UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WASHINGTON FELIX OLIVEIRA

Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)

JEQUIÉ - BA
AGOSTO / 2015

WASHINGTON FELIX OLIVEIRA

Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica
Química de Produtos Naturais

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula
Co-orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

JEQUIÉ - BA

AGOSTO / 2015

Oliveira, Washington Felix.

O52 Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de Conchocarpus mastigophorus Kallunki (Rutaceae) / Washington Felix Oliveira. - Jequié, UESB, 2015.

116 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. Orientadora: Profª. Drª. Vanderlúcia Fonseca de Paula.

1. Alcaloides acridônicos – Estudo químico 2. Alcaloides acridônicos – Atividade antibacteriana 3. Staphlococcus aureus e pseudômonas aeruginosa – Estudo químico I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD – 543

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA-PGQUI

Washington Felix Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia com requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **03/08/2015.**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula (UFMG, Belo Horizonte, 1999)
(Orientadora)

Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz (USP, São Paulo, 2012)

Profa. Dra. Mariluze Peixoto Cruz (UFBA, Salvador, 2013)

Ao meu Deus e Senhor, autor e consumador da minha fé, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, o maestro que dita o ritmo e o compasso de minha existência, ao **Senhor** que é a música mais bela dentro de mim, mesmo quando não existe instrumento a tocar.

À minha mãe **Alvina Felix**, um exemplo de vida, minha incentivadora e intercessora em todo tempo, mulher guerreira, que dedicou e dedica sua vida a me fazer feliz. Meu muito obrigado mainha.

Ao meu grande pai **Noé Paulo**, símbolo de honestidade, simplicidade, caráter e dignidade. Obrigado papai por ser um modelo de homem.

À minha esposa **Renata Rocha**, companheira e amante, por mim motivar a continuar. Te amo mesmo quando as palavras não são ditas.

Ao meu filho **David Rocha Felix**, por me ensinar a cada dia o significado de ser pai, da felicidade e gratidão. É por você que tudo suporto.

À minha orientadora Professora Dra. **Vanderlúcia Fonseca de Paula**, símbolo de sabedoria, competência e comprometimento. Sou e serei para sempre grato por acreditar em mim e confiar no meu potencial.

Ao **Programa de Pós-graduação em Química** pela oportunidade.

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro.

À **UESB**, pelo ensino e apoio.

Aos colegas do LPN, **Lauro José Caires**, **Tiago de Oliveira**, **Diego Moreno** e **Wagner Rodrigues** pela troca de conhecimento.

Aos professores Dra. **Suzimone de Jesus Correia** e Dr. **Jeferson Chagas** pelo apoio e auxilio.

Aos professores Drs. **Djalma Menezes de Oliveira e Rosane Moura Aguiar** do Laboratório de Cromatografia, pela realização das análises de CG-EM.

Às Universidades **UFBA** e **UFV** pelas análises de RMN.

Ao técnico Heiter Boness do **Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear - LABAREMN**

Ao Laboratório de Análises Clínica, nas pessoas do professor Dr. **Raphael Ferreira Queiroz** e da aluna de Iniciação científica **Gleiza Moreira Costa**, na realização dos ensaios na avaliação de atividade antibacteriana.

Aos professores **Marcos Bezerra**, **Luiz Augusto Gesteira** e **Nadia Machado** pelo ensino.

Aos colegas do LPN **Oscar, Daniel, Hion, Najla, Denise, Tiago, David e Léa** pela companhia e risos.

Aos **amigos e colegas** que mesmo sem perceberem me fazem alcançar lugares ainda mais altos.

Mas a sabedoria que vem do alto é antes de tudo pura; depois, pacífica, amável, compreensiva, cheia de misericórdia e de bons frutos, imparcial e sincera.

Tiago 3:17 – Bíblia Sagrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estruturas das substâncias isoladas de C*onchocarpus marginatus* **5**

Figura 2.2. Estruturas das Substâncias isoladas de *Conchocarpus Inopinatus* **6**

Figura 2.3. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus fontanesianus*..... **7**

Figura 2.4. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus gaudichaudianus*..... **8**

Figura 2.5. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*..... **9**

Figura 2.6. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus macrophyllus*..... **10**

Figura 2.7. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus macrocarpus*..... **10**

Figura 2.8. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus cuneifolius*..... **11**

Figura 2.9. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus paniculatus*..... **12**

Figura 2.10. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus cyrtanthus*..... **12**

Figura 2.11. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus longifolius* **13**

Figura 2.12. Estrutura de A) ácido antranílico e B) ácido chiquímico **14**

Figura 2.13. Alguns tipos de alcaloides de Rutaceae derivado do ácido antranílico..... **15**

Figura 2.14. Esqueleto e numeração dos alcaloides acridônicos..... **15**

Figura 2.15. Esqueleto da 1,2-benzopirona **16**

Figura 2.16. Folhas, frutos, caule e espécime da *C. mastigophorus*..... **18**

Figura 4.1. Foto cidade de Itamari, município em que foi realizada a coleta..... **22**

Figura 4.2. Foto do local da coleta indicado pela seta – vista aérea..... **23**

Figura 4.3. Exsicata de *Conchocarpus mastigophorus* depositada no HUESB..... **23**

Figura 4.4. Preparo dos extratos hexânico, AcOEt, metanólico para o caule e casca **25**

Figura 4.5. Frações da coluna cromatográfica do extrato acetato de etila do caule..... **27**

Figura 4.6. Fracionamento do extrato acetato de etila do caule de *C. mastigophorus*, para isolamento dos seus constituintes químicos **30**

Figura 5.1. A) Cromatograma obtido para CM1 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **1**..... **34**

Figura 5.2. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância **1**..... **36**

Figura 5.3. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância **1**, com expansão na região de δ_H 6,85 a 8,10..... **37**

Figura 5.4. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância **1** com expansão na região de δ_H 3,66 a 4,26..... **37**

Figura 5.5. Espectro de RMN ^{1}H em (acetona-d_6, 300 MHz) da substância **1**..... **38**

Figura 5.6. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) da substância **1**..... **38**

Figura 5.7. Mapa de contorno HSQC da substância **1**..... **39**

Figura 5.8. Mapa de contorno HMBC da substância **1**..... **39**

Figura 5.9. Correlação atribuídas de acordo a HMBC da substância **1**..... **40**

Figura 5.10. A) Cromatograma obtido para CM2 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **2** **41**

Figura 5.11. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) da substância **2** **44**

Figura 5.12. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) da substância **2**, expandido na região dos hidrogênios do anel A..... **44**

Figura 5.13. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) da substância **2**, expandido na região dos grupos metilas ligado a heteroátomos (O ou N) ... **45**

Figura 5.14. Espectro de RMN ^{13}C (Acetona-d_6, 125 MHz) da substância **2** **45**

Figura 5.15. Mapa de contornos HSQC da substância **2**..... **46**

Figura 5.16. Mapa de contornos HMBC da substância **2**..... **46**

Figura 5.17. Correlação atribuídas de acordo o experimento HMBC para a substância **2**..... **47**

Figura 5.18. A) Cromatograma obtido para CM3 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 2 e C) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 3..... **48**

Figura 5.19. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) de CM3 ..... **50**

Figura 5.20. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) de CM3, com expansão da região de δ_H 6,1 a 9,7..... **50**

Figura 5.21. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) de CM3, com expansão da região de δ_H 7,00 a 8,15..... **51**

Figura 5.22. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) de CM3, com expansão da região de δ_H 3,68 a 4,32 ..... **51**

Figura 5.23. Espectro de RMN ^{13}C (acetona-d_6, 125 MHz) de CM3..... **52**

Figura 5.24. A) Cromatograma obtido para CM4 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 4 e 5 ..... **54**

Figura 5.25. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM4, substância **4**(A) e substância 5(B) **57**

Figura 5.26. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM4, substância

4 (A) e 5 (B) com expansão da região de δ_H 8,0 a 6,4..... **57**

Figura 5.27. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM4 substância **4**(A) e 5 (B) com expandido da região de δ_H 4,14 a 3,62..... **58**

Figura 5.28. Espectro de RMN ^{13}C (Acetona-d_6, 125 MHz) de CM4 (destaque nos valores da substância 4) **58**

Figura 5.29. Espectro de RMN ^{1}H (Acetona-d_6, 400 MHz) de CM4 da substância **4**..... **59**

Figura 5.30. Espectro de RMN ^{13}C (Acetona-d_6, 75 MHz) de CM4 da substância **4**..... **59**

Figura 5.31. Mapa de contorno HSQC (Acetona-d_6, 400 MHz) de CM4..... **60**

Figura 5.32. Mapa de contorno HMBC (Acetona-d_6, 400 MHz) de CM4 ..... **60**

Figura 5.33. Correlação atribuídas de acordo a HMBC da substância 4 .... **61**

Figura 5.34. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de CM4 com destaque para substância **5** **63**

Figura 5.35. Espectro de RMN ^{1}H (Acetrona-d_6, 400 MHz) de CM4, com valores sinalizados da substância **5**(minoritário) e expansão da região de δ_H 6,5 a 15,2 ..... **64**

Figura 5.36. Cromatograma obtido para CM5 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 6; C) Espectro de massas da substância 7 ..... **65**

Figura 5.37. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 com integração para a substância 6 (CM5A) **67**

Figura 5.38. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 da substância 6 expandido na região de δ_H 7,10 a 7,85 ..... **67**

Figura 5.39. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 da substância 6 expandido na região de δ_H 4,06 a 4,52 ..... **68**

Figura 5.40. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de CM5, sinalizados

os valores de CM5B (substância **6**) **68**

Figura 5.41. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 da mistura de quatro substâncias e integrados para CM5B (substância 7)..... **70**

Figura 5.42. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 expandido na região de δ_H 6,1 a 7,6..... **70**

Figura 5.43. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 expandido na região de δ_H 3,1 a 4,8 (anel dihidrofurano) de CM5B (substância 7) **71**

Figura 5.44. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 com expansão na região de δ_H 1,00 a 1,95 (hidrogênios hidróxi-isopropila de CM5B (substância 7) **71**

Figura 5.45. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$,125 MHz) de CM5 sinalizado os valores referentes a CM5B (substância 7) **72**

Figura 5.46. A) Cromatograma obtido para CM3 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 8 e C) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância 9..... **73**

Figura 5.47. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6, com destaque para os sinais de CM6A (substância **8**) **75**

Figura 5.48. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) expandido na região de δ_H 7,20 a 8,05 (hidrogênios aromáticos da substância 8 sinalizados) **76**

Figura 5.49. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de CM6 com ampliação dos valores de deslocamento de carbono da substância 8 ..... **76**

Figura 5.50. Mapa de contorno de HSQC ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6 de CM6A (substância 8) e CM6B (substância 9) **77**

Figura 5.51. Mapa de contorno de HMBC ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6 de CM6A (substância 8) e CM6B (substância 9) **77**

Figura 5.52. Correlação atribuídas de acordo a HMBC da substância 8 ..... **78**

Figura 5.53. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6, com

destaque para os sinais da substância **9** **80**

Figura 5.54. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$,125 MHz) de CM6, com destaque para os sinais da substância **9** **80**

Figura 5.55. Atividade antibacteriana dos extratos hexânico, AcOEt e metanólico da casca e do caule de *Conchocarpus mastigophorus* frente à bactéria *Staphylococcus aureus*..... **83**

Figura 5.56. Atividade antibacteriana dos extratos hexânico, AcOEt e metanólico da casca e do caule de *Conchocarpus mastigophorus* frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*..... **83**

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. As principais classes de cumarinas, exemplo e característica **16**

Tabela 4.1. Valores das massas do material vegetal e rendimento dos extratos..... **24**

Tabela 4.2. Agrupamento das frações obtidas do extrato ACLCM..... **28**

Tabela 4.3. Fracionamento da fração ACLCM 25..... **29**

Tabela 5.1. Dados de RMN ^{1}H (acetona-d_6) da substância **1** comparados aos dados da literatura (Wu, et al.,1992) para a glifolina..... **40**

Tabela 5.2. Comparação dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (acetona-d_6) da substância **2** com valores da literatura (Pomkeua, 2010) para a citrusinina I..... **47**

Tabela 5.3. Comparação dos dados de RMN ^{1}H da citbrasina e de CM3B..... **52**

Tabela 5.4. Comparação dos dados de RMN ^{13}C da citbrasina e de CM3B..... **53**

Tabela 5.5. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C da substância 4 em Acetona-d_6..... **61**

Tabela 5.6. Comparação dos dados de RMN ^{1}H da substância 5 em $CDCl_3$, Acetona-d_6 e comparação com a literatura..... **63**

Tabela 5.7. Dados de RMN ^{1}H da γ-Fagarina comparado à literatura..... **69**

Tabela 5.8. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C de CM5B (substância 7) comparada a literatura em $CDCl_3$..... **72**

Tabela 5.9. Dados de RMN ^{1}H a substância **8** comparado a literatura $CDCl_3$..... **78**

Tabela 5.10. Dados de RMN ^{1}H a substância **9** comparado a literatura..... **81**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACACM – Extrato Acetato de etila da casca de *Conchocarpus mastigophorus*

ACLCM – Extrato Acetato de etila do caule de *Conchocarpus mastigophorus*

AcOEt – Acetato de etila

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

d – Dupleto

dd – Duplo dupleto

ddd – Duplo, duplo dupleto

dl – Dupleto largo

EACA – Extrato Acetato de etila da casca

EACL – Extrato Acetato de etila do caule

EHCA – Extrato hexânico da casca

EHCL – Extrato hexânico do caule

EMCA – Extrato metanólico da casca

EMCL – Extrato metanólico do caule

EM – Espectrometria de Massa

Ext. – Extrato

EV – Elétron-Volt

HCACM – Extrato Hexanico da casca da *Conchocarpus mastigophorus*

HCLCM – Extrato Hexanico do caule da *Conchocarpus mastigophorus*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

HUESB – Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Hz – Hertz

IE – Impacto eletrônico

J – Constante de acoplamento

LPN – Laboratório de Produtos Naturais

m – Multipleto

mg – Miligrama

m/z – Relação massa/carga

MCACM – Extrato Metanólico da casca da *Conchocarpus mastigophorus*

MCLCM – Extrato Metanólico do caule da *Conchocarpus mastigophorus*

Me – Metila

MeOH – Metanol

nm – Nanômetro

OMe – Metoxila

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN ^{1}H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

s – Singleto

t – Tripleto

Tf – Temperatura de fusão

UV – Ultravioleta

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

δ – Deslocamento químico

δ_C – Deslocamento químico de carbono

δ_H – Deslocamento químico de hidrogênio

λ – Comprimento de onda

Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)

Autor: Washington Felix Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula

RESUMO: Este trabalho apresenta o primeiro estudo químico e da atividade antibacteriana de extratos do caule e da casca, e de dois alcaloides acridônicos do caule de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae), uma espécie endêmica do Estado da Bahia. O material vegetal foi coletado no município de Itamari. Do extrato em acetato de etila do caule (ACLCM) foram isoladas nove substâncias, com destaque para cinco alcaloides acridônicos, importantes marcadores taxonômicos da família Rutaceae. As substâncias identificadas foram os alcaloides acridônicos glifolina (**1**), citrusinina I (**2**), citbrasina (**3**), 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxi-*N*-metilacridona (**4**) e citramina (**5**); o alcaloide furoquinolínico γ-Fagarina (**6**); a cumarina marmesina (**7**); e os alcaloides quinolônicos 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (**8**) e haplotusina (**9**). Dentre estas, a substância **4** ainda não havia sido descrita na literatura. Todas as substâncias foram identificadas usando técnicas de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C, 1D e 2D (HMBC e HSQC), e EM (CG-EM). Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico, da casca e do caule de *C. mastigophorus* foram avaliados quanto às suas propriedades antibacterianas, pelo método de difusão em disco, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa). Os extratos em acetato de etila e metanólico da casca e o extrato em acetato de etila do caule, na dose de 1 mg/disco, inibiram o crescimento de *S. aureus*, com halos de inibição de 24, 20 e 20 mm, respectivamente, similares ao halo de inibição (20 mm) da tetraciclina (1 µg/disco), antibiótico utilizado como referência. Por outro lado, apenas o extrato em acetato de etila inibiu (20 mm) o crescimento de *P. aeruginosa*, com halo idêntico (20 mm) ao do antibiótico ceftriaxona (1 µg/disco). Para as substâncias **1** e **2,** isoladas do ACLCM, foram observados halos de inibição de 10 e 16 mm, respectivamente, na concentração de 0,1 mg/disco. Estes resultados indicam que *C. mastigophorus* possui metabólitos com atividade antibacteriana e futuras investigações deverão ser realizadas visando o uso racional desta planta e/ou de seus metabólitos secundários no combate de infecções bacterianas.

Palavras chave: alcaloides acridônicos, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Phytochemical study and antibacterial activity of *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)

Author: Washington Felix Oliveira

Advisor: Prof. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula

ABSTRACT: This paper presents the first chemical and the antibacterial activity of stem extracts and bark, and two acridônicos the stem Conchocarpus mastigophorus Kallunki alkaloids (Rutaceae), an endemic species of the state of Bahia, whose plant material was collected in the municipality of Itamari. Extract in ethyl acetate stem (ACLCM) nine substances were isolated, highlighting five acridônicos alkaloids, important taxonomic markers of Rutaceae family. The substances were identified alkaloids acridone glifoline (1), citrusinine I (2), citbrasine (3) 1,3,6-trihydroxy-2,5-dimethoxy-N-metilacridone (4) and citramine (5); furoquinoline the alkaloid γ-Fagarine (6); marmesine the coumarin (7); Quinolone alkaloids and 1-methyl-4-methoxy-2-quinolone (8) and haplotusine (9). Among these, the substance 4 had not yet been described in the literature. All compounds were identified using techniques 1H and 13C NMR, 1D and 2D (HSQC and HMBC) and MS (GC-MS). The hexane extracts, ethyl acetate and methanol, bark and C. mastigophorus stem were evaluated for their antibacterial properties, by disk diffusion method, on the bacteria Staphylococcus aureus (gram-positive) and Pseudomonas aeruginosa (gram negative). The extract in ethyl acetate and methanolic extract of the bark and the stem in ethyl acetate at a concentration of 1 mg/disk, inhibited the growth of S. aureus with inhibition zones 24, 20 and 20 mm, respectively, equivalent to the inhibition zone (20 mm) of tetracycline (1 µg/disk), used as a reference antibiotic. On the other hand, only the ethyl acetate extract inhibited (20 mm), the growth of P. aeruginosa with identical halo (20mm) to the antibiotic ceftriaxone (1 µg/disk). For substances 1 and 2, isolated from ACLCM, inhibition halos were observed 10 and 16 mm, respectively, at a concentration of 0.1 mg/disk. These results indicate that C. mastigophorus have metabolites with antibacterial activity and further investigations should be carried out to encourage rational use of this plant and / or its secondary metabolites in combating bacterial infections.

Keywords: acridone alkaloids, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO DE LITERATURA **4**

2.1. Família Rutaceae **4**

2.1.1. O gênero *Conchocarpus* **4**

2.1.1.1. *Conchocarpus marginatus* **5**

2.1.1.2. *Conchocarpus Inopinatus* **6**

2.1.1.3. *Conchocarpus fontanesianus* **6**

2.1.1.4. *Conchocarpus gaudichaudianus* **7**

2.1.1.5. *Conchocarpus heterophyllus* **8**

2.1.1.6. *Conchocarpus macrophyllus* **9**

2.1.1.7. *Conchocarpus macrocarpus* **10**

2.1.1.8. *Conchocarpus cuneifolius* **10**

2.1.1.9. *Conchocarpus paniculatus* **11**

2.1.1.10. *Conchocarpus cyrtanthus* **12**

2.1.1.11. *Conchocarpus longifolius* **13**

2.1.2.1. Alcaloides **14**

2.1.2.2. Cumarinas **16**

2.1.3. *Conchocarpus mastigophorus* **17**

2.2. Produtos naturais e agentes antibacteriano **18**

3. OBJETIVOS **21**

3.1. Geral **21**

3.2. Específicos **21**

4. MATERIAL E MÉTODOS **22**

4.1. Material vegetal de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki **22**

4.2. Preparo dos extratos **24**

4.2.1. Preparo do extrato hexânico do caule (EHCL) **24**

4.2.2. Preparo do extrato acetato de etila do caule (EACL) **24**

4.2.3. Preparo do extrato metanólico do caule (EMCL).....**24**

4.2.4. Preparo dos extratos hexânico, AcOEt e Metanólico da casca **24**

4.3. Equipamentos e reagentes utilizados no estudo fitoquímicos.....**26**

4.4. Análises cromatográficas dos extratos **27**

4.4.1. Análise cromatográfica do extrato AcOEt do caule (ACLCM) **27**

4.5. Materiais e equipamentos utilizados para o ensaio antibacteriano **30**

4.6. Metodologia na avaliação preliminar da atividade antibacteriana **31**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **32**

5.1. Elucidação das estruturas das substâncias isoladas de *C.mastigophorus* **32**

5.1.1. Determinação estrutural de CM1 (substância 1) **34**

5.1.2. Determinação estrutural de CM2 (substância 2) **41**

5.1.3. Determinação estrutural dos constituintes de CM3 (substâncias 2 e 3).....**48**

5.1.4. Determinação estrutural de CM4 (substâncias 4 e 5) **54**

5.1.4.1. Determinação estrutural de CM4A (substância 4).....**54**

5.1.4.2. Determinação estrutural de CM4B (substância 5).....**62**

5.1.5. Determinação estrutural dos constituintes de CM5 (substâncias 6 e 7).....**65**

5.1.5.1. Determinação estrutural de CM5A (substância 6).....**66**

5.1.5.2. Determinação estrutural de CM5B (substância 7).....**69**

5.1.6. Determinação estrutural dos constituintes de CM6 (substâncias 8 e 9).....**73**

5.1.6.1. Determinação estrutural de CM6A (substância 8).....**74**

5.1.6.2. Determinação estrutural de CM6B (substância 9).....**79**

5.2. Resultados do ensaio antibacteriano preliminar **82**

6. CONCLUSÕES.....**84**

7. REFERÊNCIAS.....**85**

1. INTRODUÇÃO

Há milhares de anos o homem tem buscado na natureza remédios que tragam curas ou paliativos para suas doenças e dores (NEWMAN, 2000; BUTLER, 2004). Fazendo uma retrospectiva na história de descobertas e utilização dos produtos naturais como fontes medicinais no tratamento de inúmeras patologias e enfermidades, é possível verificar a tamanha importância das plantas para a humanidade (CRAGG, 2001).

Descrevendo-se alguns dos eventos da história dos metabólitos secundários produzidos nas plantas, que desencadeou na atualidade uma busca por novas substâncias com fins terapêuticos, é preciso retornar aos primeiros registros, em que alguns são datados de mais de 5 mil anos. O primeiro relato de utilização de plantas como medicamentos vem da China do ano 3.000 a.C. de um livro intitulado PEN TSAO, escrito pelo imperador Shen Nung, que descreve os benéficos de diversas folhas e raízes (JORGE, 2015).

Dos mais variados relatos em diferentes momentos da história, o papiro de Eber é um dos mais antigos, tendo como um dos primeiros utilizadores de metodologias com ervas medicinais, *Imhotep*, um grande curandeiro (BRITO et al., 2013). Nesse mesmo período, escritos da índia aplicavam os produtos naturais no tratamento de enfermidades (DEVEZA, 2013), em livros sânscritos dos Ayurvedas.

Os babilônios, no código de Hamurabi, escrito aproximadamente em 1.700 a.C., existem relatos de prescrição médicas na utilização de produtos naturais, sendo esses escritos de datas em que viveu o patriarca Abraão (DUTRA, 2009; CUNHA, 2015). Povos tão antigos quantos os babilônios os hebreus, assírios e persas, em diversos escritos históricos também confirmam a utilização de produtos naturais na cosmética e terapias (MARTINS et al., 2000).

A Bíblia o livro mais lido no mundo, tem citações diversas sobre plantas sendo utilizadas com fins curativos, um exemplo está em 2 Reis 20:7, livro escrito entre 560-540 a.C., em Gênesis Deus presenteia o primeiro homem, Adão, com plantas de todas as espécies e para todos os fins agradáveis. Em outro livro bíblico escrito entre 593-566 a.C., Ezequiel escreve: “*E junto ao rio, à sua margem, de um e de outro lado, nascerá toda a sorte de árvore que dá fruto para se comer; não cairá*

a sua folha; nos seus meses produzirá novos frutos, porque a suas aguas saem do santuário; e servirá de comida, e sua folha de remédio" (BÍBLIA SAGRADA).

Na Grécia, Diocles (400 a.C.) com o primeiro livro sobre ervas curativas de que se têm escritos, ficou conhecido como o primeiro a sistematizar todo o conhecimento de milênios. Hipócrates outro grego que ficou conhecido "como Pai da Medicina", escreveu "*Corpus Hipocratium*" que descrevia conhecimentos profundos acerca de remédios vegetais e a forma de tratamento, e que foi escrito por volta de 460-361 a.C. tempo em que viveu (NOGUEIRA et al., 2009).

No início do século I, Dioscórides, considerado o "pai da farmácia", em seu tratado chamado "De Materia Medica", catalogou aproximadamente 600 plantas, descrevendo os seus usos (JORGE, 2015). Outro grego, ainda no século I, Plinio "o Velho", que possuía uma enciclopédia de 37 volumes, registrou diversas espécies de vegetais que teriam utilidade para a medicina (VIEIRA, 2009).

Já na Idade Média, entre 450-1000, período que para a ciência em todos os sentidos, não houve evolução ou grandes descobertas, fato esse que, inevitavelmente, se refletiu em estudos de plantas medicinais, pois a ideia religiosa inundou o espirito humano. Essa era ficou conhecida como "Idade Tenebrosa". (PINTO et al., 2002).

Entre 980-1037 viveu o persa Abu Ali al Hussin ibn Abdallah ibn Sina, conhecido como Avicena, considerado o maior médico desse período, descrevia em seu livro intitulado "The Canon of Medicine", mistura com ópio e nozes, alcaçuz entre outros, e ainda, descreveu o uso e eficácia de 760 drogas organizadas em ordem alfabéticas (POLETTO, 2011).

Em 1542, Leonhart Fuchs com a obra "*De historia stirpium commentarii insignes*" (comentários notáveis sobre a história das plantas) que substitui um manuscrito bizantino Dioscórides, do século VI que tinha como título "*Códice Vindobonensis*" considerado, até então, o documento médico de maior importância (MEYER, 2001).

Samuel Hahnemann, médico alemão, foi o fundador da homeopatia em 1779, que recomendava tratamentos de doenças com quantidades pequenas de compostos derivados de plantas, que tinha sua administração aos pacientes como uma vacina (SÁ, 2014).

A partir do século XIX, ocorreu o pleno desenvolvimento da química de produtos naturais, período em que o estudo sobre plantas, com base cientifica, iniciou-se e, consequentemente, o isolamento de substâncias ativas das plantas, conhecidas, até então, como medicinais. Esses compostos demonstraram princípios ativos eficientes no tratamento de doenças, como exemplo, alguns alcaloides: a cocaína, quinina e a morfina, sendo esse último, o primeiro alcaloide a ser isolado e identificado por Armand Séquin em 1804 (MONTANARI, 2001; VIEGAS, 2006).

No Brasil, o primeiro metabólito secundário isolado, segundo diversos autores, foi o alcaloide pereirinha, extraído da casca do pau-pereira em 1838 pelo farmacêutico Ezequiel Corrêa dos Santos no Rio de Janeiro, no entanto, outros pesquisadores reivindicam esse fato, e sua utilidade medicinal era para tratamento de febre (ALMEIDA, 2009; SANTOS, 2007).

Na atualidade, estudos na área de produtos naturais, área da química responsável por buscar substâncias bioativas na natureza, isolar e caracterizar essas substâncias químicas desempenha um papel primordial na descoberta desses novos metabólitos. Sabe-se que as plantas produzem esses metabólitos secundários para seu próprio benefício, como defesa e, portanto, não fazem parte de sua necessidade universal. Por outro lado, o metabolismo primário é comum a todas as plantas, pois é um processo metabólico essencial para os vegetais, tais como, fotossíntese e o transporte de solutos (YUN, 2012; AHARONI, 2011).

Através dos métodos cromatográficos e com o desenvolvimento de novas tecnologias, o conhecimento químico das plantas tem avançado. No entanto, de toda a vasta quantidade de espécies existentes em nosso planeta, apenas uma pequena quantidade dessa diversidade foi submetida a algum tipo de estudo (CALIXTO, 2003; GARCIA, 1995).

Com a maior biodiversidade do mundo, cerca de 20% de toda riqueza vegetal do mundo, o Brasil também possui o maior quantitativo de espécies endêmicas, fator que em teoria, favorece o processo de novas descobertas de substâncias com atividades biológicas, tamanha é o celeiro de compostos ativos a serem descobertos (GANEM, 2010; FOGLIO et al., 2006).

Estima-se que das quase 280 mil espécies de plantas existentes na terra, cerca de 60 mil, incluindo fungos, são distribuídos no Brasil (GIULIETTI, 2005; LEWINSOHN, 2005).

O presente trabalho apresenta o primeiro estudo fitoquímico da espécie *Conchocarpus mastigophorus*, uma planta da família Rutaceae, endêmica da Bahia. Este gênero possui 47 espécies distribuídas por todo território brasileiro, das quais 36 espécies são endêmicas (PIRANI, 2015) e, na sua maioria, ainda não estudada, química e biologicamente. Portanto, são importantes fontes a serem exploradas, com vistas à obtenção de novas substâncias biologicamente ativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Rutaceae

A família Rutaceae pertence à ordem das Rutales, sub-família Rutoideae, tribo Cusparieae, subtribo Philocarpineae (BAETAS et al., 1996; PERNIN et al., 1999). Possui distribuição predominantemente pantropical, incluindo entre 1500-2000 espécies distribuídas em aproximadamente 160 gêneros (GROPPO et al., 2012; WATERMAN, 1983) sendo que no Brasil são citadas aproximadamente 200 espécies (ALBUQUERQUE, 1976; CORTEZ et al., 2006).

A família Rutaceae é amplamente distribuída pelos continentes e no Brasil em todas as regiões. É principalmente constituída por árvores e arbustos e tem como um dos maiores destaques, o gênero *Citrus*, devido principalmente a grande variedade das frutas comestíveis, como exemplo a laranja e limão, que têm grande força comercial no mundo. Esta família é conhecida ainda pela grande variedade de metabólitos secundários, tais como, alcaloides, cumarinas, flavonoides, entre outros. Os alcaloides nessa família se destacam e faz dessa uma das mais diversificadas quimicamente. Outra característica dessa família é a larga utilização de seus constituintes como uso medicinal e a grande diversidade de atividades biológicas (GROPPO et al., 2012; OLIVEIRA, 2014a; PRUDENTE, 2013; COSTA et al., 2010).

2.1.1. O gênero *Conchocarpus*

O gênero *Conchocarpus* J. C. Mikan, pertencente à família Rutaceae, no Brasil é nativo e ocorre em todas as regiões e quase todos os estados, sendo representado por 47 espécies, das quais 36 são endêmicas. Dentre as espécies endêmicas do Brasil encontra-se *C. mastigophorus* Kallunki, cuja ocorrência é registrada apenas no Estado da Bahia (PIRANI, 2015).

Relativamente, poucos estudos químicos são descritos na literatura para

espécies do gênero *Conchocarpus,* dentre os descritos destaca-se o isolamento de alcaloides e cumarinas de *C. marginatus* (BELLETE, 2009), de *C. inopinatus* (BELLETE et al., 2012; SÁ, 2010), de *C. longifolius* (MAFEZOLI, 2001; FACCHINI, 2005 apud BELLETE, 2009) e de *C. fontanesianus* (CABRAL et al., 2012); de alcaloides de *C. gaudichaudianus* (CORTEZ et al., 2009), de *C. macrophyllus* (ALBARICI, 2006), de *C. cuneifolius* (VELOZO, 1995 apud OLIVEIRA , 2014b), de *C. paniculatus* (VIEIRA et al., 1992); de flavonoides de *C. heterophyllus* (AMBROZIN et al., 2008) e de *C. cuneifolius* (VELOZO, 1995 apud OLIVEIRA, 2014b), e de cumarinas e diterpenos de *C. cirtanthus* (OLIVEIRA, 2014b).

Atualmente algumas espécies do gênero *Angostura* passaram por novos estudos e reavaliação e foram reclassificados por Kallunki e Pirani como pertencentes ao gênero *Conchocarpus,* são os casos da *C. paniculatus* (=Angostura paniculata), *C. macrophyllus (=Angostura macrophylla*) *e C. gaudichaudianus* (=*Angostura gaudichaudiana*) (PIRANI, 2015).

2.1.1.1. C*onchocarpus marginatus*

De *C. marginatus* (BELLETE, 2009) foram isoladas doze substâncias: três esteroides (β-sitosterol, estigmasterol e campesterol), sete alcaloides acridônicos e dois alcaloides quinolínicos (**figura 2.1**).

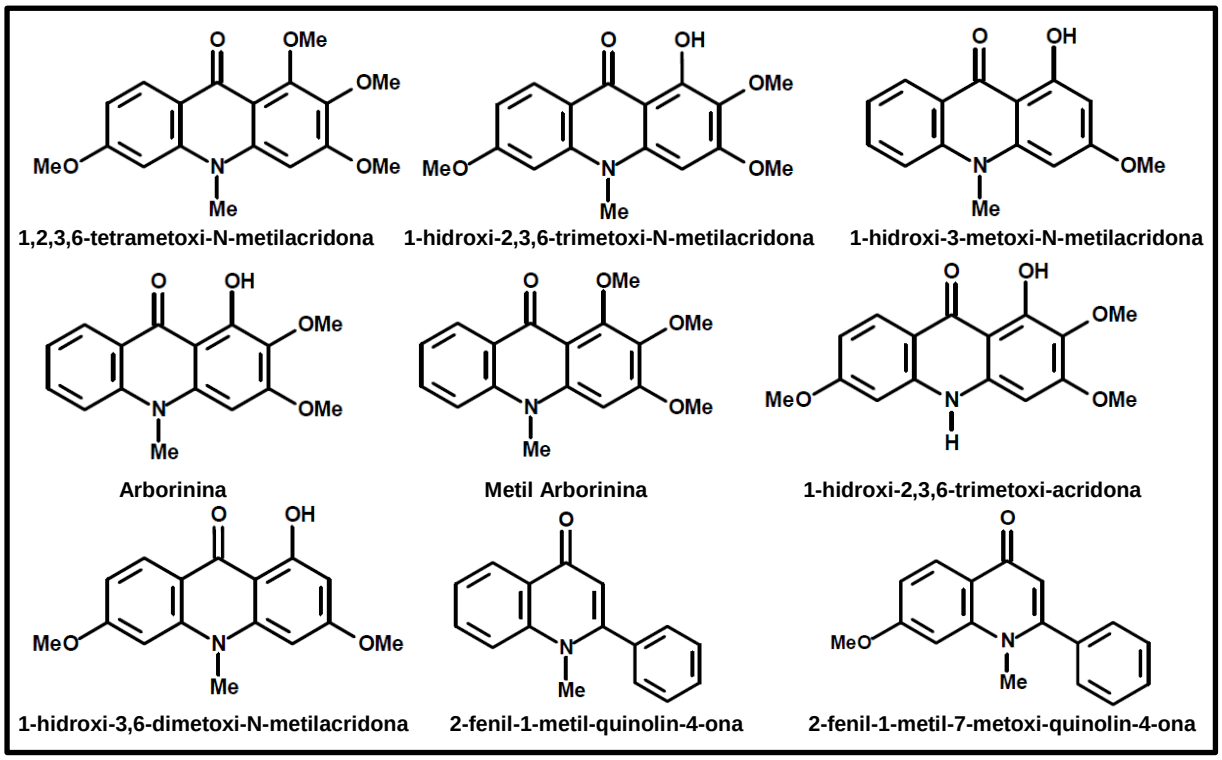


Figura 2.1. Estruturas dos alcaloides isoladas de C. *marginatus.*

2.1.1.2. *Conchocarpus Inopinatus*

De *C. inopinatus* (BELLETE et al., 2012; SÁ, 2010) foram isoladas diversas substâncias, entre elas, sete alcaloides, sendo seis acridônicos e um *seco* acridônico, e ainda, um alcaloide quinolínico, um alcaloide furoquinolino e duas cumarinas (**figura 2.2**).

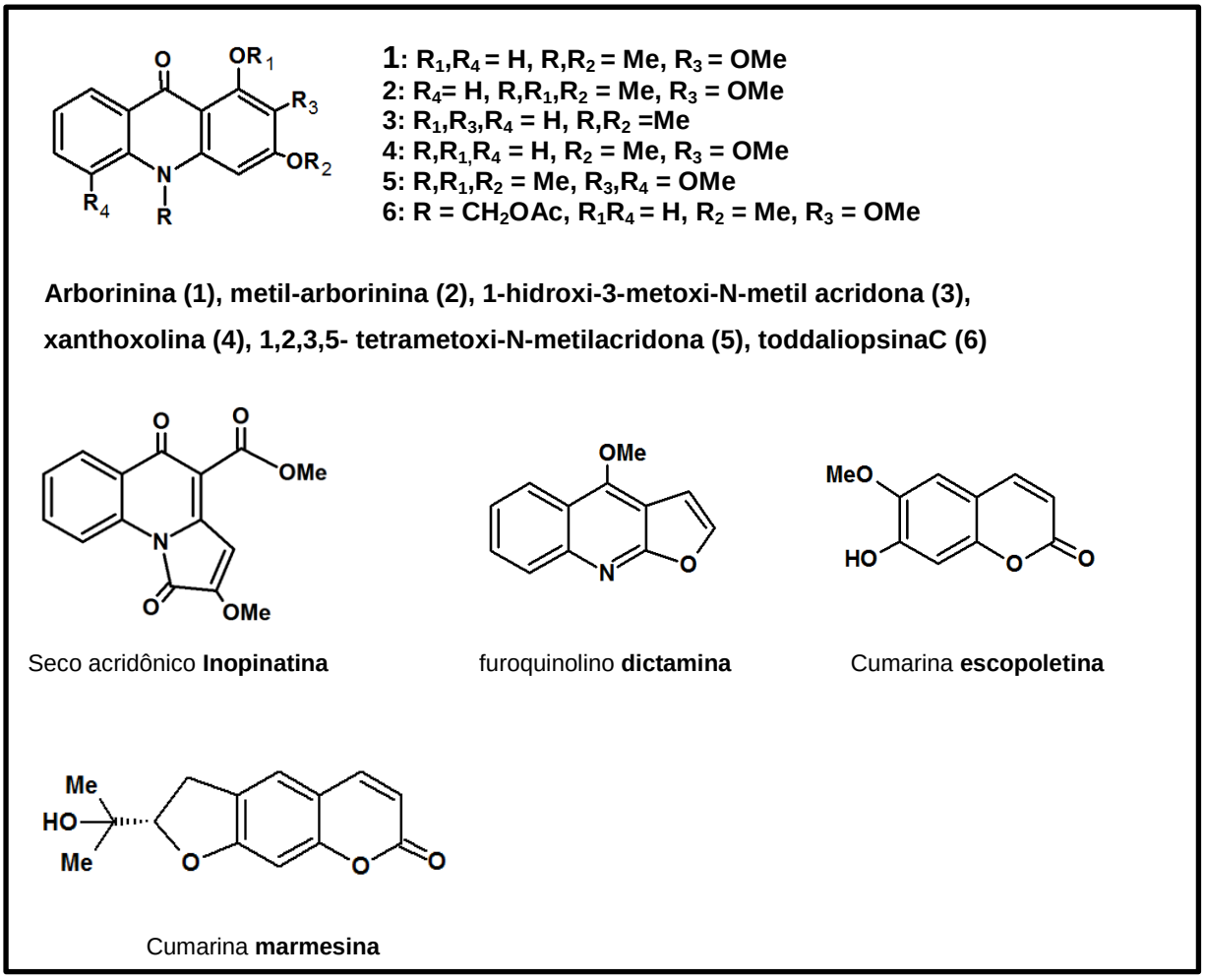


Figura 2.2. Estruturas de algumas substâncias isoladas de *C. Inopinatus.*

2.1.1.3. *Conchocarpus fontanesianus*

De *C. fontanesianus* (CABRAL et al., 2012) foram purificadas 5 substâncias, sendo três alcaloides furoquinolínicos, um alcaloide do tipo 4-quinolônico e uma furanocumarina (**figura 2.3**).

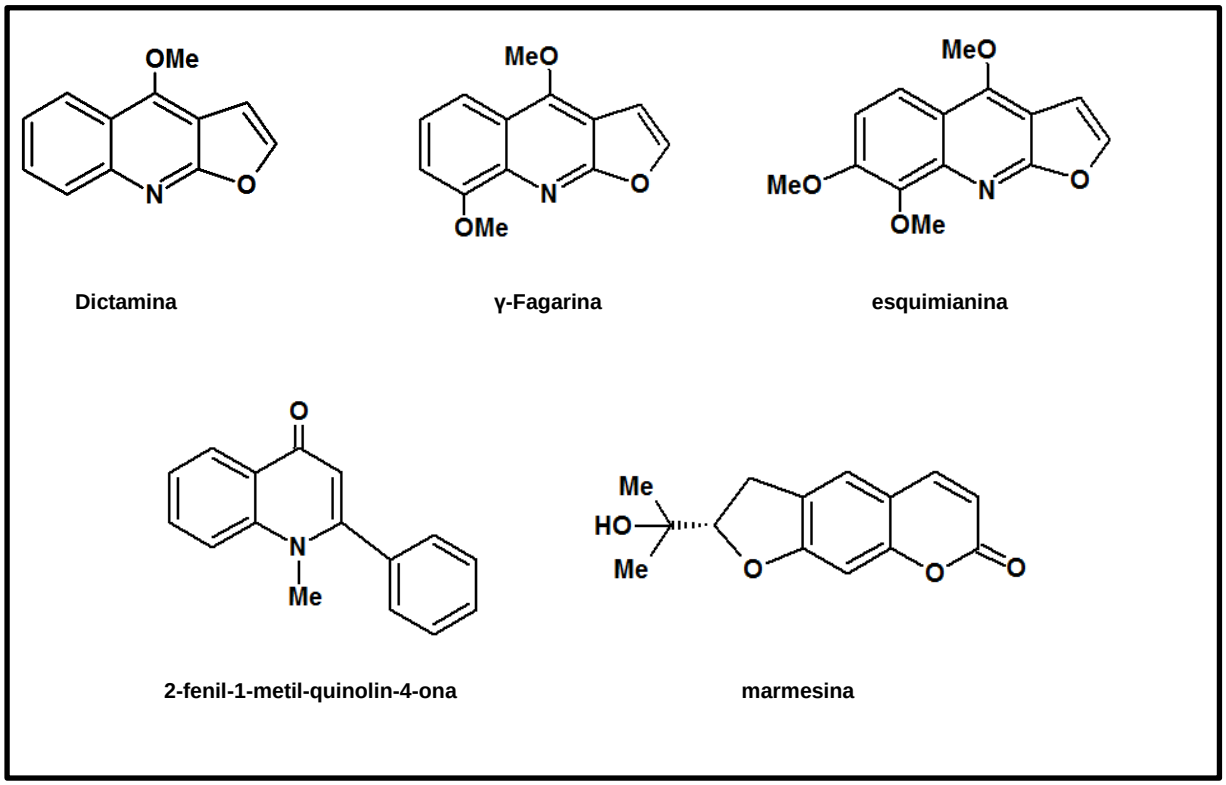
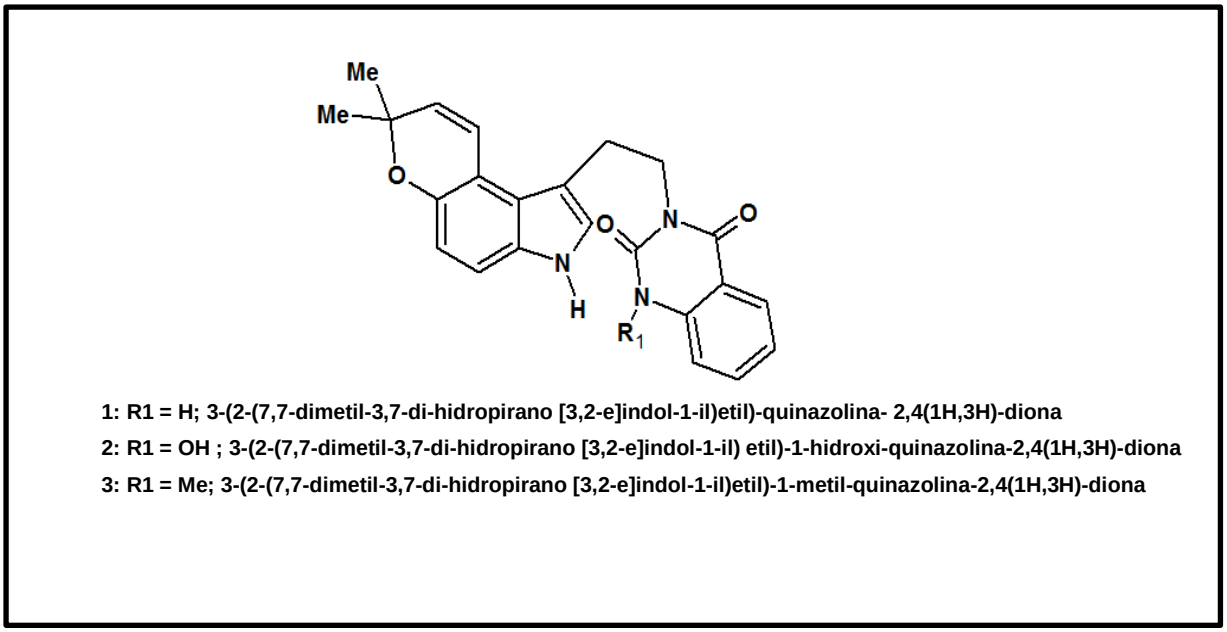


Figura 2.3. Estruturas das substâncias isoladas de *C. fontanesianus.*

2.1.1.4. *Conchocarpus gaudichaudianus*

De *C. gaudichaudianus* (CORTEZ et al., 2009) foram isoladas seis substâncias: três alcaloides indoloquinazolônicos, um quinolônico, e duas amidas (**figura 2.4**).



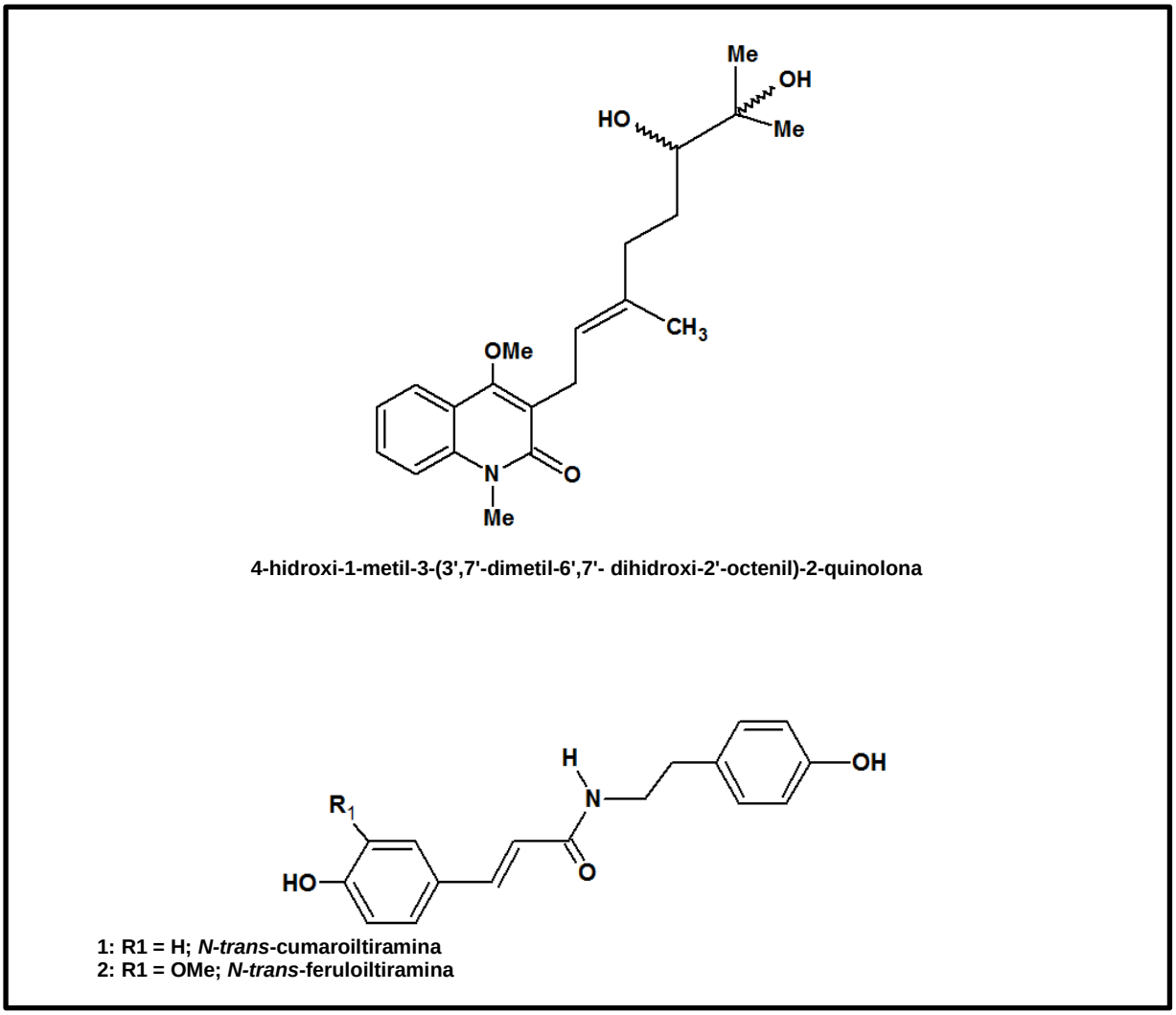


Figura 2.4. Estruturas de algumas substâncias isoladas de *C. gaudichaudianus.*

2.1.1.5. *Conchocarpus heterophyllus*

De *C. heterophyllus* (AMBROZIN et al., 2008) foram isoladas treze substâncias: três esteroides (β–sitosterol, estigmasterol) e benzoato de β–sitosterila**,** dois alcaloides a haplotusina e um do tipo quinolínico o 2-fenil-metil-4-quinolona, e ainda oito flavonas, dentre elas, cinco piranoflavonas (**figura 2.5**). As substâncias isoladas foram submetidas a testes contra *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de chagas.

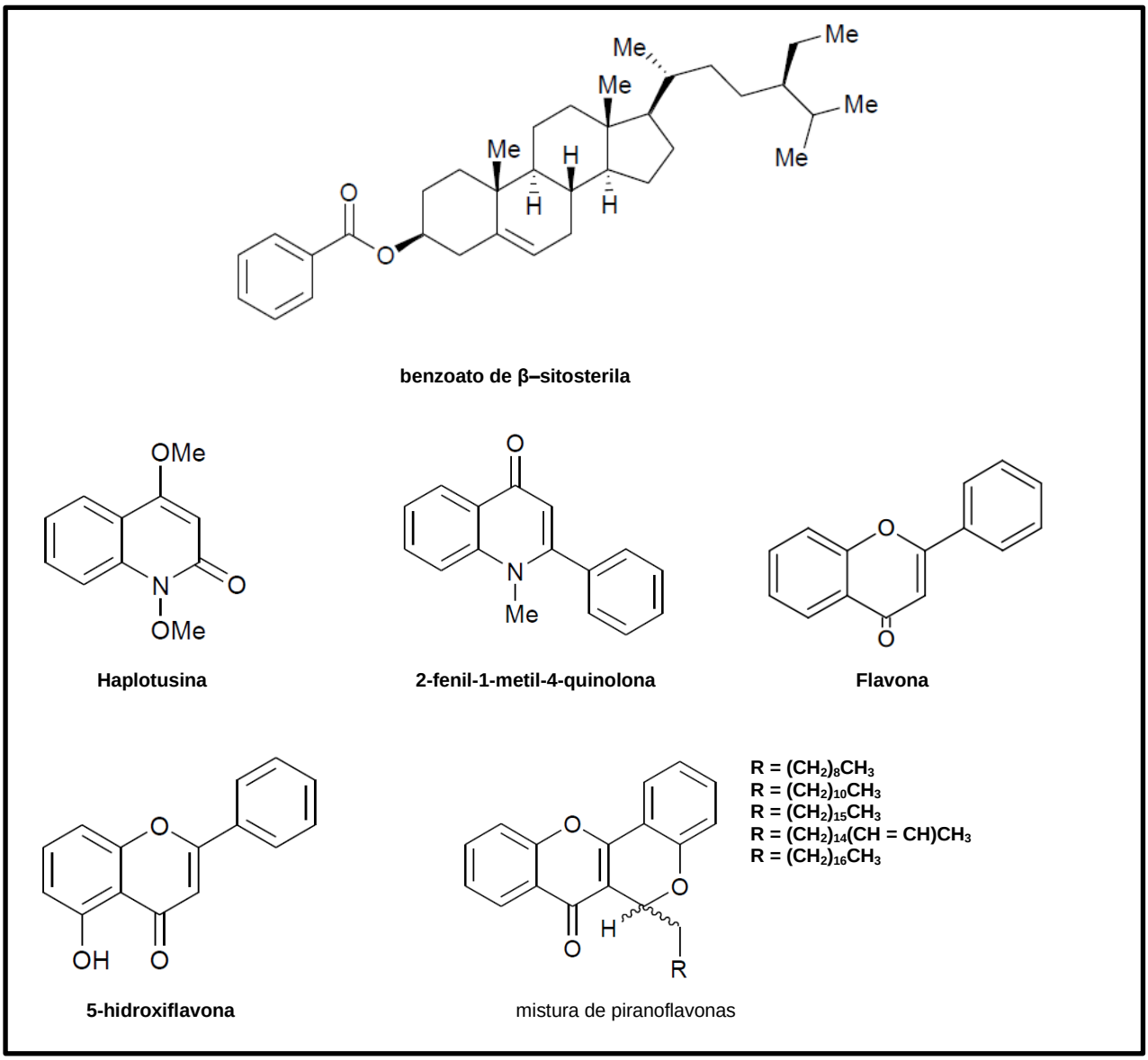


Figura 2.5. Estruturas de algumas substâncias isoladas de *C. heterophyllus.*

2.1.1.6. *Conchocarpus macrophyllus*

De *C. macrophyllus* (ALBARICI, 2006) foram isoladas quatro substâncias já descritas anteriormente em outras espécies da *Conchocarpus*, como a mistura de β-sitosterol e estigmasterol e dois alcaloides acridônicos (**figura 2.6**).

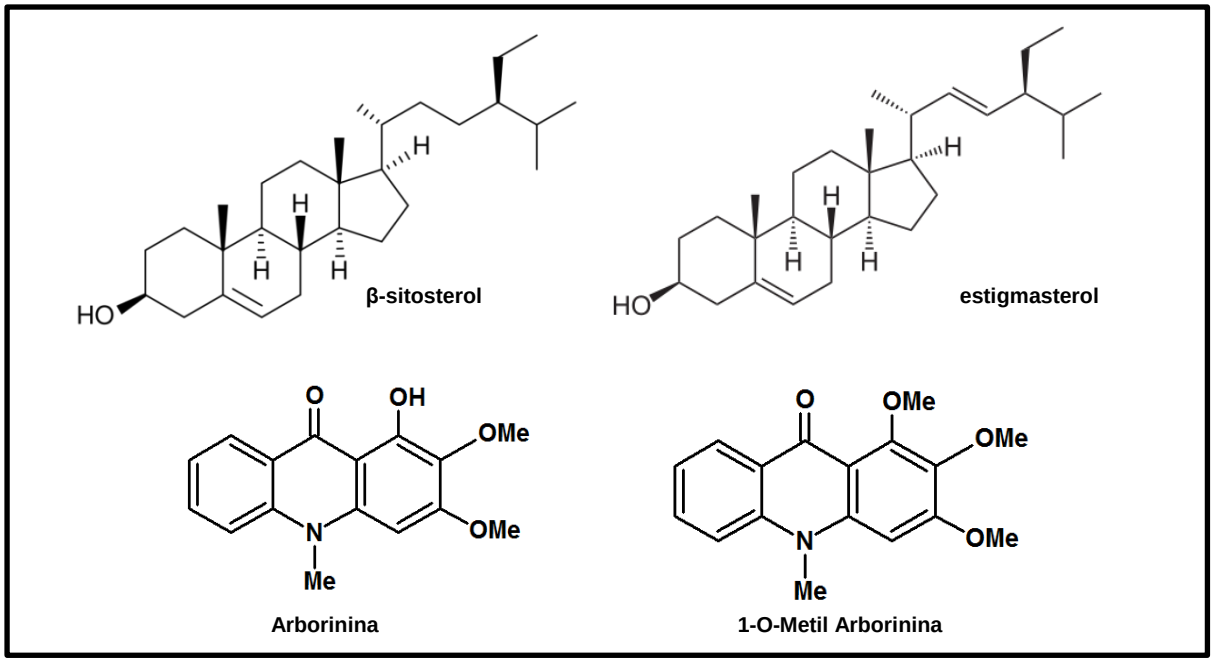


Figura 2.6. Estruturas das substâncias isoladas de *C. macrophyllus.*

2.1.1.7. *Conchocarpus macrocarpus*

De *C. macrocarpus* (VELOZO, 1995 apud OLIVEIRA , 2014b) foram isolados dois alcaloides do tipo indolquinazolínico, um já descrito em *C. gaudichaudianus* (CORTEZ et al., 2009) (**figura 2.7**).

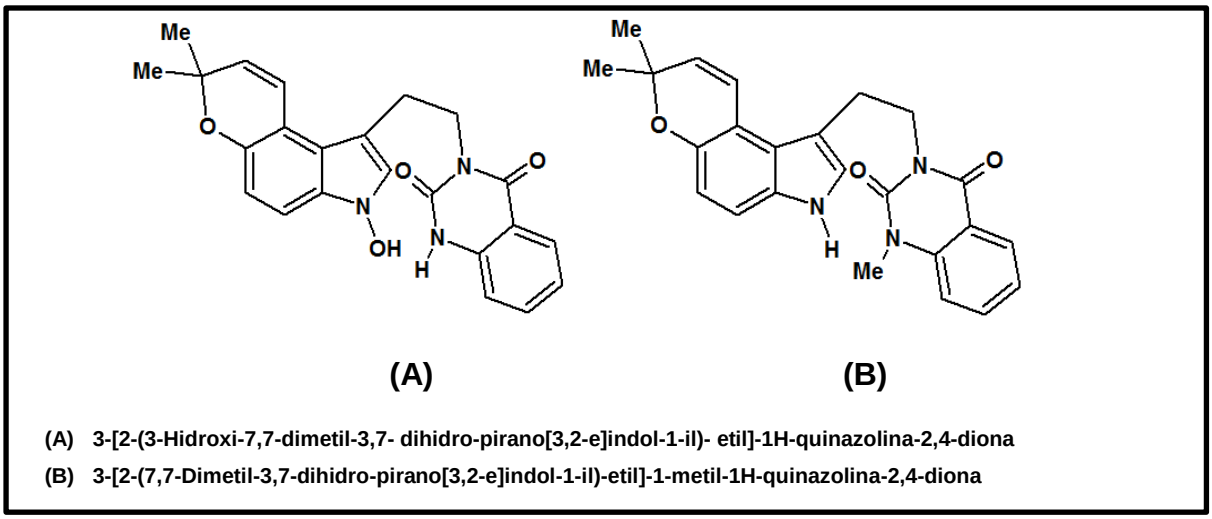


Figura 2.7. Estruturas das substâncias isoladas de *C. macrocarpus.*

2.1.1.8. *Conchocarpus cuneifolius*

De *C. cuneifolius* (VELOZO,1995 apud OLIVEIRA , 2014b) foram isoladas sete substâncias, entre elas quatro acetofenonas e três flavonoides glicosilados (**figura 2.8).**

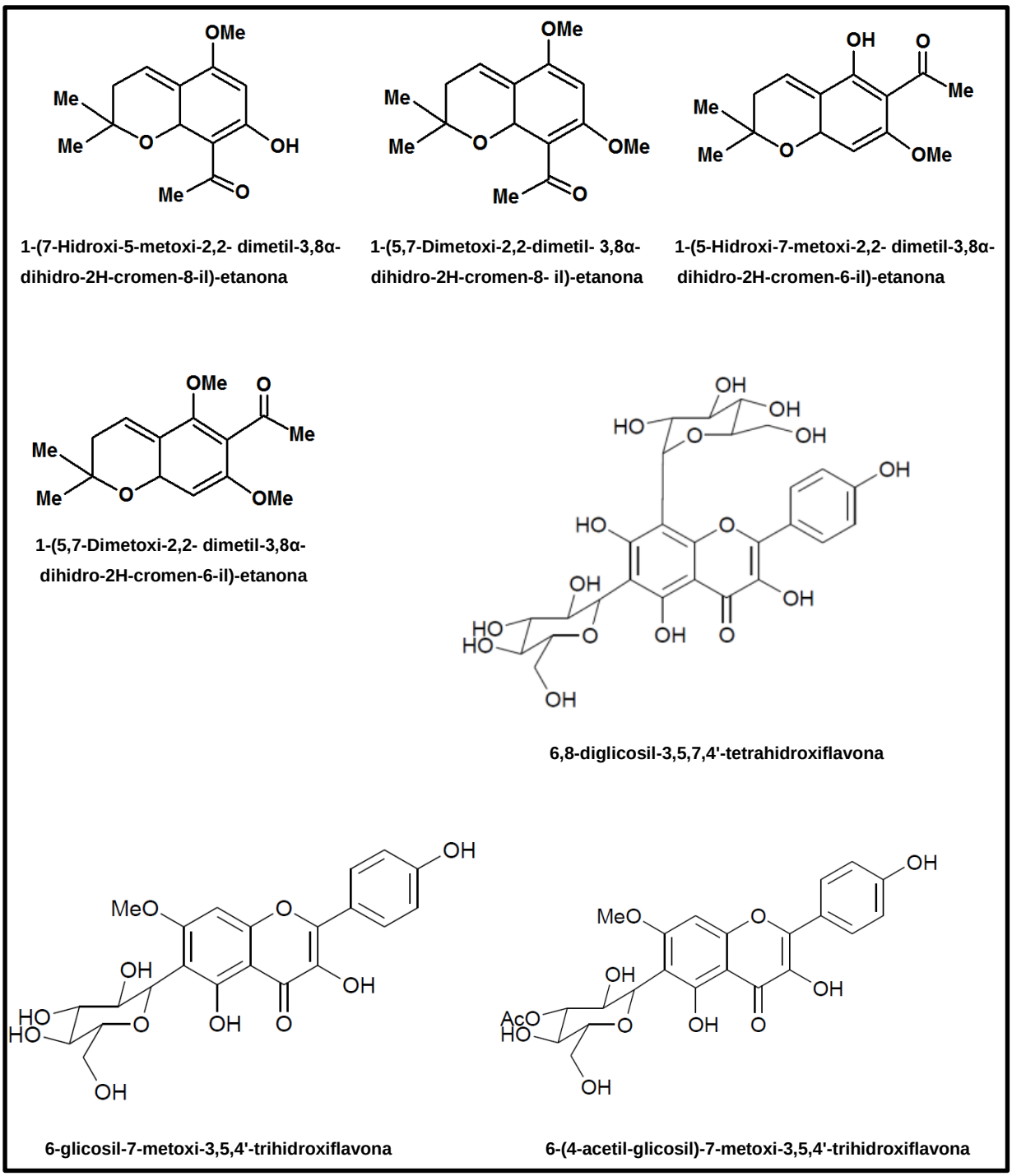


Figura 2.8. Estruturas das substâncias isoladas de *Conchocarpus cuneifolius.*

2.1.1.9. *Conchocarpus paniculatus*

De *C. paniculatus* (VIEIRA et al., 1992) anteriormente denominada *Angostura paniculata,* foram isolados alcaloides acridônicos (**figura 2.9**).

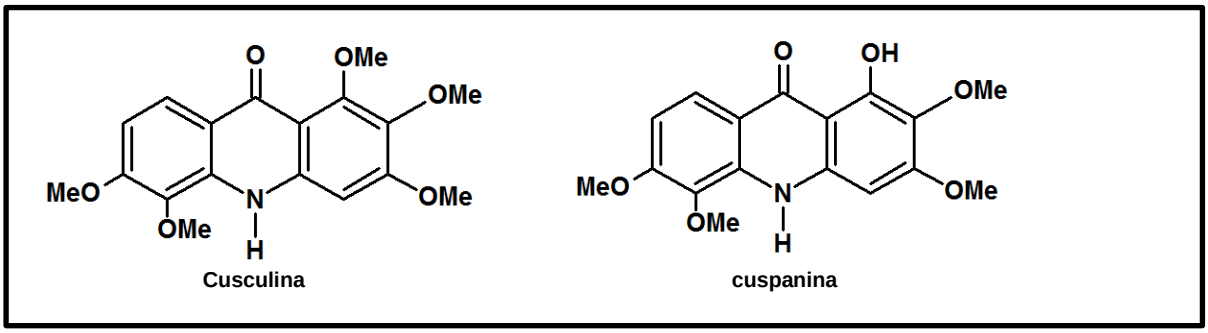


Figura 2.9. Estruturas das substâncias isoladas de *C. paniculatus.*

2.1.1.10. *Conchocarpus cyrtanthus*

De *C. cyrtanthus* (OLIVEIRA , 2014b), foram isoladas quinze substâncias: um alcaloide, anteriormente isolado de outras espécies desse gênero, três cumarinas, cinco esteroides (sitosterol, campesterol, entre outros), diterpenos e uma lignana (**figura 2.10**).

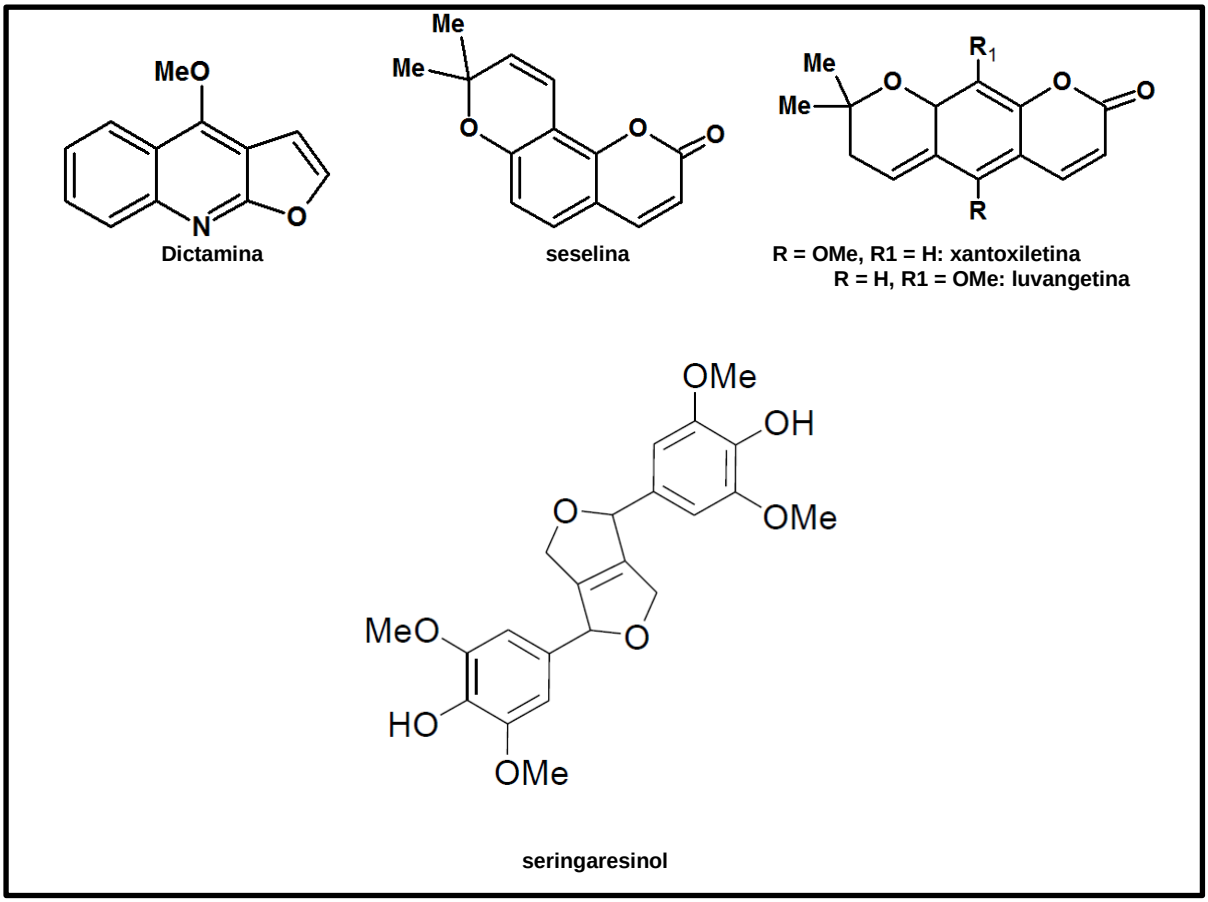


Figura 2.10. Estruturas de algumas substâncias isoladas de *C. cyrtanthus.*

2.1.1.11. *Conchocarpus longifolius*

De *Conchocarpus longifolius* (MAFEZOLI et al. 2001; FACCHINI, 2005 apud BELLETE, 2009) foram isoladas 18 substâncias, dentre elas, onze cumarinas **(figura 2.11)** e sete alcaloides.

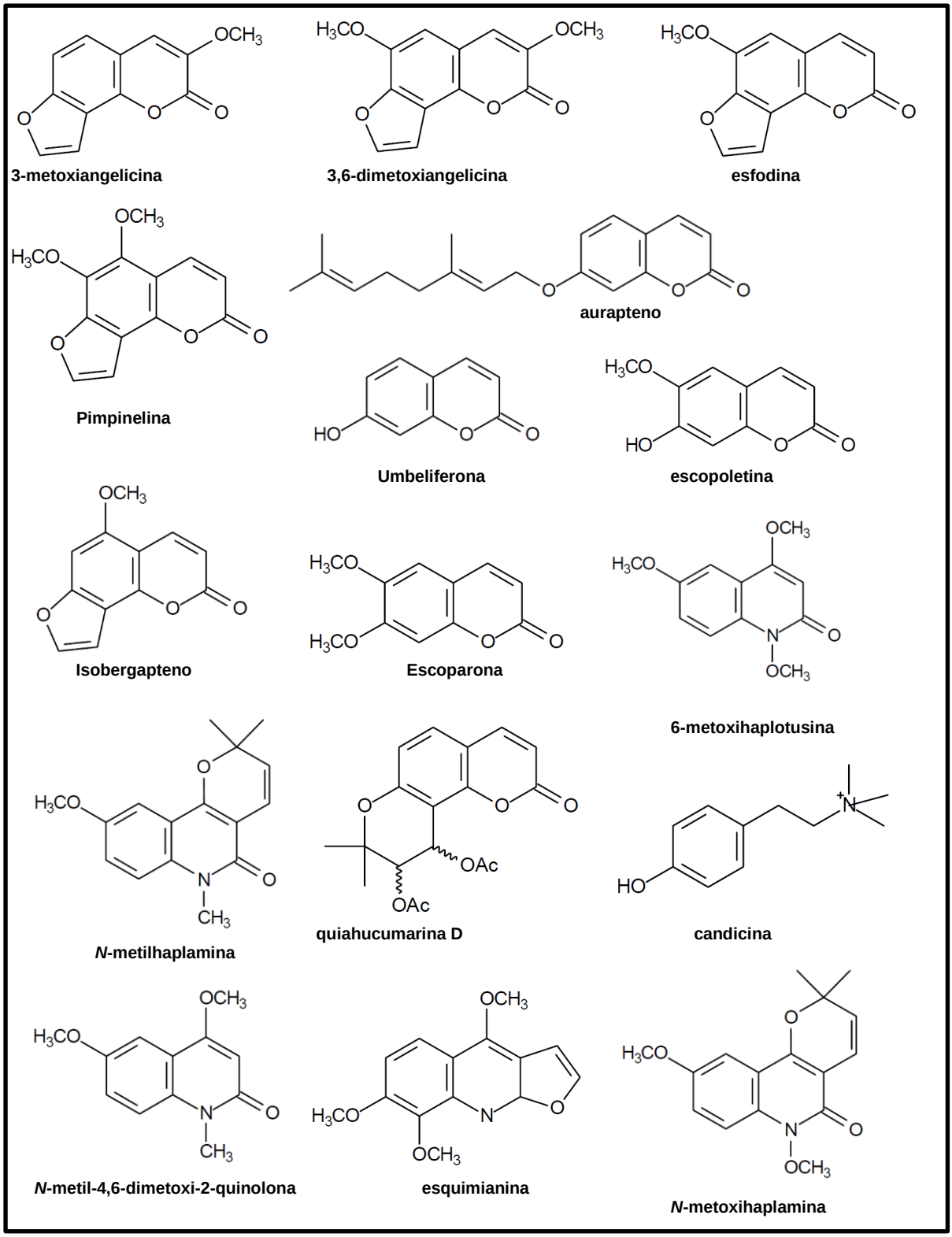


Figura 2.11. Estruturas de algumas substâncias isoladas de *C. longifolius.*

2.1.2. Metabólitos secundários presentes no gênero *Conchocarpus*

O gênero *Conchocarpus*, mesmo pouco estudado, tem sido conhecido por uma ampla diversidade de metabolito secundário, dos quais se destacam os alcaloides e cumarinas.

2.1.2.1. Alcaloides

Os alcaloides são substâncias orgânicas de caráter alcalino derivado do metabolismo secundário principalmente das plantas, mas deriva ainda de microrganismos, tais como fungos, bactérias e também de animais, contém um ou mais nitrogênio em sua estrutura. O nitrogênio é o elemento que determina seu caráter básico devido a um par de elétrons livres (KUTCHAN, 1995).

Dentre todos os metabólitos secundários os alcaloides são os que mais diferem em suas formas estruturais, diversidade de atividades biológicas, e ainda, são classificados quanto a sua origem biossintética. Constituem 20% de todas as substâncias naturais de uso terapêuticos descritos e estudados. Os principais aminoácidos envolvidos na síntese dos alcalóides são: triptofano, fenilalanina, ornitina, lisina e ácido antranílico (**figura 2.12A**), ácido chiquímico (**figura 2.12B**).

Figura 2.12. Estrutura de A) ácido antranílico e B) ácido chiquímico

No gênero *Conchocarpus* os alcaloides quinolínico e acridônico, derivados do ácido antranílico, são os que têm o maior destaque e suas estruturas aparecem em quase todos os trabalhos descritos na literatura sobre o gênero. De acordo com WATERMAN (1975), esses alcaloides são marcadores taxonômicos e quase restritos para a família Rutaceae **(figura 2.13)**.

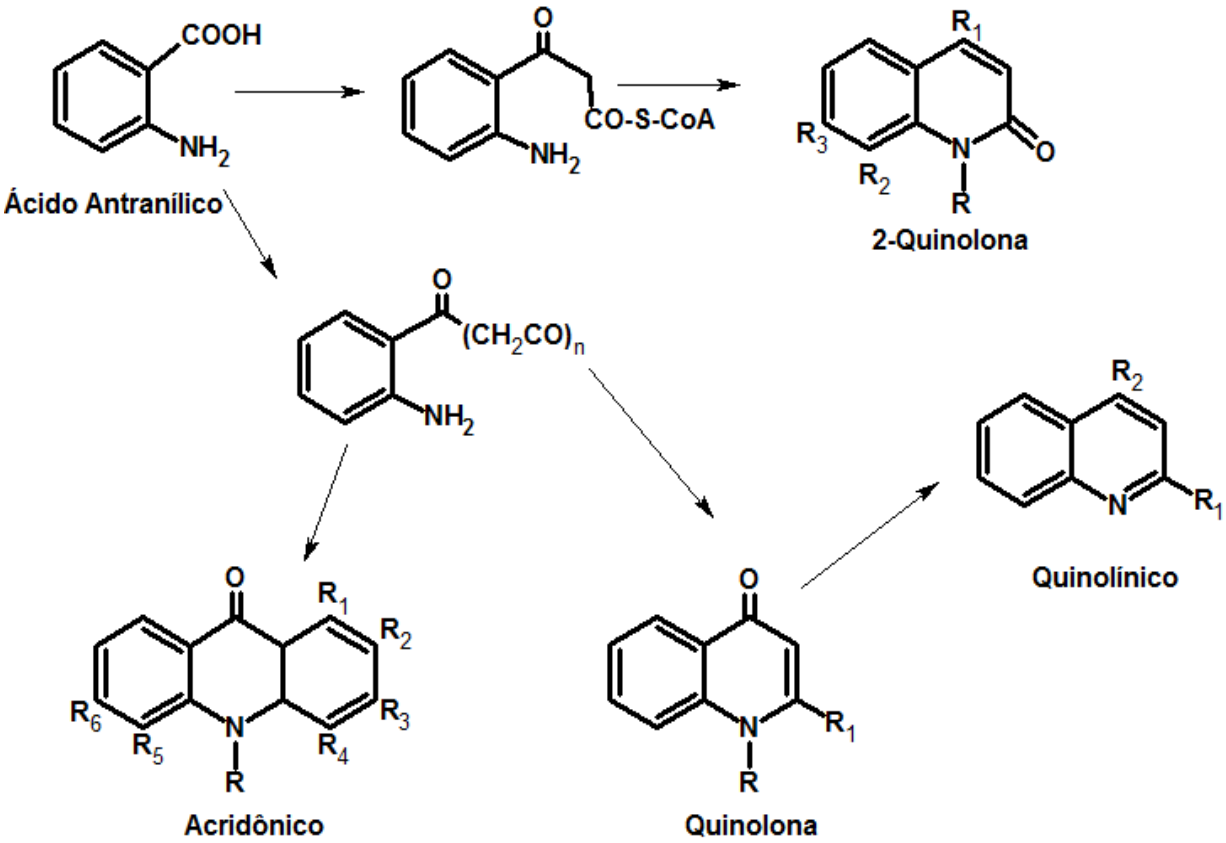


Figura 2.13. Alguns tipos de alcaloides de Rutaceae derivado do ácido antranílico.

Devido ao numero de alcaloides acridônicos identificado nesse trabalho, a **figura 2.14** mostra o esqueleto e o padrão de numeração destes, que serão utilizados ao longo da dissertação.

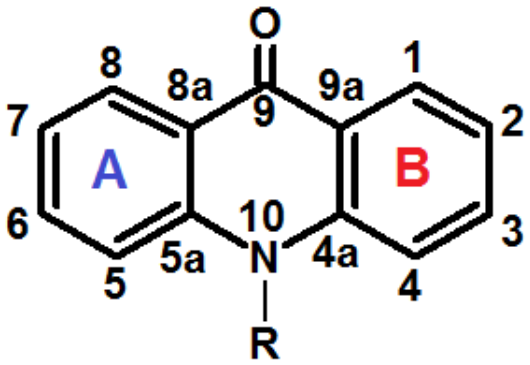


Figura 2.14. Esqueleto e numeração dos alcaloides acridônicos.

2.1.2.2. Cumarinas

O nome cumarinas é originário de “cumaru” nome popular de *Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae. É uma classe ampla em metabólitos secundários dos vegetais, ocorrendo em grande parte das famílias e tendo como estrutura básica a 1,2-benzopirona (**figura 2.15**) (LUCY, 2004).

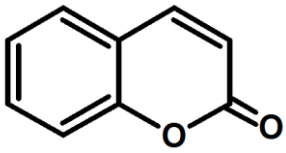
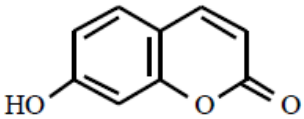
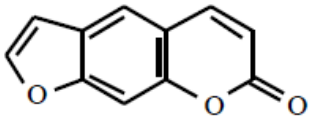
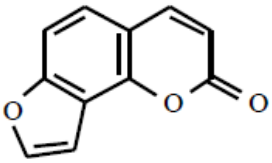
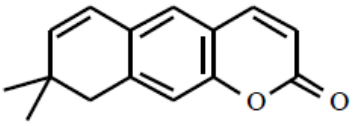
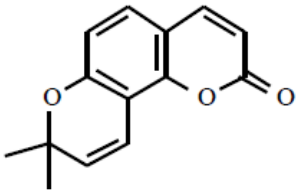
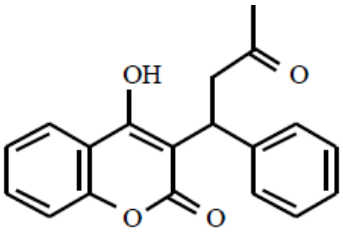


Figura 2.15. Esqueleto da 1,2-benzopirona.

Entre algumas de suas estruturas se destacam no gênero *Conchocarpus* a marmesina e a escopoletina (**figura 2.2)** que aparecem em mais de um trabalho. As cumarinas são subdivididas em quatro grupos (JAIN, 2012): as cumarinas simples, as furanocumarinas, as piranocumarinas e as cumarinas com anel pirona substituído **(tabela 2.1).**

Tabela 2.1. As principais classes de cumarinas encontradas em *Conchocarpus*

Classificação	Características	Exemplos
Cumarina simples	Hidroxilado, alcoxilado ou alquilado no anel benzeno	
Furanocumarina	Anel furânico ligado ao anel benzênico. Linear ou Angular	 **linear**  **angular**

Piranocumarina	Anel pirano ligado a anel benzênico. Linear ou Angular	 **linear**  **angular**
Cumarina pirona-substituída	Substituição no anel pirona, muitas vezes na posição 3C ou 4C	

2.1.3. *Conchocarpus mastigophorus*

C. mastigophorus (**figura 2.16**) é uma espécie nativa e endêmica do Brasil que possui estrutura de arbusto de cerca de 3 m de altura, folhas simples, coriáceas, alternas e verdes, suas flores são brancas e brácteas verdes, com relatos de ocorrência apenas no estado da Bahia, distribuídas nos municípios de Uruçuca e Itamari em Floresta Ombrófila da Mata Atlântica (PIRANI, 2015).

Após a realização da pesquisa bibliográfica para verificar algum relato sobre o estudo dessa planta, observou-se que ainda não existem trabalhos disponíveis na literatura sobre essa espécie, tanto no que se refere à constituição química, quanto a atividades biológicas, o que torna o presente trabalho de grande relevância, para ampliação do conhecimento da fitoquímica e potencial farmacológico de plantas da família Rutaceae.

Figura 2.16. Folhas, frutos, caule e espécime da *C. mastigophorus.*

2.2. Produtos naturais e agentes antibacteriano

Atualmente, as doenças infecciosas estão entre as que mais matam no Brasil e no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) essa enfermidade é responsável por um terço dessas mortes, especialmente, nos países em desenvolvimento, devido a ocorrência de micro-organismos resistentes e dificuldade de acesso a medicamentos mais eficientes (GUIDO, 2010).

A hanseníase, doença conhecida também na Bíblia como “lepra”, é uma doença infectocontagiosa que se manifesta por lesões cutâneas. É causada por uma bactéria chamada *Mycobacterium leprae*, agente causador da doença de Hansen, cujo nome se deve ao fato de ter sido identificada pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, em 1873. Essa é uma das mais antigas doenças infectocontagiosas que se tem conhecimento (EIDT, 2004).

As grandes epidemias que assolaram a humanidade têm como grandes causadores os micro-organismos, como por exemplo, a peste negra entre 1333 a 1351, que devastou a Europa e a Ásia, causada pela bactéria *Yersinia pestis*. Entre 1817 e 1824 foi a cólera originada pela bactéria *Vidrio cholerae*. Entre

1850 e 1950, a tuberculose provocada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, ou bacilo de Koch, que dizimou um bilhão de pessoas, e ainda hoje em países em desenvolvimento é a maior doença infecciosa que leva a morte. A varíola (*Orthopoxvírus variolae*) que atormentou as civilizações e que matou grandes reis como Faraó Ramsés II, Luís XV e a rainha Maria II. A gripe espanhola, causada pelo vírus influenza, que resultou como saldo de 20 milhões de mortes em apenas um ano, entre 1918 a 1919. O tifo, de bactérias do gênero *Rickettsia* (1918-1922) provocou a morte de três milhões de pessoas, e a febre amarela na Etiópia, que ocasionou a morte de pelo menos 20 mil, entre 1960 a 1962. O sarampo pelo vírus *morbillivirus,* que até 1963, a estimativa é que matava 6 milhões por ano, a malária que tem como causador o protozoário do gênero *Plasmodium* e a AIDS doença causada pelo vírus HIV, identificada em 1981 (BARATA, 2000; KRITSKI, 2007; GOMES et al., 2001; WALDMAN et al., 1999).

Foi em meados do século XIX que o primeiro cientista identificou micro-organismos causadores de diversas doenças como a cólera e a tuberculose, um dos cientistas foi Robert Koch, um grande passo na busca por medicamentos especializados no combate dessas enfermidades, que aflorou em pesquisas com agentes químicos que revelasse atividade antibiótica (GUIMARÃES, 2010).

Toda devastação causada por doenças que durante séculos assolaram nações tiveram seus dias contados com a descoberta acidental em 1928 por Alexander Fleming do primeiro antibiótico, a penicilina, produzida por um fungo identificado como *Penicillium notatum*, que desencadeou inúmeras pesquisas e busca por novos antibióticos, que possibilitou expressivamente a diminuição de mortes ocasionadas por doenças infecciosas (CALIXTO, 2012).

As plantas medicinais com uso antibacteriano ou antifúngico já fazem parte das tradições de povos na utilização de folhas, caules e raízes, que hoje já tem sua eficiência comprovada através de estudos recentes dos metabólitos secundários dessas plantas. Uma vez conhecendo a abundância de substâncias produzidas com propriedades antimicrobianas é plausível a busca por compostos capazes de compor novos antibióticos com maior potencialidade (DUARTE, 2006).

Nos dias de hoje o grande desafio da microbiologia é desenvolver antibióticos que combatam micro-organismos resistentes aos antimicrobianos

disponíveis, fato que demonstra a necessidade de descoberta de novas substâncias com propriedades antimicrobianas (PEREIRA et al., 2004).

A resistência antimicrobiana tem se tornado um problema cada vez mais sério, que afeta não apenas países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, mas todo o mundo (SANTOS, 2004). O estudo da resistência bacteriana, segundo ANTUNES et al. (2006), geralmente se baseia na observação de micro-organismos que tenham importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, entre outros.

De acordo com FUENTEFRIA et al. (2008), *Pseudomonas aeruginosa,* bactéria gram-negativa, é um dos principais micro-organismos recuperados de efluentes hospitalares. Essa bactéria é um patógeno nosocomial que promove infecções em diversas partes do corpo humano. A importância clínica da infecção por *P. aeruginosa* se deve principalmente à ocorrência de múltipla resistência a antibacterianos, resultando em grande dificuldade na erradicação da doença. Frequentemente, apresenta um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, tais como cefalosporinas de terceira e quarta gerações, carbapenêmicos e aminoglicosídeos (FUENTEFRIA et al., 2008; NEVES et al., 2011).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo gram-positivo caracterizada por ser um dos maiores responsáveis pelas mortes por infecção hospitalar, principalmente no período dos anos 80 e 90, onde houve um aumento do número de doenças infecciosas causadas pelas cepas de *S. aureus* multirresistentes (FRANÇA et al., 2009). Frequentemente, é encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Todavia, pode provocar infecções simples, tais como espinhas, furúnculos e celulites, ou até infecções mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e outras (SANTOS et al., 2007).

A vancomicina, antibiótico da classe dos glicopeptídios, é o medicamento de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos, entretanto, já não se mostra tão efetivo, devido a ocorrência de cepas resistentes a este antibiótico, que no Brasil, surgiram desde o ano 2000. Esses dados indicam a necessidade urgente, já reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), da

descoberta de novos antibióticos para o tratamento das cepas multirresistentes de *S. aureus* (FRANÇA et al., 2009; SANTOS et al., 2007).

Algumas espécies vegetais sintetizam como metabólitos secundários, substâncias de defesa contra predadores: micro-organismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (ALVES, 2001; DEWICK, 2002). Estes compostos despertam grande interesse pelas atividades biológicas produzidas em resposta ao meio ambiente e efeitos fisiológicos que exercem nos animais (ALVES, 2001; ROBBERS et al., 1998). São produtos quimicamente variados, sendo de particular interesse os terpenoides, alcaloides e cumarinas, por apresentarem ação antimicrobiana com grande frequência (HAIDA et al., 2007).

Muitos estudos têm sido realizados com espécies da família Rutaceae, amplamente distribuída na região do semiárido baiano, com biogênese razoavelmente definida e com diversidade de micromoléculas já descritas. GIBBS (1974) afirma que a família é muito bem caracterizada pela variedade de alcaloides e cumarinas que apresentam potencial atividade microbiológica (SILVA, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar o estudo químico de extratos do caule de *Conchocarpus mastigophorus* e avaliar a atividade antibacteriana destes extratos, bem como de seus constituintes químicos isolados.

3.2. Específicos

1. Avaliar o potencial antibacteriano dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico da casca e do caule de *Conchocarpus mastigophorus;*
2. Isolar substâncias do extrato acetato de etila do caule de *C. mastigophorus* através de técnicas cromatográficas;
3. Identificar as substâncias isoladas do extrato acetato de etila do caule de *C. mastigophorus* utilizando-se das técnicas espectroscópicas (RMN ^{1}H e RMN ^{13}C 1D e 2D (HMQC e HSQC)), e espectrométricas (EM);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki

O material vegetal (galhos e folhas) foi coletado no dia 18 de fevereiro de 2014 de espécime de *C. mastigophorus*, na Fazenda Alto da Caixa D'Água (S13°71'804" W039°62'815"), em um pequeno fragmento de Floresta Ombrófila, localizada no município de Itamari, Bahia, Brasil **(figuras 4.1** e **4.2)**. Este material foi identificado pela professora Dra. Guadalupe Edilma de Licona Macedo, com confirmação posterior de um especialista da família Rutaceae, o professor Dr. José Rubens Pirani – USP. Uma exsicata (**figura 4.3**) foi depositada no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, com o registro HUESB 9559.

Figura 4.1. Foto cidade de Itamari, município em que foi realizada a coleta (Fonte: Google maps. 2015 – Foto: Nelson Ribeiro).

Figura 4.2. Vista aérea do local da coleta, indicado pela seta (Fonte: Google Earth 2015).

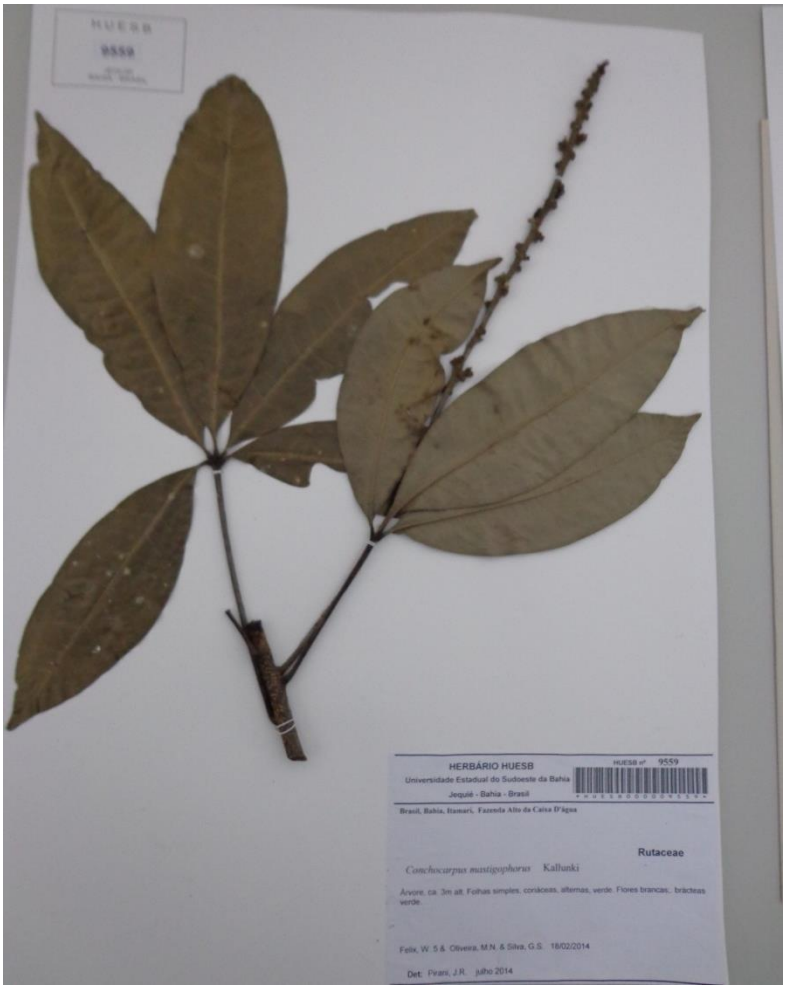


Figura 4.3. Exsicata de *Conchocarpus mastigophorus* depositada no HUESB.

O material coletado (folhas, caule e casca), após limpo e separado, foi pesado (**tabela 4.1**) e secado em uma estufa com circulação de ar, por 48 horas, à uma temperatura de 40 ^{o}C. Por fim, este material foi triturado em liquidificador industrial e, pesado, para posterior preparo dos extratos (**figura 4.1**).

4.2. Preparo dos extratos

4.2.1. Preparo do extrato hexânico do caule (EHCL)

O caule seco e triturado de *C. mastigophorus* foi colocado em um recipiente de vidro contendo hexano P.A., durante quatro dias, para obtenção do extrato por maceração. Após este período, procedeu-se uma filtração e o filtrado resultante foi concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a aproximadamente 40 ^{o}C. O resíduo retido nesta filtração foi submetido a outras duas extrações sucessivas, pelo mesmo período de tempo. Os filtrados foram agrupados em um único recipiente e foram mantidos em capela de exaustão até evaporação completa do solvente residual, ou seja, até não se observar variação da massa do extrato.

4.2.2. Preparo do extrato acetato de etila do caule (EACL)

Para obtenção do extrato em AcOEt, o resíduo obtido ao final da 3ª extração com hexano, foi submetido a extração com AcOEt P.A., pelo mesmo procedimento descrito no item 4.2.2.

4.2.3. Preparo do extrato metanólico do caule (EMCL)

Para obtenção do extrato metanólico, o resíduo obtido ao final da 3ª extração com AcOEt, foi submetido a extração com metanol P.A., pelo mesmo procedimento descrito no item 4.2.2.

4.2.4. Preparo dos extratos hexânico, AcOEt e Metanólico da casca

Os procedimentos utilizados para preparo dos extratos da casca foram realizados com a mesma metodologia da extração do caule, e pode ser resumido na **figura 4.4**. E os valores das massas finais dos extratos brutos, para ambos, podem ser observados na **tabela 4.1**.

Tabela 4.1. Valores das massas do material vegetal e rendimento dos extratos

Material	Massa	EH	EA	EM
Caule	**2.195 g**	6,199 g	6,700 g	6,300 g
Casca	**535,7 g**	1,552 g	4,124 g	5,850g

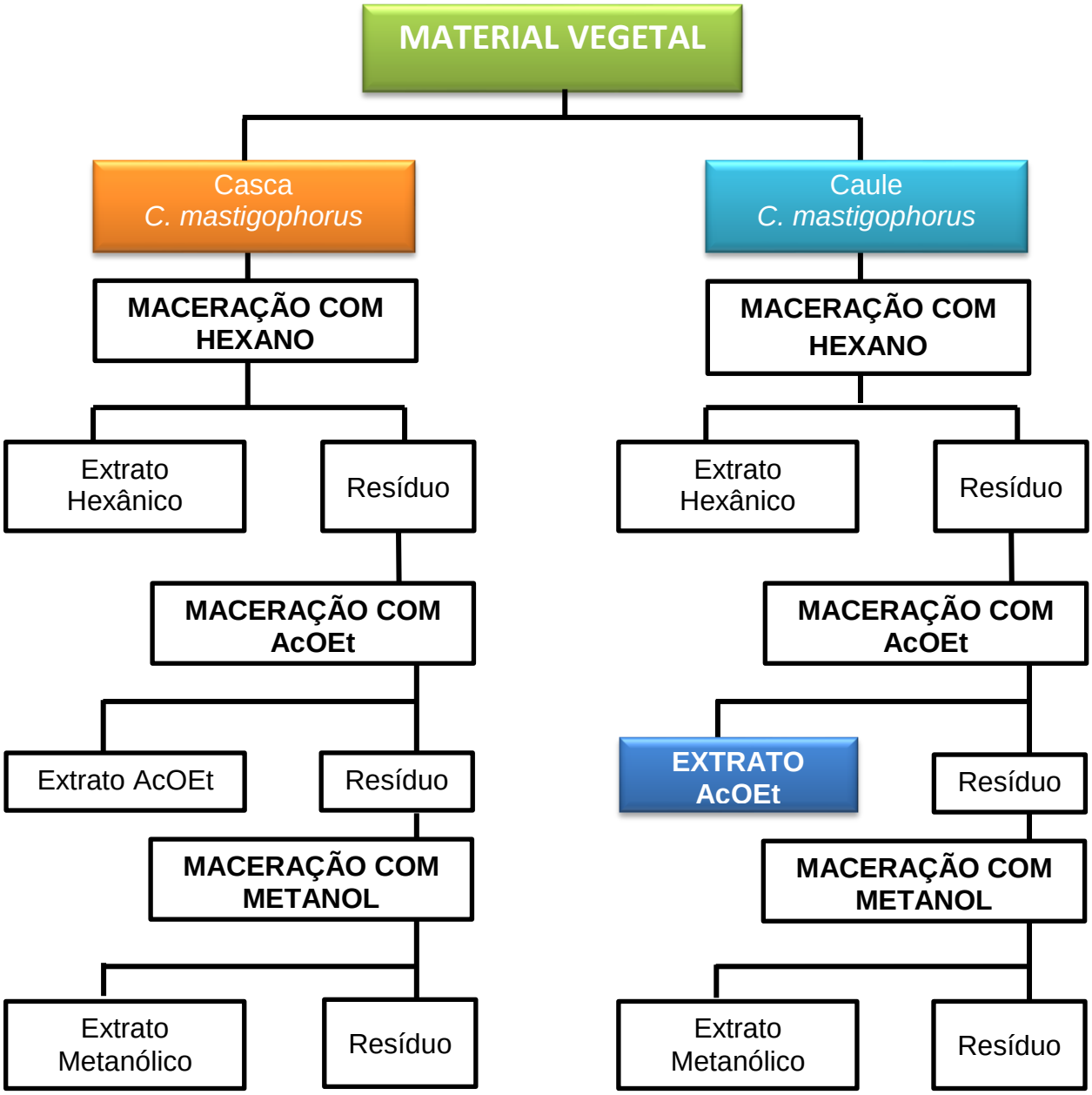


Figura 4.4. Preparo dos extratos hexânico, AcOEt, metanólico para o caule e casca.

Após preparo do material vegetal e análises por CCD destes, o extrato acetato de etila do caule foi selecionado para estudo fitoquímico e desenvolvimento desse trabalho.

4.3. Equipamentos e reagentes utilizados no estudo fitoquímicos

O material vegetal foi moído em liquidificador industrial de marca siemsen.

O material vegetal foi secado em estufa com circulação de ar da marca Tecnal (modelo TE-394/2).

Material com massa superior a 200 g foi pesado em balança semianalítica da marca Gehaka 2000, e material com massa inferior a esse valor foi pesado em balança analítica de marca Shimadzu AUY220.

Foram utilizados solventes PA das marcas Química Moderna, Anidrol, Vetec e Quimex para o preparo dos extratos, analises por CCD e fase móvel nas separações por CC.

As placas de vidro para realização de CCD foram recobertas por sílica gel 60G- F254 da Vetec.

As placas de CCD analítica, foram ativadas, por duas horas na estufa à temperatura de 100 ^{o}C.

As placas de CCD foram reveladas em radiação UV nos comprimentos de ondas 254 e 365 nm e ainda com vapor de iodo.

Os extratos e as frações recolhidas do processo de CC passaram por processo de rotaevaporação, com pressão reduzida, evaporador de marca Fisatom.

As sílicas de marcas Vetec gel 60 (0,063 – 0,200 mm) e para cromatografia Flash da Sigma-Aldrich (40 – 60 µm) foram utilizadas como fase estacionária nos processos de separação em coluna (CC).

As temperaturas de fusão (Tf) foram obtidas através do aparelho de ponto de fusão modelo MQAPF-302 da Microquímica.

O processo de análises de massas através do CG-EM foram realizadas em aparelho da Shimadzu modelo QP2010 SE. As condições de análise por CG-EM foram: temperaturas do injetor e da interface, 290 ^{o}C, temperatura inicial da coluna 100 ^{o}C, durante 1 min., sendo aumentada 5 ^{o}C min^{-1}, até atingir 285 ^{o}C; fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,8 mL min^{-1}.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{1}H e ^{13}C, HMBC, HSQC e NOESY a 500 MHz, para análises das estruturas foram obtidos na Universidade Federal da Bahia em aparelho Varian Inova 500. E os espectros a 300 MHz foram obtidos na Universidade Federal de Viçosa, marca Varian Mercury 300.

4.4. Análises cromatográficas dos extratos

4.4.1. Análise cromatográfica do extrato AcOEt do caule (ACLCM)

O extrato ACLCM (6,7 g) foi previamente analisado por CCD para se obter o melhor padrão de fracionamento e ainda identificar os pontos de separação de substâncias. Da massa inicial separou-se 700 mg para ensaios de atividade antibacteriana, e o restante (6,0 g) do extrato foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica.

Logo após a escolha da melhor condição de se iniciar o fracionamento do ACLCM, ele foi submetido a cromatografia em coluna, usando como fase estacionaria a sílica gel 60, e como eluente inicial hexano puro. No decorrer da eluição, a polaridade foi aumentada gradualmente com adição de acetato de etila resultando em misturas de hexano/acetato de 100:0 até 0:100. Em seguida, foram utilizadas misturas de AcOEt/MeOH, variando na proporção de 100:0 até 0:100. Deste fracionamento obteve-se 41 frações, com uma variedade de coloração (**figura 4.5**), que após analisadas por CCD foram agrupadas em 23 grupos de frações (**tabela 4.2**).

Figura 4.5. Frações da coluna cromatográfica do extrato acetato de etila do caule.

Tabela 4.2. Frações obtidas do extrato ACLCM por cromatografia em coluna.

Fração	código do grupo	massa (mg)	código da amostra	substância
1 – 3	ACLCM01/03	3,0		
4	ACLCM04	730,5		
5	ACLCM05	125,3		
6	ACLCM06	181,9		
7 – 8	ACLCM07/08	79,9		
9	ACLCM09	49,8		
10	ACLCM10	41		
11	ACLCM11	77		
12	ACLCM12	157	CM3	**03**
13	ACLCM13	202		
14	ACLCM14	249	CM2	**02**
15	ACLCM15	371,5		
16	ACLCM16	227	CM1	**01**
17 – 18	ACLCM17/18	164		
19 – 20	ACLCM19/20	102		
21 – 22	ACLCM21/22	183		
23	ACLCM23	122,3		
24	ACLCM24	36		
25 – 29	ACLCM25	390	CM4 a CM6	
30 – 34	ACLCM26	160,1		
35	ACLCM27	17,6		
36 – 38	ACLCM28	188,7		
39 – 41	ACLCM29	1.085		
Total		**4.944**		

Os grupos ACLCM 12, 14 e 16 foram submetidos à purificação por solubilização parcial com os solventes hexano, diclorometano e acetona, sucessivamente, até obtenção das substâncias **1** (16 mg), **2** (22 mg) e **3** (33 mg), respectivamente. A fração ACLCM25 foi submetida a um novo fracionamento por CC de sílica gel com gradiente crescente de polaridade hexano/AcOEt 100:0 até 0:100,

alterando a polaridade com AcOEt/MeOH, 100:0 até 0:100. Deste fracionamento obteve-se 21 frações que, após análise por CCD, foram reunidas em 10 grupos (**tabela 4.3**).

Tabela 4.3. Fracionamento da fração ACLCM 25

Fração	Código	massa (mg)	código	Substância
1 – 3	ACLCM25.1	36		
4 – 6	ACLCM25.2	27	CM4	**04, 05**
7	ACLCM25.3	8,5		
8	ACLCM25.4	8		
9 – 12	ACLCM25.5	26,5	CM5	**06, 07**
13 – 14	ACLCM25.6	38		
15	ACLCM25.7	19		
16	ACLCM25.8	6		
17 - 18	ACLCM25.9	7,5	CM6	**08, 09**
19 - 21	ACLCM25.10	25		
Total		**201,5**		

Da fração ACLCM25.2, denominada CM4, foram identificadas as substâncias **4** e **5**; de ACLCM25.5, codificada como CM5, foram identificadas as substâncias **6** e **7**; e de ACLCM25.9 (CM6) as substâncias **8** e **9**.

A **figura 4.6** resume o procedimento descrito para o fracionamento do extrato em acetato de etila do caule de *C. mastigophorus* e de suas frações.

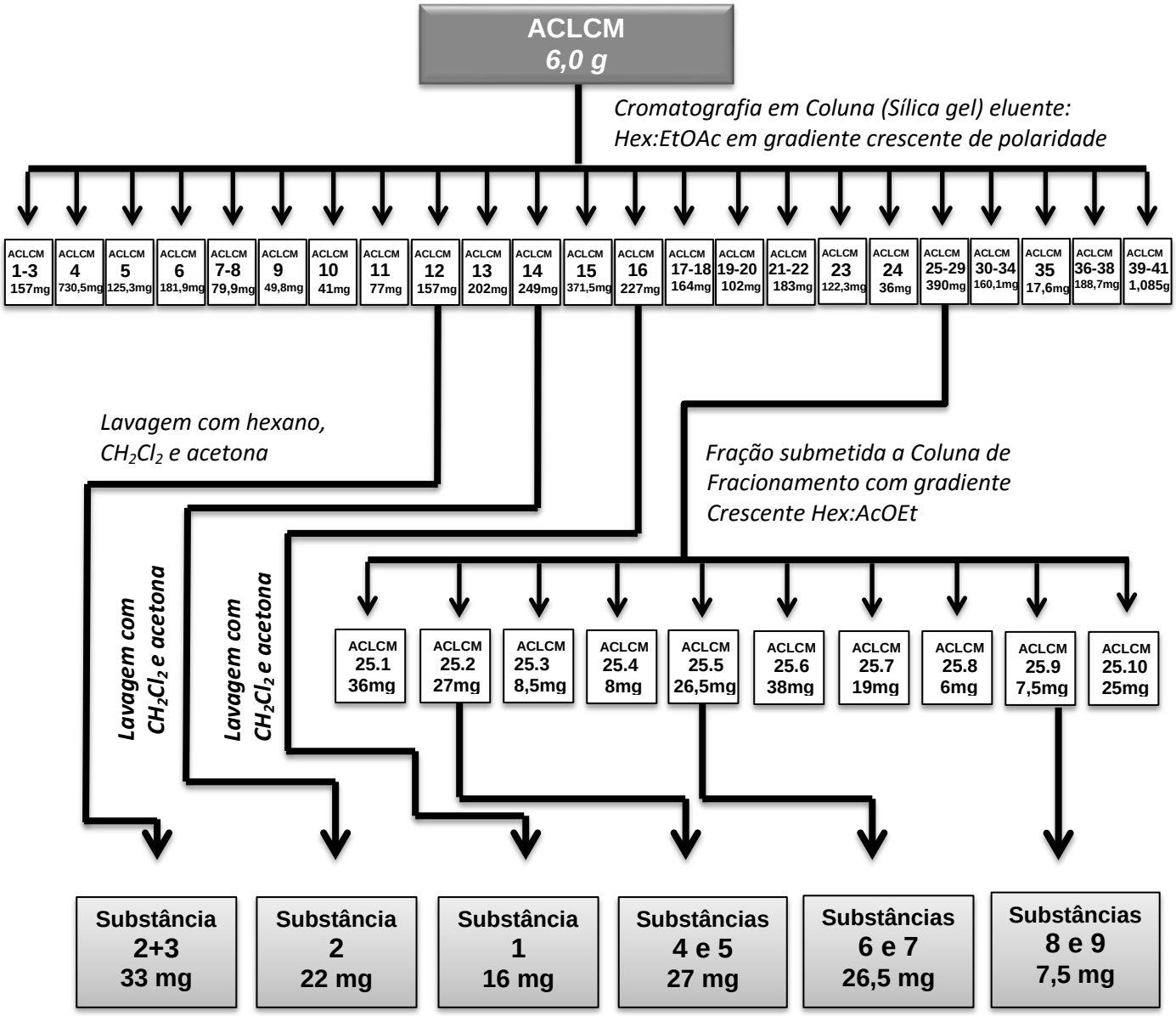


Figura 4.6. Fracionamento do extrato acetato de etila do caule de *C. mastigophorus*, para isolamento de alguns de seus constituintes químicos.

4.5. Materiais e equipamentos utilizados para o ensaio antibacteriano

A atividade antibacteriana foi testada com cepas de *Staphylococcus aureus* de origem hospitalar.

O caldo nutriente utilizado para o crescimento bacteriano foi o Difco Mueller Hilton Broht.

O meio de cultura para o antibiograma foi preparado com Agar Müeller-Hinton.

O solvente utilizado para dissolução das substâncias e extrato foi o Etanol da marca Vetec;

A substância utilizada como controle positivo foi a tetraciclina, antibiótico obtido de origem comercial.

As alíquotas das amostras foram retiradas com micropipeta 0,5 - 10 µL da Digipet.

A estufa utilizada para incubação foi uma estufa incubadora da Quimis, modelo Q315M23.

As amostras foram aplicadas em discos estéreis com diâmetro de 6 mm feitos de papel filtro;

As placas de petri utilizadas para crescimento da cultura bacteriana tinham uma proporção de 90 X 15 mm.

4.6. Metodologia na avaliação preliminar da atividade antibacteriana

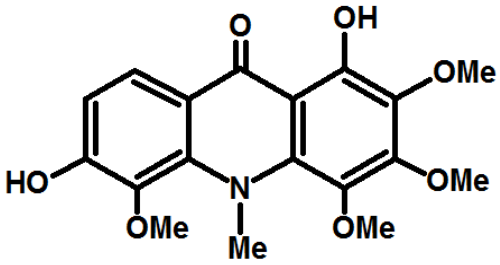
A atividade antibacteriana dos extratos e substâncias isoladas de *C. mastigophorus* foi testada frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As bactérias foram incubadas em caldo nutriente (Difco Mueller Hilton Broht) a 37 °C por 24 h para expansão. Em seguida, as suspensões bacterianas foram diluídas em salina estéril até 0,1 e absorbância em 625 nm (STEMPLIUK, 2006). As suspensões foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton de acordo com o método descrito por BAUER et al. (1966). Em seguida, os discos foram impregnados com 1 mg dos extratos bruto de *Conchocarpus Mastigophorus* e 0,1 mg das substâncias isoladas do extrato ACLCM. Posteriormente, os discos foram adicionados sobre o semeado bacteriano e incubados a 37 °C por 24 h. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em milímetros (mm). Os antibióticos ceftriaxona (30 µg/disco) e tetraciclina (30 µg/disco) foram utilizados como controle positivo para as bactérias gram-negativa e gram-positiva, respectivamente. Etanol foi utilizado como controle negativo.

Dentre os extratos que foram submetidos aos ensaios antibacterianos, para esse trabalho apenas ACLCM e as substâncias isoladas desse extrato serão descritos e discutidos, devido a grade variedade de substâncias observadas através de técnicas cromatográficas preliminares, como por exemplo, a análise da CCD.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

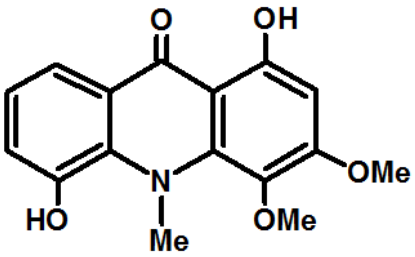
5.1. Elucidação das estruturas das substâncias isoladas de *C. mastigophorus*

O estudo fitoquímico do caule de *C. mastigophorus* possibilitou o isolamento de 09 metabólitos secundários, sendo cindo alcaloides do tipo acridônico (**1-5**) um quinolínico (**6**) e dois quinolônicos (**8-9**), além de uma cumarina (**7**).



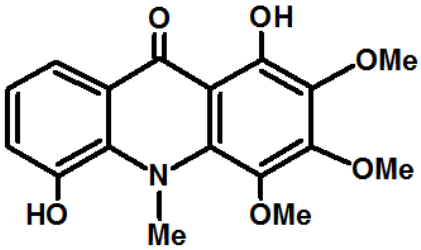
(1)

1,6-dihidroxi-2,3,4,5-tetrametoxi-*N*-metilacridona - glifolina *(glyfoline)*



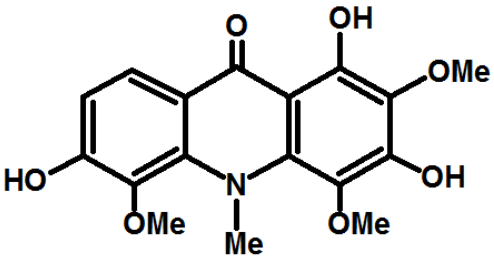
(2)

1,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-*N*-metilacridona – citrusinina I (*citrusinine* I)



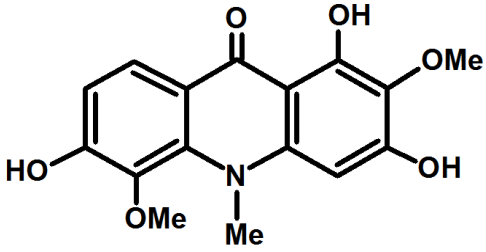
(3)

1,5-dihidroxi-2,3,4-trimetoxi-*N*-metilacridona – citbrasina (*citbrasine*)



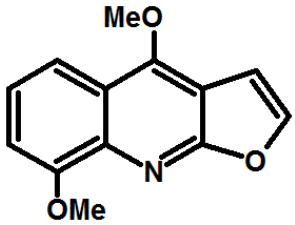
(4)

1,3,6-trihidroxi-2,4,5-trimetoxi-*N*-metilacridona – mastigoforina (*mastigophorine*)



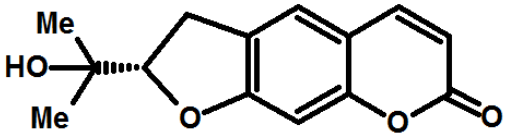
(5)

1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxi-*N*-metilacridona – citramina (*citramine*)



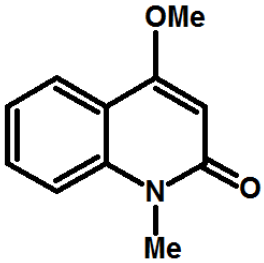
(6)

γ-Fagarina



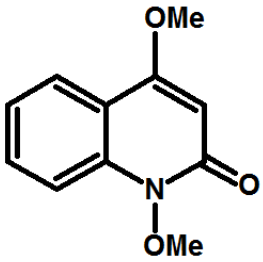
(7)

Marmesina



(8)

***N*-metil-4-metoxi-2-quinolona**



(9)

N-metoxi-4-metoxi-2-quinolona (haplotusina)

5.1.1. Determinação estrutural de CM1 (substância 1)

A fração CM1 foi analisada por CG-EM e o cromatograma (**figura 5.1A**) apresentou um pico principal com pureza relativa alta. O espectro de massas (**figura 5.1B**) da substância majoritária de CM1 mostrou o pico do íon molecular em *m/z* = 361 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{19}NO_7$, além de vários fragmentos com massas pares, indicando a presença de nitrogênio na molécula.

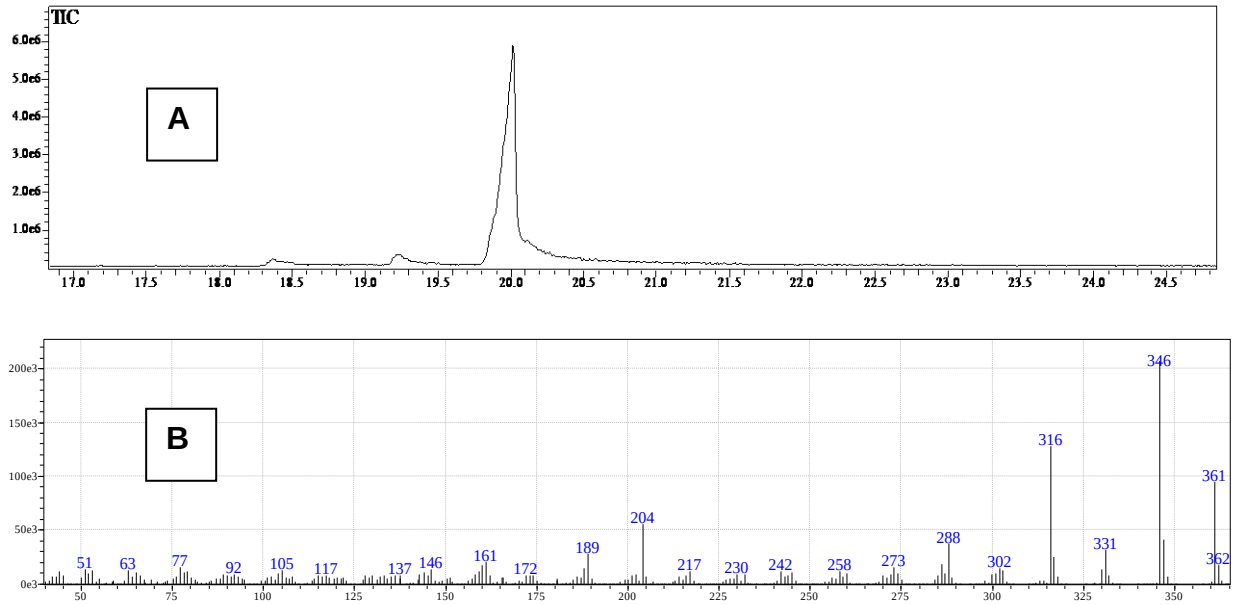
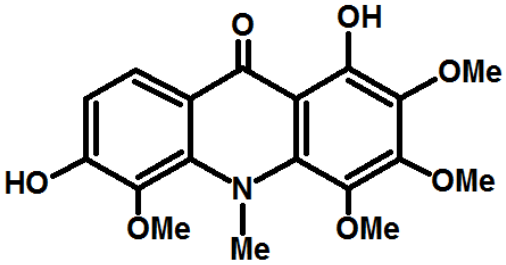


Figura 5.1. A) Cromatograma obtido para CM1 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **1**.

A substância **1** (16 mg) foi isolada da fração ACLCM 16 e foi obtida na forma de um sólido cristalino amarelo. Sua fórmula estrutural foi determinada por meio da análise detalhada dos dados de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C 1D e 2D (HMQC e HSQC), dos dados de EM (CG-EM), e também, por comparação com a literatura (FURUKAWA, 1983b; SU et al., 1992; WU et al., 1982), sendo identificada como o alcaloide acridônico tetrametoxilado, glifolina (**1**).



(1)

No espectro de RMN ^{1}H, obtido em $CDCl_3$ (**figura 5.2**) não foi observado o sinal característico do grupo OH na posição *peri* à carbonila. Entretanto, ao comparar os dados da substância **1** (**figuras 5.2**, **5.3** e **5.4**; **tabela 5.1**) com os dados da substância conhecida como glifolina (*glyfoline*) (FURUKAWA, 1983b; SU, et al., 1992; WU et al., 1982), observou-se grande semelhança apesar dos dados da literatura terem sido obtidos em outros solventes (DMSO-d_6, acetona-d_6). Para melhor comparação entre estes dados, o espectro de RMN ^{1}H foi também obtido em acetona-d_6 (**figura 5.5**). Em acetona-d_6 observou-se o sinal da hidroxila quelada (δ_H 14,20), localizada em C-1, e ainda o sinal da segunda hidroxila, em δ_H 9,15, que não haviam sido observados no espectro obtido em $CDCl_3$. Analisando os demais sinais do espectro de RMN ^{1}H, em $CDCl_3$ (**figuras 5.2 a 5.4**), observou-se um sinal em δ_H 8,07 (1H, *d,* J=8,8 Hz), característico do H-8 em um sistema acridônico, desblindado pela carbonila na posição C-9 (FURUKAWA et al., 1983a). Este sinal mostrou acoplamento com o hidrogênio em posição *orto*, cujo sinal foi observado em δ_H 6,97 (1H, *d,* J=8,8 Hz, H-7. Os demais sinais observados em δ_H 4,14 (3H, s), δ_H 3,95 (3H, s), δ_H 3,88 (3H, s) δ_H 3,83 (3H, *s*) e δ_H 3,78 (3H, s), são correspondentes aos grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O), sendo quatro grupos -OMe e um grupo -NMe.

O espectro de RMN ^{13}C da substância **1** (**figura 5.6**) apresentou sinais correspondentes a 18 carbonos. Estes sinais apareceram em δ_C 182,4 referente à carbonila, valor condizente com a presença de uma hidroxila *peri* à carbonila (FURUKAWA et al., 1983a); os valores em δ_C 61,8, 61,5, 61,2 e 60,5 foram atribuídos às metoxilas com substituições em ambas as posições *orto* (FURUKAWA et al., 1983a). O valor de δ_C 45,9 foi atribuído ao grupo CH_3 ligado ao nitrogênio.

Na análise do mapa de contorno HSQC (**figura 5.7**) foi possível correlacionar δ_H 8,07 com δ_C 123,7; δ_H 6,97 com δ_C 111,8 e os sinais em δ_H 4,14, 3,95, 3,88, 3,83 e 3,78 com δ_C 61,8, 61,2, 60,5, 61,5 e 45,9, respectivamente. A partir desses valores foi possível sugerir a posição C-6 para uma hidroxila e C-5 para uma das metoxilas, devido ao efeito conhecido como “compressão estérica” (FURUKAWA, et al., 1983a).

Fazendo a análise do mapa de contorno de HMBC (**figura 5.8**) da substância **1** foi possível correlacionar δ_H 8,07 (H-8) com δ_C 182,4 (C-9), 141,8 (C-5a), 154,9 (C-6) e 135,2 (C-5); δ_H 6,97 (H-7) com δ_C 154,9 (C-6), 141,8 (C-5a), 135,2

(C-5) e 118,1 (C-8a). Com os dados de correlação de ambos os hidrogênios do anel A acoplando com 135,2 (C-5) referente a uma metoxila, pode se determinar que não haviam duas hidroxilas no anel A, mas apenas uma, determinando a localização de uma metoxila em C-5. Foi possível ainda correlacionar o sinal em δ_H 3,78 ($-NCH_3$) com δ_C 141,8 (C-5a) e 138,0 (C-4a); e finalmente, os sinais em δ_H 4,14, 3,95, 3,88 e 3,83 com aqueles em δ_C 154,2, 135,2, 135,4 e 134,3 respectivamente.

As correlações observadas no mapa de contorno HMBC, representadas na **figura 5.9**, confirmaram a identificação da substância **1** como a glifolina, bem como os fragmentos observados em seu espectro de massas **(figura 5.1B).** As fragmentações em *m/z* 316 (100%), 346 (70%) e 204 (70%), também estão de acordo com a literatura (WU et al., 1982; SU et al., 1992) para a glifolina. A fragmentação principal é a perda de três grupos CH_3. Uma fragmentação característica da estrutura acridônica, com o anel B 1,2,3,4-tetrassubstituido.

A glifolina é uma substância com grande potencial antitumoral (WU et al., 2010) e ainda não foi isolada de espécies do gênero *Conchocarpus*. Foi isolada pela primeira vez de *Glycosmis citrifolia* (Willd.) Lindl. por Wu et al. (1982).

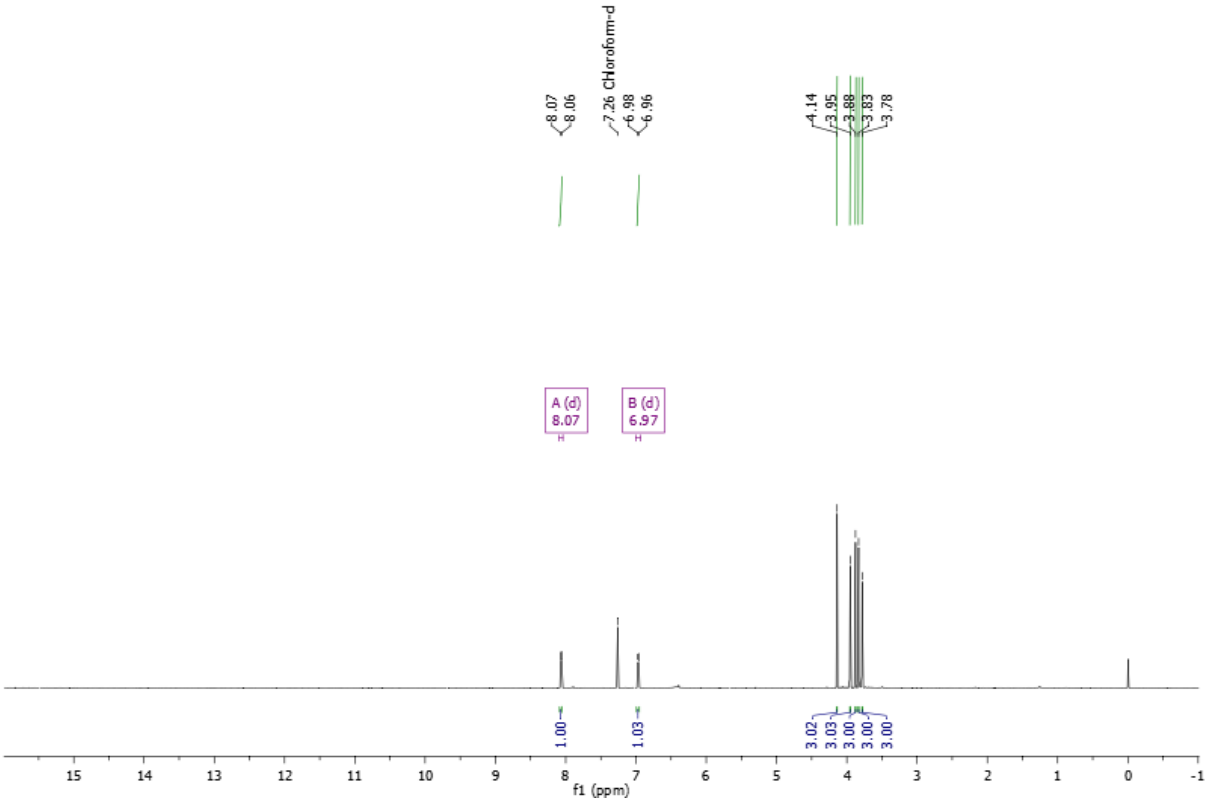


Figura 5.2. Espectro de RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância **1**.

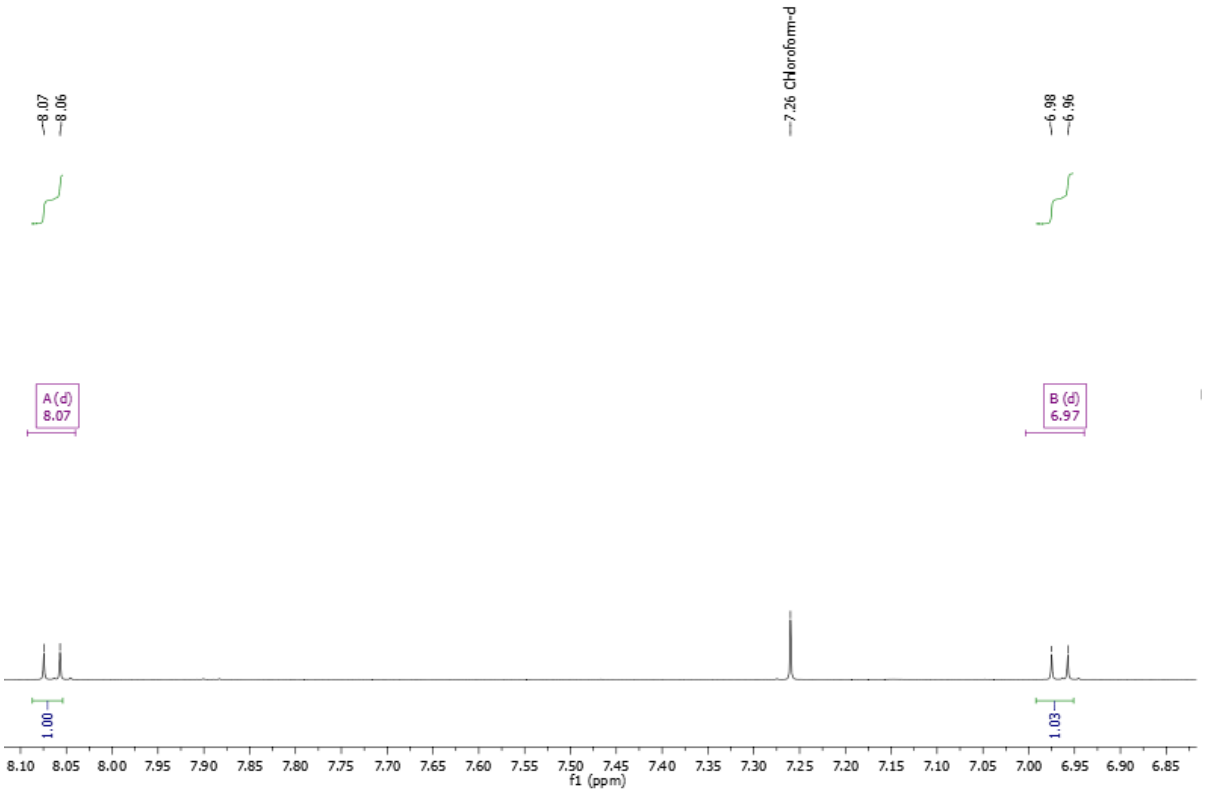


Figura 5.3. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância **1**, com expansão na região de δ_H 6,85 a 8,10.

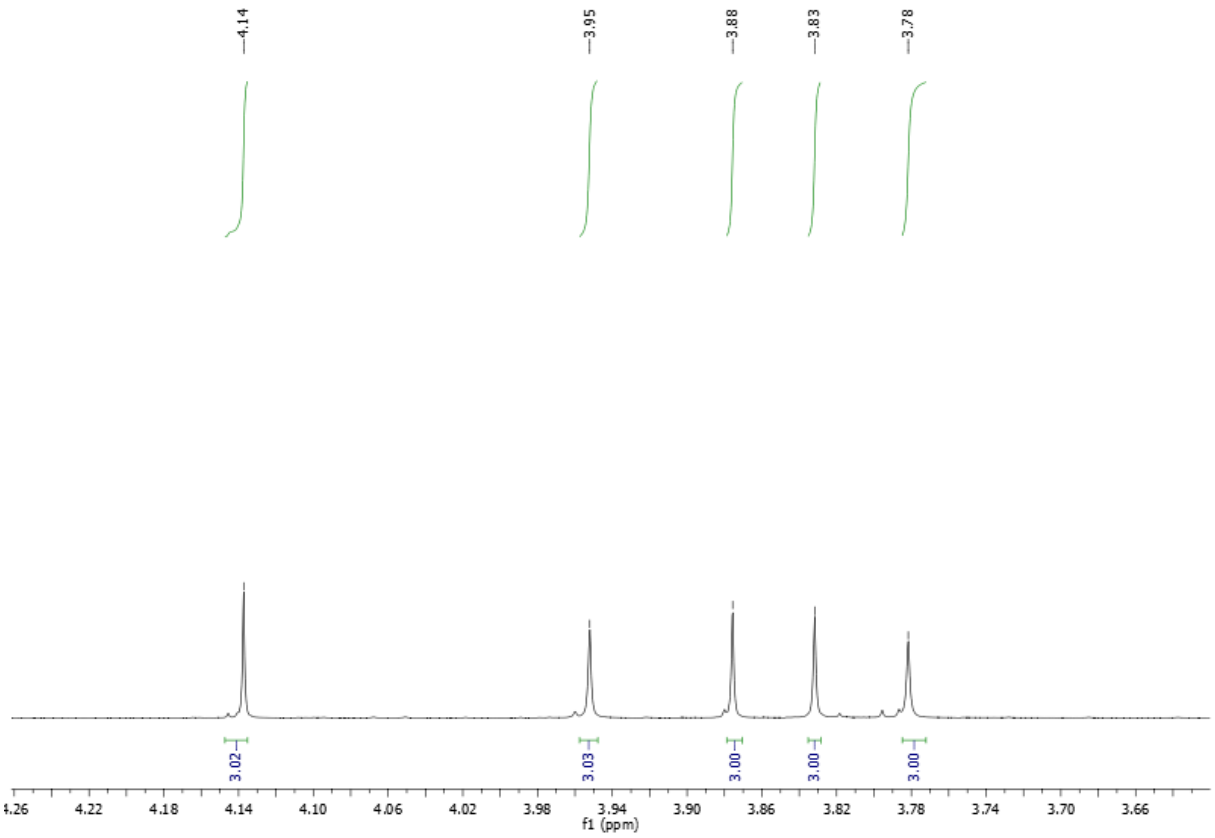


Figura 5.4. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância **1** com expansão na região de δ_H 3,66 a 4,26.

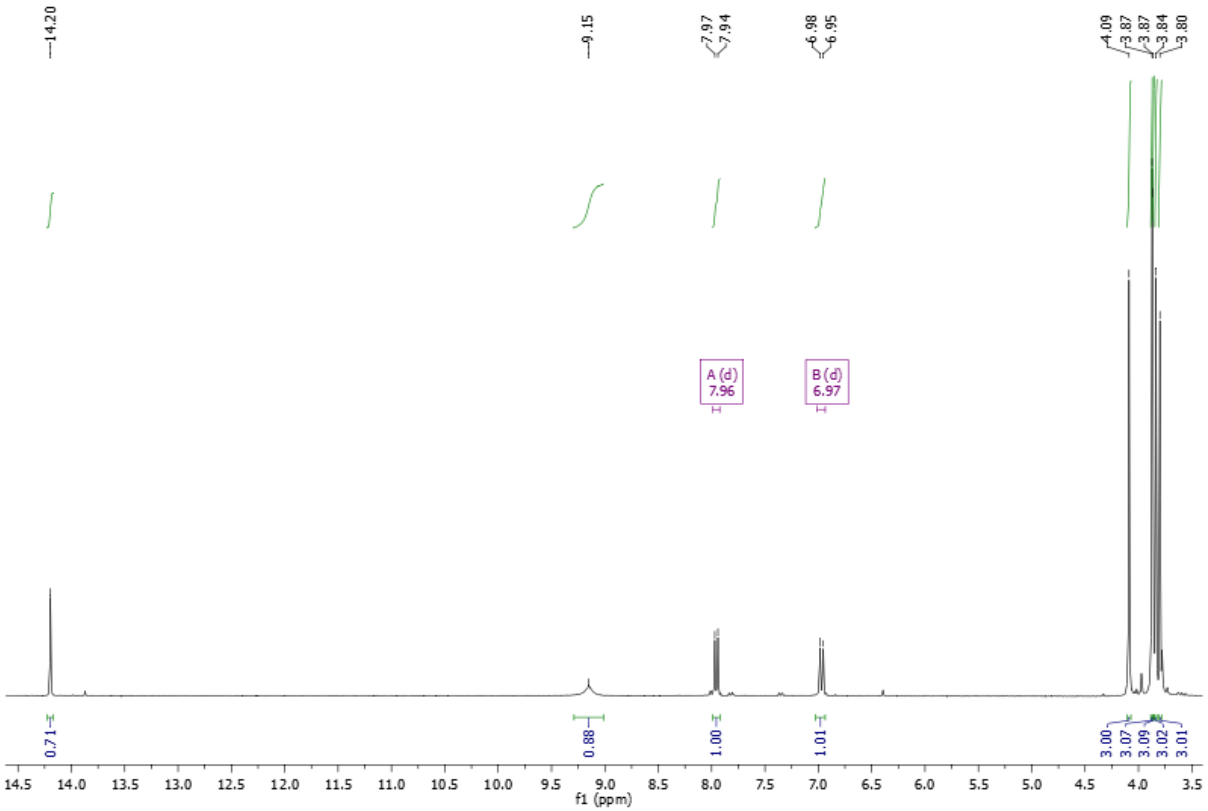


Figura 5.5. Espectro de RMN ^{1}H em (acetona-d_6, 300 MHz) da substância **1**.

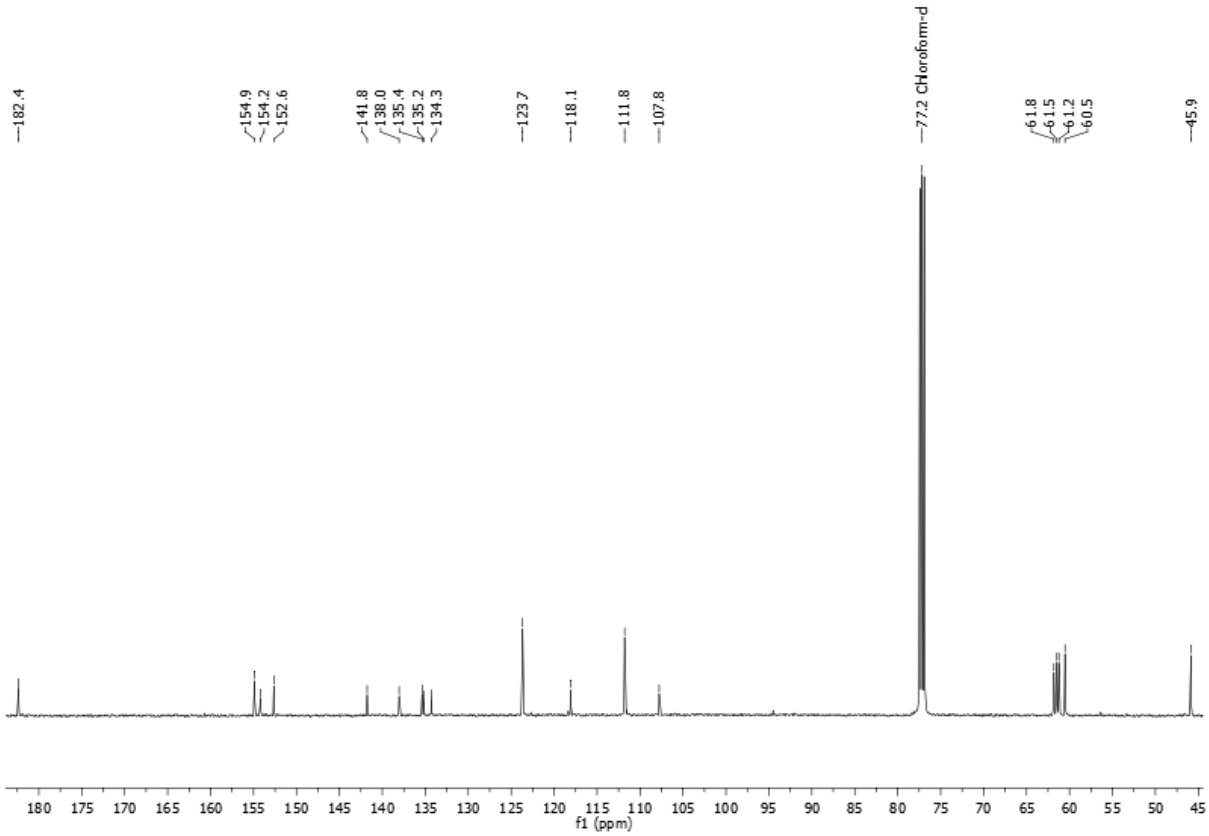


Figura 5.6. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) da substância **1**.

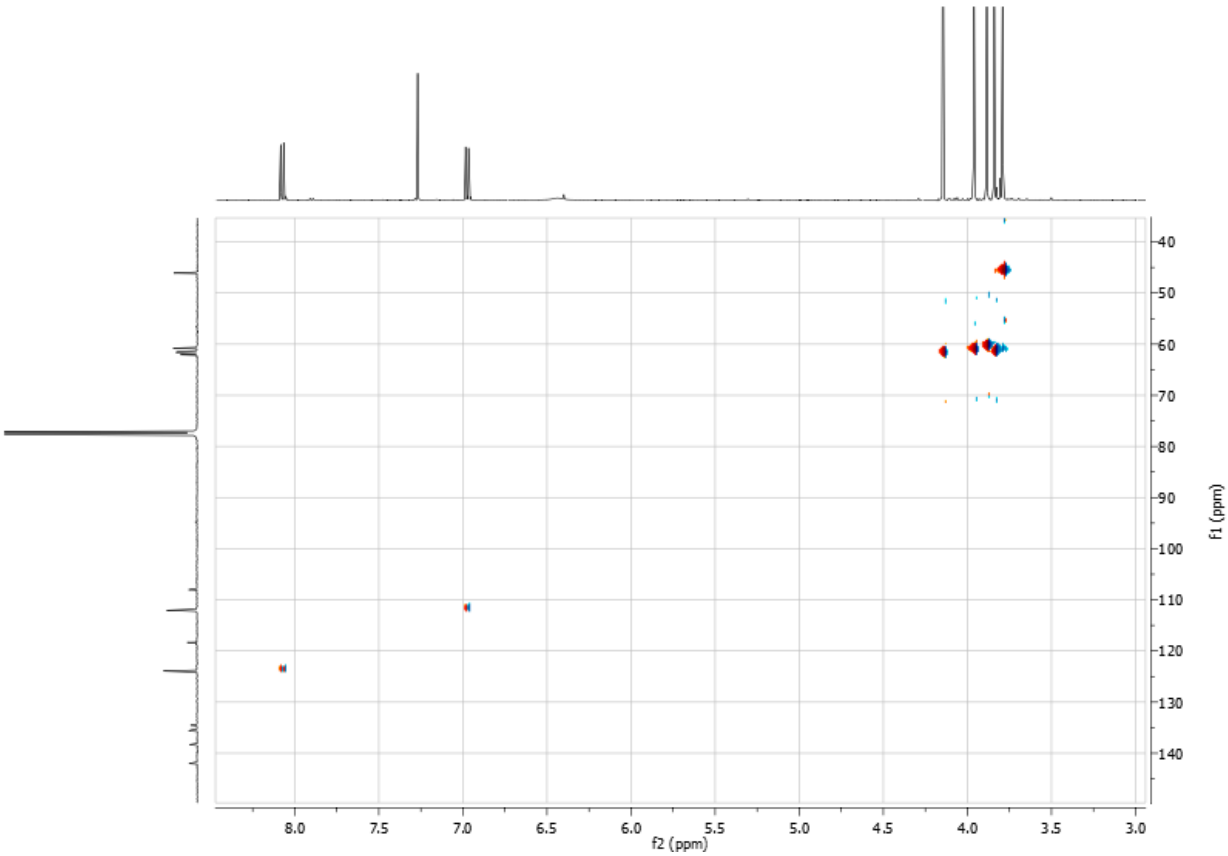


Figura 5.7. Mapa de contorno HSQC da substância **1**.

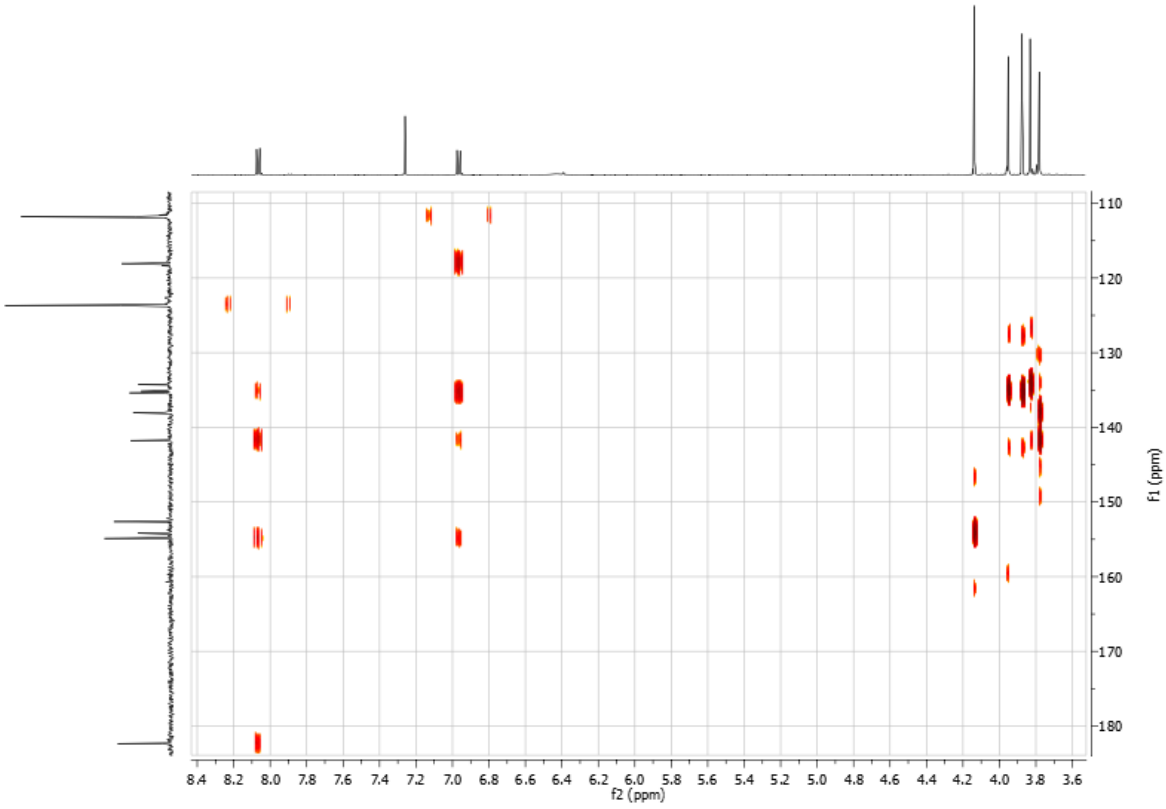


Figura 5.8. Mapa de contorno HMBC da substância **1**.

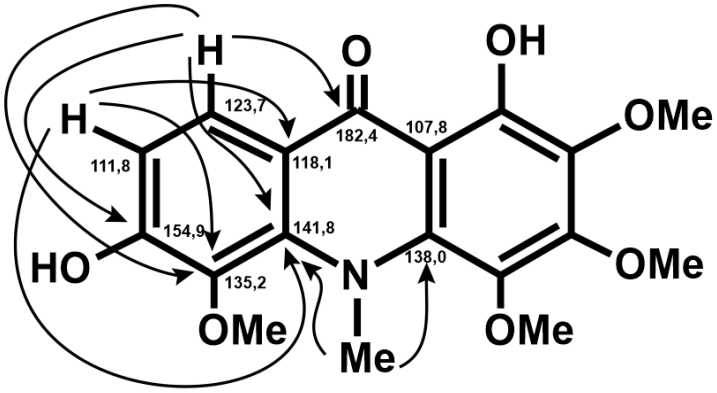


Figura 5.9. Correlação atribuídas de acordo o HMBC da substância **1**.

Tabela 5.1. Dados de RMN ^{1}H (acetona-d_6) da substância **1** comparados aos dados da literatura (WU, et al.,1992) para a glifolina

	Substância 1	**Glifolina**
Posição	**δ_H** (Mult.)	**δ_H**(Mult.)*
1-OH	14,20 (s)	14,18 (s)
2-OMe	4,09 (s) **	4,02 (s) **
3-OMe	3,84 (s) **	3,75 (s) **
4-OMe	3,87 (s) **	3,78 (s) **
5-OMe	3,87 (s)**	3,80 (s) **
6-OH	9,15 (sl)	10,45 (sl)
7	6,97 (d, J = 8,8 Hz)	6,94 (d, J = 9,0 Hz)
8	7,96 (d, J = 8,8 Hz)	7,84 (d, J = 9,0 Hz)
9	---	---
4a	---	---
5a	---	---
8a	---	---
9a	---	---
10-NMe	3,80 (s)	3,69 (s)

* dados obtidos em DMSO-d_6.

** Atribuições das metoxilas não foram confirmadas e podem estar trocadas**.**

5.1.2. Determinação estrutural de CM2 (substância 2)

A fração CM2 foi analisada por CG-EM e o cromatograma (**figura 5.10A**) apresentou um único pico, indicando um alto grau de pureza desta. O espectro de massas (**figura 5.10B**) do constituinte desta fração (substância **2**) mostrou o pico do íon molecular em *m/z* = 301 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{15}NO_5$.

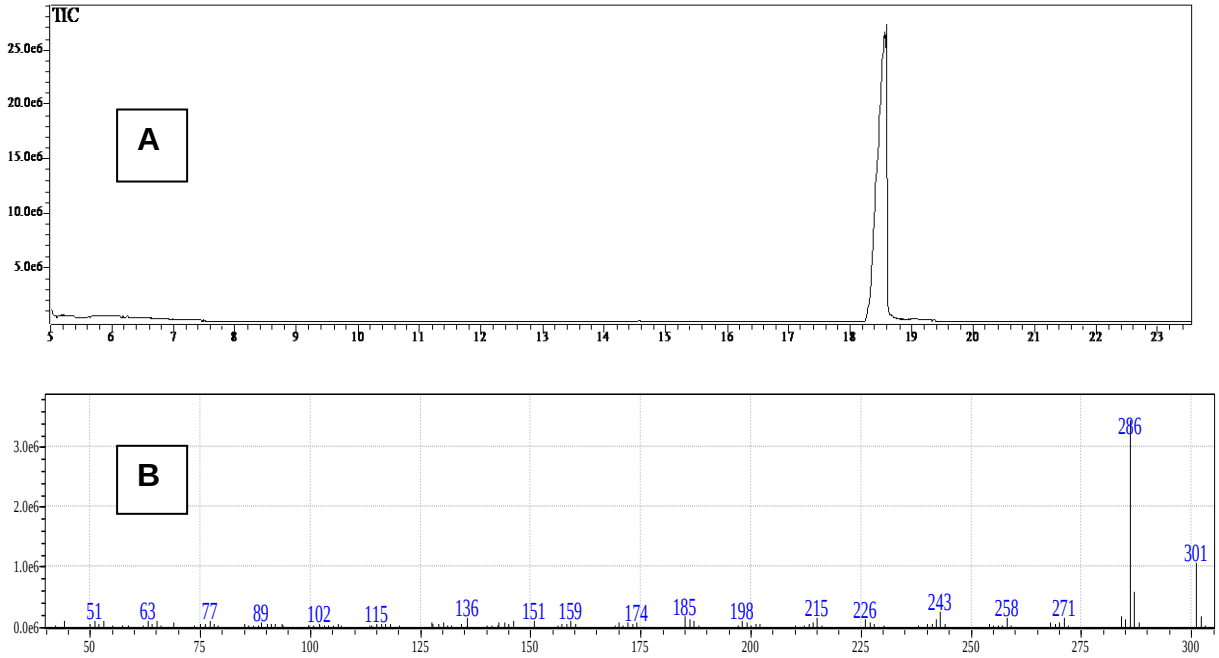
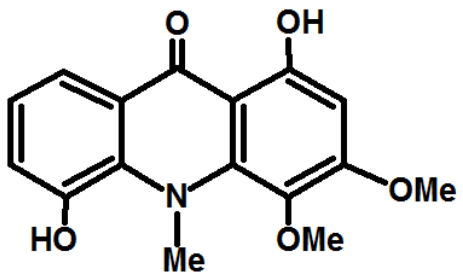


Figura 5.10. A) Cromatograma obtido para CM2 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **2**.

A substância **2** (22 mg) foi obtida da fração ACLCM14 na forma de um sólido cristalino alaranjado, solúvel em acetona, que apresentou coloração alaranjada intensa quando revelado com reagente de Dragendorff, indicando se tratar de um alcaloide. Sua temperatura de fusão (não corrigida) foi determinada na faixa de 198–200 ^{o}C, Bem próxima ao valor (206–207 ^{o}C) descrito por Wu e Furukawa (1983). Sua identificação foi realizada por análises dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C 1D e 2D (HMBC e HSQC) e por CG-EM, para obtenção do espectro de massas, que forneceram dados suficientes para identificação da mesma como 1,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-*N*-metilacridona, um alcaloide conhecido como citrusinina I (**2**).



(**2**)

O espectro de RMN ^{1}H **(figura 5.11-5.13)** em acetona-d_6 da substância **2** apresentou um sinal em δ_H 14,14, característico para a presença de uma hidroxila fenólica quelada, em posição *peri* a um grupo carbonílico. Um segundo sinal, em δ_H 9,15 (s), também foi atribuído à outra hidroxila fenólica. Os sinais em δ_H 7,79 (1H, dd, J=8,0 e 1,5 Hz), δ_H 7,29 (1H, dd, J=8,0 e 1,5 Hz) e δ_H 7,15 (1H, t, J=7,8 Hz), revelaram o padrão de substituição relativo (1,2,3-trissubstituído) do anel A, e foram atribuídos a H-8, H-6 e H-7, respectivamente. O sinal em δ_H 6,40 (1H, *s*) revelou o padrão pentassubstituído do outro anel aromático (anel B). Os três sinais em δ_H 3,98 (3H, s), δ_H 3,83 (3H, s) e δ_H 3,77 (3H, s) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (O ou N).

O espectro de RMN ^{13}C (**figura 5.14**) da substância **2** apresentou 16 sinais, que foram atribuídos (**tabela 5.2**) após análise detalhada dos espectros de HSQC (**figura 5.15**) e de HMBC (**figura 5.16**).

Analisando o mapa de contorno HSQC (**figura 5.15**) foi possível correlacionar o sinal dos hidrogênios (anel A) δ_H 7,79, 7,29 e 7,15 aos sinais dos carbonos em δ_C 117,4, 120,9 e 123,5, respectivamente. Observou ainda o sinal δ_H 6,40 único hidrogênio do anel B correlacionar com o sinal em δ_C 94,7. Também foi possível correlacionar as metoxilas com sinais δ_H 3,77 e 3,98 do anel aromático B aos δ_C 60,5 e 56,7, sendo o sinal mais desblindado, segundo Furukawa, et. al. (1983a), é referente à metoxila sob compressão estérica, efeito que é observado quando existem grupos substituintes em ambas as posições *orto* em relação à esta metoxila. O sinal δ_H 3,83 correlacionou com o sinal em δ_C 46,8, e o deslocamento químico do carbono *N*-metílico é compatível com a presença de grupos substituintes na posição *peri* ao nitrogênio (FURUKAWA, et al. 1983a).

No mapa de contorno HMBC (**figura 5.16**), que mostra geralmente acoplamentos a duas e três ligações entre ^{13}C e ^{1}H ($^{2}J_{HC}$ e $^{3}J_{HC}$), foram observadas correlações dos seguintes sinais: em δ_H 7,79 (H-8) com os sinais em δ_C 183,2

(C=O), 138,7 (C-5a) e 120,9 (C-6); em δ_H 7,29 (H-6) com os sinais em δ_C 148,9 (C-5), 138,7 (C-5a), 123,5 (C-7) e 117,4 (C-8); em δ_H 7,15 (H-7) com os sinais δ_C 148,9 (C-5), 125,6 (C-8a), 120,9 (C-6) e 117,4 (C-8); em δ_H 6,40 (H-2) com os sinais em δ_H 161,3 (C-1), 161,0 (C-3), 131,2 (C-4) e 106,9 (C-9a); em δ_H 14,14 (1-OH) com os sinais em δ_C 94,7 (C-2) e 106,9 (C-9a); em δ_H 3,98 (3-OMe) e 3,77 (4-OMe) com os sinais em δ_C 161,0 (C-3) e 131,2 (C-4), respectivamente; e finalmente, em δ_H 3,84 com os sinais em δ_C 143,2 (C-4a) e 138,7 (C-5a). Estes dados possibilitaram a definição das posições dos substituintes no esqueleto do alcaloide acridônico, como mostrado na **figura 5.18**, e a identificação da substância **2**, como a citrusinina I (WU & FURUKAWA, 1983). Os dados de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C (**tabela 5.2**) mostraram-se de acordo com aqueles da literatura (POMKEUA, 2010) para esta substância. Apesar desta substância ter sido isolada pela primeira vez por Wu e Furukawa (1983b), não foram utilizados os dados publicados por estes autores para comparação com a substância 2, pois os mesmos foram obtidos em solvente diferentes (DMSO-d_6 + $CDCl_3$).

Esse tipo de alcaloide é bastante comum na família Rutaceae. A citrusinina I foi primeiramente isolada da casca da raiz de *Citrus sinensis* L. Osbeck (WU e FURUKAWA, 1983b), mas essa é a primeira ocorrência no gênero *Conchocarpus*. A citrusinine I é uma substancia que exibe grande efetividade contra o vírus do herpes tipos 1 e 2 (YAMAMOTO et al., 1989) e foi isolada pela primeira vez de *Citrus sinensis* Osbeck var. (WU & FURUKAWA, 1983b), e posteriormente, de *Swinglea glutinosa* (PURCARO et al., 2009).

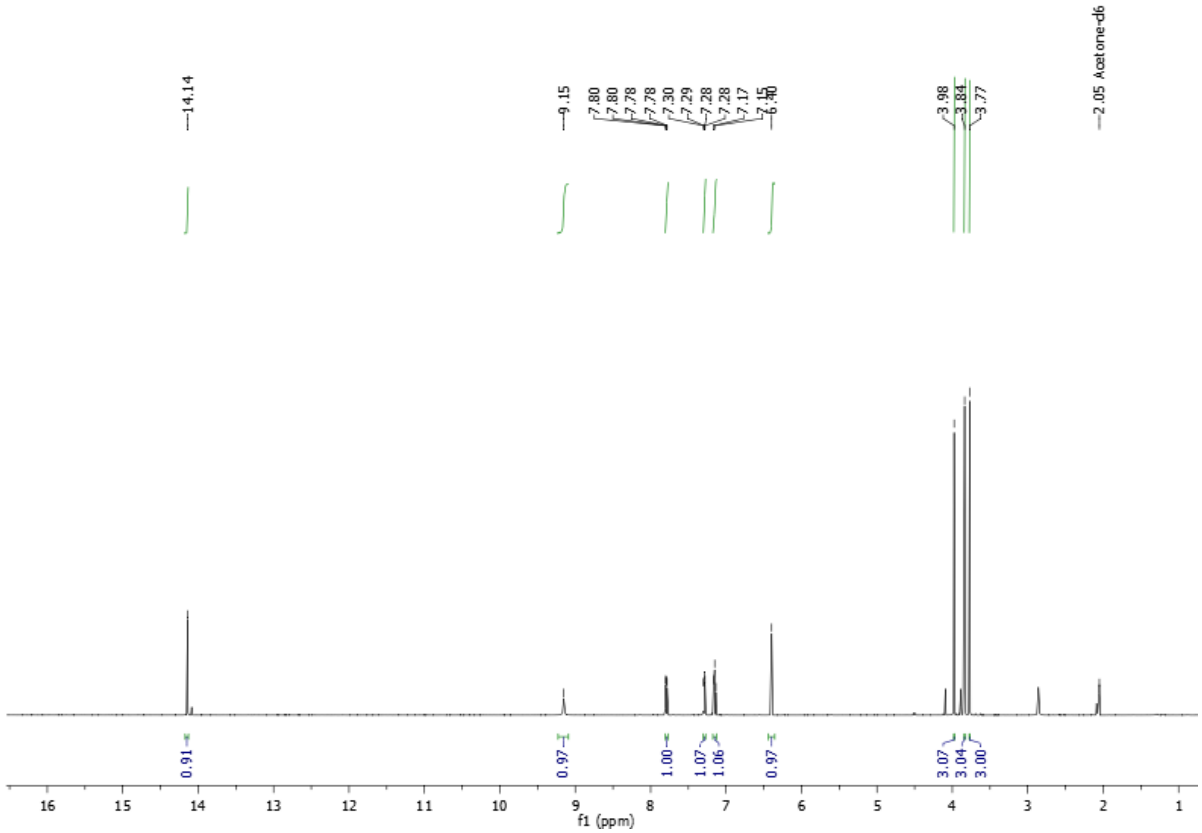


Figura 5.11. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) da substância **2**.

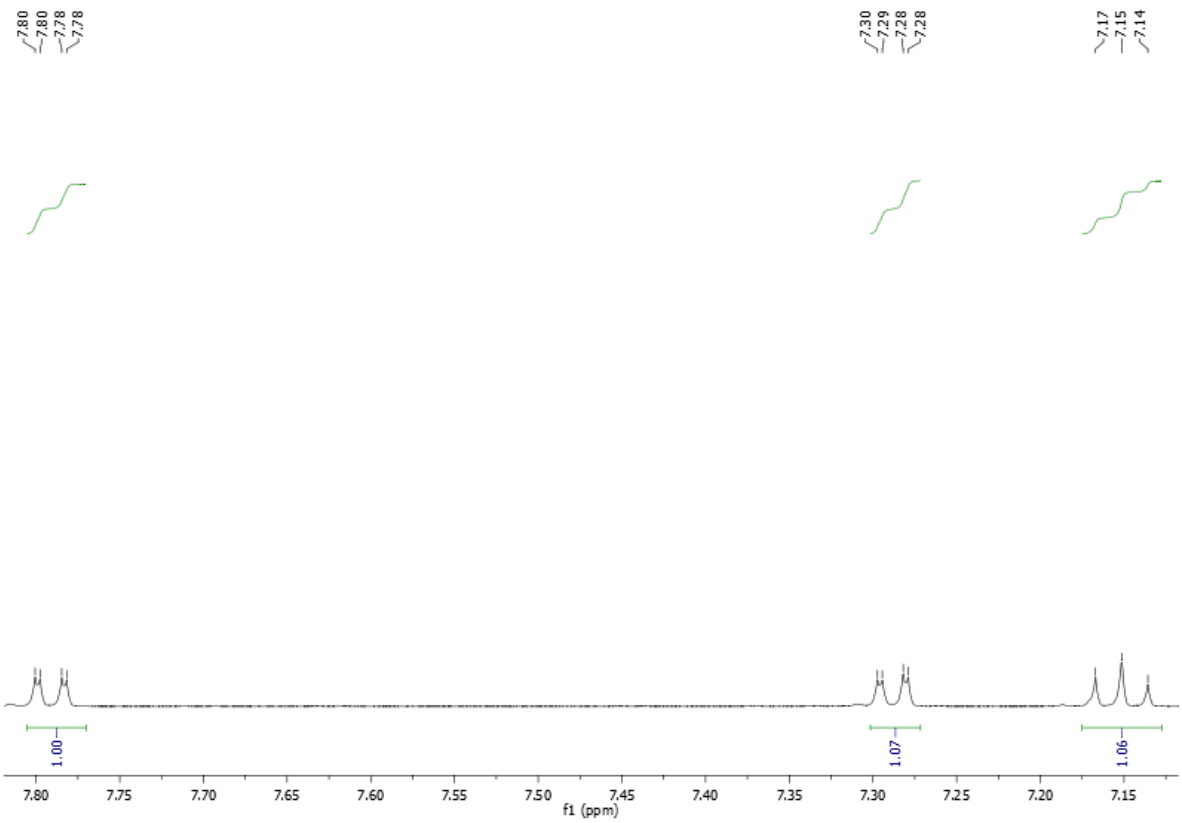


Figura 5.12. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) da substância **2**, com expansão na região de δ_H 7,15 a 7,80.

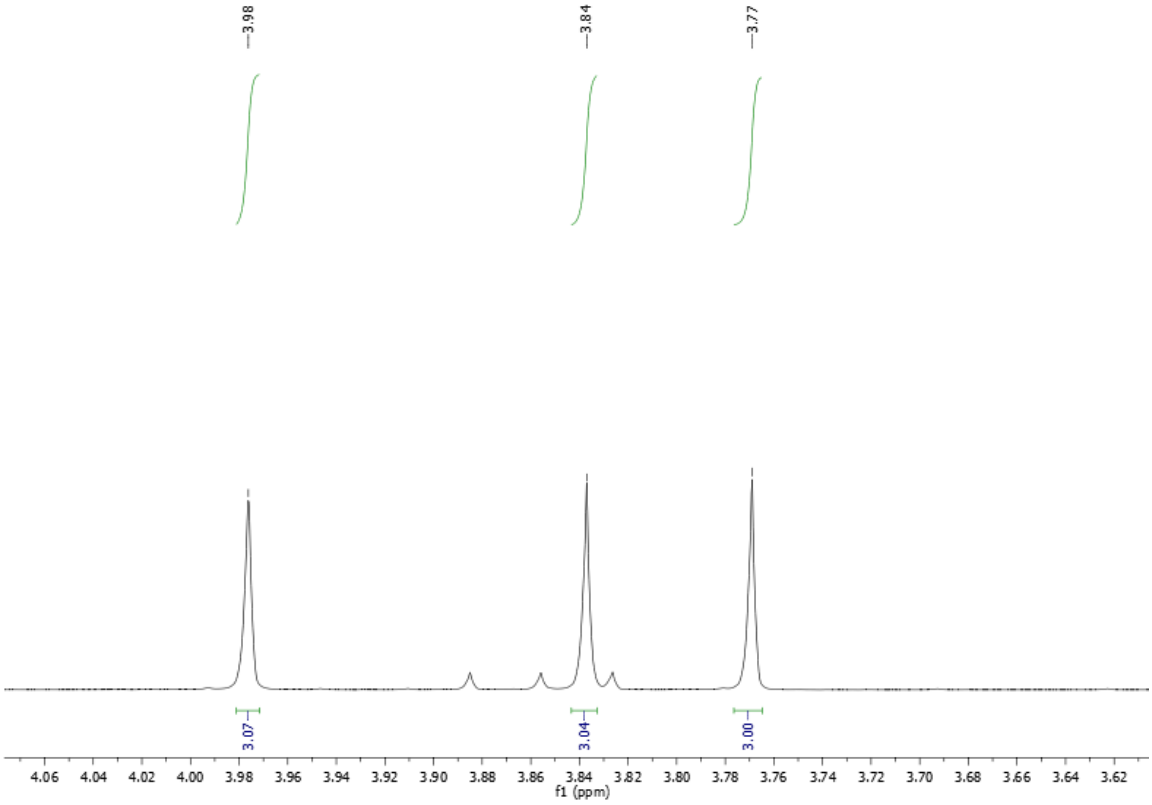


Figura 5.13. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) da substância **2**, com expansão na região de δ_H 3,62 a 4,06.

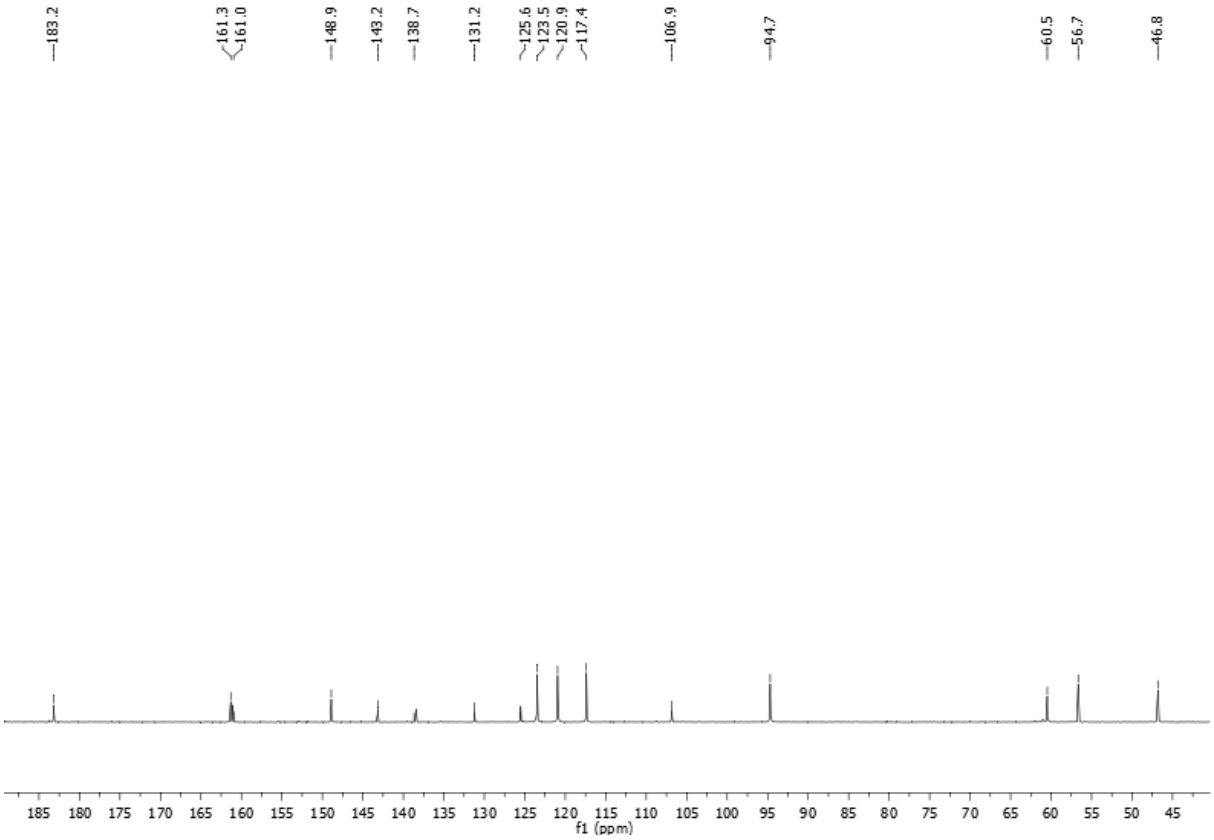


Figura 5.14. Espectro de RMN ^{13}C (Acetona-d_6, 125 MHz) da substância **2**.

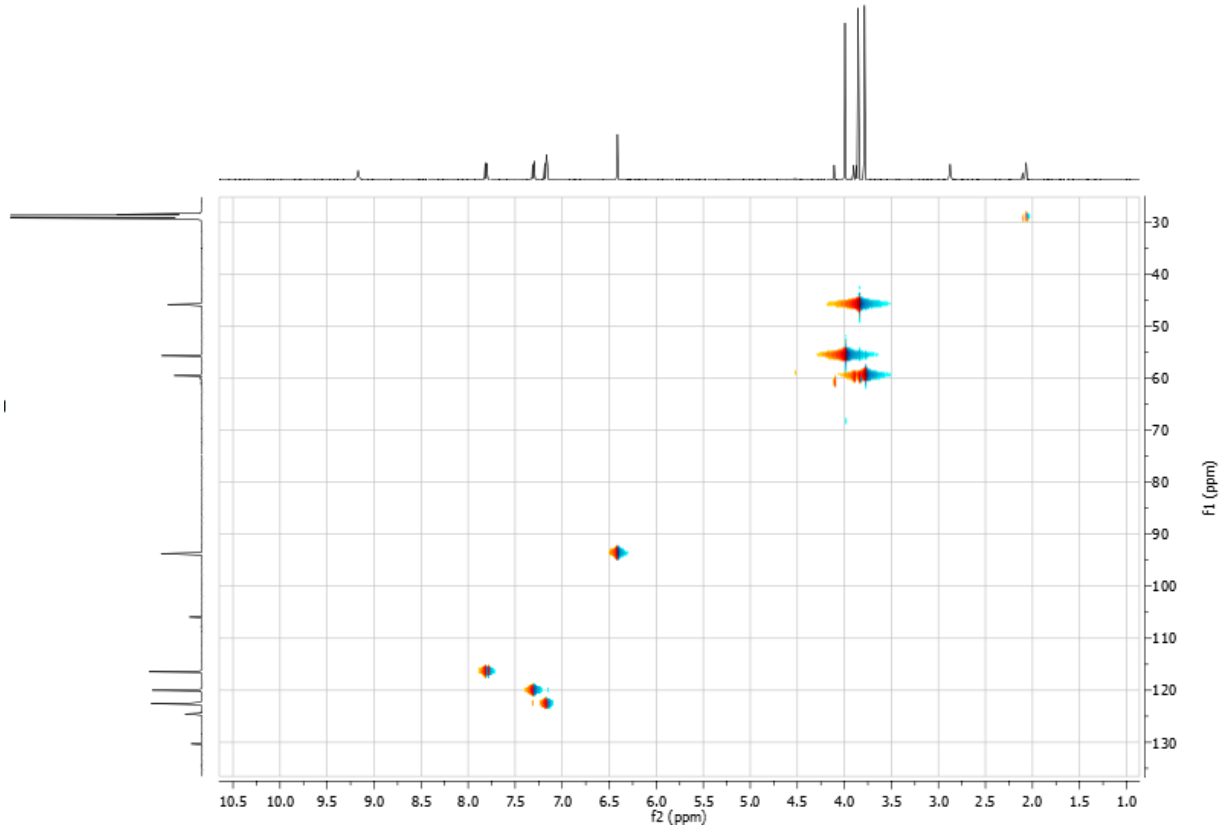


Figura 5.15. Mapa de contornos HSQC da substância **2**.

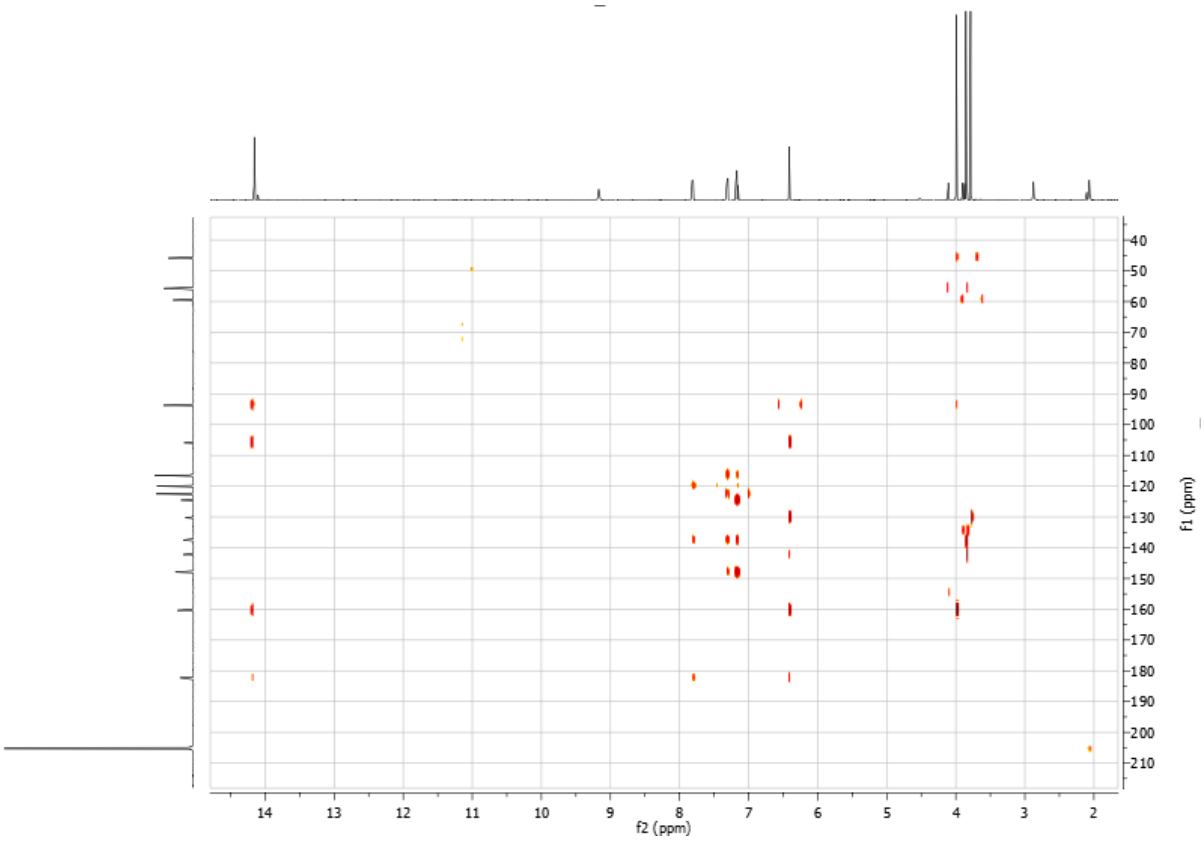


Figura 5.16. Mapa de contornos HMBC da substância **2**.

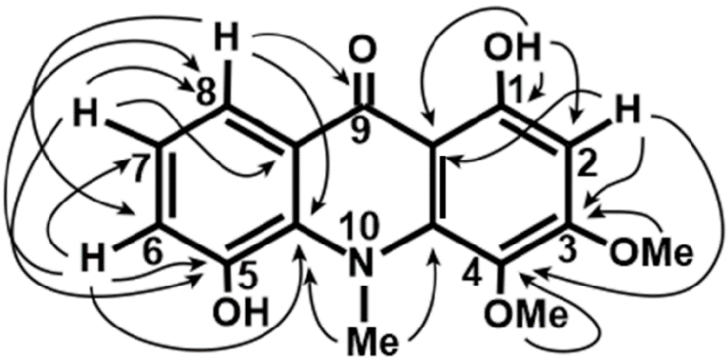


Figura 5.17. Correlações observadas no experimento HMBC para a substância **2**.

Tabela 5.2. Comparação dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (acetona-d_6) da substância **2** com valores da literatura (POMKEUA, 2010) para a citrusinina I

	Substância 2		**Citrusinina I**	
Posição	**δ_H**	**δ_C**	**δ_H***	**δ_C***
1-OH	14,14 (s)	161,3	14,22 (s)	160,3
2	6,40 (s)	94,7	6,41 (s)	93,7
3	---	161,0	---	160,0
3-OMe	3,98 (s)	56,7	3,98 (s)	55,7
4	---	131,2	---	130,3
4-OMe	3,77 (s)	60,5	3,76 (s)	59,5
5-OH	9,15 (s)	148,9	9,42 (s)	148,0
6	7,29 (dd J=7,8; 1,5 Hz)	120,9	7,30 (d, J = 7.8 Hz)	119,9
7	7,15 (t, J = 7.8 Hz)	123,5	7,16 (t, J = 7,8 Hz)	122,5
8	7,79 (dd J = 8; 1,5 Hz)	117,4	7,78 (d, J = 7,8 Hz)	116,3
9	---	183,2	---	182,2
4a	---	143,2	---	142,2
5a	---	138,7	---	137,4
8a	---	125,6	---	124,5
9a	---	106,9	---	105,9
10-NMe	3,83 (s)	46,8	3,83 (s)	45,9

* dados obtidos em acetona-d_6.

5.1.3. Determinação estrutural dos constituintes de CM3 (substâncias 2 e 3)

A fração CM3 foi analisada por CG-EM e o cromatograma (**figura 5.18A**) apresentou dois picos principais, denominados A e B, além de outros picos menos significativos. O espectro de massas (**figura 5.18B**) do constituinte majoritário desta fração apresentou a mesma massa e grande semelhança com o espectro de massas da citrusinina I (**2**), enquanto o espectro de massas (**figura 5.18C**) do outro constituinte (substância **3**) apresentou o pico do íon molecular *m/z* 331 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{17}NO_6$.

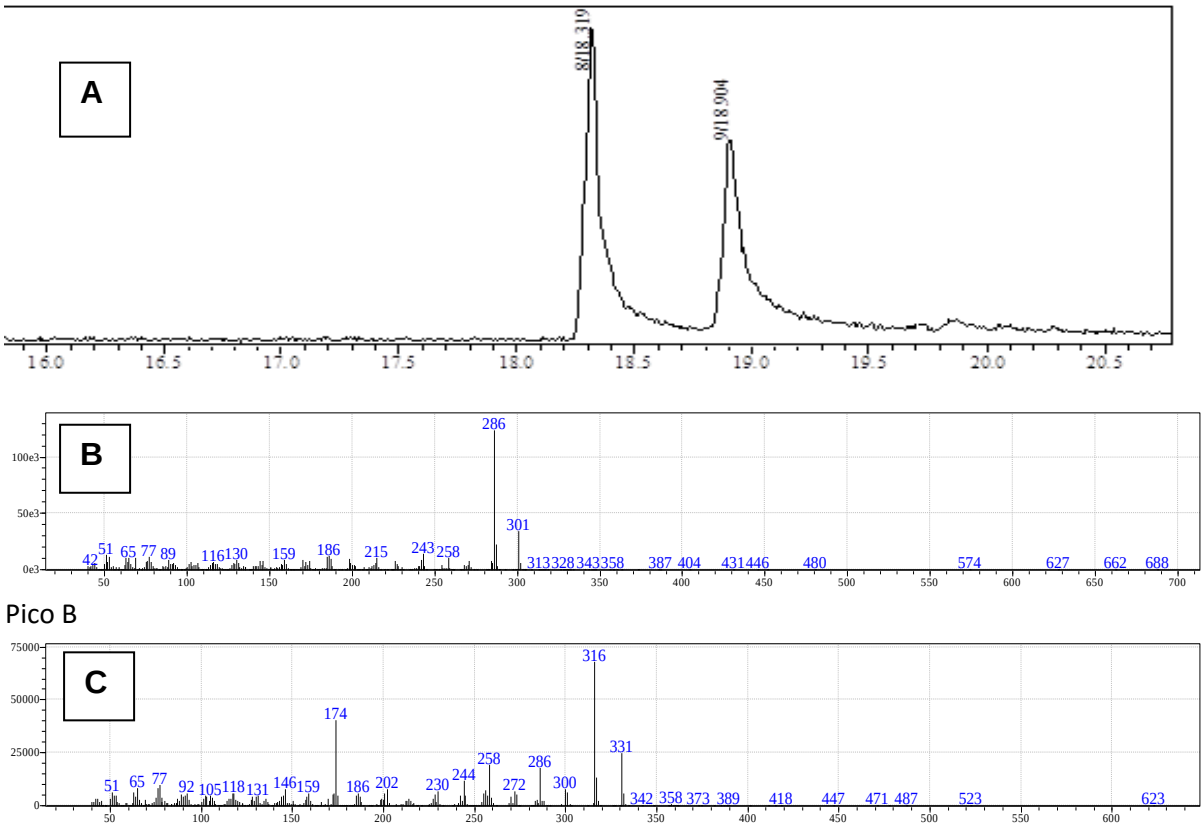
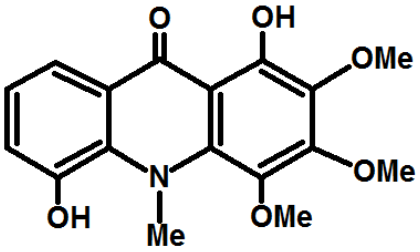


Figura 5.18. A) Cromatograma obtido para CM3 após análise por CG-EM; B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **2**; e C) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **3**.

A fração CM3 (33 mg) foi obtida na forma de um sólido amorfo castanho, da fração ACLCM12, solúvel em acetona. Por meio da análise detalhada de dados espectrométricos (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C e EM) obtidos para CM3, e comparação desses dados com aqueles de uma amostra autêntica (substância **2**) e da literatura, foi possível identificar CM3A como a citrusinina I (**2**), já isolada da fração CM2, e CM3B como o alcaloide acridônico 1,5-dihidroxi-2,3,4-trimetoxi-*N*-metilacridona, conhecido como citbrasina (**3**) (WU & FURUKAWA, 1983).



(3)

O espectro de RMN ^{1}H (**figuras 5.19 a 5.22**) de CM3 apresentou sinais correspondentes a duas substâncias, CM3A e CM3B, na proporção relativa de 10:8, os quais foram diferenciados (no espectro) pelas letras A e B, respectivamente. A comparação dos sinais de CM3A com aqueles da amostra CM2 (seção 5.1.2), possibilitou concluir que estas são idênticas, e se tratam da citrusinina I (**2**). Portanto, somente será discutida a elucidação estrutural de CM3B (substância **3**). Os sinais observados para CM3B foram muito semelhantes ou, em alguns casos, coincidentes aos sinais observados para CM3A. A principal diferença nos dados de RMN de ^{1}H destas, é a substituição em C-2, caracterizada pela observação do sinal em δ_H 6,40 (s, H-2) para CM3A (ausente em CM3B), e um sinal de uma quarta metoxila, *orto* dissubstituída, em CM3B (ausente em CM3A). Portanto, conclui-se que a estrutura de CM3B é semelhante à de CM3A (citrusinina I), com a substituição de um hidrogênio em C-2 por um grupo metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C (**figuras 5.24**) de CM3 também possibilitou confirmar as observações destacadas anteriormente, mostrando 17 sinais de carbono para CM3B e apenas 16 sinais para CM3A. Vale destacar que os sinais de CM3A foram atribuídos a partir da comparação dos dados com aqueles da substância **2** (CM2).

Estas informações possibilitaram a proposição da estrutura do alcaloide acridônico 1,5-dihidroxi-2,3,4-trimetoxi-*N*-metilacridona (**3**) para CM3B. Além disso, a comparação dos dados de RMN ^{1}H (**tabela 5.3**) e RMN ^{13}C (**tabela 5.4**) com aqueles da literatura (WU e FURUKAWA, 1983; PURCARO, 2008), para o alcaloide, conhecido como citbrasina (**3**), corroboraram para a confirmação desta proposta.

As principais fragmentações correspondentes aos picos apresentados no espectro de massas de CM3B (**figura 5.18C**) estão de acordo com a literatura (WU e FURUKAWA, 1983) e são observadas em *m/z* (%): 316(100), 300(7), 286(16), 258(15), 174(25). A citbrasina também foi isolada pela primeira vez de *Citrus*

sinensis Osbeck var. (WU e FURUKAWA, 1983), e posteriormente, de *Swinglea glutinosa* (PURCARO et al., 2009). A substância citbrasina possui atividade como inibidor de enzima frente à catepsina V (SEVERINO, 2008).

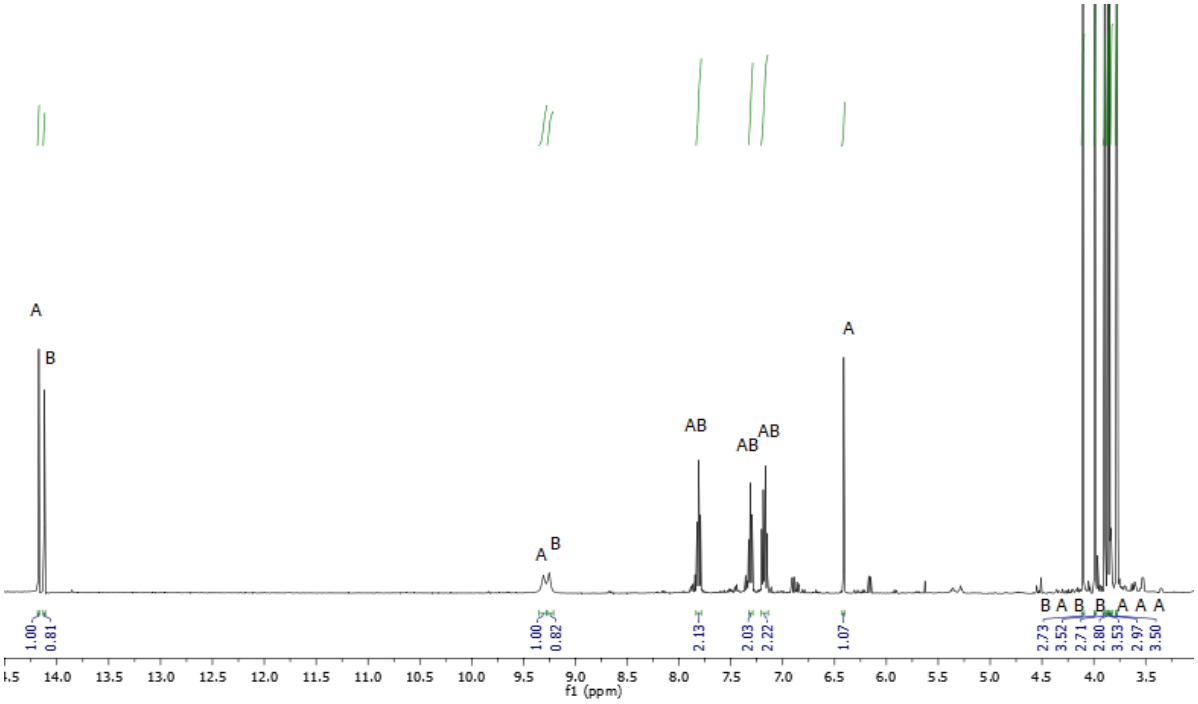


Figura 5.19. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d$_6$, 500 MHz) de CM3.

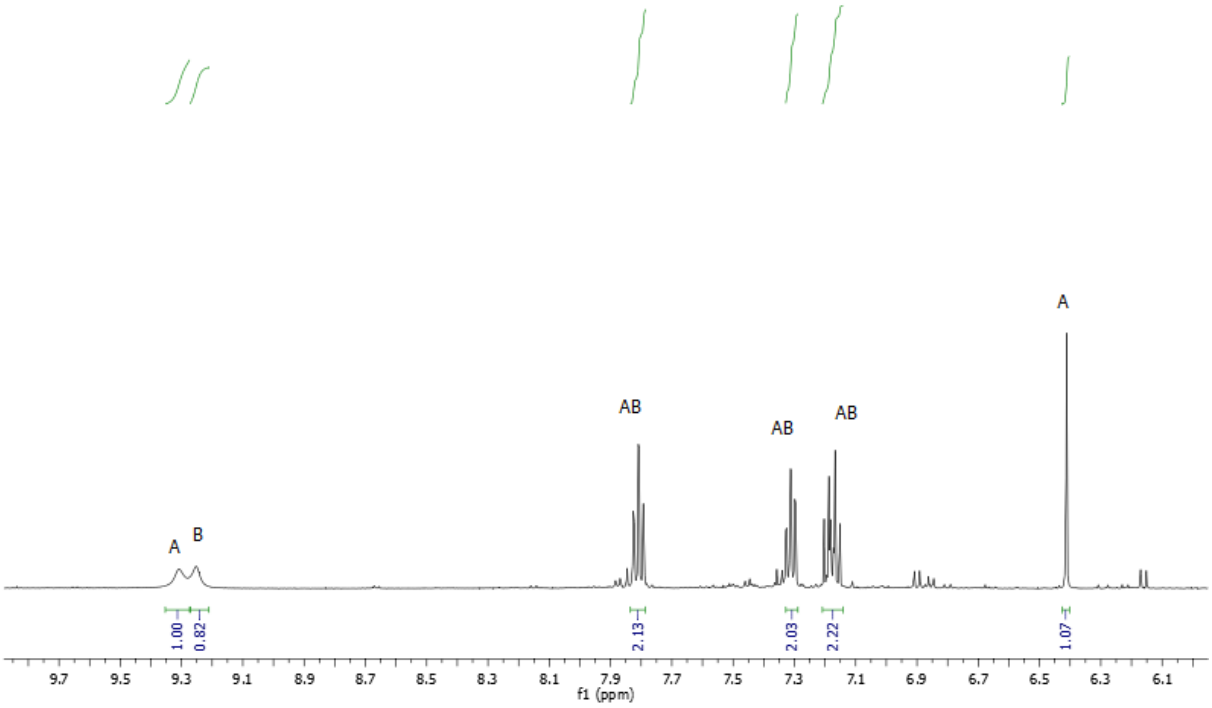


Figura 5.20. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d$_6$, 500 MHz) de CM3, com expansão da região de δ_H 6,1 a 9,7.

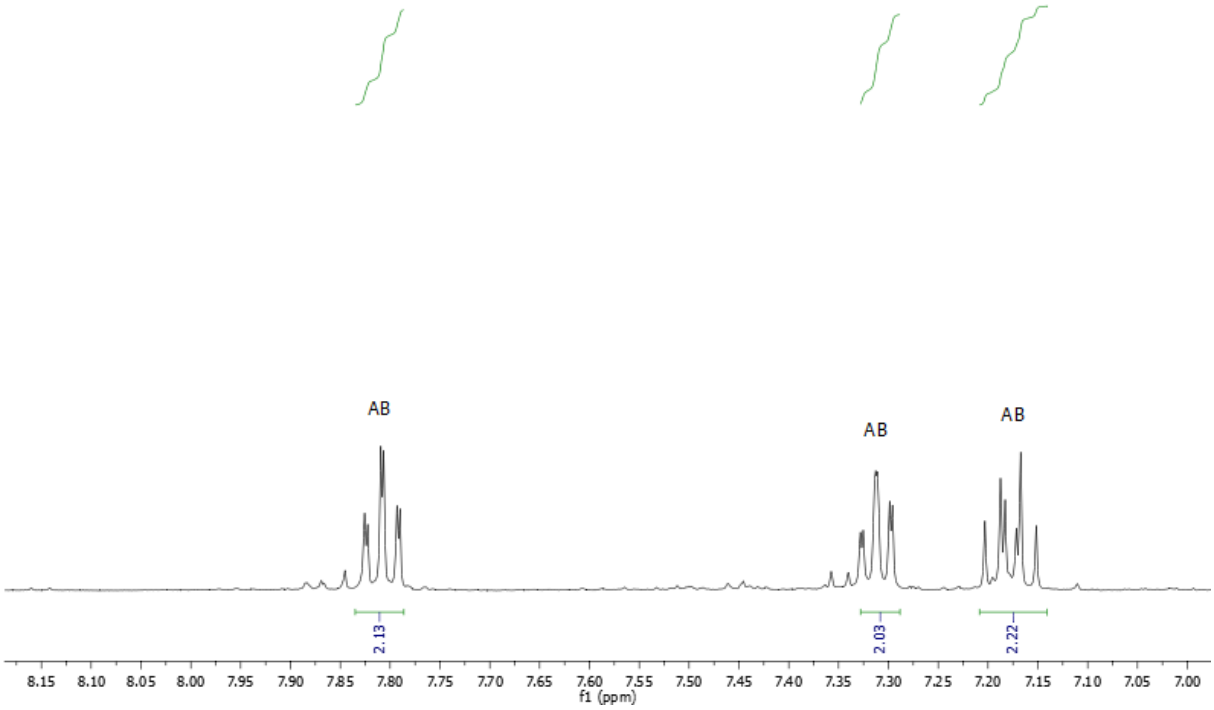


Figura 5.21. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) de CM3, com expansão da região de δ_H 7,00 a 8,15.

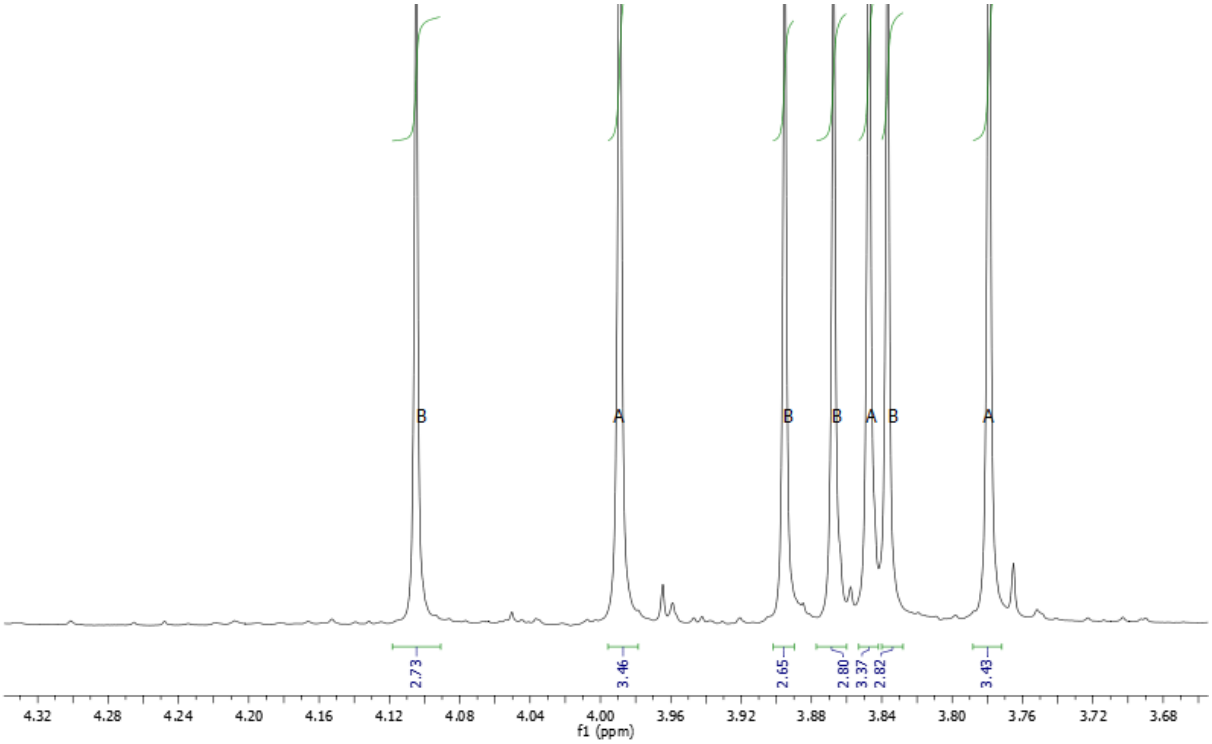


Figura 5.22. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 500 MHz) de CM3, com expansão da região de δ_H 3,68 a 4,32.

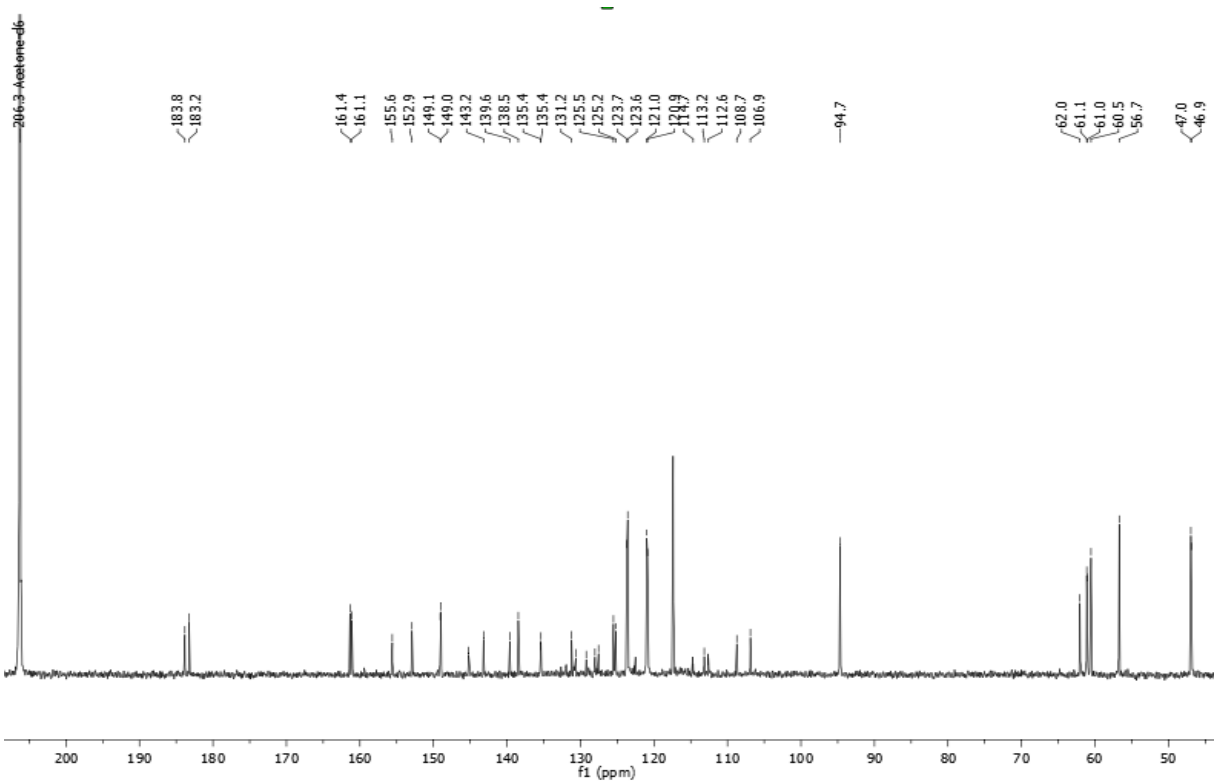


Figura 5.23. Espectro de RMN ^{13}C (acetona-d_6, 125 MHz) de CM3.

Tabela 5.3. Comparação dos dados de RMN ^{1}H da citbrasina e da substância CM3B

	citbrasina	**substância CM3B**
Posição	**δ_H*** (Mult.)	**δ_H****(Mult.)
1-OH	13,99 (*s*)	14,10 (*s*)
2	---	---
2-OMe	3,95 (*s*)	3,88 (*s*)
3	---	---
3-OMe	4,13 (*s*)	4,09 (*s*)
4	---	---
4-OMe	3,81 (*s*)	3,82 (*s*)
5-OH	7,12 (*s*)	9,23 (*s*)
6	7,19 (dd J=8,0; 2,0 Hz)	7,30 (dd, J = 7,8; 1,5 Hz)
7	7,07 (*t*, J = 8,0 Hz)	7,17 (*t*, J = 7,8 Hz)
8	7,85 (dd J=8,0; 2,0 Hz)	7,79 (dd, J = 8,0; 1,5 Hz)
9	---	---
4a	---	---
5a	---	---
8a	---	---
9a	---	---
10-NMe	3,84 (*s*)	3,85 (*s*)

* Dados obtidos em acetona-d_6 (WU & FURUKAWA, 1983)

** Dados obtidos em acetona-d_6 a 500 MHz.

Tabela 5.4. Comparação dos dados de RMN ^{13}C da citbrasina e de CM3B

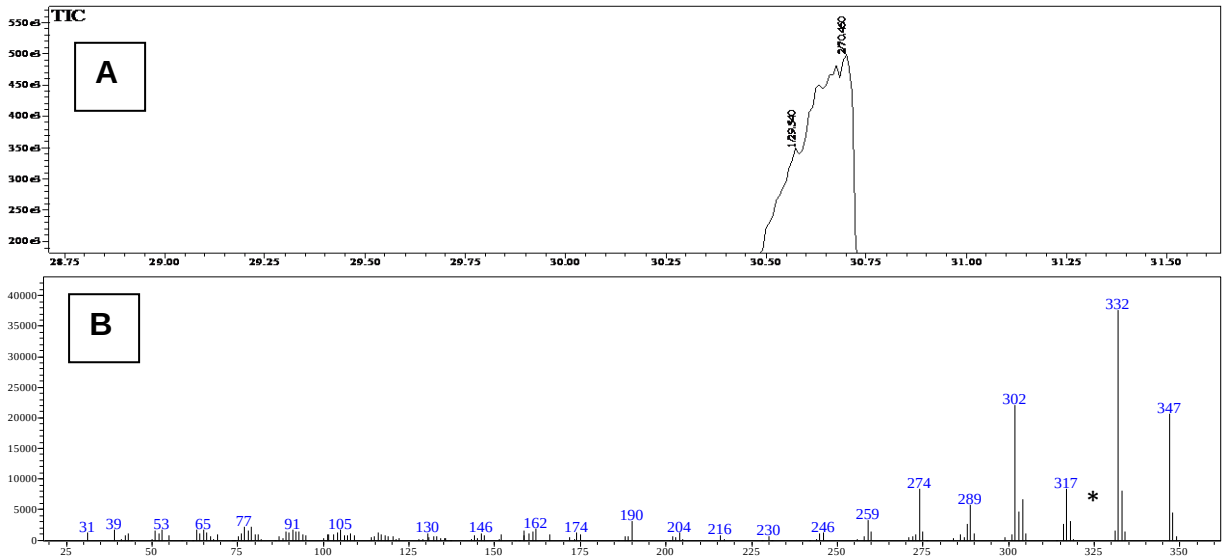
	citbrasina	**substância CM3B**
Posição	**δ_C*** (Mult.)	**δ_C****(Mult.)
1	154,7	155,6
2	152,1	152,9
2-OMe	61,0	61,0
3	138,9	139,6
3-OMe	61,3	61,1
4	134,5	135,4
4-OMe	61,9	62,0
5	147,0	149,1
6	120,5	123,7
7	122,9	125,2
8	118,0	120,9
9	183,1	183,8
4a	108,3	108,7
5a	---	---
8a	124,6	127,5
9a	137,6	135,0
10-NMe	46,6	46,9

* Dados obtidos em acetona-d_6 (PURCARO, 2008).

** Dados obtidos em acetona-d_6 a 125 MHz.

5.1.4. Determinação estrutural de CM4 (substâncias 4 e 5)

A fração CM4 (27 mg) foi analisada por CG-EM e o cromatograma (**figura 5.24A**) apresentou dois picos principais, denominados CM4A e CM4B. O espectro de massas (**figura 5.24B**) dois constituintes foram identificados, sendo que o majoritário desta fração apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 347 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{17}NO_7$, e o minoritário apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 317 daltons que é compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{15}NO_6$. A discussão da elucidação estrutural das substâncias **4** e **5** será apresentada a seguir.

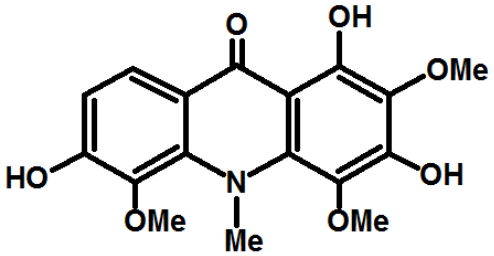


*Mistura de duas substâncias (M=347 e M=317)

Figura 5.24. A) Cromatograma obtido para CM4 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **4** e **5**.

5.1.4.1 Determinação estrutural de CM4A (substância 4)

A amostra CM4, proveniente da fração ACLCM25.2, contendo uma mistura das substâncias **4** (CM4A) e **5** (CM4B), na proporção de 100:20, foi obtida na forma de um sólido amorfo castanho, solúvel em clorofórmio. Seus constituintes foram identificados por meio da análise dos dados de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C 1D e 2D (HMBC e HSQC) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, que forneceram dados suficientes para determinação da estrutura de mais um alcaloide do tipo acridônico (1,3,6-trihidroxi-2,4,5-trimetoxi-*N*-metilacridona), sendo que a substância **5** será discutida no próximo item, ora visto que dessa mistura duas substâncias foram identificadas.



(4)

O espectro de RMN ^{1}H (**figura 5.25** a **5.27**) de CM4 da substância **4** (A) apresentou sinal em δ_H 8,05 (*d*, J=8,8 Hz) referente ao H-8, mais desblindado devido ao efeito da carbonila. O sinal em δ_H 6,96 (*d*, J=8,8 Hz) foi a atribuído ao H-7, que se acopla em *orto* com o H-8. Os sinais referentes às metoxilas aparecem na região de δ_H 4,02, 3,87 e 3,86 e o sinal da metila ligada ao nitrogênio, em δ_H 3,79. Mesmo não sendo observado o sinal característico de δ_H para uma hidroxila quelada, na faixa 12-17 ppm, o valor de δ_C acima de 180 para a carbonila, indicou a possibilidade da presença de um grupo hidroxila em posição *peri* à carbonila (FURUKAWA, et al., 1983a). Ao obter o espectro de RMN ^{1}H em acetona-d_6 (**Figura 5.28**), ao invés de $CDCl_3$, pode se observar além dos sinais já mencionados, outros três sinais referentes às hidroxilas. Estes sinais aparecem em δ_H 14,30, para a hidroxila *peri* a carbonila, e em δ_H 8,90 e 9,11, para as duas outras hidroxilas, em C-3 e C-6. Observa-se ainda um pequeno deslocamento dos valores para os hidrogênios H-8, H-7 e da metoxilas, algo já esperado, devido a interação própria para cada solvente. Os sinais de H-8 e H-7 que, em $CDCl_3$, foram observados em δ_H 8,05 e 6,96, respectivamente, foram observados em δ_H 7,94 (*d*, J=8,8 Hz) e 6,95 (*d*, J=8,8 Hz) em acetona-d_6 (**tabela 5.5**).

O espetro de RMN ^{13}C (**figura 5.29)** de CM4 apresentou 33 sinais de carbonos para mistura das substâncias **4** e **5** com valores que se destacam para diferenciar e pontuar alguns deslocamentos característicos. Em δ_c 182,2 e 180,7 representam valores das carbonilas. Os sinais em δ_c 61,8, 61,1, 61,0 (2C) e 60,6 são referentes das cinco metoxilas apresentadas pelas substâncias CM4A e CM4B. A principal diferença nos sinais destas duas substâncias, refere-se ao deslocamento químico do grupo metila ligado ao nitrogênio, observado em δ_c 45,5 para CM4A (substância **4**) que evidencia, segundo Furukawa, et al. (1983a), substituição nas posições *peri* ao nitrogênio (*orto*-dissubistituído). Esse efeito não é observado para

CM4B (substância **5**) que será discutida na **seção 5.1.4.2**. Os valores referentes a substância **4** em $CDCl_3$ e os 17 sinais referentes aos carbonos aparecem em δ_c 182,1; 154,8; 151,5; 150,0; 141,5; 138,0; 135,4; 129,5; 128,5; 123,5; 117,9; 111,9; 105,4; 61,1; 61,0; 60,6 e 45,5, valores distinguidos pela intensidade dos sinais e que são observados na ampliação da **figura 5.29**. Esses valores ainda foram reafirmados e correlacionados com maior detalhamento a partir do experimento repetido em acetona-d_6 e descritos na análise dos experimentos de HMBC e HSQC. Os valores de $\delta_{c,}$ em acetona-d_6 são: 182,6; 156,8; 152,6; 152,4; 143,4; 139,0; 137,2; 130,8; 130,0; 123,2; 118,0; 113,4; 105,4; 60,9; 60,8; 60,6 e 46,3 (**figura 5.30** e **tabela 5.5)**.

O mapa de contornos do HSQC (**figura 5.31**) de CM4 para a substância **4** apresentou seis sinais de carbonos hidrogenados, dois deles referentes aos hidrogênios C-7 e C-8 se correlacionando com H-7 e H-8, respectivamente. Outras correlações foram observadas entre os sinais em δ_H 3,83; 3,86 e 3,87, referente às metoxilas, com os sinais em δ_c 60,6; 60,8 e 61,0, valores com solventes acetona-d_6. Devido à grande proximidade destes valores tornou-se difícil determinar com exatidão tais correlações. Finalmente, foi observada correlação entre o sinal em δ_H 3,80, referente ao grupo metila ligado ao nitrogênio, com o sinal em δ_c 46,3.

No mapa de contornos do HMBC (**figura 5.32**) de CM4 para substância **4** observou-se correlação do sinal δ_H em 14,39 referente à hidroxila quelada com os sinais em δ_c 105,4(C-9a); 130,8(C-2) e 152,6(C-1). Do sinal em δ_H 9,11 (6-OH) correlação com os sinais em δ_c 113,4(C-7) e 137,2(C-5); e do sinal em δ_H 8,90 (3-OH) com o sinal em δ_c 130,0(C-4). Com relação aos hidrogênios do anel A (tetrasubistituído), H-7 em δ_H 6,95, correlacionou com os sinais δ_c 118,0(C-8a) e 137,2(C-5); e H-8 (δ_H 7,94) com os sinais em δ_c 137,2(C-5), 143,4(C-5a), 156,9(C-6) e 182,6(C-10). Estas correlações podem ser visualizadas na **figura 5.33**.

A diferença nos espectros de RMN das substâncias **4** e **5** e as análises dos mapas de correlações forneceram dados suficientes para a determinação inequívoca das posições das hidroxilas e metoxilas. Após análise dos resultados discutidos, confirma-se a substância **4** como sendo a estrutura do alcaloide acridônico 1,3,6-trihidroxi-2,4,5-trimetoxi-*N*-metilacridona, substância ainda não descrita na literatura, para a qual propusemos o nome de mastigoforina (*mastigophorine*), devido ao seu primeiro isolamento ocorrer de *C. mastigophorus*.

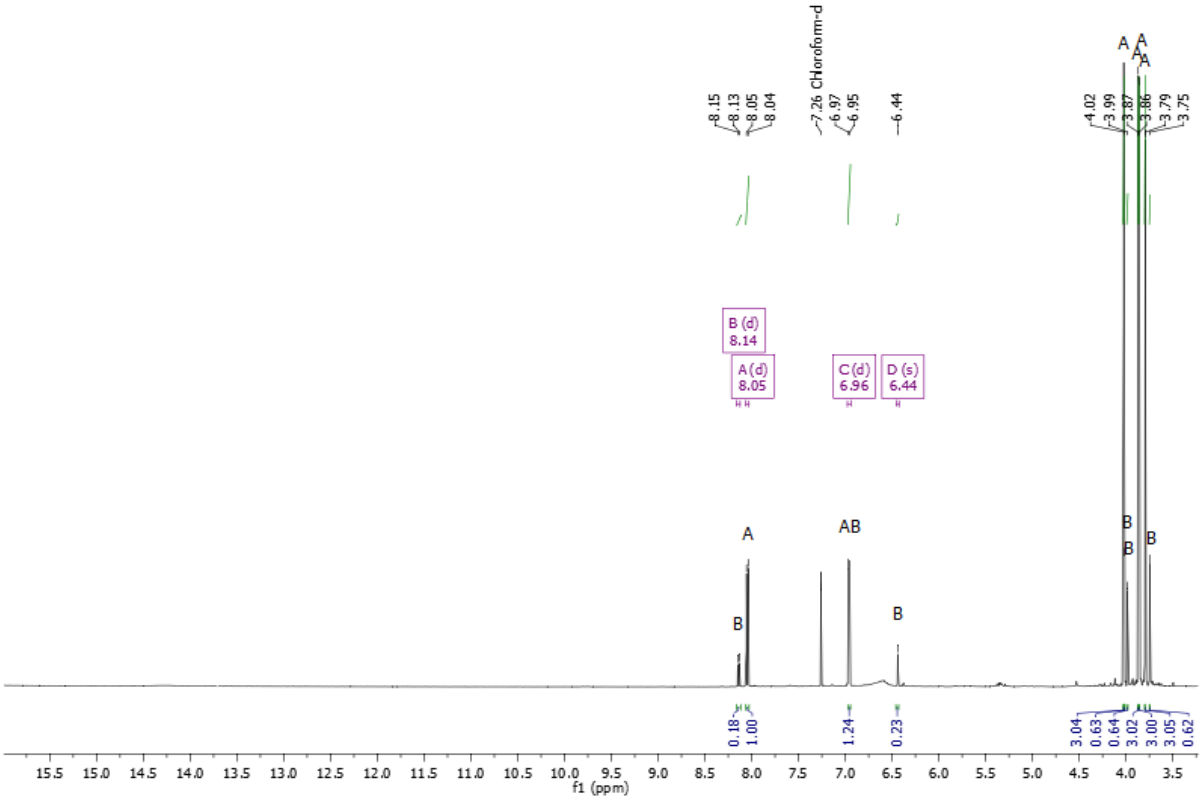


Figura 5.25. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM4, substância **4**(A) e substância 5(B).

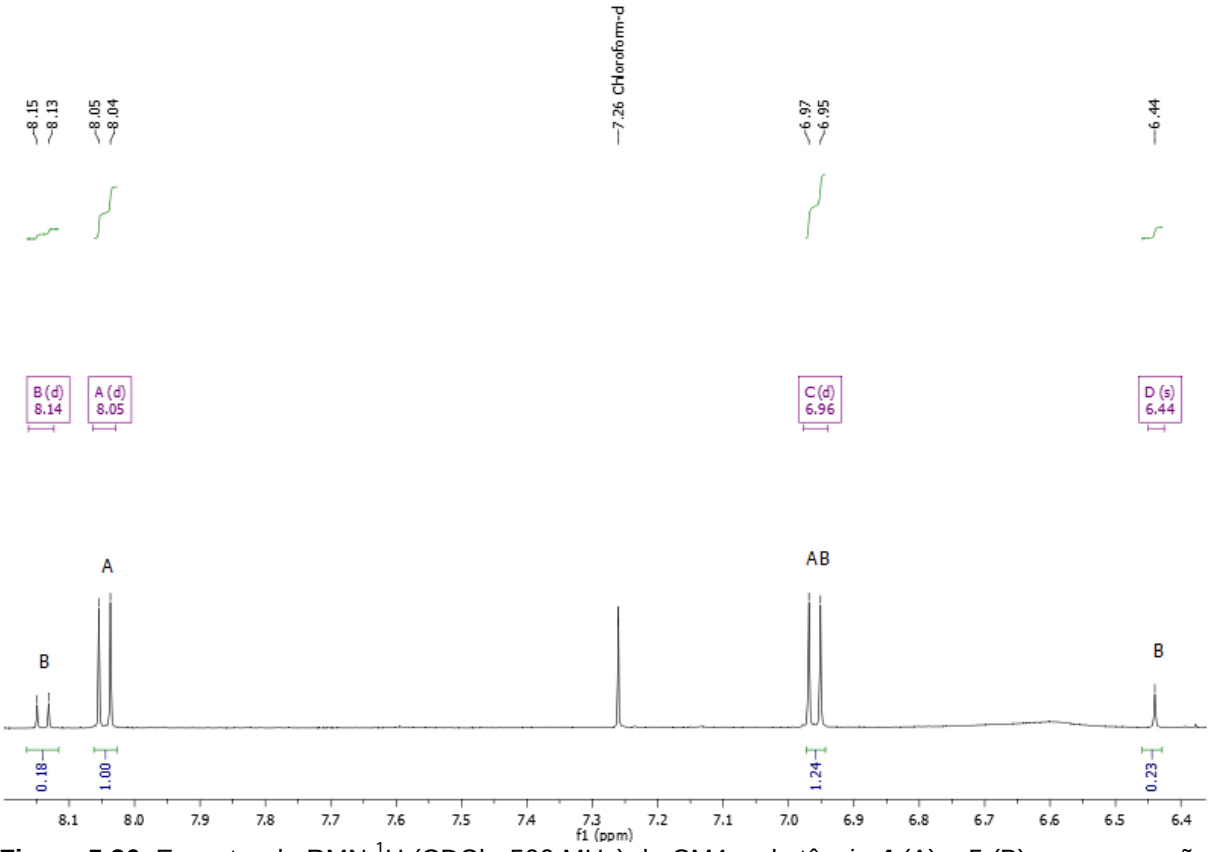


Figura 5.26. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM4, substância **4** (A) e 5 (B) com expansão da região de δ_H 8,0 a 6,4.

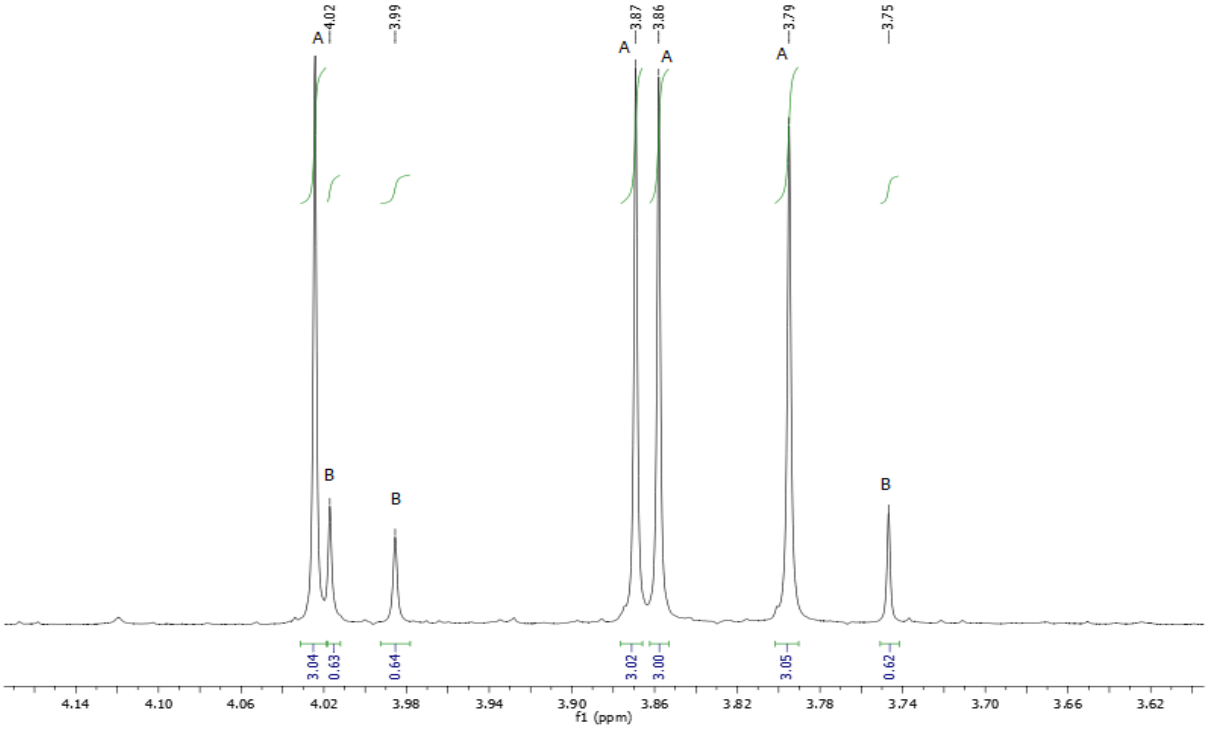


Figura 5.27. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM4 substância **4**(A) e 5 (B) com expandido da região de δ_H 4,14 a 3,62.

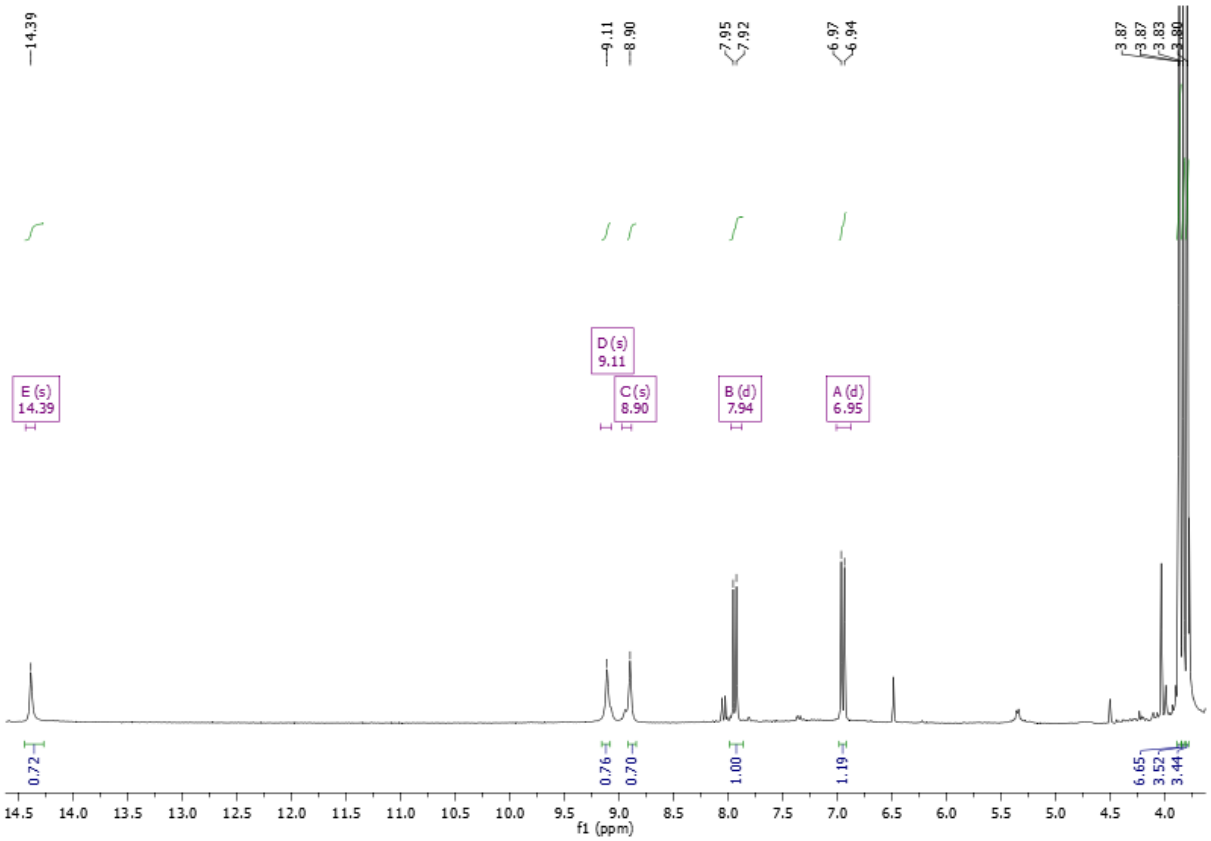


Figura 5.28. Espectro de RMN ^{1}H (acetona-d_6, 400 MHz) de CM4 da substância **4**.

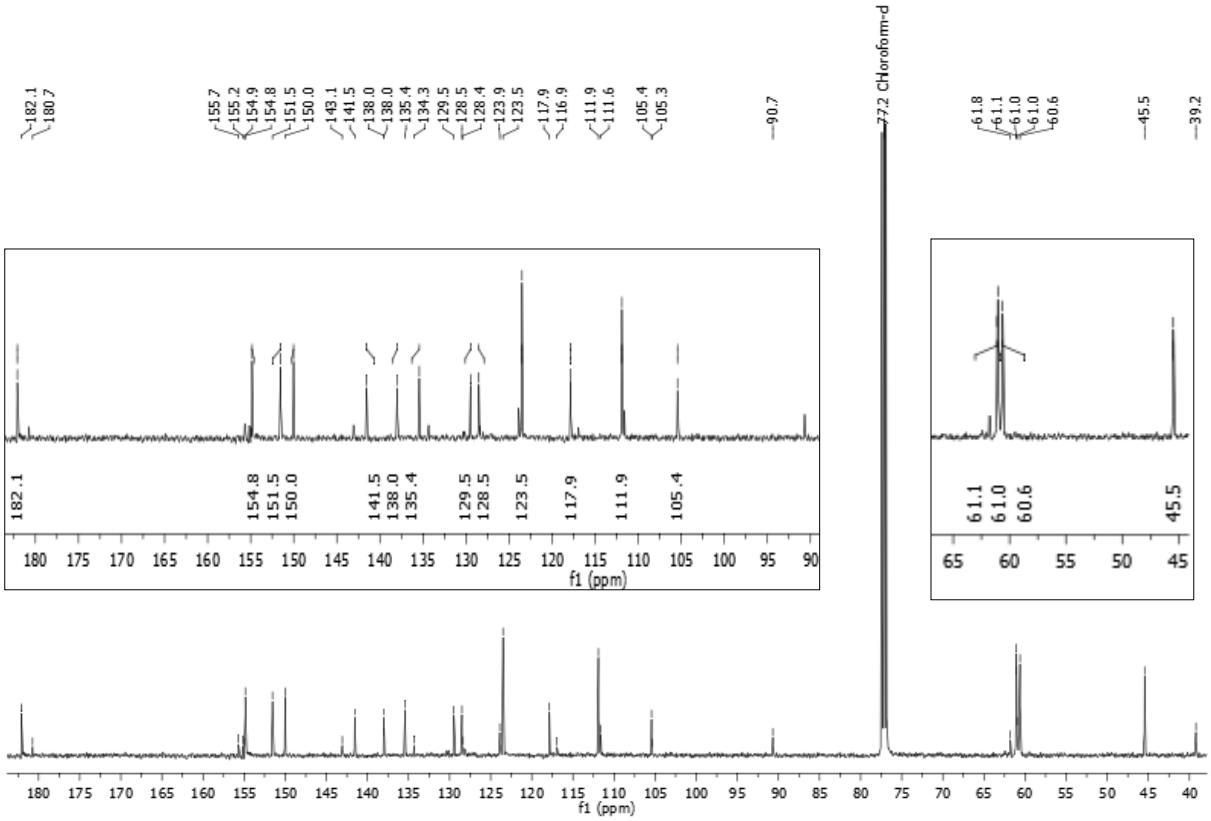


Figura 5.29. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de CM4 (destaque nos valores da substância 4).

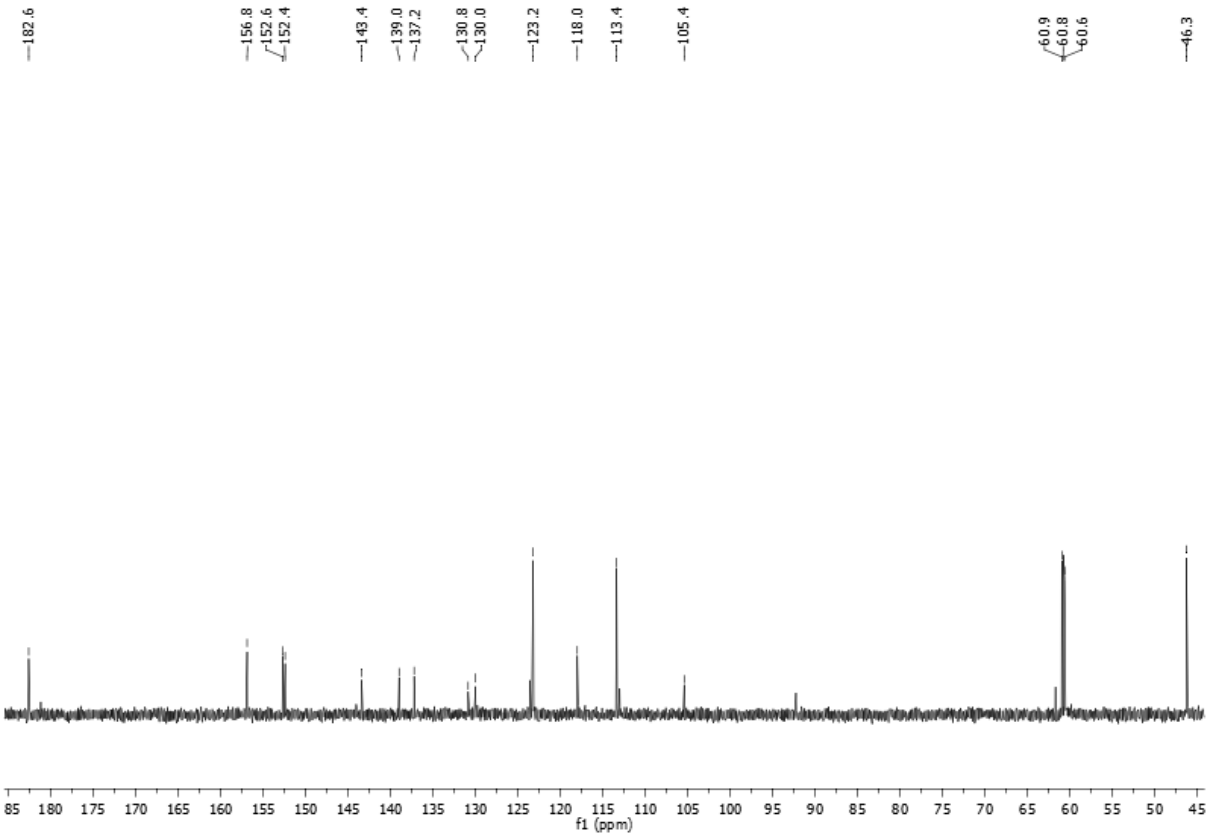


Figura 5.30. Espectro de RMN ^{13}C (acetona-d_6, 75 MHz) de CM4 da substância **4**.

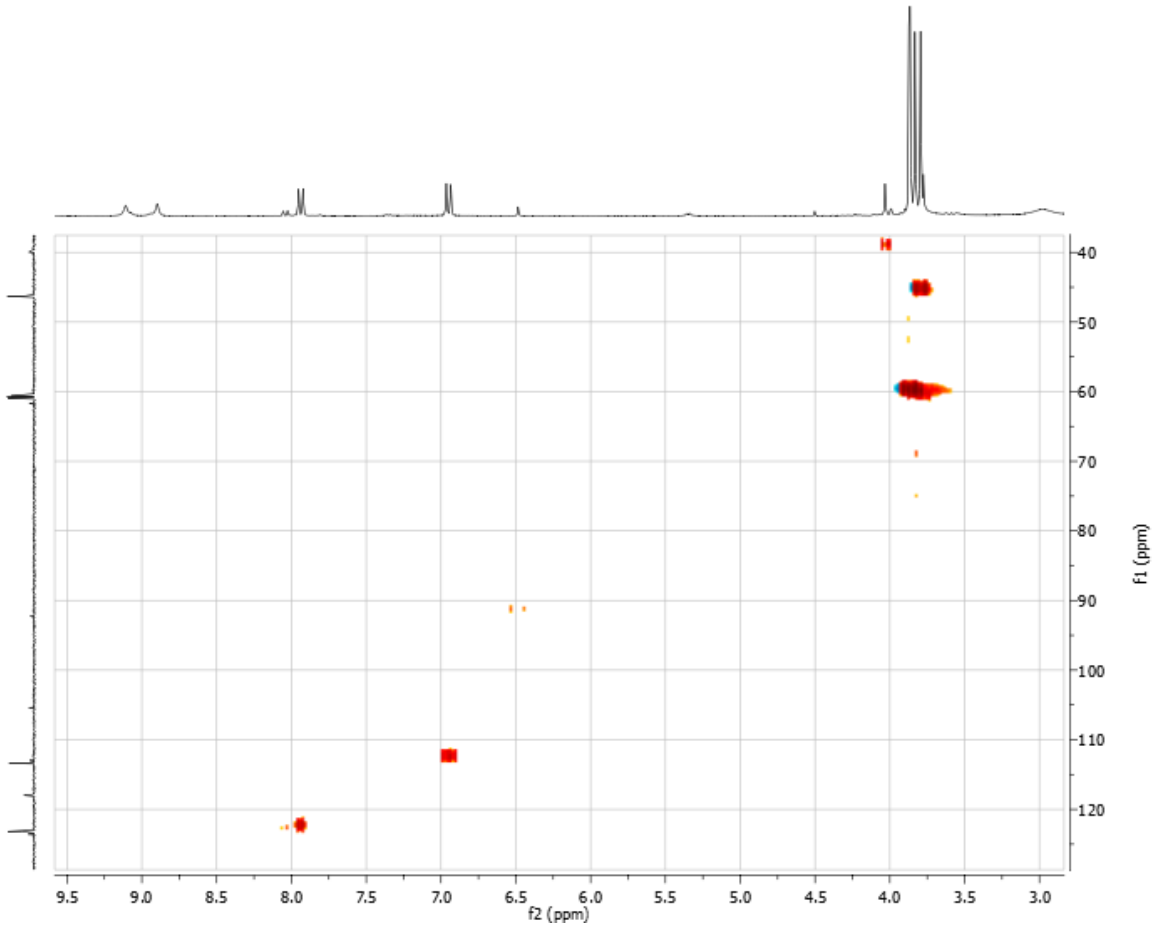


Figura 5.31. Mapa de contorno HSQC (acetona-d_6, 400 MHz) de CM4.

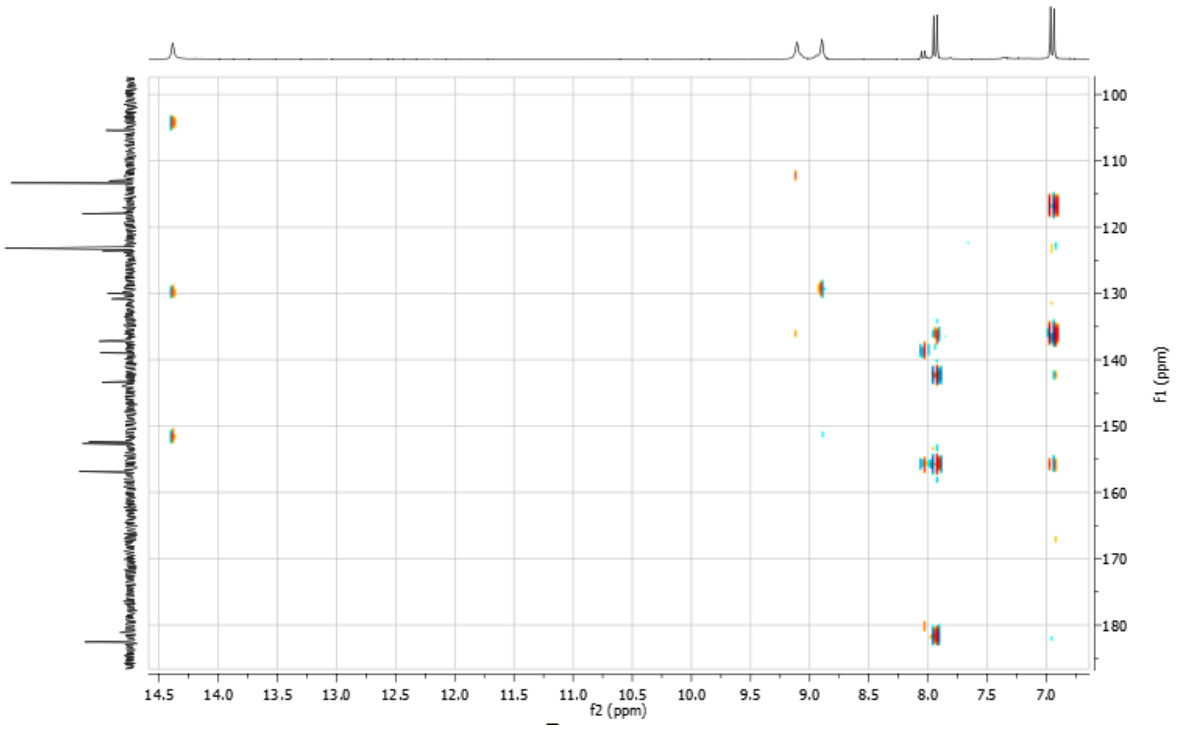


Figura 5.32. Mapa de contorno HMBC (Acetona-d_6, 400 MHz) de CM4.

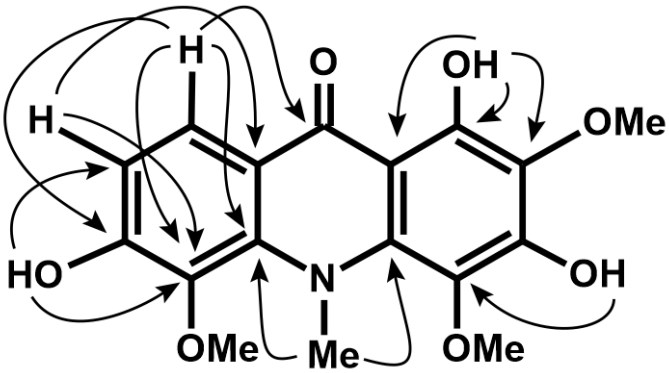


Figura 5.33. Correlação atribuídas de acordo a HMBC da substância **4**.

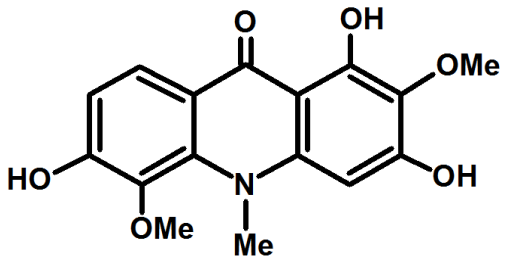
Tabela 5.5. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C da substância **4** em acetona-d_6

Posição	δ_H (Mult.)	δ_C
1-OH	14,39 (s)	152,6
2	---	130,8
2-OMe	3,87 (s)*	60,9*
3-OH	8,90 (s)	152,4
4	---	130,0
4-OMe	3,86 (*s*)*	60,8*
5	---	137,2
5-OMe	3,83 (*s*)*	60,6*
6-OH	9,11 (*s*)	156,8
7	6,95 (*d*, J = 8,8 Hz)	113,4
8	7,94 (*d*, J = 8,8 Hz)	123,2
9	---	182,6
4a	---	139,0
5a	---	143,4
8a	---	118,0
9a	---	105,4
10-NMe	3,80 (s)	46,3

* podem estar trocadas

5.1.4.2. Determinação estrutural de CM4B (substância 5)

O perfil espectrométrico da substância **5** (CM4B) se assemelha em muitos aspectos ao da substância **4** (CM4A). Sua identificação foi realizada baseada nos dados de RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, CG-EM e comparação destes dados com dados da literatura para o alcaloide acridônico 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxi-*N*-metilacridona (**5**).



5

Os sinais da substância **5** (CM4B) no espectro de RMN ^{1}H foram característicos aos de um alcaloide acridônico, e semelhantes aos da substância **4**. Os sinais em δ_H 8,14 (*d*, J=8,8 Hz) e δ_H 6,96 (*d*, J=8,8 Hz) foram atribuídos a H-8 e H-7, respectivamente; em δ_H 6,44 (s), foi atribuído ao H-4; em δ_H 4,02 (s), 3,99 (s) e 3,75 (s) atribuídos a dois grupos metoxila e uma metila ligada a nitrogênio. Dados que foram observados em $CDCl_3$ (**figuras 5.25** a **5.27**). No espectro em acetona-d_6, (**figura 5.35**) além dos sinais já discutidos, observou-se o sinal da hidroxila *peri* à carbonila, em δ_H 15,02, e outros dois sinais, em δ_H 9,08 e 8,94, referentes outras duas hidroxilas.

No espectro de RMN ^{13}C (**figura 5.34**) as principais diferenças observadas nos sinais da substância **5**, comparados aos da substância **4,** foram de C-4 em δ_c 90,7, valor característico a carbono hidrogenado no anel aromático; e o sinal do grupo metila ligado ao nitrogênio, que foi observado em δ_c 39,2, valor compatível com a ausência de substituinte em uma das posições *peri* ao grupo *N*-metil, neste caso em C-4 (FURUKAWA, et al., 1983b). Os demais sinais da substância **5** foram observados em δ_c: 180,7; 155,7; 155,2; 154,9; 143,1; 138,0; 134,3; 128,4; 123,9; 116,9; 111,6; 105,3; 90,7; 61,8; 61,0 e 39,2.

A análise destes dados e comparação (**tabela 5.6**) com dados da literatura (JU-ICHI et al., 1988) permitiu fazer as atribuições para o alcaloide acridônico 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxi-*N*-metilacridona, conhecido como citramina. Muitos tipos de

alcalóides acridônicos são descritos na literatura, mas substâncias do tipo 1,2,3,5,6-pentaoxigenados são raras e a citramina é um desses exemplos de fonte natural.

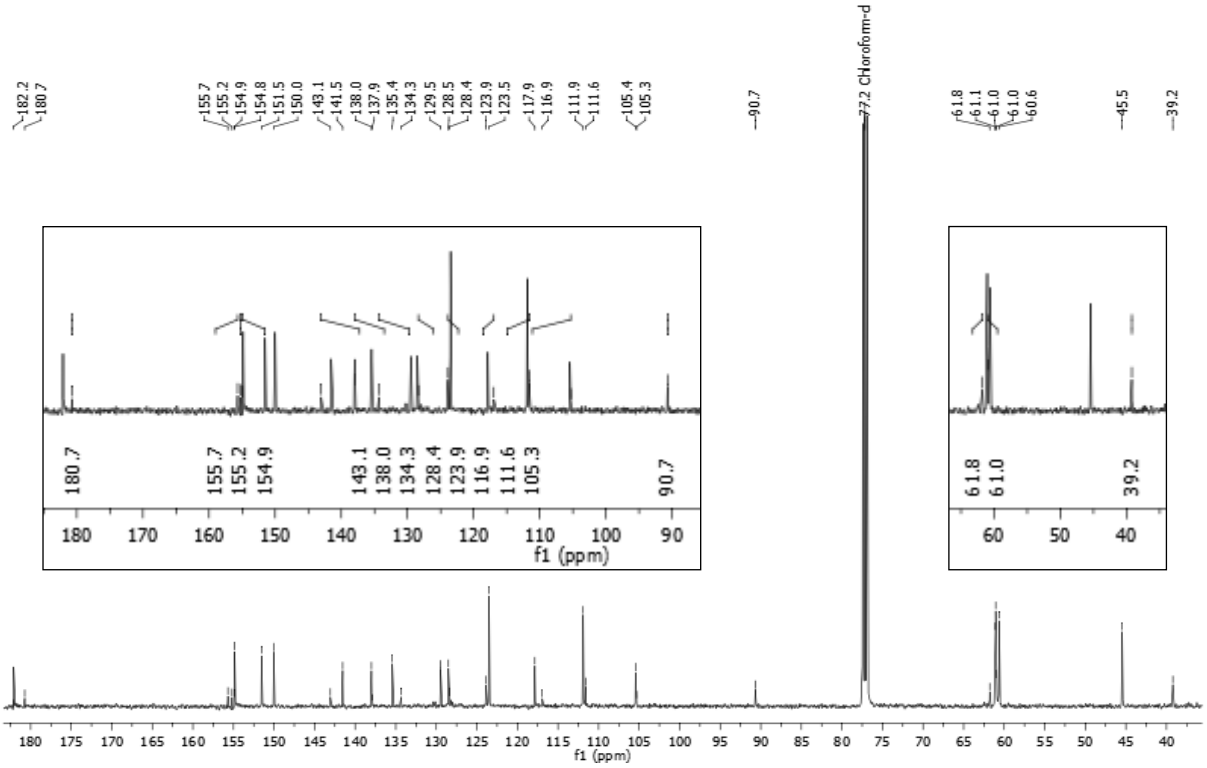


Figura 5.34. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de CM4 com destaque para substância **5**.

Tabela 5.6. Comparação dos dados de RMN ^{1}H da substância **5** em acetona-d_6 com dados da literatura para a citramina

	substância 5	**citramina**
Posição	**δ_H** (Mult.)	**δ_H ***(Mult.)
1-OH	15,02 (s)	15,03 (s)
3-OH	9,08 (s)	9,04 (s)
4	6,49 (s)	6,49 (s)
6-OH	8,94 (s)	8,91 (s)
7	6,96 (d, J=8,8 Hz)	6,95 (d, J=8,8 Hz)
8	8,04 (d, J=8,8 Hz)	8,05 (d, J=8,8 Hz)
10-NMe	4,03 (s)	4,04 (s)

* (JU-ICHI et al., 1988)

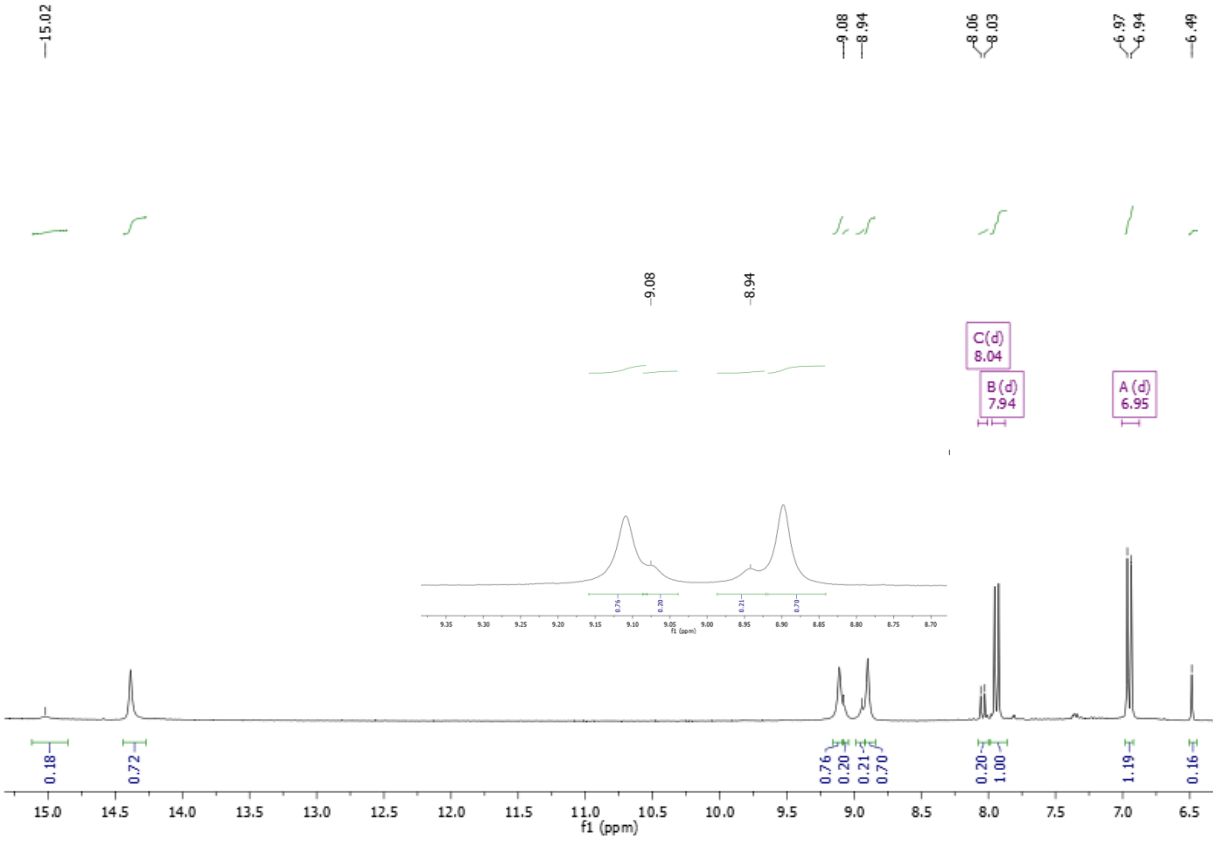


Figura 5.35. Espectro de RMN ^{1}H (acetrona-d$_6$, 400 MHz) de CM4, com valores sinalizados da substância **5** (minoritário), com expansão da região de δ_H 6,5 a 15,2.

5.1.5. Determinação estrutural dos constituintes de CM5 (substâncias 6 e 7)

A fração CM5 (26,5 mg), constituída de um sólido amorfo amarelo claro, foi obtida do grupo ACLCM 25.5. Esta foi analisada por CG-EM e o cromatograma (**figura 5.36A**) apresentou um pico principal (pico 2) e três minoritários (picos 1, 3 e 4). Entretanto, serão discutidos somente os dados das substâncias correspondentes aos picos 1 e 2, que foram denominadas CM5A e CM5B, respectivamente, e identificadas como substâncias **6** e **7**.

O espectro de massas (**figura 5.36C**) do constituinte majoritário (CM5B) desta fração apresentou a mesma massa e grande semelhança com o espectro de massas da marmesina (substância **7**), enquanto o espectro de massas (**figura 5.36B**) do outro constituinte apresentou o pico do íon molecular *m/z* 229 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{11}NO_3$ e semelhante ao espectro de massas da γ-Fagarina (substância **6**). A identificação das substâncias **6** e **7** será apresentada a seguir.

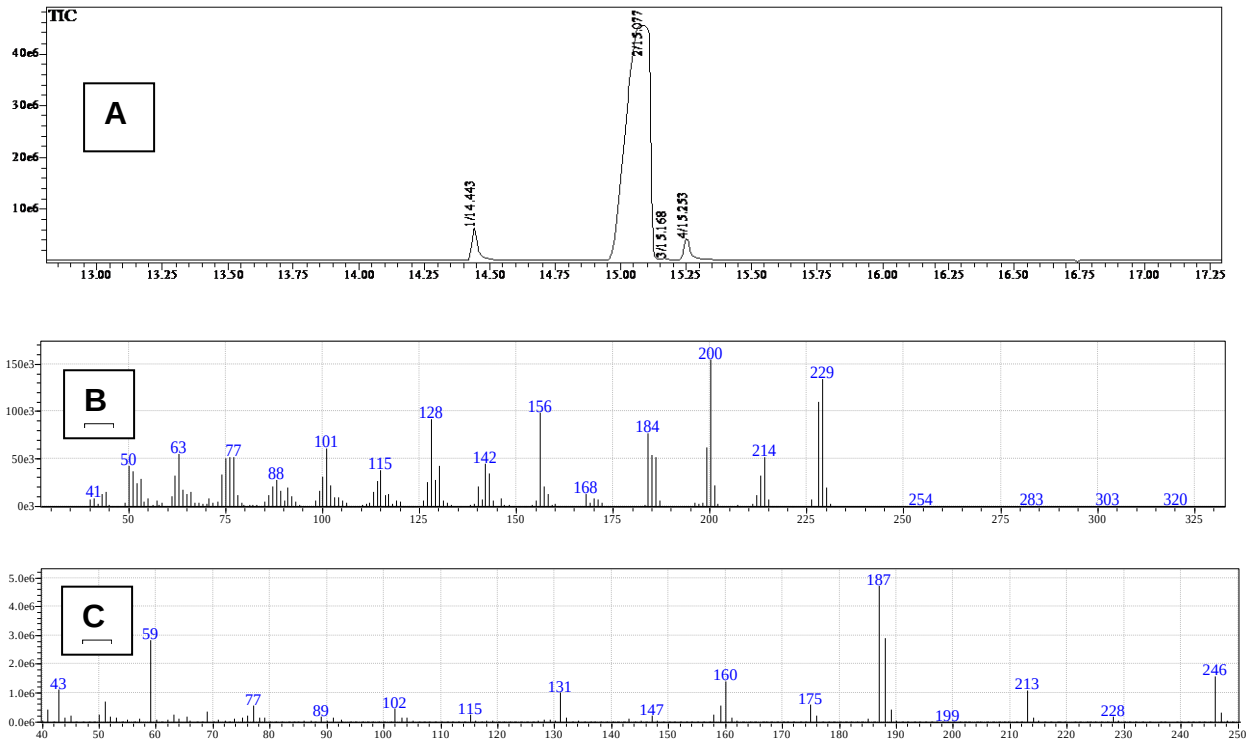
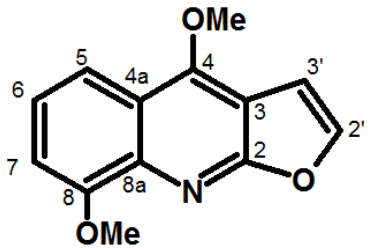


Figura 5.36. Cromatograma obtido para CM5 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **6**; C) Espectro de massas da substância **7**.

5.1.5.1 Determinação estrutural de CM5A (substância 6)

A substância **6** (CM5A), um dos constituintes minoritários de CM5, foi obtida em mistura com a substância **7**, e ainda duas outras substâncias (**4** e **5**). Esta foi caracterizada pela análise dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C, além de CG-EM.



(6)

Os sinais correspondentes à substância **6**, no espectro de RMN ^{1}H (**figura 5.37** a **5.39**) de CM5, foram observados em δ_H 7,83 (dd, J= 8,6 e 1,1 Hz) referente a H-5, hidrogênio mais desblindado, sugerindo assim a presença dos hidrogênios H-6 e H-7. O sinal de H-6 em δ_H 7,39 apresentou-se como um duplo dupleto devido aos acoplamentos em orto com H-5 (J=8,6 Hz) e H6 (J= 7,5 Hz). O hidrogênio H-7 então foi atribuído ao sinal em δ_H 7,09 (dd, J= 7,7 e 0,9 Hz). Os sinais em δ_H 7,67 (d, J=2,7 Hz) e δ_H 7,13 (d, J=2,7 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente, característicos do anel furânico. Os sinais em δ_H 4,49 (s, 3H) e 4,07 (s, 3H) sugerem a presença de duas metoxilas, sendo que o sinal em δ_H 4,49 é característico para metoxilas em C-4 de anel furoquinolínico e o sinal δ_H em 4,07 referente à metoxila em C-8. Os valores estão de acordo com aqueles da literatura (**tabela 5.7**) para a γ-Fagarina.

Por se tratar de uma mistura de quatro substâncias, no espectro de RMN ^{13}C (**figura 5.40**) foram distinguidos os sinais da substância **6**, por comparação com dados da literatura (PAULINI et al., 1989).

Da análise do espectro de massas da substância **6** (**figura 5.36**) observou-se o pico do íon molecular *m/z* 229 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{11}NO_3$. Os picos correspondentes a fragmentos em *m/z* 214, 200, 199, 186, 185, 184, 156 e 75 também estão de acordo a literatura (PAULINI et al., 1989) para a γ-fagarina, um alcaloide furoquinolínico, amplamente distribuído na família Rutaceae (MESTER, 1983). A γ-fagarina demonstrou um grande potencial antioxidante de acordo com (FERNANDES, 2011).

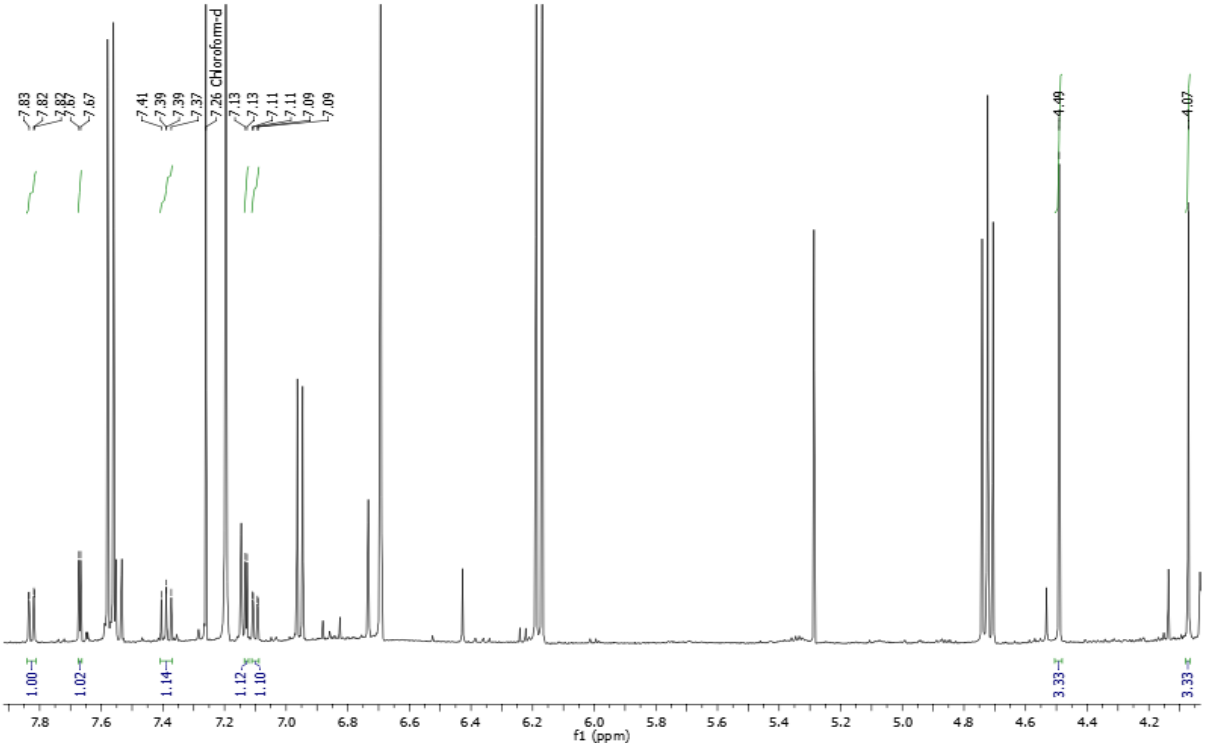


Figura 5.37. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5, com integração dos sinais da substância **6** (CM5A) .

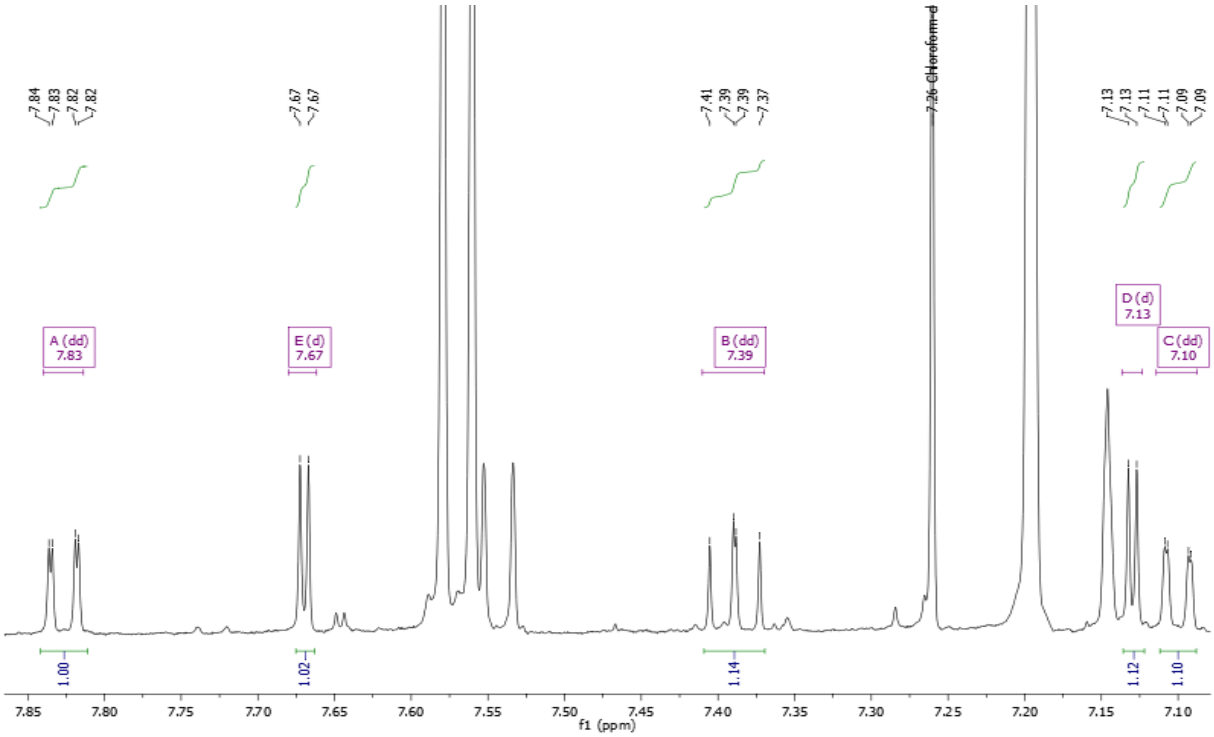


Figura 5.38. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5, com expansão da região de δ_H 7,10 a 7,85 e com destaque para os sinais da substância **6**.

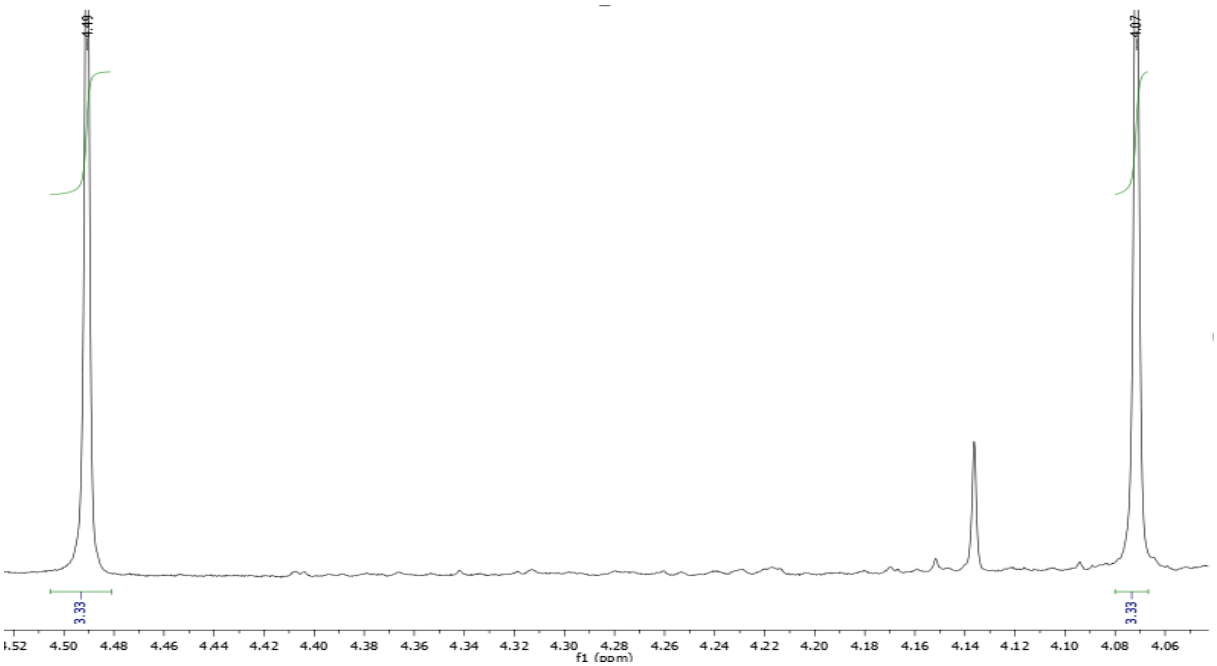


Figura 5.39. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5, com expansão da região de δ_H 4,06 a 4,52 e com destaque para os sinais da substância **6**.

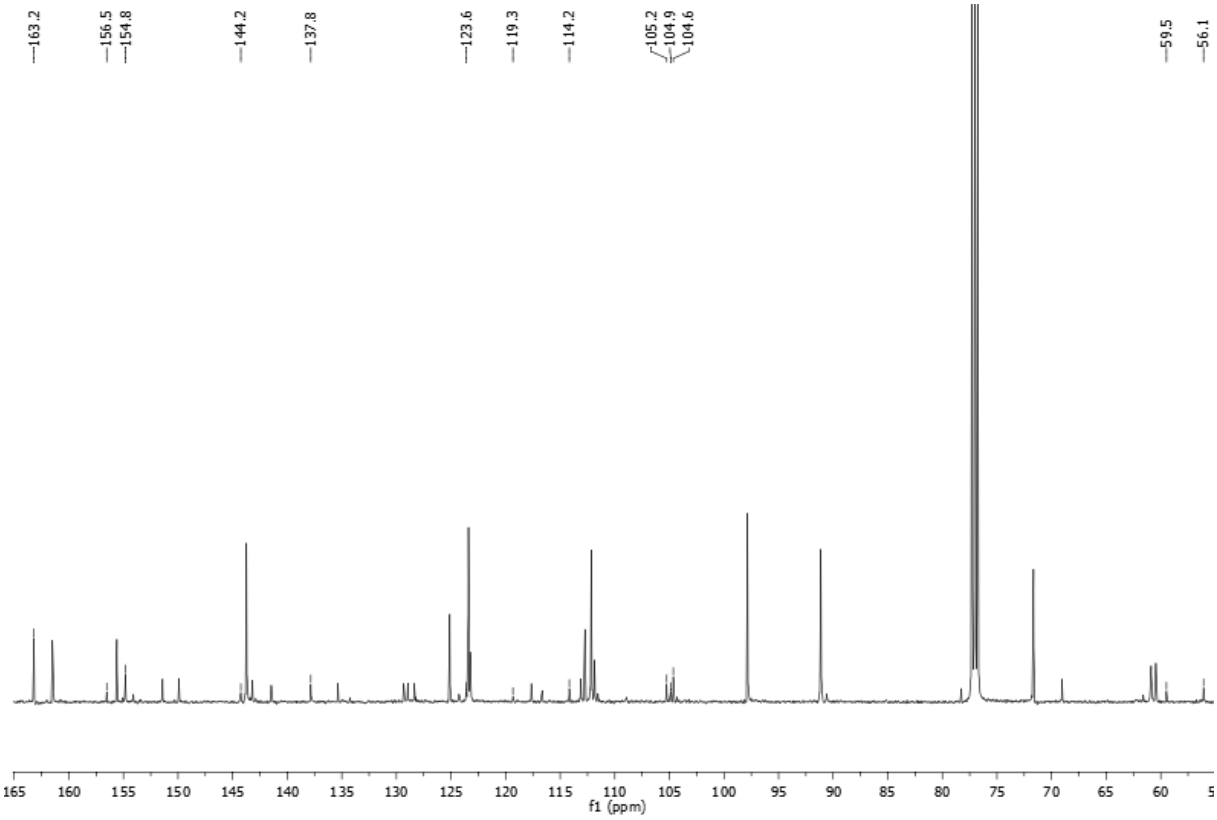


Figura 5.40. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de CM5, com valores de δ_C para CM5B (substância **6**).

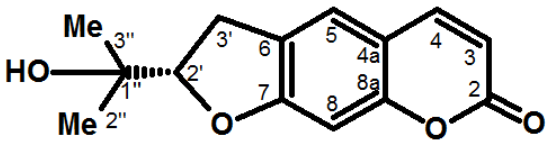
Tabela 5.7. Comparação dos dados de RMN ^{1}H da substancia **6** com dados da literatura para a γ-Fagarina.

Posição	substância 6	γ-Fagarina
	δ_H (Mult.)	δ_H *(Mult.)
5	7,83 dd (J=8,6 e 1,1 Hz)	7,83 dd (J=9,0 e 1,5 Hz)
6	7,39 dd (J=8,5 e 7,5 Hz)	7,34 dd (J=9,0 e 8,0 Hz)
7	7,10 dd (J=7,7 e 0,9 Hz)	7,04 dd (J=8,0 e 1,5 Hz)
2'	7,67 d (J=2,7 Hz)	7,63 d (J=3,0 Hz)
3'	7,13 d (J=2,7 Hz)	7,06 d (J=3,0 Hz)
4-OCH_3	4,49 *s*	4,44 *s*
8-OCH_3	4,07 *s*	4,07 *s*

* PAULINI et al., 1989

5.1.5.2. Determinação estrutural de CM5B (substância 7)

A substância **7** (**CM5B**), constituinte majoritário de CM5, foi obtidas em mistura com outros três constituintes minoritários (substâncias **4**, **5** e **6)** como descrito no item 5.1.5.1, e foi identificada com base no dados de RMN ^{1}H e ^{13}C e CG-EM, e comparação com a literatura, como a cumarina marmesina.



7

No espectro de RMN ^{1}H (**figura 5.41** a **5.44**) de CM5, os sinais de **CM5B** foram observados em δ_H 7,57 (d, 9,5 Hz) e 6,18 (d, 9,5 Hz), sugerindo a presença de um esqueleto cumarínico, sendo estes sinais característicos dos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. Os sinais em δ_H 6,69 (1H, s) e 7,20 (1H, s), foram atribuídos a H-8 e H-5, respectivamente. Os sinais do anel dihidrofurano foram observados em δ_H 4,72 (dd, 9,2 e 8,5 Hz, H-2'), 3,22 (m, H-3'a) e 3,21 (m, H-3'b). Os sinais referentes ao grupo hidróxi-isopropila foram observados em δ_H 1,36 (3H, s) e 1,23 (3H, s).

No espectro de RMN ^{13}C de CM5 (**figura 5.45**) foram observados 14 sinais para a substância **7 (CM5B)**, em δ_C: 163,2 (C-7), 161,5 (C-2), 155,6 (C-8a), 143,7

(C-4), 125,1 (C-6), 123,4 (C-5), 112,7 (C-4a), 112,2 (C-3), 97,9 (C-8), 91,1 (C-2'), 71,7 (C-1''), 29,5 (C-3'a e b), 26,0 (C-2''), 24,3 (C-3'').

Analisando os dados dos espectros e fazendo comparação (**tabela 5.8**) com a literatura (ISIDORO et al., 2012) foi possível determinar a natureza da substância **7** como a cumarina marmesina. Essa substância foi submetida a ensaios de inibição do transporte de elétrons basal, no qual demonstrou atividade (SÁ, 2010).

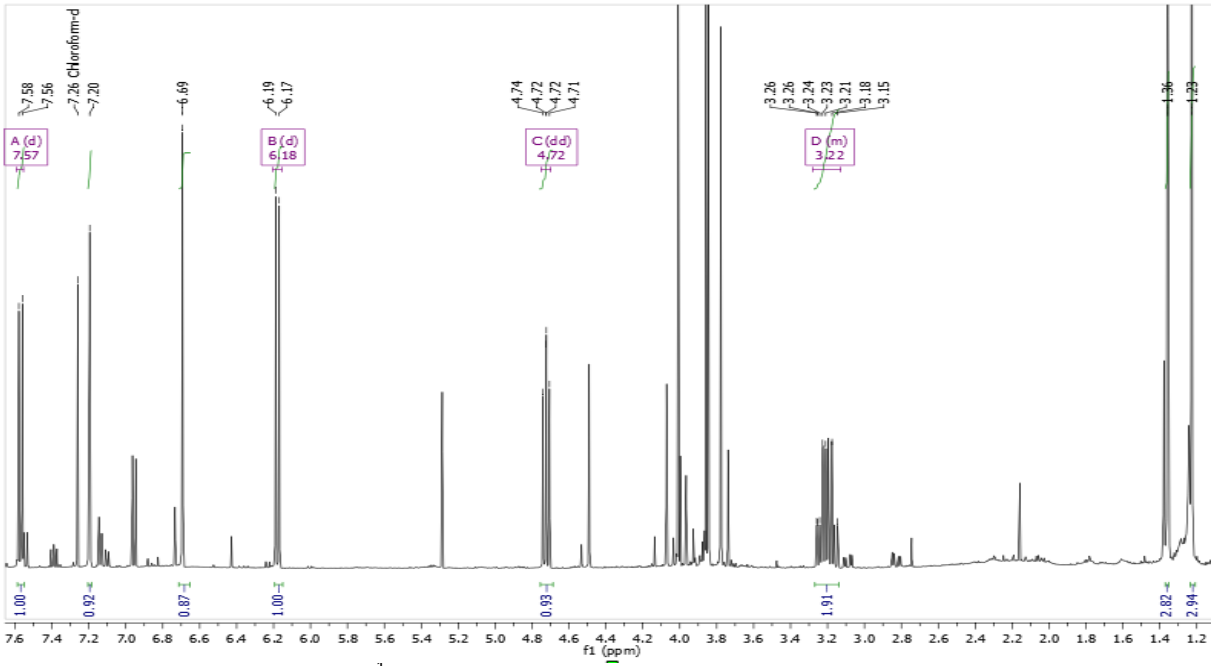


Figura 5.41. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 da mistura de quatro substâncias e integrados para CM5B (substância 7).

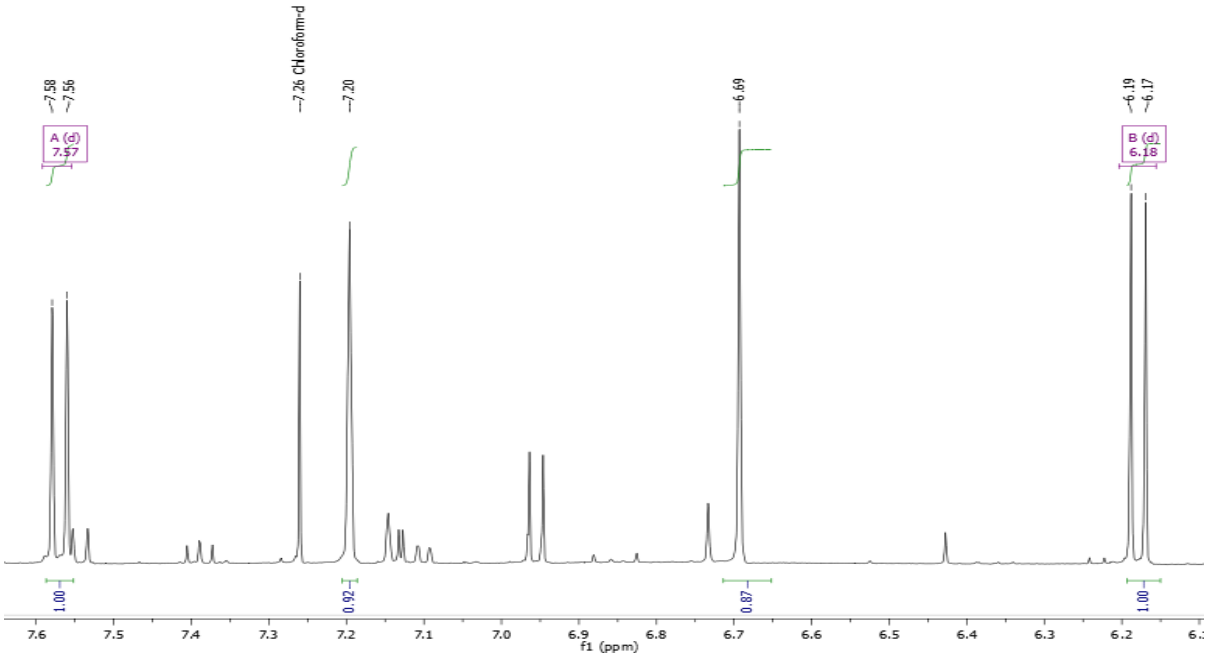


Figura 5.42. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5 expandido na região de δ_H 6,1 a 7,6.

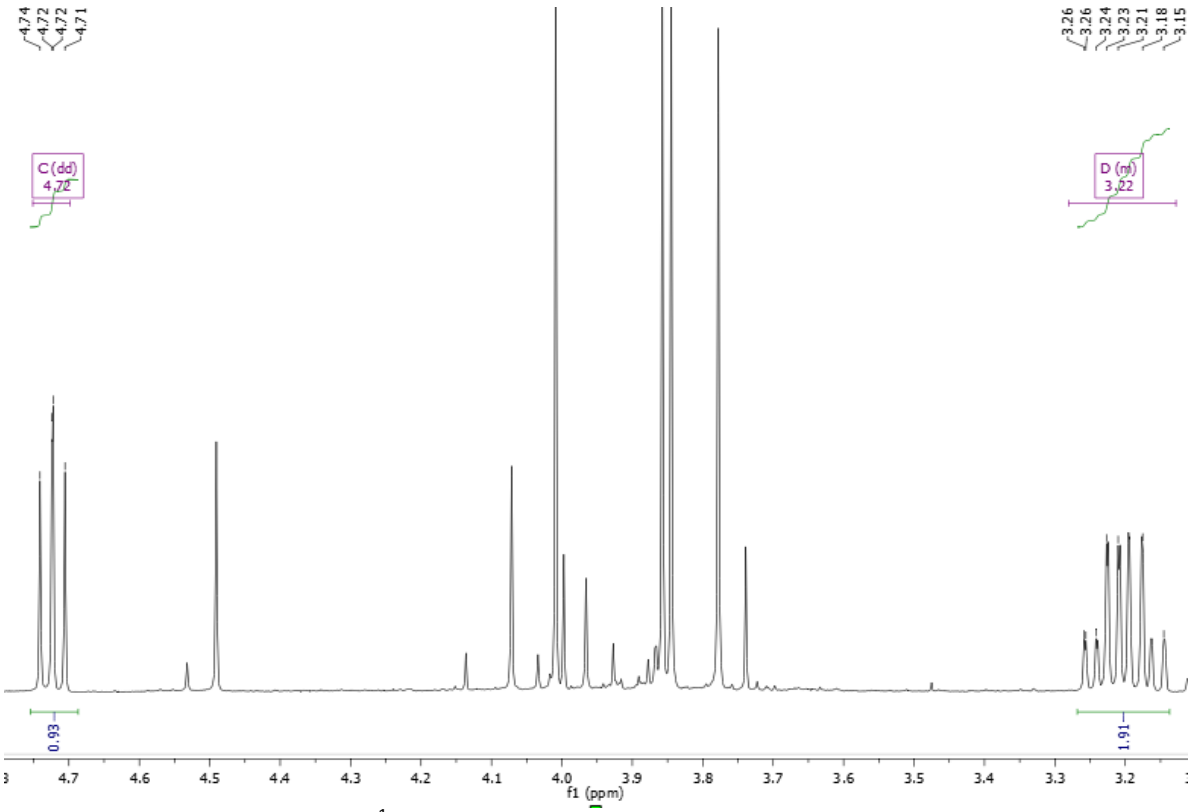


Figura 5.43. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5, com expansão da região de δ_H 3,1 a 4,8 (anel di-hidrofurano) da substância **7**.

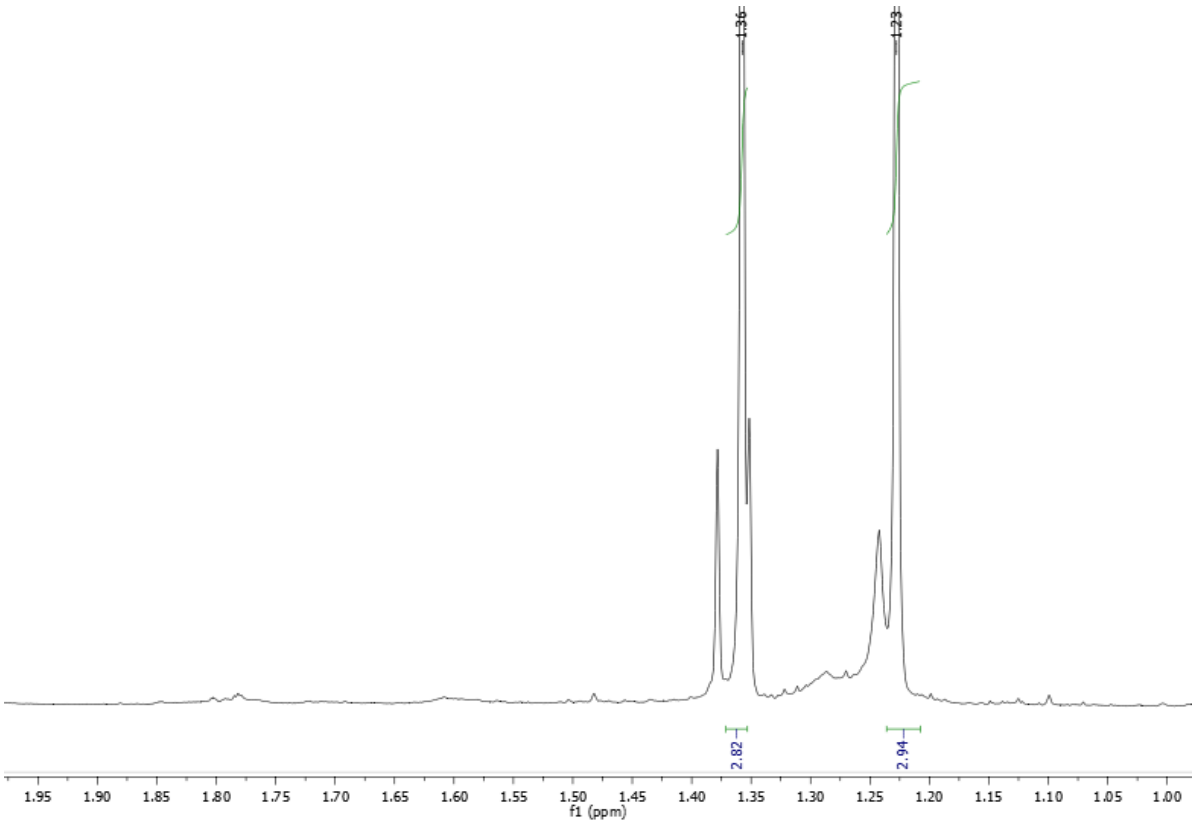


Figura 5.44. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM5, com expansão na região de δ_H 1,00 a 1,95, e destaque para os hidrogênios hidróxi-isopropila da substância **7**.

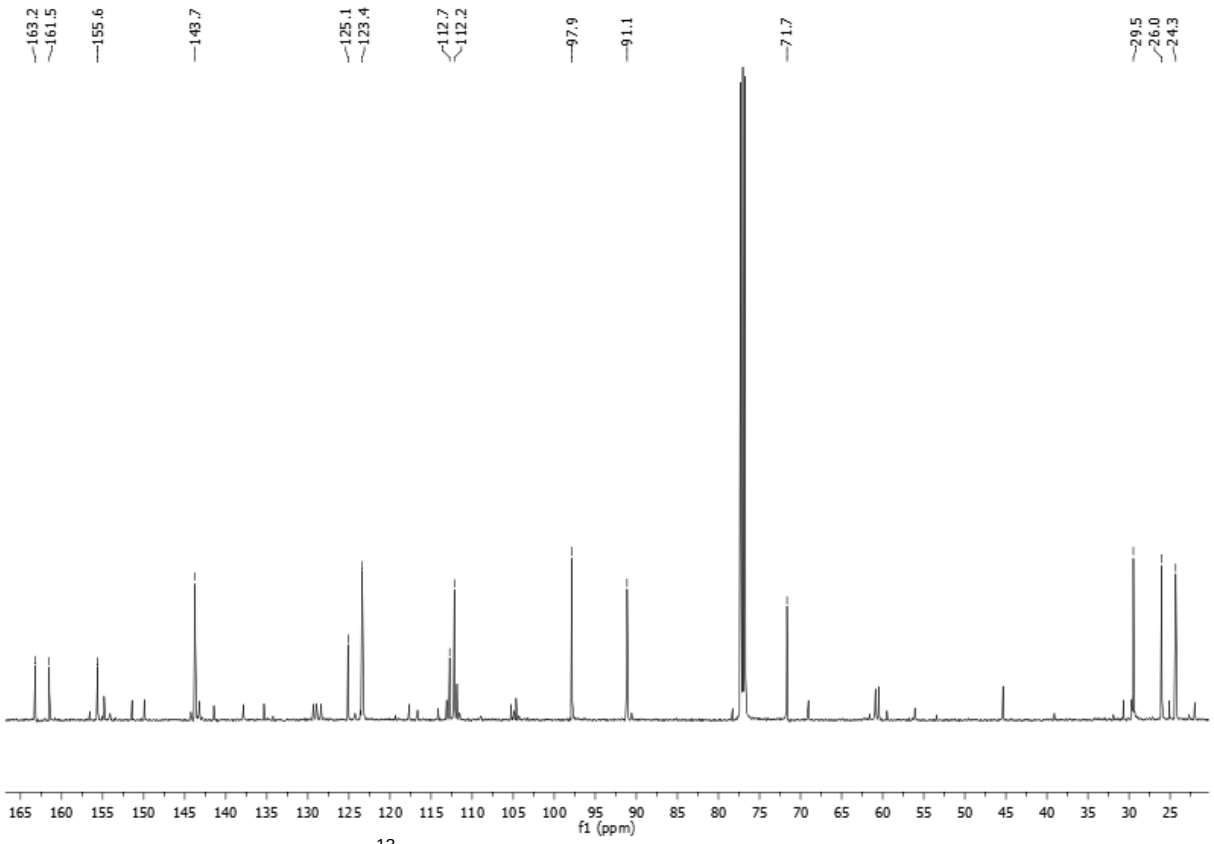


Figura 5.45. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$,125 MHz) de CM5, com destaque para os sinais referentes à substância **7**.

Tabela 5.8. Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C ($CDCl_3$) de CM5B (substância **7**) comparados aos dados da literatura (ISODORO et al*.,* 2012) para a marmesina.

	Substância 7		**marmesina**	
Posição	**δH** (Mult.)	**δC**	**δH*** (Mult.)	**δC***
2	---	161,5	---	161,1
3	6,18 (d, 9,5)	112,2	6,22 (d, 9,4)	112,3
4	7,57 (d, 9,5)	143,7	7,60 (d, 9,4)	139,4
4a	---	112,7	---	113,7
5	7,20 (sl)	123,4	7,22 (sl)	123,4
6	---	125,1	---	125,0
7	---	163,2	---	163,3
8	6,69 (s)	97,9	6,75 (s)	97,9
8a	---	155,6	---	155,7
2’	4,72 (dd, 9,2 e 8,5)	91,1	4,74 (dd, 9,2 e 8,5)	91,1
3’a	3,22 (m)	29,5	3,22 (ddd, 14,8, 8,5 e 1)	29,5
3’b	3,21 (m)	29,5	3,19 (ddd, 14,8, 9,2 e 1)	29,5
1’’	---	71,7	---	71,6
2’’	1,36 (s)	26,0	1,38 (s)	26,2
3’’	1,23 (s)	24,3	1,24 (s)	24,2

5.1.6. Determinação estrutural dos constituintes de CM6 (substâncias 8 e 9)

A fração CM6 (7,5 mg) foi obtida na forma de um sólido amorfo alaranjado da fração ACLCM25.9 e revelou em reagente de Dragendorff, com uma cor alaranjada, indicando a presença de alcaloide. Esta foi analisada por CG-EM e o cromatograma (**figura 5.46A**) apresentou dois picos principais com uma proporção relativa de 100:60, denominados CM6A (majoritário) e CM6B. O espectro de massas (**figura 5.46B**) do constituinte majoritário (substância **8**), apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 189 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{11}NO_2$. O espectro de massas (**figura 5.46C**) de CM6B (substância **9**) apresentou o pico do íon molecular *m/z*=205 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{11}NO_3$.

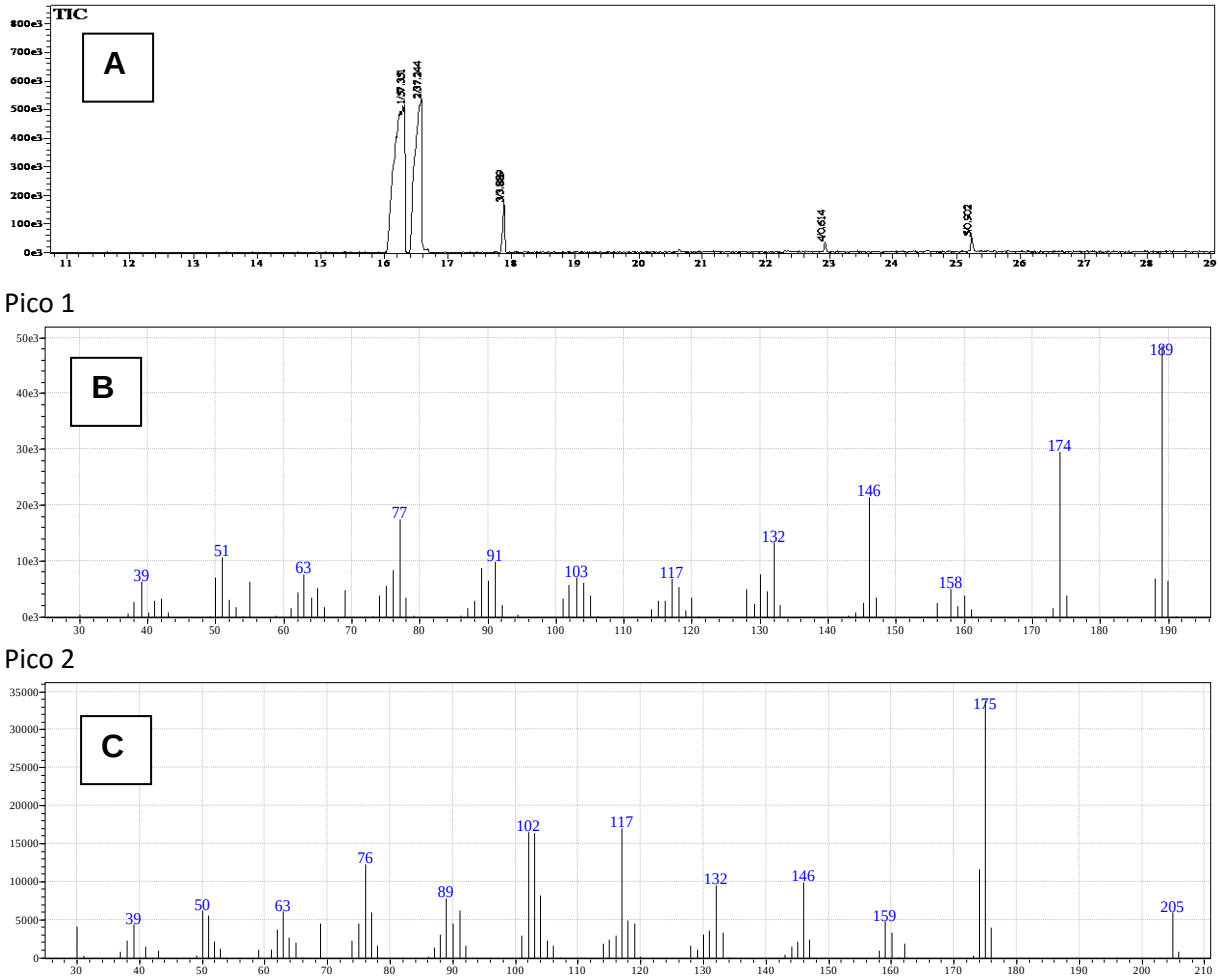
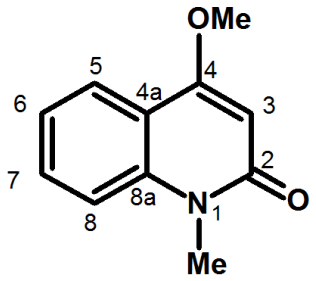


Figura 5.46. A) Cromatograma obtido para CM3 após análise por CG-EM; e B) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **8** e C) Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **9**.

5.1.6.1 Determinação estrutural de CM6A (substância 8)

A substância **8** (CM6A) foi obtida em mistura com a substância **9** (CM6B) e outros constituintes em baixa concentração. Ela foi identificada pela análise dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C, HMBC, HSQC e por CG-EM, e também, por comparação de dados da literatura, como o alcaloide 1-metil-4-metoxi-2-quinolona.



8

No espectro de RMN ^{1}H de CM6 (**figura 5.47** a **5.48**) foram observados sinais referentes às duas substâncias CM6A e CM6B. Para CM6A, observou-se quatro sinais, todos com integração para um hidrogênio, típicos de anel aromático dissubstituído, sendo dois multipletos, em δ_H 7,61-7,66 (H-7) e em δ_H 7,25-7,30 (H-6); um duplo dupleto, em δ_H 7,99 (J= 8,5 e 1,3 Hz, H-5); e um dupleto largo em δ_H 7,37 (J= 8,5 Hz, H-8). Além destes, foram observados um sinal em δ_H 6,17 (s, H-3), característico de alcaloides 2-quinolônicos, com substituição em C-4; e dois singletos em δ_H 3,97, referente ao grupo metoxila em C-4, e em δ_H 3,69, referente ao grupo *N*-metil. Os valores para cada hidrogênio foram atribuídos de acordo com as correlações observadas no HMBC que serão mostradas a seguir.

No espectro de RMN ^{13}C (**figura 5.49**) foram atribuídos 11 sinais de carbonos de acordo com a literatura, e com as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HSQC. A análise do mapa de contorno de HSQC de CM6 (**figura 5.50**) mostrou as correlações, para a substância **8,** entre os seguintes sinais: em δ_H 7,37 (H-8) e em δ_C 114,3; em δ_H 7,99 (H-5) e em δ_C 123,6; em δ_H 7,61-7,65 (H-7) e em δ_C 131,6; em δ_H 7,25-7,30 (H-6) e em δ_C 122,6; em δ_H 6,17 (H-3) e em δ_C 96,2; em δ_H 3,69 (N-Me) com δ_C 29,5; e em δ_H 3,97 (OMe) com δ_C 56,1.

O mapa de contorno de HMBC (**figura 5.51**) mostrou as seguintes correlações: do sinal em δ_H 7,99 (H-5) com os sinais em δ_C 163,2 (C-4), 139,7 (C-8a) e 131,6 (C-7); em δ_H 7,61-7,66 (H-7) com os sinais em δ_C 139,7 (C-8a), 114,3 (C-8), 123,6 (C-5); em δ_H 7,37 (H-8) com os sinais em δ_C 122,6 (C-6) e 116,8 (C-4a); do

sinal em δ_H 6,17 (H-3) com os sinais em δ_C 163,2 (C-4) e 116,8 (C-4a); em δ_H 3,97 (OMe) com o sinal em δ_C 163,2 (C-4); e em δ_H 3,69 (N-Me) com os sinais em δ_C 139,7 (C-8a) e 164,1 (C=O), Esta última correlação evidenciou a posição da carbonila, caracterizando o alcaloide como do tipo 2-quinolônico. A partir das correlações observadas de HMBC (**figura 5.52**) e HSQC foi possível atribuir todos os sinais de carbono e hidrogênio da substância **8**, os quais são apresentados na **tabela 5.9**, que também mostra a comparação dos dados de RMN ^{1}H com aqueles da literatura (NAYAR et al., 1971; ALBARICI, 2006), para o alcaloide 1-metil-4-metoxi-2-quinolona, substância isolada de *Hesperethusa crenulata* (Roxb.) (NAYAR et al., 1971). Essa substância foi submetida a ensaios e foi observada uma significativa atividade tripanocida (AMBROZIN, 2004).

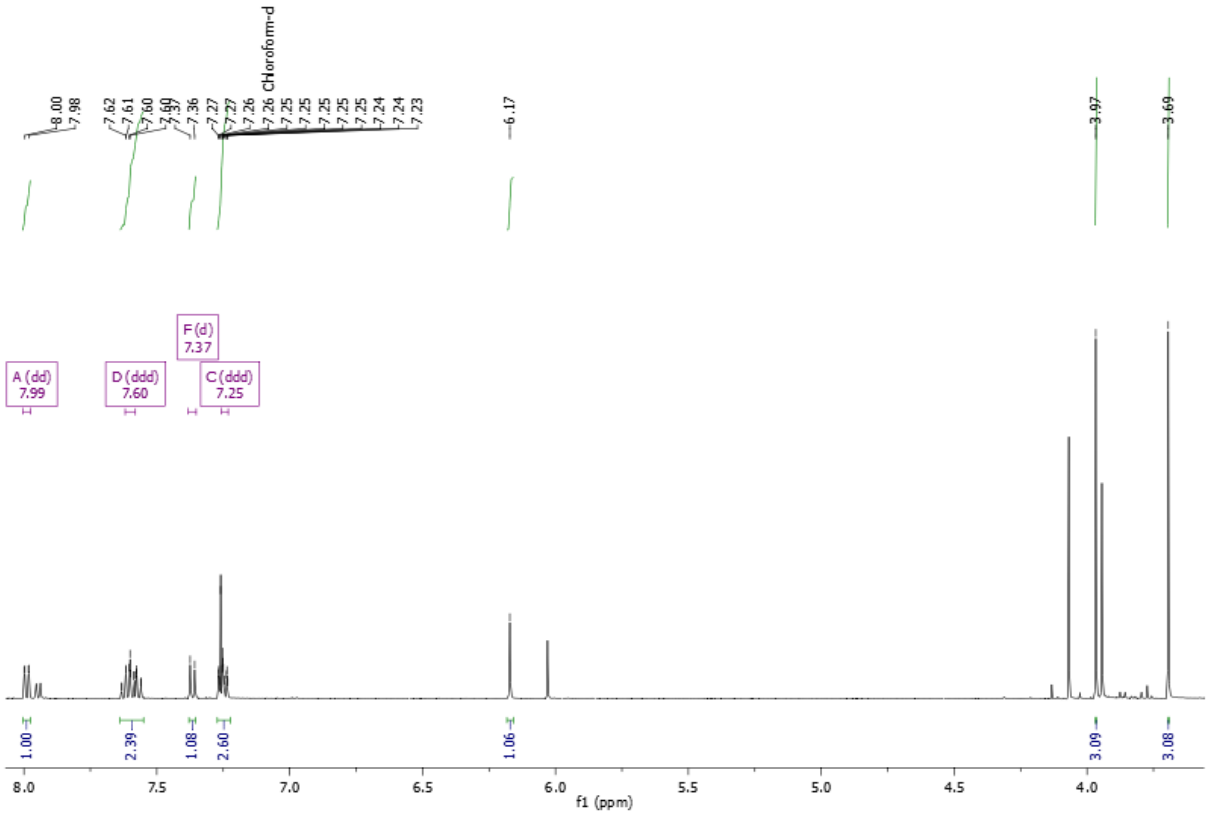


Figura 5.47. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6, com destaque para os sinais de CM6A (substância **8**).

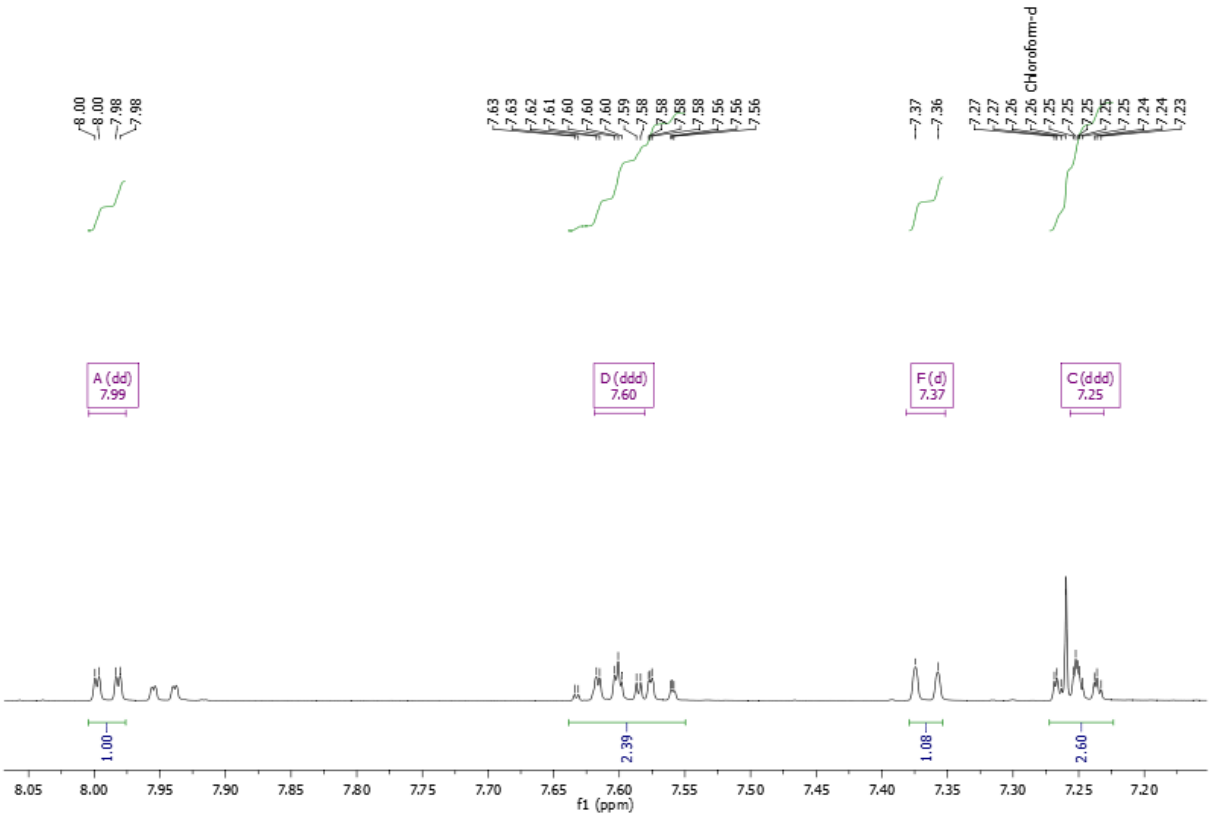


Figura 5.48. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz), com expansão da região de δ_H 7,20 a 8,05, com destaque para os sinais da substância **8**.

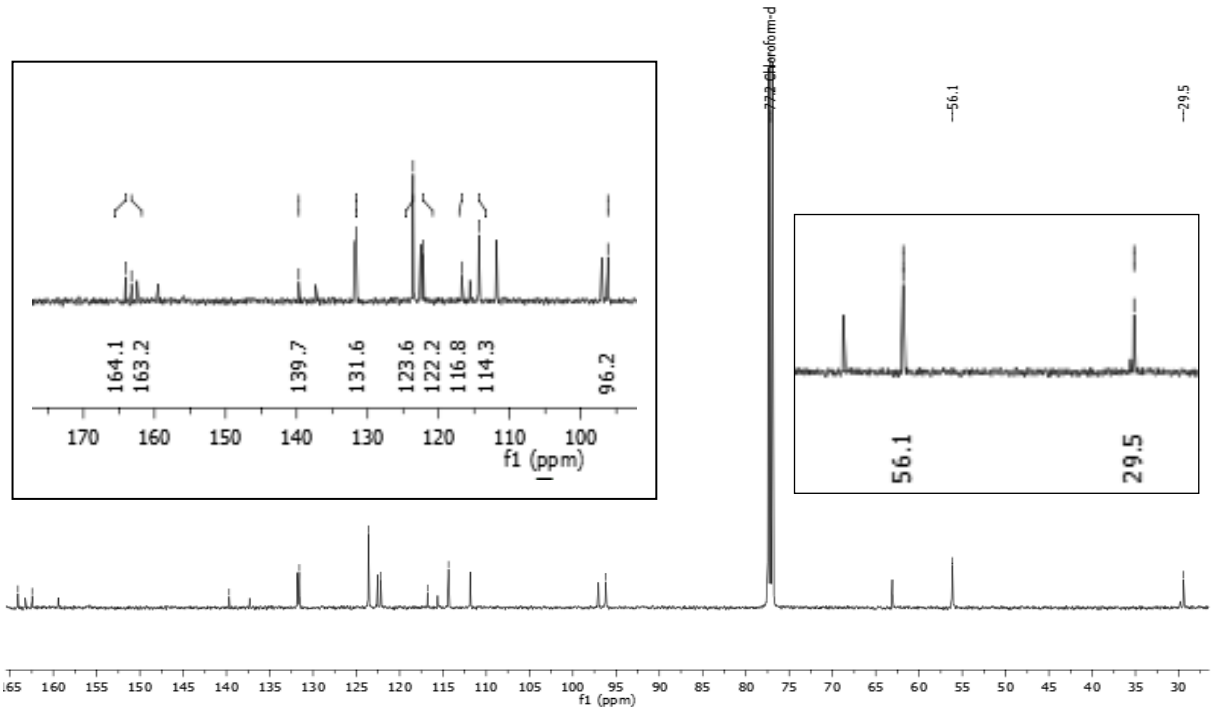


Figura 5.49. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$,125 MHz) de CM6, com ampliação dos valores de deslocamento de carbono da substância **8**.

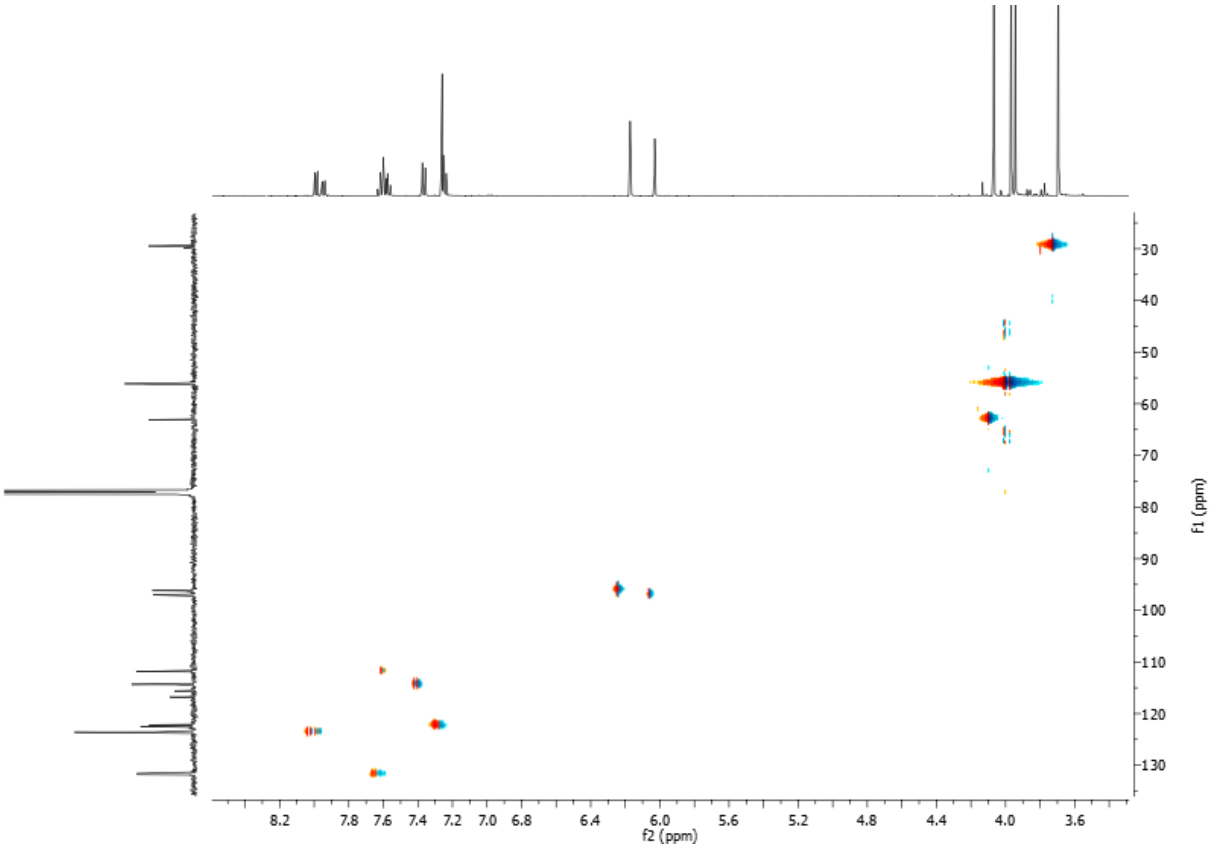


Figura 5.50. Mapa de contorno de HSQC ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6 (substâncias **8** e **9**).

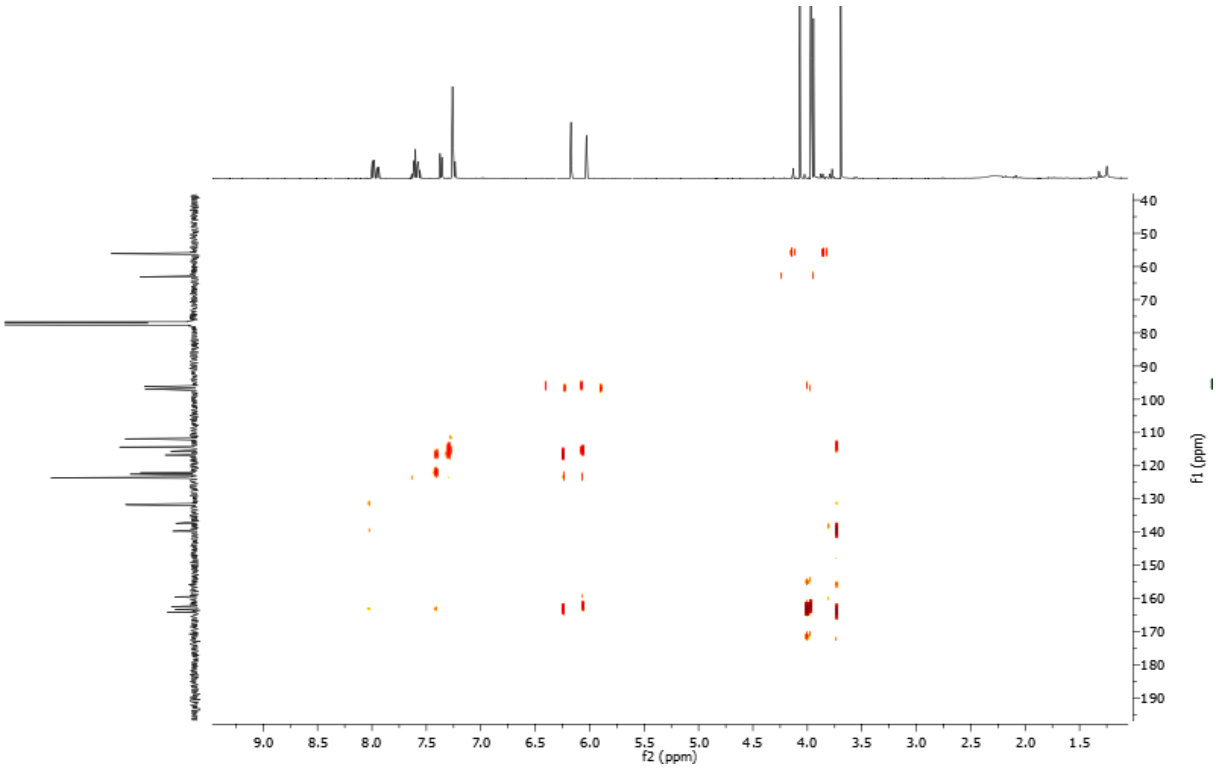


Figura 5.51. Mapa de contorno de HMBC ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6 (substâncias **8** e **9**).

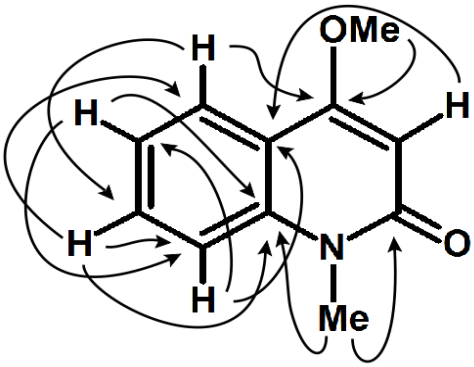


Figura 5.52. principais correlações observadas no HMBC para substância **8**.

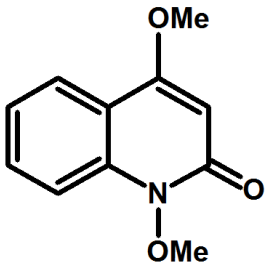
Tabela 5.9. Dados de RMN ^{1}H ($CDCl_3$) da substância **8** comparado com a literatura

	Substância 8	**1-metil-4-metoxi-2-quinolona**
Posição	**δ_H** (Mult.)	**δ_H***
3	6,17 (s)	6,12 (s)
5	7,99 (dd, 8,0; 1,3 Hz)	7,98 (dd, 8,0; 1,2 Hz)
6	7,25-7,30 (m)	7,25 (ddd, 8,0; 7,1 e 1,2)
7	7,61-7,65 (m)	7,60 (ddd, 8,2; 7,1 e 1,2)
8	7,37(dl, 8,5 Hz)	7,37 (dl, 8,2 Hz)
1-NMe	3,69 (s)	3,70 (s)
4-OMe	3,97 (s)	3,97 (s)

* ALBARICI, 2006 ($CDCl_3$ – 200 MHz)

5.1.6.2 Determinação estrutural de CM6B (substância 9)

A identificação da substância **9** (CM6B) foi realizada pela análise dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C, HMBC, HSQC e por CG-MS, sendo identificada como a 1,4-dimetoxi-2-quinolona, conhecida como haplotusina.



9

O espectro de RMN ^{1}H (**figura 5.53**) de CM6 apresentou os sinais da substância **9** muito parecidos e, em alguns casos, sobrepostos aos sinais da substância **8.** A principal diferença ocorreu na região dos sinais de OMe e NMe. Para a substância **9**, ao invés do sinal característico do grupo N-CH_3 (~δ_H 3,70) presente na substância **8**, foi observado um sinal em δ_H 4,07 (s-3H), sugerindo a presença de um grupo N-OMe, no lugar do grupo N-Me. Esta proposição foi suportada pela diferença de 16 unidades (um átomo de oxigênio) na massa molecular das substâncias **8** (*m/z*=189) e **9** (*m/z*=205) (**figuras 46B e 46C**).

No espectro de RMN ^{13}C (**figura 5.54**) de CM6, que apresentou sinais correspondentes a 22 carbonos para as substâncias **8** e **9**, sendo 11 carbonos para cada, a principal diferença também foi observada na substituição de um grupo N-Me na substância **8**, por um grupo N-OMe na substância **9**, caracterizada pelos sinais em 29,5 e 63,1, respectivamente.

A análise do mapa de contornos HSQC (**figura 5.50**) de CM6 mostrou as seguintes correlações para a substância **9**: entre o sinal em δ_H 7,57 (H-8) com o sinal em δ_C 111,9; do sinal em δ_H 7,61-7,66 (H-7) com o sinal em δ_C 131,8; do sinal em δ_H 7,95 (H-5) com o sinal em δ_C 123,6; do sinal em 7,25-7,30 (H-6) com o sinal em δ_C 122,2; do sinal em δ_H 6,03 (H-3) com o sinal em δ_C 97,0; do sinal em δ_H 4,07 com o sinal em δ_C 63,1; e do sinal em δ_H 3,94 com o sinal em δ_C 56,2.

O mapa de contorno de HMBC (**figura 5.51**) de CM6 mostrou correlações similares às da substância 8. Porém, como esperado, o sinal em δ_H 4,07 (N-OMe) não mostrou correlação com algum carbono, pois estaria a 3 ligações de um átomo

de nitrogênio e a duas ligações de um átomo de oxigênio. As correlações observadas no HMBC e HSQC possibilitaram as atribuições completas dos átomos de hidrogênio e carbono da substância **9** e a identificação desta, como o alcaloide 1,4-dimetoxi-2-quinolona, conhecido como haplotusina. As atribuições completas de RMN ^{13}C para a substância **8** e **9** são apresentadas na **tabela 5.10**. Essa substância apresenta atividades tripanocidas bastante significativas (AMBROZIN, 2004).

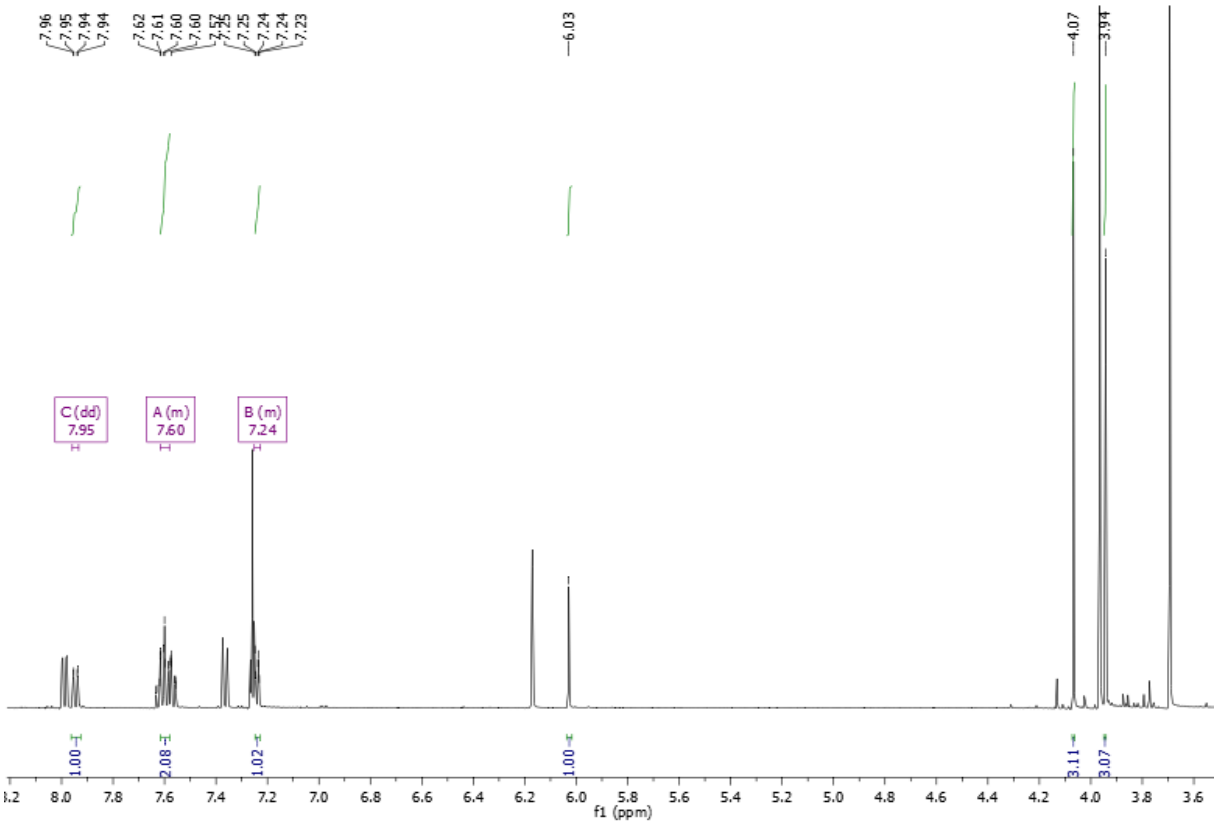


Figura 5.53. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) de CM6, com destaque para os sinais da substância **9**.

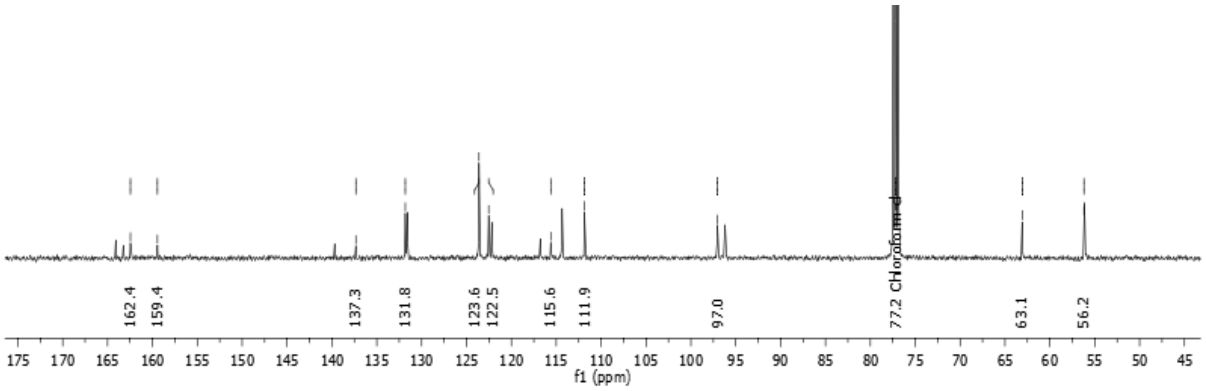


Figura 5.54. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$,125 MHz) de CM6, com destaque para os sinais da substância **9**.

Tabela 5.10. Atribuição dos dados de RMN ^{13}C para as substâncias **8** e **9.**

	substância 8	**substância 9**
C	**δ_C**	**δ_c**
2(C=O)	164,1	159,4
3	96,2	97,0
4	163,2	162,4
4a	116,8	115,6
5	123,6	123,6
6	122,5	122,2
7	131,6	131,8
8	114,3	111,9
8a	139,7	137,3
1-*N*OMe	----	63,1
1-*N*Me	29,5	----
4-OMe	56,1	56,2

5.2. Resultados do ensaio antibacteriano preliminar

A atividade antibacteriana dos seis extratos de *C. mastigophorus* do caule e da casca nos solventes hexano, Acetato de etila e metanólico, foi avaliada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa.* Os resultados revelaram que todos os extratos foram capazes de reduzir o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (gram positivas) e *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativa). A **figura 5.55** mostram que os extratos MCACM (±20 mm), ACLCM (±20 mm) e ACACM (±24 mm) inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* com maior eficiência, sendo os resultados dos extratos MCACM e ACLCM similares ao encontrado para o antibiótico de referência, a tetraciclina (20 mm) e o ACACM ainda maior em efetividade. Frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* o extrato que demonstrou maior eficácia foi o ACLCM, com halo de inibição igual ao antibiótico de referência a ceftriaxona (20 mm) como observa na **figura 5.56**.

Foram analisadas também duas substâncias isoladas do extrato ACLCM de *C. mastigophorus*, dois alcaloides desta planta, e ambas as substâncias **2** (Citrusinina) e substância **1** (Glifolina) inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* com halo de inibição de 16 e 10 mm, respectivamente, como é demonstrado na **figura 5.55**, no entanto, as substâncias isoladas não demonstraram capacidade na inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (**figura 5.56**). Assim, os resultados que foram expressos com as substâncias isoladas incentiva a busca por novas substâncias que correspondam à análise preliminar dos extratos ou isolamento das substâncias identificadas.

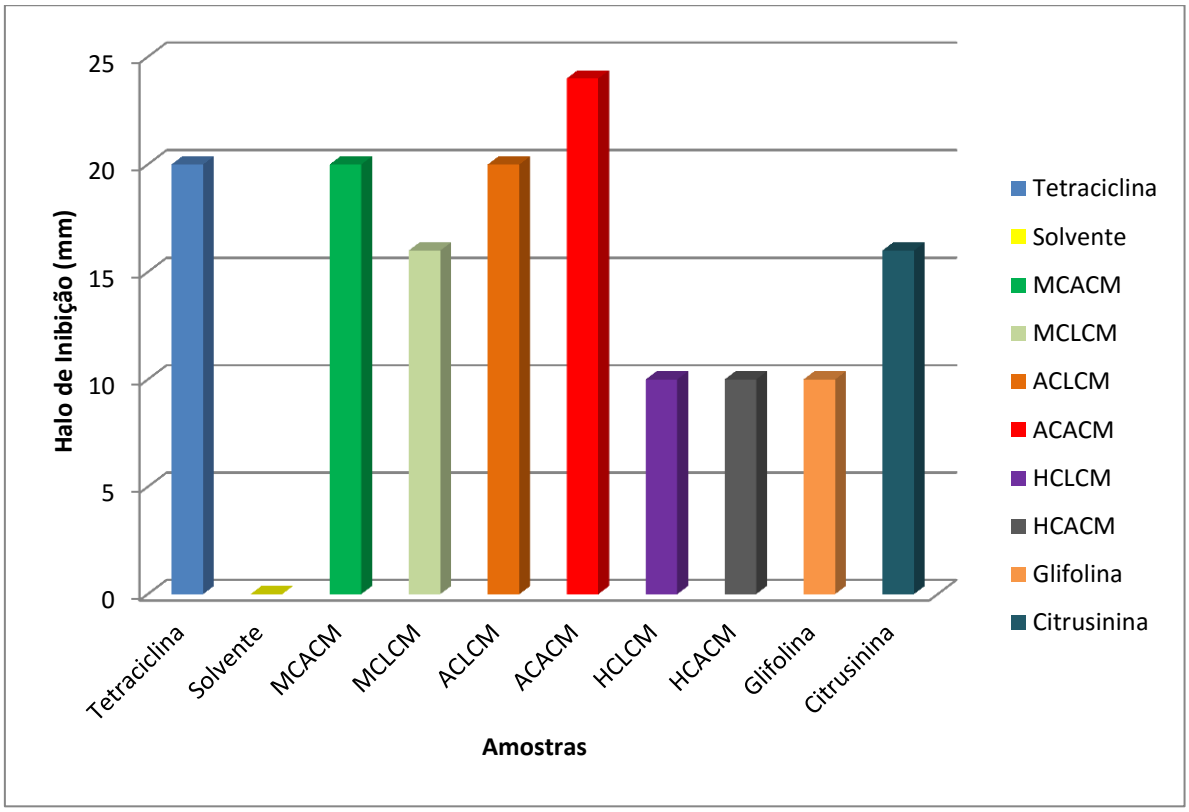


Figura 5.55. Atividade antibacteriana dos extratos hexânico, AcOEt e metanólico da casca e do caule de *Conchocarpus mastigophorus* frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

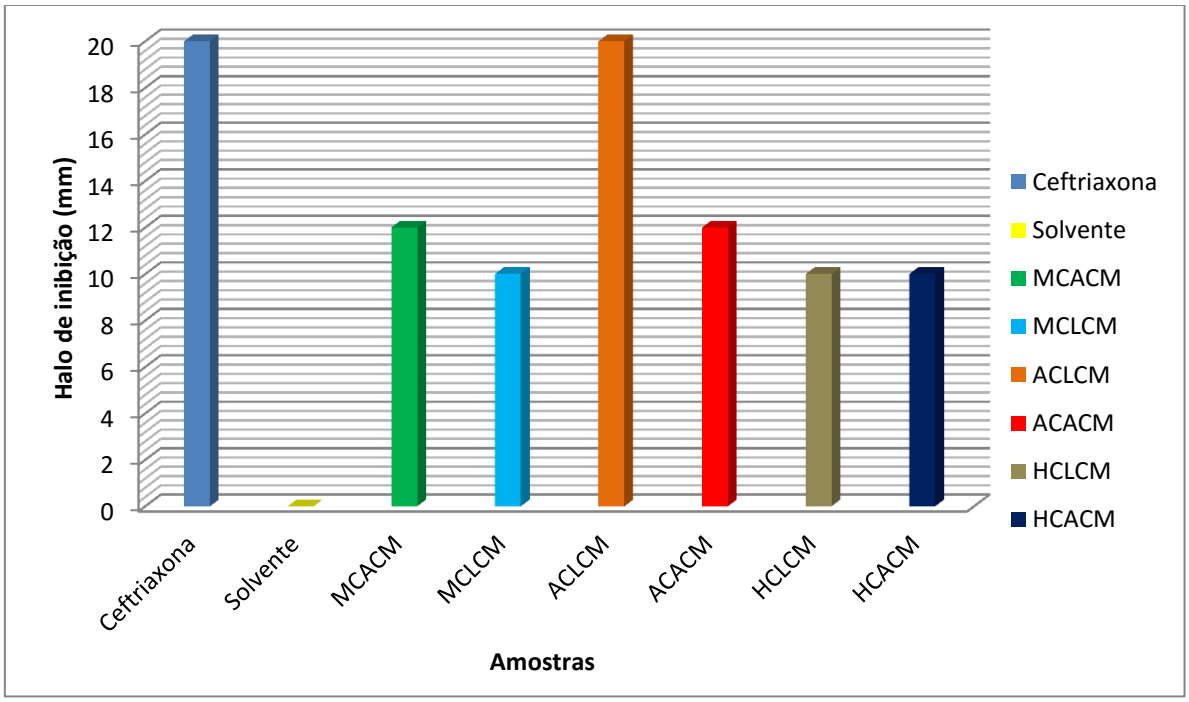


Figura 5.56. Atividade antibacteriana dos extratos hexânico, AcOEt e metanólico da casca e do caule de *Conchocarpus mastigophorus* frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa.*

6. CONCLUSÕES

O estudo do extrato do caule de *Conchocarpus mastigophorus* resultou no isolamento e identificação de nove substâncias. Sendo oito alcaloides e uma cumarina, e dessas substâncias um ainda não descrito na literatura, a 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxi-*N*-metilacridona (mastigoforina), um alcaloide acridônico. Das substâncias identificadas a glifolina (**1**), critusinina (**2**), citbrasina (**3**) e citramina (**5**), todos alcaloides do tipo acridônicos são substâncias com atividades diversas, entre elas antitumoral, no tratamento do couro cabeludo e no tratamento de DSTs. Além dos acridônicos outros alcaloides foram identificados, como a γ-Fagarina (**6**), e os alcaloides 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (**8**) haplotusina (**9**), além da cumarina marmesina (**7**).

O extrato do caule demonstrou grande potencial no ensaio antibacteriano, no entanto, as substâncias isoladas não foram capazes de inibir com eficácia o crescimento das bactérias, portanto novas substâncias desse extrato (ACLCM) precisam ser purificadas e identificadas para que sejam testadas, pois é provável que as substâncias ativas para ação antibacterianas não tenham sido ainda isoladas do extrato do caule. Os constituintes químicos de muitas frações do ACLCM ainda não foram purificados, e, portanto, a continuidade deste trabalho é de grande importância para o isolamento das substâncias bioativas.

7. REFERÊNCIAS

A BÍBLIA SAGRADA – Sociedade Bíblica Trinitariana do Brasil, 1994.

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**. n.22, p.239–244, 2011.

ALBARICI, T. R. **Estudo fitoquímico de *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas.** Tese (Doutorado em Ciência) – São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 182p, 2006.

ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista brasileira de farmacognosia***.* v.19, n.4, p. 942-952, 2009.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cad Temat. QNEsc***.* n.3, p.10-5, 2001.

AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; DE ALBUQUERQUE, S. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Quimica Nova,** v. 31, n.4, p. 740-743, 2008.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Braz. J. Pharmacog***.* n.16, p. 517-24, 2006.

BAETAS, A. C. S.; ARRUDA, M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Coumarins from *Metrodorea flavida*. **Phytochemistry** v.43, n.2, p.491-493, 1996.

BARATA, R. B.. Cem anos de endemias e epidemias. **Ciências e saúde coletiva**. v. 5, n.2, p. 333-345, 2000.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.N.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. ,**Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-496, 1966.

BELLETE, B. S.; DE SA, I. C. G.; MAFEZOLI, J.; CERQUEIRA, C. N.; da Silva, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; PIRANI, J.R. Phytochemical and chemosystematics studies of *Conchocarpus marginatus* and *C. inopinatus* (Rutaceae). **Química Nova**, v.35, n.11, p. 2132-2138, 2012.

BELLETE, B. S. **Estudo fitoquímico de Conchocarpus marginatus (Rutaceae), e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados**. Dissertação de Mestrado em Química. São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 175p, 2009.

BRITO, A. M. G.; RODRIGUES, S. A.; BRITO, R. G. e XAVIER-FILHO, L.. Aromaterapia: da gênese a atualidade. **Revista brasileira de plantas medicinais***.* vol.15, n.4, suppl.1, pp. 789-793, 2013.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products***.* v.67, p.2141-2153, 2004.

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. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus.* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.2, p. 374-380, 2012.

CALIXTO, J. B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura***.* [online]. v. 55, n.3, pp. 37-39, 2003.

CALIXTO, C.M.F.; CAVALHEIRO, E.T.G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.

CORTEZ, L. E. R.; CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; FERREIRA, A. G.; DA SILVA, M. F. G. F. New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. **Heterocycles**, v.78, n.8, p.2053-2059, 2009.

CORTEZ, L. E. R.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, A. G.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. Constituintes Químicos de *Almeidea coerulea* (Nees &

Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V.16, p.164-169, 2006a.

CORTEZ, L.E.R.; FERREIRA, A.G.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G. Atividades Biológicas de Extratos obtidos das Partes Aéreas de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A.St.-Hil. e *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. *bahiensis* Kallunki (Rutaceae). **Acta Farm. Bonaerense** v.25, n.1, p. 50-54, 2006b.

COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; PEDRO, A. S.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Rev. bras. farmacogn**. [online]. v.20, n.4, pp. 502-505, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. **Pharm. Biol**. v.39, p. 8-17, 2001.

CUNHA, A.P. da. **Aspectos Históricos sobre Plantas Medicinais, seus Constituintes Activos e Fitoterapia**. ESALQ, DISPONIVEL EM: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>. Acesso em 06 de janeiro de 2015.

DEVEZA A.C.R.S. Ayurveda – A medicina clássica indiana / Ayurveda – the classical indian medicine. **Revista de Medicina**. v.92, n.3, p.156-65, 2013.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2ª ed., London, John Wiley & Sons, 515p, 2002.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v.7, 2006.

DUTRA M.G. **Plantas Medicinais, Fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. 2009, 112f. Dissertação de mestrado (Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente). UniEvangélica, Anápolis, 2009.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v.13, n.2, p.76-88, 2004.

FACCHINI, P. H. **Estudo Fitoquímico biomonitorado visando o controle de formigas e microrganismos**. São Carlos, Programa de Pós graduação em química – UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 2005.

FERNANDES, T. S**. Análise Fitoquímica e Estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e deinibição da enzima Acetilcolinesterase da espécie *Helietta apiculata* Benth.** Santa Maria. Programa de pós graduação em Química – Universidade Federal de Santa Maria, 2011. Tese de mestrado, 2011.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA C.L.; SOUSA I.M.O.; RODRIGUES R.A.F. 2006. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Construindo a História dos Produtos Naturais.** <http://www.multiciencia.unicamp.br/ art04_7.htm>, acesso em março de 2015.

FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M.; RITO, P. da N.; OLIVEIRA, A. P.; TEIXEIRA, L. A.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana de floroglucinois e do extrato hexanico de *Hypericum brasiliense* Choysi. **Química Nova***.* v.32, p.1103-1106, 2009.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G.. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***,* v.5, p. 470-473, 2008.

FUNAYAMA, S.; CORDELL, G. A. Chemistry of acronycine iv. Minor constituents of acronine and the phytochemistry of the genus acronychza***.*** **Journal of Natural Products.** v. 47*.* n*.* 2*,* **pp.** 285-291, 1984.

FURUKAWA, H.; YOGO, M.; WU, T. Acridone Alkaloids. X. [1)] ^{13}C-Nuclear Magnetic Ressonace Spectra of Acridone Alkaloids. **Chem. Pharm. Bull.** v.31, n. 9, p. 3084-3090, 1983a.

FURUKAWA, H.; WU, T.S. Acridone Alkaloids. Part 9.[1] Chemical Constituents of *Glycosmis citrifolia* (Willd.) Lindl. Structures of Novel Linear Pyranoacridones, Furoacridones, and Other New Acridone Alkaloids. **Journal of the Chemical Society**. p.1681-1888, 1983b.

GANEM, R.S. (Org.). **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas. Brasília: Câmara dos Deputados**, Ed. Câmara. Série Memória e análise de leis, n. 2, 437 p, 2010.

GARCIA, Eloi S.. Biodiversidade, biotecnologia e saúde**. Cad. Saúde Pública** [online]. vol.11, n.3, p. 495-500, 1995.

GIULIETTI, A.M.; R.M. HARLEY, L.P. QUEIROZ, M.G.L. WANDERLEY & C.VAN DEN BERG. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade,** v.1, p.52-61, 2005.

GIBBS, R. D. Chemotaxonomy of Flowering Plants. Montreal/London: McGill-**Queen's University Press**, 1974.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas e medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Vol. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GOMES, A.P.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; MENDONÇA, E.G.; OLIVEIRA, A.G.A.; SIQUEIRA-BATISTA R. Malária grave por *Plasmodium falciparum.* **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v.23, n.3, p. 358-369, 2001.

GROPPO, M.; KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R.; ANTONELLI, A. Chilean Pitavia more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to Neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the Family. **PhytoKeys,** 19: 9-29, 2012.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G.. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**. v.24, n. 70, pp. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D.; PUPO ,M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HAIDA, K. S; et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Cienc. Saude Unipar**. *V.*11, p. 185-92, 2007.

ISIDORO, M. M.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ARRUDA, A C.; SILVA, S. C. Fitoquímica e quimiossistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). **Química Nova**. v. 35, n.11, pp. 2119-2124, 2012.

JAIN P. K. AND JOSHI H.; Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile, **Journal of Applied Pharmaceutical Science.** v.02, n.06, p. 236-240, 2012.

JORGE, S. S. A. **Plantas Medicinais: Coletânea de Saberes**. Pdf. Disponível em: http://www.fazendadocerrado.com.br/fotos_noticias/1280/Livro.pdf. acesso em 22 de Março 2015.

JU-ICHI, M.; KAGA, H.; MURAGUICHI, M.; INOUE, M.; KAJIURA, I.; OMURA, M.; FURUKAWA, H. New Acridone Alkaloid and Coumarin from Citrus Plants. **Heterocycles**. v 27, n. 9, p. 2197-2200, 1988.

KRITSKI, A. L.; VILLA, T. S.; TRAJMAN, A.; LAPA E SILVA, J. R.; MEDRONHO, R. A.; RUFFINO-NETTO, A. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. **Rev. Saúde Pública**. v. 41, suppl.1, p. 9-14, 2007.

KUTCHAN, T. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **The Plant Cell**. v.7, p.1059-1070, 1995.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade** v.1, n.1, p. 36-42, 2005.

LUCY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on cumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of câncer. **Current Pharmaceutical Design**. v.10, p.3797-3811, 2004.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of Trypanosoma cruzi. **Journal of Ethnopharmacology**. v.73, p. 335-340, 2000.

MAFEZOLI, J. **Atividade tripanocina e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae**. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de doutorado, 240 p. 2001.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais.** 220p. Viçosa: Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MESTER, I. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In PG Waterman, MF Grundon (eds), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales,* **Academic Press**, London, p. 31-96, 1983.

MEYER, F. G.; E. E. TRUEBLOOD; HELLER, J. L. The Great Herbal of Leonhart Fuchs: "De historia stirpium commentarii insignes", 1542. Published by: **The University of Chicago Press on behalf of The History of Science Society**, 1542. Review by: Jean A. Givens. Vol. 92, No. 2, p. 390-391. 2001.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. DA S.. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova.** v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

NAYAR, M. N. S.; SUTAR, C. V.; BHAN, M. K.; Alkaloids of the stem bark of Hesperethusa crenulata. **Phytochemistry**. v.10, p.2843, 1971.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**. v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICIA, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**. v.1, n.3, p. 227-240, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery. **Nat. Prod. Rep**. v.17, p. 215-234, 2000.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA, I. V.; ROSSI, A. A. B. Estudo anatômico foliar de espécies de *Citrus* com potencial medicinal. **Enciclopédia biosfera**. v.10, n.18, p. 3280-3290, 2014a.

OLIVEIRA, L. S. S.. **Constituinte químico de *Conchocarpus cyrtanthus* (Rutaceae)**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2014b.

PAULINI, H.; WAIBEL, R., SCHIMMER, O. Mutagenicity and structura-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae. **Mutation Research** v.227, p.179-186, 1989.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, C. T.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**. v.38, n.2, p. 326-328, 2004.

PERNIN, R.; MUYARD, F.; BÉVALOT, F.; TILLEQUIN, F.; MORETTI, C. Coumarins form the roots and stembark of *Metrodorea flavida*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.27, p.531-533, 1999.

PIRANI, J.R. *Conchocarpus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB438>. Acesso em: 20 de Junho de 2015.

PINTO, A.C.; SILVA D.H.S.; BOLZANI, V.D.; LOPES N.P.; EPIFANIO R.D. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**. v.25, p. 45-61, 2002.

POLETTO, R. Continuidades e avanços nos saberes médicos na Europa da primeira metade do século XVIII: uma análise dos Tratados Médicos de Ayala (1705) e Sanz de Dios (1730). **Revista Brasileira de História & Ciências Sociais** Vol. 3 Nº 6, 2011.

POMKEUA, S. **Chemical constituents from the rhizomes of *curcuma zeoaria* (Christm.) rosc. and the stems of *citrus medica* Linn.** Dissertação de Mestrado em estudos Químicos. Prince of Songkla University, Songkla, 2010.

PRUDENTE, R. C. C.; MOURA, R. B. Evidências científicas para a indicação popular de algumas espécies da família Rutaceae no tratamento de doenças respiratórias na região Sudeste do Brasil. **Infarma-Ciências Farmacêuticas.** v. 25, n. 1, 2013.

PURCARO, R. **Isolation of secondary metabolites from plants and their use as lead compounds for the synthesis of biologically active products**. Dissertação de doutorado em química. Universita' Degli Studi di Napoli Federico II, 2008.

PURCARO, R; SCHRADER, K. K.; BURANDT, C.; DELLAGRECA, M.; MEEPAGALA, K. M. Algicide Constituents from *Swinglea glutinosa*. **Journal of agricultural and food chemistry.** v. 57, n. 22, p.10632-10635, 2009.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia & Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editora Premier, 372p, 1998.

SÁ, I. C. G. **Estudo fitoquímico de Rabdodendron amazonicum, Conchocarpus inopinatus e avaliação dos compostos isolados na inibição da fotossíntese**. Dissertação (Mestrado em Química). São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SÁ, F. M. P.; SANTOS, R. Homeopatia: Histórico e Fundamentos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente.** v. 5, n.1, p. 60-78, 2014.

SANTOS, N. P. Passando da doutrina à prática: Ezequiel Corrêa dos Santos e a farmácia nacional. **Química Nova** [online]. v.30, n.4, pp. 1038-1045, 2007.

SANTOS, N. de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - Enferm.** [online]. v. 13, pp. 64-70. 2004.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SEVERINO, R. P. **Busca de produtos naturais como inibidores. específicos de enzimas**. Dissertação de Mestrado em Química. São Carlos. Universidade Federal de São Carlos, 2008.

SILVA, C. V. **Alcalóides benzofenantridínicos e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil. Salvador**. 2006. Dissertação de Mestrado, (Programa de Pós-graduação em Química), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SILVA, C. V. da et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista brasileira de Farmacognosia**. [online]. vol.20, n.3, p. 355-360, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora S.A, 2006, 508p.

SU, T.-L.; KOHLER, B.; CHOU, T-C.; CHUN, M. W.; WATANABE, K. A. Synthesis of the Acridone Alkaloids Glyfoline and Congeners. Structure-Activity Relationship Studies of Cytotoxic Acridones **J. Med. Chem**. v.35, p. 2703-2710, 1992.

SU, T-L.; LIN, C-T.; CHEN, C-H.; HUANG, H-M. Synthesis of Biotinylated Glyfoline for Immunoelectron Microscopic Localization. **Bioconjugate Chem**. v.11, p. 278-281, 2000.

TRABULSI L, R.; ALTERTHUM, F. Staphylococcus aureus. In: TEIXEIRA, L.; SANTOS, K. R. N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TORTORA, J. G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 894p.

VIEIRA P.C, KUBO I.; KUJIME H.; YAMAGIWA Y.; KAMIKAWA T. Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata:* isolation, structures, and synthesis. **Journal of Natural Products**, *v.55, p.* 1112-1117, 1992.

VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M.T.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure Appl. Chem**, v.73, n.3, p. 617-622, 2001.

VIEIRA, Ana Thereza Basilio. Origens da medicina romana na História Natural, de Plínio o velho. **Revista Archai**, Brasília, n. 03, pp. 31-43, Jul. 2009. Disponível em http://archai.unb.br/revista.

VIEGAS, C. JR.; BOLZANI V. S.; BARREIRO E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**. v.29, p.326–337, 2006.

VELOZO, E.S. **Fitoquímica comparada dos gêneros Conchocarpus, Almeidea e Rauia (Rutaceae),** 1995. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

WALDMAN, E. A.; DA SILVA, L. J.; MONTEIRO, C. A. Trajetória das doenças infecciosas: Da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, n.3 p.5-47, 1999.

WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales. **London: Academic Press**, 1983.

WATERMAN, P. G. Alkaloids of the Rutaceae: Their distribution and systematic significance. **Biochem. Syst. Ecol**. v.3, p. 149-180, 1975.

WU, T.S., FURUKAWA, H. Acridone Alkaloids VII. Constituents of Citrus sinensis osbeck var brasiliensis Tanaka. Isolation and characterization of three new acridone alkaloids, and new coumarin. **Chemical and Pharmaceutical Bullentin**.v.31, n.3, p. 901-906, 1983.

WU, T.S.; FURUKAWA, H.; KUOH, C-S. Constituents of citrus depressa (Rutaceae). Characterizations of five new acridone alkaloids. **Heterocycles**. v. 19, n. 2, 1982.

WU, Y. C.; YEN, W. Y.; HO, H. Y.; SU, T. L.; YIH, L. H. Glyfoline induces mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells. **International Journal of Cancer.** v. 126, p. 1017–1028, 2010.

YAMAMOTO, N.; FURUKAWA, H.; ITO, Y.; YOSHIDA, S.; MAENO, K.; NISHIYAMA, Y. Antiherpes virus activity of citrusinine-I, a new acridone alkaloid and related compounds. **Antiviral Research**, v. 12, p. 21-36, 1989.

YUN, U.W.; YAN, Z; AMIR, R.; HONG, S.; JIN, Y.W.; LEE, E.K.; LOAKE, G.J. Plant natural products: history, limitations and the potential of cambial meristematic cells. **Biotechnol Genet Eng. Rev.** v.28, p. 47-59, 2012.