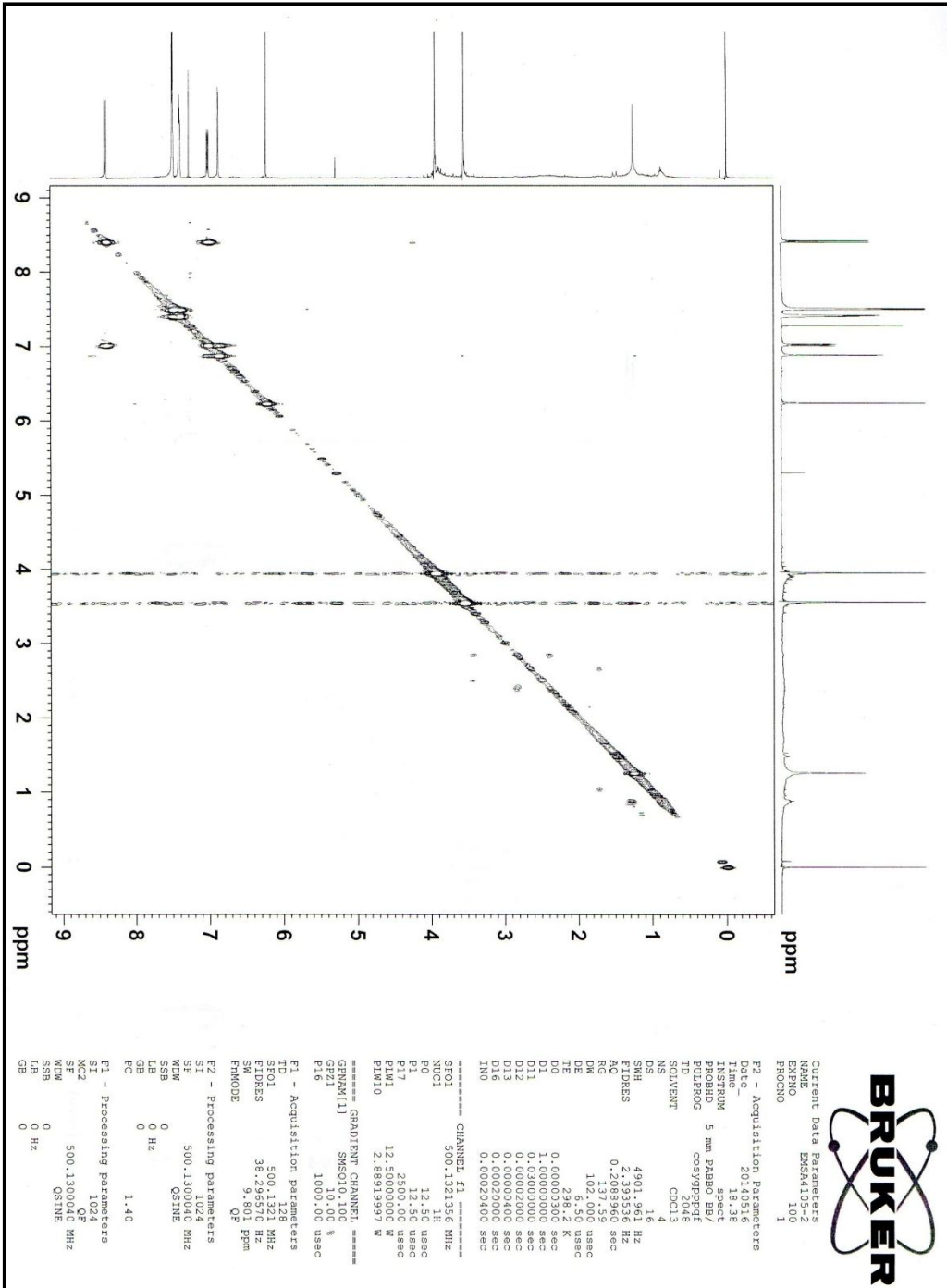


Figura 89. Espectro de H¹-H¹COSY (500 MHz, CDCl₃) obtido para as substâncias SA-06 (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).

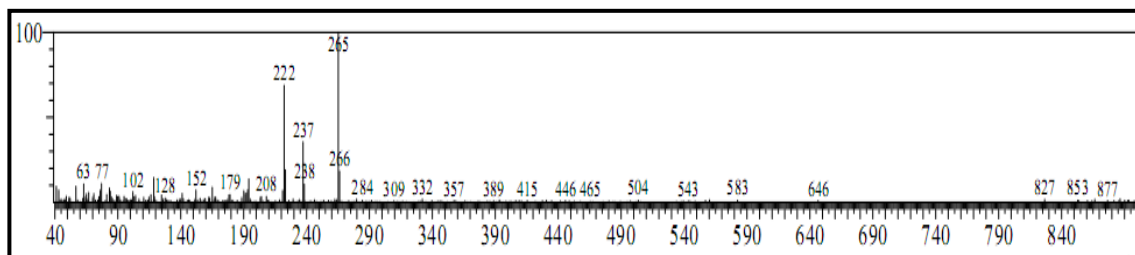
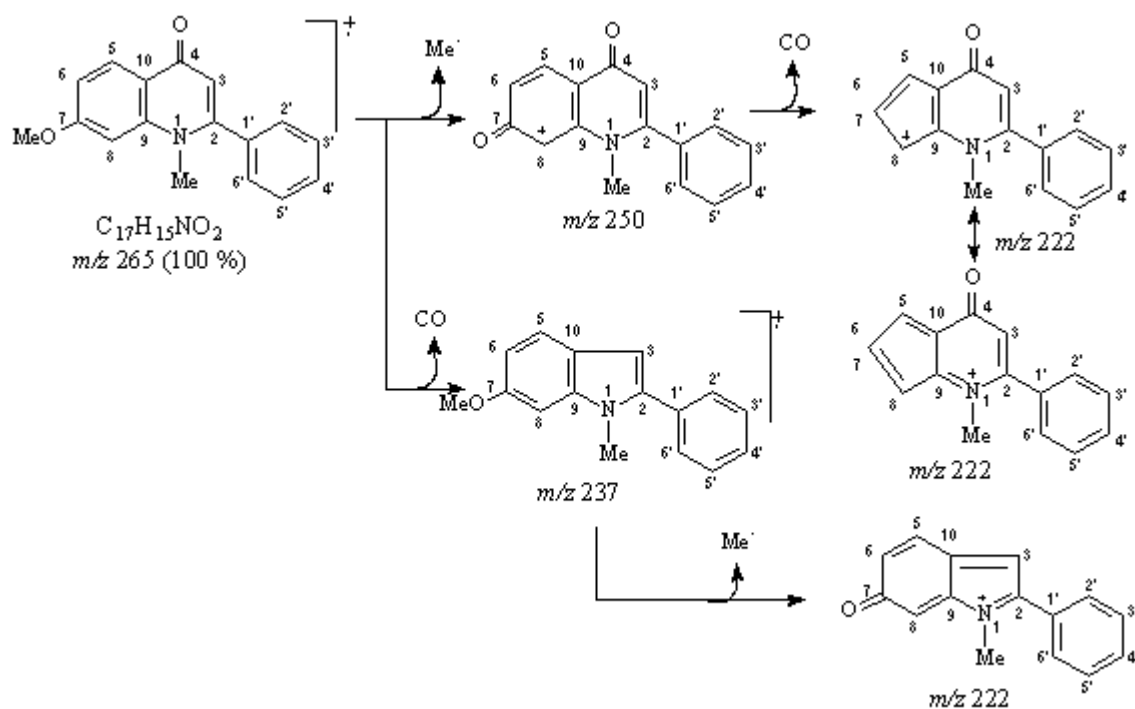
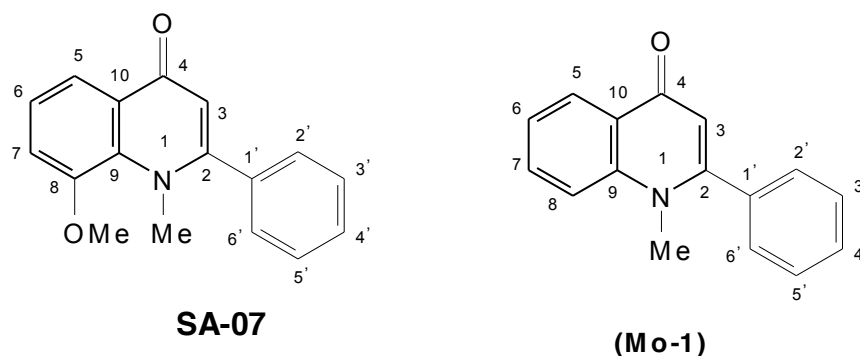


Figura 90. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **SA-06** (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).



Esquema 7. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **SA-06** (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona).

5.3.1.2.5. Determinação estrutural da substância SA-07.



A substância **SA-07** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*, na forma de um óleo amarelo e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

O espectro de RMN ^{13}C para esta substância (Figuras 91 e 92) apresentou grande semelhança com o espectro obtido para a substância **SA-06** (2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona), descrita anteriormente, pois diferem na sua estrutura apenas pela posição do grupo metoxila.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ) obtido para a substância **SA-07** permitiu reconhecer a presença de 17 átomos de carbono, sendo dois carbonos metílicos (referentes a MeO-8 e Me-N), nove carbonos metínicos (sp^2) e seis carbonos quaternários (sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Os valores de deslocamento dos átomos de carbono confirmam a presença do carbono carbonílico C-4 em δ_{C} 178,0 ppm, e dos carbonos quaternários C-2 e C-8 respectivamente em δ_{C} 157,9 ppm e δ_{C} 150,8 ppm (TEREZAN, 2007).

O carbono metílico MeO-8 foi observado em δ_{C} 56,2 ppm, com deslocamento característico de metoxila. O sinal referente ao segundo carbono metílico foi encontrado em δ_{C} 44,3 ppm, atribuído ao átomo de carbono Me-N. Também foi possível observar o deslocamento dos átomos de carbono metínicos aromáticos simétricos, CH-2'/CH-6' em δ_{C} 128,8 ppm e CH-3'/CH-5' em δ_{C} 129,9 ppm e do átomo de carbono aromático CH-4' em δ_{C} 128,9 ppm (Tabela 26) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

O espectro de RMN ^1H obtido para a substância **SA-07** (Figura 93 e 94) apresenta dois dupletos, um tripleto, três multipletos e um simpleto na região aromática do espectro (Tabela 26).

O duplete observado em δ_{H} 8,07 ppm (1H, $J = 8,0$ Hz) refere-se a H-5 e o segundo duplete observado em δ_{H} 7,19 ppm (1H, $J = 8,0$ Hz) corresponde a H-7. O átomo de hidrogênio H-6 foi observado na forma de um tripleto em δ_{H} 7,36 ppm (1H, $J = 8,0$ Hz) sugerindo um acoplamento em orto com H-5 e H-7, ambos confirmados no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 97), indicando a ausência de substituinte em C-7.

Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações a uma ligação ($^1J_{\text{HC}}$) entre os átomos CH-5(δ_{C} 118,3)/H-5(δ_{H} 8,07), CH-6(δ_{C} 124,3)/H-6(δ_{H} 7,36) e CH-7(δ_{C} 113,9)/H-7(δ_{H} 7,19), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 95).

No mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 96) observou-se as correlações a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$) entre os átomos CH-7(δ_{C} 113,9)/H-6(δ_{H} 7,36) e C-8(δ_{C} 150,8)/H-7(δ_{H} 7,19) e à três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos CH-5(δ_{C} 118,3)/H-7(δ_{H} 7,19), C-9(δ_{C} 135,5)/H-7(δ_{H} 7,19) e C-10(δ_{C} 124,3)/H-6(δ_{H} 7,36) (Tabela 26). Desta forma sugerindo a presença de um anel benzênico trissubstituído, com um dos substituintes em C-8, na estrutura da substância **SA-07**.

Em δ_{H} 6,38 ppm (1H) foi observado um simpleto, o qual apresentou correlação a uma ligação (J_{HC}) com o átomo de carbono metínico em δ_{C} 112,7 ppm (CH-3), ambos com deslocamentos característicos de C-H olefínicos. Este dado aliado as correlações a duas ($^2J_{\text{HC}}$) e três ligações ($^3J_{\text{HC}}$), observadas no mapa de correlação HMBC (Figura 96), entre os átomos C-2(δ_{C} 157,9)/H-3(δ_{H} 6,38), C-4(δ_{C} 178,0)/H-3(δ_{H} 6,38) e C-10(δ_{C} 129,5)/H-3(δ_{H} 6,38), permitiu atribuir este simpleto ao átomo de hidrogênio H-3.

Os três multipletos observados na região aromática foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2' e H-6' (2H, 7,56 ppm), H-3' e H-5' (2H, 7,53-7,51 ppm) e H-4' (1H, 7,53-7,51 ppm), observados nas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-2'/6'(δ_{C} 128,8)/H-2'/6'(δ_{H} 7,56), CH-3'/5'(δ_{C} 129,9)/H-3'/5'(δ_{H} 7,53) e CH-4(δ_{C} 128,9)/H-4'(δ_{H} 7,53), evidenciando claramente a presença de um anel aromático monosubstituído.

O mapa de correlação heteronuclear de HMBC também apresentou a correlação a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos C-2(δ_{C} 157,9)/ H-2'/6'(δ_{H} 7,56) confirmando a presença do anel benzênico na posição C-2 (Tabela 26).

Na região alifática do espectro RMN ^1H (Figura 93) foram observados dois simpletos em δ_{H} 3,99 ppm (3H) e δ_{H} 3,65 ppm (3H). O simpleto em δ_{H} 3,99 ppm (3H) foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila MeO-8, devido a correlação a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos MeO-8(δ_{C} 56,2)/3H-MeO-8(δ_{H} 3,99) e a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre C-8(δ_{C} 150,8)/ 3H-MeO-8(δ_{H} 3,99), confirmando a presença de uma metoxila na posição C-8 do anel benzênico trissubstituído.

O segundo simpleto em δ_{H} 3,65 ppm (3H) foi atribuído aos átomos de hidrogênio da metila Me-N, confirmado pela correlação a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos Me-N(δ_{C} 44,3)/3H-Me-N(δ_{H} 3,65) e a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) entre C-2(δ_{C} 157,9)/ Me-N(δ_{H} 3,65) (Tabela 26).

O espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **SA-07** (Figura 98 e Esquema 8) apresentou o pico do íon molecular ($[\text{M}^+]$) com $m/z= 265$, confirmando a proposta estrutural com fórmula molecular igual a $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_2$.

Após comparação com a literatura concluiu-se que a substância **SA-07** corresponde ao alcaloide 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona, o qual também foi isolado na espécie *Spiranthera odoratissima* (TEREZAN, 2007).

Tabela 26. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **SA-07** (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância 2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona (**Mo-1**) (TEREZAN, 2007). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
C					
2	157,9	-	H-3	H-2'/H-6'Me-N	154,7
4	178,0	-	H-3	H-5	177,6
8	150,8	-	H-7	H-6; MeO-8	-
9	135,5	-		H-5; H-7	142,0
10	129,5	-		H-3; H-6	126,9
1'	136,2	-		H-3; H-3'/H-5'	136,0
CH					
3	112,9	6,38 (s)			112,8
5	118,3	8,07 (d, 8,0)		H-7	126,9
6	124,3	7,36 (t, 8,0)			123,9
7	113,9	7,19 (d, 8,0)	H-6	H-5	132,4
8	-	-			115,9
2'/6'	128,8	7,56 (m)		H-4'	128,6
3'/5'	129,9	7,53-7,51 (m)			128,8
4'	128,9	7,53-7,51 (m)		H-2/H-6'	129,6
CH₃					
Me-N	44,3	3,65 (s)			37,2
MeO-8	56,2	3,99 (s)			-

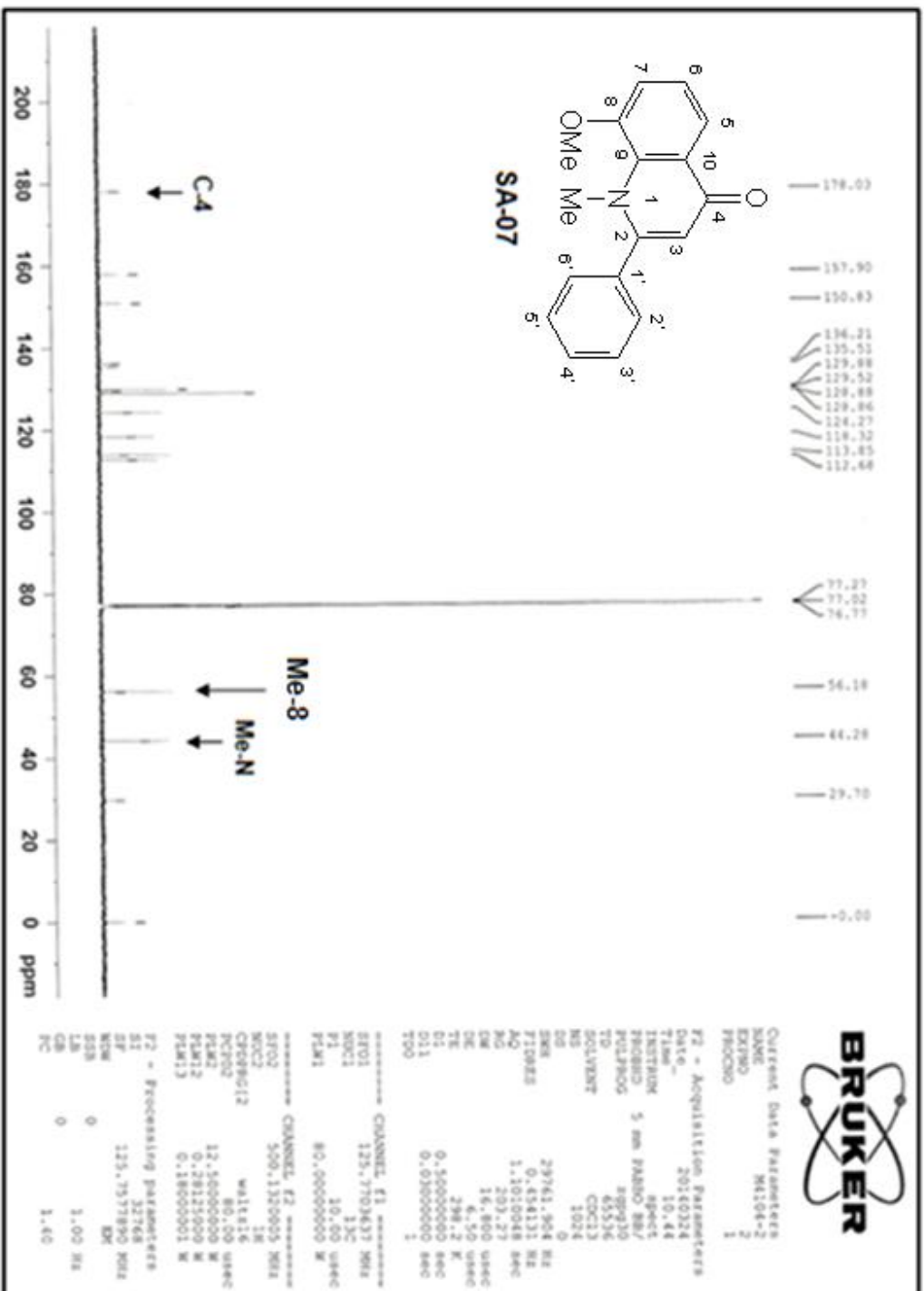


Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).

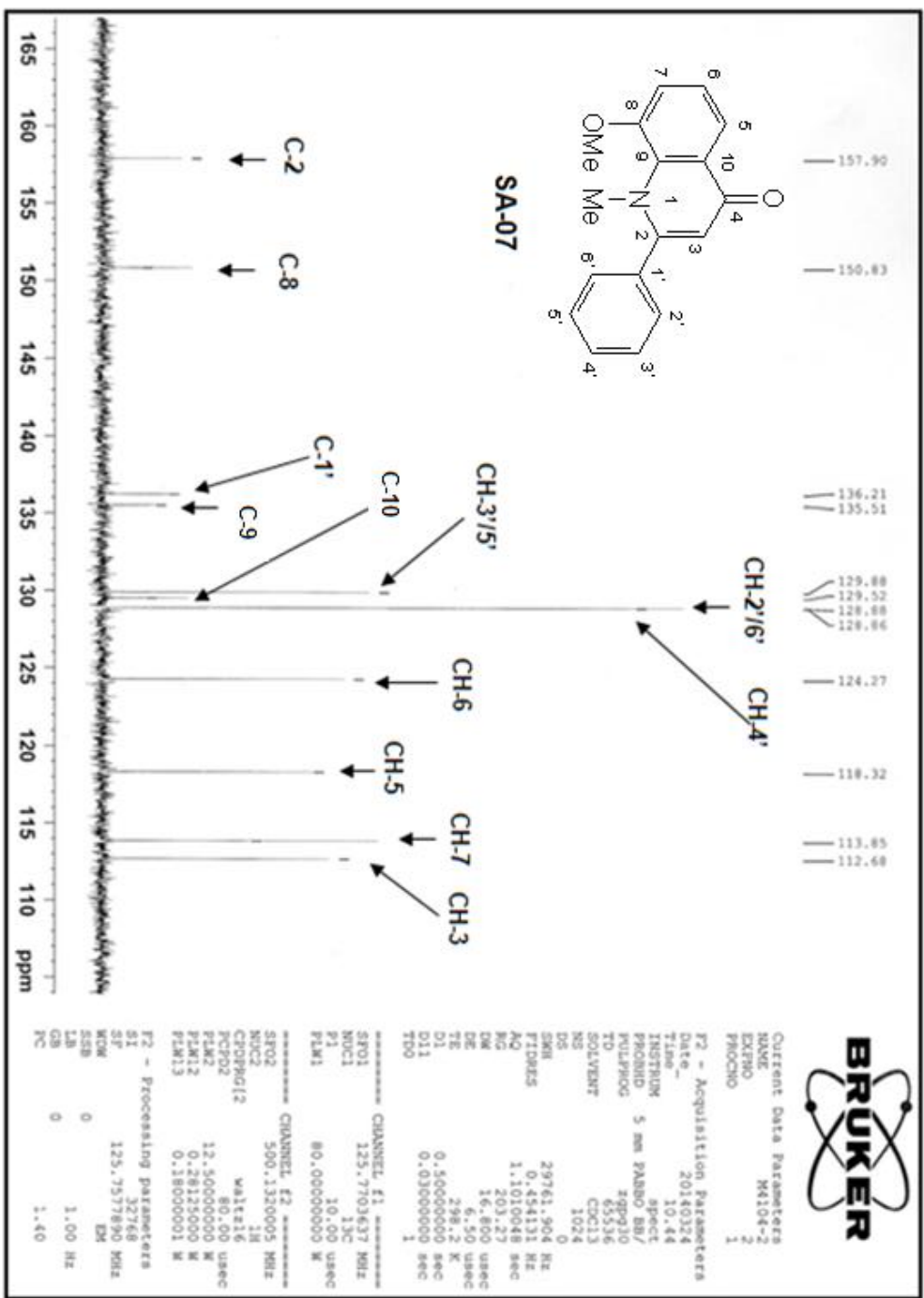


Figura 92. Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 95 a 165 ppm).

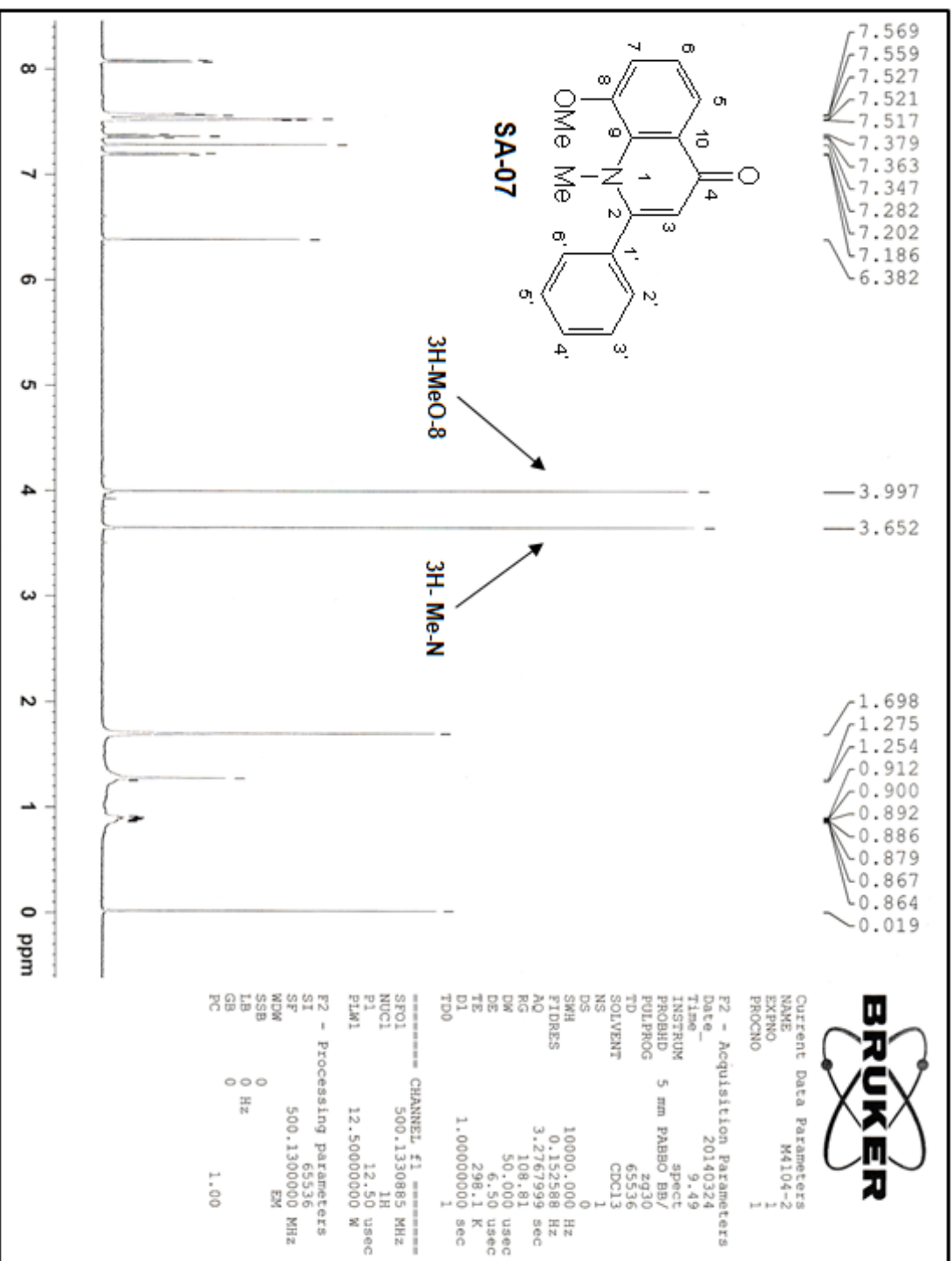


Figura 93. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **SA-07** (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).

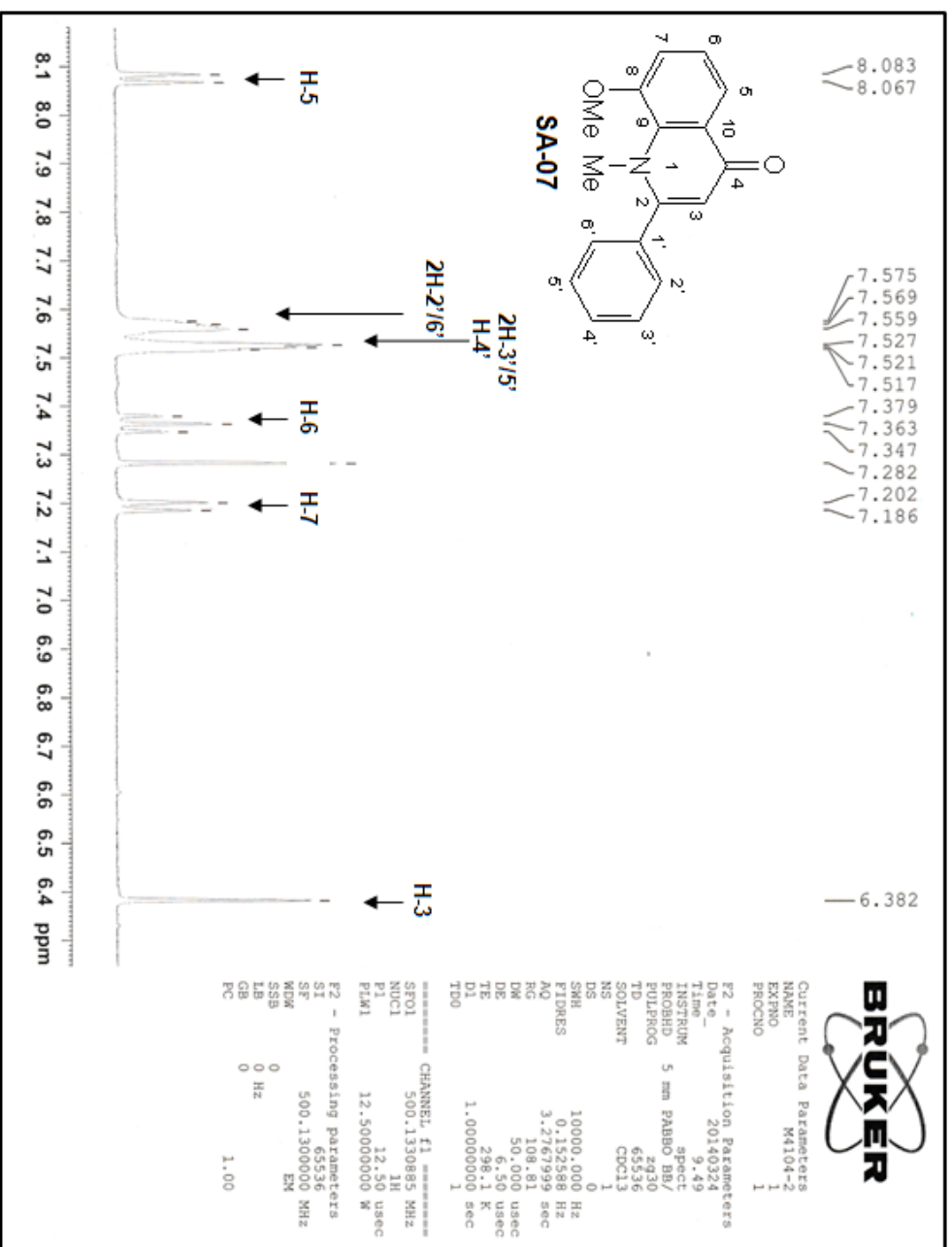


Figura 94. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **SA-07** (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona) (região de 6,3 a 8,1 ppm).

Amostra de Michelle Rodrigues

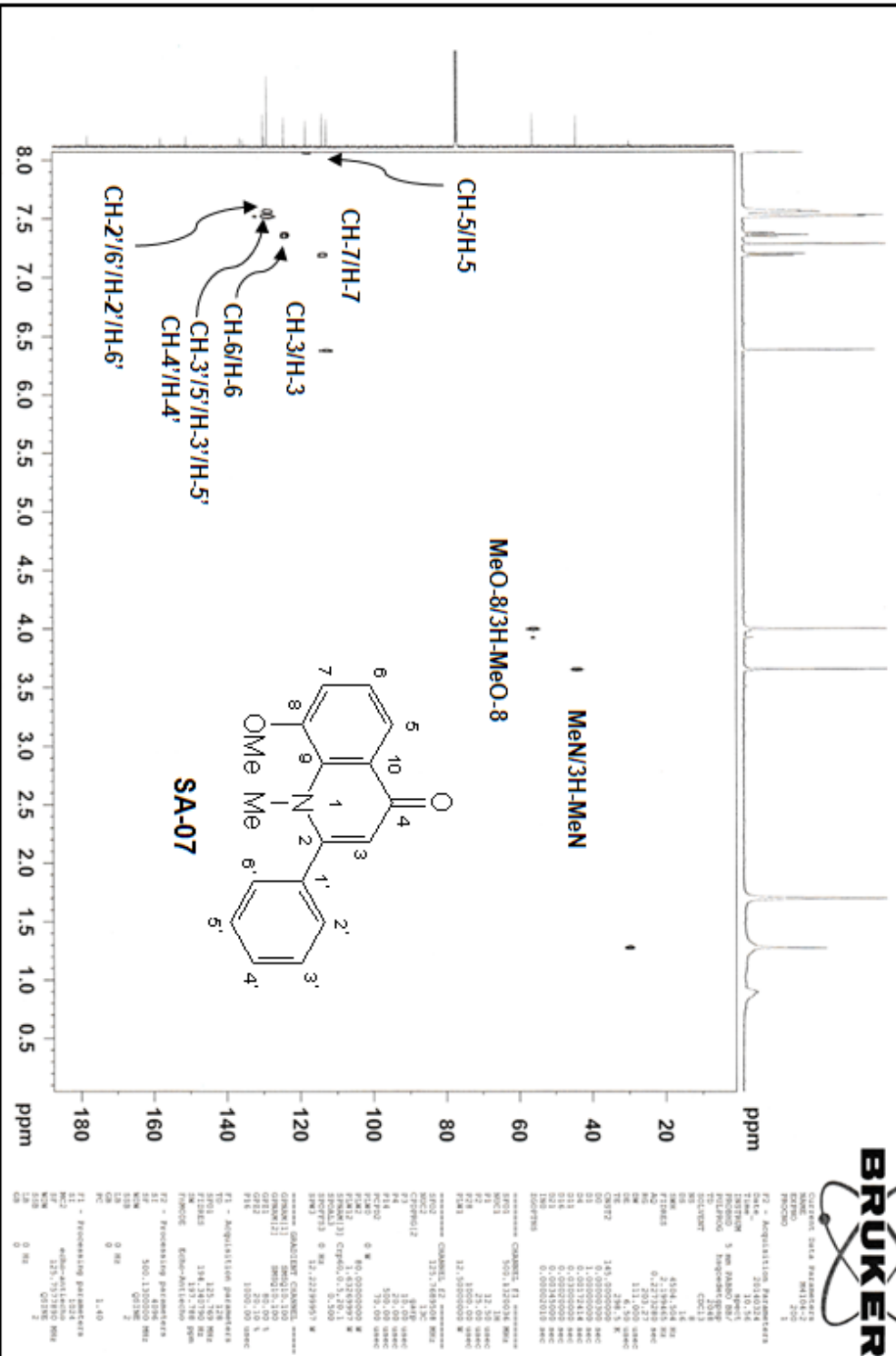


Figura 95. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona)

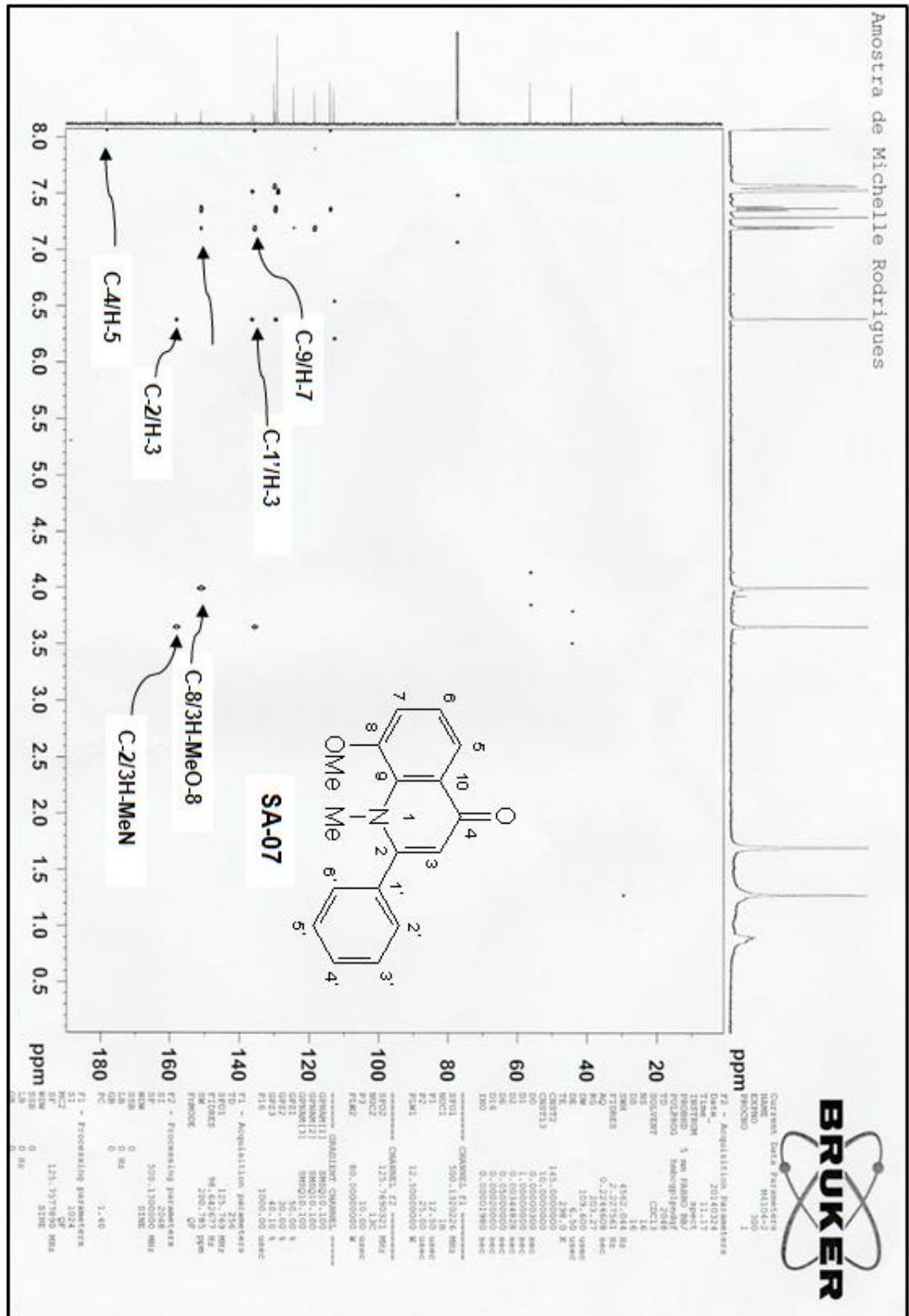


Figura 96. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).

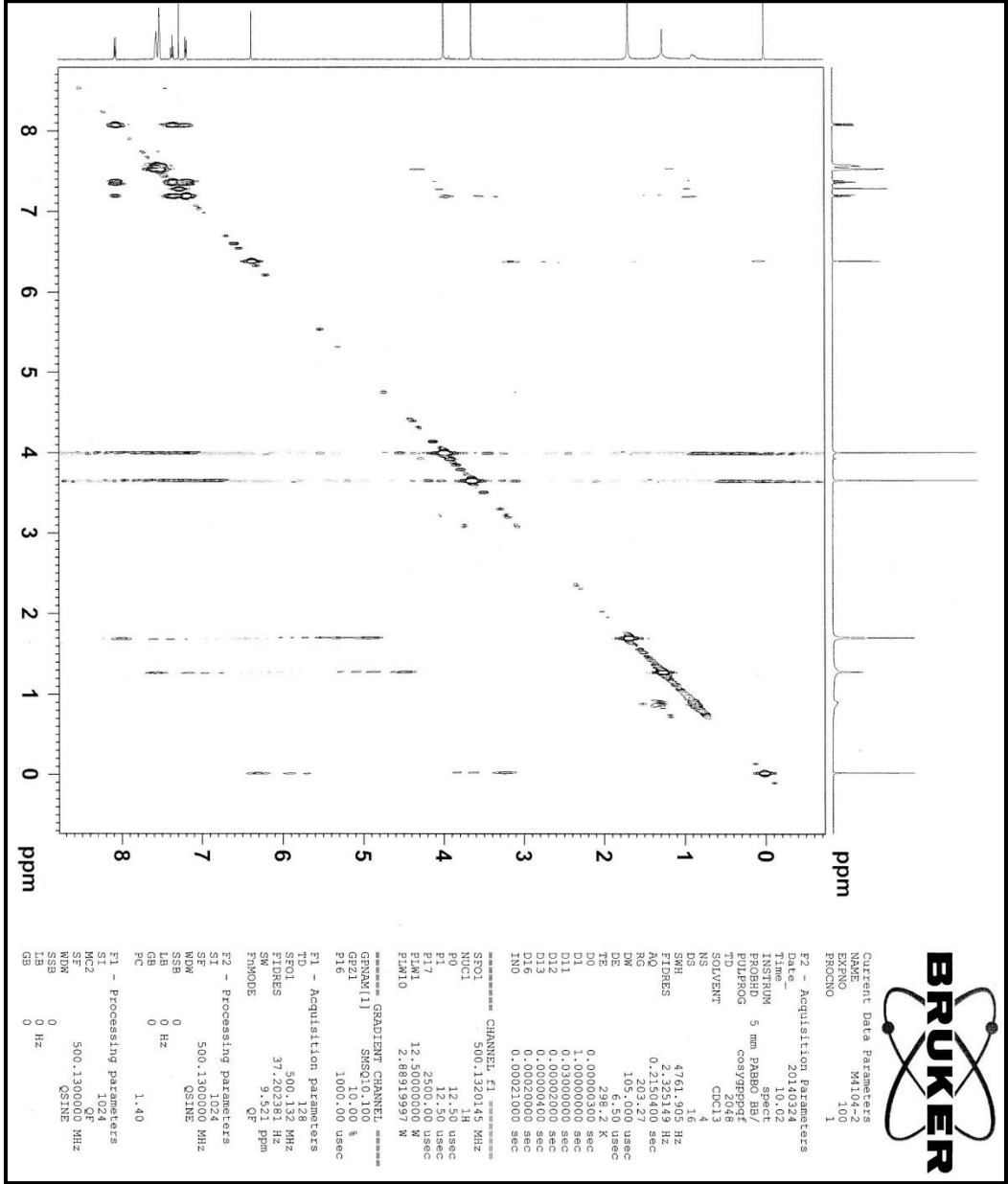


Figura 97. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para as substâncias SA-07 (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).

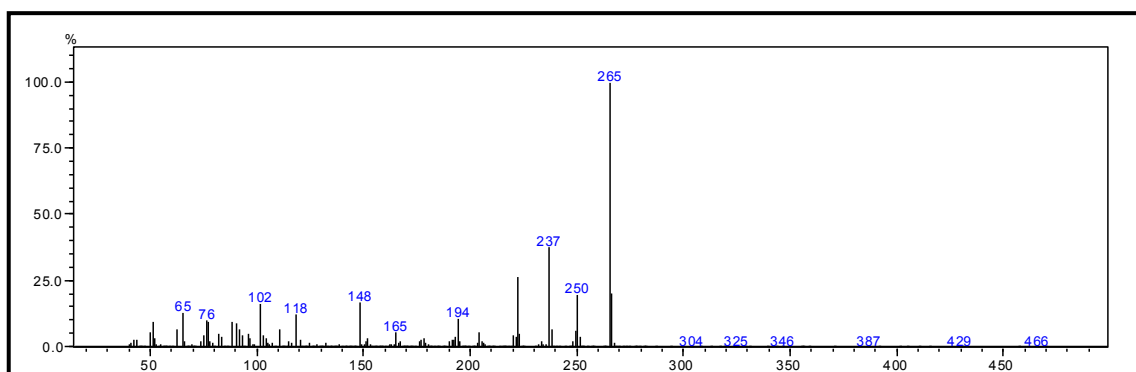
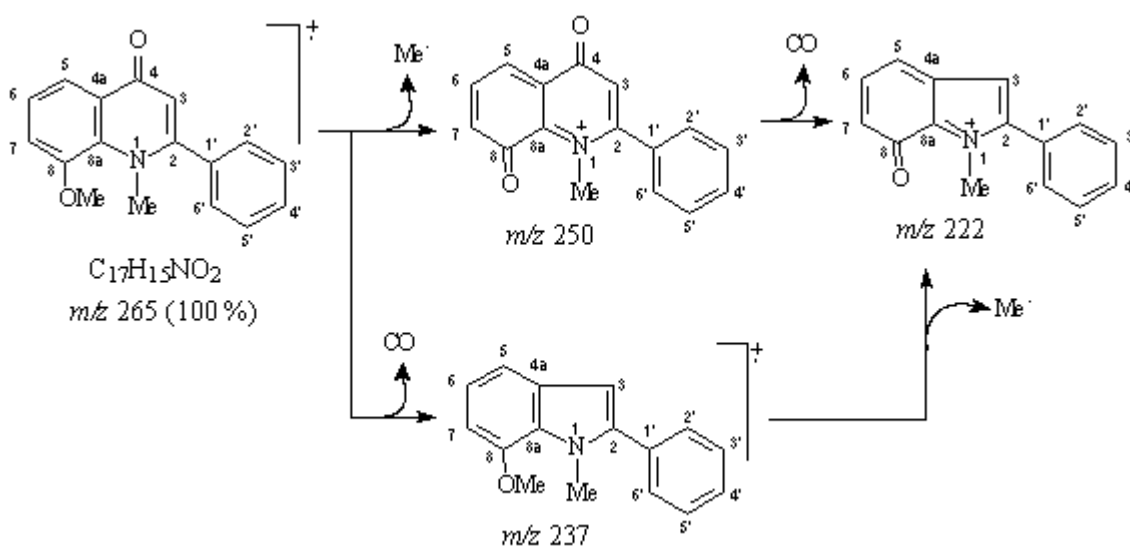
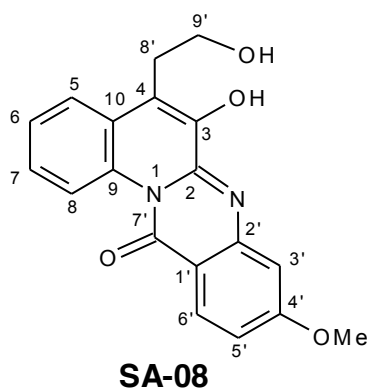


Figura 98. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **SA-07** (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).



Esquema 8. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **SA-07** (2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona).

5.3.1.2.6. Determinação estrutural da substância SA-08.



A substância **SA-08** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*, na forma de um óleo incolor e apresentou resultado positivo para o teste com o reagente Dragendorff.

O espectro de infravermelho (Figura 99) apresentou uma banda larga característica de hidroxilas livres em ν OH 3445 cm^{-1} e uma banda intensa em ν C=O 1641 cm^{-1} indicando a presença do grupo carbonila na estrutura da substância **SA-08** (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figura 100) obtido para a substância **SA-08** revelou a presença de 19 átomos de carbono, sendo um carbono metílico, dois carbonos metilênicos (sp^3), sete carbonos metínicos (sp^2) e nove carbonos quaternários (sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Os valores de deslocamento dos átomos de carbono indicaram a presença do átomo do carbono carbonílico C-7' em δ_{C} 167,7 ppm e da metoxila em δ_{C} 55,5 ppm. O átomo de carbono C-9' foi observado em δ_{C} 64,5 ppm, com deslocamento característico de átomo de carbono carbinólico (Tabela 27).

O espectro de RMN ^1H obtido para a substância **SA-08** (Figuras 101 e 102) apresentou na região aromática quatro dupletos, um duplo duplete e dois tripletos que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio pertencentes aos anéis benzênicos, presentes na estrutura da substância **SA-08**.

O átomos de hidrogênio H-5, H-6, H-7 e H-8 são observados respectivamente em δ_{H} 7,63 ppm ($d, J= 8,0\text{ Hz}$), δ_{H} 7,03 ppm ($t, J= 8,0\text{ Hz}$), δ_{H} 7,17

ppm (t , $J = 8,0$ Hz) e δ_{H} 7,43 ppm (d , $J = 8,0$ Hz), com multiplicidades características de anel benzênico 1,2-disubstituído. Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{CH}) entre os átomos CH-5 (δ_{C} 120,5)/H-5(δ_{H} 7,63), CH-6(δ_{C} 120,5)/H-6(δ_{H} 7,03), CH-7(δ_{C} 124,8)/H-7(δ_{H} 7,17) e CH-8 (δ_{C} 112,8)/H-8(δ_{H} 7,43), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figuras 103 e 104).

O mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 105 e 106) contribuiu com as correlações a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre C-10(δ_{C} 131,0)/ H-5(δ_{H} 7,63) e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre C-9(δ_{C} 138,0)/H-7(δ_{H} 7,17), confirmando a presença de um anel benzênico 1,2- disubstituído na estrutura da substância **SA-08**.

Ainda na região aromática do espectro RMN ^1H , foram observados os sinais em δ_{H} 7,37 ppm (d , $J = 2,5$ Hz), δ_{H} 7,39 ppm (dd , $J = 8,8, 2,5$ Hz) e δ_{H} 7,79 ppm (d , $J = 8,8$), que correspondem aos hidrogênio H-3', H-5' e H-6', respectivamente.

As correlações observadas a uma ligação (J_{CH}) entre os átomos CH-3'(δ_{C} 106,3)/H-3'(δ_{H} 7,37), CH-5'(δ_{C} 126,7)/H-5'(δ_{H} 7,39) e CH-6'(δ_{C} 129,9)/H-6'(δ_{H} 7,79) e a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre C-1'(δ_{C} 117,1)/H-6'(δ_{H} 7,79), C-2'(δ_{C} 147,32)/H-3'(δ_{H} 7,37), C-4'(δ_{C} 167,7)/H-3'(δ_{H} 7,37) e C-4'(δ_{C} 167,7)/H-5'(δ_{H} 7,39), confirmam as atribuições realizadas e a presença do segundo anel benzênico 1,2,4-trisubstituído na estrutura da substância **SA-08** (Tabela 27).

Já na região alifática do espectro de RMN ^1H (Figura 101) foram observados dois tripletos e um simpleto. O simpleto em δ_{H} 4,28 ppm (3H) foi atribuído aos três átomos de hidrogênio da metoxila MeO-4, devido a correlação a uma ligação (J_{CH}) entre os átomos MeO-4'(δ_{C} 55,0)/3H-MeO-4' e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre C-4'(δ_{C} 167,7)/3H-MeO-4'(δ_{H} 4,28), confirmando a presença da metoxila na posição C-4' do anel benzênico 1,2,4-trisubstituído.

Os dois tripletos observados em δ_{H} 3,67 ppm (2H, $J = 7,2$ Hz) e δ_{H} 3,97 ppm (2H, $J = 7,2$ Hz) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio 2H-8' e 2H-9' do grupo hidroxietil. O mapa HSQC confirmou estas atribuições com as correlações heteronucleares a uma ligação (J_{CH}) entre os átomos CH₂-8'(δ_{C} 29,6)/2H-8'(δ_{H} 3,67) e CH₂-9'(δ_{C} 64,5)/2H-9'(δ_{H} 3,97). Já o mapa HMBC apresentou as correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre os átomos C-3(δ_{C} 133,5)/2H-8'(δ_{H} 3,67) e

C-4(δ_C 116,4)/2H-9'(δ_H 3,97), confirmando a presença do grupo hidroxietil na posição C-4 da estrutura da substância **SA-08**.

O mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (Figura 107) também confirmou a estrutura proposta para substância **SA-08**.

A análise de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS (Figuras 108 e 109) revelaram o pico do íon molecular ($[M^+]$) com $m/z= 336,1152$ que corresponde a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, confirmando a estrutura proposta para a substância **SA-08**.

Mas para confirmar a presença dos dois grupos hidroxílicos, também foi realizada a reação de acetilação da substância **SA-08** usando piridina e anidrido acético (1:2). O espectro de ESI(+)-MS (Figura 110) obtido para o derivado acetilado **SA-08a** apresentou o pico com $m/z= 420,1338$ que corresponde a fórmula molecular igual a $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$, confirmando definitivamente a estrutura proposta para a substância **SA-08**. As propostas de fragmentação podem ser observadas nos Esquemas 9 e 10.

Após todas as análises descritas acima, foi realizada uma pesquisa na literatura. Esta pesquisa revelou que a substância **SA-08** corresponde a um alcaloide inédito na literatura, denominado atlanticol (3-hidroxi-4-(2-hidroxiethyl)-4'-methoxi-7'*H*-quinolino[2,1-*b*]quinazolin-7'-ona).

Tabela 27. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **SA-08** (atlanticol), em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	155,0	-		2H-8'
3	133,5	-		H-5; 2H-9'
4	116,4	-	2H-8'	H-6; H-8; 2H-8'
9	138,0	-		2H-8'
10	131,0	-	H-5	H-5; H-7
1'	117,1	-	H-6'	
2'	147,3	-	H-3'	H-6'
4'	167,7	-	H-3'; H-5'	H-6'; MeO-4'
7'	167,7	-		H-6'
CH				
5	120,5	7,63 (d, 8,0)		H-7
6	120,5	7,03 (t, 8,0)		H-8
7	124,8	7,17 (t, 8,0)		H-5
8	112,8	7,43 (d, 8,0)		H-6
3'	106,3	7,37 (d, 2,5)		H-5'
5'	126,7	7,39 (dd, 8,8, 2,5)		H-3'
6'	129,9	7,79 (d, 8,8)		
CH₂				
8'	29,6	3,67 (t, 7,2)	2H-9'	
9'	64,5	3,97 (t, 7,2)	2H-8'	
CH₃				
MeO-4'	55,5	4,28 (s)		

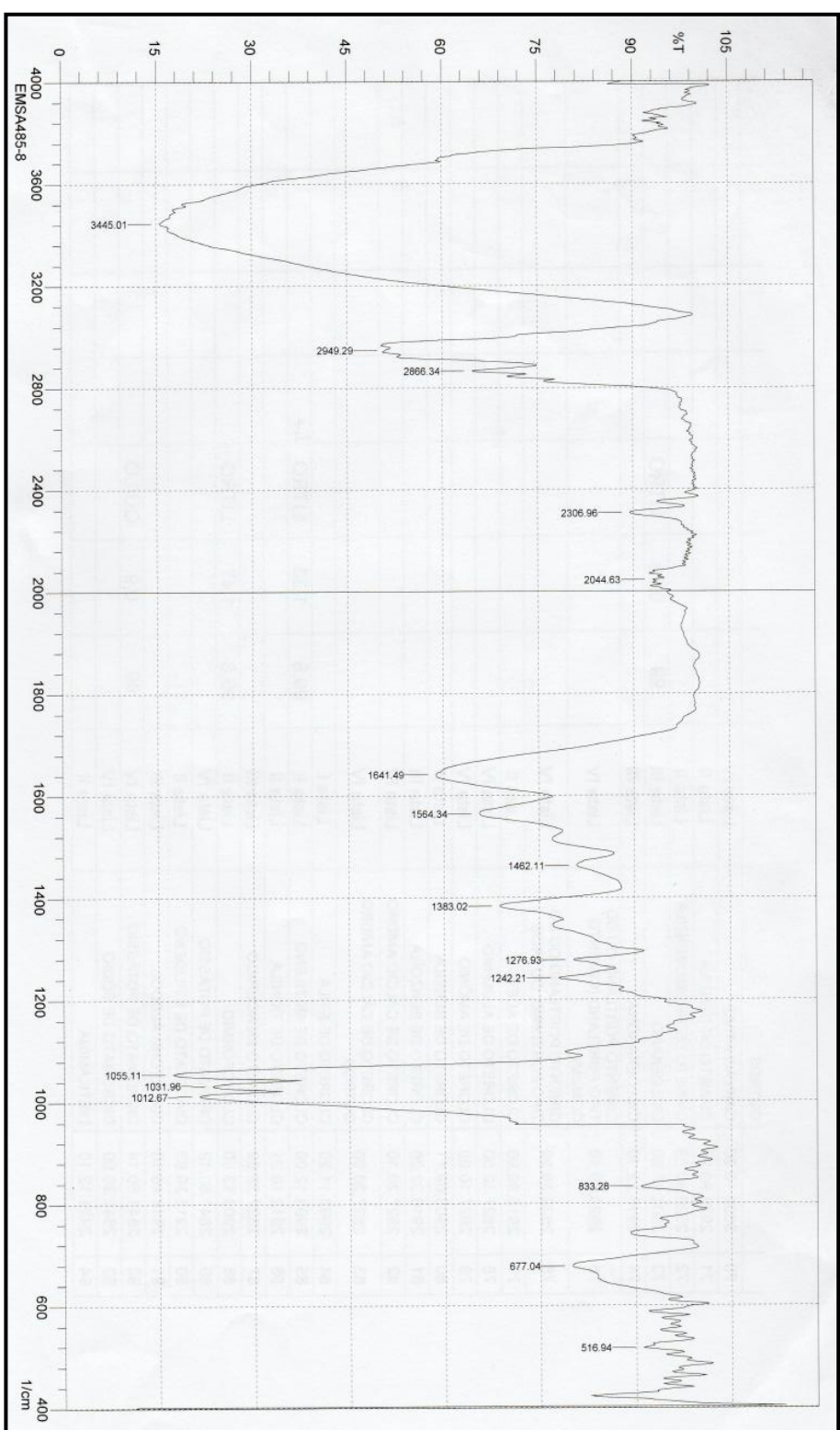


Figura 99. Espectro na região do infravermelho obtido para a substância SA-08 (atlanticoi).

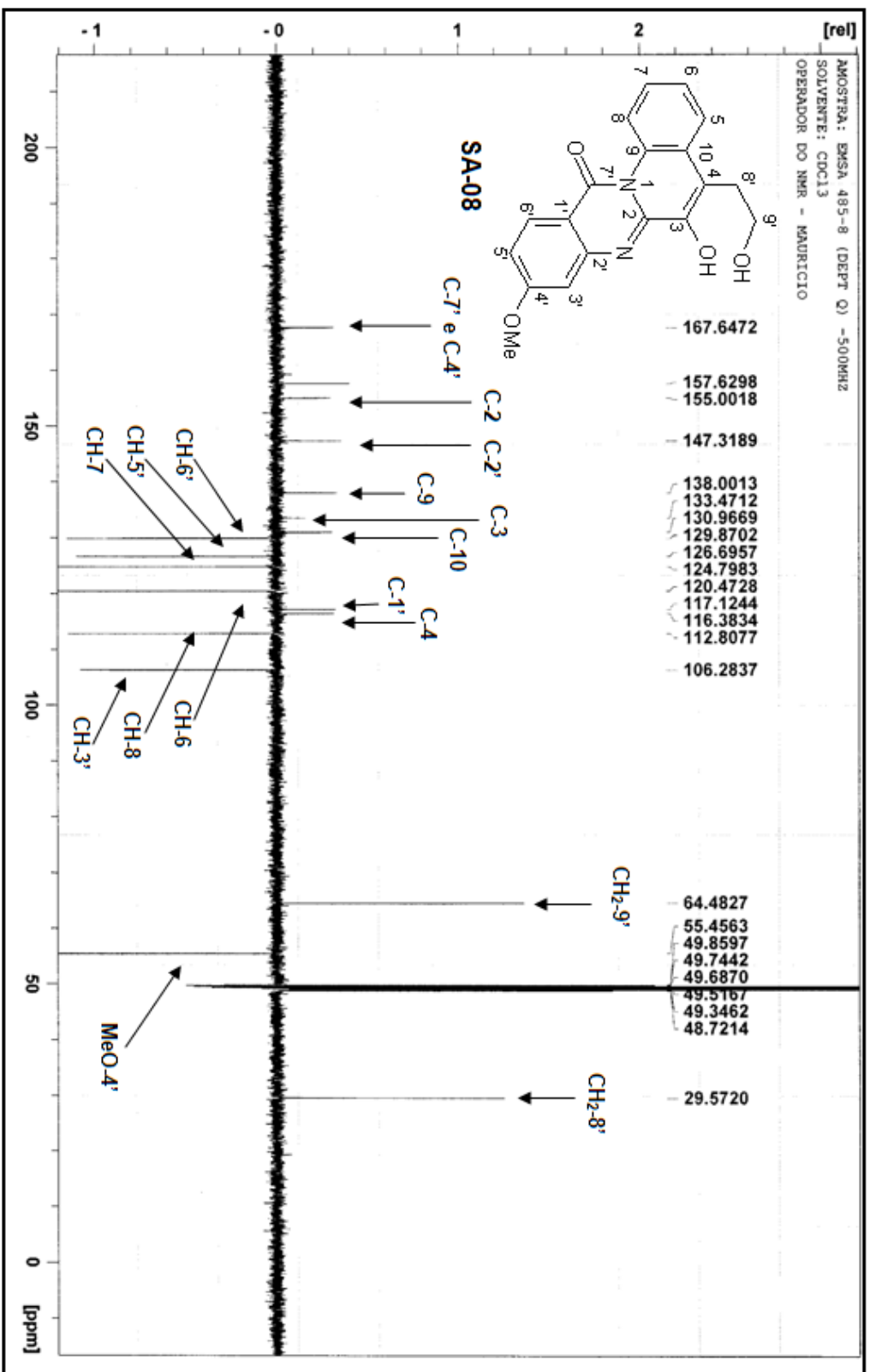


Figura 100. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-08 (atlântico).

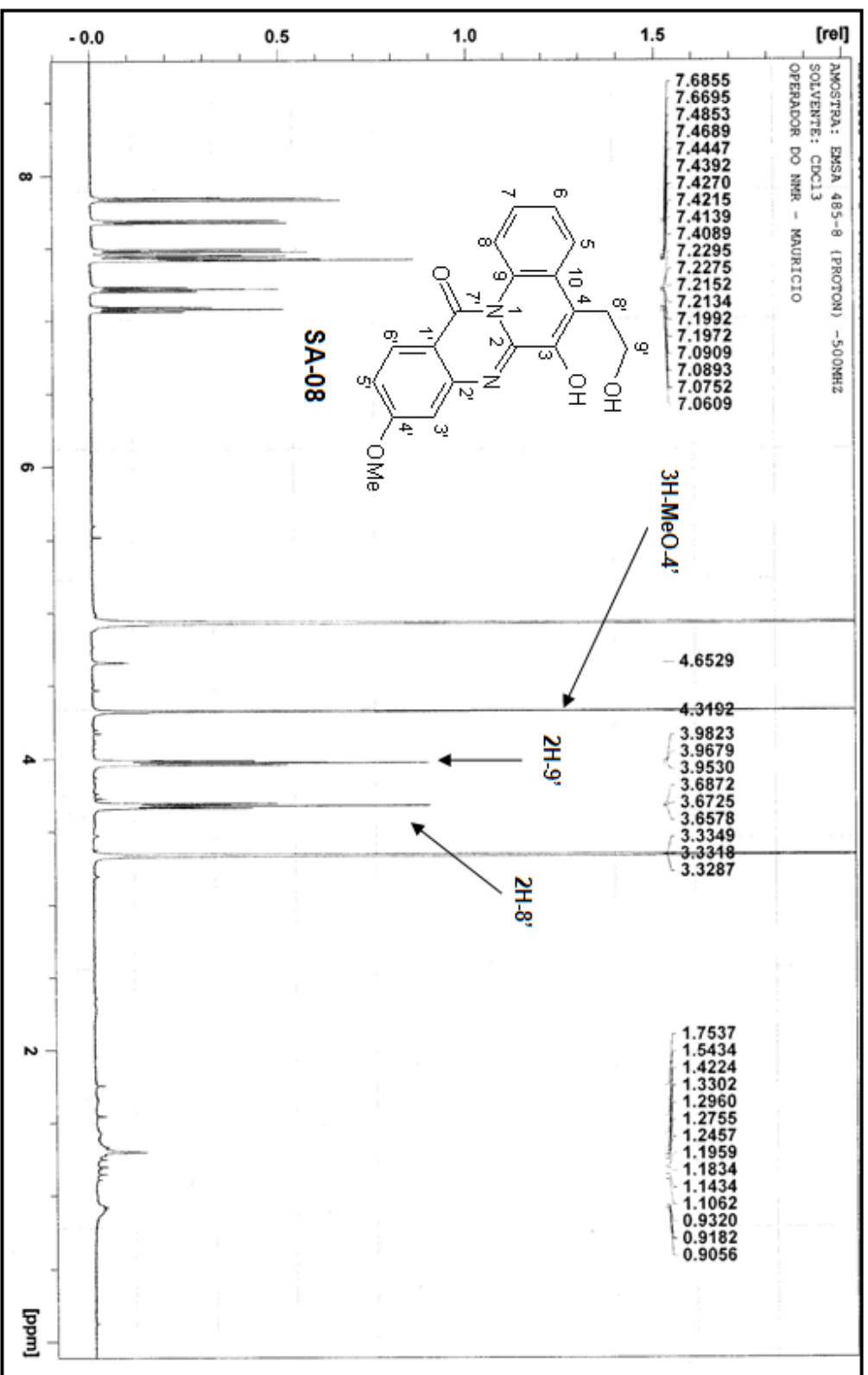


Figura 101. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-08 (atlântico).

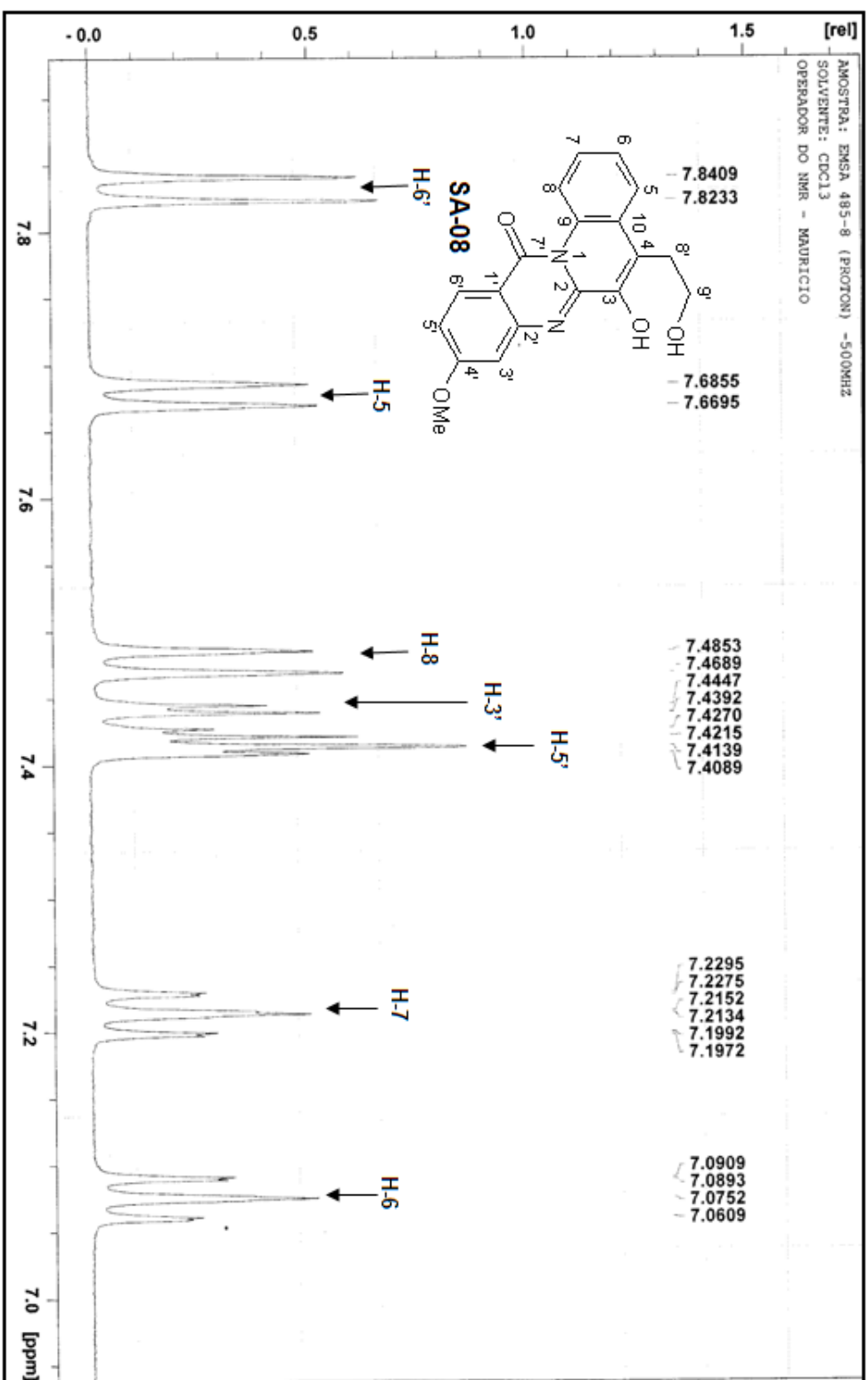


Figura 102. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-08 (atlântico) (região de 7,05 a 7,9 ppm).

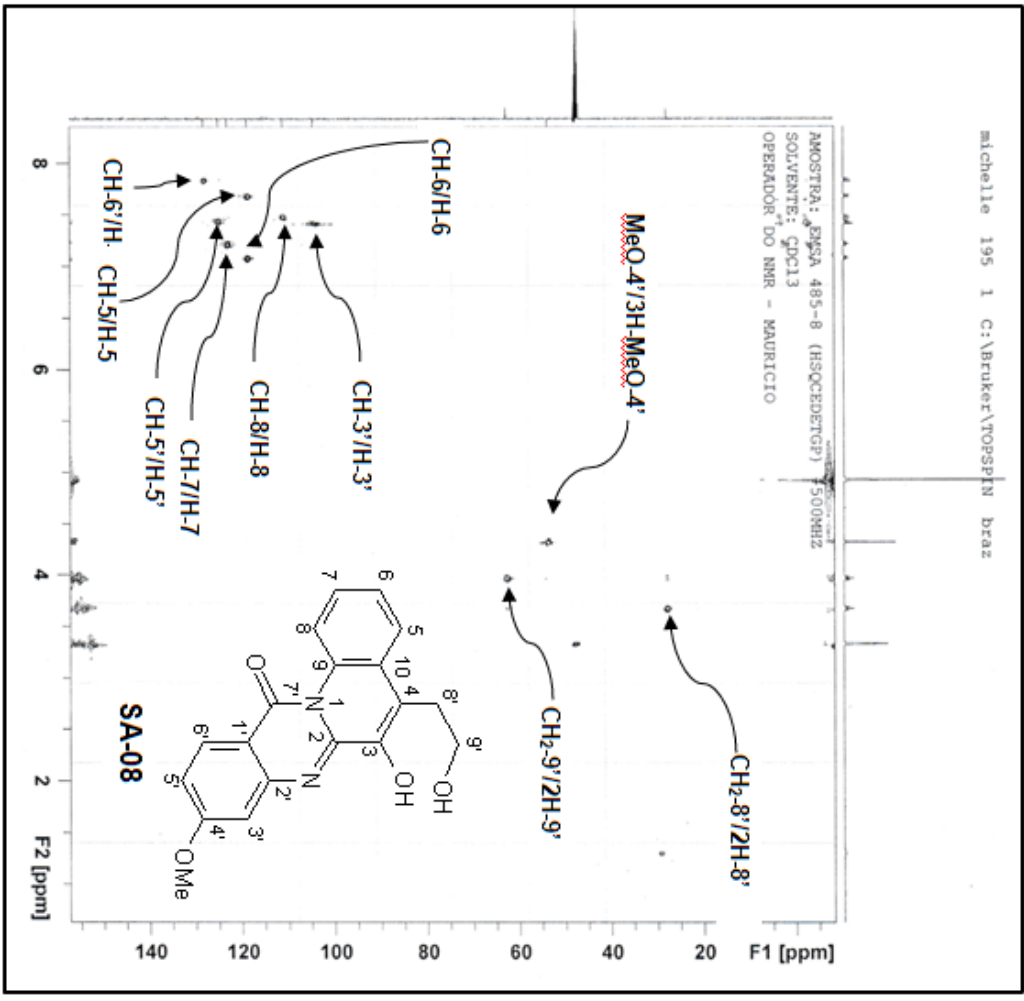


Figura 103. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-08 (atlântico).

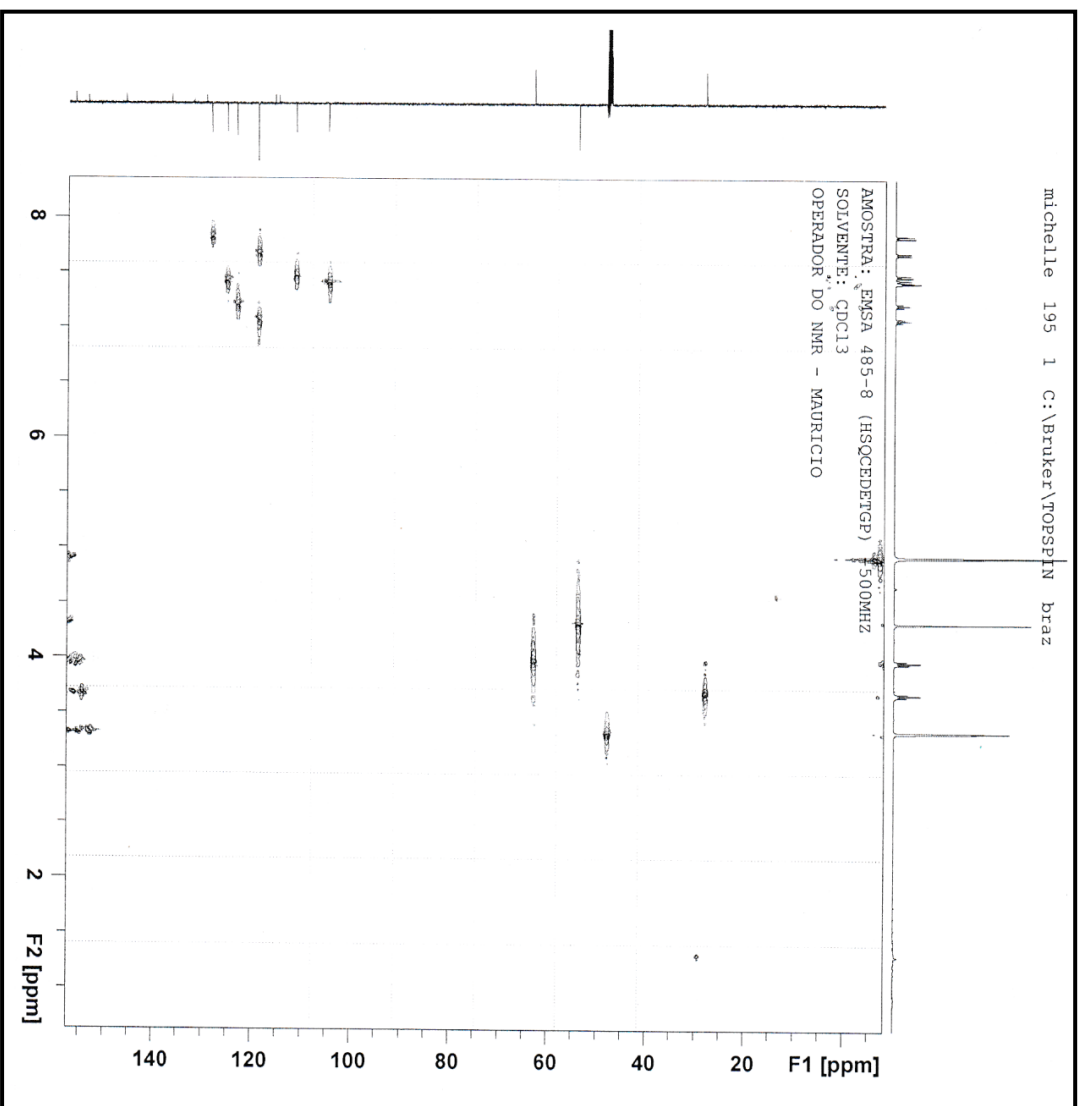


Figura 104. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-08 (atlântico) (região de 10 a 145 ppm).

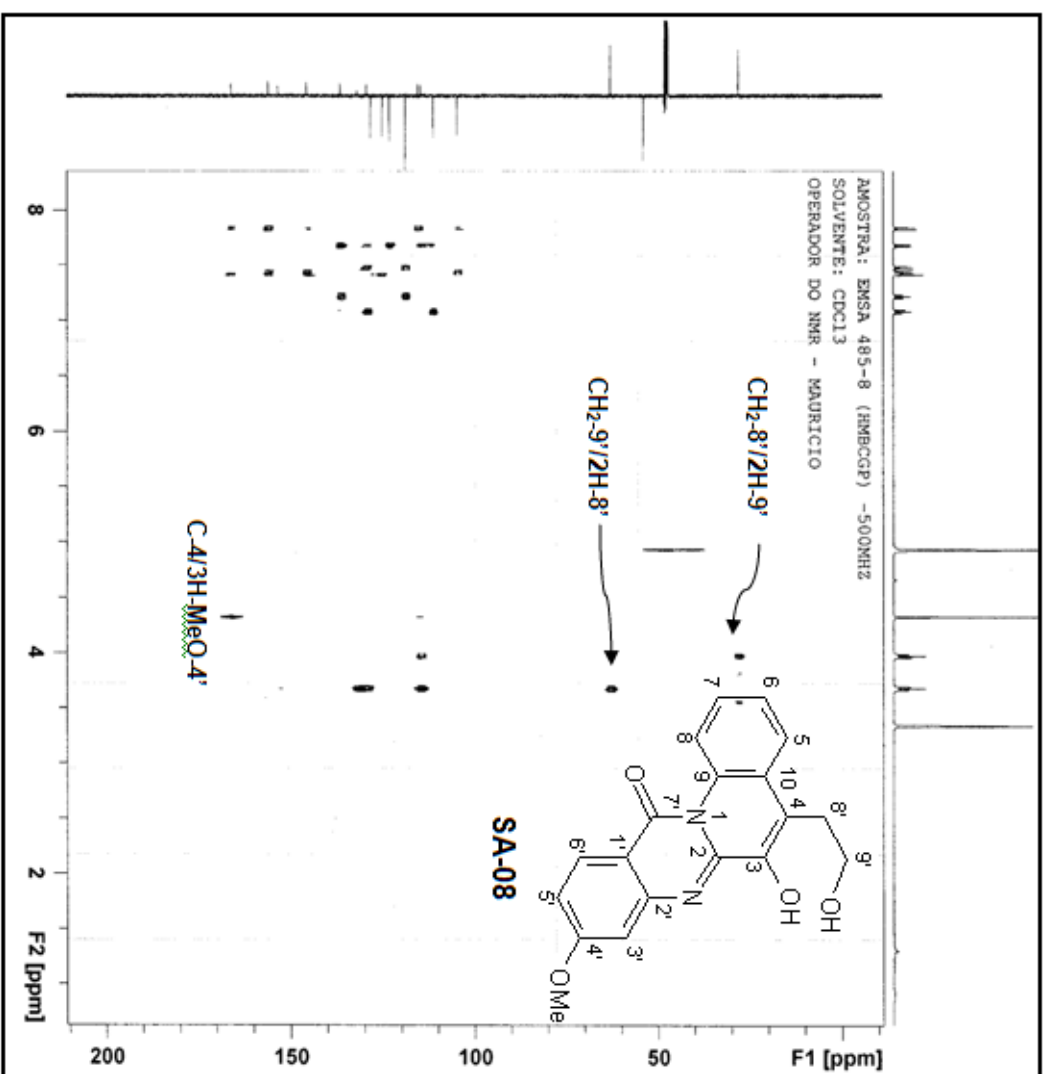


Figura 105. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-08 (atlanticoi).

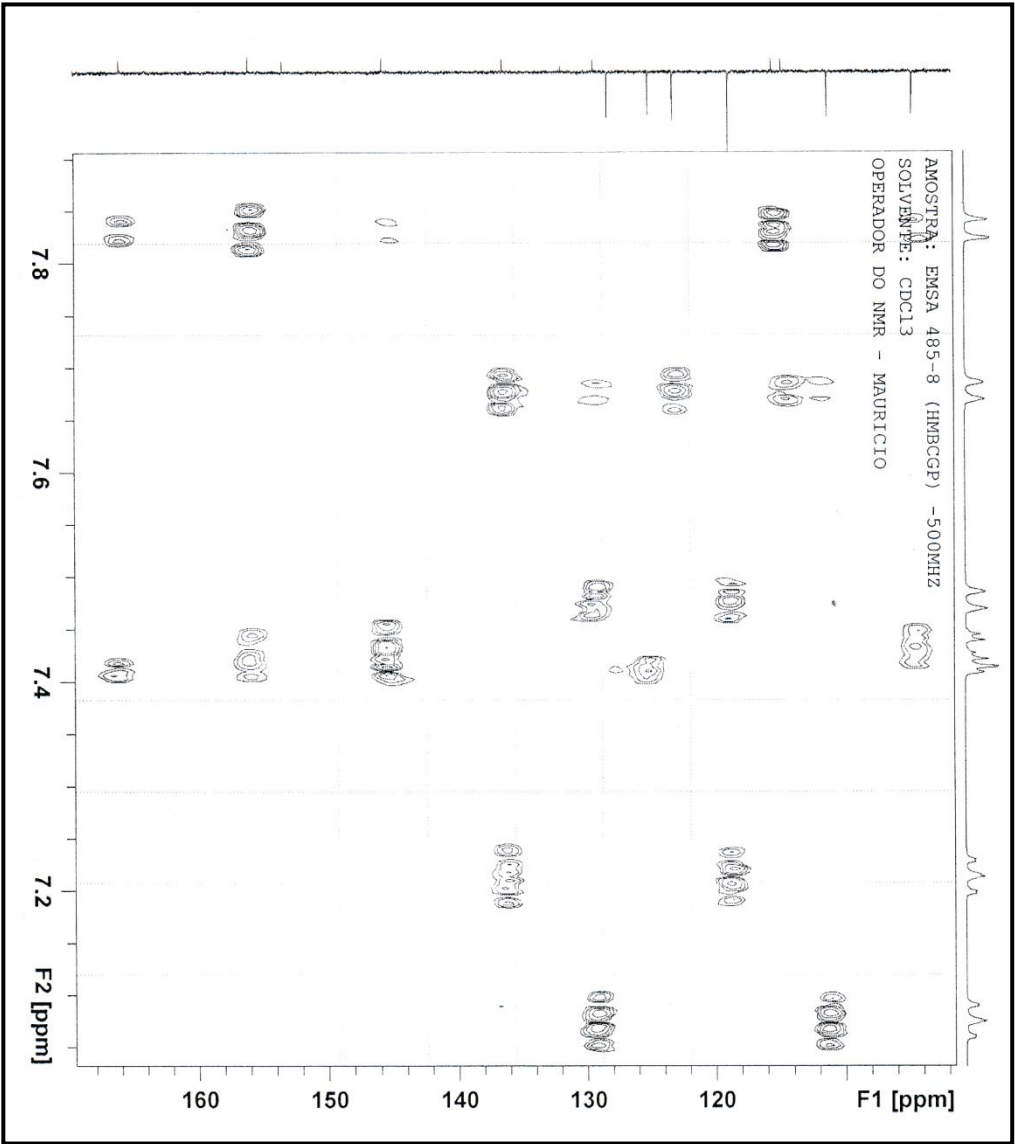


Figura 106. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-08 (atlântico) (região de 102 a 168 ppm).

Michelle 194 1 C:\Bruker\TOPSPIN braz

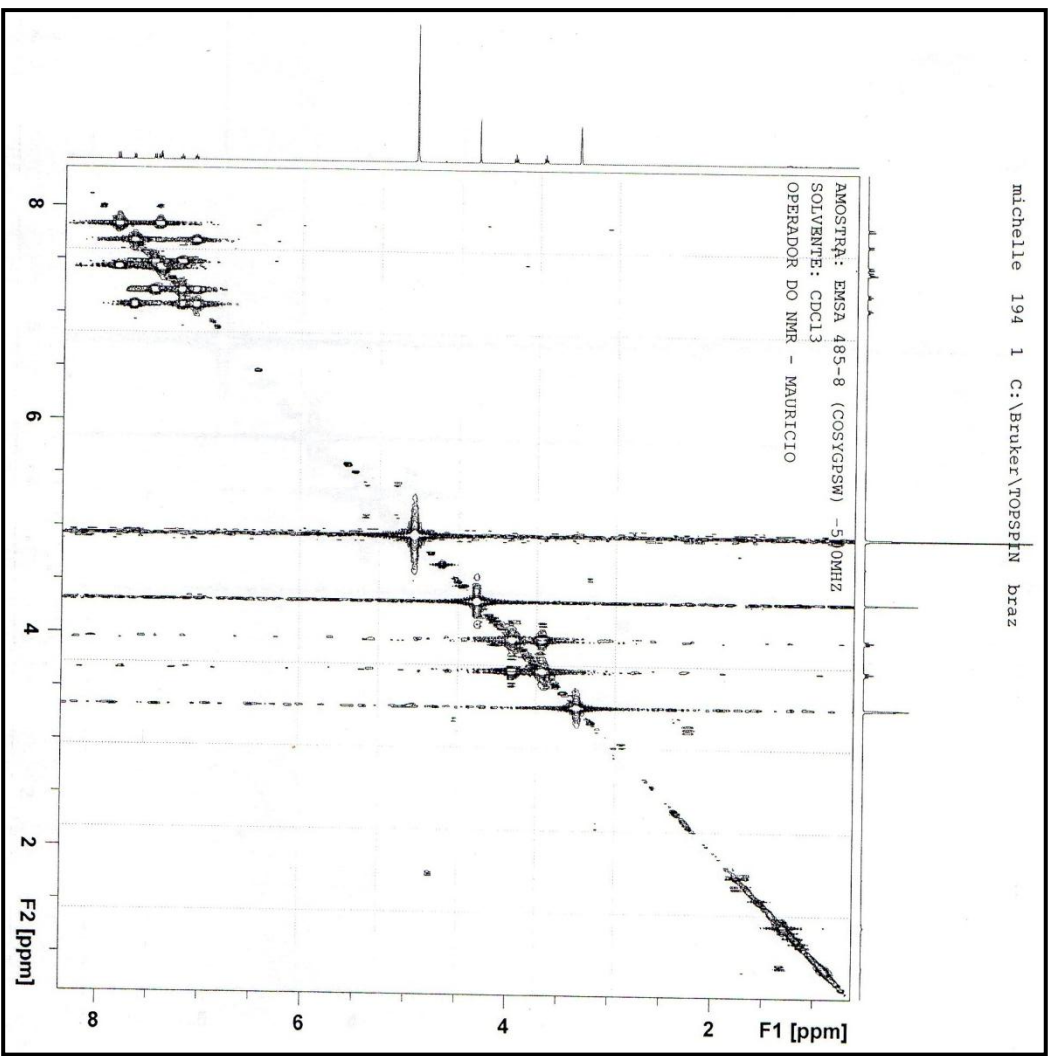


Figura 107. Espectro de H^1-H^1 -COSY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para as substâncias SA-08 (atlantico).

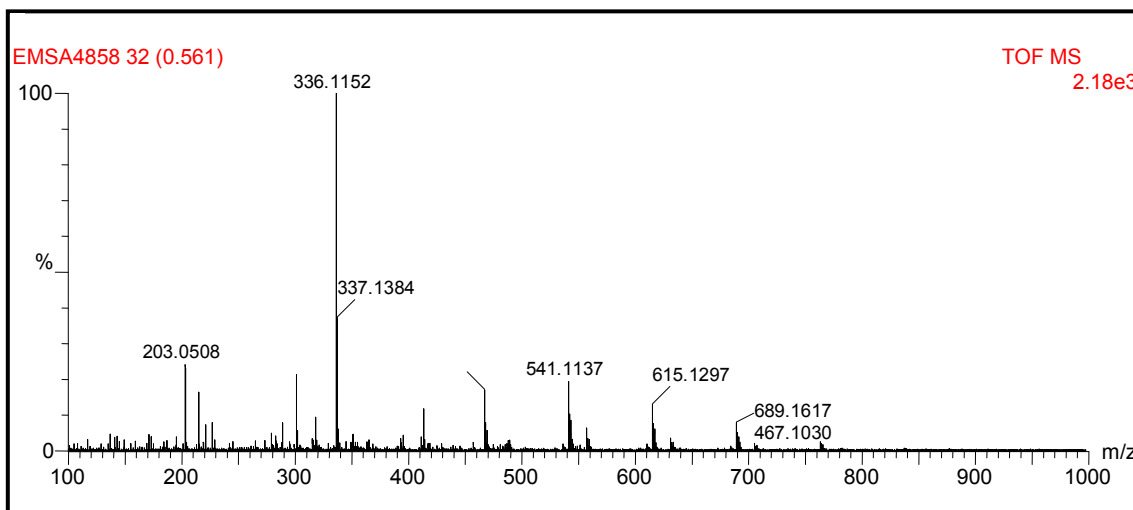


Figura 108. Espectro de ESI(+)-MS obtido em solução de água:metanol (1:1) para a substância **SA-08** (atlanticol).

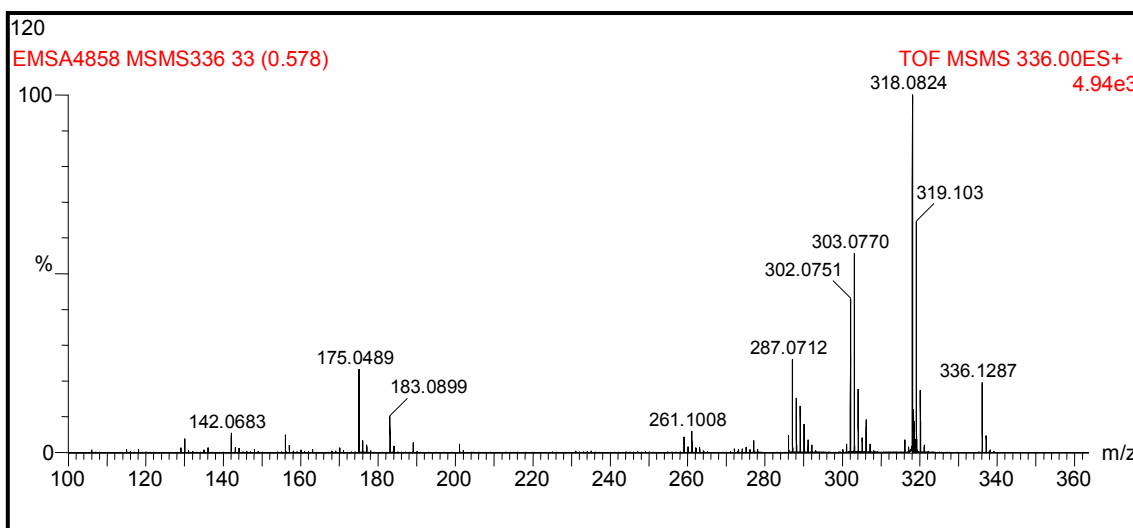
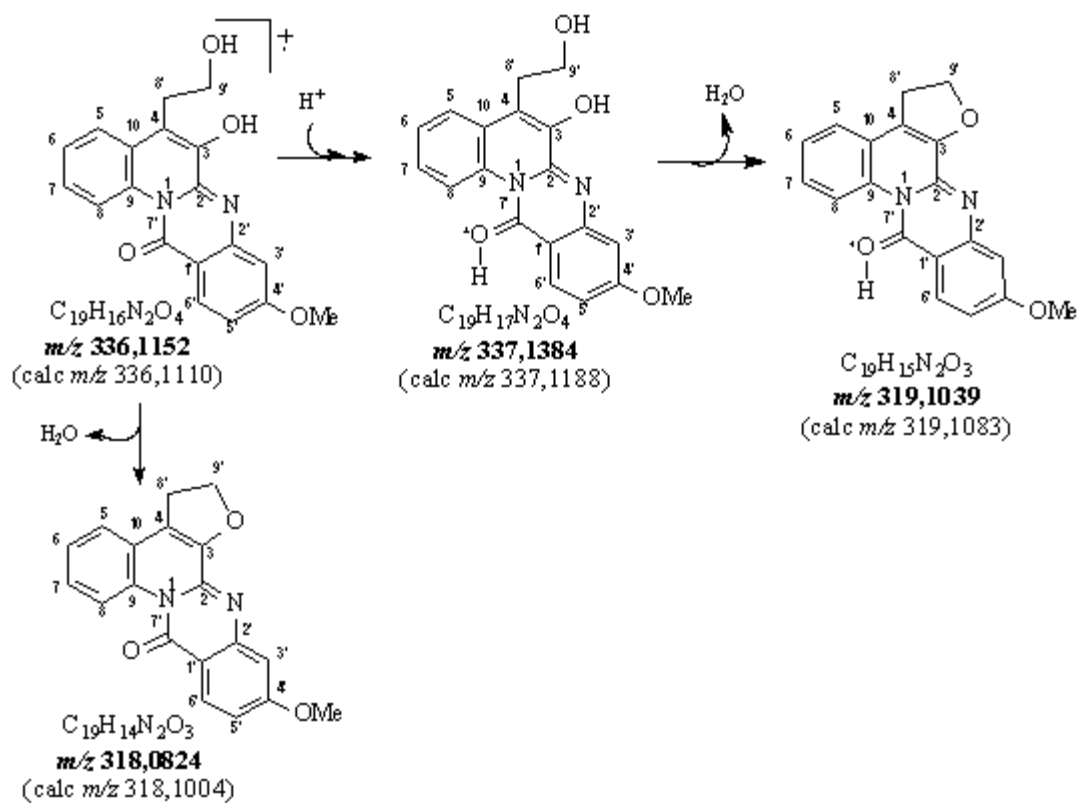


Figura 109. Espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o pico em m/z 336 em solução de água:metanol (1:1) para a substância **SA-08** (atlanticol).



Esquema 9. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para a substância **SA-08** (atlanticol).

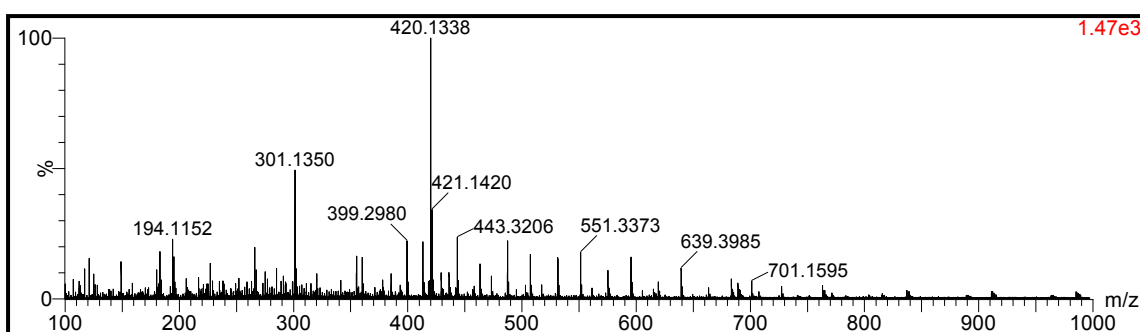


Figura 110. Espectro de ESI(+)-MS obtido em solução de água:metanol (1:1) para o derivado acetilado **SA-08a**.

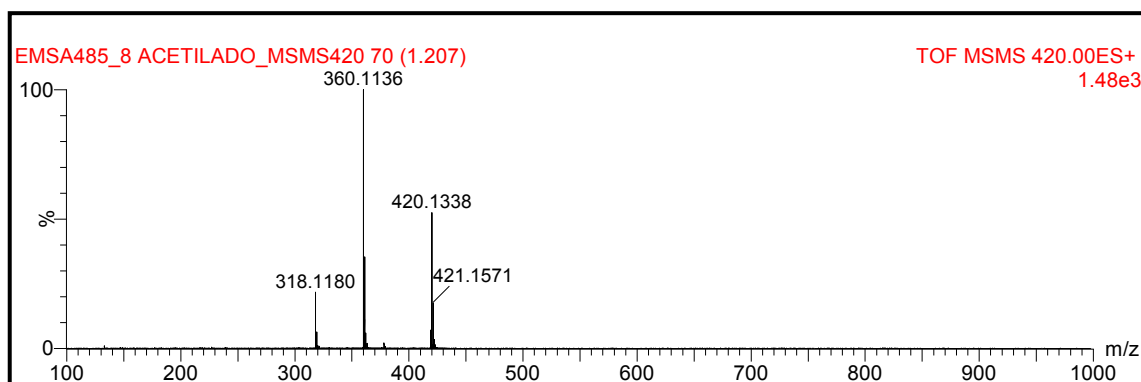


Figura 111. Espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o pico em m/z 420 em solução de água:metanol (1:1) para o derivado acetilado **SA-08a**.

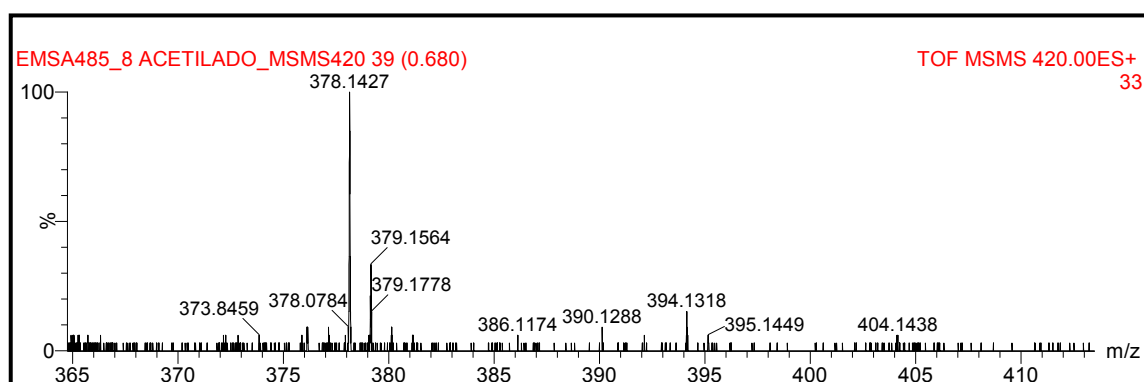
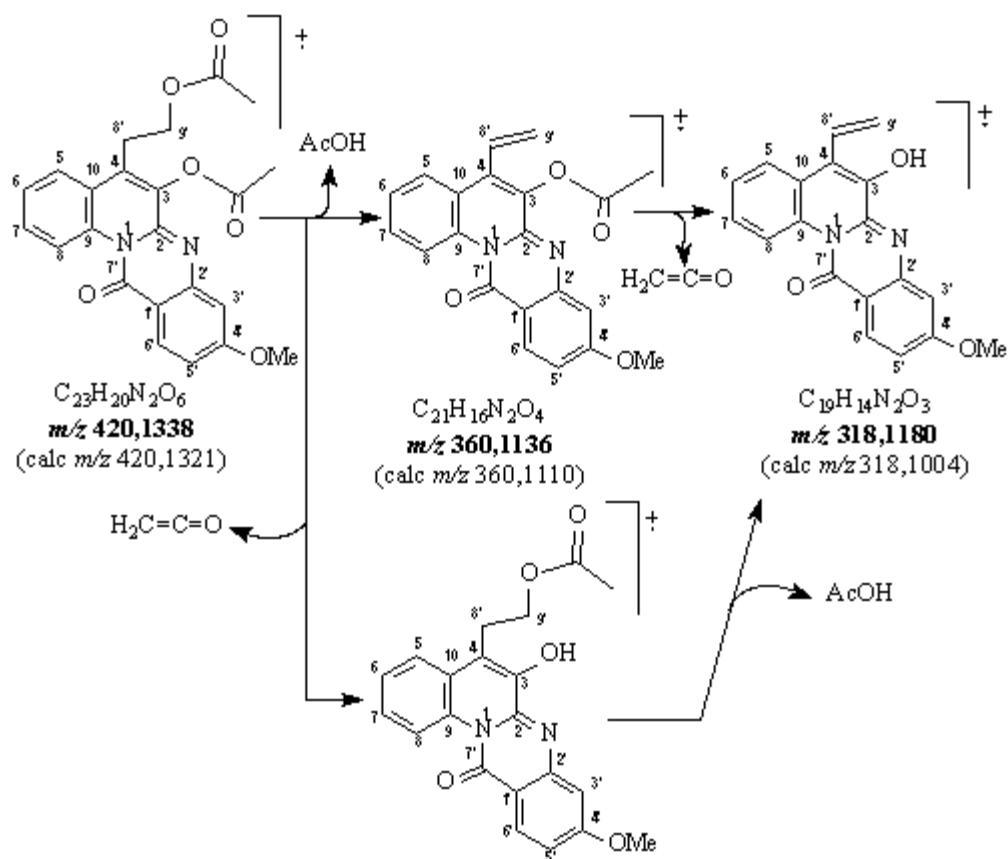


Figura 112. Espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o pico em m/z 420 em solução de água:metanol (1:1) para o derivado acetilado **SA-08a**.



Esquema 10. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para o derivado acetilado **SA-08a**.

5.3.2. Cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas nas plantas e são comumente encontradas na família Rutaceae. Esta classe de substâncias possui sua origem sintética no ácido cinâmico. Há dois tipos de rotas biossintéticas fundamentais, que resultam na obtenção da cumarina e da umbeliferona (Figura 113). As estruturas de ambas as cumarinas diferem pelo fato da ocorrência da oxigenação na posição 7, no caso da umbeliferona (DEWICK, 2002).

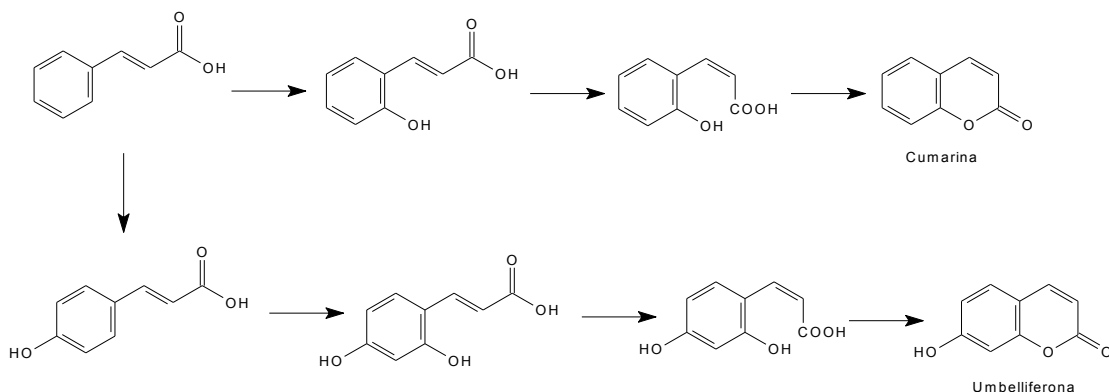
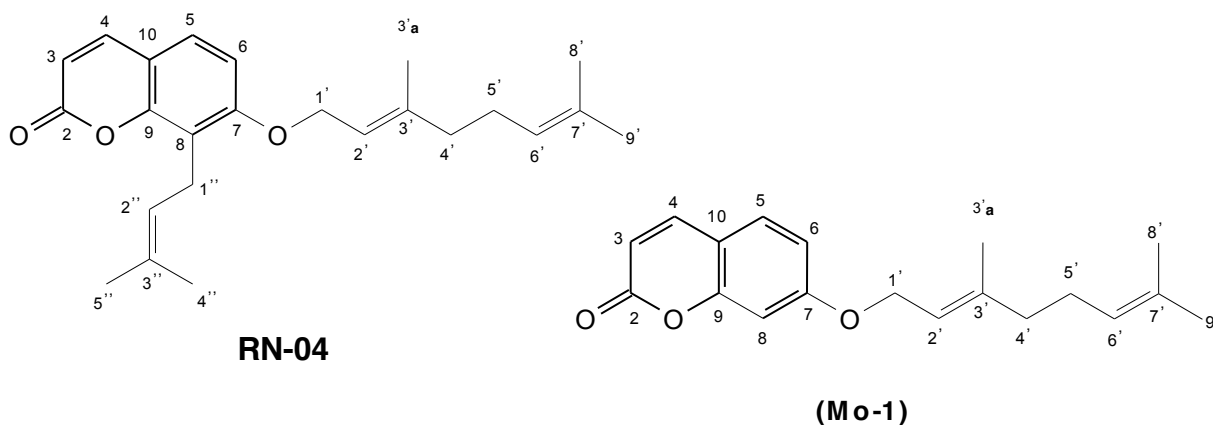


Figura 113. Proposta de biossíntese para as cumarinas: cumarina e umbeliferona (DEWICK, 2002).

A umbeliferona possui o esqueleto cumarínico mais simples encontrado na família Rutaceae. Porém a grande diversidade estrutural das cumarinas encontradas nas famílias Rutaceae e Umbelliferae é resultado da ocorrência de prenilações. As prenilações nas posições 6 e 8 são comuns devido ao fato da hidroxila presente na posição 7 ser um grupo orientador orto (DEWICK, 2002).

5.3.2.1. Cumarina isolada da espécie *Rauia nodosa*.

5.3.2.1.1. Determinação estrutural da substância RN-04.



A substância **RN-04** foi isolada do extrato em hexano da espécie *Rauia nodosa*, na forma de um óleo incolor.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figuras 114 e 115) obtido para a substância **RN-04** permitiu reconhecer a presença de 24 átomos de carbono, sendo cinco carbonos metílicos, quatro carbonos metilênicos (sp^3), sete

carbonos metínicos (sp^2) e oito carbonos quaternários (sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010). No espectro de RMN ^{13}C é possível observar a presença do átomo de carbono carbonílico em 161,5 ppm, dos demais átomos de carbono do anel cumarínico com deslocamentos característicos de cumarinas com substituição na posição C-8 e de três unidades prenilas (Tabela 28).

O espectro de RMN 1H (Figuras 116, 117 e 118) obtido para a substância **RN-04** apresenta quatro dupletos na região aromática. Os dupletos observados em δ_H 7,62 ppm (1H, $J= 9,4$ Hz) e 6,24 ppm (1H, $J= 9,4$ Hz) são referentes aos átomos de hidrogênio H-4 e H-3, e os dupletos em δ_H 7,29 ppm (1H, $J= 8,4$ Hz) e δ_H 6,84 ppm (1H, $J= 8,4$ Hz) são referentes aos átomos de hidrogênio H-5 e H-6. A constante de acoplamento de ambos os pares de dupletos indicam que os hidrogênios aromáticos se encontram orto relacionados.

Estas atribuições foram realizadas devido as correlações a uma ligação (J_{CH}) entre os átomos CH-3(δ_C 112,9)/H-3(δ_H 6,24), CH-4(δ_C 143,8)/H-4(δ_H 7,62), CH-5(δ_C 125,0)/H-5(δ_H 7,29) e CH-6 (δ_C 108,6)/H-6(δ_H 6,84), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 120).

A análise do mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 121) revelou as correlações a duas ($^2J_{HC}$) entre os átomos C-2(δ_C 161,5)/H-3(δ_H 6,24), C-7(δ_C 159,6)/H-6(δ_H 6,84) e C-10(δ_C 113,3)/H-4(δ_H 7,62) e à três ligações ($^3J_{HC}$) entre os átomos C-4(δ_C 143,8)/H-5(δ_H 7,29), C-8(δ_C 118,3)/H-6(δ_H 6,84) e C-9(δ_C 152,9)/H-5(δ_H 7,29) e (Tabela 28), confirmando a presença do esqueleto cumarínico substituído nas posições 7 e 8 na estrutura da substância **RN-04**.

O espectro de RMN 1H (Figura 118) obtido para a substância **RN-04** também apresentou sinais característicos de unidades prenilas, substituintes comumente encontrados nas estruturas das cumarinas (DEWICK, 2002).

A região alifática do espectro de RMN 1H apresentou um duplete em δ_H 4,66 ppm (2H, $J= 6,4$ Hz), um tripleto em δ_H 5,51 ppm (1H), dois multipletos em δ_H 2,11 ppm (1H) e δ_H 2,14 ppm (1H), um duplo tripleto em δ_H 5,10 ppm (1H) e três simpletos em δ_H 1,59 ppm (3H), δ_H 1,69 ppm (3H) e δ_H 1,73 ppm (3H), atribuídos respectivamente aos átomos de hidrogênio 2H-1', 1H-2', 1H-4', 2H-5', 1H-6', 3H-8', 3H-9' e 3H-3a'.

Além das multiplicidades e dos valores de deslocamento serem compatíveis com unidades prenhas, também foram observadas as correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH₂-1'(δ_C 65,7)/2H-1'(δ_H 4,66), CH-2'(δ_C 119,9)/H-2'(δ_H 5,51), CH₃-3a'(δ_C 16,7)/3H-3a'(δ_H 1,73), CH₂-4'(δ_C 39,5)/2H-4'(δ_H 2,11), CH₂-5'(δ_C 26,3)/2H-5'(δ_H 2,14), CH-6'(δ_C 123,7)/H-6'(δ_H 5,10), CH₃-8'(δ_C 17,7)/3H-8'(δ_H 1,59) e CH₃-9'(δ_C 25,8)/3H-9'(δ_H 1,69) (Tabela 28), confirmando as atribuições. A análise do mapa HMBC contribuiu através da correlação a três ligações ($^3J_{HC}$) entre os átomos C-7(δ_C 159,63)/ 2H-1'(δ_H 4,66), revelando a presença de duas unidades prenila na posição C-7 do anel cumarínico.

Também foram observados na região alifática do espectro RMN ¹H (Figura 118), sinais que sugerem a presença de uma terceira unidade prenila na estrutura. Estes sinais correspondem a um duplete em δ_H 3,57 ppm (2H, J = 9,3 Hz), um duplo tripleto em δ_H 5,27 ppm (1H, J = 9,3 Hz) e dois simpletos em δ_H 1,67 ppm (3H) e δ_H 1,90 ppm (3H), os quais foram atribuídos aos átomos de hidrogênio 2H-1'', 1H-2'', 3H-4'' e 3H-5'' (Tabela 28). Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH₂-1''(δ_C 22,1)/2H-1''(δ_H 3,57), CH-2''(δ_C 121,3)/H-2''(δ_H 5,27), CH₃-4''(δ_C 18,0)/3H-4''(δ_H 1,90) e CH₃-5''(δ_C 25,7)/3H-5''(δ_H 1,67) (Tabela 28), observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 120).

Já o mapa de correlação heteronuclear HMBC apresentou a correlação a duas ligações ($^2J_{HC}$) entre os átomos C-8(δ_C 118,3)/ 2H-1''(δ_H 3,57) e a três ligações ($^3J_{HC}$) entre C-7(δ_C 159,6)/ 2H-1''(δ_H 3,57), confirmando a presença de uma unidade prenila na posição C-8 do anel cumarínico (Tabela 28).

O mapa de correlação homonuclear, ¹H-¹H-COSY (Figura 119), apresentou as correlações entre os átomos de hidrogênio 2H-1''(*d*, δ_H 3,57 ppm, J = 9,3)/1H-2''(*t*, δ_H 5,27 ppm), 1H-2''(*t*, δ_H 5,27 ppm)/3H-4''(*s*, δ_H 1,90 ppm) e 1H-2''(*t*, δ_H 5,27 ppm)/3H-5''(*s*, δ_H 1,67 ppm) presentes na unidade prenila encontrada na posição C-8 da substância **RN-04**.

O espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **RN-04** (Figura 122 e Esquema 11) apresentou o pico do íon molecular ($[M^+]$) com m/z = 366, confirmando a proposta com fórmula molecular igual a C₂₄H₃₀O₃. Após comparação com a literatura concluiu-se que a substância **RN-04** corresponde a cumarina *O*-geranilostenol (MEYER, et. al., 1985).

Tabela 28. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **RN-04** (*O*-geraniostenol), em CDCl_3 , em comparação com os dados da literatura da substância aurapteno (**Mo-1**) (MISSAU, 2008). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
2	161,5	-	H-3	H-4	162,1
7	159,6	-	H-6	H-5;2H-1';2H-1''	161,3
8	118,3	-	2H-1''	H-6	-
9	152,9	-		H-5;H-4;2H-1''	155,8
10	113,3	-	H-4	H-3;H-6	112,4
3'	141,5	-	3H-3'a	2H-1'	142,3
7'	132,4	-	3H-8';3H-9'		131,9
3''	131,9	-	3H-4'';3H-5''	2H-1''	-
CH					
3	112,8	6,24 (d, 9,4)			112,9
4	143,8	7,62 (d, 9,4)	H-5		143,4
5	125,0	7,29 (d, 8,4)	H-4		128,6
6	108,6	6,84 (d, 8,6)			113,2
8	-	-	-	-	101,6
2'	119,2	5,51 (t)	2H-1'		118,4
6'	123,7	5,10 (dt)		3H-8';3H-9'	123,6
2''	121,3	5,27 (dt)	2H-1''		-
CH₂					
1'	65,7	4,66 (d (6,4))			65,5
4'	39,5	2,11 (m)	2H-5'	H-2';3H-3'a	39,5
5'	26,3	2,14 (m)	H-4'		26,2
1''	22,1	3,57 (d (9,3))			-
CH₃					
3'a	16,7	1,73 (s)		H-2'	16,8
8'	17,7	1,59 (s)		H-6';3H-9'	17,7
9'	25,8	1,69 (s)			25,6
4''	18,0	1,90 (s)		H-2''	-
5''	25,7	1,67 (s)		H-2'';3H-4''	-

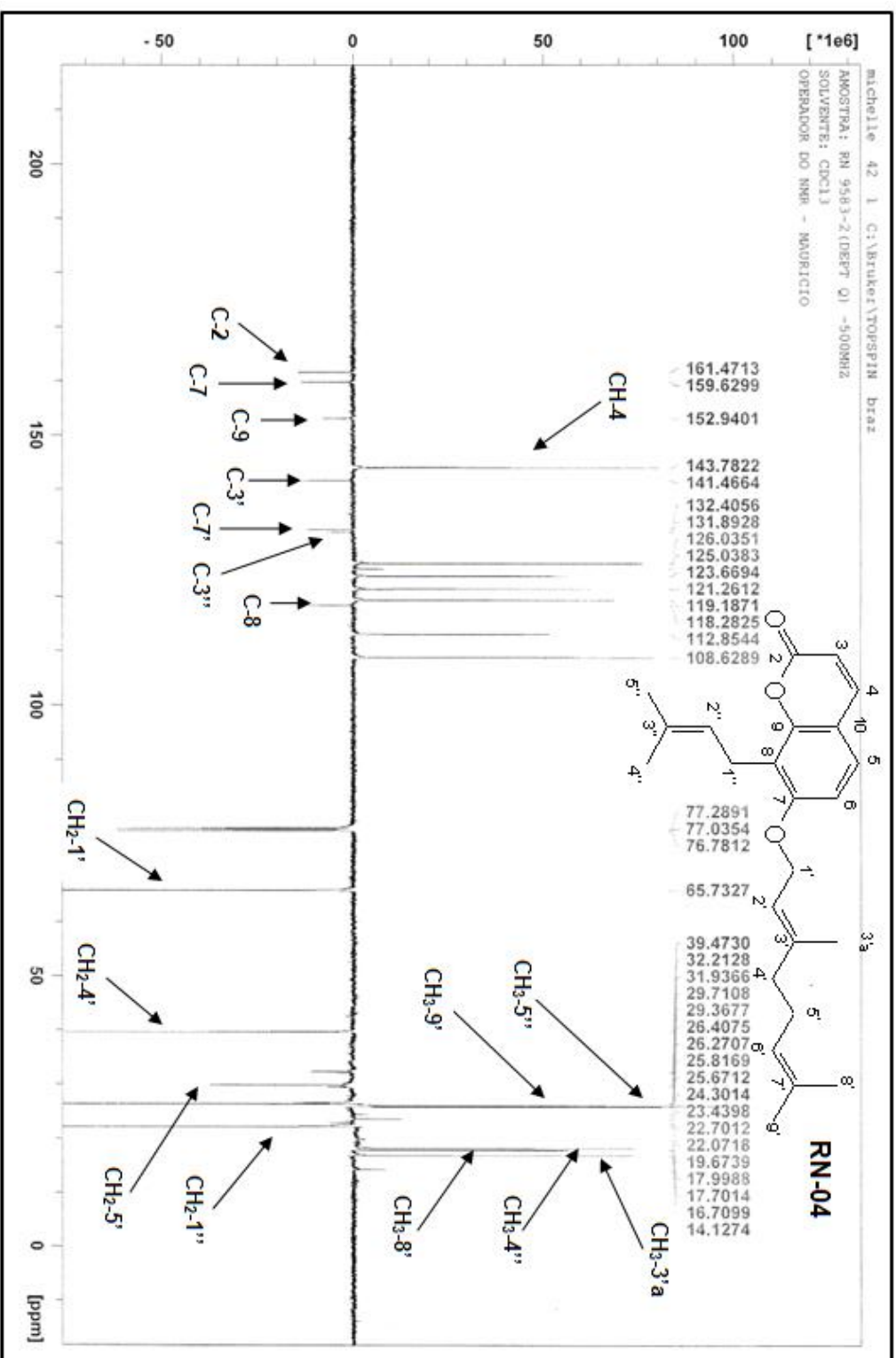


Figura 114. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-04 (O-geraniilostenol).

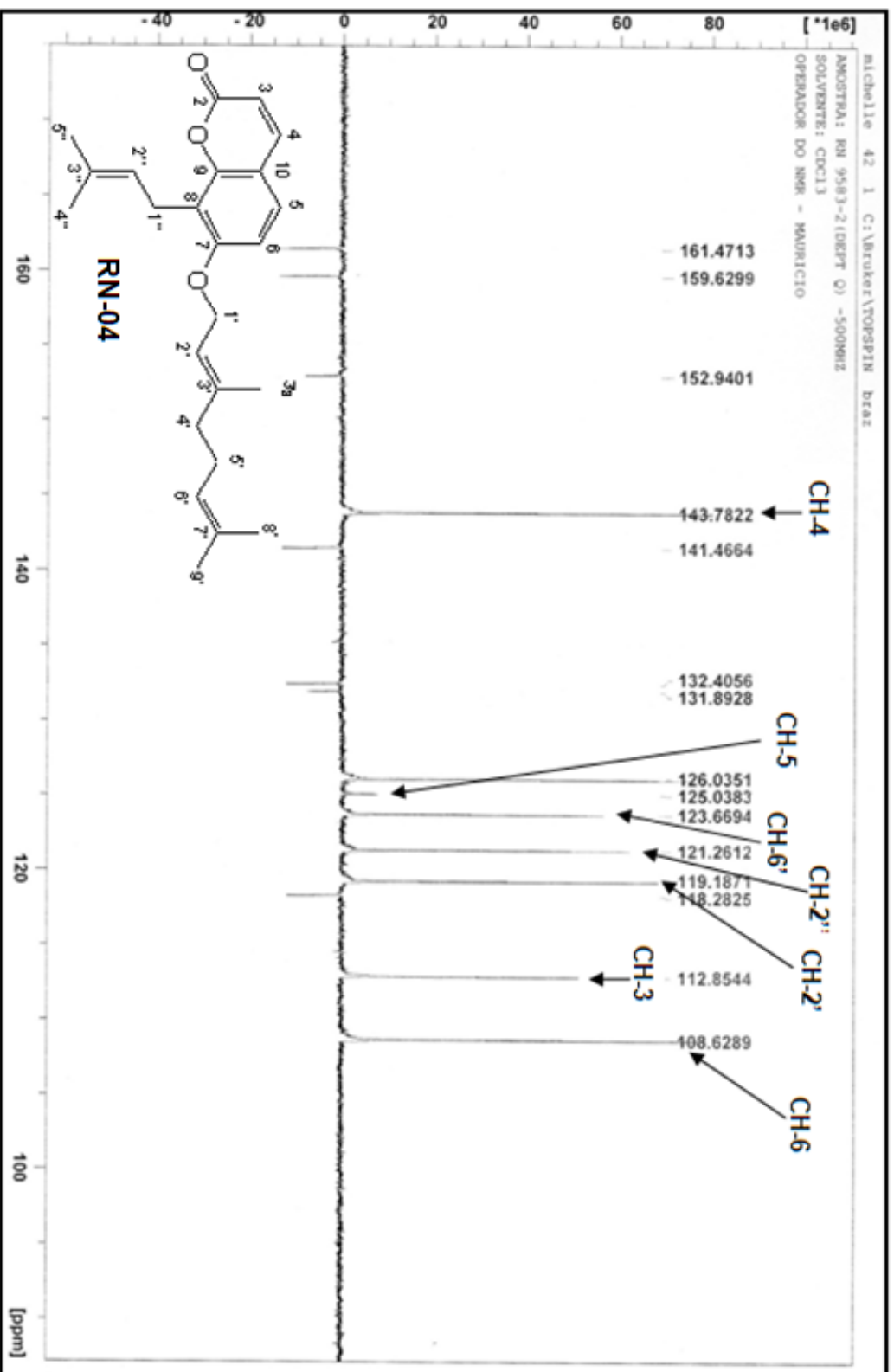


Figura 115. Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-04** (O-geraniilostenol) (região de 90 a 170 ppm).

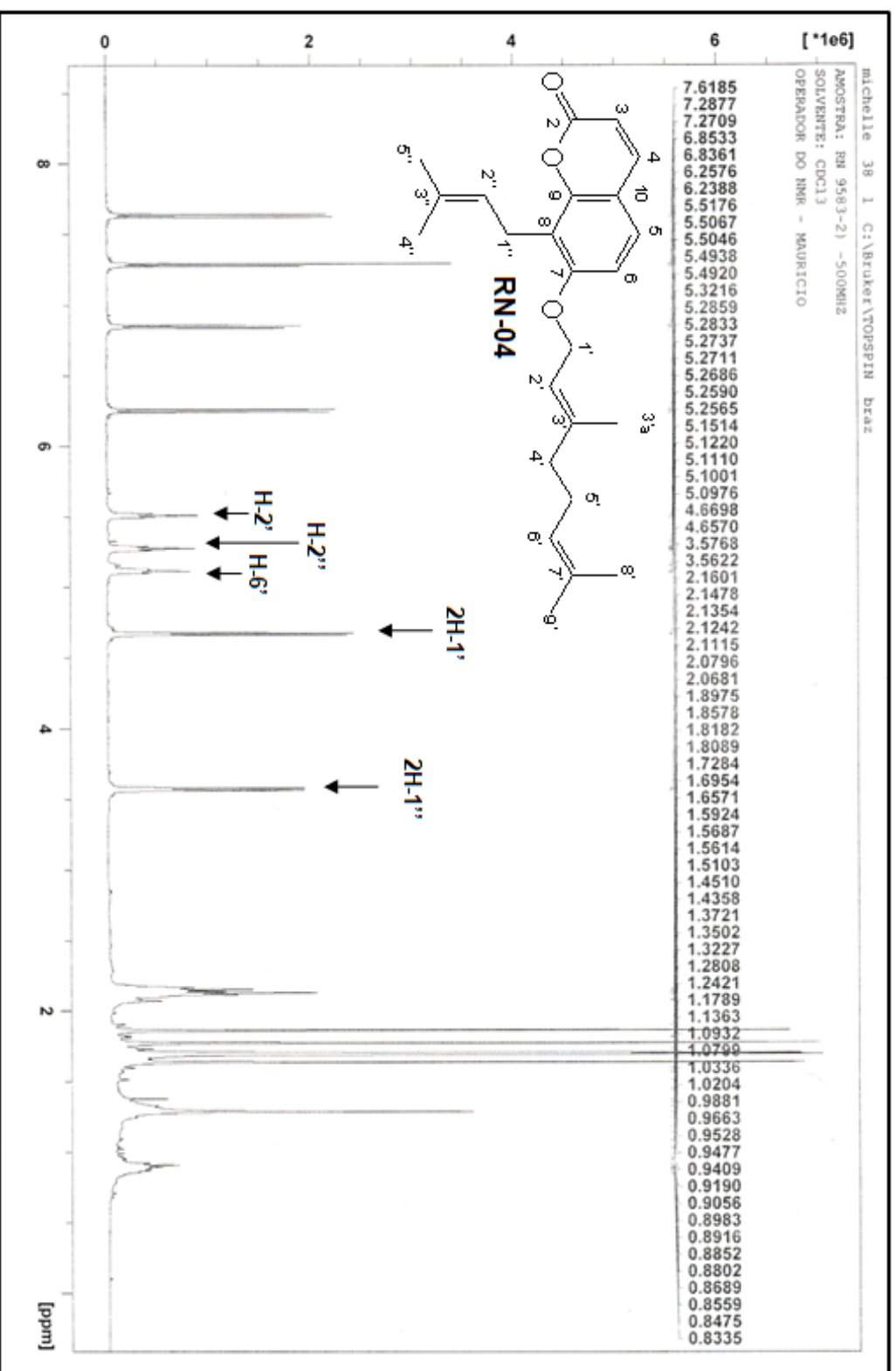


Figura 116. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-04** (O-geraniilostenol).

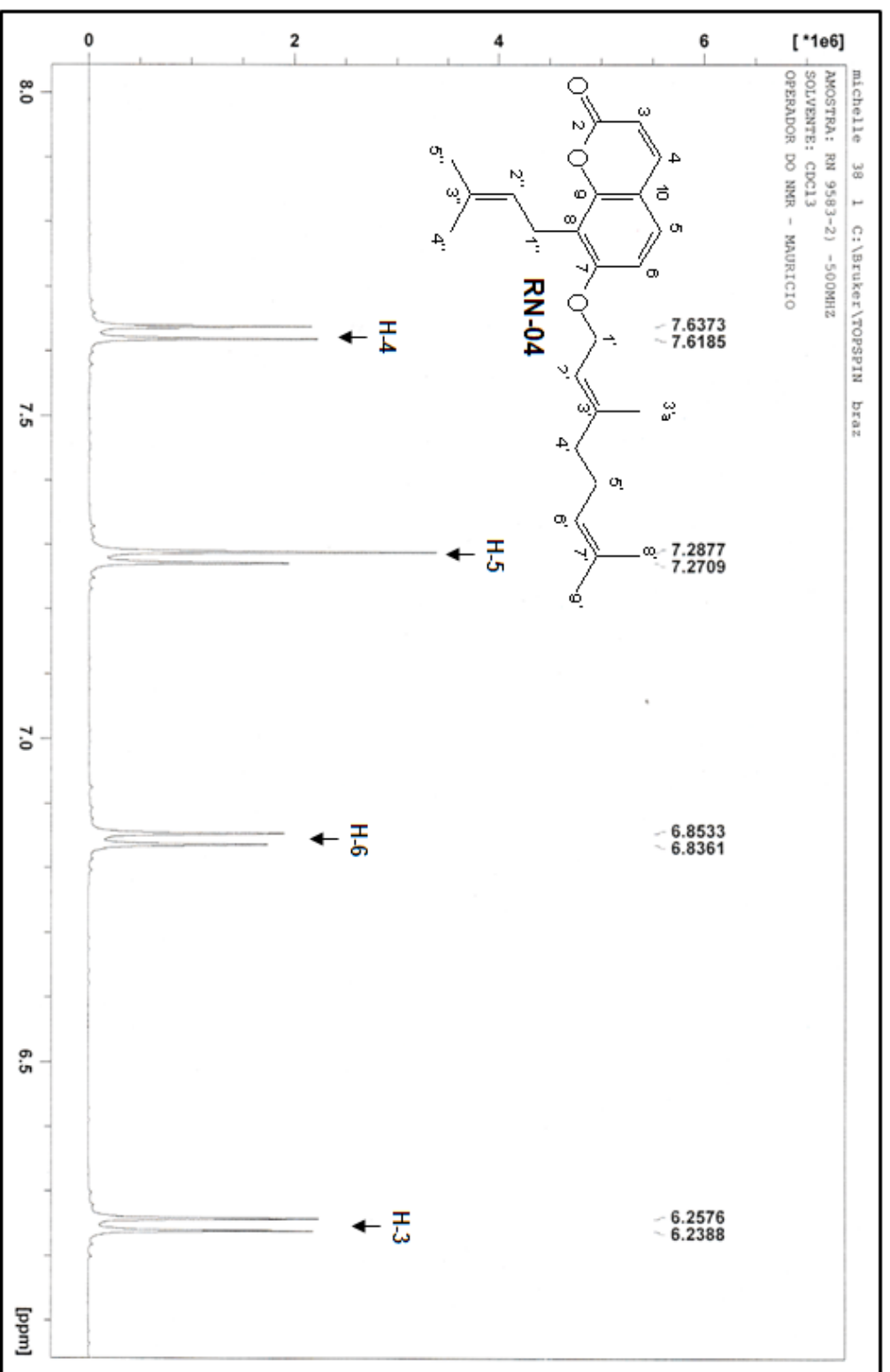


Figura 117. Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-04** (O-geraniostenol) (região de 6,0 a 8,0 ppm).

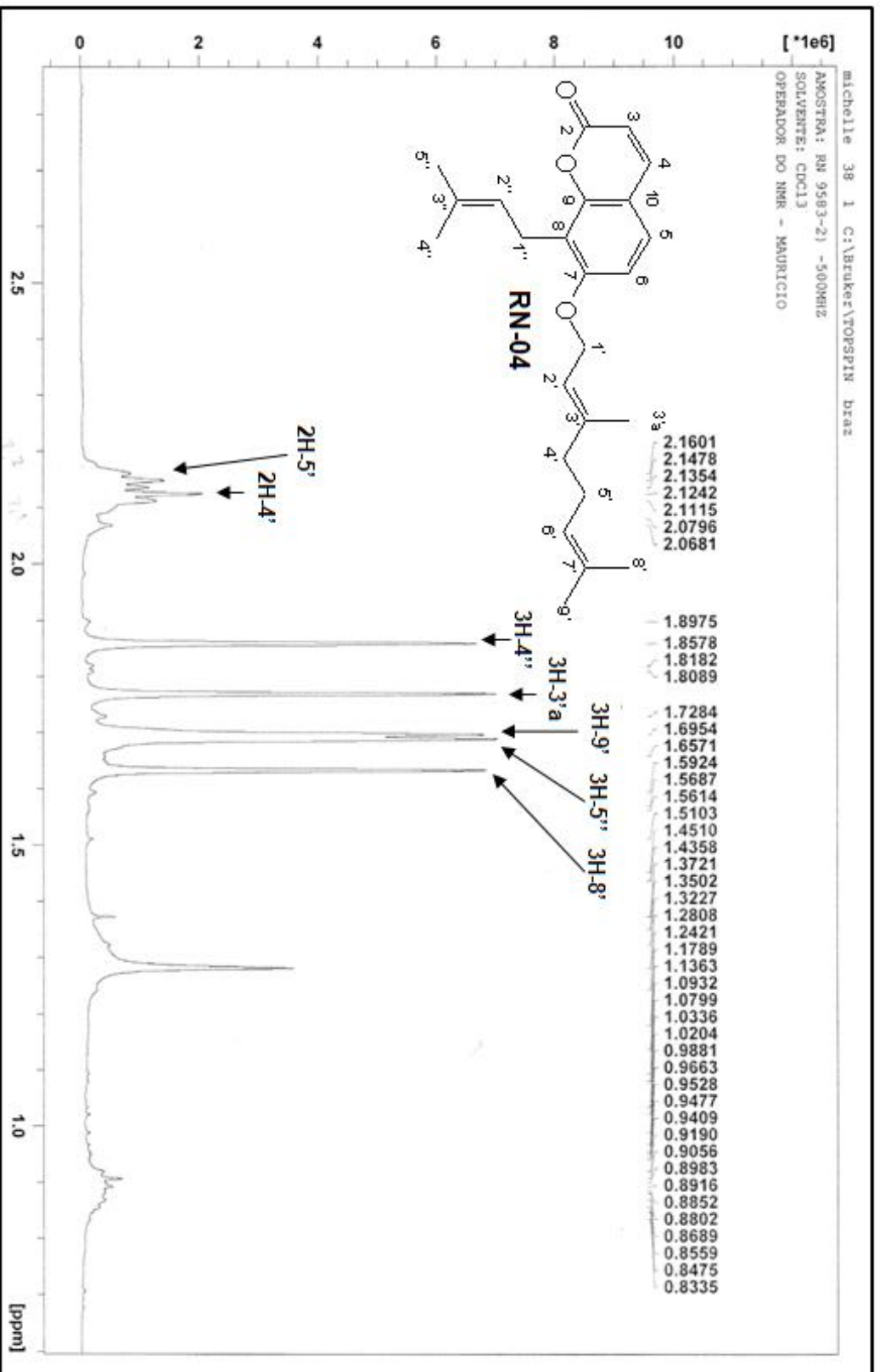


Figura 118. Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-04** (O-geraniostenol) (região de 0 a 2,8 ppm).

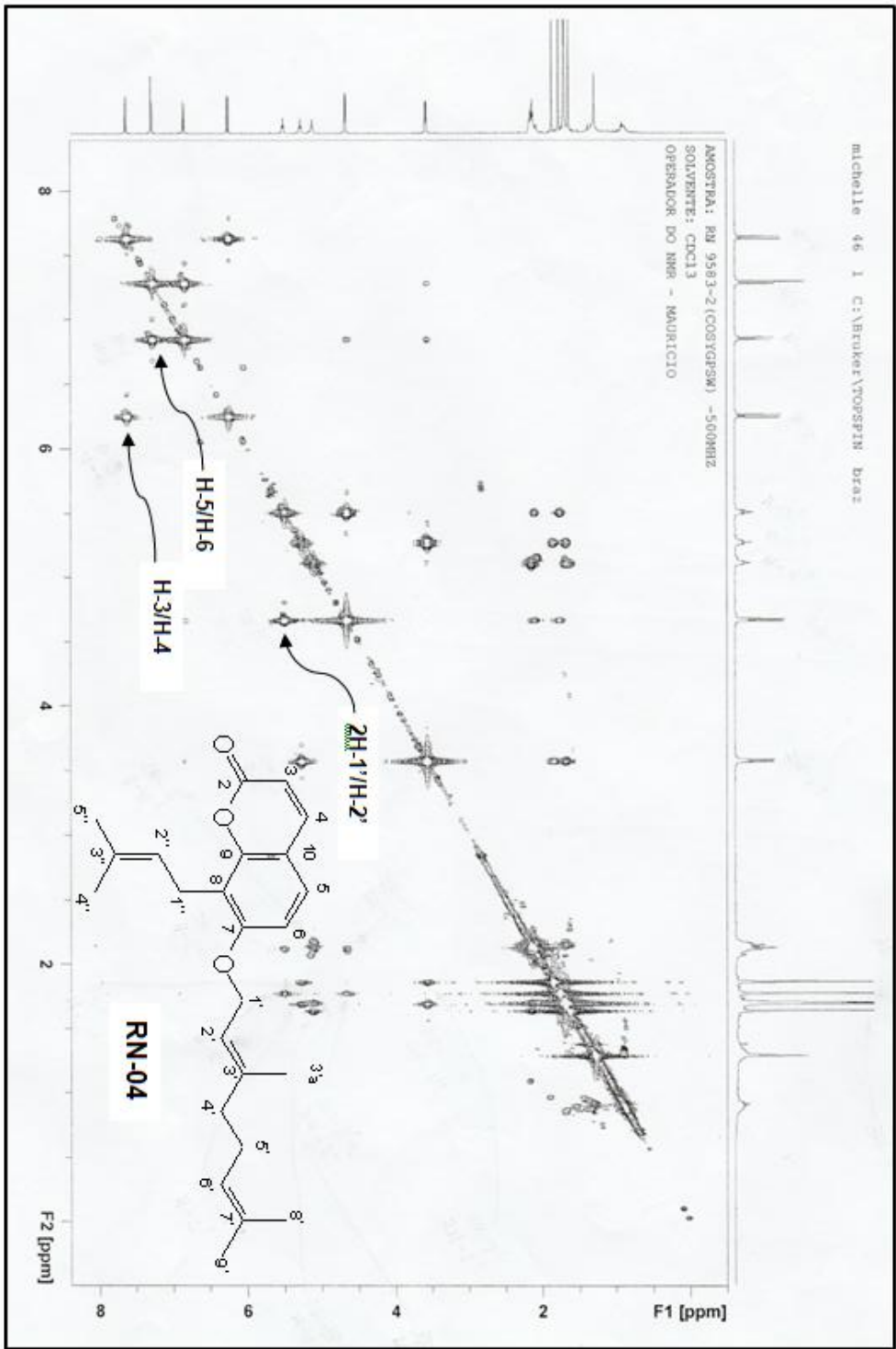


Figura 119. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-04** (O-geranilosteno).

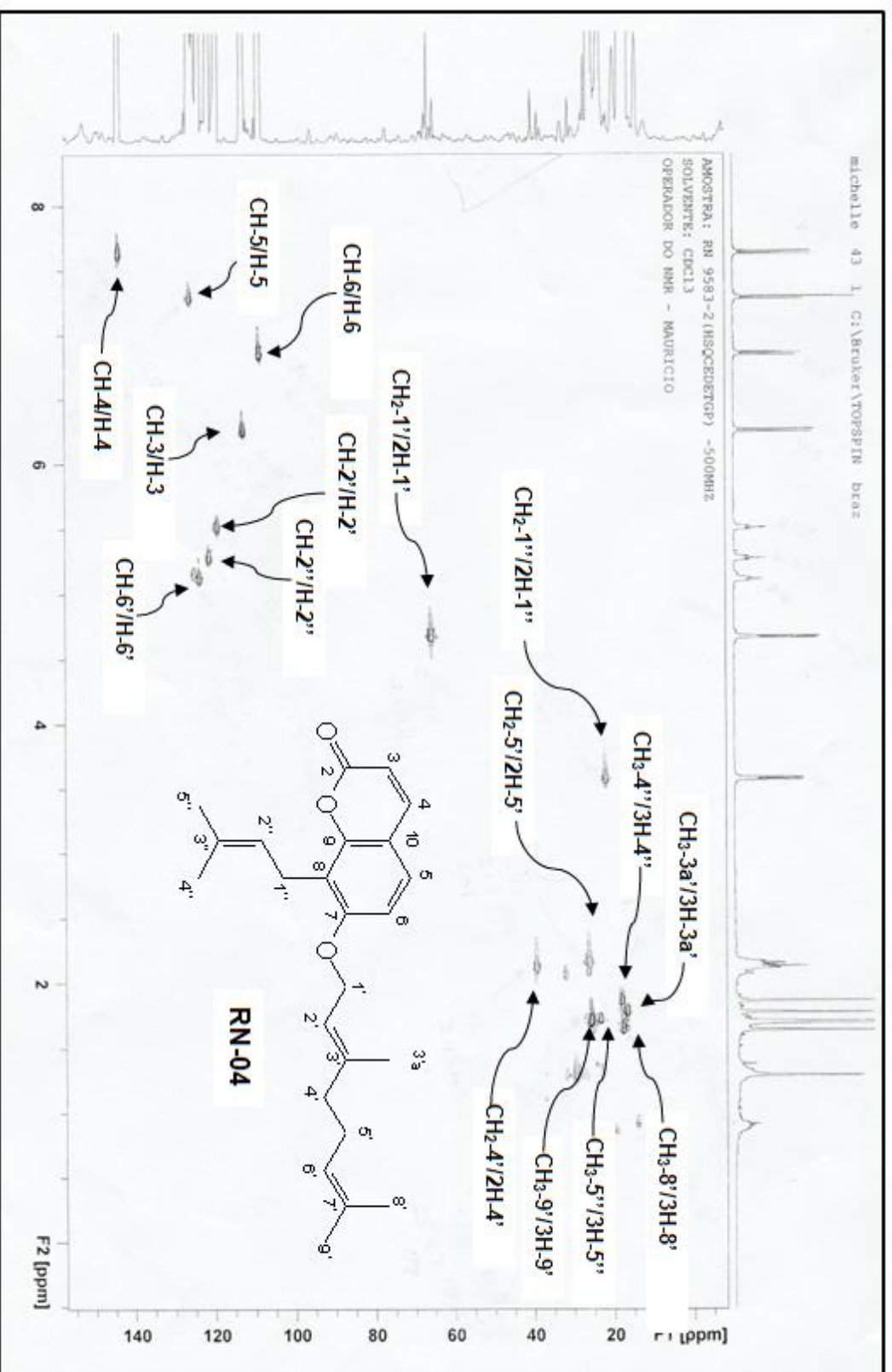


Figura 120. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-04 (O-geraniilostenol).

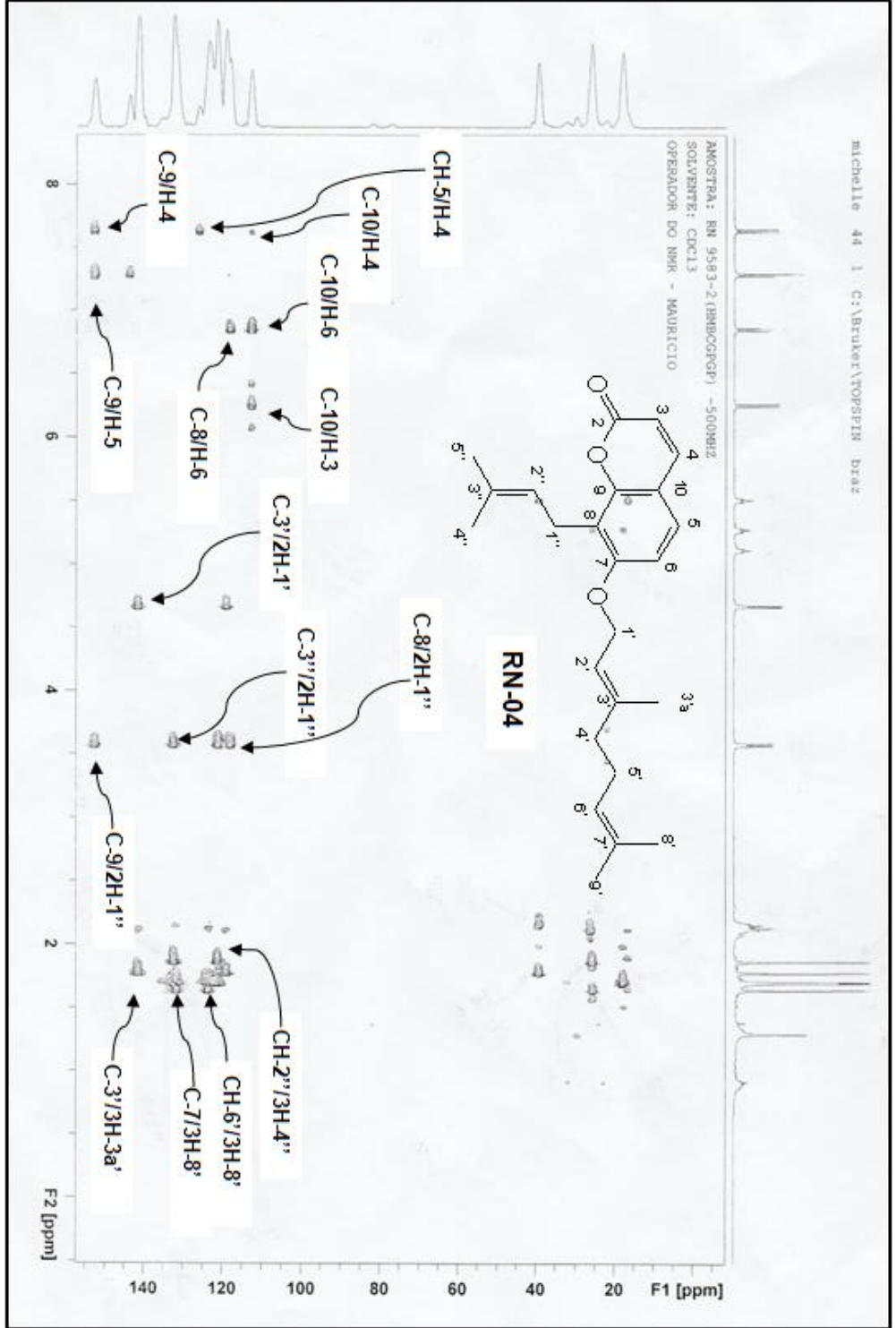


Figura 121. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-04 (O-geranilostenol).

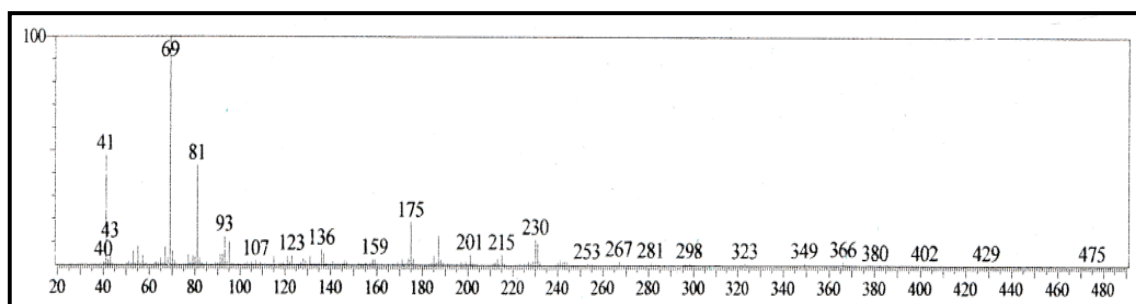
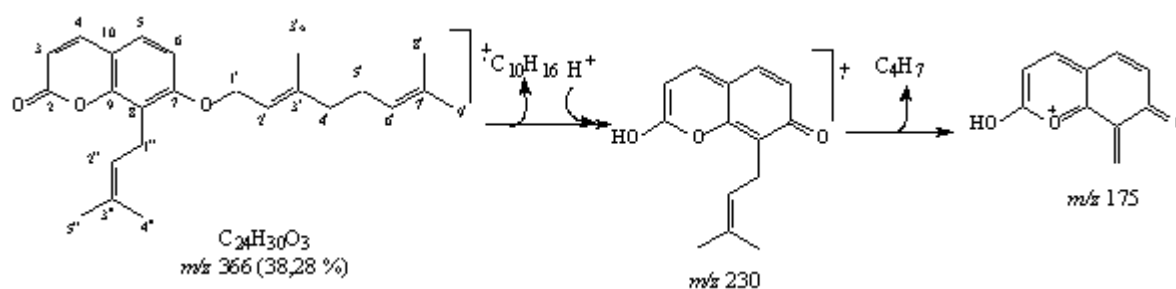


Figura 122. Espectro de massas (CG-EM) obtido para a substância **RN-04** (*O*-geraniostenol).



Esquema 11. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de massas (CG-EM) para a substância **RN-04** (*O*-geraniostenol).

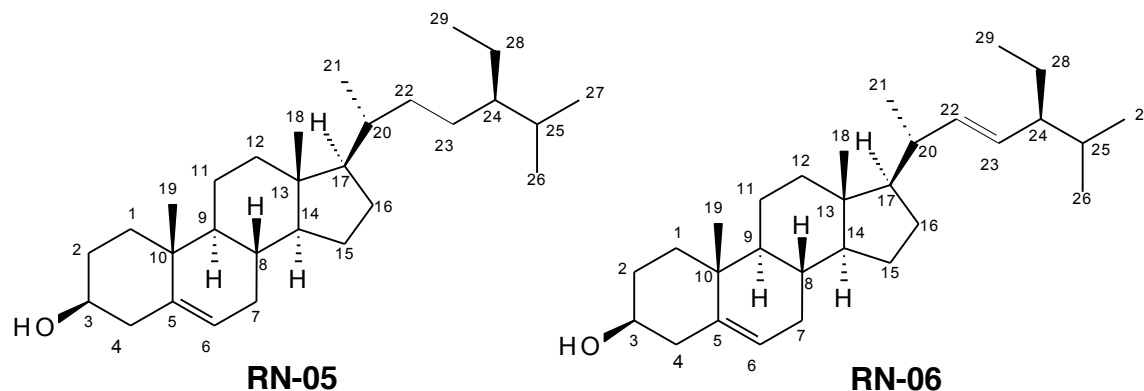
5.3.3. Esteroides

Os esteroides são triterpenos modificados, que possuem o esqueleto tetracíclico do lanosterol. Porém diferem do mesmo, devido a ausência das metilas nas posições C-4 e C-14 (DEWICK, 2002).

Este estudo resultou no isolamento de seis fitoesteróides do extrato em hexano da espécie *Rauia nodosa*. Foram identificados cinco esteroides amplamente conhecidos, β -sitosterol (**RN-05**), estigmasterol (**RN-06**), sitostenona (**RN-07**), estigmastenona (**RN-08**) e peróxido de ergosterol (**RN-09**) e um esteroide inédito na literatura, denominado rauianodoxi (**RN-10**).

5.3.3.1. Esteroides isolados da espécie *R. nodosa*.

5.3.3.1.1. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias RN-05 e RN-06.



A mistura das substâncias **RN-05** e **RN-06**, foi obtida do extrato em hexano da espécie *Rauia nodosa*, na forma de cristais incolores.

O espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) (Figura 123) obtido para esta mistura de substâncias, apresentou sinais característicos da mistura dos esteroides β -sitosterol (**RN-05**) e estigmasterol (**RN-06**), comumente isolados em diversas plantas (DEWICK, 2002). Neste espectro foi observado um duplete em δ_{H} 5,38 ppm, atribuído ao hidrogênio H-6, um multiplete em δ_{H} 3,55 ppm referente ao hidrogênio carbinólico H-3 e ainda um grande acúmulo de sinais intensos na região de δ_{H} 2,21 a 0,70 ppm do espectro, devido aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal de ambas as substâncias (Tabela 29).

A análise do espectro de RMN ^1H da mistura também possibilitou a confirmação da presença do estigmasterol (**RN-06**), através dos dois duplos dupletos observados em δ_{H} 5,06 e 5,15 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio olefínicos H-22 e H-23 (Tabela 29).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) obtido para a mistura dessas substâncias (Figura 124) apresentou sinais referentes ao β -sitosterol (**RN-05**) e ao estigmasterol (**RN-06**). O átomos de carbono CH-6 e C-5 foram observados em δ_{C} 121,7 e 140,8 ppm e o átomo de carbono carbinólico CH-3 em δ_{C} 71,8 ppm.

A distinção entre o β -sitosterol (**RN-05**) e o estigmasterol (**RN-06**), pode ainda ser confirmada pelos sinais observados em δ_c 138,3 e 129,3 ppm atribuídos aos átomos de carbono com hibridização sp^2 , CH-22 e CH-23, presentes apenas na estrutura do estigmasterol (**RN-06**). Já os átomos de carbono CH₂-22 e CH₂-23 presentes no β -sitosterol (**RN-05**) foram observados em δ_c 34,0 e 26,1 ppm (Tabela 29).

A análise do espectro de RMN ¹³C, permitiu uma completa atribuição dos sinais referentes aos átomos de carbono de ambos os esteroides (Tabela 29).

Após comparação com os dados relatados na literatura concluiu-se que a mistura isolada corresponde as substâncias β -sitosterol (**RN-05**) e estigmasterol (**RN-06**), comumente isoladas na forma de mistura em diversas espécies vegetais (KOJIMA et. al., 1990).

Tabela 29. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) das substâncias **RN-05** e **RN-06**, em comparação com os dados da literatura para o β -sitosterol (**Mo-1**) e para o estigmasterol (**Mo-2**) (KOJIMA et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

	RN-05	Mo-1	RN-06	Mo-2
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
C				
5	140,8	140,7	140,8	140,7
10	36,5	36,5	36,5	36,5
13	42,3	42,3	42,3	42,2
CH				
3	71,8	71,8	71,8	71,8
6	121,7	121,7	121,7	121,5
8	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,1	50,1	50,1	50,1
14	56,8	56,3	56,8	56,8
17	56,1	56,0	56,0	55,9
20	36,2	36,1	40,5	40,5
22	-	-	138,3	138,3
23	-	-	129,3	129,2
24	45,8	45,8	51,2	51,2
25	29,2	29,1	31,9	31,9
CH₂				
1	37,2	37,2	37,2	37,2
2	31,7	31,6	31,7	31,6
4	42,3	42,30	42,3	42,3
7	31,9	31,9	31,9	31,9
11	21,1	21,1	21,1	21,1
12	39,8	39,8	39,7	39,7
15	24,3	24,3	24,4	24,4
16	28,3	28,2	28,9	28,9
22	34,0	33,9	-	-
23	26,1	26,0	-	-
28	23,1	23,0	25,4	25,4
CH₃				
18	11,9	11,9	12,0	12,0
19	19,4	19,4	19,4	19,4
21	18,8	18,8	21,2	21,2
26	19,8	19,8	21,2	21,1
27	19,1	19,0	19,1	19,0
29	12,0	12,0	12,3	12,3

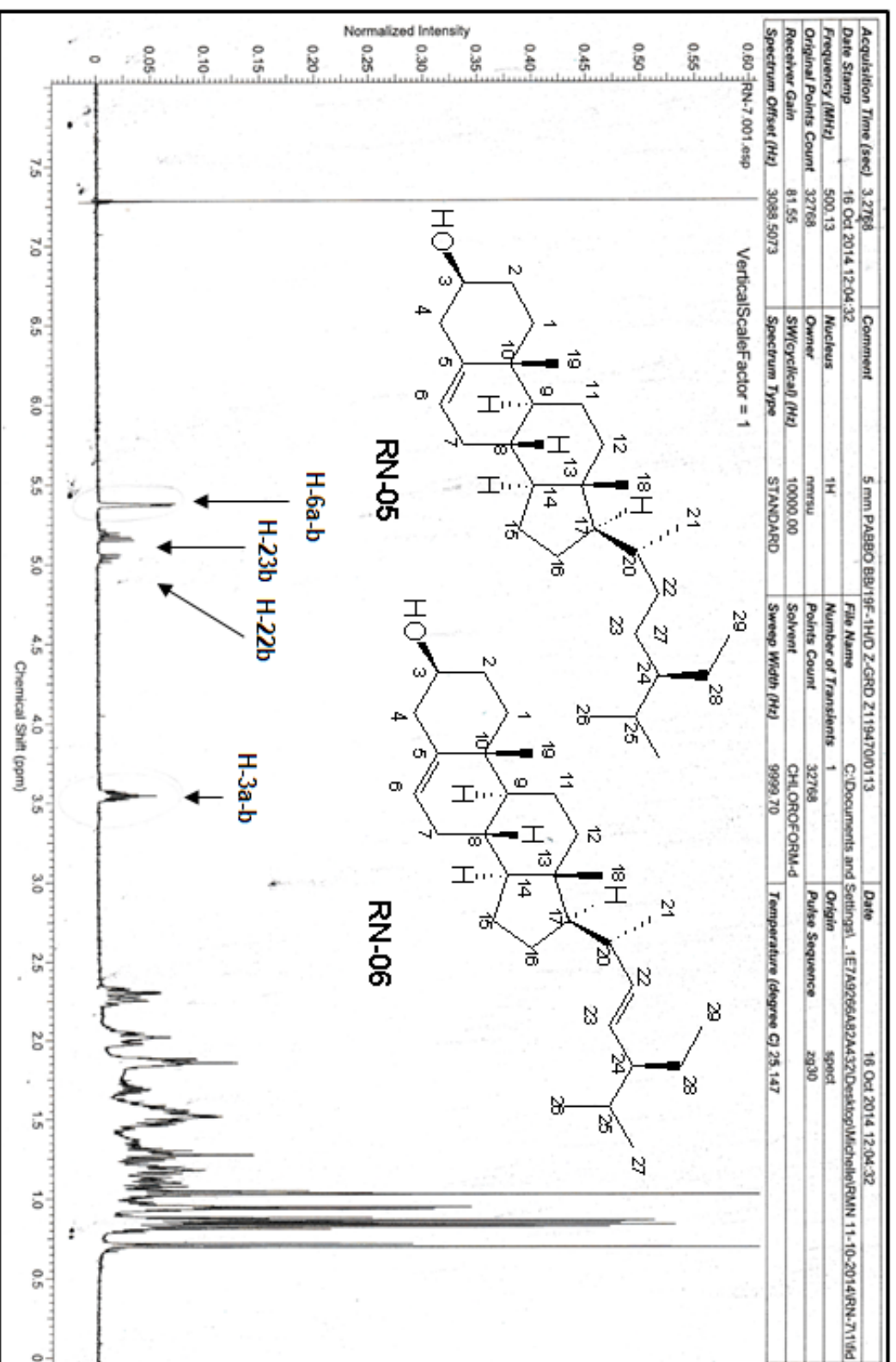


Figura 123. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias **RN-05** (β-sitosterol) e **RN-06** (estigmasterol).

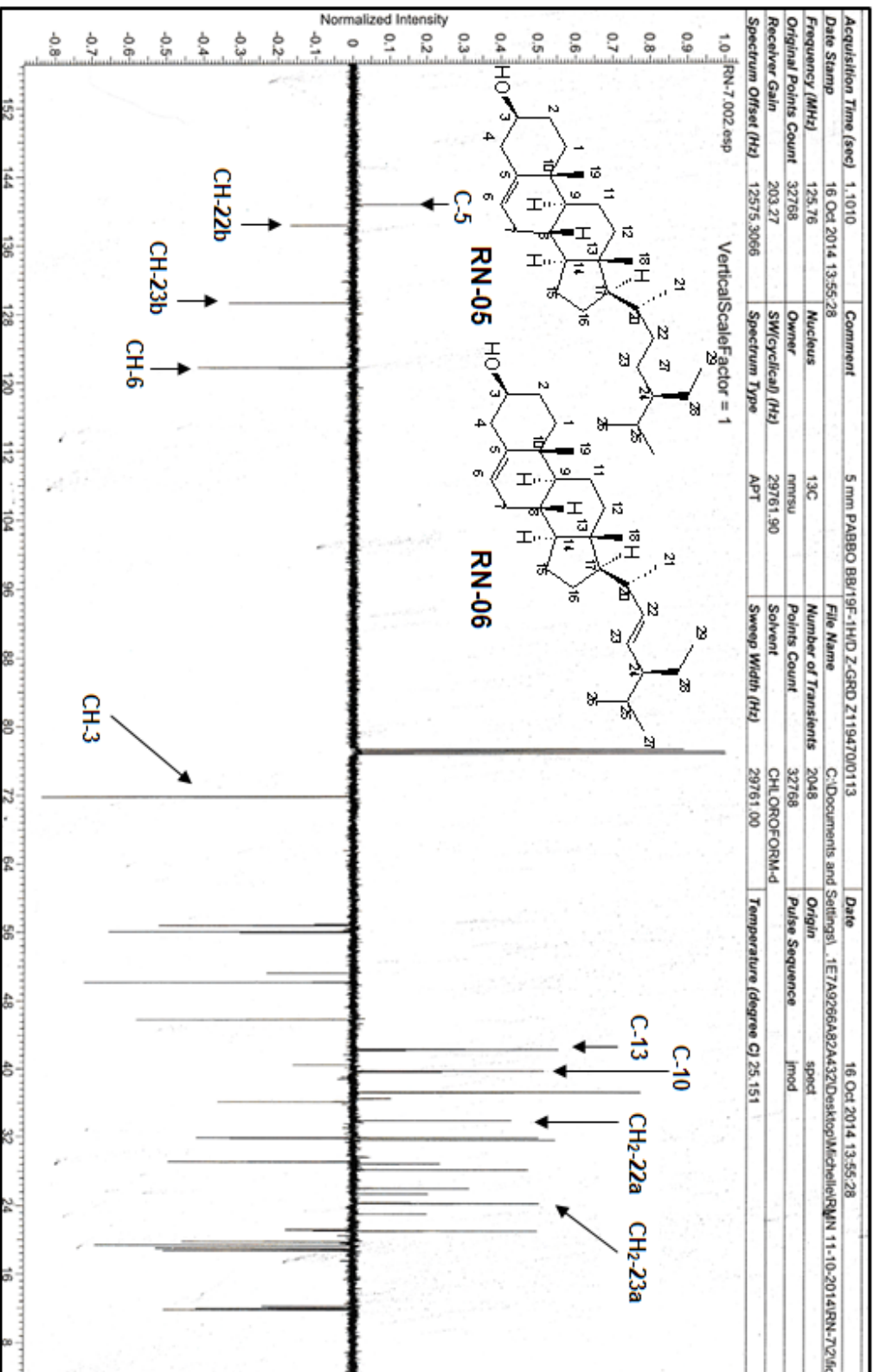
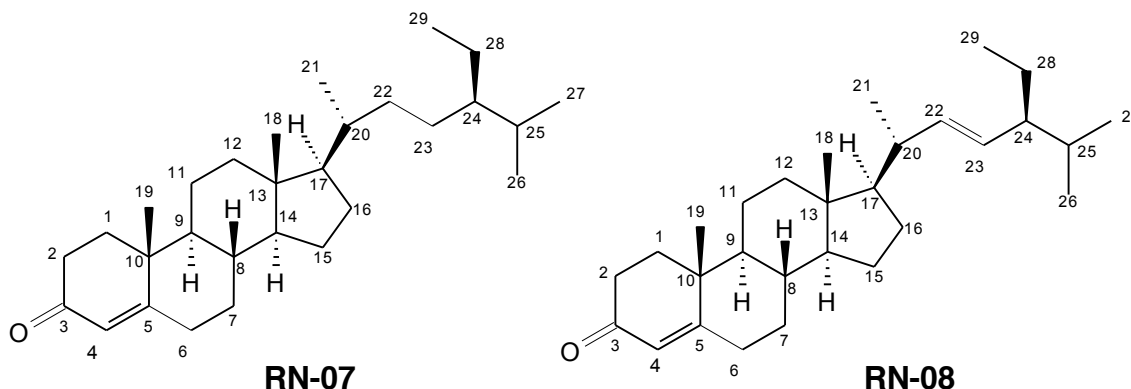


Figura 124. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias RN-05 (β-sitosterol) e RN-06 (estigmasterol).

5.3.3.1.2. Determinação estrutural da mistura contendo as substâncias RN-07 e RN-08.



A mistura das substâncias **RN-07** e **RN-08** foi isolada do extrato em hexano da espécie *Rauia nodosa*, na forma de um óleo amarelo.

O espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) (Figura 125) obtido para esta mistura de substâncias, apresentou sinais característicos da mistura dos esteroides sitostenona (**RN-07**) e estigmastenona (**RN-08**) (VIEIRA, 1995), comumente isolados em diversas plantas (DEWICK, 2002). Neste espectro observou-se um simpleto em δ_{H} 5,75 ppm atribuído ao hidrogênio H-4 e um grande acúmulo de sinais intensos na região de δ_{H} 2,50 a 0,73 ppm, devido aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos pertencentes ao esqueleto esteroidal de ambas as substâncias.

A análise do espectro de RMN ^1H da mistura também confirmou claramente a presença da estigmastenona (**RN-08**), através dos dois duplos dupletos observados em δ_{H} 5,15 e 5,08 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio olefínicos H-22 e H-23 (Tabela 30).

A análise de espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) obtido para a mistura dessas substâncias (Figura 126) apresentou sinais referentes a sitostenona (**RN-07**) e a estigmastenona (**RN-08**). O átomos de carbono CH-4 e C-5 foram observados em δ_{C} 123,7 e 171,6 ppm e o átomo de carbono carbonílico C-3 em δ_{C} 199,6 ppm.

A distinção entre a sitostenona (**RN-07**) e o estigmastenona (**RN-08**), pode ainda ser confirmada pelos sinais observados em δ_{C} 138,1 e 129,5 ppm atribuídos aos átomos de carbono com hibridização sp^2 , CH-22 e CH-23, presentes apenas na estrutura da estigmastenona (**RN-08**). Já os átomos de carbono CH_2 -22 e CH_2 -

23 presentes na sitostenona (**RN-07**) são observados em δ_c 34,0 e 26,1 ppm (Tabela 30).

A análise do espectro de RMN ^{13}C permitiu uma completa atribuição dos sinais referentes aos átomos de carbono de ambos os esteroides.

Após comparação com os dados relatados na literatura, foi possível concluir que a mistura de esteroides corresponde as substâncias sitostenona (**RN-07**) e estigmastenona (**RN-08**), também comumente isoladas na forma de mistura em diversas espécie vegetais (GRECA et al., 1990).

Tabela 30. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) das substâncias **RN-07** e **RN-08**, em comparação com os dados da literatura para a sitostenona (**Mo-1**) e para a estigmastenona (**Mo-2**) (VIEIRA, 1995). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

	RN-07	Mo-1	RN-08	Mo-2
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
C				
3	199,6	200,1	199,6	200,1
5	171,6	172,5	171,6	172,5
10	35,7	36,1	35,7	36,1
13		42,7		42,7
CH				
4	123,8	123,8	123,7	123,8
8	35,6	35,8	35,6	35,8
9	53,8	54,0	53,8	54,0
14	55,9	55,9	55,9	55,9
17	56,1	56,1	56,0	56,1
20	40,5	36,3	40,5	40,7
22	-	-	138,1	138,4
23	-	-	129,5	129,6
24	45,8	45,9	45,8	51,4
25	29,2	29,3	31,9	29,9
CH₂				
1	38,6	38,8	38,6	38,8
2	33,9	34,1	34,00	34,1
6	32,9	32,1	33,0	32,1
7	32,4	32,0	32,4	32,0
11	21,0	21,2	21,0	21,2
12	39,6	39,8	39,6	39,8
15	24,2	24,3	24,2	24,3
16	28,2	29,3	28,2	29,3
22	34,00	34,0	-	-
23	26,1	26,2	-	-
28	23,1		25,2	
CH₃				
18	12,0	12,2	11,99	12,2
19	17,4	17,5	17,4	17,5
21	18,7	18,9	21,1	21,3
26	19,8	19,2	19,8	20,4
27	19,0	18,6	19,1	18,6
29	11,9	12,2	11,9	12,2

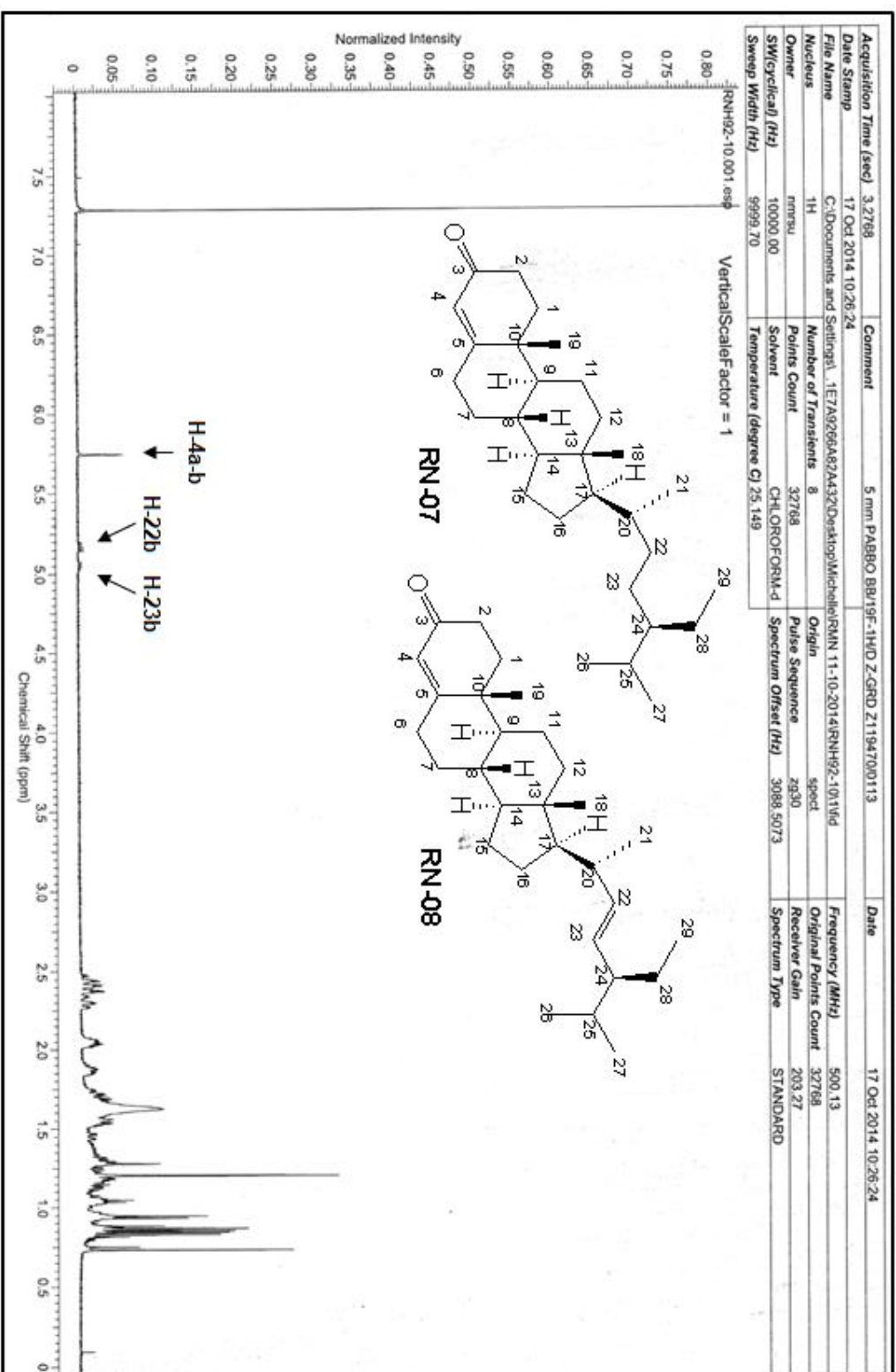


Figura 125. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias RN-07 (sitostenona) e RN-08 (estigmasterona).

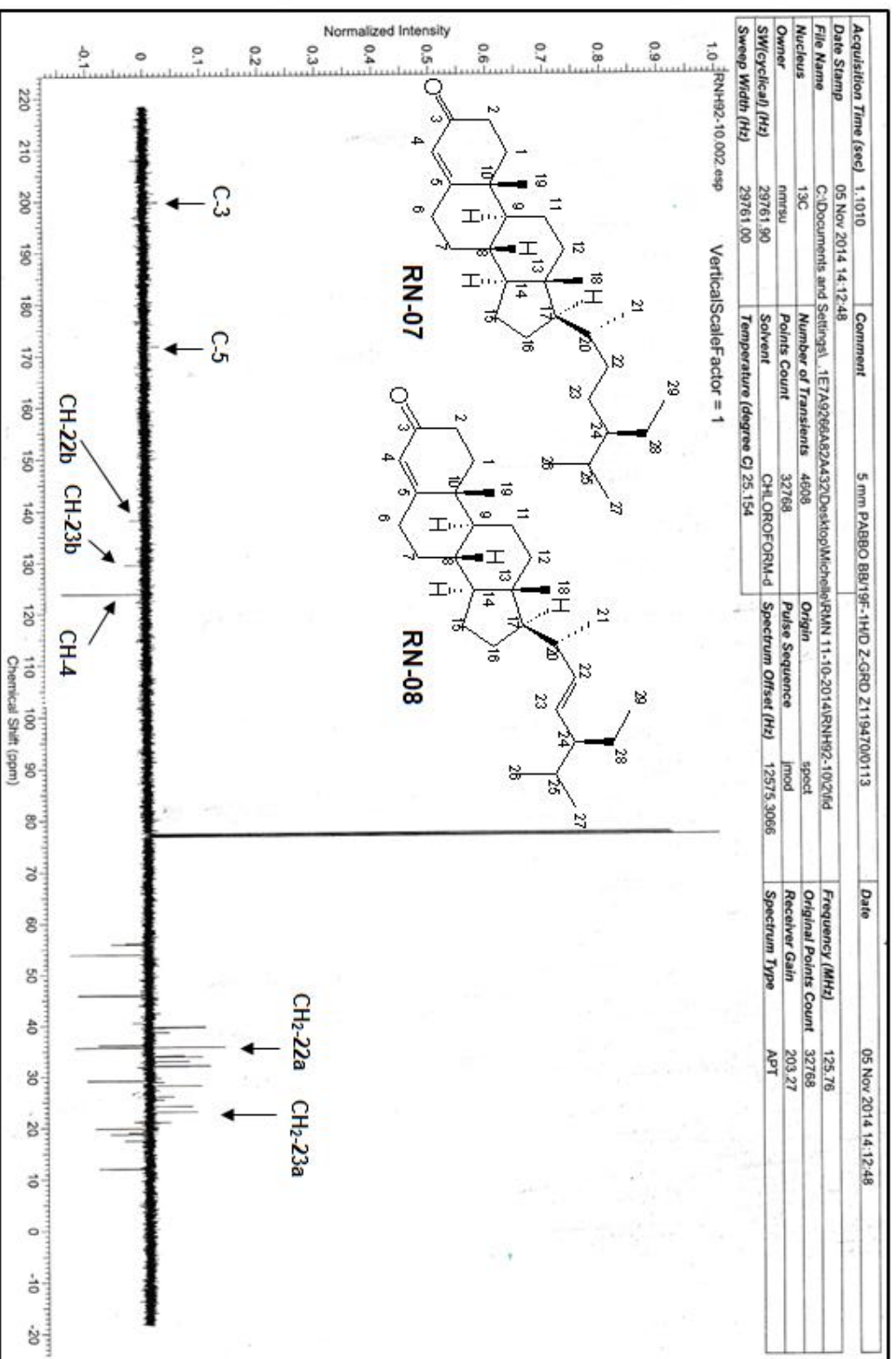
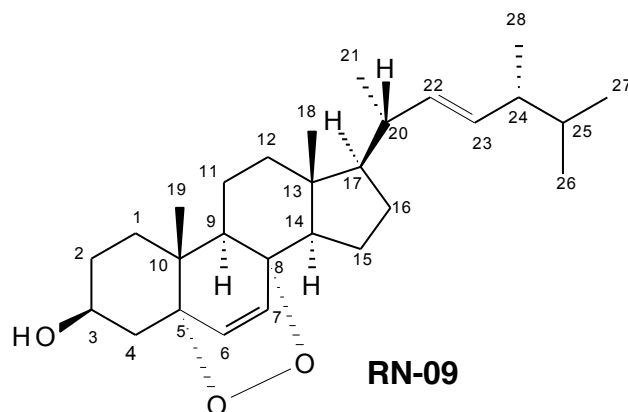


Figura 126. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a mistura das substâncias RN-07 (sitostenona) e RN-08 (estigmasterona).

5.3.3.1.3. Determinação estrutural da substância RN-09.



A substância **RN-09** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Rauia nodosa*, na forma de um óleo amarelo.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figura 127) obtido para a substância **RN-09** permitiu reconhecer a presença de 28 átomos de carbono, sendo seis carbonos metílicos, sete carbonos metilênicos (sp^3), onze carbonos metínicos (sete sp^3 e quatro sp^2) e quatro carbonos quaternários, sendo dois ligados a heteroátomos, sugerindo um esqueleto esteroidal (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Os sinais referentes aos átomos de carbono quaternários foram observados em δ_{C} 81,0 ppm, δ_{C} 79,8 ppm, δ_{C} 44,6 ppm e δ_{C} 36,6 ppm. Os dois primeiros sinais são atribuídos aos carbonos quaternários C-5 e C-8 devido as correlações a duas ($^2J_{\text{HC}}$) ligações entre os átomos C-5(δ_{C} 81,0)/H-6(δ_{H} 6,27) e C-8 (δ_{C} 79,8)/H-14(δ_{H} 1,58) e à três ($^3J_{\text{HC}}$) ligações entre os átomos C-5(δ_{C} 81,0)/H-7(δ_{H} 6,53) e C-5(δ_{C} 81,0)/3H-19(δ_{H} 0,91) (Tabela 31), observadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 132 e 133), e apresentam deslocamentos característicos de átomos de carbono ligados a átomos de oxigênio.

Os outros dois sinais na região mais protegida são referentes aos átomos de carbono quaternários C-10 e C-13, que se encontram substituídos respectivamente pelas metilas CH_3 -18 e CH_3 -19. O mapa de correlação heteronuclear HMBC confirmou as atribuições pelas correlações a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$) entre os átomos C-10(δ_{C} 36,6)/3H-19(δ_{H} 0,91) e C-13 (δ_{C} 44,6)/3H-18(δ_{H} 0,84) (Tabela 31).

Também foi possível observar no espectro de RMN ^{13}C obtido para a substância **RN-09**, um sinal de átomo de carbono em δ_{C} 66,44 ppm (CH-3), com deslocamento característico de carbono carbinólico. Os sinais referentes aos carbonos metínicos com hibridização sp^2 foram observados em δ_{C} 135,4 ppm (CH-6), δ_{C} 130,8 ppm (CH-7), δ_{C} 135,2 ppm (CH-22) e δ_{C} 132,3 ppm (CH-23), estes deslocamentos indicam a presença de insaturação entre estes átomos.

Já os seis sinais referentes aos carbonos metílicos são observados na região de δ_{C} 13-21 ppm (Tabela 31) do espectro de RMN ^{13}C (Figura 127).

O espectro de RMN ^1H obtido para a substância **RN-09** (Figuras 128 e 129) apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,27 ppm (1H, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,53 ppm (1H, $J = 8,4$ Hz) referentes aos átomos de hidrogênio H-6 e H-7, indicando um acoplamento na posição orto. Estas atribuições são confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}), observadas no mapa HSQC, entre os átomos CH-6(δ_{C} 135,4)/H-6(δ_{H} 6,27) e CH-7(δ_{C} 130,8)/H-7(δ_{H} 6,53), confirmando a presença de insaturação entre os átomos devido aos valores característicos dos deslocamentos.

Os hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 também foram observados respectivamente em δ_{H} 5,16 ppm (1H, dd, $J = 15,3$ e $8,2$ Hz) e δ_{H} 5,24 ppm (1H, dd, $J = 15,3$ e $7,6$ Hz) e apresentaram as correlações uma ligação (J_{HC}) com os átomos de carbono em δ_{C} 135,2 ppm e δ_{C} 132,3 ppm, assim confirmando a insaturação nesta posição.

Também foi possível observar um multipletto em δ_{H} 4,01 ppm atribuído ao átomo de hidrogênio H-3, confirmado pela a correlação a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos CH-3(δ_{C} 64,4)/H-3(δ_{H} 4,01), observada no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 130 e 131). Desta forma indicando a presença de uma hidroxila na posição CH-3 da estrutura da substância **RN-09** (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Na região alifática do espectro de RMN ^1H observam-se vários simpletos e dupletos, os quais através das correlações observadas no mapa de correlação heteronuclear a uma ligação (J_{HC}), HSQC, podem ser atribuídos aos respectivos átomos de hidrogênios metilênicos e metílicos, conforme apresentado na Tabela 31.

O mapa de correlação homonuclear, ^1H - ^1H -COSY (Figura 134) também confirmou a estrutura proposta para substância **RN-09**.

Após comparação com os dados relatados na literatura, foi possível concluir que a substância **RN-09** corresponde ao esteroide denominado peróxido de ergosterol ($5\alpha,8\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol) (RÖSECKE & KÖNIG, 2000).

Tabela 31. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **RN-09**, em CDCl_3 , e comparação com os dados da literatura da substância peróxido de ergosterol (**Mo-1**) (RÖSECKE; KÖNIG, 2000). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
5	81,0	-	H-6	3H-19; H-7	82,2
8	79,8	-		H-14	79,4
10	36,6	-	3H-19		36,9
13	44,6	-	3H-18		44,6
CH					
3	66,4	4,01 (m)			66,5
6	135,4	6,27 (d, 8,4)			135,4
7	130,8	6,53 (d, 8,4)			130,7
9	51,1	1,52 (dd, 6,95, 5,99)		3H-19	51,1
14	51,7	1,58 (d, 6,55)		3H-18	51,7
17	56,2	1,23		3H-18; 3H-21	56,2
20	39,8	2,05	3H-21		39,7
22	135,2	5,16 (dd, 15,3, 8,2)		3H-21	135,2
23	132,3	5,24 (dd, 15,3, 7,6)		3H-28	132,3
24	42,8	1,90	3H-28	3H-26; 3H-27	42,8
25	33,1	1,49	3H-26; 3H-27	3H-28	33,1
CH₂					
1	34,7	1,97, 1,71		3H-19	34,7
2	30,1	1,86, 1,50			30,1
4	36,9	2,15, 1,90			36,9
11	20,6	1,63, 1,42			23,4
12	39,8	1,98, 1,23		3H-18	39,7
15	20,6	1,3			20,6
16	29,3	1,76	2H-15		28,6
CH₃					
18	12,9	0,84 (s)			12,9
19	17,6	0,91 (s)			18,2
21	20,9	1,02 (d, 6,5)			20,9
26	19,9	0,85 (d, 6,9)		3H-27	19,6
27	19,6	0,83 (d, 6,8)		3H-26	19,9
28	18,2	0,93 (d, 6,9)			17,6

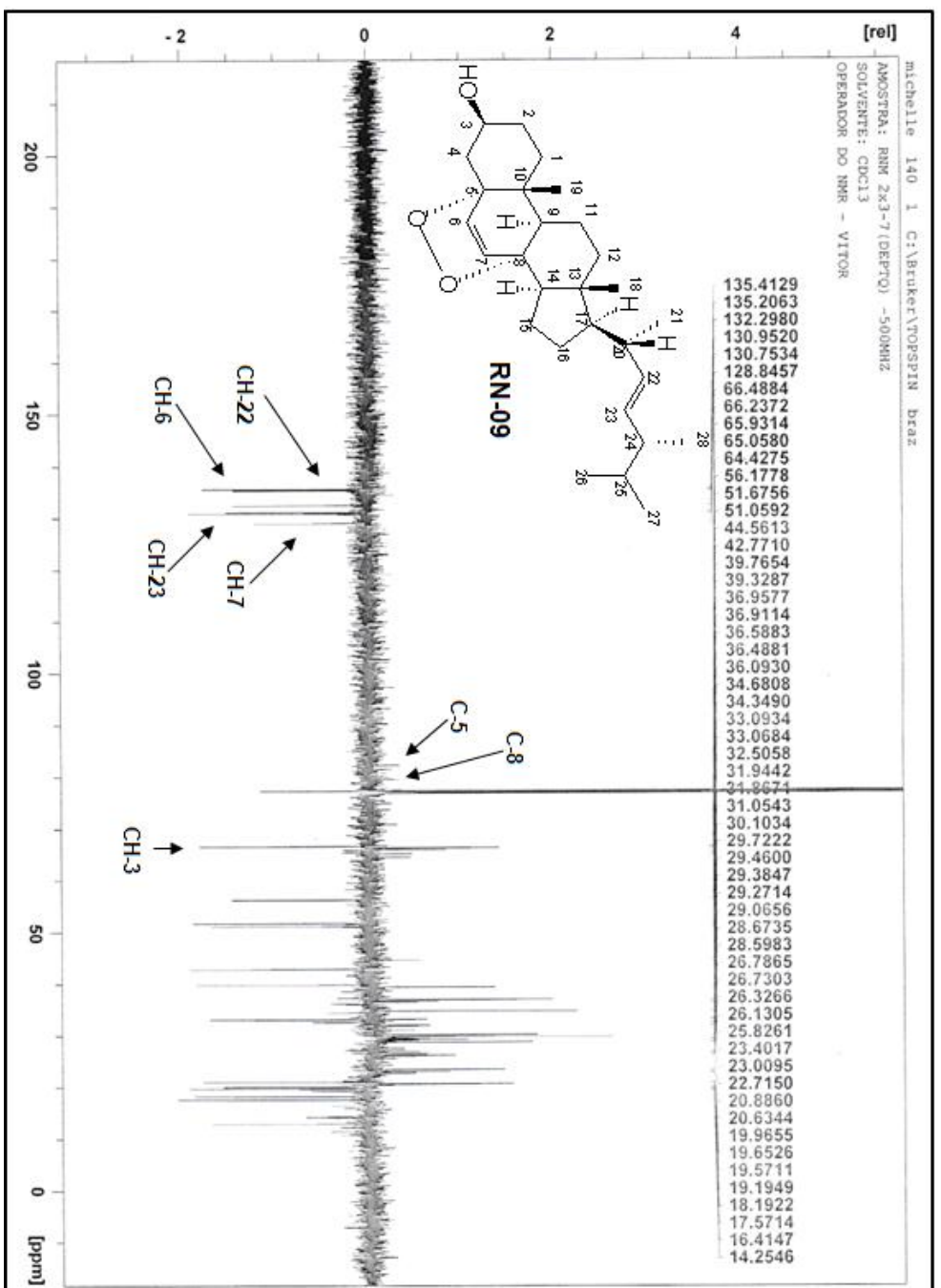


Figura 127. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol).

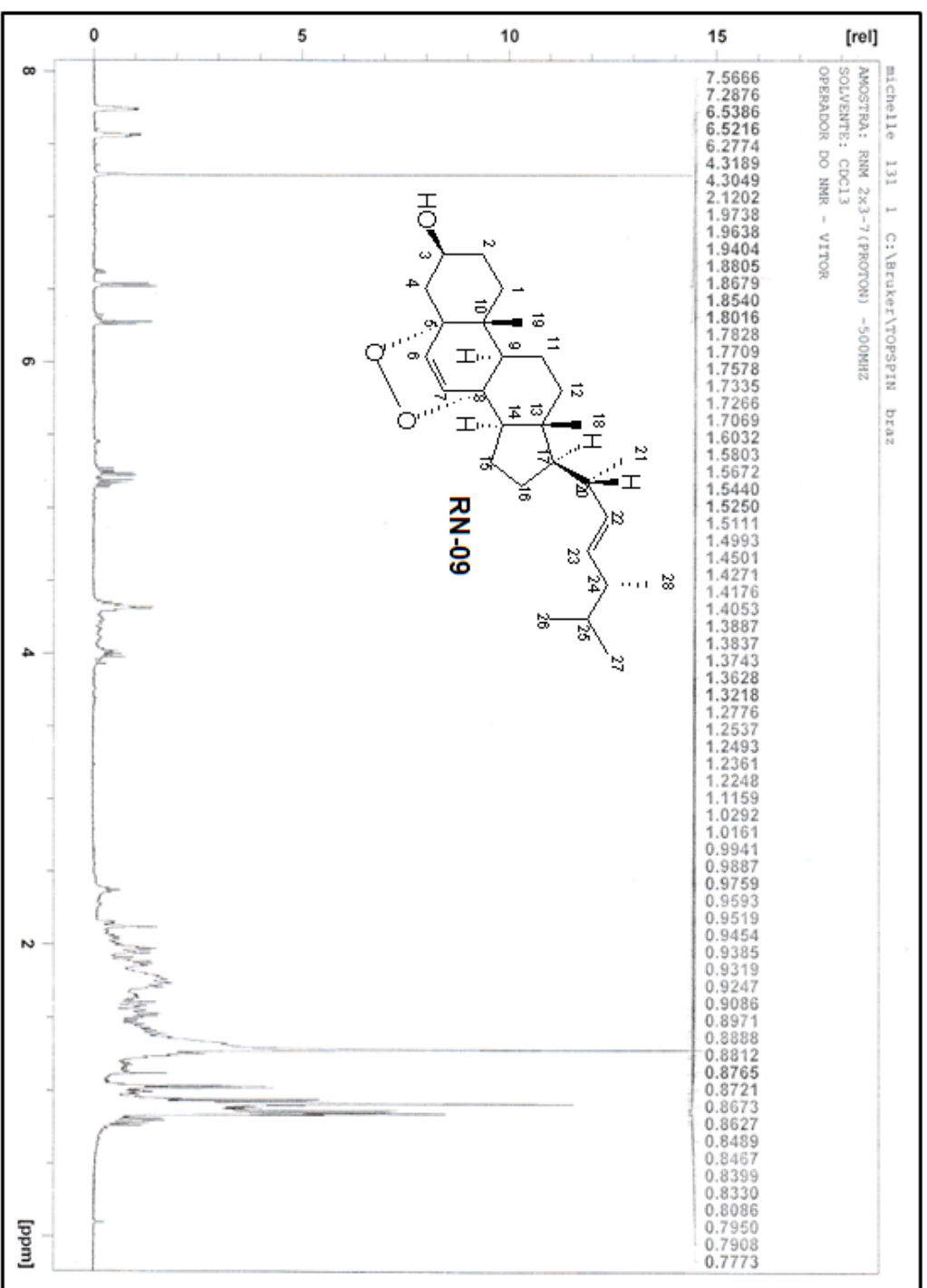


Figura 128. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol).

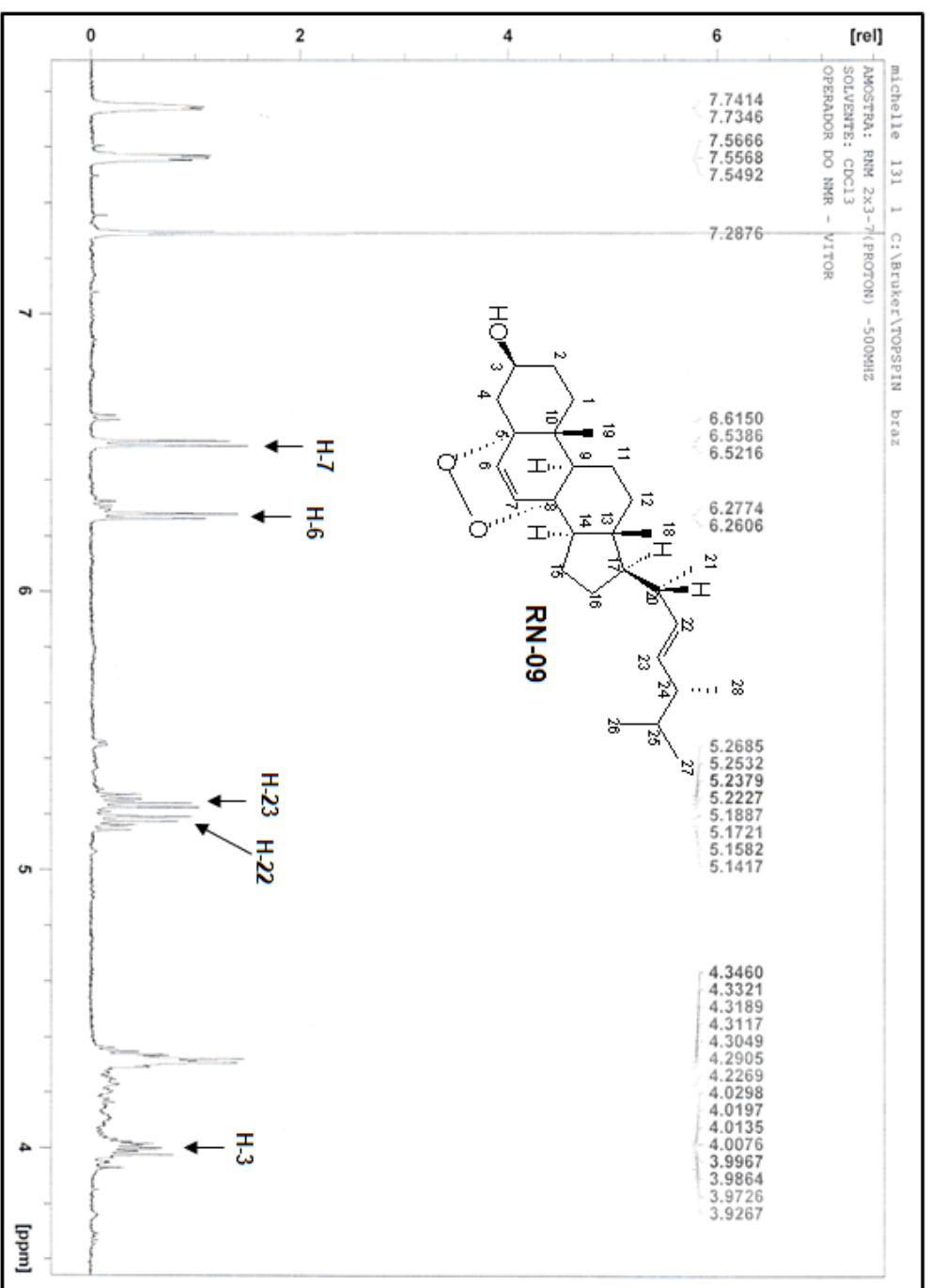


Figura 129. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol) (região de 3,6 a 8,0 ppm).

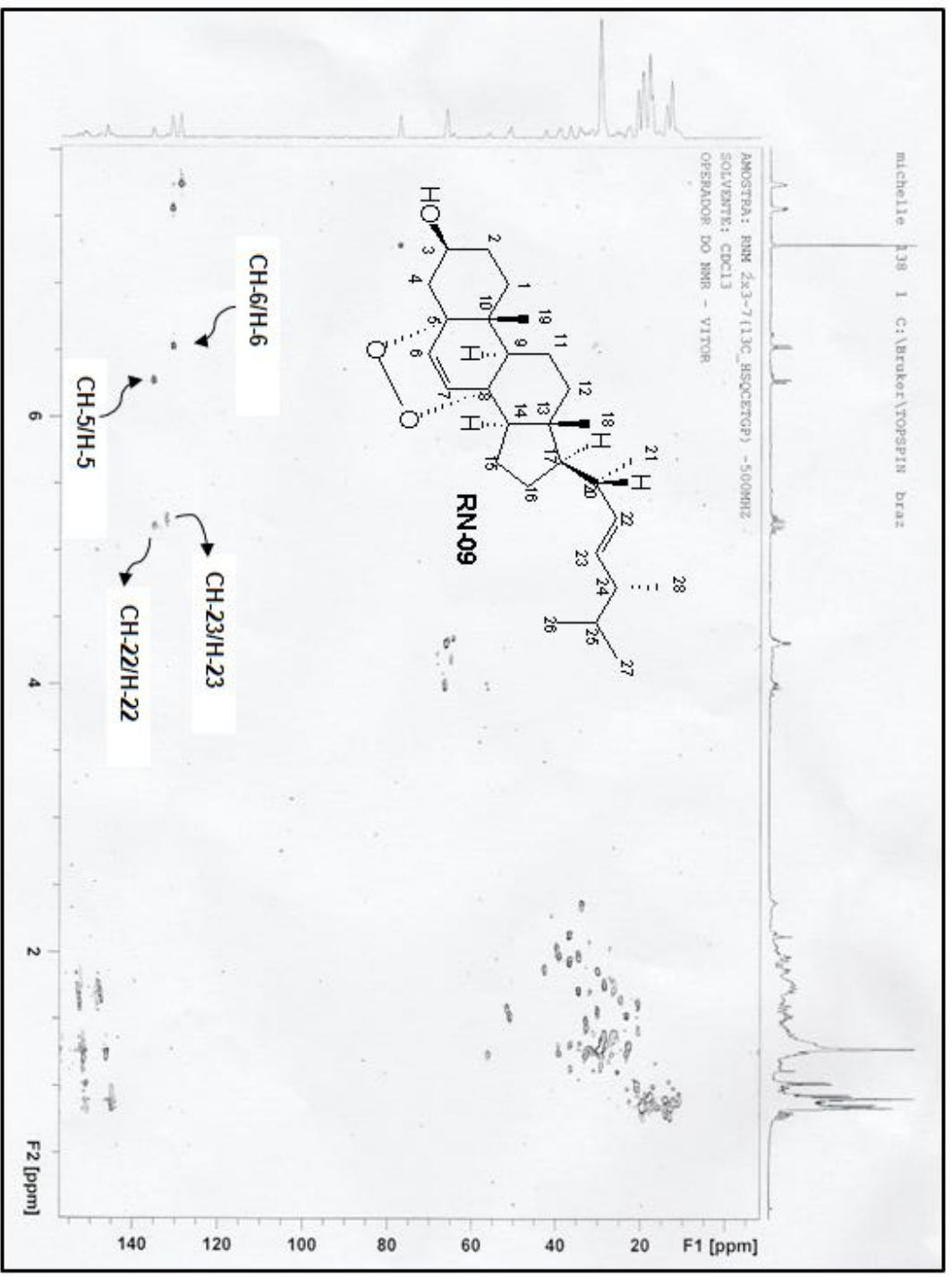


Figura 130. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol).

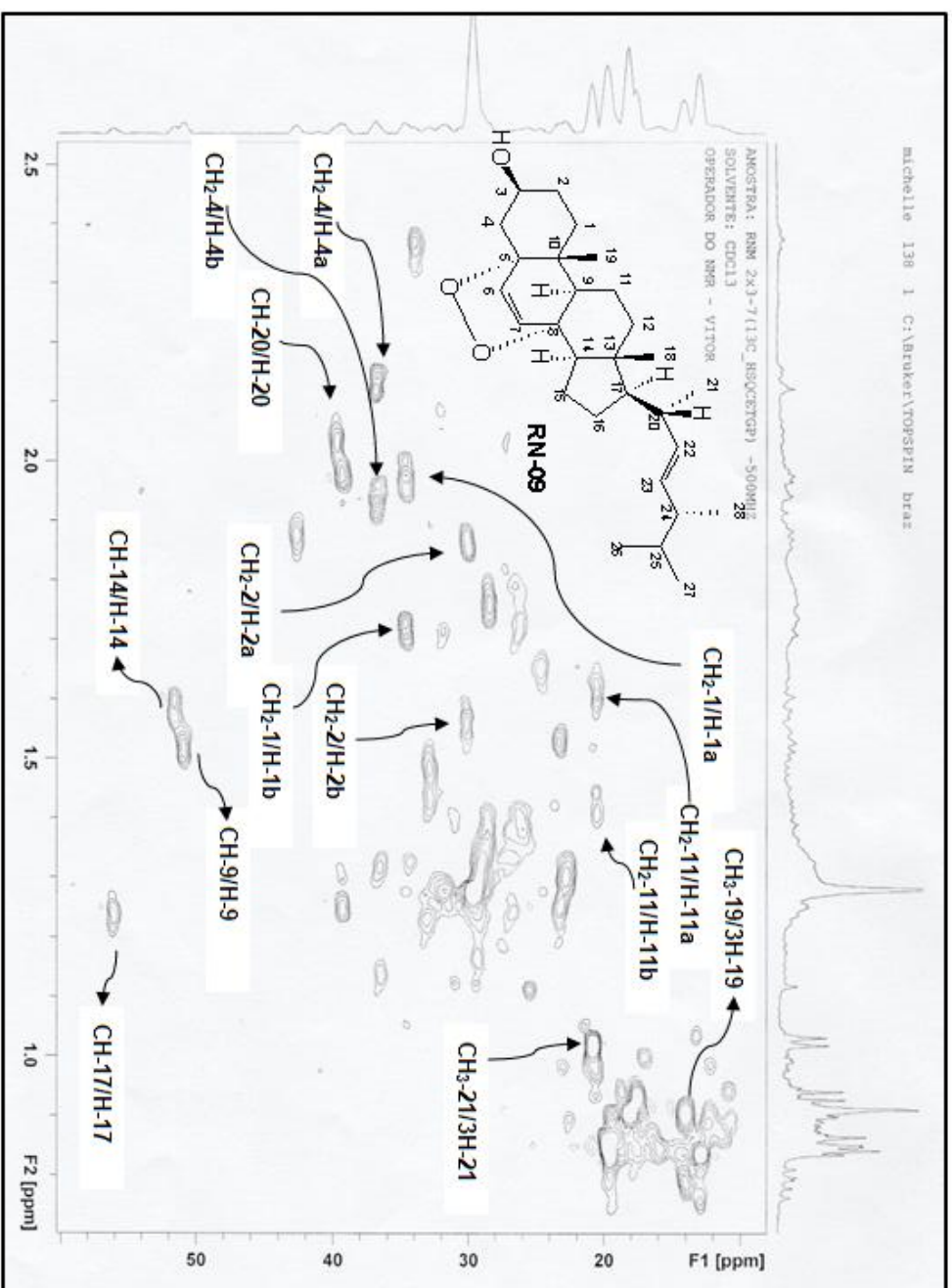


Figura 131. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol) (região de 10 a 60 ppm).

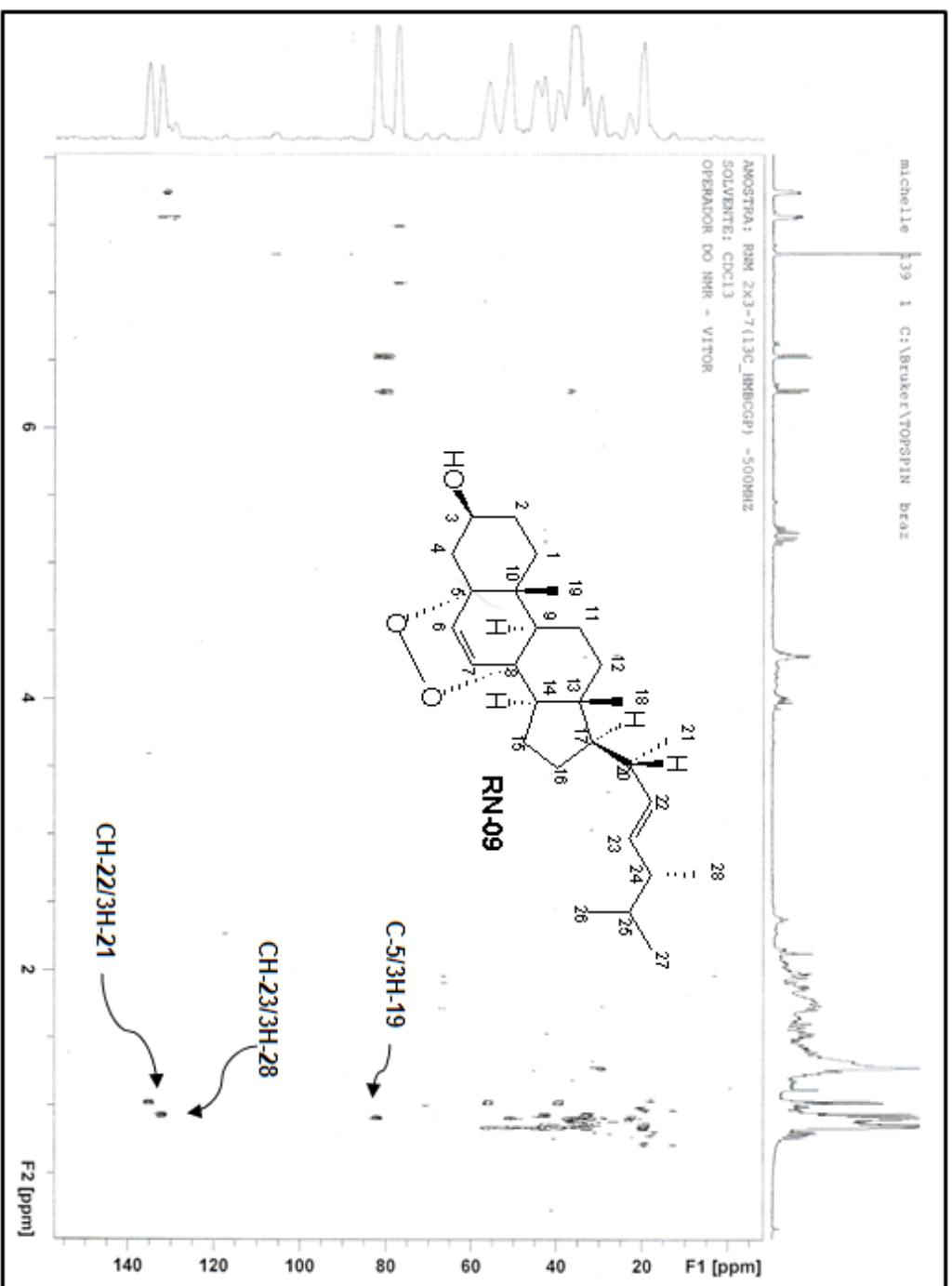


Figura 132. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol).

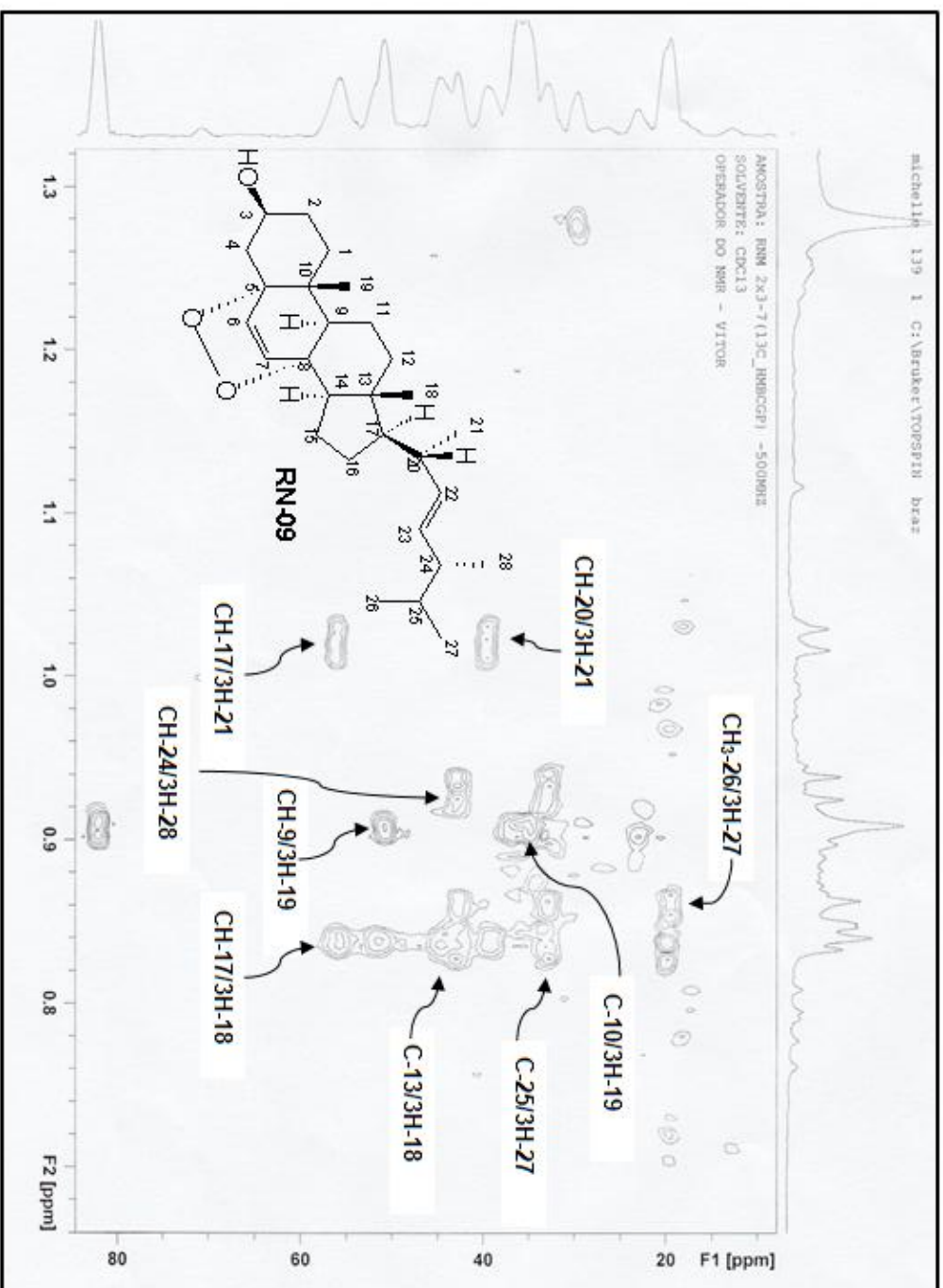


Figura 133. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-09** (peróxido de ergosterol) (região de 10 a 85 ppm).

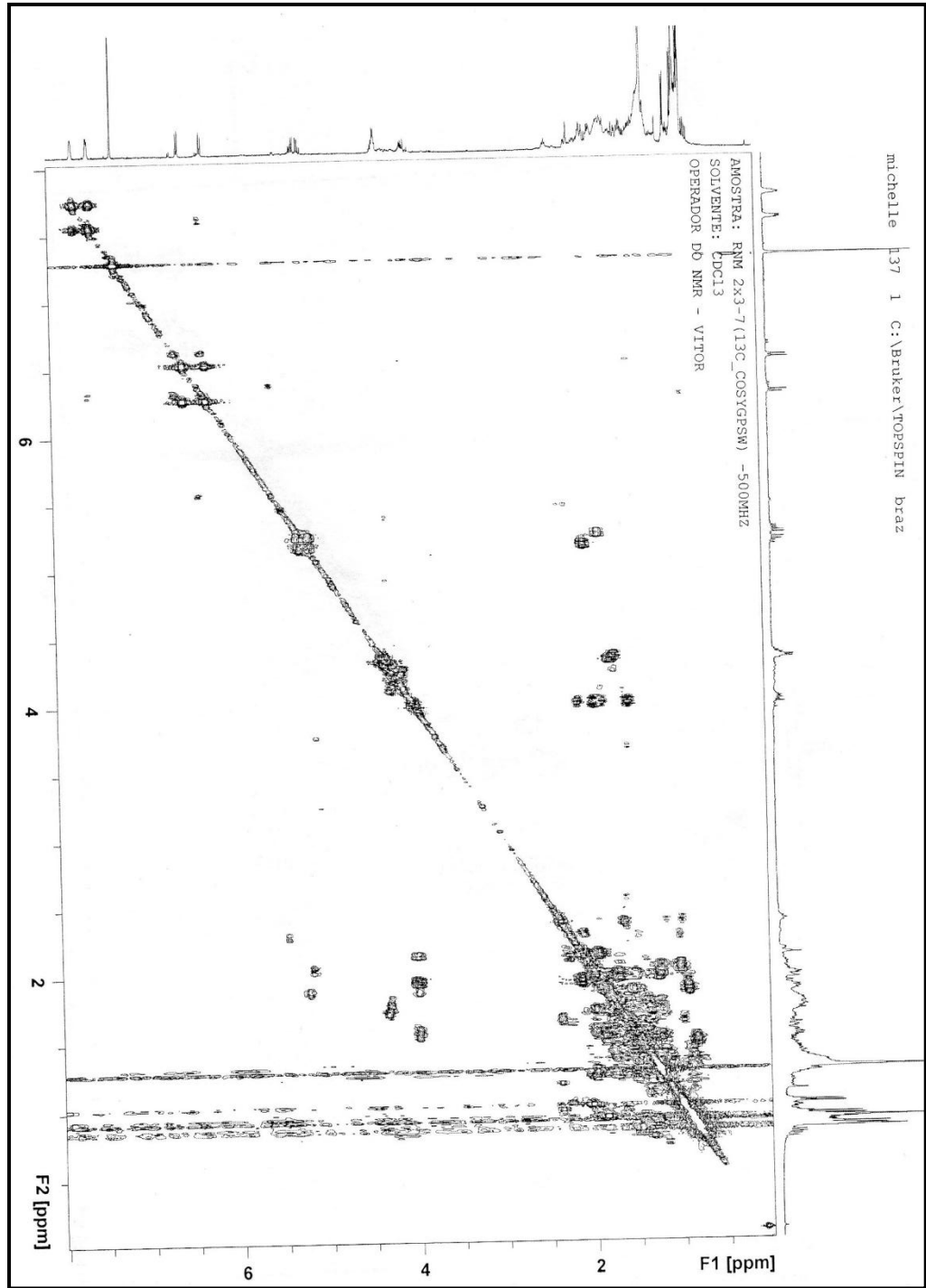
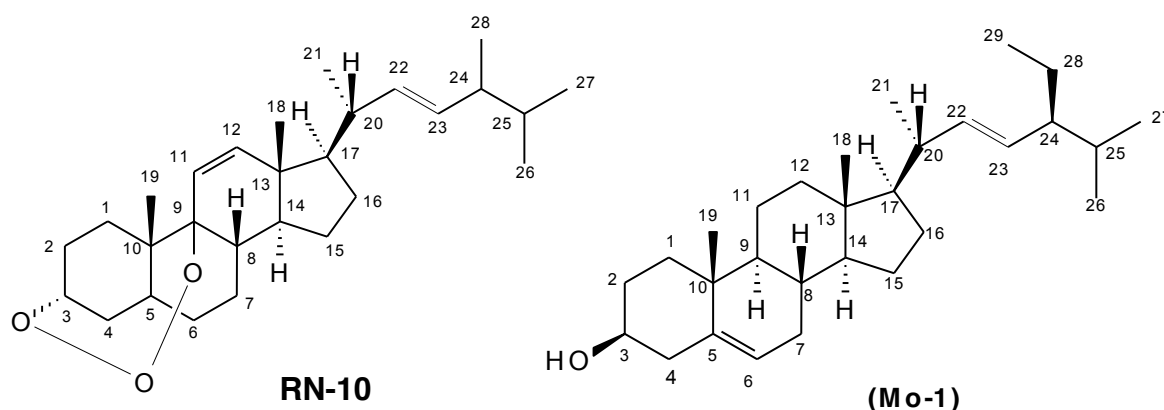


Figura 134. Espectro de ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) obtido para as substâncias RN-09 (peróxido de ergosterol).

5.3.3.1.4. Determinação estrutural da substância RN-10.



A substância **RN-10** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Rauia nodosa*, na forma de um óleo incolor.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figuras 136 e 137) obtido para a substância **RN-10** permitiu reconhecer a presença de 28 átomos de carbono, sendo seis carbonos metílicos, sete carbonos metilênicos (sp^3), doze carbonos metínicos (oito sp^3 e quatro sp^2) e três carbonos quaternários, sendo um ligado a heteroátomo, sugerindo assim um esqueleto esteroidal (SILVERSTEIN, 1998; PAVIA et., al., 2010).

O espectro de RMN ^1H obtido para a substância **RN-10** (Figuras 138 e 139) apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,27 ppm (1H, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,53 ppm (1H, $J = 8,4$ Hz) atribuídos aos átomos de hidrogênio H-11 e H-12, indicando um acoplamento na posição orto. Os hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 também foram observados respectivamente em δ_{H} 5,17 ppm (1H, dd, $J = 15,2$ e 8,5 Hz) e δ_{H} 5,23 ppm (1H, dd, $J = 15,2$ e 8,2 Hz). Estes deslocamentos são característicos de átomos de hidrogênio olefínicos e indicam a presença de duas insaturações na estrutura da substância **RN-10** (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et. al., 2010).

Na região alifática do espectro de RMN ^1H observam-se vários singletos e dupletos, os quais através das correlações observadas no mapa de correlação heteronuclear a uma ligação (J_{HC}), HSQC (Figuras 140 e 141), podem ser atribuídos aos respectivos átomos de hidrogênios metilênicos e metílicos, conforme apresentado na Tabela 32.

Os sinais referentes aos átomos de carbono quaternários foram observados no espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) em δ_{C} 82,2 ppm, δ_{C} 38,2 ppm e δ_{C}

44,4 ppm. O primeiro sinal possui deslocamento característico de átomos de carbono ligado a heteroátomos de oxigênio e apresentou correlação a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$) com H-11 (δ_{H} 6,27 ppm) e a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$) com 3H-19 (δ_{H} 0,91 ppm) e H-12 (δ_{H} 6,23 ppm), observadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 142 e 143). Desta forma este sinal foi atribuído ao átomo de carbono quaternário C-9.

Os outros dois sinais na região mais protegida são referentes aos átomos de carbono quaternários C-10 e C-13, que estão ligados as metilas CH₃-18 e CH₃-19. Estas atribuições são devido as correlações a duas ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre os átomos C-10 (δ_{C} 38,2)/3H-19 (δ_{H} 0,91) e C-13 (δ_{C} 44,4)/3H-18 (δ_{H} 0,84), observados no mapa de correlação heteronuclear HMBC.

Foi observado também um segundo carbono com deslocamento característico de átomos de carbono ligado a heteroátomos de oxigênio. Este sinal foi observado como um carbono metínico em δ_{C} 66,5 ppm (CH-3). A análise do mapa de correlação heteronuclear, HSQC, apresentou a correlação a uma ligação (J_{HC}) entre este átomo de carbono e um multiplete em δ_{H} 4,02 ppm. Já o mapa de correlação heteronuclear HMBC apresentou a correlação a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$) com os átomos de hidrogênio 2H-4, observados em δ_{H} 1,25 ppm e δ_{H} 1,97 ppm. Desta forma este sinal foi atribuído ao carbono metínico CH-3 e indicou a presença de um segundo heteroátomo de oxigênio nesta posição (Tabela 32).

Os sinais referentes aos carbonos metínicos com hibridização sp^2 foram observados em δ_{C} 135,5 ppm (CH-11), δ_{C} 130,8 (CH-12), δ_{C} 135,2 (CH-22) e δ_{C} 132,2 (CH-23), estes deslocamentos indicam a presença de insaturação entre estes átomos. Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações a uma ligação (J_{HC}) entre os átomos C-11 (δ_{C} 135,5)/H-11 (6,27), CH-12 (δ_{C} 130,8)/H-12 (δ_{H} 6,53), CH-22 (δ_{C} 135,2)/H-22 (δ_{H} 5,17) e CH-23 (δ_{C} 132,2)/H-23 (δ_{H} 5,23).

O mapa de correlação homonuclear, ^1H - ^1H -COSY (Figura 144) também corroborou com a estrutura proposta para substância **RN-10**.

Os seis sinais referentes aos carbonos metílicos são observados na região de δ_{C} 12-21 ppm do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figura 137) . Assim sugerindo um esqueleto esteroidal para a substância **RN-10**.

Tabela 32. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **RN-10** (rauianodoxi), em CDCl_3 , e comparação com os dados da literatura da substância estigmasterol (**Mo-1**) (KOJIMA et. al., 1990). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J , entre parênteses) estão em Hz.

	HSQC		HMBC		Mo-1
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
5	-	-	-	-	140,7
9	82,2	-	H-11	H-12; 3H-19	-
10	38,2	-	3H-19	H-11	36,5
13	44,4	-	3H-18		42,2
CH					
3	66,5	4,02 (m)	2H-4		71,8
5	51,1	1,50		3H-19	-
6	-	-	-	-	121,5
8	38,3	2,05			31,9
9	-	-	-	-	50,1
11	135,5	6,27 (d, 8,5)		H-18	-
12	130,8	6,53 (d, 8,5)		H-14	-
14	51,7	1,58		3H-18	56,8
17	56,1	1,24		3H-18; 3H-21	55,9
20	39,7	2,07	3H-21	H-23	40,5
22	135,2	5,17 (dd, 15,2, 8,5)		3H-21	138,3
23	132,2	5,23 (dd, 15,2, 8,2)	H-24	3H-28	129,2
24	42,8	1,87	3H-28	H-22; 3H-26; 3H-27	51,2
25	33,1	1,48	3H-26; 3H-27	3H-28	31,9
CH₂					
1	36,9	2,15, 1,90		3H-19	37,2
2	34,7	1,93, 1,68			31,6
4	38,3	1,97, 1,25			42,3
6	20,7	1,65, 1,43			-
7	30,1	1,85, 1,60			31,9
11	-	-	-	-	21,1

12	-	-	-	-	39,7
15	23,4	1,55, 1,25			24,4
16	28,7	1,75, 1,30			28,9
28	-	-	-	-	25,4
CH₃					
18	12,9	0,84 (s)			12,0
19	18,2	0,91 (s)			19,4
21	20,8	1,02 (d, 6,5)			21,2
26	19,9	0,85 (d, 7,0)		3H-27	21,1
27	19,6	0,84 (d, 6,9)		3H-26	19,0
28	17,6	0,92 (d, 7,4)			-
29	-	-	-	-	12,3

A estereoquímica da substância **RN-10** foi determinada através, das análises das interações dipolares dos átomos de hidrogênio, apresentados pelo mapa de interação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (Figuras 145 e 146). A análise do espectro de ^1H - ^1H -NOESY permitiu observar a interação espacial entre o átomo de hidrogênio H-8 e os átomos de hidrogênio metílicos 3H-18 e 3H-19, indicando que estes átomos de hidrogênios estão em posições que resultam na orientação axial-axial (Figura 135).

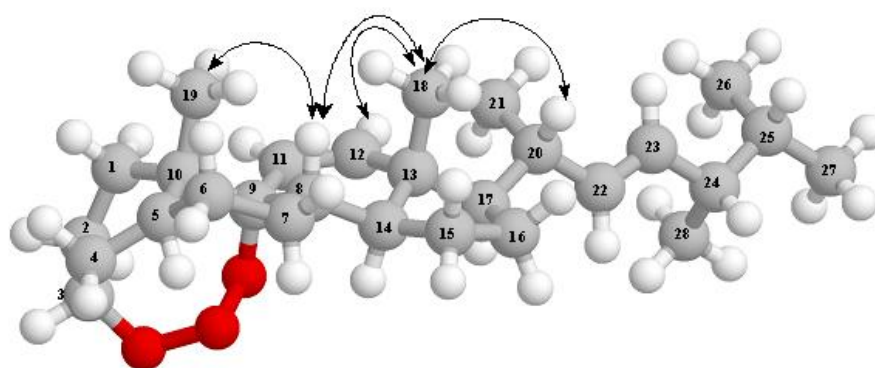


Figura 135. Interações espaciais observadas no espectro de ^1H - ^1H -NOESY referente a estereoquímica da substância **RN-10**.

Além disso, foi possível determinar a configuração *S* para o átomo de carbono CH-20 com base na interação espacial observada entre os átomos de hidrogênio H-20 e 3H-18 ilustrada na Figura 135.

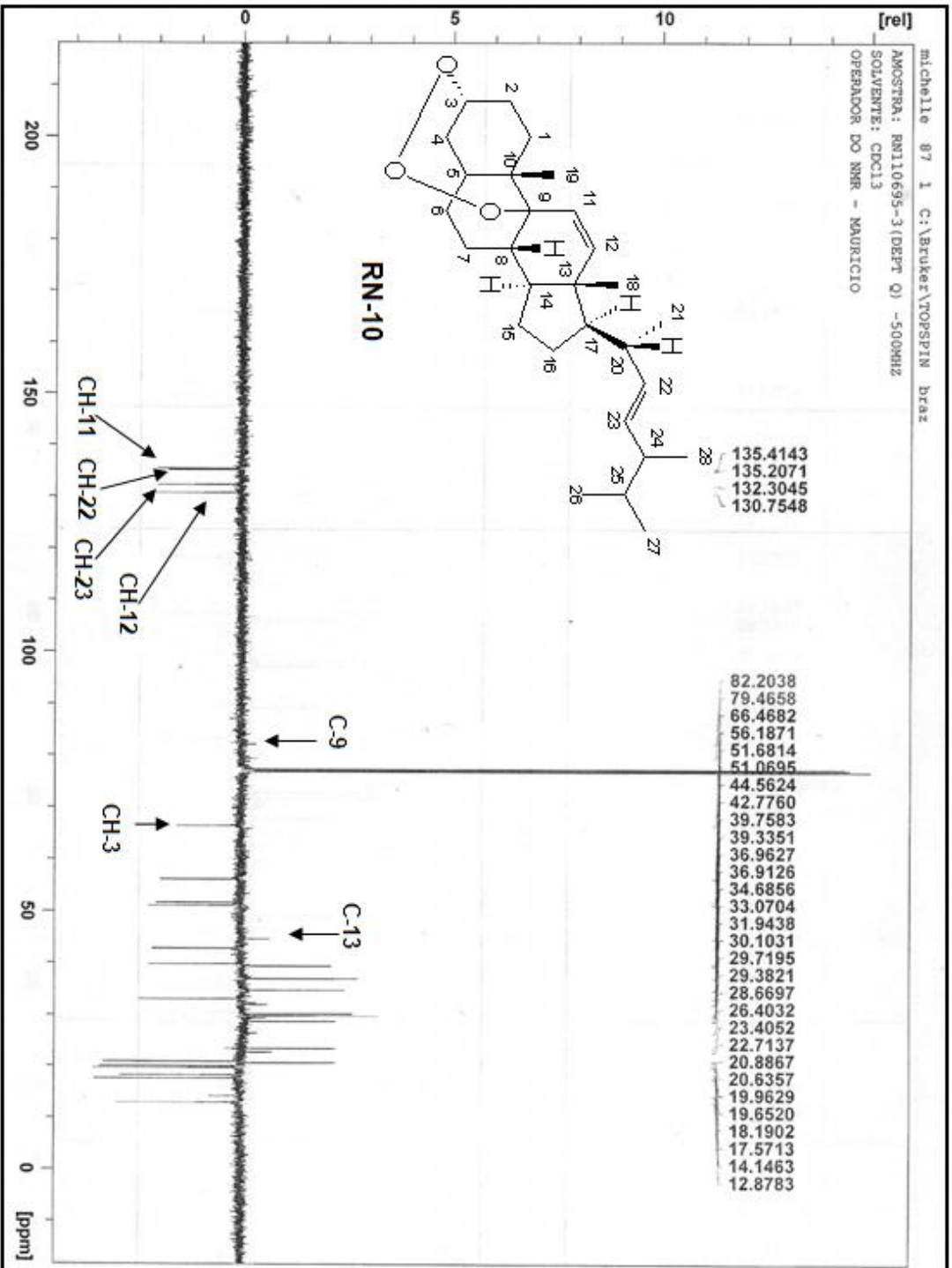


Figura 136. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-10 (rauanodoxi).

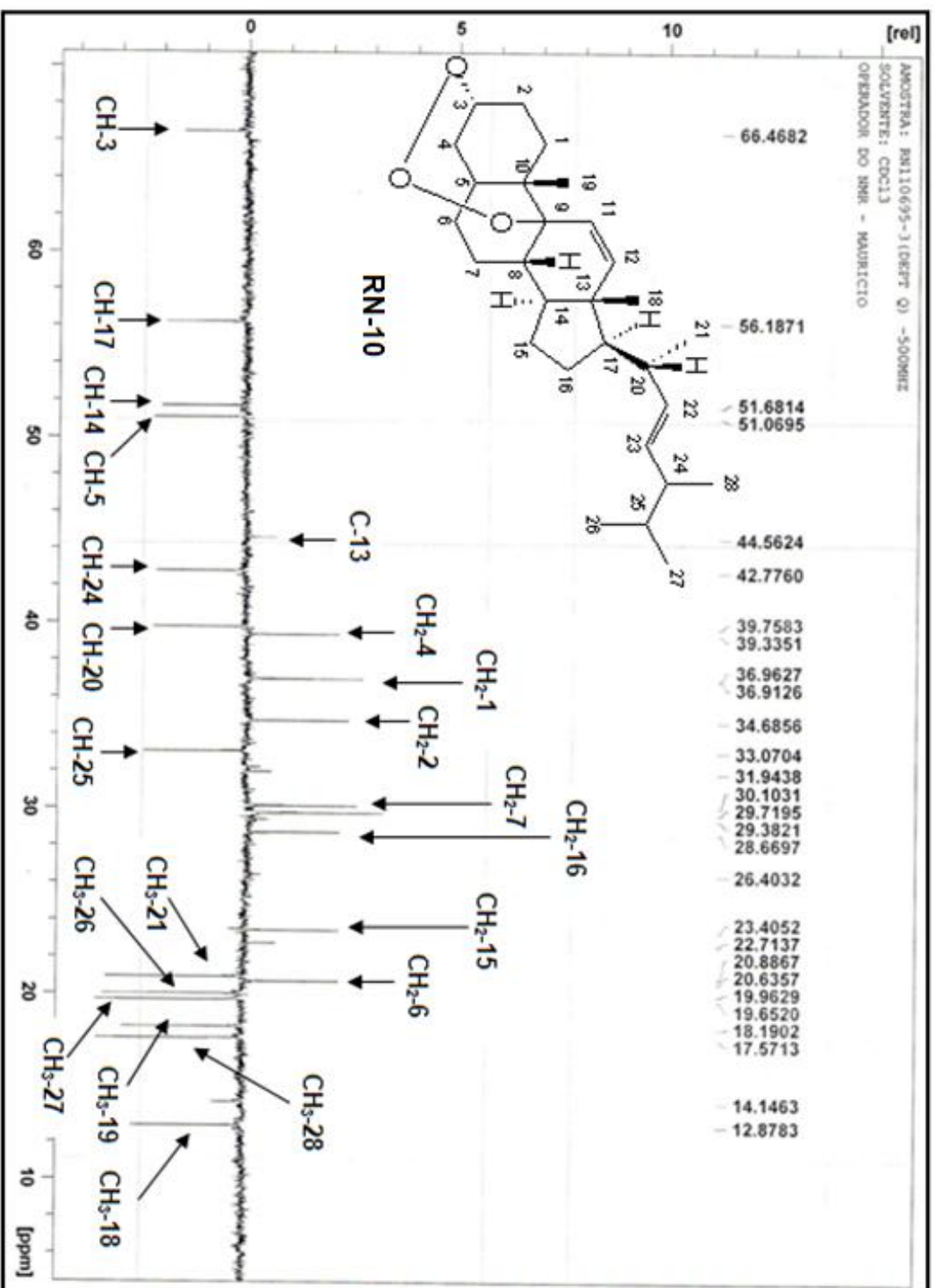


Figura 137. Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-10 (rauianodoxil) (região de 06 a 70 ppm).

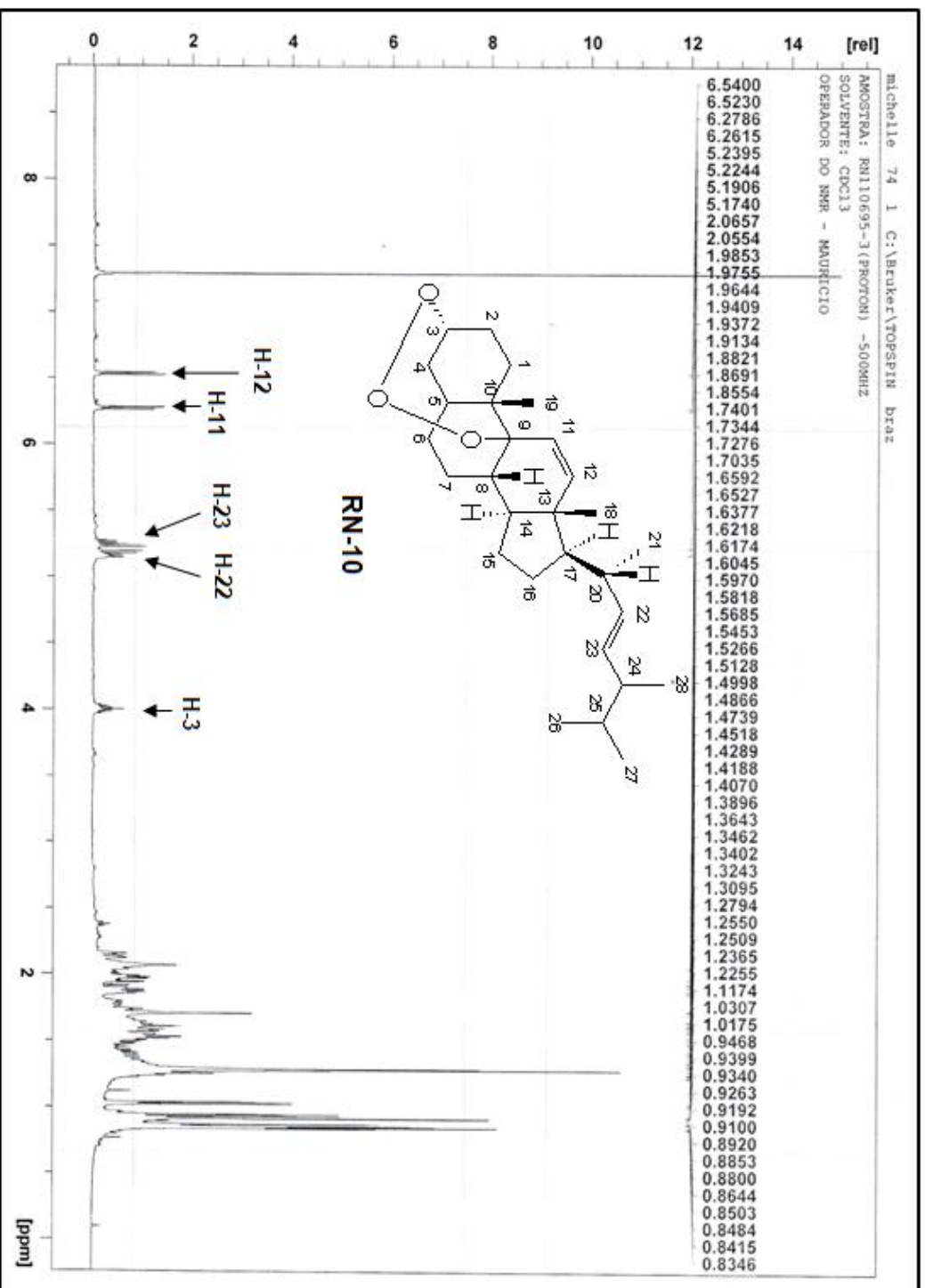


Figura 138. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-10** (raulianodoxil).

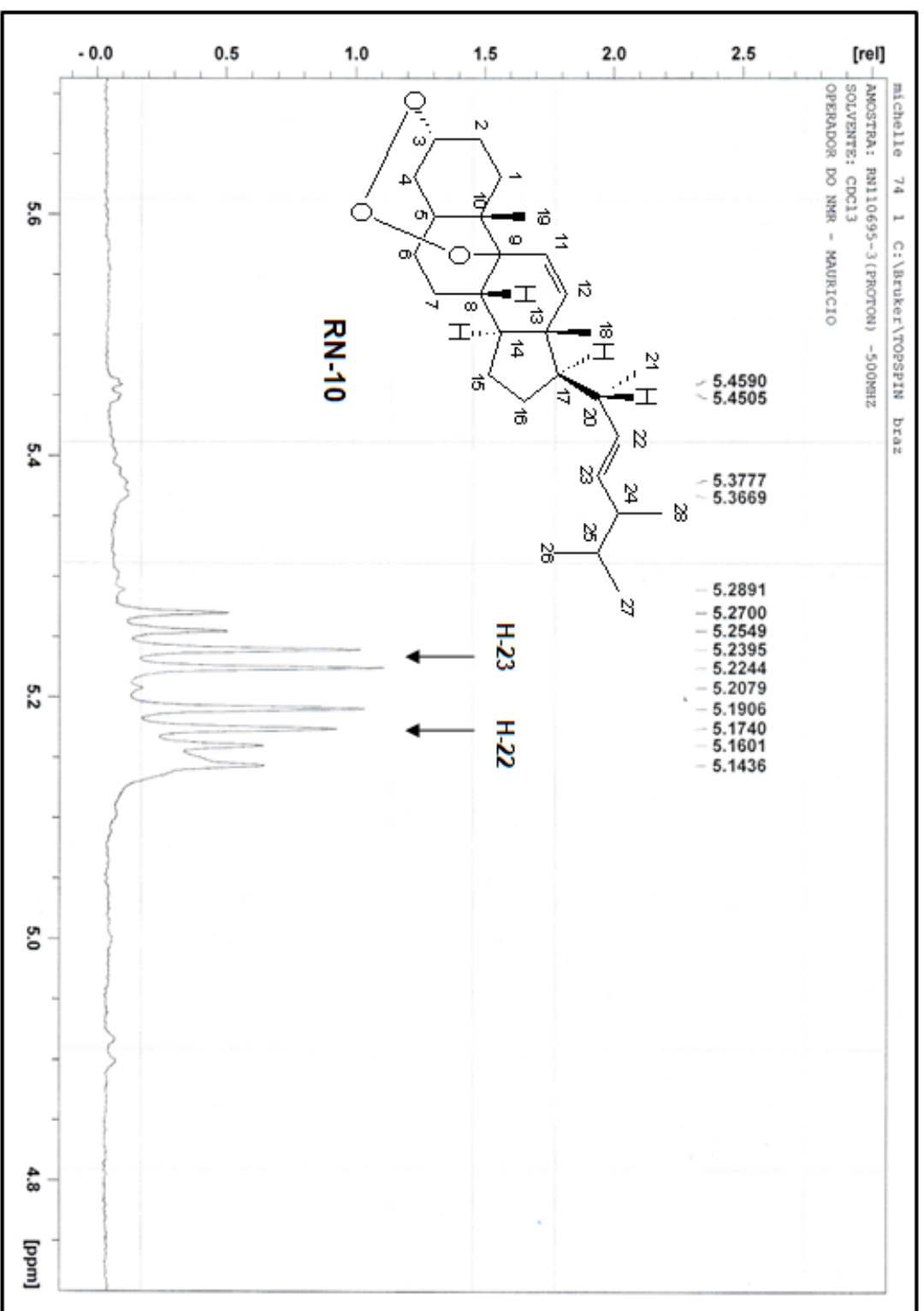


Figura 139. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-10** (rauanodoxi) (região de 4,9 a 5,7 ppm).

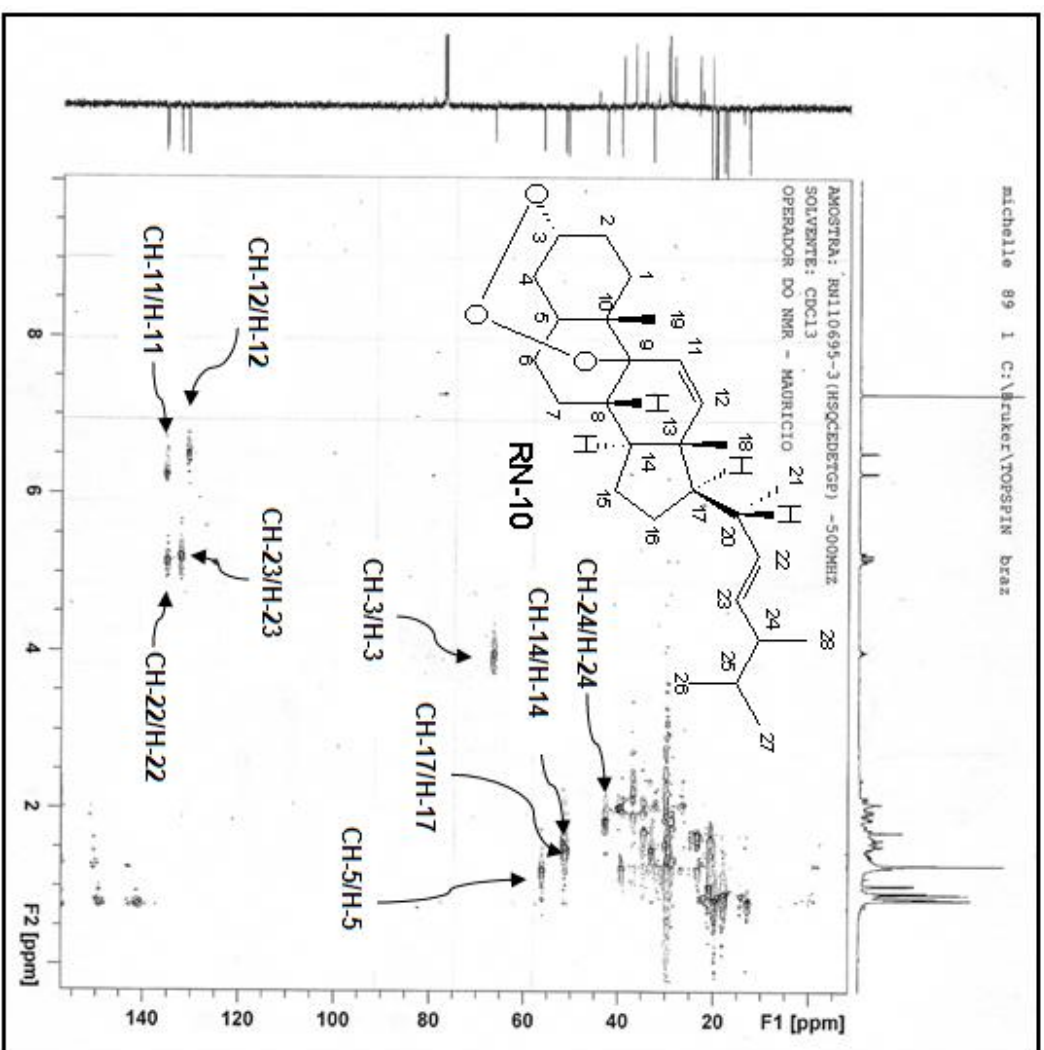


Figura 140. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância RN-10 (raianodoxi).

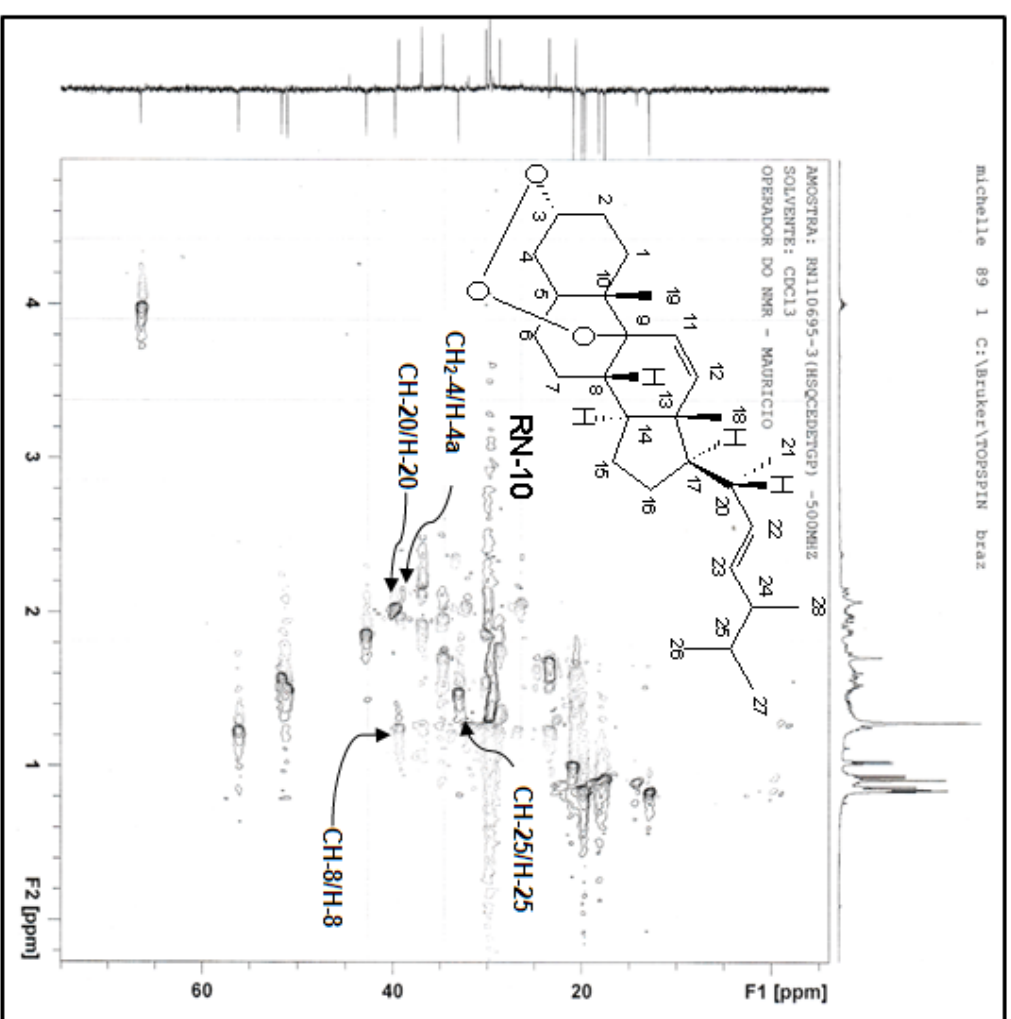


Figura 141. Ampliação do espectro de HSQC (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância **RN-10** (raujanodoxi) (região de 10 a 75 ppm).

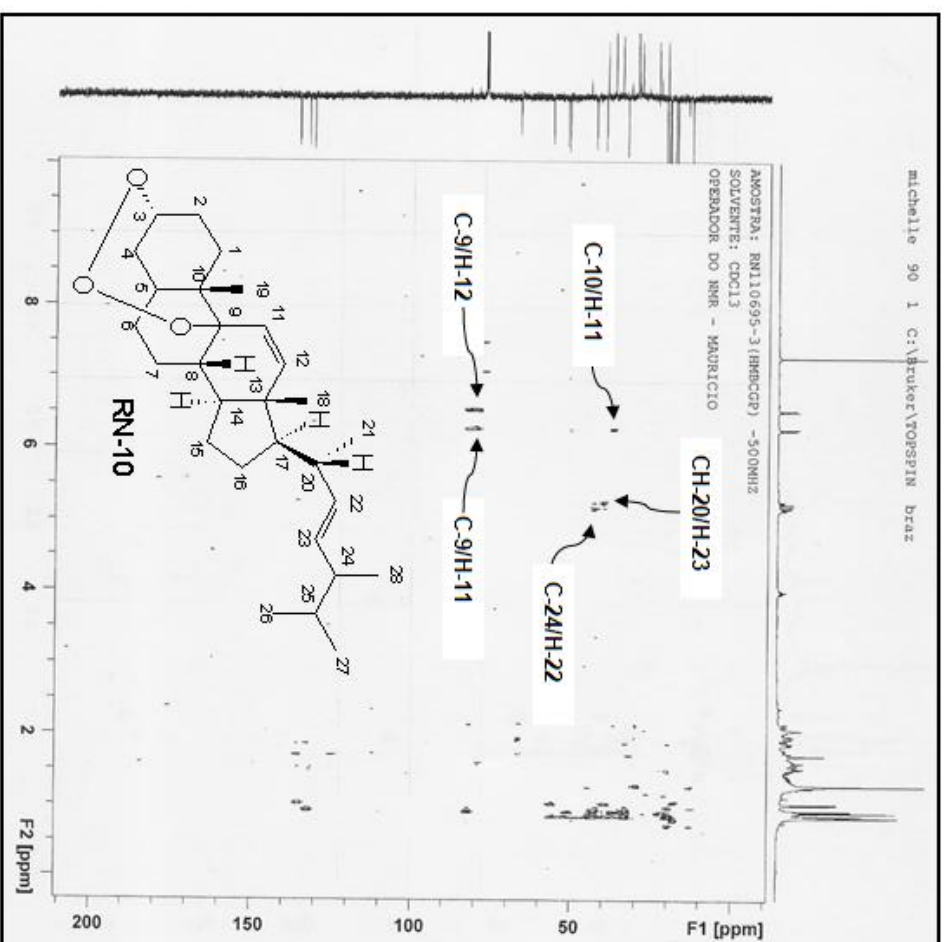


Figura 142. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-10** (rauianodoxi).

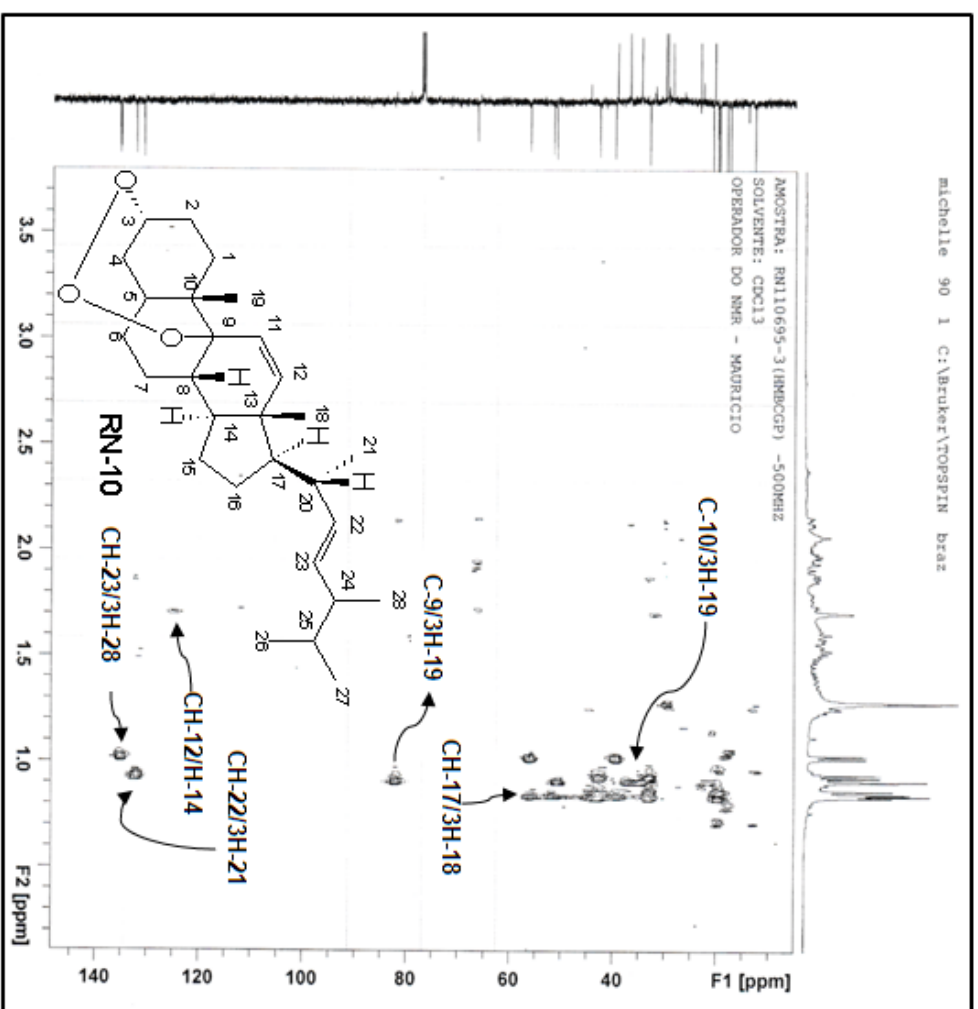


Figura 143. Ampliação do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-10** (rauanodoxil) (região de 20 a 145 ppm).

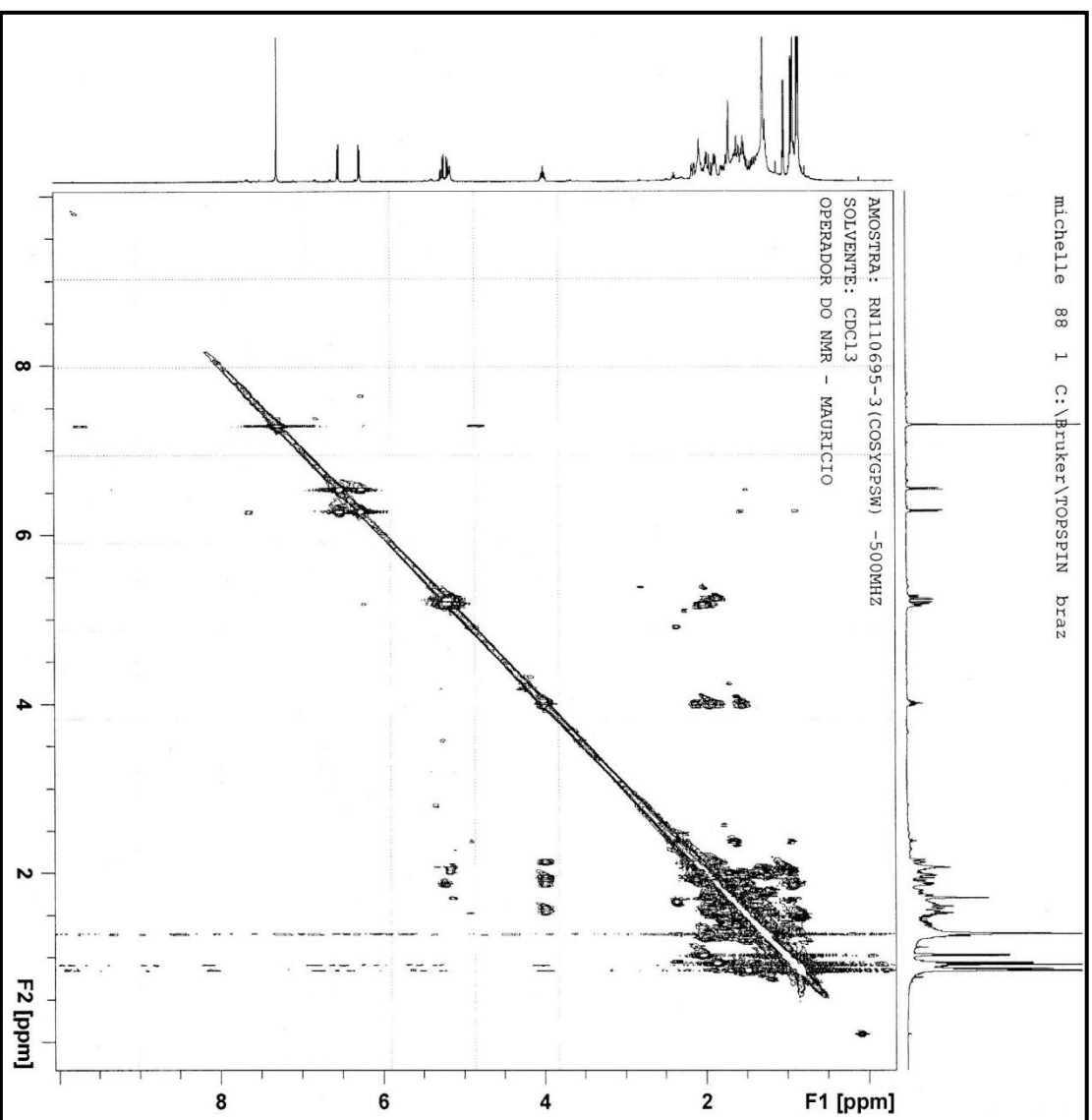


Figura 144. Espectro de H^1 - H^1 COSY (500 MHz, $CDCl_3$) obtido para as substâncias **RN-10** (raianodoxi).

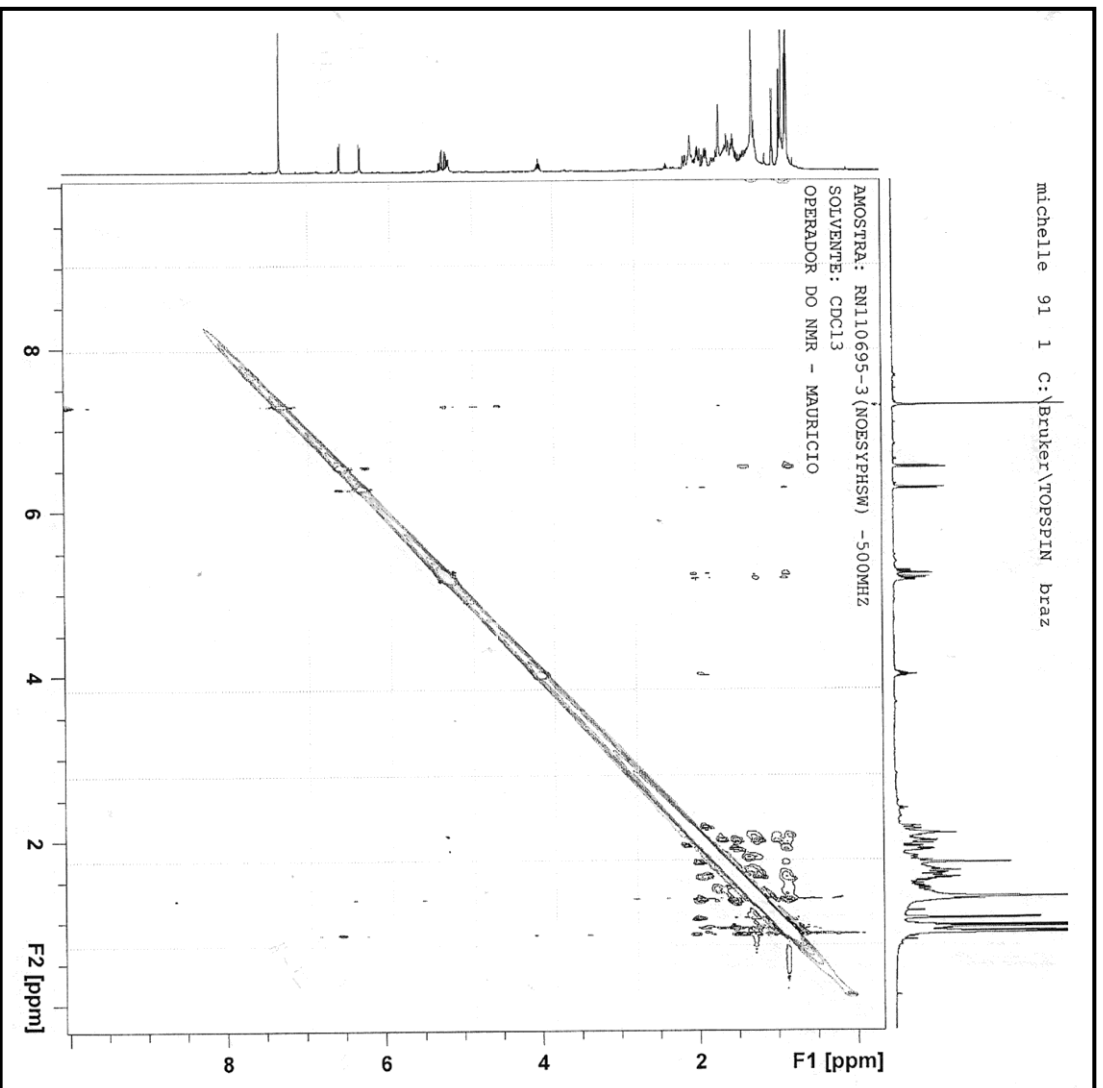


Figura 145. Espectro de ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância RN-10 (raianodoxi).

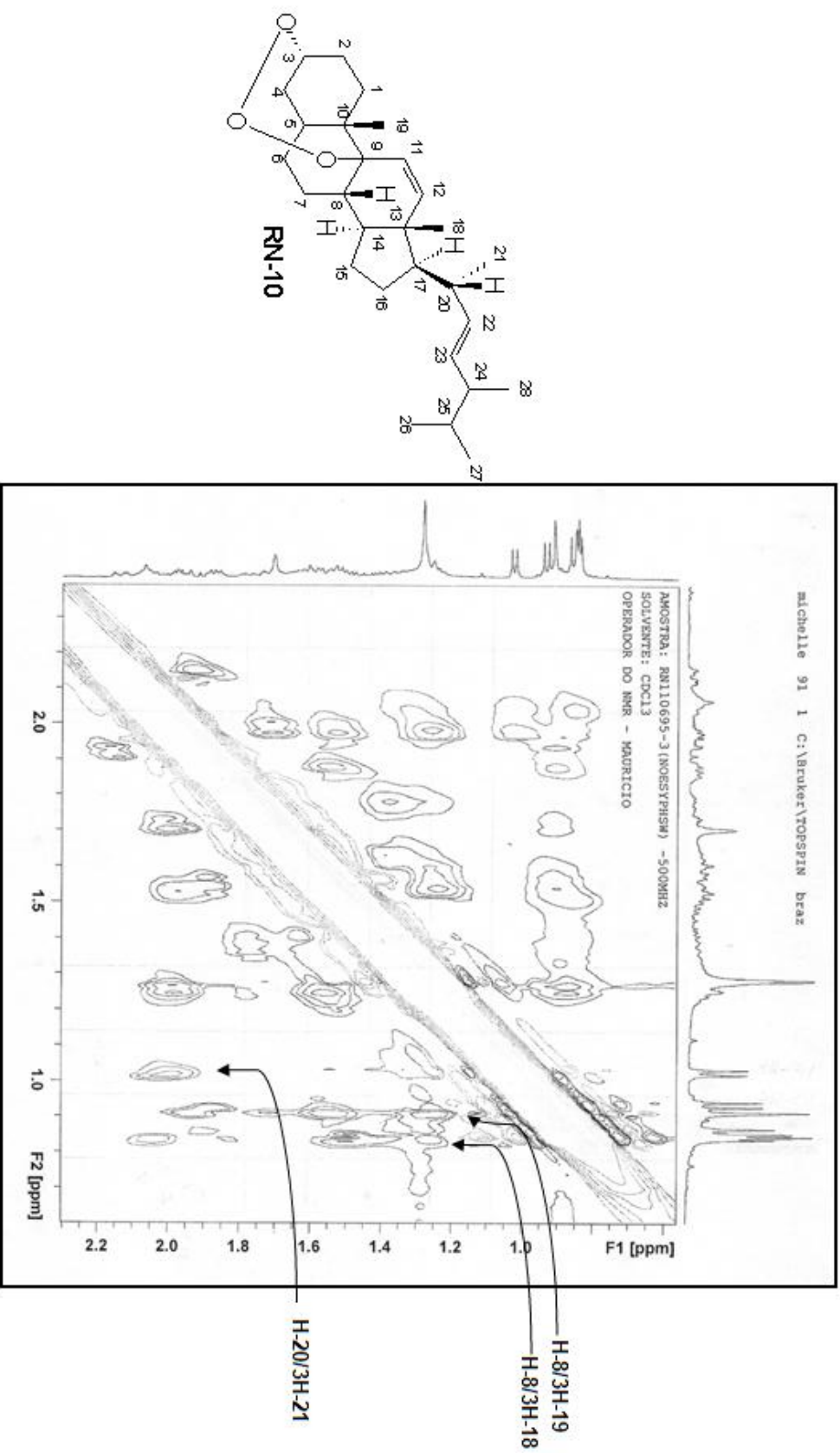


Figura 146. Ampliação do espectro de ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) obtido para a substância **RN-10** (rauanodoxil).

A análise do espectro de ESI(+)-MS (Figura 147) obtido para substância **RN-10** foi imprescindível para sua elucidação estrutural. O espectro de ESI(+)-MS apresentou o pico do íon molecular com $[M+H]^+ = 429,3384$ com base neste resultado foi definida a estrutura com fórmula molecular igual $C_{28}H_{44}O_3$.

A proposta de fragmentação apresentada no Esquema 11 confirma a presença de um terceiro átomo de oxigênio na estrutura da substância **RN-10**.

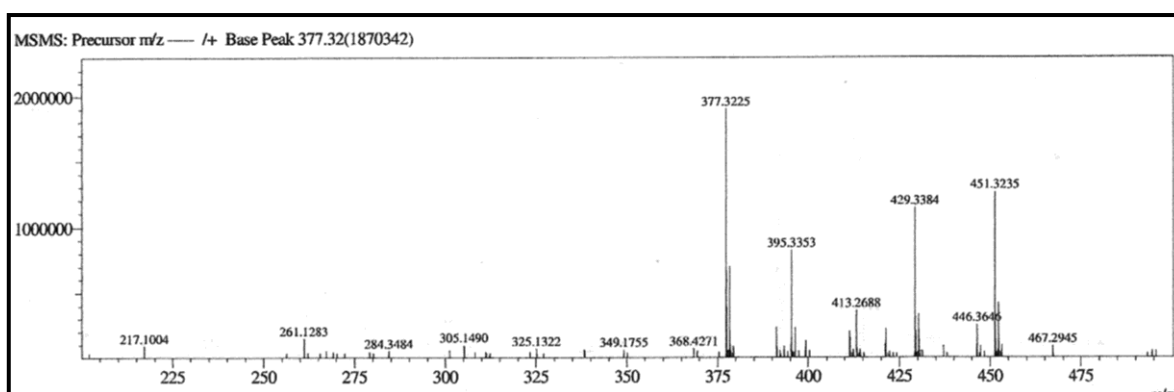
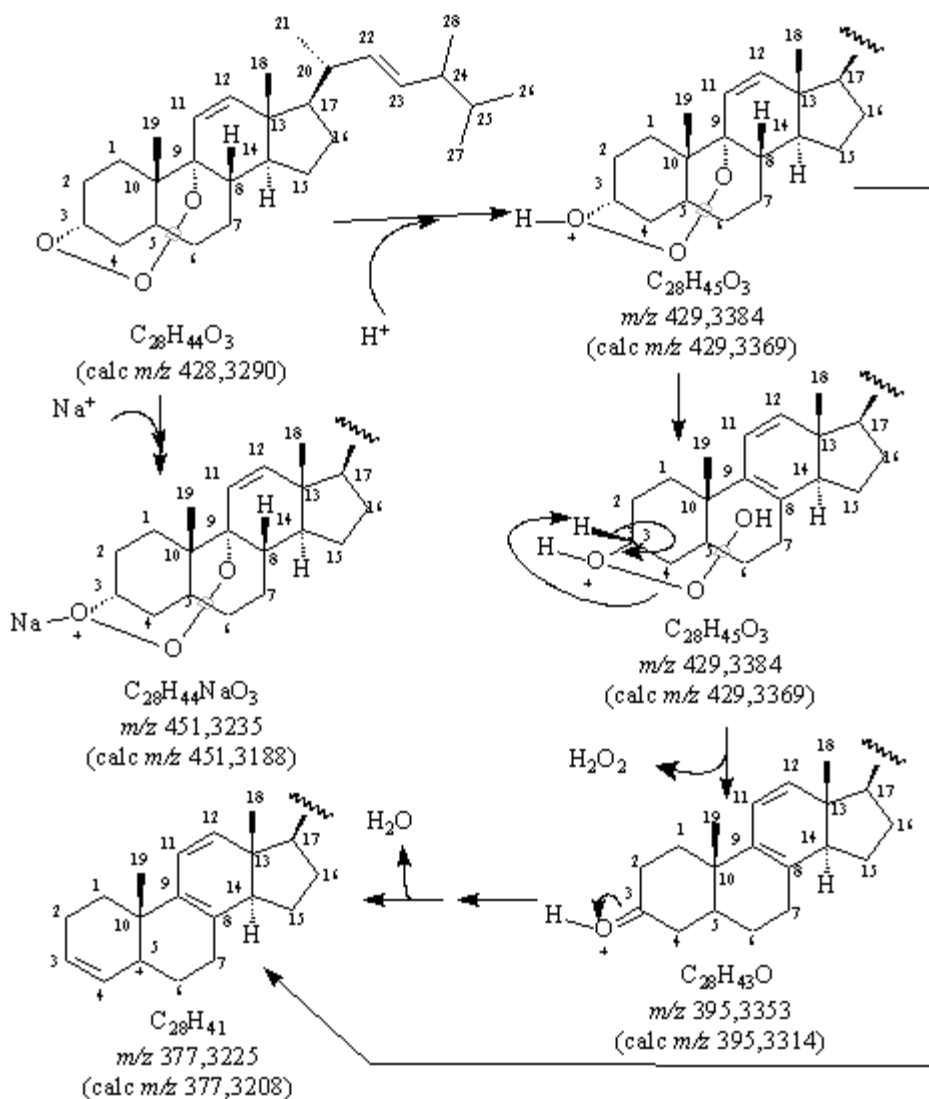


Figura 147. Espectro de ESI(+)-MS obtido em solução de água:metanol (1:1) para a substância **RN-10** (rauianodoxi).



Esquema 12. Proposta do mecanismo de fragmentação para os principais picos obtidos no espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para a substância **RN-10** (rauianodoxi).

Após a determinação estrutural, foi realizada uma pesquisa na literatura que constatou que a substância **RN-10** consistia em um novo esteroide, que foi denominado rauianodoxi (ROCHA et. al., 2014).

Em função da estrutura do novo esteroide rauianodoxi (**RN-10**), ser muito distinta das demais substâncias conhecidas, foram realizados os cálculos de modelagem molecular para certificar a estabilidade desta substância. Os resultados obtidos revelaram que a proposta estrutural com a ponte de três átomos de oxigênio entre os átomos de carbono CH-3 e C-9, de fato é estável.

A ponte 1,2,3-trioxocina é parte de um anel de oito membros, que pode adotar a configuração cadeira ou bote distorcido, ambas representadas na Figura 148. As distâncias de ligações encontradas entre os átomos C(3)-O(1) e C(9)-

O(3) são respectivamente de 1,470 Å e 1,520 Å e entre os átomos de oxigênio O(1)-O(2) e O(2)-O(3) são de 1,507 Å e 1,471 Å. O ângulo de ligação encontrado entre os átomos O(1)-O(2)-O(3) corresponde a 112,57°, compatível com a hibridização sp^3 dos átomos de oxigênio.

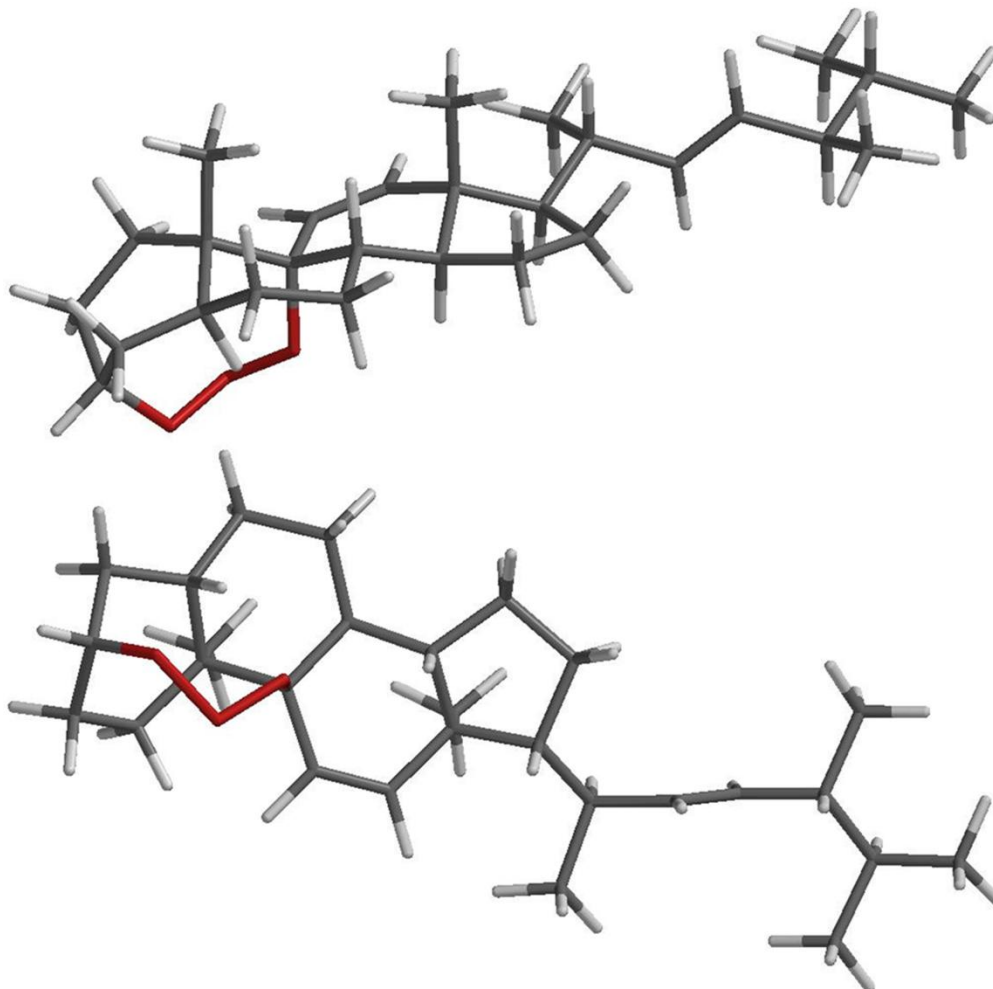


Figura 148. Representações em 3D da estrutura da substância **RN-10**.

Para efeitos de comparação, foi realizado o estudo de modelagem molecular para o produto da reação entre as moléculas de ciclohexeno e o ozônio (O_3), o qual possui na sua estrutura uma ponte 1,2,3-trioxole sendo similar a proposta de estrutura para a substância **RN-10** (TREACY et. al., 1997). Este estudo resultou nas distâncias de ligação de 1,425 e 1,442 Å para as duas ligações do tipo C-O. Estes valores são um pouco menores do que os valores encontrados para a substância rauianodoxi (**RN-10**) (1,470 Å e 1,520 Å) devido ao

fato dos átomos de carbono CH-3 e C-9 estarem mais afastados em função do esqueleto esteroidal.

A análise dos dados descritos acima permitiu determinar com segurança que a estrutura da substância rauianodoxi (**RN-10**) corresponde a um novo tipo de esteroide, 3,9-(1,2,3)-trioxocina (ROCHA et. al., 2014).

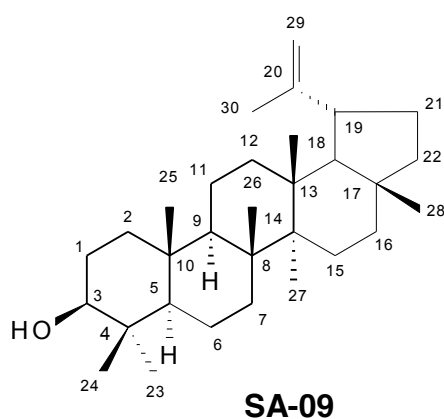
5.3.4. Triterpeno

Os triterpenos são substâncias compostas por 30 átomos de carbono. São formados pela união cauda-cauda de duas moléculas de farnesilpirofosfato resultando no hidrocarboneto esqualeno, cuja ciclização gera os diferentes tipos de esqueleto encontrados nos triterpenos. As estruturas dos triterpenos podem ser acíclicas, mono, di, tri, tetra e pentacíclicas. Porém as estruturas tetracíclicas e pentacíclicas são as classes predominantes encontradas nos triterpenos (DEWICK, 2002).

Este estudo resultou no isolamento de um triterpeno pentacíclico, o lupeol, do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*.

5.3.4.1. Triterpeno isolado da espécie *Spiranthera atlantica*.

5.3.4.1.1. Determinação estrutural da substância SA-09.



A substância **SA-09** foi isolada do extrato em metanol da espécie *Spiranthera atlantica*, na forma de um óleo incolor.

O espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) (Figura 149) obtido para a substância **SA-09** apresentou sinais característicos do triterpeno lupeol, amplamente conhecido.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) permitiu reconhecer a presença de 30 átomos de carbono, sendo sete carbonos metílicos, onze carbonos metilênicos (dez sp^3 e um sp^2), cinco carbonos metínicos (sp^3) e sete carbonos quaternários (seis sp^3 e um sp^2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAIVA et. al., 2010).

Os valores de deslocamento dos átomos de carbono confirmam a presença da dupla exocíclica nos átomos de carbono CH-20 e CH₂-29, respectivamente em δ_{C} 151,0 ppm e δ_{C} 109,4 ppm. O átomo de carbono carbinólico foi observado em δ_{C} 79,0 ppm (Tabela 33).

O espectro de RMN ^1H obtido para a substância **SA-09** (Figura 150) apresenta seis simpletos na região de δ_{H} 0,8-1,05 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio pertencentes as metilas CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-27 e CH₃-28.

Em δ_{H} 1,70 ppm observou-se um simpleto referente aos átomos de hidrogênios da metila CH₃-30, a qual encontra-se ligada ao carbono CH-20 pertencente a dupla exocíclica. Também foi observada a presença dos sinais dos hidrogênios metilênicos CH₂-29 na forma de um duplodupletos em δ_{H} 4,70 ppm (1H, $J= 2,1$ Hz) e um dupletos em δ_{H} 4,59 ppm (1H, $J= 2,1$). O átomo de hidrogênio carbinólico H-3 apresentou-se na forma de um duplodupletos em δ_{H} 3,21 ppm (1H, $J= 8,0$ e $J= 6,5$ Hz) (Tabela 33).

A análise do espectro de RMN ^{13}C permitiu uma completa atribuição dos sinais referentes aos átomos de carbono para a substância **SA-09**. Os dados descritos acima sugerem a estrutura de um triterpeno de esqueleto lupânico com uma hidroxila na posição C-3 para a substância **SA-09**.

Após comparação com a literatura concluiu-se que a substância **SA-09** corresponde ao triterpeno lupeol, comumente isolado em diversas espécies de plantas (MAHATO et. al., 1994).

Tabela 33. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) da substância **SA-09**, em comparação com os dados da literatura para o triterpeno lupeol (**Mo-1**) (MAHATO et. al., 1994). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

	SA-09	Mo-1
	δ_c	δ_c
C		
4	38,9	38,8
8	40,0	40,8
10	37,2	37,1
14	43,0	42,8
17	43,0	43,0
20	151,0	150,9
CH		
3	79,0	78,9
5	55,3	55,3
9	50,4	50,4
13	38,0	38,0
18	48,3	48,2
19	48,0	47,9
CH₂		
1	38,7	38,7
2	27,4	27,4
6	18,3	18,3
7	34,3	34,2
11	20,9	20,9
12	25,1	25,1
15	27,4	27,4
16	35,6	35,5
21	29,8	29,8
22	40,0	40,0
29	109,4	109,3
CH₃		
23	28,0	28,0
24	15,4	15,4
25	16,1	16,1
26	16,0	15,9
27	14,6	14,5
28	18,0	18,0
30	19,3	19,3

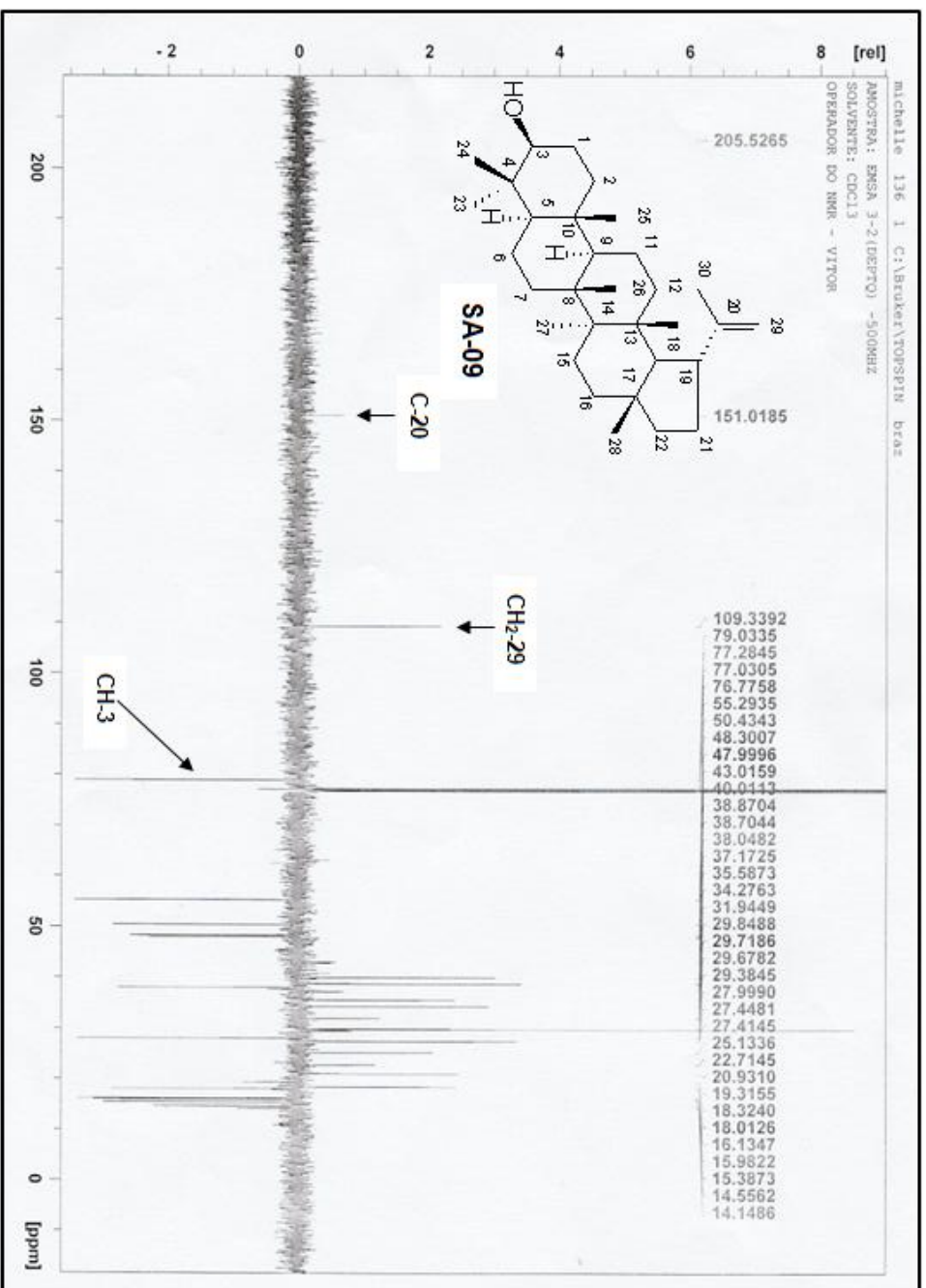


Figura 149. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) obtido para a substância SA-09 (lupeol).

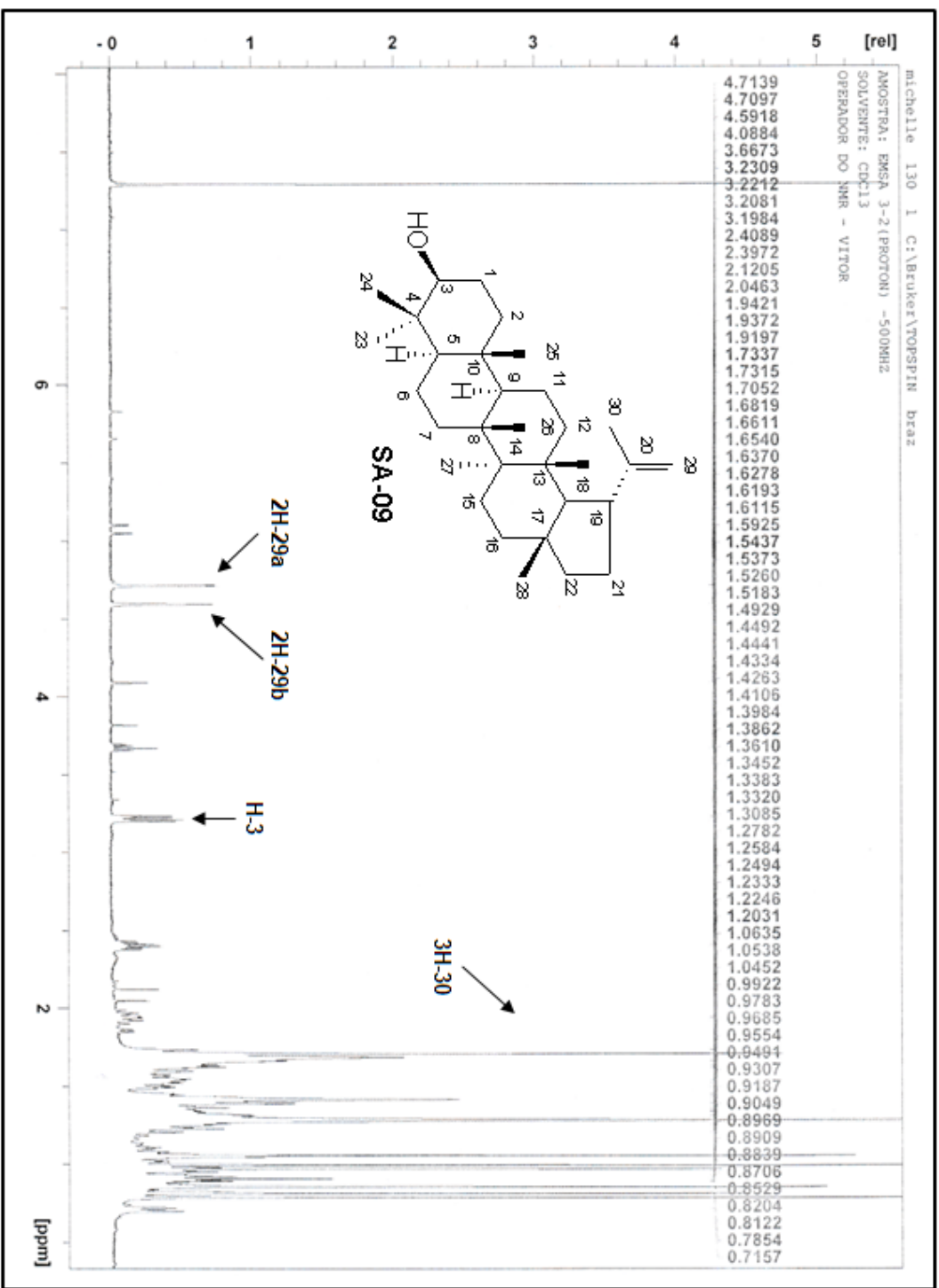


Figura 150. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) obtido para a substância SA-09 (lupcol).

6. ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Após o isolamento e identificação dos alcaloides obtidos das espécies *R. nodosa* e *S. atlantica*, descritos anteriormente, foram realizados os estudos das atividades anticancerígenas destas substâncias e dos seus extratos brutos frente a células leucêmicas humanas. Foram estudadas duas linhagens: THP-1 de linhagem mielóide e U937 de linhagem linfóide. Apenas os alcaloides tiveram suas atividades biológicas avaliadas, devido ao fato dessa classe de substâncias apresentar relatos de atividade antitumoral frente a diversas linhagens de células cancerígenas. Além disso, muitos alcaloides são utilizados como fármacos no tratamento do câncer (MORAIS & BRAZ FILHO, 2007).

Estes estudos foram realizados no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF) com a colaboração do Prof. Milton M. Kanashiro. Para a realização destes estudos, foram seguidas as etapas descritas abaixo.

6.1. Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas e dos extratos brutos frente às células em cultura

6.1.1. Descongelamento de células leucêmicas humanas

Colocou-se 5 mL de meio D-MEM/F12 (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) (Gibco BRL, EUA) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco BRL, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, EUA) em 1 tubo de 15 mL. A linhagem celular desejada foi retirada do nitrogênio líquido. As células foram descongeladas de maneira rápida (banho-maria à 45°C), colocando-se o criotubo que contém as células em contato com a água, sob agitação. No fluxo laminar, transferiu-se as células do criotubo para o tubo Falcon contendo 5 mL de meio D-MEM/F12. Centrifugou-se por 3 minutos na velocidade de 1200 rpm. Ressuspendeu-se em 3 mL de meio, passando este para uma garrafa de cultura.

6.1.2. Cultura de linhagens de células leucêmicas humanas

Células de origem leucêmicas humanas THP-1 (linhagem mielóide) e U937 (linhagem linfóide) foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e mantidas em estufa a 37°C (Forma Scientific Inc., modelo 3159), com 5% de CO₂ e umidade controlada.

6.1.3. Congelamento de células leucêmicas humanas

Quando as células cultivadas atingem um crescimento superior a 25 mL, separa-se o conteúdo de 4 garrafas, e as células passam pelo processo de congelamento para reposição das células descongeladas.

Inicialmente, despreendeu-se os 20 mL de células contidos nas garrafas de cultura, transferiu-se para um tubo de 15 mL. O tubo foi centrifugado por aproximadamente 4 minutos na velocidade de 1200 rpm e descartou-se o sobrenadante. Em seguida o “pellet” foi ressuspensionado, com 900 µL de SFB (Soro Fetal Bovino), preferencialmente, ou com 900 µL de meio complementado e 10 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido). As células foram então transferidas para um criotubo devidamente identificado. Revestiu-se o criotubo com “plástico de bolhas” e colocou-o a -70°C, no freezer. Após 24 h, transferiu-se o criotubo contendo as células para o nitrogênio líquido.

6.1.4. Avaliação das atividades anticancerígenas das substâncias isoladas e dos extratos brutos através do ensaio Metabólico com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium)

O ensaio metabólico com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) é um teste amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas. Este ensaio foi realizado de acordo com a literatura, que tem por base a redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium (MTT) a formazan através da enzima succinato desidrogenase mitocondrial (ALBRECHT et al., 2004) (Figura 151).

Desta forma, a viabilidade mitocondrial é quantificada através da redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade enzimática. Assim a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (Albrecht et al., 2004).



Figura 151. Esquema da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial (Albrecht et al., 2004).

Para realizar o ensaio metabólico com MTT foram utilizadas cerca de 4 garrafas de cultura de um tipo celular (THP-1 e U937). Estes 4 mL do meio de cultura de cada garrafa foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL e homogeneizou-se. Misturou-se 50 μ L das células e 50 μ L de corante Tripán Blue, homogeneizou-se e, a seguir, as células foram contadas numa câmara de Neubauer (4 quadrantes). Foi necessário ajustar o número de células para a concentração de 1×10^6 células/mL para posterior uso no experimento, diluindo ou concentrando as células conforme o necessário.

As substâncias e os extratos testados foram solubilizados em DMSO e completados com água ultra-pura estéril (2 mg/mL). Em seguida foi realizada a diluição seriada dos tratamentos em meio de cultura, D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), para atingir as respectivas concentrações finais de, 25, 50, 100, 200 e 400 μ g/mL.

As células leucêmicas foram plaqueadas em um volume de 100 μ L/poço (1×10^6 células/mL) em placas de 96 poços, tratadas com os alcaloides e extratos brutos nas concentrações finais de 25, 50, 100, 200 e 400 μ g/mL. O volume total de cada poço foi de 200 μ L e os mesmos foram mantidos na estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

As células foram submetidas aos tratamentos por 48 horas e a seguir a viabilidade foi avaliada pelo teste de metabolização do MTT. A cada poço foram acrescentados 20 µL de uma solução de MTT (5,0 mg/mL dissolvido em tampão fosfato salino pH 7,2). Após 4 horas de incubação, foram retirados 120 µL do sobrenadante das culturas de células cancerígenas e os cristais púrpuras obtidos pela precipitação de formazan foram solubilizados em 150 µL de uma solução de isopropanol P.A. com HCl fumegante, na proporção de 0,6 v/v de HCl.

As placas foram submetidas à centrifugação por 10 min a 1500 rpm. Em seguida foram transferidos 100 µL do sobrenadante de cada poço para uma segunda placa de 96 poços, que na sequência foi levada para leitura em um espectrofotômetro multicanal com comprimento de onda ajustado para 570 nm.

Em todos os experimentos foi empregado um controle nos quais as células leucêmicas foram observadas na ausência de qualquer tratamento, com o intuito de avaliar a porcentagem de morte celular que ocorre de maneira natural e permitir posterior comparação. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo utilizados três poços para cada concentração dos tratamentos.

6.1.5. Resultados obtidos por ensaio metabólico com MTT

As atividades anticancerígenas dos extratos metanólicos dos caules obtidos para as espécies, *R. nodosa* e *S. atlantica*, e os alcaloides isolados de ambas as espécies foram avaliadas frente à duas linhagens de células leucêmicas humanas, U937 e THP-1.

Os alcaloides puros testados foram: vepressina (**RN-01**), γ -fagarina (**SA-01**), esquimianina (**SA-02**), 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**), 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**) e atlanticol (**SA-08**); e também foi testada a mistura dos alcaloides, *N*-metilflindersina (**RN-02**) e zantobungeanina (**RN-03**), denominada de **Mistura 1**.

O solvente DMSO utilizado para solubilizar as substâncias testadas também teve a sua atividade biológica avaliada, mas não apresentou atividade anticancerígena frente às linhagens de células leucêmicas.

Em todos os experimentos foi realizado um controle negativo, no qual as células não receberam nenhuma espécie de tratamento. Este controle é de extrema utilidade, pois serve para certificar a viabilidade das células no

experimento, descartando qualquer falsa atividade anticancerígena induzida pelos tratamentos.

Vale ressaltar, para efeito de comparação, que os valores de EC_{50} obtidos para a cisplatina, um antineoplásico amplamente utilizado, frente às linhagens U937 e THP-1 foram respectivamente de 2,1 $\mu\text{g/mL}$ e 3,0 $\mu\text{g/mL}$ após um intervalo de 36 h de incubação (MOREIRA, 2015).

Foram obtidos valores de EC_{50} (concentração mínima inibitória de 50% da população celular estudada) para os extratos brutos e alcaloides testados frente ambas as linhagens celulares estudadas, após um período de 48 h de incubação (Tabela 34). Desta forma proporcionando uma melhor comparação entre as atividades inibitórias exibidas pelos diferentes tratamentos investigados.

Tabela 34. Valores de EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para as substâncias testadas após o período de 48 h de incubação.

Substâncias Testadas	EC_{50} ($\mu\text{g/ml} \pm \text{s.d.}$)	
	U937	THP-1
EMRN	>400	>400
EMSA	367,8 \pm 1,0	>400
vepressina (RN-01)	>400	>400
Mistura 1	277,7 \pm 1,0	>400
γ -fagarina (SA-01)	309,2 \pm 1,1	188,0 \pm 1,0
esquimianina (SA-02)	93,0 \pm 1,0	135 \pm 1,0
2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (SA-06)	72,8 \pm 1,2	64,7 \pm 1,2
2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (SA-07)	193,7 \pm 1,0	168,2 \pm 1,0
atlanticol (SA-08)	237,5 \pm 1,0	302,1 \pm 1,0

A análise dos resultados apresentados na **Tabela 34** evidenciou que os extratos brutos metanólicos do caule das espécies, *R. nodosa* e *S. atlantica*, não apresentaram atividade anticancerígena frente as linhagens de células leucêmicas testadas.

O alcaloide vepressina (**RN-01**) também não apresentou atividade anticancerígena frente as células U937 e THP-1. Já a mistura dos alcaloides *N*-metilflindersina (**RN-02**) e zantobungeanina (**RN-03**) (**Mistura 1**) apresentou uma baixa atividade anticancerígena frente a linhagem U937, obtendo EC_{50} igual a 277,7 $\mu\text{g/mL}$, e não apresentou atividade anticancerígena frente à linhagem THP-1.

O alcaloide atlanticol (**SA-08**), inédito na literatura, apresentou apenas uma baixa atividade anticancerígena frente às duas linhagens de células leucêmicas estudadas.

Os alcaloides furoquinolínicos, γ -fagarina (**SA-01**) e esquimianina (**SA-02**), apresentaram baixas e moderadas atividades anticancerígenas, respectivamente, frente às duas linhagens celulares testadas. A γ -fagarina (**SA-01**) apresentou baixa atividade anticancerígena frente à linhagem U937 (EC_{50} = 309,2 $\mu\text{g/mL}$), porém obteve uma melhor atividade frente à linhagem THP-1 (EC_{50} = 188,0 $\mu\text{g/mL}$). O comportamento inverso foi observado para a esquimianina (**SA-02**), apesar da grande semelhança estrutural entre ambos os alcaloides (Figura 152). Este último obteve valores moderados de EC_{50} , sendo 93,0 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem U937 e 135 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem THP-1. Este resultado sugere um considerável aumento do potencial anticancerígeno em função da presença de grupos metoxilas nas estruturas dos alcaloides furoquinolínicos, uma vez que o alcaloide esquemianina (**SA-02**) difere estruturalmente da γ -fagarina (**SA-01**) apenas pela presença de uma segunda metoxila em sua estrutura.

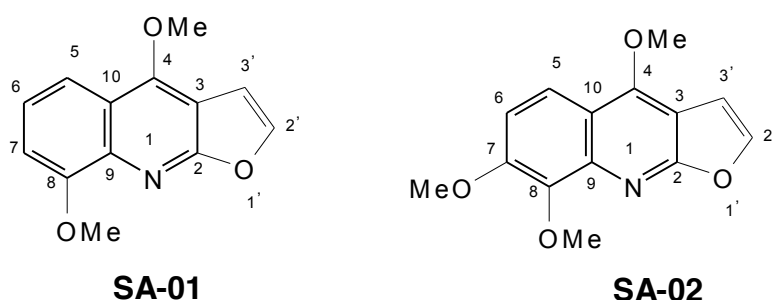


Figura 152. Estrutura dos alcaloides furoquinolínicos, γ -fagarina (**SA-01**) e esquimianina (**SA-02**).

Um resultado semelhante foi observado para os dois alcaloides 2-fenilquinolinos testados, 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) e 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**), que diferem apenas pela posição do grupo metoxila em suas estruturas (Figura 153).

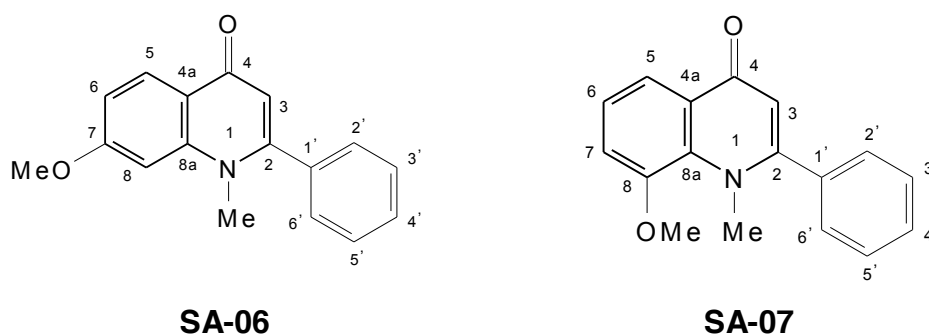


Figura 153. Estrutura dos alcaloides 2-fenilquinolinos, 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) e 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**).

O alcaloide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) foi a substância testada que apresentou a maior atividade anticancerígena frente ambas às linhagens celulares investigadas. Foi obtido para este alcaloide um valor de EC_{50} igual a 72,8 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem U937 e de 64,7 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem THP-1. Já o alcaloide 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**) apresentou uma atividade anticancerígena inferior frente a ambas às linhagens celulares, e ainda observou-se uma atividade anticancerígena ligeiramente menor frente às células THP-1 (EC_{50} = 193,7 $\mu\text{g/mL}$) do que frente às células U937 (EC_{50} = 168,2 $\mu\text{g/mL}$). Desta forma indicando a influência da posição do grupo metoxila no potencial anticancerígeno dos alcaloides testados.

7. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da espécie *Rauia nodosa* resultou no isolamento de dez substâncias, sendo seis esteroides, três alcaloides e uma cumarina, são elas: vepressina (**RN-01**), *N*-metilflindersina (**RN-02**), zantobungeanina (**RN-03**), *O*-geranilostenol (**RN-04**), β -sitosterol (**RN-05**), estigmasterol (**RN-06**), sitostenona (**RN-07**), estigmastenona (**RN-08**), peróxido de ergosterol (**RN-09**) e rauianodoxi (**RN-10**). As substâncias *N*-metilflindersina (**RN-02**), *O*-geranilostenol (**RN-04**) e peróxido de ergosterol (**RN-09**) foram isoladas pela primeira vez no gênero *Rauia* e o esteroide rauianodoxi (**RN-10**) é inédito na literatura.

Já o estudo fitoquímico da espécie *Spiranthera atlantica* permitiu o isolamento de nove substâncias, oito alcaloides e um triterpeno, são elas: γ -fagarina (**SA-01**), esquimianina (**SA-02**), 1',2'-epóxido-8-metoxiflindersina (**SA-03**), 8-metoxiflindersina (**SA-04**), 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (**SA-05**), 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**), 2-fenil-1-metil-8-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-07**), atlanticol (**SA-08**) e lupeol (**SA-09**). Sendo os alcaloides 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) e 8-metoxiflindersina (**SA-07**) inéditos no gênero *Spiranthera*. Além disso, foi possível isolar o alcaloide 1',2'-dihidro-8-metoxiflindersina (**SA-05**) obtido pela primeira vez como produto natural e os alcaloides, 1',2'-oxo-8-metoxiflindersina (**SA-04**) e atlanticol (**SA-08**), inéditos na literatura.

As atividades inibitórias dos extratos brutos metanólicos dos galhos de ambas as espécies e de oito alcalóides isolados foram investigadas frente às linhagens de células leucêmicas humanas (THP-1 e U937), através da técnica de ensaio metabólico com MTT. O alcaloide 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona (**SA-06**) foi o tratamento testado que apresentou a maior atividade anticancerígena frente à ambas linhagens celulares, resultando em um EC₅₀ igual a 72,8 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem U937 e de 64,7 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem THP-1.

Os dois extratos brutos não apresentaram atividade anticancerígena e os demais alcaloides testados apresentaram baixas atividades inibitórias frente às linhagens de células leucêmicas testadas.

Desta forma este estudo fitoquímico contribuiu significativamente para aumentar o conhecimento químico dos gêneros, *Rauia* e *Spiranthera*, atualmente

pouco estudados. Além de contribuir na busca incessante por novos fármacos no combate ao câncer.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albaraci, T. R. (2006) Estudo fitoquímico de *Rauia sp* e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária dos extratos e substâncias isoladas. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Albaraci, T. R.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Pirani, J. R. (2010) Cumarinas e Alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). *Química Nova*, 33(10): 2130-2134.

Albernaz, L. C.; Deville, A.; Dubost, L.; Paula, J. E.; Bodo, B.; Grellier, P.; Espindola, L. S.; Mambu, L. (2012) Spiranthenones A and B, tetraprenylated phloroglucinol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. *Planta Medica*, 78: 459-464.

Albrecht, H., Brodbeck-Hummel, D., Hoever, M., Nickel, B., Regenass, U. Cellular Assays in Drug Discovery In: Dingermann, T., Steinhilber, D., Folkers, G. (2004). *Molecular Biology in Medicinal Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 3-39.

Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. (2005) Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28: 118-129.

Ambrozin, A. R. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S. (2004) Trypanocidal Activity of Meliaceae and Rutaceae Plant Extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(2): 227-231.

Ambrozin, A. R. P.; Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Ellena, J. A.; Albuquerque, S. (2005) New pyrone and quinoline alkaloid from *Almeidea rubra* and their trypanocidal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3A): 434-439.

Ambrozin, A. R. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F. (2008) Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. *Química Nova*, 31(4): 740-743.

Arango, V.; Robledo, S.; Séon-Méniel, B.; Figadère, B.; Cardona, W.; Sáez, J.; Otálvaro, F. (2010) Coumarins from *Galipea panamensis* and their activity against *Leishmania panamensis*. *Journal of Natural Products*, 73: 2012-2014.

Arruda, A. C.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Francisco, R. H. P.; Rodrigues, A. M. G. D.; Lechat, J. R. (1991) Two pyrano flavones from *Neoraputia alba*. *Phytochemistry*, 30(9): 3157-3159.

Arruda, A. C.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F. (1993) Further pyrano flavones from *Neoraputia alba*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 4(2): 80-83.

- Barbosa, D. B. M.; Nascimento, M. V. M.; Lino, R. C.; Magalhães, M. R.; Florentino, I. F.; Honório, T. C. D.; Galdino, P. M.; Bara, M. T. F.; Paula, J. R.; Costa, E. A. (2012) Mechanism involved in the anti-inflammatory effect of *Spiranthera odoratissima* (Manacá). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(1): 137-143.
- Bayer, R. J; Mabberley, D. J.; Morton, C.; Miller, C. H.; Sharma, I. K.; Pfeil, B. E.; Rich, S.; Hitchcock, R.; Sykes, S. (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpdna sequences. *American Journal of Botany*, 96(3): 668-685.
- Bhattacharyya, P; Chowdhury, B. K. (1984) Ravesilone, a quinolone alkaloid from *Ravenia spectabilis*. *Phytochemistry*, 23(8): 1825-1826.
- Bhattacharyya, P.; Chowdhury, B. K. (1985) Glycolone, a quinolone alkaloid from *Glycosmis pentaphylla*. *Phytochemistry*, 24(3): 634-635.
- Bellet, B. S.; Sá, I. C. G.; Mafezoli, J.; Cerqueira, C. N.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Zukerman-Schpector, J. (2012) Fitoquímica e quimiosistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). *Química Nova*, 35(11): 2132-2138.
- Bevalot, F.; Fournet, A.; Moretti, C.; Vaquette, J.; Waterman, P. G.; Young, S. A. (1983) Paracotoin derivatives from leaves of *Ticorea pedicellata*. *Phytochemistry*, 22(12): 2875-2877.
- Blaschke-Cobet, M.; Luckner, M. (1973) Zur biosynthese des graveolins bei *Ruta angustifolia*. *Phytochemistry*, 12: 2393-2398.
- Botsaris, A. S. (2007) Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 18-26.
- Brieskorn, C. H.; Beck, V. (1971) Über die bitterstoffiz der angosturarinde. *Phytochemistry*, 10: 3205-3211.
- Cabral, R. S.; Sartori, M. C.; Cordeiro, I.; Queiroga, C. L.; Eberlin, M. N.; Lago, J. H. G.; Moreno, P. R. H.; Young, M. C. M. (2012) Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2): 374-380.
- Chabner, B. A.; Longo, D. L. (1996) *Cancer chemotherapy and biotherapy*, 2^a ed., Lippincott-Raven: Filadélfia.
- Calixto, J. B.; Siqueira, M. Jr. (2008) Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia*, 78: 98-106.
- Calla-Magarinos, J.; Giménez, A.; Troye-Blomberg, M; Fernández, C. (2009) An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as anti-leishmania agent in bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-c production in polyclonally activated cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69: 251–258.

- Campbell, W. E.; Davidowitz, B.; Jackson, G. E. (1990) Quinolinone alkaloids from an *Agathosma* species. *Phytochemistry*, 29(4): 1303-1306.
- Canonica, L.; Danieli, B.; Manitto, P.; Russo, G. (1968) New quinazolinocarboline alkaloids from *Euxylophora paraensis* HUB. *Tetrahedron Letters*, 47: 4865-4866.
- Cao, S.; Al-Rehaily, A. J.; Brodie, P.; Wise, J. H.; Moniz, E.; Malone, S.; Kingston, D. G. I. (2008) Furoquinoline alkaloids of *Ertela (Monnieria) trifolia* (L.) Kuntze from the Suriname rainforest. *Phytochemistry*, 69: 553-557.
- Castro, H. G. (2001) *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários*, ed.; Suprema: Viçosa, p. 104.
- Correa, M. P. (1984) *Dicionário das Plantas Uteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, ed.; Grafica Brasileira Ltda: Rio de Janeiro, p. 619.
- Cortez, L. E. R.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, A. G.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B. (2006) Constituintes químicos de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) a. St.-Hil (Rutaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2): 164-169.
- Cortez, L. E. R.; Cortez, D. A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F. (2009) New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles*, 78(8): 2053-2059.
- Cortez, L. E. R.; Ferreira, I. C. P.; Lonardon, M. V. C.; Ferreira, A. G.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Cortez, D. A. G. (2011) Alkaloids and triterpene from *Almeidea coerulea* (Nees and Mart.) a. St.-Hil. and anti-leishmanial activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1): 61-66.
- Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. (2000) *Patologia Estrutural e Funcional*. 6^a ed.; Guanabara: Rio de Janeiro, p.1251.
- Cuca, L. E.; Martínez, J. C.; Monache, F. D. (1998) Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*. *Revista colombiana de química*, 27(1): 23-29.
- Danieli, B.; Manitto, P.; Ronchetti, F.; Russo, G. (1972) New indolopyridoquinazoline alkaloids from *Euxylophora paraensis*. *Phytochemistry*, 11: 1833-1836.
- Danieli, B.; Palmisano, G.; Russo, G. (1973) Minor indolopyridoquinazoline alkaloids from *Euxylophora paraensis*. *Phytochemistry*, 12: 2521-2525.
- Danieli, B.; Palmisano, G.; Rainold, G.; Russo, G. (1974) 1-hydroxyrutaecarpine from *Euxylophora paraensis*. *Phytochemistry*, 13: 1603-1606.
- Danieli, B.; Farachi, C.; Palmisano, G. (1976) A new indolopyridoquinazoline in the bark of *Euxylophora paraensis*. *Phytochemistry*, 15: 1095-1096.
- Dewick, P. M. (2002) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. ed.; John Wiley & Sons: Nova York.

Engler, H. G. A. (1931) Rutaceae. In H. G. A. Engler & K. Prantl (eds.) *Die natürlichen Pflanzfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann., v19a, 2ª Edição.

Fachini, P. H. (2005) Estudo fitoquímico biomonitorado visando o controle de formigas e microorganismos. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Fay M.; Cameron K.; Prance G.; Chase, M.; (1997) Familial relationships of *Rhabdodendron* (Rhabdodendraceae): plastid rbcL sequences indicate a caryophyllid placement. *Kew Bulletin*, 52(4): 923-932.

Fournet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. (1993) Les chimanines, nouvelles quinoléines substituées en 2, isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products*, 56(9): 1547-1552.

Fournet, A.; Ferreira, M. E.; Arias, A. R.; Ortiz, S. T.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Schinini, A.; Hocquemiller, R. (1996) In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11): 2447-2451.

Fournet, A.; Mahieux, R.; Fakhfakh, M. A.; Franck, X.; Hocquemiller, R.; Figadère, B. (2003) Substituted quinolines induce inhibition of proliferation of HTLV-1 infected cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 891-894.

Freitas, C. M. J.; Lucchese, A. M.; Silva, F. S.; Velozo, E. S. (2003) Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 805-807.

Galdino, P. M.; Nascimento, M. V. M.; Florentino, I. F.; Lino, R. C.; Fajemiroye, J. O.; Chaibud, B. A.; Paula, J. R.; Lima, T. C. M.; Costa, E. A. (2012) The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A.St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 38: 276–284.

Goodwin, S.; Smith, A. F.; Velasquez, A. A.; Horning, E. C. (1959) Alkaloids of *Lunasia umara* Blanco. Isolation Studies. *Journal of the American Chemical Society*, 81(23): 6209-6213.

Greca, M. D.; Monaco, P.; Previtiera, L. (1990) Stigmasterols from *Typha latifolia*. *Journal of Natural Products*, 53(6): 1430-1435.

Griffiths, A., Miller, J. H., Suzuki, D., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. (2000) *Introdução à Genética*. 7ª ed. Guanabara: Rio de Janeiro.

Groppo, M.; Pirani, J. R.; Salatino, M. L. F.; Blanco, S. R.; Kallunki, J. A. (2008) Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpdna. *American Journal of Botany*, 95(8): 985-1005.

Hohlemweger, S. V. A.; Tavares, W.; Carvalho, A. M.; Vieira, P. C.; Velozo, E. S. (2004) 2-Quinolone alkaloids from the rare species of Rutaceae *Andreodoxa flava* Kallunki. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 627-629.

Houghton, P. J.; Watabe, Y.; Woldemariam, T. Z.; Yates, M. (1998) Activity of alkaloids from Angostura bark against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50: 230.

Isidoro, M. M.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C. (2012) Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). *Química Nova*, 35(11): 2119-2124.

Jacquemond-Collet, I.; Hannedouche, S.; Fabre, N.; Fourasté, I.; Moullis, C. (1999) Two tetrahydroquinoline alkaloids from *Galipea officinalis*. *Phytochemistry*, 51: 1167-1169.

Jacquemond-Collet, I.; Hannedouche, S.; Fourasté, I.; Moullis, C. (2000) Novel quinoline alkaloid from trunk bark of *Galipea officinalis*. *Fitoterapia*, 71: 605-606.

Jacquemond-Collet, I.; Bessiére, J.; Hannedouche, S.; Cedric, B.; Fourasté, I.; Moullis, C. (2001) Identification of the alkaloids of *Galipea officinalis* by gas chromatography–mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 12: 312-319.

Jacquemond-Collet, I.; Benoit-Vical, F.; Mustofa; Valentin, A.; Stanislas, E.; Mallié, M.; Fourasté, I. (2002) Antiplasmodial and citotoxic activity of galipenine and other tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. *Planta Medica*, 68: 68-69.

Johne, S.; Hartling, S. (1977) Isolierung Von γ -fagarin aus *Erythrochiton brasiliensis* Nees et Mart (Rutaceae). *Pharmazie*, 32: 415.

Jurd, L.; Wong, R. Y. (1981) New quinolinone alkaloids from the heartwood of *Euxylophora paraensis*. *Australian Journal of Chemistry*, 34(8):1625-1632.

Jurd, L.; Wong, R. Y.; Benson, M. (1982) The structures of paraensidimerin A and C, two bisquinolinone alkaloids from *Euxylophora paraensis*. *Australian Journal of Chemistry*, 35(12): 2505-2517.

Jurd, L.; Benson, M. (1983) Structures of paraensidimerins B, E, F, and G, four new dimeric quinolinone alkaloids from *Euxylophora paraensis*. *Journal of the Chemistry Society, Chemical Communications*, 2: 92-93.

Kingston, D. G. I. (2000) Recent Advances in the Chemistry of Taxol. *Journal of Natural Products*, 63: 726-734.

Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. (1990) Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29(7): 2351-2355.

Leite, A. C.; Ambrozini, A. R. P.; Castilho, M. S.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Oliva, G.; Silva, M. F. G. F.; Thiemann, O. H.; Lima, M. I. S.; Pirani, J. R. (2009) Screening of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enzyme inhibitors. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1A): 1-6.

Lima, V.; Silva, C. B.; Mafezoli, J.; Bezerra, M. M.; Moraes, M. O.; Mourão, G. S. M. M.; Silva, J. N.; Oliveira, M. C. F. (2006) Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice. *Fitoterapia*, 77: 574-578.

Li, X.; Dunbar, D. C.; Elsohly, H. N.; Walker, L. A.; Clark, A. M. (2001) Indolopyridoquinazoline alkaloid from *Leptothyrsa sprucei*. *Phytochemistry*, 58: 627-629.

Machado, A. E. D. (2000) Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23: 237-243.

Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S. (2000) In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 335-340.

Mafezoli, J. (2001). Atividade Tripanocida e antimicrobiana de plantas da Família Rutaceae. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Mahato, S. R.; Kundu. A. (1994) ¹³C NRM Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A Compilation and Some salient Features. *Phytochemistry*, 37(6): 1317-1575.

Martínez-Luis, S.; Cherigo, L.; Higginbotham, S.; Arnold, E.; Spadafora, C.; Ibañez, A.; Gerwik, W. H.; Cubilla-Rios, L. (2011) Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. *International Microbiology*, 14: 95-102.

Meyer, B. N.; Wall, M. E; Wani, M. C.; Taylor, H. L. (1985) Flavones, coumarins and an alkaloid from *Sargentia greggii*. *Journal of Natural Products*, 48: 952-946.

Missau, F. C.(2008) Estudo das propriedades químicas, estruturais e biológicas das espécies *Polygala paniculata* e *Polygala pulchella*. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Moraes, V. R. S.; Tomazela, D. M.; Ferracin, R. J.; Garcia, C. F.; Sannomiya, M.; Soriano, M. P. C.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Filho, E.; Magalhães, E. G.; Magalhães, A. F.; Pimenta, E. F.; Souza, D. H. F.; Oliva, G. (2003) Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(3): 380-387.

Morais, S. M., Braz-Filho, R., (2007) *Produtos Naturais-Estudos Químicos e Biológicos*. ed.; EdUECE: Fortaleza.

Moreira, R. O. (2015) Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de compostos de coordenação de platina e zinco. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Moullis, C.; Wirasutisna, K. R.; Gleye, J.; Loiseau, P.; Stanislas, E.; Moretti, C. (1983) A 2-quinolone alkaloid from *Almeidea Guyanensis*. *Phytochemistry*, 22(9): 2095-2096.

Murad, A. M.; Katz, A. (2000) *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*, ed.; Guanabara: Rio de Janeiro, p. 41.

Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann O. H.; Oliva, G. (2003A) Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme. *Acta Crystallographica*, 59: 1506-1508.

Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann O. H.; Oliva, G. (2003B) Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme. *Acta Crystallographica*, 59: 1503-1505.

Nebo, L.; Varela, R. M.; Molinillo, J. M. G.; Sampaio, O. M.; Severino, V. G. P.; Casal, C. M.; Fernandes, M. F. G.; Fernandes, J. B.; Macías, F. A. (2014) Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. *Phytochemistry Letters*, 8: 226–232.

Newman, J. D.; Dragg, G. M.; Snader, K. M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037.

Nygren, P. (2001) What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica*, 40: 166-174.

Oliveira, R. B.; Alves, R. J. (2002) Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química Nova*, 25: 976.

Ortega, E. H.; Graupner, P. R.; Asai, Y.; Tendyke, K.; Qiu, D.; Shen, Y. Y.; Rios, N.; Arnold, A. E.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; Gerwik, W. H.; Cubilla-Rios, L. (2013) Mycoleptodiscins A and B, cytotoxic alkaloids from the endophytic fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194. *Journal of Natural Products*, 76: 741–744.

Passador, E. A. P. (1995) Quimiosistemática de Rutaceae e estudo fitoquímico de *Neoraputia magnífica* Var. *magnífica*. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Passador, E. A. P.; Silva, M. F. G. F.; Fo, E. R.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Pirani, J. R. (1997) A pyrano chalcone and a flavanone from *Neoraputia magnífica*. *Phytochemistry*, 45(7): 1533-1537.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R. (2010) *Introdução à espectroscopia*. Tradução da 4ª edição norte americana. São Paulo: Cengage Learning.

Pirani, J. R.; Ottra, J. H. L.; Menezes, N. L. (2010) Morfoanatomia da flor de cinco espécies de *Galipea Aubl.* e seu significado na evolução de flores tubulosas entre as Rutaceae neotropicais. *Revista Brasil de Botanica*, 33(2): 301-318.

Ribeiro, T. A. N.; Ndiaye, E. A. S.; Velozo, E. S.; Vieira, P. C.; Ellena, J.; Sousa Junior, P. T. (2005) Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B): 1347-1352.

Ribeiro, A. B. (2006) Fitoquímica do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* e da espécie *Nycticalanthus speciosus* (Rutaceae) e biossíntese de cumarinas preniladas. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Rocha, M. R.; Souza, J. J.; Barcellos, L. T.; Sant'ana, C. M. R.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C. (2014) A novel 3,9-(1,2,3-Trioxocine)-type steroid of *Rauia nodosa* (Rutaceae). *Molecules*, 19: 14637-14648.

Rosas, L. V.; Veiga, T. A. M.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F. (2011) Prenylindole alkaloids from *Raputia praetermissa* (Rutaceae) and their chemosystematic significance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(7): 1346-1353.

Rösecke, J.; König, W.A. (2000) Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor*. *Phytochemistry*, 54: 757-762.

Roseghini, R.; Moreira, P.; Vale, V.; Pinheiro, A. M.; Costa, J. F. O.; Bittencourt, V.; Nascimento I.; Schaer, R.; Velozo, E.; El-Bachá, R.; Meyer, R.; Freire, S. (2006) Different effects of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela baihensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 28: 361–376.

Roseghini, R.; Falcão, G. M.; Costa, J. F. O.; Clarêncio, J.; Nascimento, I.; Velozo, E.; Schaer, R.; Vale, V.; Costa, S. L.; Costa, M. F. D.; Tardy, M.; Meyer, R.; Freire, S. M. (2009) The flavonoid rutin but not the alkaloid arborinine induces apoptosis in a B-cell hybridoma cell line. *Planta Medica*, 75: 488–493.

Salmonm, S. E., (1998) *Farmacología Básica & Clínica*, Katzung, B. G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655.

Santana, L. L. B.; Cardoso, L. A.; Druzian, J. I.; Souza, V. F.; Costa, T. A. C.; Nóbrega, D. A.; Hohlemwerger, S. V. A.; Velozo, E. S. (2006) Selectivity in the extraction of 2-quinolone alkaloids with supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4): 525-530.

Santos, C. S.; Januário, A. H.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Pirani, J. R. (1998) Cycloartane triterpenoid and alkaloids from *Almeidea SPP*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(1): 39-42.

Santos, R. A. N.; Batista Júnior, J.; Rosa, S. I. G.; Torquato, H. F.; Bassi, C. L.; Ribeiro, T. A. N.; Beserra, A. M. S. S.; Fontes, C. J. F.; Silva, L. E.; Piuvezam, M. R. (2011) Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. *Parasitology*, 138: 1224–1233.

Sargenti, S. R.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Salatino, A.; Pirani, J. R. (1993) Betaines, amino acids and waxes from *Erythrochiton brasiliensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(6/7): 723-727.

Silva, M.; Napolitano, H. B.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Oliva, G.; Thiemann O. H. (2003) 3-(5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]-pyran-6-yl)propionic acid: a potential inhibitor against *Leishmania*. *Acta Crystallographica*, 59: 1575-1577.

Silva, C. V.; Reis, A. L. V.; Ferrer, S. R.; Guerreiro, H. M. N.; Barros, T. F.; Velozo, E.S. (2010) Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(3): 355-360.

Silverstein, R. M., Webster, F. X. (2000) *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6ª Edição, Editora LTC.

Soares, S. F.; Borges, L. M. F.; Braga, R. S.; Ferreira, L. L.; Louly, C. C. B.; Tresvenzol, L. M. F.; Paula, J. R.; Ferri, P. H. (2010) Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Veterinary Parasitology*, 167: 67-73.

Sohrab, M. H.; Chowdhury, R.; Rahman, K. M.; Hasan, C. M.; Rashid, M. A. (2004) Antibacterial activity and cytotoxicity of extractives from *Ravenia spectabilis*. *Fitoterapia*, 75: 510-513.

Souza, J. P. I.; Arruda, A. C.; Muñoz, G. D.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H. (1999) Prenylated flavones from *Neoraputia paraensis*. *Phytochemistry*, 52: 1705-1709.

Souza, M. V. N. (2004) Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, 27: 308-312.

Souza, J. J. (2006) Constituintes químicos das cascas das raízes de *Tabernaemontana hystrix* (Apocynaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Späth, E.; Pikel, J. (1930) Über neue Basen der Angosturarinde: Chinolin, 2-Methyl-chinolin, 2-n-Amyl-chinolin und 1-Methyl-2-keto-1, 2-dihydrochinolin. *Monatshefte für Chemie*, 55: 352-357.

Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. (2001) *Oncology*, ed. Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132.

Talapatra, S. K.; Maiti, B. C.; Talapatra, B.; Das, B. C. (1969) Spectabiline, a new dihydrofuroquinol-4-one alkaloid from *Leminonia spectabilis* Lindl. *Tetrahedron Letters*, 54:4789-4790.

Tanoli, S. A. K.; Tanoli, N. U.; Bondancia, T. M.; Usmani, S.; Kerssebaum, R.; Ferreira, A. G.; Fernandes, J. B.; Ul-Haq, Z. (2013) Crude to leads: a triple-pronged direct NMR approach in coordination with docking simulation. *Analyt*, 138: 5137-5145.

Terezan, A. P. (2007) Estudo químico de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) e atividades biológicas em formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa*. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Terezan, A. P.; Rossi, R. A.; Almeida, R. N. A.; Freitas, T. G.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Pirani, J. R. (2010) Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5): 882-886.

Tomazela, D. M.; Pupo, M. T.; Passador, E. A. P.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Fo, E. R.; Pirani, J. R. (2000) Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*, 55: 643-651.

Toro, M. J. U.; Muller, A. F.; Arruda, M. S. P.; Arruda, A. C. (1997) Alkaloids and coumarins from *Ticorea longiflora*. *Phytochemistry*, 45(4): 851-853.

Treacy, J.; Curley, M.; Wengerb, J.; Sidebottom, H. (1997) Determination of Arrhenius parameters for the reactions of ozone with cycloalkenes. *Journal of the Chemical Society*, 93: 2877-2881.

Vagneur, B.; Richomme, P.; Bruneton, J. (1989) Aryl-2 et alkyl-2 quinolines nouvelles isolées d'une Rutacee bolivienne : *Galipea longiflora*. *Canadian Journal of Chemistry*, 67: 2116-2118.

Velozo, E.S. (1995) Fitoquímica comparada dos gêneros *Almeidea*, *Angostura* e *Rauia* (Rutaceae). Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Vieira, P. C.; Alvarenga, M. A.; Gottlieb, O. R.; Nazare, M.; McDougall, V.; Reis, F.A.M. (1980) Structural confirmation of dihydrocinnamic acids from *Adiscanthus fusciflorus* by ^{13}C NMR. *Phytochemistry*, 19: 472-473.

Vieira, P. C.; Kubo, I. (1990) Molluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*. *Phytochemistry*, 29(3): 813-815.

Vieira, P. C.; Kubo, I.; (1992) Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura panzculata*: isolation, structures, and synthesis. *Journal of Natural Products*, 55(8): 1112-1117.

Vieira, I. J. C. (1995) Uma contribuição à química da família Simaroubaceae. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Vieira, I. J. C.; Lião, L. M.; Velozo, E. F.; David, V.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Fo, E. R. (1996) Isolamento de produtos naturais por cromatografia de gotas em contracorrente. *Química Nova*, 19(1): 21-23.

Vieira, P. C.; Mafezoli, J.; Pupo, M. T.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S.; Oliva, G.; Pavão, F. (2001) Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. *Pure and Applied Chemistry*, 73(3): 617–622.

Vougogiannopoulou, K.; Fokialakis, N.; Aligiannis, N.; Cantrell, C.; Skaltsounis, A. (2010) The raputindoles: novel cyclopentyl bisindole alkaloids from *Raputia simulans*. *Organic Letters*, 12(9): 1908-1911.

Vougogiannopoulou, K.; Fokialakis, N.; Aligiannis, N.; Cantrell, C.; Skaltsounis, A. (2011) Simple indole alkaloids from the neotropical rutaceous tree *Raputia simulans*. *Planta Medica*, 77: 1559-1561.

Vougogiannopoulou, K.; Travassarou, A.; Fokialakis, N.; Skaltsounis, A. (2014) Rare bisindole alkaloids from the amazonian tree *Raputia simulans*. *Chemistry & Biodiversity*, 11: 126-132.

Waterman, P. G. (1975) Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochemical Systematic and Ecology*, 3: 149-180.

Waterman, P. G.; Grundon, M.F. (1983) *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*. ed.; Academic Press: Londres.

Waterman, P. G. (1999) The chemical systematics of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. *Biochemical Systematic and Ecology*, 27: 395–406.

Wirasutisna, K. R.; Gleye, J.; Moulis, C.; Stanislas, E.; Moretti, C. (1987) Galipein, a coumarin from *Galipea trifoliata*. *Phytochemistry*, 26(12): 3372.