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

DENISE SILVA ARRAIS

Avaliação da atividade leishmanicida de constituintes químicos dos galhos de *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki (Rutaceae)

Jequié-BA
Novembro de 2019

Denise Silva Arrais

Avaliação da atividade leishmanicida de constituintes químicos dos galhos de *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) 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.

Orientadora: Profª. Drª. Vanderlúcia Fonseca de Paula

JEQUIÉ-BA

Novembro de 2019

A773a Arrais, Denise Silva.
Avaliação da atividade leishmanicida de constituintes químicos dos galhos de *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki (Rutaceae) / Denise Silva Arrais.- Jequié, 2019.
104f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula)

1.*Angostura bracteata* 2.Alcaloides quinolínicos 3.Amidas 4.Atividade leishmanicida I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

DENISE SILVA ARRAIS

"Avaliação da atividade leishmanicida de constituintes químicos dos galhos de *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki (Rutaceae)"

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula
(UFMG, Minas Gerais- MG, 1999)

Prof. Dr. Galber Santos Brito da Silva
(UFBA, Salvador - BA, 2017)

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira
(UFMG, Minas Gerais- MG, 2012)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 29 / 11 / 2019

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido a dádiva da vida e sempre me dar forças para seguir em frente;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB pela minha formação acadêmica e pelo incentivo a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de minha bolsa de Mestrado, o que contribuiu para que este trabalho se concretizasse;

Ao Laboratório de Produtos Naturais da UESB (LPN) por fornecer a estrutura necessária para realização do estudo fitoquímico;

À Universidade Federal de Viçosa-UFV e a Universidade Estadual Paulista-UNESP pela realização das análises de Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética nuclear;

Ao Herbário da UESB (HUESB) e à professora Dra. Guadalupe Edilma Licona de Macedo por possibilitar a realização das coletas e identificação da planta estudada.

Ao Instituto René Rachou – Fiocruz, pela realização dos ensaios leishmanicidas.

À minha mãe Eliete e seu esposo Sandoval, e aos meus irmãos Odenilda, Reneilton e Reinan por todo apoio, incentivo, amor incondicional e por acolherem minha filha com todo o amor e carinho enquanto eu me dedicava a pesquisa;

Aos meus colegas e ex-colegas do LPN, em especial a Lauro, pela amizade, incentivo e pela imensa contribuição para a realização de minha pesquisa;

Às minhas amigas de longas datas Beatriz, Jamile e Roberta por estarem sempre presentes e me mostrarem o verdadeiro sentido da amizade;

As amigas que a UESB me concedeu, Cristiane, Marluce e Nájila pela amizade e apoio em diversos momentos de minha vida;

Ao Prof. Dr. Djalma Menezes e ao meu colega Ivan por possibilitar o transporte das amostras até a Fiocruz para realização dos ensaios biológicos;

À professora Dra. Suzimone de Jesus Correia, pela amizade, apoio e incentivo para que eu ingressasse na pós-graduação e pela imensa contribuição para minha formação acadêmica.

À professora Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula, pela contribuição para minha formação acadêmica, pela oportunidade de tê-la como orientadora, pela confiança depositada em mim, pela paciência e pela humanidade.

“Quando a circunstância é boa, devemos desfrutá-la; quando não é favorável devemos transformá-la e quando não pode ser transformada, devemos transformar a nós mesmos”

Viktor Emil Frankl

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta *Angostura bracteata* e sua exsicata, respectivamente, depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Jequié. 76
Figura 2. Análise da fração hexânica em três aplicações, variando apenas a concentração do extrato, utilizando reagente de Dragendorff (CCD eluída com hexano/AcOEt 9:1). 14
Figura 3. Esquema 1 A: Fracionamento de HGAB para obtenção de AB-1, AB-2, AB-3 e AB-4 15
Figura 4. Esquema 1 B: Fracionamento de HGAB para obtenção da substancia AB-5 16
Figura 5. Esquema 1 C: Fracionamento de HGAB para obtenção de AB-6, AB-7, AB-8 E AB-9 17
Figura 6. Esquema 1 D: Fracionamento de HGAB para obtenção de AB-12 18
Figura 7. Esquema 2: Fracionamento da fração AEGAB para obtenção de AB-12..19
Figura 8. Esquema 3: Fracionamento de MGAB para obtenção de AB-13 20
Figura 9. Cromatograma da fração AB-1 24
Figura 10. Espectro de massas (CG-EM/IE) da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 25
Figura 11. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) para a substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 26
Figura 12. Fórmula estrutural da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 27
Figura 13. A) Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) e B) DEPTq da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 28
Figura 14. Mapa de contornos HSQC da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 29
Figura 15. Correlações H-C, a duas e três ligações, observadas para a substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 30
Figura 16. Mapa de contornos HMBC da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 30
Figura 17. Espectro RMN ^{1}H (600 MHz) da fração AB-3: mistura dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol 32
Figura 18. Espectro de DEPTq ($CDCl_3$,150 MHz) da fração AB-3: mistura dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol 35
Figura 19. Fórmulas estruturais do estigmasterol e β-sitosterol, respectivamente...35
Figura 20. Espectro de massas da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina) 36
Figura 21. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina) 36
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina) 37
Figura 23. Mapa de contorno HSQC da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina) 38
Figura 24. Fórmula estrutural da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentil)quinolina 39
Figura 25. Sobreposição dos espectros de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de AB-4 e AB-5: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina) 39
Figura 26. Cromatograma obtido para a fração AB-6 na análise por CG-EM/IE 40
Figura 27. Espectro de massas da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina 41

Figura 28. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.....42
Figura 29. Fórmula estrutural da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.....42
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.....43
Figura 31. Espectro de massas da substância AB-8: vanilina.....45
Figura 32. Espectro de massas da substância vanilina, fornecido pela biblioteca NIST 14. 45
Figura 33. Fórmula estrutural da substância AB-8: vanilina 45
Figura 34. Espectro de massas da substância AB-9: evolitrina.....46
Figura 35. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da substância AB-9: evolitrina 46
Figura 36. Fórmula estrutural dos alcaloides furoquinolínicos evolitrina e pteleína..47
Figura 37. Espectro de RMN de DEPTq (150 MHz, $CDCl_3$) da substância AB-9: evolitrina.....48
Figura 38. Mapa de contornos HSQC da substância AB-9: evolitrina 49
Figura 39. Mapa de contornos HMBC da substância AB-9: evolitrina.....49
Figura 40. Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância AB-9: evolitrina.....50
Figura 41. Cromatograma (CG-EM/IE) da fração AB-10.....51
Figura 42. Espectro de massas (CG-EM/IE) do constituinte majoritário da fração AB-10: 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina.....52
Figura 43. Fórmula estrutural do alcaloide majoritário da fração AB-10: 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina.....52
Figura 44. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-10.....53
Figura 45. Ampliação da região contendo os sinais dos hidrogênios ligados ao anel quinolínico do constituinte majoritário [2-(3',4'-metilenodioxiestiril)quinolina] da fração AB-10 54
Figura 46. Espectro de DEPTq da fração AB-10, destacando os sinais do constituinte majoritário: [2-(3',4'-metilenodioxiestiril)quinolina].....55
Figura 47. Espectro de massas (CG-EM-IE) para a fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.....57
Figura 48. Fragmento correspondente ao pico base no espectro de massas (IE) de AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida 57
Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida (*sinais de hidrogênio do composto minoritário). 59
Figura 50. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida, na região de hidrogênios ligados ao carbono sp^2 60
Figura 51. Mistura de rotâmeros da substância *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida (AB-11). 60
Figura 52. Espectro de DEPTq (150 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida 62
Figura 53. Mapa de contorno HSQC da região de hidrogênios ligados em carbonos sp^2 da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida 62
Figura 54. Mapa de contorno HSQC da região de hidrogênios ligados em carbonos sp^3 da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.....63
Figura 55. Mapa de contorno HMBC da região de hidrogênios ligados em carbonos sp^2 da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.....63

Figura 56. Mapa de contorno HMBC da região de hidrogênios ligados em carbonos *sp*^{3} da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida 64
Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz) para a substância AB-12: esquimianina 66
Figura 58. Espectro de DEPT-135 para a substância AB-12: esquimianina 67
Figura 59. Mapa de contorno HSQC para a substância AB-12: esquimianina 67
Figura 60. Mapa de contorno HMBC para a substância AB-12: esquimianina 68
Figura 61. Fórmula estrutural da substância AB-12: esquimianina 68
Figura 62. Espectro de massas da fração AB-13: magnolamida e magnolamida b .70
Figura 63. Espectro de RMN de ^{1}H da mistura de isômeros *trans* e *cis* de AB-13: Magnolamida e Magnolamida b 70
Figura 64. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, CD_3OD) da fração AB-13, destacando os sinais do isômero majoritário AB-13a: magnolamida.....71
Figura 65. Estrutura molecular de AB-13a: magnolamida 72
Figura 66. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, CD_3OD) da fração AB-13, destacando os sinais do isômero minoritário AB-13b 73
Figura 67. Estrutura molecular de AB-13b: magnolamida b. 73
Figura 68. Espectro de DEPTq da fração AB-13, destacando os sinais do isômero majoritário AB-13a: magnolamida. 75
Figura 69. Mapa de contornos HSQC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{2} destacando os sinais do isômero minoritário AB-13b: magnolamida b 76
Figura 70. Mapa de contornos HSQC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{3}, destacando os sinais do isômero majoritário AB-13a: magnolamida 76
Figura 71. Mapa de contornos HMBC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{2} 77
Figura 72. Mapa de contornos HMBC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{3} 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa das frações originadas do extrato etanólico bruto dos galhos de *A. bracteata* 13
Tabela 2. Atribuição dos dados RMN ^{1}H e RMN ^{13}C para o alcaloide AB-2, baseada nas correlações H-C, observadas nos espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) .29
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol experimental e comparados com a literatura. 32
Tabela 4. Deslocamentos químicos de ^{13}C observados no espectro de DEPTq dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol e comparação com dados da literatura 34
Tabela 5. Dados espectrais de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) e RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) para a substância AB-4....38
Tabela 6. Comparação dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de AB-7 com dados da literatura....43
Tabela 7. Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de AB-9 com aqueles reportados para evolitrina e pteleina....47
Tabela 8. Atribuição dos sinais de RMN de ^{1}H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de AB-9 e comparação dos dados de RMN de ^{13}C, com os dados da literatura para evolitrina 48
Tabela 9. Correlação entre os sinais de RMN de ^{1}H e ^{13}C para AB-10 56
Tabela 10. Comparação entre os dados de RMN de ^{1}H de AB-11 (600 MHz) e beecheyamida (400 MHz), ambos em $CDCl_3$....61
Tabela 11. Correlações de ^{1}H e ^{13}C observadas no HSQC e comparação com dados da literatura* 64
Tabela 12. Comparação entre os dados de RMN de ^{1}H (600 MHz) obtidos para AB-12 e os dados constantes na literatura para a esquimianina 66
Tabela 13. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C de AB-12 e comparação com dados da literatura da esquimianina (skimmianine) 69
Tabela 14. Comparação de dados de RMN de ^{1}H (600 MHz, CD_3OD) para os isômeros *trans* (AB-13a) e *cis* (AB-13b) da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1H-pirrol-1-il)butil]ferulamida 74
Tabela 15. Comparação de dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) para os isômeros *trans* (AB-13a) e *cis* (AB-13b) da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1H-pirrol-1-il)butil]ferulamida 78
Tabela 16. Resultados do ensaio da atividade leishmanicida dos extratos das folhas (EFAB) e galhos (EGAB) de *Angostura bracteata*....80
Tabela 17. Resultados do ensaio da atividade leishmanicida das substâncias isoladas de *Angostura bracteata* 80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila

AEGAB - fração de acetato de etila dos galhos de *Angostura bracteata*

CC - Cromatografia em Coluna

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

$CDCl_3$ - Clorofórmio deuterado

CD_3OD - Metanol deuterado

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

dd - duplo dupleto

DEPT-Q - Intensificação sem distorção por transferência de polarização com retenção de carbonos quaternários. (do inglês: "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer retaining quaternary centres")

HGAB - fração hexânica dos galhos de *Angostura bracteata*

HMBC - Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (do inglês: "Heteronuclear Multiple Bond Correlation")

HSQC - Correlação Heteronuclear Quântica Simples (do inglês: "Heteronuclear Single Quantum Correlation")

IE - Ionização por elétrons

m - multipleto

s – singleto

*s*l – singleto largo

t – Tripleto

RCF – Força Centrífuga relativa

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

MGAB- fração metanólica dos galhos de *Angostura bracteata*

MTT – Metil tiazolil tetrazólio

Avaliação da atividade leishmanicida de constituintes químicos dos galhos de *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki (Rutaceae)

Autora: Denise Silva Arrais

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula

RESUMO: O presente trabalho descreve o estudo químico do extrato etanólico dos galhos de *Angostura bracteata,* família Rutaceae, assim como a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos seus extratos (folhas e galhos) e de algumas substâncias isoladas. As substâncias foram purificadas utilizando métodos clássicos de separação e identificadas através de métodos espectrométricos de análise (RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D e 2D) e CG-EM). A partir do extrato etanólico dos galhos, foi feita uma coluna filtrante para obtenção de três frações: Fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica. Da fração hexânica, foram isolados três alcaloides quinolínicos: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina (AB-2), 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentil)quinolina (AB-4) e 4-metoxi-2-(3',4'metilenodioxifeniletil)quinolina (AB-7); dois alcaloides furoquinolínicos: evolitrina (AB-9) e esquimianina (AB-12); um aldeído fenólico: vanilina (AB-8) e uma mistura dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol (AB-3). Da fração acetato de etila, foram isolados mais um alcaloide quinolínico, o 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)quinolina (AB-10) e uma mistura de isômeros rotaméricos de uma amida, a *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida (AB-11). Da fração metanólica, foi isolada uma mistura de isômeros *cis* e *trans* de uma amida, a *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1*H*-pirrol-1-il)butil]ferulamida, cujo isômero *cis* está sendo descrito na literatura pela primeira vez. A atividade leishmanicida dos extratos das folhas e galhos de *A. bracteata*, assim como as substâncias AB-2, AB-4, AB-11 e AB-13 foram avaliadas *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis,* empregando-se o método do MTT. Apesar de várias plantas desse gênero apresentarem atividade leishmanicida, neste ensaio, os extratos e substâncias testados não apresentaram atividade significativa. Os resultados obtidos neste trabalho, principalmente a partir da investigação fitoquímica de *A. bracteata* contribuem para o conhecimento e valorização da flora brasileira, em especial da família Rutaceae.

Palavras-chave: *Angostura bracteata*, alcaloides quinolínicos, amidas, atividade leishmanicida.

Evaluation of the leishmanicidal activity of chemical constituents of the branches from *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki (Rutaceae)

Author: Denise Silva Arrais

Advisor: Profa. Dr. Vanderlúcia Fonseca de Paula

ABSTRACT: The present work describes the chemical study of the ethanolic extract of the branches from *Angostura bracteata*, Rutaceae family, as well as the evaluation of the *in vitro* leishmanicidal activity of its extracts (leaves and branches) and some isolated substances. Substances were purified using classical separation methods and identified by spectrometric analysis methods (^{1}H and ^{13}C NMR (1D and 2D) and GC-MS). From the ethanolic extract of the branches, a filtering column was made to obtain three fractions: hexane, ethyl acetate and methanol fractions. From the hexane fraction, three quinoline alkaloids were isolated: 4-methoxy-2-(1'2'-*trans*-epoxypropyl)quinoline (AB-2), 4-methoxy-2-(1'2'-*trans*-epoxypentyl)quinoline (AB-4) and 4-methoxy-2-(3',4'-methylenedioxyphenylethyl)quinoline (AB-7); two furoquinoline alkaloids: evolitrine (AB-9) and skimmianine (AB-12); a phenolic aldehyde: vanillin (AB-8) and a mixture of the steroids β-sitosterol and stigmasterol (AB-3). From the ethyl acetate fraction, a further quinoline alkaloid, 2-(3',4'-methylenedioxystyryl)quinoline (AB-10) and a mixture of rotameric isomers of an amide, *N*-4-hydroxyphenethyl)-*N*-methyl-*trans*-ferulamide (AB-11) was isolated. From the methanol fraction, a mixture of *cis* and *trans* isomers was isolated from an amide, *N*-[4-(2-formyl-5-hydroxymethyl-1*H*-pirrole-1-yl)butyl]ferulamide, whose *cis* isomer is being described in the literature for the first time. The leishmanicidal activity of the leaves and branches extracts from *A. bracteata*, as well as the substances AB-2, AB-4, AB-11 and AB-13 were evaluated *in vitro* against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, using the MTT method. Although several plants of this genus have leishmanicidal activity, in this assay, the extracts and substances tested did not show significant leishmanicidal activity. The results obtained in this work, mainly of the phytochemical investigation from *A. bracteata* contribute to the knowledge and appreciation of the Brazilian flora, especially from the Rutaceae family.

Keywords: *Angostura bracteata,* quinoline alkaloids, amides, leishmanicidal activity.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO 1

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2

2.1 A família Rutaceae A. Juss. 2

2.1.1 O gênero *Angostura* Roem. & Schult. 2

2.1.2 Metabólitos secundários isolados de *Angostura* 3

2.1.2.1.1 *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki 3

2.1.2.1.2 *Angostura granulosa* (Kallunki) Kallunki 3

2.1.2.1.3 *Angostura longiflora* (K. Krause) Kallunki 4

2.1.2.1.4 *Angostura trifoliata* (Willd.) T.S. Elias 4

2.2 Atividade biológica do gênero 8

2.3 Leishmaniose 9

3.0 OBJETIVOS 11

3.1 Geral.....11

3.2 Específicos 11

4.0 PARTE EXPERIMENTAL.....11

4.1 Materiais e reagentes utilizados 11

4.2 Equipamentos 12

4.3 Metodologia.....12

4.3.1 Coleta e Identificação do material Vegetal 12

4.3.2 Preparo dos extratos 12

4.3.3 Isolamento dos constituintes químicos 13

4.3.4 Identificação das substâncias isoladas.....14

4.3.5 Atividade leishmanicida *in vitro* 21

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....21

5.1 Identificação dos constituintes químicos isolados de *Angostura bracteata* 21

5.1.1 Identificação da substância AB-1 24

5.1.2 Identificação da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina 25

5.1.3 Identificação da amostra AB-3: mistura de β-sitosterol e estigmasterol 31

5.1.4 Identificação da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina).....35

5.1.6 Identificação da substância AB-6 39

5.1.7 Identificação da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.....40

5.1.8 Identificação da amostra AB-8: vanilina 44

5.1.9 Identificação da amostra AB-9: evolitrina 45

5.1.12 Identificação da substância AB-12: esquimianina 65
5.1.13 Identificação da fração AB-13: magnolamida e magnolamida b.....69
5.2 Atividade leishmanicida 78
6.0 CONCLUSÃO.....80
7.0 REFERÊNCIAS.....81

1.0 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde tempos muito remotos, como tentativa de amenizar ou curar os males e doenças que o assolam. Em muitas comunidades carentes e alguns grupos étnicos, o conhecimento a respeito das propriedades destas plantas se constitui como único recurso terapêutico para a população (MACIEL et al., 2001).

Como ampla fonte de plantas medicinais, destaca-se o Brasil, considerado um país megadiverso que detém cerca de 22% das 1,5 milhão de espécies descritas na Terra. Esta grande diversidade biológica deve-se a sua extensão territorial relativamente grande, juntamente com a sua diversidade geográfica e climática. Retém a flora mais rica do mundo, apresentando cerca de 55 mil espécies de plantas superiores, o que representa 22% do total mundial (SAVI et al., 2019) e possui alto índice de espécies endêmicas. Apesar de haver uma grande diversidade na flora brasileira, menos de 10% das espécies conhecidas foram estudadas com o objetivo de obter compostos que exibam atividade biológica (HEINZMANN e BARROS, 2007). Este baixo percentual de estudo das espécies conhecidas mostra-se desfavorável para a população em geral, pois o conhecimento acerca de compostos bioativos pode contribuir para a produção de novos fármacos eficientes para controlar ou curar determinadas doenças.

A indústria farmacêutica, nas últimas décadas, tem descoberto medicamentos baseados em modelos de compostos sintéticos, pois são fáceis de reproduzir e apresentam compatibilidade com as *High Throughput Screening (HTS),* traduzindo para o português significa triagem de alta produtividade, um método computadorizado que utiliza sistemas robóticos para realizar testes em série, em busca da descoberta de novos princípios ativos. Porém, houve um declínio na quantidade de fármacos que chegaram ao mercado, o que torna imprescindível a busca por novos compostos bioativos a partir do estudo dos produtos naturais (ATANASOV et al., 2015).

A investigação fitoquímica de produtos naturais ainda não estudados ou pouco explorados apresenta-se como uma importante ferramenta na busca por novas substâncias com princípios ativos. Além disso, esses produtos naturais podem servir como modelos eficientes para produzir substâncias medicamentosas com nova função terapêutica, diferente do material de partida (SILVA e FERNANDES, 2010).

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A família Rutaceae A. Juss.

A família Rutaceae A. Juss. compreende cerca de 160 gêneros e 1.900 espécies, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. É uma família muito grande e diversificada (GROPPO et al., 2008). As espécies pertencentes a esta família geralmente são árvores ou arbustos, que apresentam flores actinomorfas e pequenas de cor branca ou creme. No Brasil, espécies pertencentes a esta família são encontradas na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal. Verifica-se ocorrência de 32 gêneros que compreendem 194 espécies dos quais, 5 gêneros e 105 espécies são endêmicos (FLORA DO BRASIL, 2020).

Alguns representantes da família Rutaceae apresentam grande importância econômica, como por exemplo espécies do gênero *citrus*, que apresentam variedades de frutos comestíveis incluindo laranja *(Citrus sinensis*), limão *(Citrus limon*), toranja (*Citrus paradisi)* e lima (principalmente *Citrus aurantifolia*). Algumas espécies como o pau-marfim (*Balfourodendrom riedeliano),* por exemplo, também se destacam na economia como produtora de madeira de boa qualidade, sendo muito utilizado para a produção de móveis (CARVALHO, 2003).

Além da importância econômica, a família Rutaceae é bem-conceituada entre os fitoquímicos devido a sua excepcional variedade de metabólitos secundários, entre os quais se destacam, alcaloides, limonoides, flavonoides, cumarinas e óleos voláteis (GROPPO et al., 2008).

2.1.1 O gênero *Angostura* Roem. & Schult.

O gênero *Angostura* é constituído por sete espécies, distribuídas na região da Nicarágua ao Norte da Venezuela e sul ao norte da Bolívia (KALLUNKI e PIRANI, 1998). No Brasil há 4 espécies conhecidas pertencentes a este gênero, entre as quais 2 são endêmicas: *A. bracteata* e *A. quinquefolia* (FLORA DO BRASIL, 2020).

Elas podem ser encontradas nas regiões norte (Acre, Amazonas e Pará), nordeste (Bahia e Maranhão), centro-oeste (Mato Grosso) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) (FLORA DO BRASIL, 2020).

Angostura é um dos gêneros que constitui a subtribo Galipeinae, antigamente conhecida como Cuspariinae, tribo Galipeae (KALLUNKI e PIRANI, 1998). O número de espécies pertencentes a este gênero foi confuso desde a sua descrição, pois havia

divergências entre as descrições dos taxonomistas em vários sistemas de classificação. Posteriormente, essas divergências foram retificadas por Kallunki e Pirani (1998), e várias espécies foram excluídas de *Angostura* e consideradas pertencentes a *Conchocarpus*.

Três novas espécies de *Angostura* (*A. alipes*, *A. quinquefolia* e *A. simplex*) foram descritas, três novas combinações neste gênero foram realizadas (*A. bracteata, A. granulosa e A. longiflora*). Como resultado, sete espécies de *Angostura* são reconhecidas atualmente (KALLUNKI e PIRANI, 1998).

2.1.2 Metabólitos secundários isolados de *Angostura*

O perfil químico do gênero *Angostura* é composto por diversas classes de metabólitos secundários, dos quais, destacam-se principalmente os alcaloides quinolínicos (Quadro 1). Dentre as sete espécies descritas, em um levantamento realizado no *Web of Science* e *Scifinder Web*, foram encontrados estudos sobre a constituição química para quatro espécies: *A. bracteata*, *A. granulosa*, *A. longiflora* e *A. trifoliata*. Estes estudos são relatos a seguir e mostrados de forma sucinta no Quadro 1.

2.1.2.1.1 *Angostura bracteata* (Nees & Mart.) Kallunki

Angostura bracteata é uma espécie arbórea nativa e endêmica do Brasil, distribuída nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de janeiro e São Paulo. No Espírito Santo, é conhecida popularmente por gramirim-café. Possui como sinônimos *Sciuris bracteata* Nees & Mart.; *Portenschlagia trifoliata* Pohl ex Engl., *Galipea bracteata* (Nees & Mart.) Engl. e *Ticorea bracteata* (Nees & Mart.) A.St.-Hil. ex DC (FLORA DO BRASIL, 2020).

2.1.2.1.2 *Angostura granulosa* (Kallunki) Kallunki

A espécie arbórea *Angostura granulosa* encontra-se distribuída na região da América do Sul, especificamente Nicarágua e Costa Rica (KALLUNKI, 1988); sua casca é muito utilizada pela população para fins medicinais (LÓPES e BARRILLAS,1997). O nome desta espécie foi atribuído devido ao aspecto granular da pubescência dos seus frutos maduros (KALLUNKI, 1988).

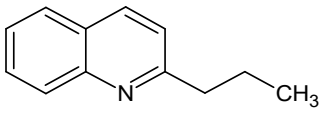
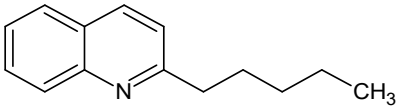
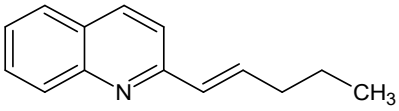
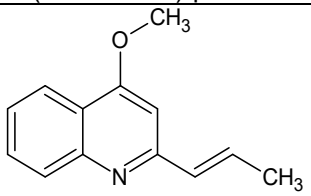
2.1.2.1.3 *Angostura longiflora* (K. Krause) Kallunki

Angostura longiflora é uma espécie arbórea com longas folhas encontrada no norte da Bolívia e no Brasil, nos estados Acre e Mato Grosso. A casca do caule desta árvore é muito utilizada pelos índios chimanes, na Bolívia, para o tratamento da leishmaniose cutânea (FOURNET et al., 1994). No Acre, esta espécie é conhecida popularmente como Matapira, mata rabuja e Pirarara branca (FLORA DO BRASIL, 2020).

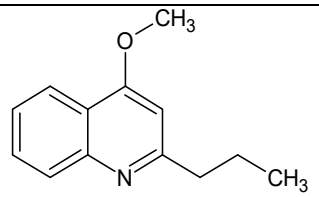
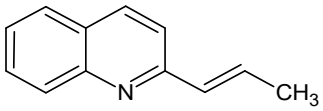
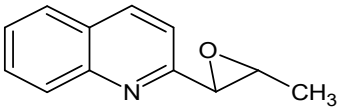
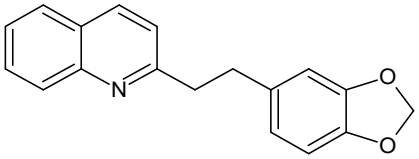
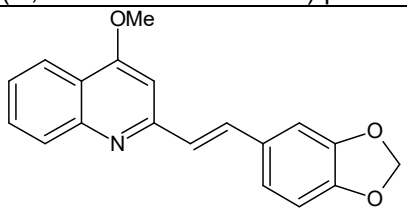
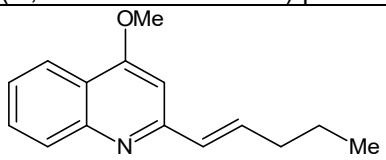
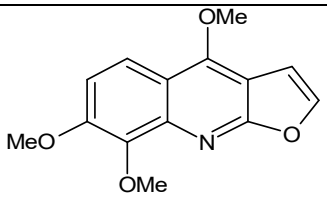
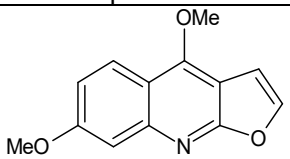
2.1.2.1.4 *Angostura trifoliata* (Willd.) T.S. Elias

Angostura trifoliata é uma espécie de árvore arbustiva muito conhecida na medicina popular da América do Sul. Sua casca é amplamente utilizada no tratamento de febres, espasmos e diarreias. Esta espécie também costumava ser a base de um tônico amargo chamado Bitters de Angustura (RAKOTOSON et al., 1998).

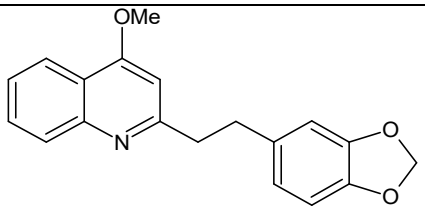
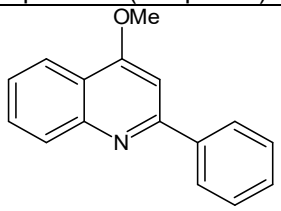
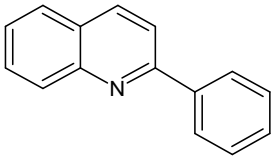
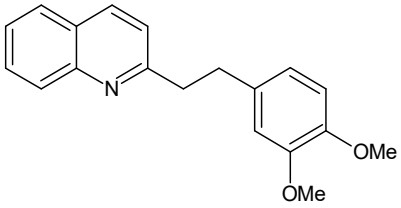
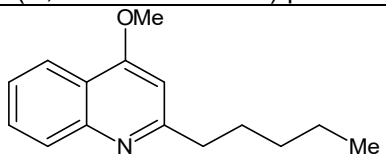
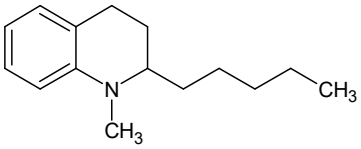
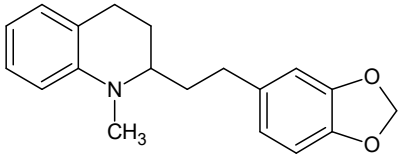
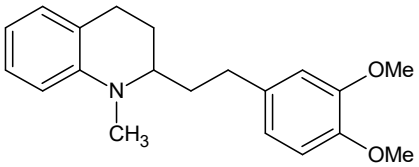
Quadro 1. Substâncias isoladas de três espécies do gênero *Angostura*

ALCALOIDES			
Substância isolada	**Espécie**	**Órgão vegetal**	**Referência**
 2- Propilquinolina	*A. bracteata*	Caule	Vieira e Kubo (1990)
 2-Pentilquinolina	*A. bracteata*	Caule	Vieira e Kubo (1990)
 2-(Pent-1'-enil)quinolina	*A. bracteata*	Caule	Vieira e Kubo (1990)
 Chimanina C	*A. longiflora*	casca do caule casca da raiz folhas	Fournet, et. al (1993b)

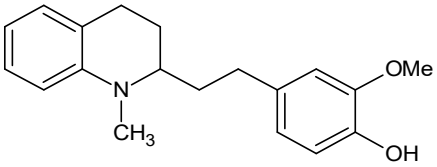
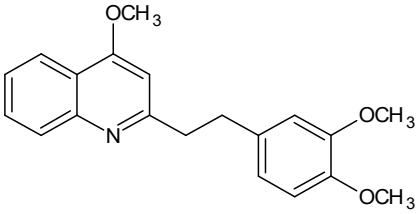
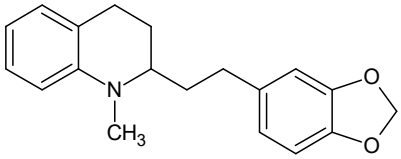
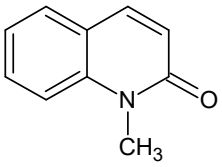
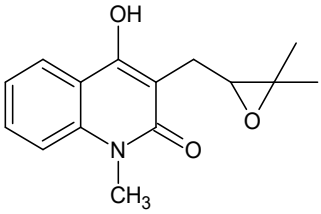
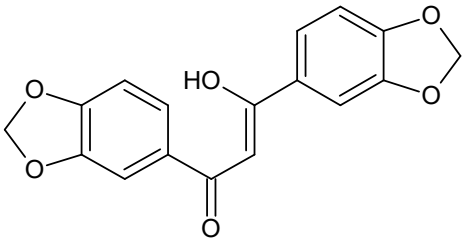
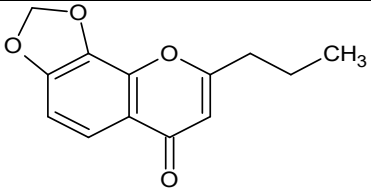
Continua...

 Chimanina A	*A. longiflora*	casca do caule casca da raiz folhas	Fournet, et al. (1993b)
 Chimanina B	*A. longiflora*	casca do caule casca da raiz folhas	Fournet, et al. (1993b) Fournet, et al. (1994)
 Chimanina D	*A. longiflora*	casca do caule casca da raiz folhas	Fournet, et al (1993b) Fournet, et al (1994)
 2-(3',4'-Metilenodioxifeniletil)quinolina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al (1989)
 2-(3',4'-Metilenodioxiestiril)quinolina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al (1989)
 4-Metoxi-2-(pent-1'-enil)quinolina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al. (1989)
 Esquimianina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al (1989)
 Evolitrina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al (1989)

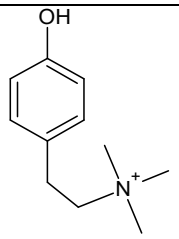
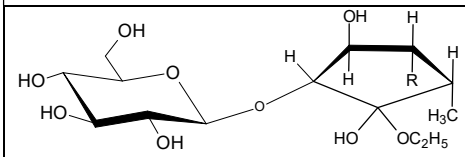
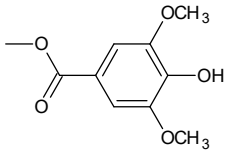
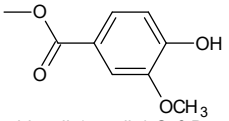
Continua...

 4-Metoxi-2-(3',4'-metilenodioxifeniletil) quinolina (Cusparina)	*A. longiflora*	casca do caule galhos	Fournet, et al. (1994) Fournet, et al. (1989) Rakotoson et al. (1998) Houghton et al. (1999)
 4-Metoxi-2-fenilquinolina	*A. longiflora*	casca do caule galhos	Fournet, et al. (1994) Fournet, et al. (1989)
 2-Fenilquinolina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al. (1994) Fournet, et al. (1989)
 2-(3',4'-Dimetoxifeniletil)quinolina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al. (1989)
 4-metoxi-2-pentilquinolina	*A. longiflora*	casca do caule	Fournet, et al. (1989) Houghton et al. (1999)
 Angustureína	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Jacquemond-collet et al. (2001)
 Galipinina	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Rakotoson et al. (1998)
 Cuspareína	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Rakotoson et al. (1998) Houghton et al. (1999)

Continua...

 Galipeina	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Jacquemond-collet et al. (1999)
 Galipina	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Houghton et al. (1999)
 Alocuspareina	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Houghton et al. (1999)
 *N*-metilquinol-2-ona	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Houghton et al. (1999)
 *N*-Metil-4-hidroxi-3-(2´,3´-epoxiisobutil)-2-quinolona	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	casca do caule	Jacquemond-collet et al. (2000)
Outras Classes			
 Galiposina	*A. granulosa* (Sin. *Galipea granulosa*	Casca	López et al. (1998)
 Granulosina	*A. granulosa* (Sin. *Galipea granulosa)*	Casca	López et al. (1997)

Continua...

 Candicina	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	Casca do tronco	Jacquemond-collet et al. (2000)
 Bitterstoff 1: R =  3,5-diidroxi-5-etoxi-2-siringoil-1-metil-4-O-*β*-D-Glicopiranosil-ciclopentano Bitterstoff 2: R =  3,5-diidroxi-5-etoxi-2-siringoil-1-metil-4-O-*β*-D-vaniloil-ciclopentano	*A. trifoliata* (sin. *Galipea officinalis*)	Casca do caule	Brieskorn and Beck (1971)

2.2 Atividade biológica do gênero *Angostura*

No gênero *Angostura*, há várias classes de compostos, especialmente alcaloides quinolínicos, que apresentam diferentes atividades biológicas. Em um estudo realizado na Bolívia, foram isolados 12 alcaloides quinolínicos de *Galipea Longiflora (*sin*. Angostura longiflor*a) e testados contra *L. amazonensis, L. brasiliensis* e *L. donovani*. A casca do caule desta planta é utilizada sob a forma de emplastos pelos índios Chimanes para o tratamento da leishmaniose cutânea produzida por *Leishmania braziliensis*. A partir deste estudo, foi possível comprovar atividade leishmanicida *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis, L. brasiliensis* e *L. donovani.* Entre os alcaloides isolados, a 2-*n*-propilquinolina (CI_{90} = 50 µg/mL), a chimanina D (CI_{90} = 50 µg/mL) e a chimanina B (CI_{90} = 50 µg/mL) apresentaram maior ação leishmanicida (CI = concentração inibitória). Os extratos clorofórmico e em éter de petróleo, preparados a partir da casca do caule, da raiz e folhas, apresentaram-se ativos *in vitro* contra *L. amazonensis, L. brasiliensis* e *L. donovani Leishmania* e *Tripanossoma cruzi* a 100 µg/mL. Para a atividade antileishmania *in vivo*, camundongos Balb/c foram infectados com *Leishmania amazonensis* (cepa PH8 e H-142) e tratados 24 h após a infecção com os principais alcalóides isolados do extrato

bruto: 2-fenilquinolina e 2-*n*-pentilquinolina. A 2-fenilquinolina foi tão eficaz contra a cepa H-142 quanto a Glucantime®, medicamento de referência (FOURNET et al., 1994).

Um estudo realizado por Nakayama e colaboradores (2001) comparou a ação tripanocida "*in vivo"* do benzonidazol, que é uma droga recomendada para o tratamento da infecção aguda e congênita pelo *Tripanossoma cruzi*, e a 2-n-propilquinolina, alcaloide conhecido por sua atividade leishmanicida. Ambos foram testados em camundongos infectados com uma cepa não letal de *T. Cruzi e* apresentaram baixo impacto no nível de parasitemia. Porém, a resposta imune foi mais evidente nos camundongos tratados com benzonidazol e 2-*n*-propilquinolina do que nos camundongos não tratados.

Foram testadas as atividades antimaláricas e toxicológicas de quatro alcalóides tetrahidroquinolínicos puros (angustereina, galipinina, cuspareina e galipeina) que foram obtidos a partir da casca do tronco de *Galipea officinalis* (= *A. trifoliata*). Dois extratos brutos (hexânico e clorofórmico) apresentaram atividade antimalárica *in vitro* semelhante contra o *Plasmodium falciparum* (JACQUEMOND-COLLET et al., 2002).

Estudos *in vitro* realializados por Calla-magariños e colaboradores (2009), comprovaram que o extrato de Evanta (*Angostura longiflor*a) e a 2-fenilquinolina, além de apresentar potencial leishmanicida, controlaria a reação inflamatória crônica do indivíduo infectado devido ao efeito sobre a proliferação celular e produção de IFN-y (glicoproteína pró-inflamatória) induzida por anticorpos anti-CD3 e concanavalina A.

Em um estudo realizado por Vieira e Kubo (1990), foi comprovada atividade moluscicida dos alcaloides quinolínicos 2-substituídos 2-n-pentilquinolina, 2-(1'-pentenil)quinolina e 2-(3',4'- metilenodioxifeniletil)quinolina isolados de *Galipea bracteata* (sin. *A. bracteata)* contra a espécie de caramujo aquático *Biomphalaria glabrata,* envolvido na transmissão da esquistossomose.

2.3 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa ocasionada por diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae. Esses protozoários são transmitidos aos seres humanos por meio da picada de vetores pertencentes, em sua maioria, aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia.* (VERA-IZAGUIRRE, 2006). A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, pois afeta principalmente pessoas de baixa renda, que vivem em

péssimas condições de moradia e sem acesso a saneamento básico, como por exemplo, em áreas de esgoto a céu aberto, o que atrai os mosquitos transmissores desta doença (ARAÚJO et al., 2019).

Anualmente, registra-se a ocorrência de 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose, distribuídos por 98 países dos cinco continentes. Entre estas ocorrências, 300.000 correspondem a leishmaniose visceral, onde 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão; e 1 milhão das ocorrências corresponde aos casos de leishmaniose cutânea, que ocorrem principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe Síria e Tunísia e leishmaniose mucocutânea, que ocorre essencialmente no Brasil, Peru e no Estado Plurinacional da Bolívia (WHO, 2015).

O termo leishmaniose refere-se ao fato da pessoa infectada com o parasita adoecer devido as manifestações dos sintomas da doença, considerando que a maioria das pessoas infectadas vivem normalmente sem que desenvolvam nenhum sintoma. As diversas manifestações clínicas da doença dependem, além da espécie de *Leishmania* envolvida, de fatores genéticos e da resposta imunológica do hospedeiro. A leishmaniose pode se manifestar por três formas diferentes: 1) leishmaniose visceral, conhecida popularmente como calazar, é forma mais grave da doença, pois os protozoários atacam os órgãos internos do hospedeiro e se não houver tratamento, pode ser fatal; 2) leishmaniose cutânea, a forma mais comum da doença, onde os protozoários atacam a pele do indivíduo causando lesões graves; e 3) leishmaniose mucocutânea, na qual as mucosas do nariz, boca e garganta são comprometidas, podendo até ser totalmente destruídas (WHO, 2019).

O tratamento disponível para leishmaniose consiste na utilização de medicamentos à base de compostos de antimônio pentavalente, anfotericina B e pentamidinas (MOREIRA et al., 2006). Porém, a utilização destes compostos apresenta alguns inconvenientes, como custo elevado; dificuldades na administração do medicamento, já que esta é realizada por via parenteral; tempo prolongado de tratamento, o que faz com que muitos pacientes desistam antes de eliminarem o parasita do organismo, aumentando as chances de os protozoários desenvolverem resistência a droga administrada; alta toxicidade dos compostos utilizados e diversos efeitos colaterais desagradáveis, como alterações cardíacas, problemas renais, pancreáticos e hepáticos (ROCHA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2019). Neste contexto, a busca por novas substâncias que sejam ativas contra a leishmaniose e que

apresentem uma forma de tratamento menos agressiva é de suma importância. Os extratos provenientes de plantas ou até mesmo os metabólitos secundários isolados destes extratos podem fornecer uma vasta fonte de agentes medicinais contra a leishmaniose.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar o estudo fitoquímico do extrato etanólico dos galhos de *Angostura bracteata* e avaliar a atividade leishmanicida deste extrato e dos constituintes isolados.

3.2 Específicos

- Realizar o estudo fitoquímico do extrato etanólico dos galhos de *Angostura bracteata* coletados no município de Jequié-BA, utilizando-se métodos cromatográficos clássicos.
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectroscópicos e espectrométricos.
- Avaliar o potencial de atividade leishmanicida dos extratos etanólicos dos galhos, folhas e substâncias isoladas de *Angostura bracteata* por meio de ensaios biológicos *"in vitro".*

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e reagentes utilizados

- Para as análises por cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 60 (0,063–0,200 mm) da Sigma Aldrich.

- As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas contendo uma camada de sílica gel 60 G-F254 da Vetec e Macherey-Nagel ativadas em estufa a 100 ºC por 2 h.

- As placas de CCD foram reveladas por irradiação de luz UV, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, por sublimação de iodo e por ação de um spray contendo o reagente de Dragendorff - uma solução ácida de subnitrato de bismuto com iodeto de potássio (ALICE et al., 1995).

- Os solventes utilizados para o preparo dos extratos, separações por CC, e análise por CCD foram todos de grau analítico das marcas Vetec, Qhemis, Reatec, Anidrol e Química Moderna.

4.2 Equipamentos

- Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, a 600 MHz e 150 MHz, respectivamente, assim como o DEPTq e os espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) foram obtidos na Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Araraquara, em espectrômetro Bruker Avance III 600.

- A eliminação dos solventes dos extratos e das frações obtidas no seu fracionamento foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Fisaton.

- As temperaturas de fusão (Tf) foram determinadas em um aparelho modelo MQAPF-302 da Microquímica.

- O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar da Tecnal, modelo TE-394/2.

- As análises por CG-EM foram realizadas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em um cromatógrafo modelo GC-17 A (Shimadzu) sob as seguintes condições: a temperatura de injeção e da interface foi 290 ºC, fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,6 mL/min, temperatura inicial da coluna 40 ºC durante 2 min, sendo aumentada 20 ºC/min até atingir 300 ºC. A coluna utilizada foi uma SPB-5 (30 m x 0,25 mm (di), espessura do filme de 0,25 μm).

4.3 Metodologia

4.3.1 Coleta e Identificação do material Vegetal

Os materiais vegetais submetidos a este estudo foram coletados na Fazenda Brejo Novo, situada a 9 km da cidade de Jequié-BA em 27 de março de 2017. A exsicata da planta *Angostura bracteata* (Figura 1) foi depositada no Herbário da UESB com o código HUESB 12718.

Figura 1. Planta *Angostura bracteata* e sua exsicata, respectivamente, depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – *Campus* de Jequié.

4.3.2 Preparo dos extratos

Os galhos (607 g) de *A. bracteata* foram secos em estufa com circulação de ar à uma temperatura de 40 ºC. Em seguida, foram cortados e submetidos à extração a frio com etanol (PA) por um período de 48 horas. O solvente foi então eliminado por destilação sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Este procedimento foi repetido por três vezes, para obtenção de 53,20 g do extrato bruto.

Da massa total do extrato bruto obtido, 45 g foi submetida a uma coluna filtrante e o restante foi separado para ensaio biológico. O extrato foi adsorvido em sílica gel 60 e, posteriormente, fracionado em coluna a partir da percolação dos solventes hexano, acetato de etila e metanol, para obtenção das respectivas frações apresentadas na Tabela 1. Além do extrato etanólico dos galhos, foi preparado também o extrato etanólico das folhas de *A. bracteata,* utilizando o mesmo procedimento descrito acima. Foram utilizados 190,00 g do material vegetal e para obtenção de 36,90 g do extrato etanólico das folhas. Este extrato foi utilizado apenas para a avaliação de sua atividade leishmanicida, pois na literatura já há relatos do estudo fitoquímico do extrato obtido das folhas de *A. bracteata.*

Tabela 1. Massa das frações originadas do extrato etanólico bruto dos galhos de *A. bracteata*

Fração	Código	Massa do extrato (g)
Hexânica	HGAB	7,30
Acetato de etila	AEGAB	1,44
Metanólica	MGAB	33,04

4.3.3 Isolamento dos constituintes químicos

A fração hexânica (HGAB), foi escolhida para estudo, pois ao analisá-la por CCD utilizando como revelador o reagente de Dragendorff e compará-la com as outras frações foi possível observar qualitativamente uma grande concentração em alcaloides e uma menor complexidade (Figura 2).

A fração hexânica foi, então, submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando como eluente uma mistura de Hexano/AcOEt 9:1 de forma isocrática. Este fracionamento deu origem a 8 novas frações (HGAB 1 - HGAB 8), após agrupamento. As frações ricas em alcaloides foram submetidas a sucessivos

fracionamentos por coluna cromatográfica até isolamento de seus constituintes químicos (Figuras 3 a 6).

Figura 2. Análise da fração hexânica em três aplicações, variando apenas a concentração do extrato, utilizando reagente de Dragendorff (CCD eluída com hexano/AcOEt 9:1).

Após estudar a fração hexânica, foi estudada a fração de acetato de etila (AEGAB) (Figura 7) e em seguida, a fração metanólica (MGAB) (Figura 8).

Para o isolamento dos componentes destas frações foi realizada cromatografia em coluna, onde a fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 e a fase móvel uma mistura de solventes (previamente analisada por meio da CCD) utilizada de forma isocrática.

4.3.4 Identificação das substâncias isoladas

Após serem purificadas, todas as substâncias isoladas foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e de ^{13}C e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de Massas (CG-EM) pelo método de separação em coluna e, apenas a amostra AB-13, pelo método de inserção direta devido ao seu caráter polar, a fim de possibilitar a elucidação estrutural dessas substâncias.

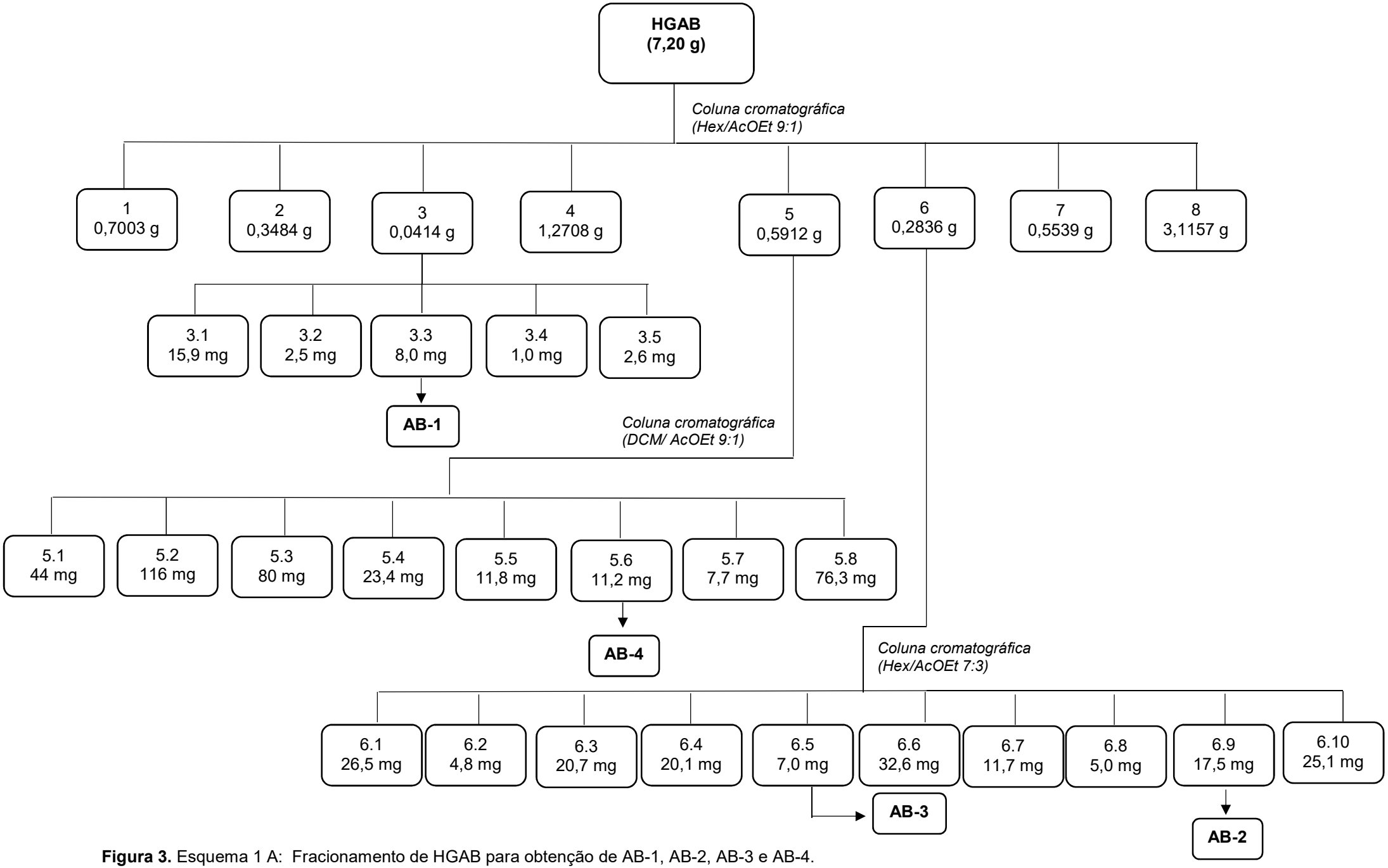


Figura 3. Esquema 1 A: Fracionamento de HGAB para obtenção de AB-1, AB-2, AB-3 e AB-4.

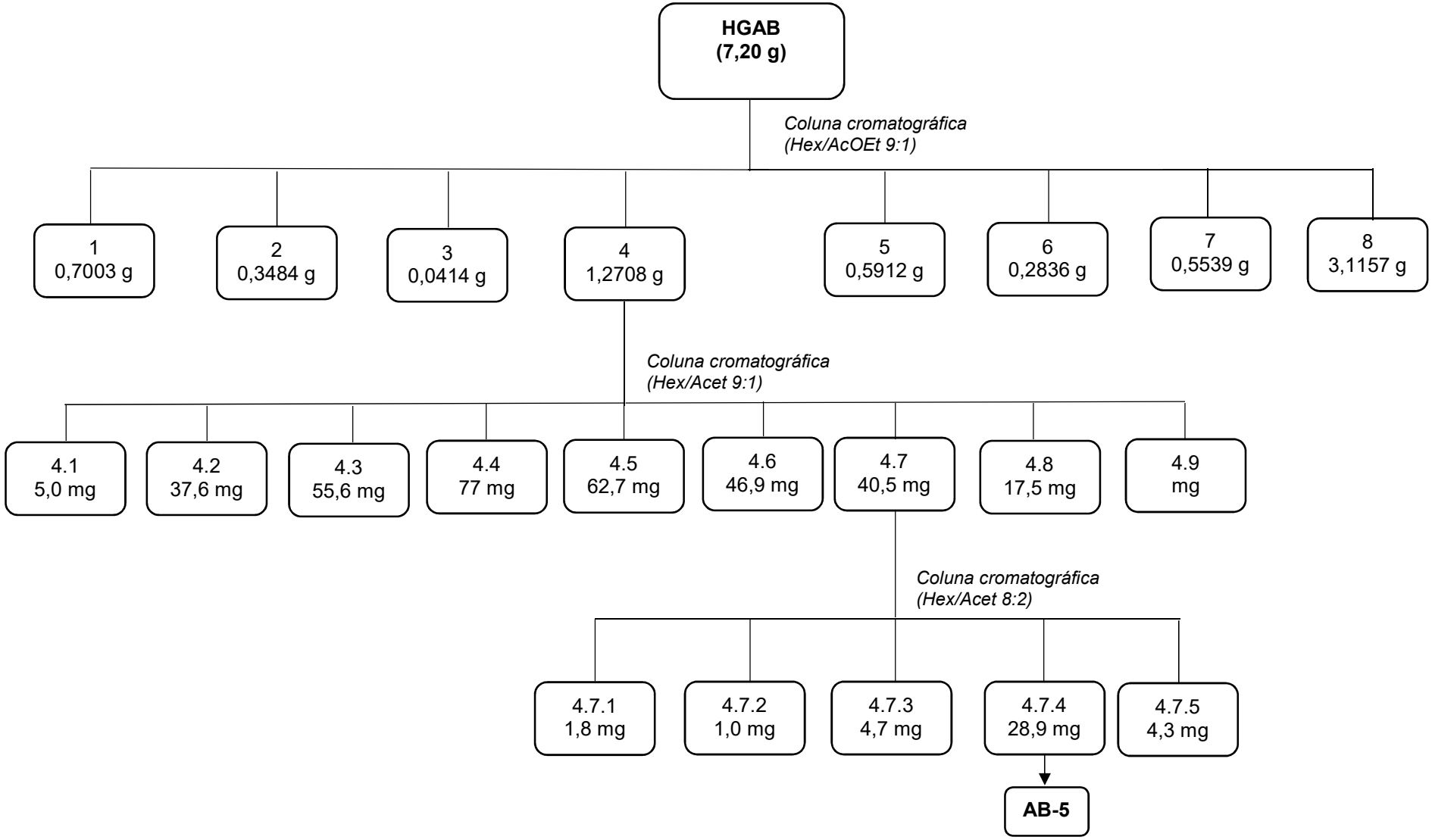


Figura 4. Esquema 1 B: Fracionamento de HGAB para obtenção da substancia AB-5.

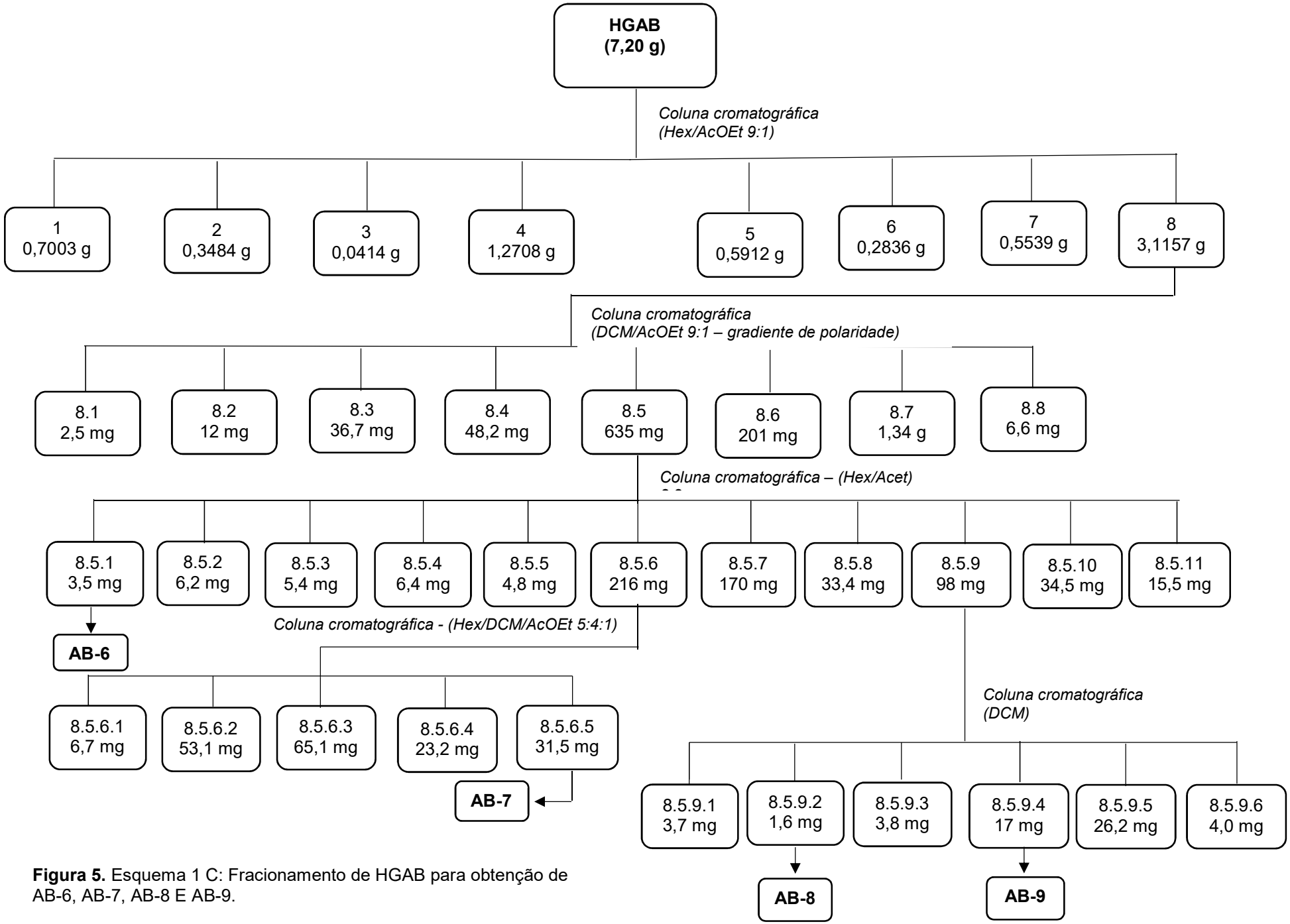


Figura 5. Esquema 1 C: Fracionamento de HGAB para obtenção de AB-6, AB-7, AB-8 E AB-9.

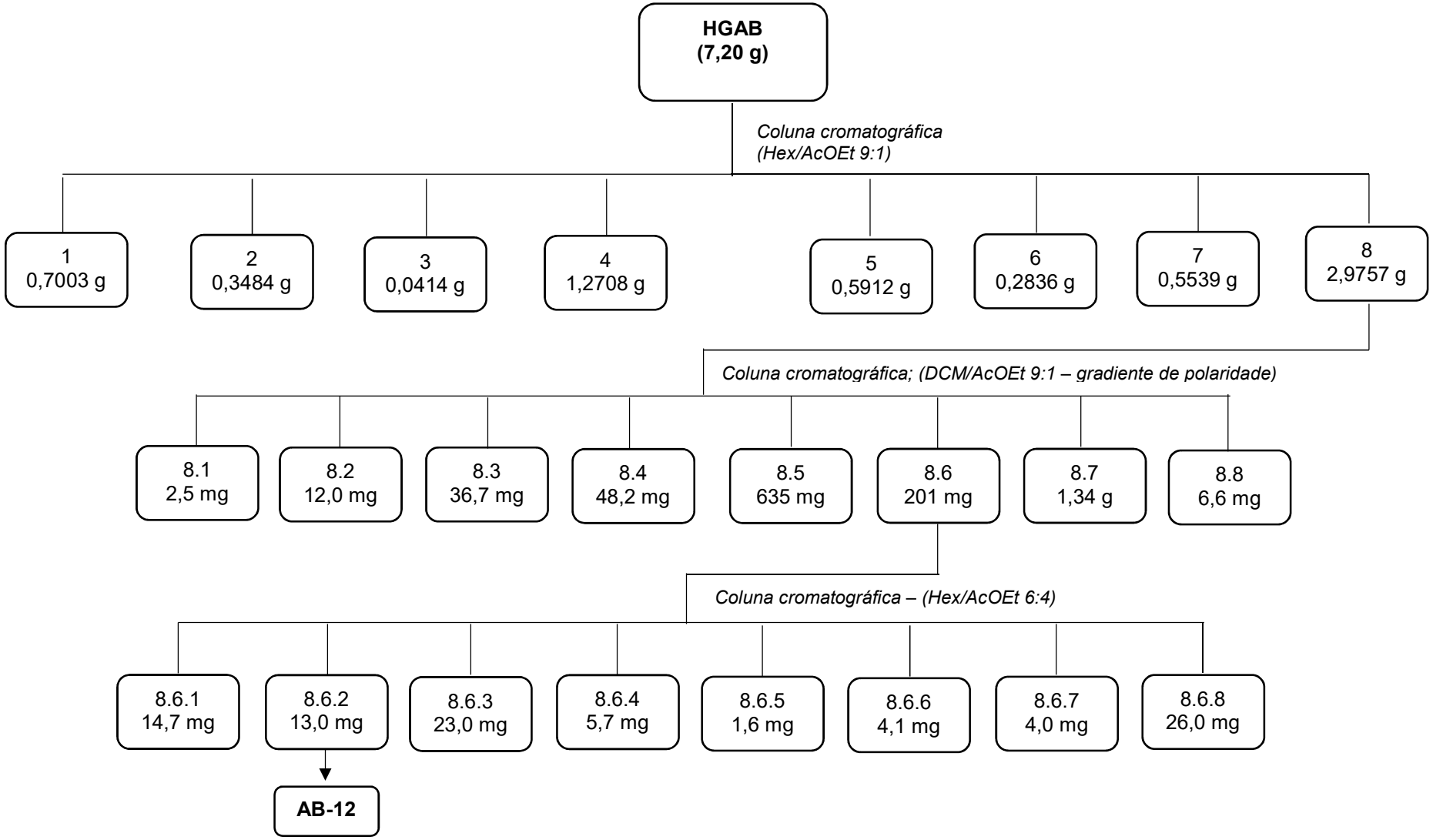


Figura 6. Esquema 1 D: Fracionamento de HGAB para obtenção de AB-12.

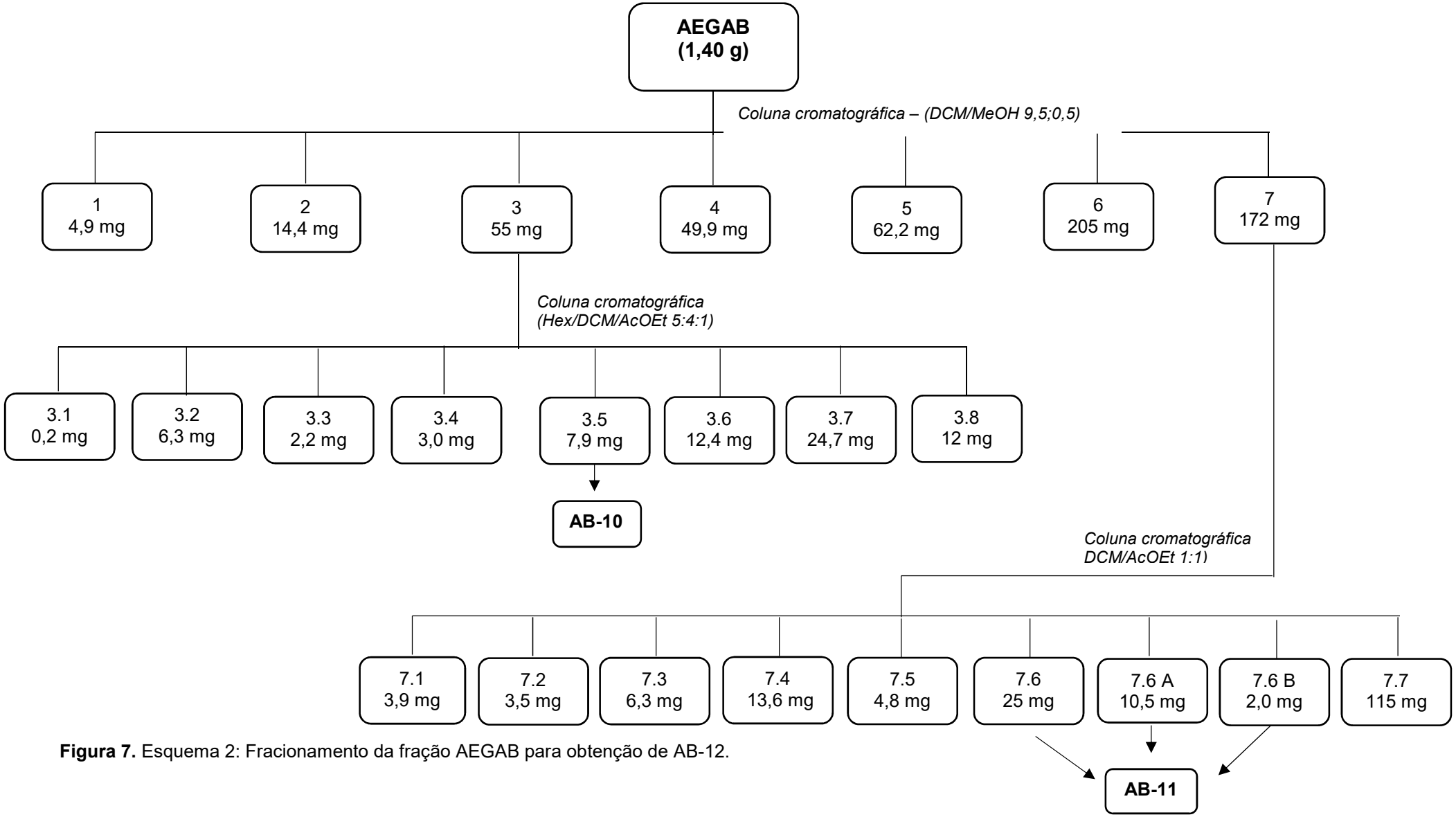


Figura 7. Esquema 2: Fracionamento da fração AEGAB para obtenção de AB-12.

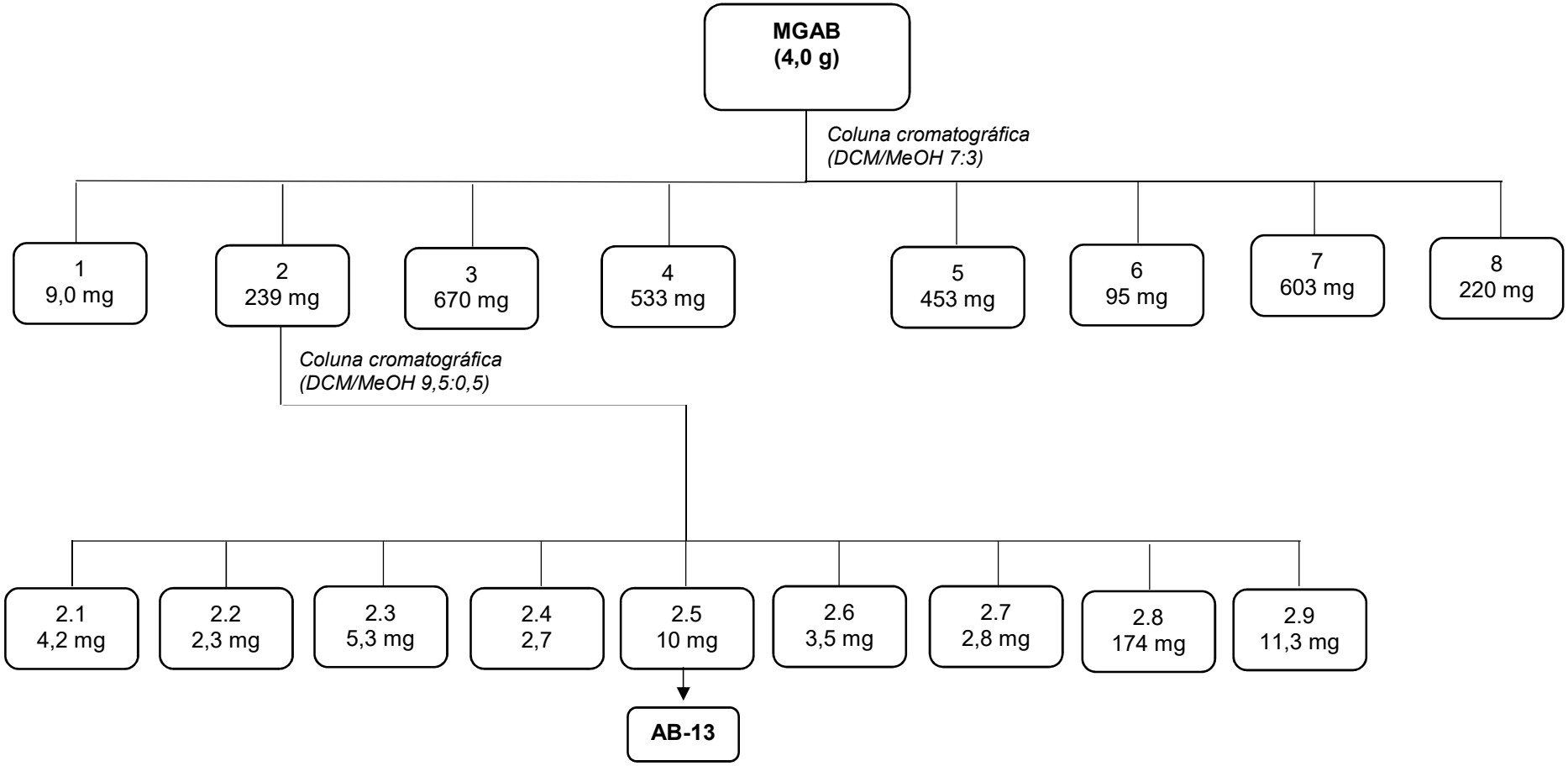


Figura 8. Esquema 3: Fracionamento de MGAB para obtenção de AB-13.

4.3.5 Atividade leishmanicida *in vitro*

Para realização do ensaio leishmanicida, foram utilizadas formas promastigotas extracelulares de *Leishmania amazonenses (Leishmania)* (IFLA/BR/196/PH-8), obtidas de lesões de “hamsters”. Essas formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider's pH 7,2 a 26 ºC.

Após 7 dias de cultivo, quando as formas promastigotas pararam de crescer, a cultura foi centrifugada por 10 min a 1000 RCF, ressuspendida em meio Schneider's pH 6,0 e incubada a 32 ºC, para a obtenção das formas amastigotas. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços. Uma alíquota de 90 µL de um inóculo contendo $1x10^8$ parasitas/mL e 10 µL das amostras a 200 µg/mL foram adicionadas a cada poço. As microplacas foram incubadas a 32 ºC por 72 h e a viabilidade celular foi determinada colorimetricamente usando 10 µL de metil tiazolil tetrazólio (MTT) à 5 mg/mL em 570 nm. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Anfotericina B á 0,2 µg/mL foi a droga leishmanicida utilizada como padrão (CALLAHAN et al., 1997; SERENO et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2002). Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida foram expressos em porcentagem e comparados com o grupo de controle.

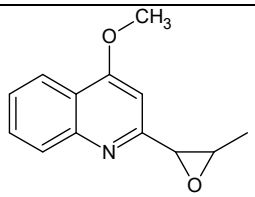
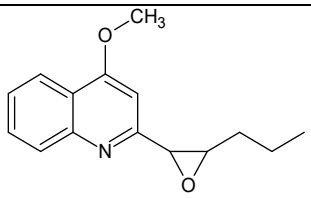
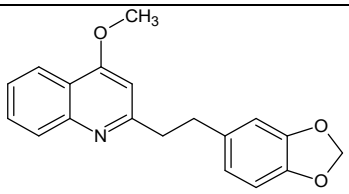
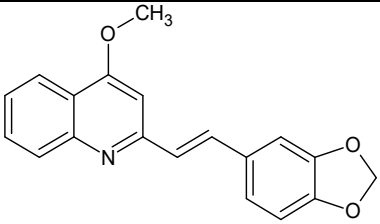
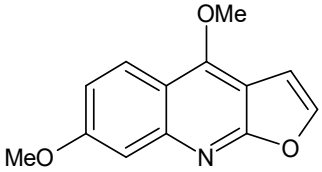
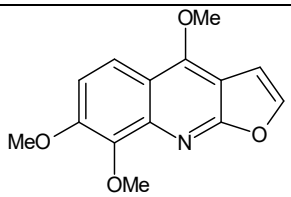
Os extratos que tiveram suas atividades leishmanicidas determinadas foram o EGAB e o EFAB. As amostras testadas foram AB-2, AB-4, AB-11 e AB-13. O ensaio leishmanicida foi realizado no Instituto René Rachou- IRR, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Minas Gerais.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

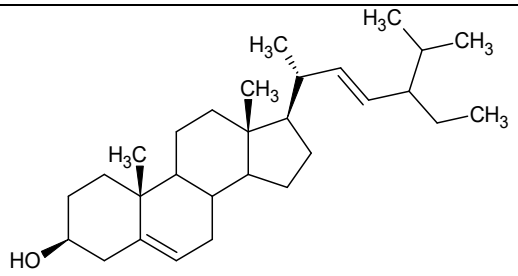
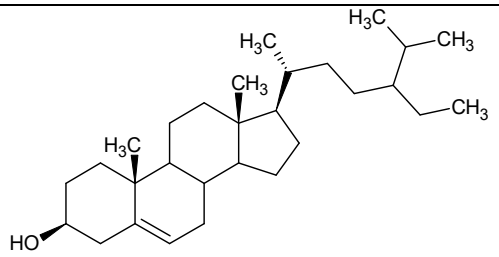
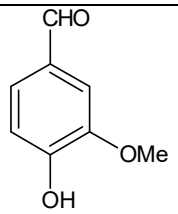
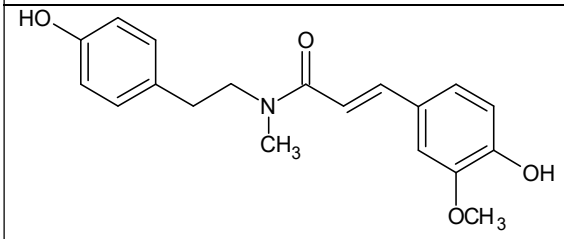
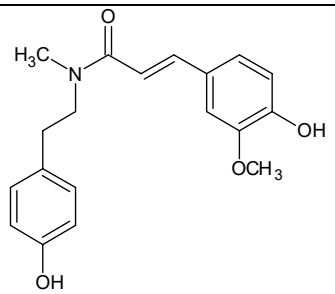
5.1 Identificação dos constituintes químicos isolados de *Angostura bracteata*

O estudo fitoquímico do extrato etanólico dos galhos de *Angostura bracteata* levou ao isolamento e identificação de quatro alcaloides quinolínicos, dois alcaloides furoquinolínicos, um aldeído fenólico, duas misturas isoméricas de amidas e uma mistura de dois esteroides. A estrutura química e o nome dos compostos isolados são apresentados no Quadro 2 e a elucidação estrutural é descrita nas páginas seguintes.

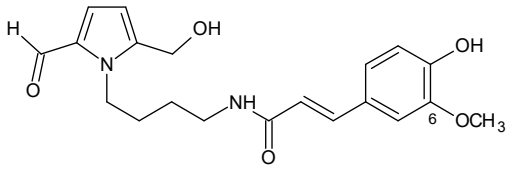
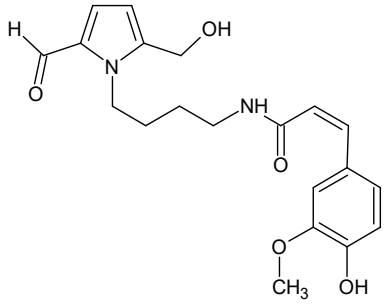
Quadro 2. Substâncias isoladas dos galhos de *Angostura bracteata*

Alcaloides quinolínicos			
Fórmula estrutural e molecular	**Código**	**Nome**	**Isolamento prévio**
 $C_{13}H_{14}NO_2$	AB-2	4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina	*A. bracteata* Andrade (2003)
 $C_{15}H_{17}NO_2$	AB-4	4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentil)quinolina	*A. bracteata* Andrade (2003)
 $C_{19}H_{17}NO_3$	AB-7	4-metoxi-2-(3',4'metilenodioxifeniletil) quinolina (Cusparina)	*G. longiflora* (=*A. longiflora*) Fournet et al. (1989)
 $C_{19}H_{15}NO_3$	AB-10	2-(3',4'-metilenodioxiestiril) quinolina	*G. longiflora (=A. longiflora)* Fournet et al. (1989)
Alcaloides furoquinolínicos			
 $C_{13}H_{11}NO_3$	AB-9	Evolitrina	*A. bracteata* Andrade (2003) *G. longiflora* (=*A. longiflora*) Fournet et al. (1989)
 $C_{14}H_{13}NO_4$	AB-12	Esquimianina	*G. longiflora* (=*A. longiflora*) Fournet et al. (1993)

Continua...

Esteroides			
 $C_{29}H_{48}O$	AB-3	Estigmasterol	*A. bracteata* Andrade (2003)
 $C_{29}H_{50}O$	AB-3a	β-sitosterol	*A. bracteata* Andrade (2003)
Aldeído fenólico			
 $C_8H_8O_3$	AB-8	Vanilina	*Vanilla planifolia* Gallage et al. (2018)
Amidas			
 $C_{19}H_{21}NO_4$	AB-11a	[*N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida]	Não reportado
 $C_{19}H_{21}NO_4$	AB-11b	[*N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida]	Não reportado

Continua...

 $C_{20}H_{24}N_2O_5$	AB-13a	Magnolamida	*Magnolia coco* Yu et al. (1998)
 $C_{20}H_{24}N_2O_5$	AB-13b	Magnolamida b	Não reportado

5.1.1 Identificação da substância AB-1

Da fração HGAB 3.3 (Figura 2), foram obtidos 2,6 mg de um óleo incolor e solúvel em diclorometano, codificada como AB-1. Esse óleo foi submetido a análise por CCD, com visualização da placa sob luz ultravioleta (λ = 254 e 365 nm) e revelação com vapores de iodo e reagente de Dragendorff, observando-se apenas um ponto na placa. O resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff, indicou tratar-se de um alcaloide. Porém, após envio da amostra para análise por RMN de ^1H, observou-se uma alteração da sua coloração, a qual tornou-se mais escura, e ao ser submetida novamente a análise por CCD (nas mesmas condições) apresentou vários pontos, indicando uma possível degradação da substância, a qual foi confirmada pelas análises por CG-EM (Figura 9). Por se tratar de uma mistura complexa de substâncias não foi possível identificar os seus constituintes químicos, bem como, não foi possível submetê-la a novo processo de purificação devido à pequena massa disponível.

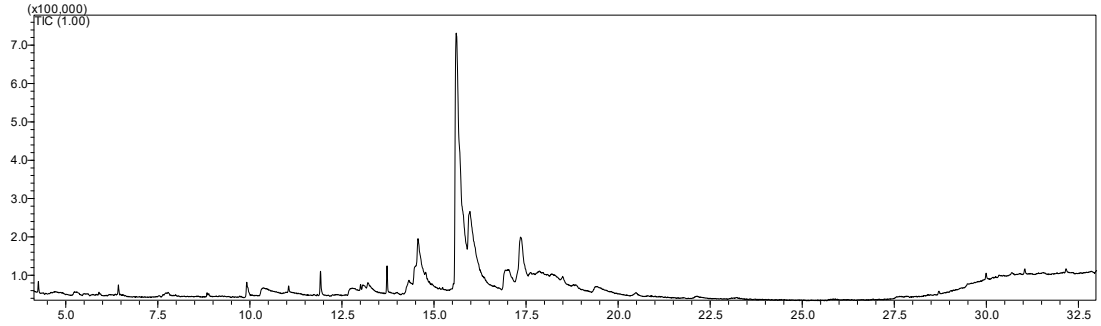


Figura 9. Cromatograma da fração AB-1.

5.1.2 Identificação da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina

Da fração HGAB 6.9, foram obtidos 17 mg de um óleo amarelo claro e solúvel em diclorometano, codificado como AB-2. Na análise por CCD, apresentou fluorescência quando sob luz UV (λ = 254 nm), e apresentou coloração alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcaloide. Seu espectro de massas (Figura 10) apresentou pico do íon molecular com razão *m/z*=215, indicando a presença do nitrogênio em sua estrutura. O espectro de massas de alta resolução apresentou a massa do $[M+H]^+$ em *m/z* = 216,1023, compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{13}NO_2$ (calculado para $C_{13}H_{14}NO_2$ = 216,1024).

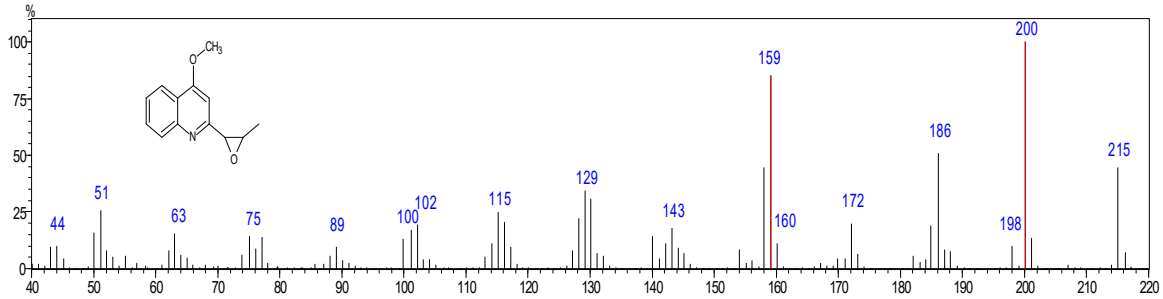


Figura 10. Espectro de massas (CG-EM/IE) da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

O espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$, Figura 11) apresentou sinais característicos de alcaloides quinolínicos (FOURNET et al., 1989), os quais possuem um anel benzênico fundido a um anel piridínico (DEWICK, 2002). Os sinais de hidrogênios em δ 8,16 (1H, *dd*, *J* = 8,3/ 1,1 Hz), δ 8,00 (1H, *d*, *J* = 8,3 Hz), δ 7,69 (1H, *ddd, J* = 8,3/ 6,9/1,1 Hz) e δ 7,48 (1H, *ddd, J* = 8,1/6,9/1,1 Hz) foram associados a um anel benzênico *orto* dissubstituído (fundido a um anel piridínico). O sinal em δ 6,63 (1H, *s*), atribuído a um hidrogênio na posição 3, caracterizou o padrão tetrassubstituído do anel piridínico, e o sinal em δ 4,03 (1H, *s*) indicou a presença de um grupo metoxila na posição 4 desse anel. Os sinais em δ 3,95 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), δ 3,16 (1H, *qd, J* = 5,1/ 2,0 Hz) e δ 1,53 (3H, *d*, *J* = 5,1 Hz) foram relacionados aos hidrogênios de um grupo *trans*-1',2'-epoxipropila, ligado ao C-2 do anel piridínico. Esse padrão de substituição é comum em alcaloides quinolínicos de espécies de *Angostura* (FOURNET et al.

1989; FOURNET et al., 1993a, VIEIRA e KUBO, 1990). A estereoquímica *trans* para o grupo 1',2'-epoxipropila foi estabelecida pelos valores típicos de constante de acoplamento (2,0 Hz) entre H1' e H2' (SILVERSTEIN et al., 1994). Baseando-se apenas nos dados dos espectros de massas e de RMN de ^{1}H, foi possível propor a estrutura da 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina para AB-2 (Figura 12).

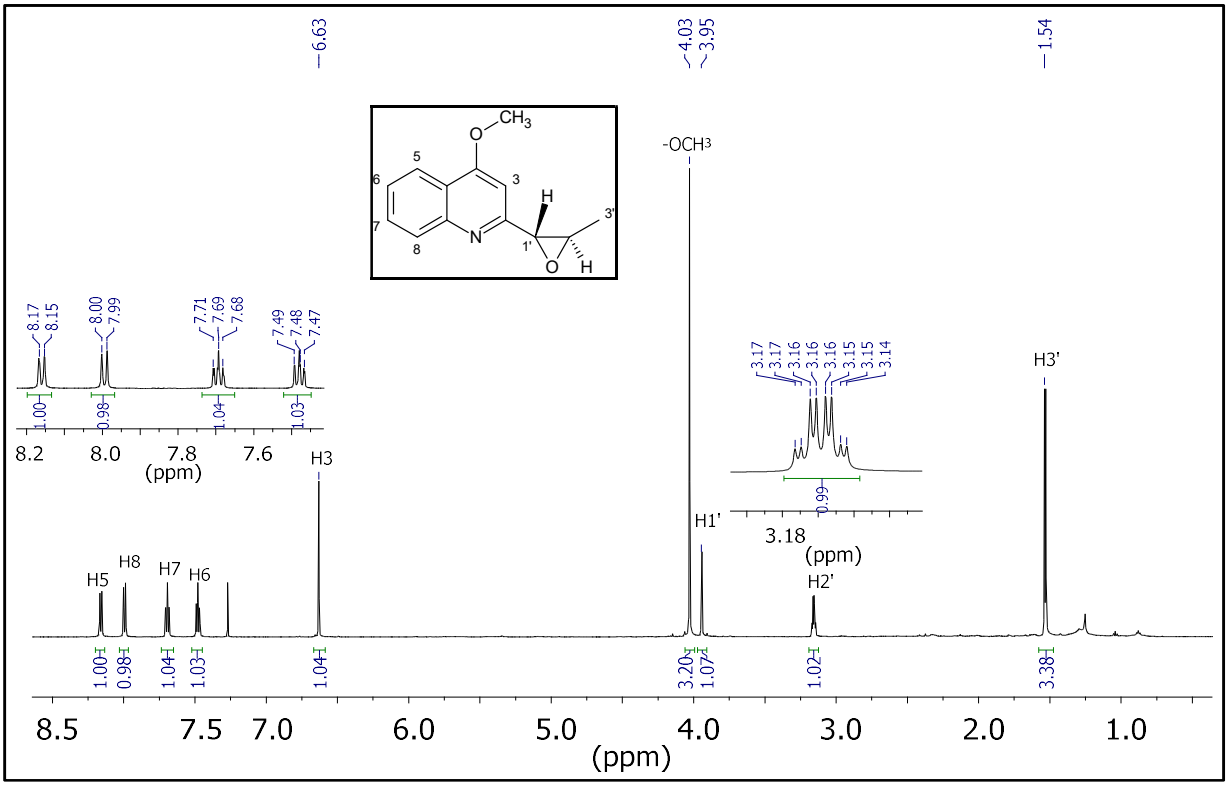


Figura 11. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) para a substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-trans-epoxipropil)quinolina.

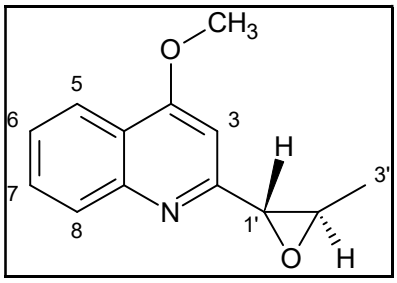


Figura 12. Fórmula estrutural da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

Os dados dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPTq (Figura 13), revelaram a presença de 13 carbonos: quatro carbonos não hidrogenados (C), sete carbonos metínicos (CH) e dois carbonos metílicos (CH_3), confirmando a estrutura proposta.

Esses dados (Tabela 2), associados às correlações C-H, a uma ligação ($^1J_{H-C}$), observadas no mapa de contornos HSQC (Figura 14) e, a duas e três ligações (Figura 15), observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 16), possibilitaram a atribuição inequívoca dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C para a 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropilquinolina (AB-2). Ao realizar uma busca nas bases de dados *Scifinder* e *Web of Science*, foi verificado que não há nenhum dado publicado sobre este alcaloide. Há apenas uma tese de doutorado (ANDRADE, et al., 2003) que descreve sua identificação em uma mistura binária, composta pelo alcaloide em questão (4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropilquinolina) e por um outro alcaloide quinolínico (cusparina) na proporção de 1:2, respectivamente. É importante acrescentar, que, apesar de não haver dados na literatura sobre o 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropilquinolina), há dados sobre o isolamento e identificação de um alcaloide muito semelhante a este, conhecido como Chimamina D. A diferença entre ambos está apenas no grupo metoxila, que está presente no primeiro e ausente no segundo. A chimanina D foi isolada a partir do extrato das folhas e casca do tronco de *Galipea longiflora* (=*A. longiflora*) e apresentou atividade contra cepas de *Trypanosoma cruzi* semelhante aos fármacos de referência, assim como atividade contra cinco linhagens de formas promastigotas de espécies de Leishmania (FOURNET et al., 1994).

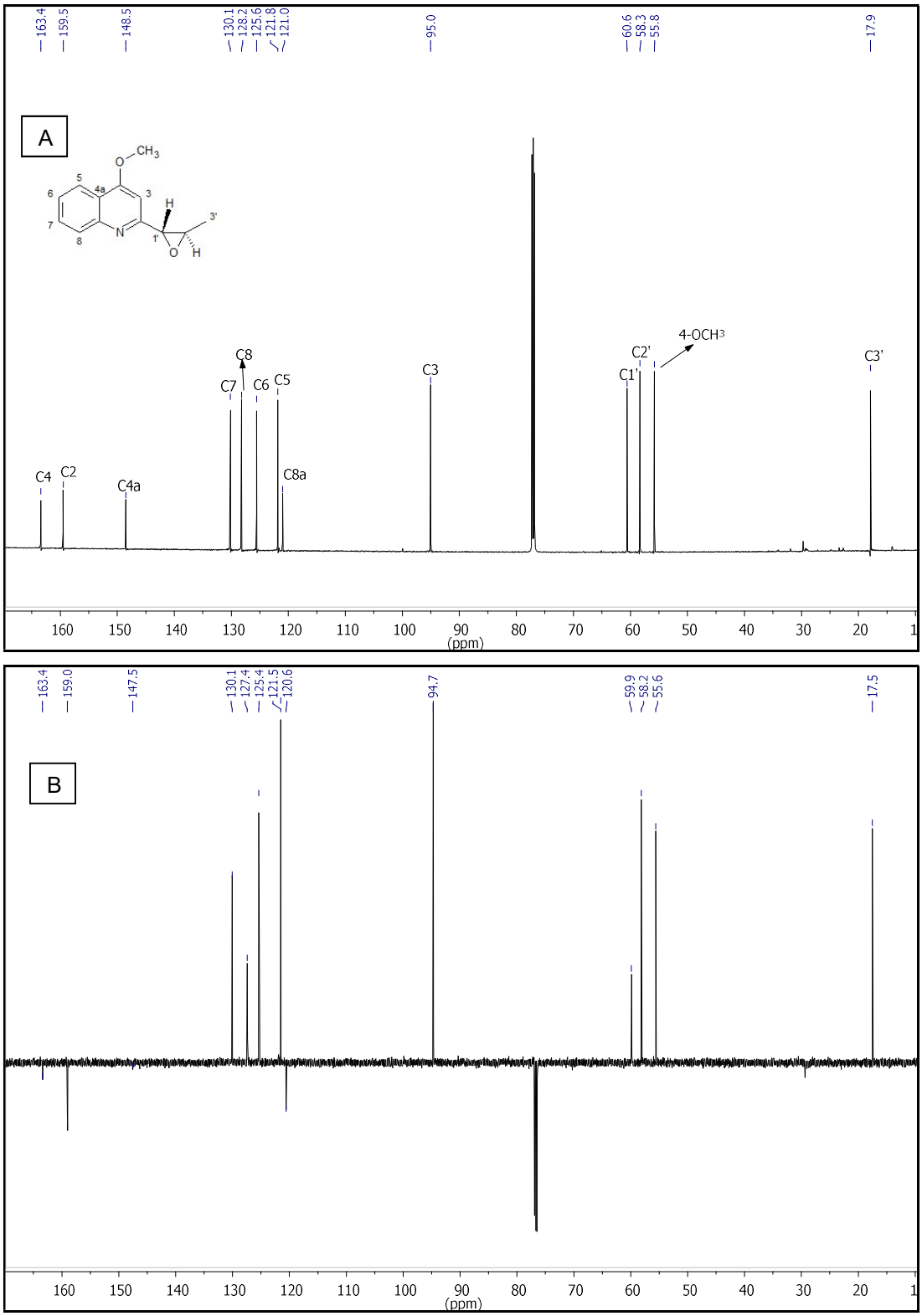


Figura 13. A) Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) e B) DEPTq da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

.

Tabela 2. Atribuição dos dados RMN ^{1}H e RMN ^{13}C para a substância AB-2, baseada nas correlações H-C, observadas nos espectros bidimensionais (HSQC e HMBC)

	HSQC		HMBC	
H/C	δ_H (mult, *J*/Hz)	δ_C	$^{2}J/_{H-C}$	$^{3}J/_{H-C}$
2	--	159,5	---	---
3	6,63 (*s*)	95,0	C8a	C4/C1'
4	--	163,4	---	---
5	8,16 (*dd*, 8,3/1,1)	121,8	C7/C4a	C4
6	7,48 (*ddd,* 8,3/6,9/ 1,1)	125,6	C8a	C8
7	7,69 (*ddd*, 8,3/ 6,9/1,1)	130,2	C5	C4a
8	8,00 (*d*, 8,3)	128,2	C8a	C6
8a	--	121,0	---	---
9a	--	148,5	---	---
-OC<u>H</u>$_3$	4,03 (*s*)	55,8	---	C4
1'	3,95 (*dd*, 2,0)	58,4	C2/C2'	C3
2'	3,16 (*qd,* 5,1/ 2,0)	60,6	C3'	---
3'	1,53 (*d*, 5,1)	17,9	C2'	---

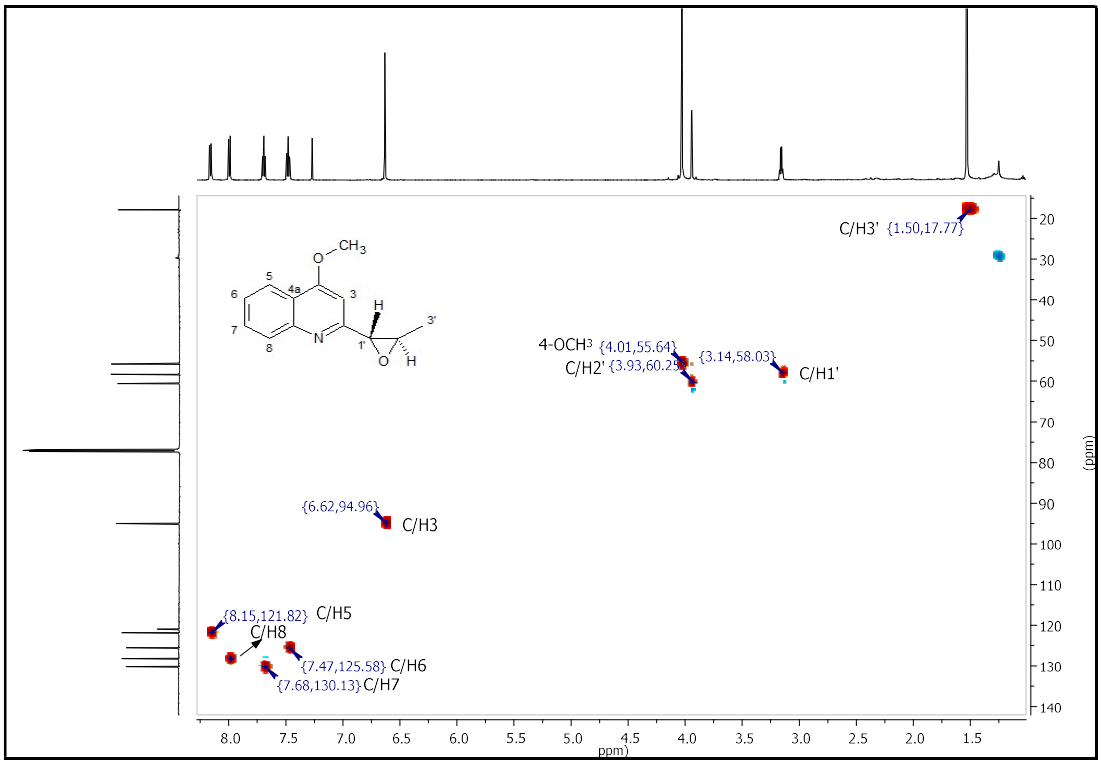


Figura 14. Mapa de contornos HSQC da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

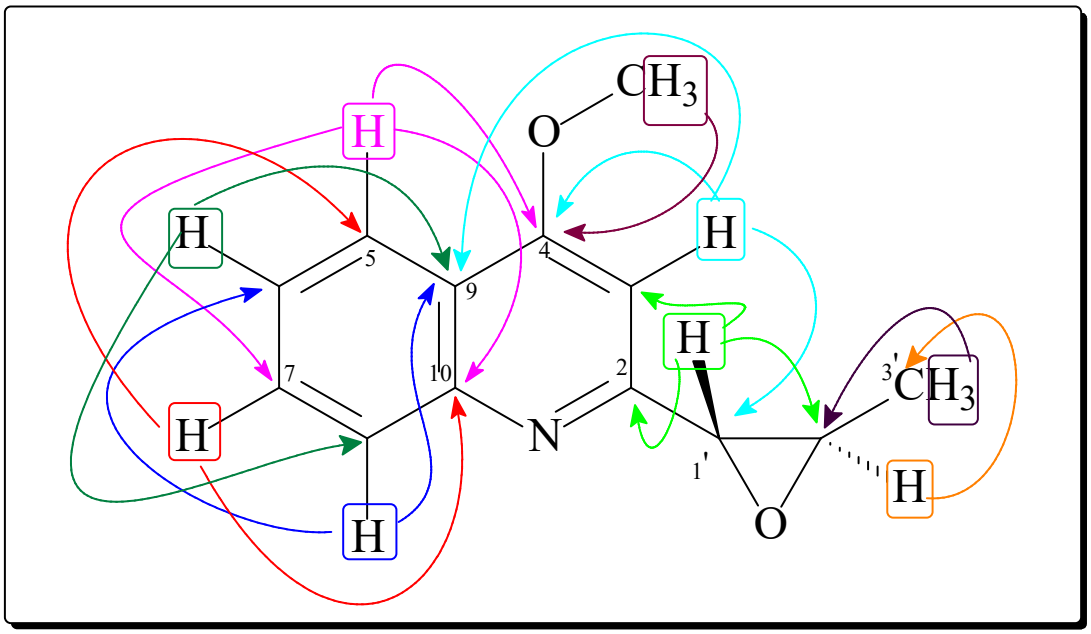


Figura 15. Correlações H-C, a duas e três ligações, observadas para a substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

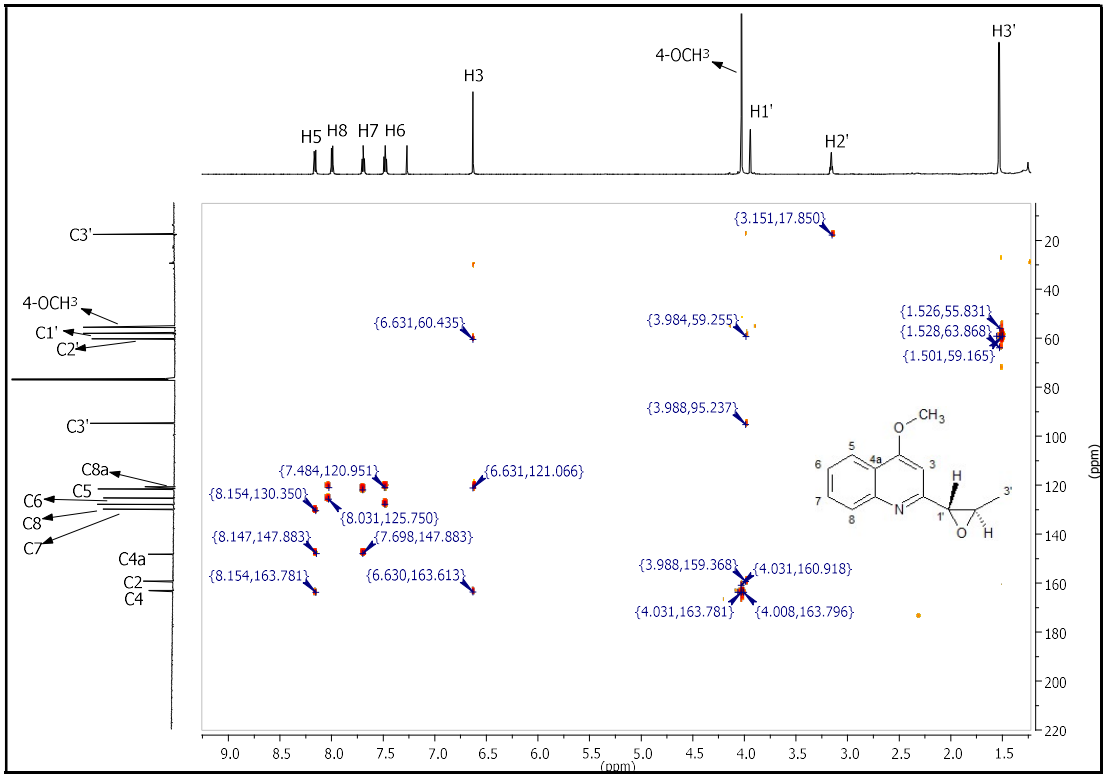


Figura 16. Mapa de contornos HMBC da substância AB-2: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina.

5.1.3 Identificação da amostra AB-3: mistura de β-sitosterol e estigmasterol

Da fração HGAB 6.5, foram obtidos 7 mg de cristais brancos (Tf = 138,6-139,8 ºC), codificado como AB-3. Em sua análise por CCD apresentou uma única mancha com coloração marrom, quando revelada com os vapores de iodo, e nenhuma fluorescência sob luz UV (λ = 254 e 365 nm).

Ao analisar seu espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$, Figura 17), observou-se a presença de uma grande quantidade de sinais intensos na região de δ 0,69 a 1,02, característicos de carbonos metílicos e metilênicos. Os sinais em δ 3,55 (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios carbinólicos (H-3). Os sinais em δ 5,34 (*s*l) e 5,35 *s*l, integrando para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-6. Os sinais em δ 5,17 (*dd*, *J* = 15,2/8,6 Hz) e δ 5,04 (*dd, J* = 15,2/8,6 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos em H-22 e H-23, devido aos acoplamentos vicinais com os hidrogênios H-20 e H-24, respectivamente (Tabela 3).

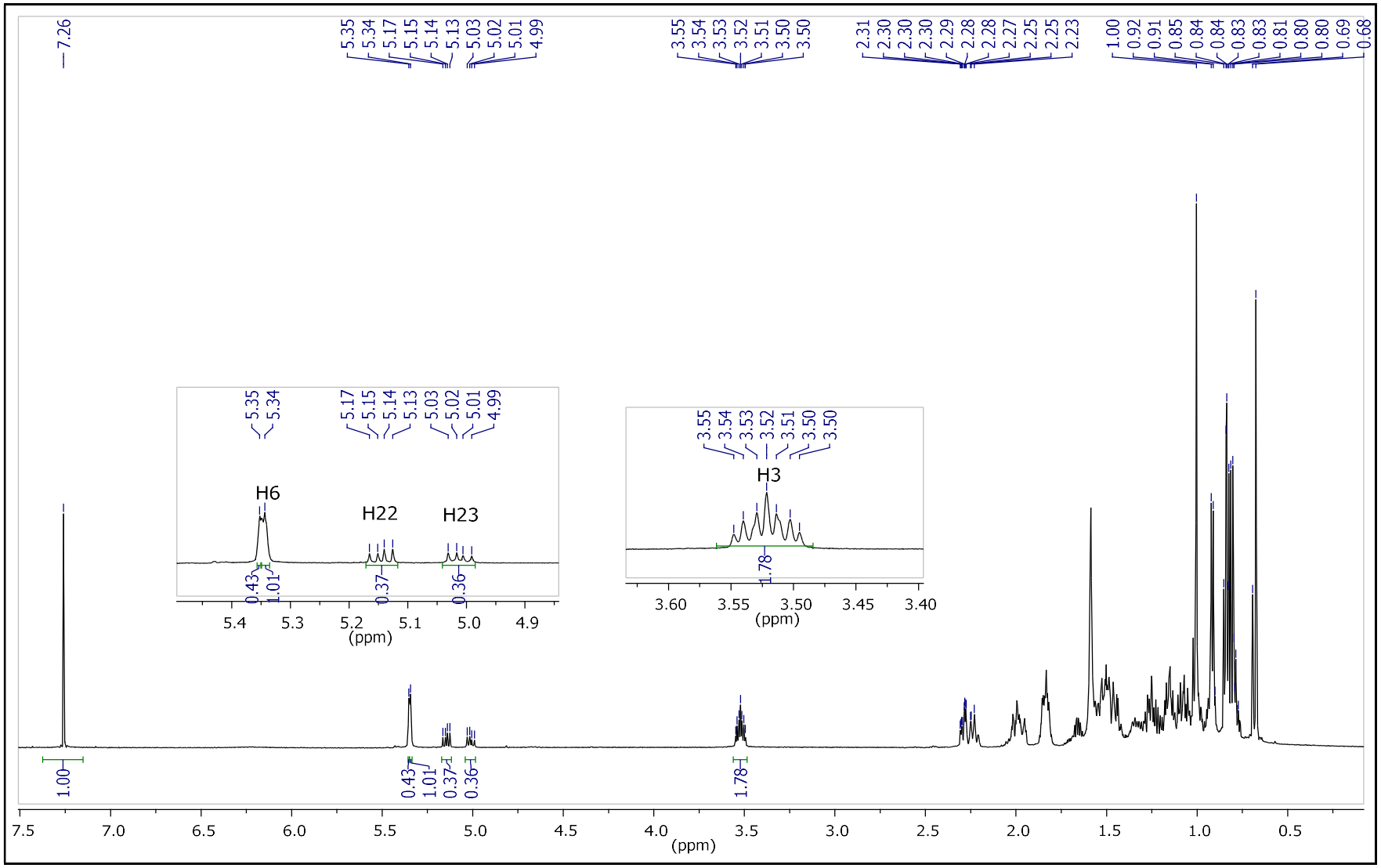


Figura 17. Espectro RMN ^{1}H (600 MHz) da fração AB-3: mistura dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol.

Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol experimental e comparados com a literatura*

Hidrogênio	β-sitosterol	β-sitosterol (lit.)*	Estigmasterol	Estigmasterol (lit.)*
3	3,52 (*m*)	3,52 (m)	3,52 (*m)*	3,52 (*m*)
6	5,35 (*m*)	5,35 (m)	5,34 (*s*l)	5,34 *s*l
18	0,68 (*s*)	0,68 (s)		0,68 (*s*)
19	1,00 (*s*)	1,01 (sl)		
21	0,92 (*d*)	0,92 (d)		
22			5,17 *dd*	5,14 (*dd)*
23			5,04 *dd*	5,07 (*dd)*
26	0,82 (*d*)	0,83 (*d*)		
27	0,81 (*d)*	0,81 (*d*)		
29	0,84 (*m)*	0,85 (*t*)		

* INOUE, et al., 2010.

O espectro de DEPTq (150 MHz, $CDCl_3$, Figura 18) de AB-3 indicou a presença de 43 átomos de carbonos, apresentou quatro sinais na região de carbonos sp^2 (121,7, 129,3, 138,3 e 140,8 ppm) indicativo da presença de duas ligações duplas. Os sinais em δ 138,4 e 129,4 são característicos de esteroides com ligação dupla entre C-22 e C-23. Os sinais em δ 140,8 e 121,7 foram atribuídos aos carbonos da ligação dupla entre C-5 e C-6. O sinal δ 71,9 foi atribuído ao carbono oximetínico (C-3). Os dados completos de RMN de ^{13}C (Tabela 4) foram comparados a dados da literatura (MIRANDA et al., 2012) para estes dois esteroides, confirmando a identidade entre estes.

Após análise por RMN de ^{1}H, DEPTq e comparação com dados da literatura foi possível constatar que AB-3 trata-se de uma mistura dos esteroides β – sitosterol, com fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ e estigmasterol, cuja fórmula molecular é $C_{29}H_{48}O$ (Figura 19).

Tabela 4. Deslocamentos químicos de ^{13}C observados no espectro de DEPTq dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol e comparação com dados da literatura ()

Carbono	Estigmasterol	Estigmasterol lit. *	β-sitosterol	β -sitosterol lit. *
1	37,2 CH_2	37,2	37,2 CH_2	37,4
2	31,6 CH_2	31,6	31,6 CH_2	31,6
3	71,8 CH	71,8	71,8 CH	71,8
4	42,3 CH_2	42,3	42,3 CH_2	42,3
5	140,7 C	140,7	140,7 C	140,7
6	121,7 CH	121,7	121,7 CH	121,7
7	31,9 CH_2	31,6	31,9 CH_2	31,6
8	31,9 CH	31,9	31,9 CH	31,9
9	50,1 CH	50,1	50,1 CH	50,1
10	36,5 C	36,5	36,5 C	36,1
11	21,1 CH_2	21,0	21,1 CH_2	21,0
12	39,7 CH_2	39,7	39,7 CH_2	39,7
13	56,9 C	56,8	42,3 C	42,3
14	56,8 CH	56,7	56,7 C	56,7
15	24,4 CH_2	24,3	24,3 CH_2	24,3
16	28,9 CH_2	28,9	28,2 CH_2	28,2
17	55,9 CH	56,0	56,0 CH	56,0
18	12,2 CH_3	12,2	12,0 CH_3	11,9
19	19,8 CH_3	19,1	19,8 CH_3	19,0
20	39,7 CH	40,4	36,1 CH	36,1
21	21,1 CH_3	21,2	19,4 CH_3	18,7
22	138,3 CH	138,3	31,6 CH_2	33,9
23	129,3 CH	129,2	28,9 CH_2	26,0
24	51,2 CH_3	51,2	45,9 CH	45,8
25	29,2 CH_3	29,7	29,1 CH	29,1
26	21,3 CH_3	21,2	21,1 CH_3	19,8
27	18,9 CH_3	18,9	19,4 CH_3	19,3
28	25,4 CH_2	25,4	23,1 CH_2	23,0
29	12,06 CH_3	12,2	11,87 CH_3	12,0

*MIRANDA, et al., 2012.

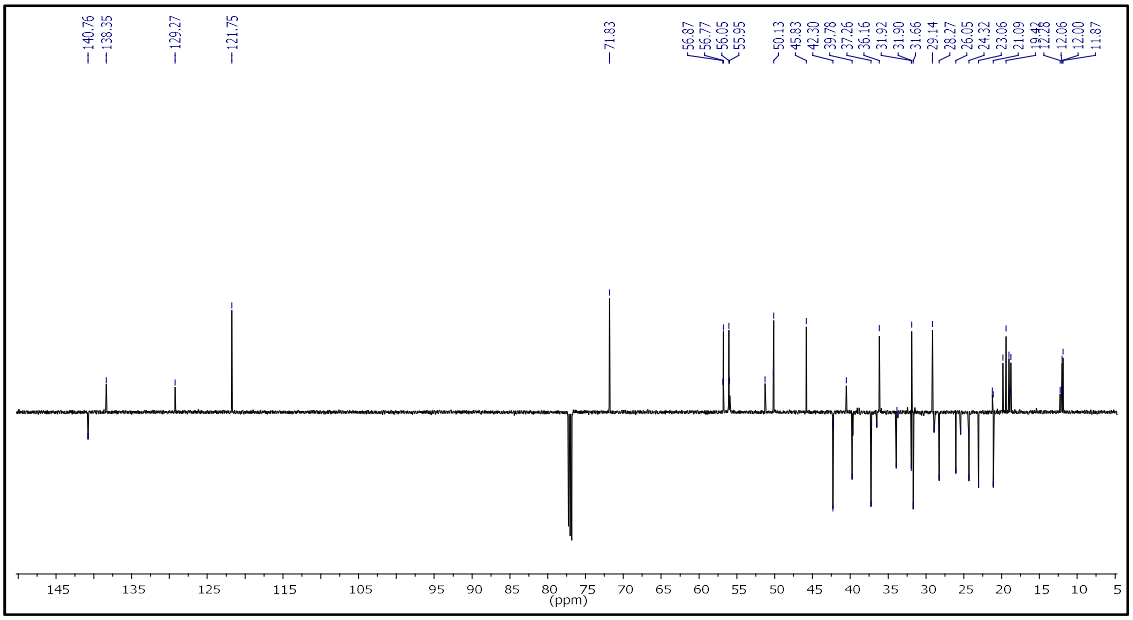


Figura 18. Espectro de DEPTq ($CDCl_3$,150 MHz) da fração AB-3: mistura dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol.

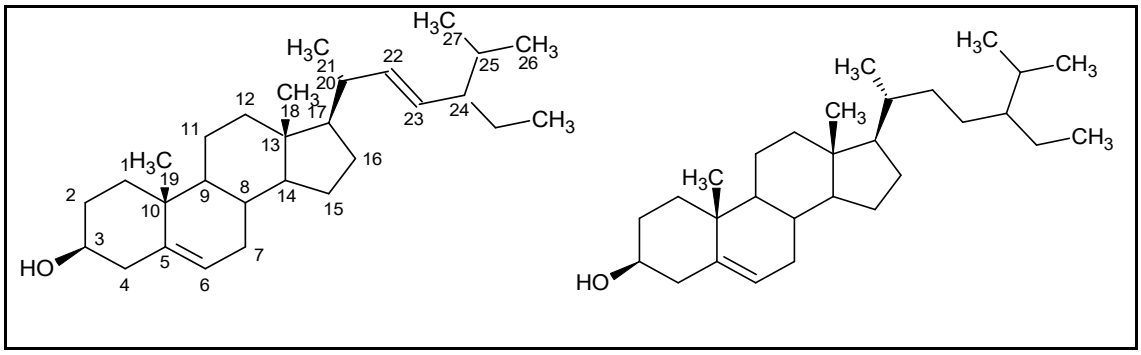


Figura 19. Fórmulas estruturais do estigmasterol e β-sitosterol, respectivamente.

5.1.4 Identificação da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina)

A substancia AB-4 foi isolada sob a forma de um óleo com coloração amarelada. Apresentou fluorescência quando submetida à luz UV (λ = 254 e 365 nm) por meio da CCD e apresentou coloração alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcaloide. Seu espectro de massas (Figura 20) apresentou pico do íon molecular com razão *m/z* = 243 Da, indicando a presença do nitrogênio em sua estrutura. O espectro de massas de alta resolução apresentou a massa do $[M+H]^+$ em *m/z* = 244,1335, compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{17}NO_2$ (calculado para $C_{15}H_{18}NO_2$ = 244,1337).

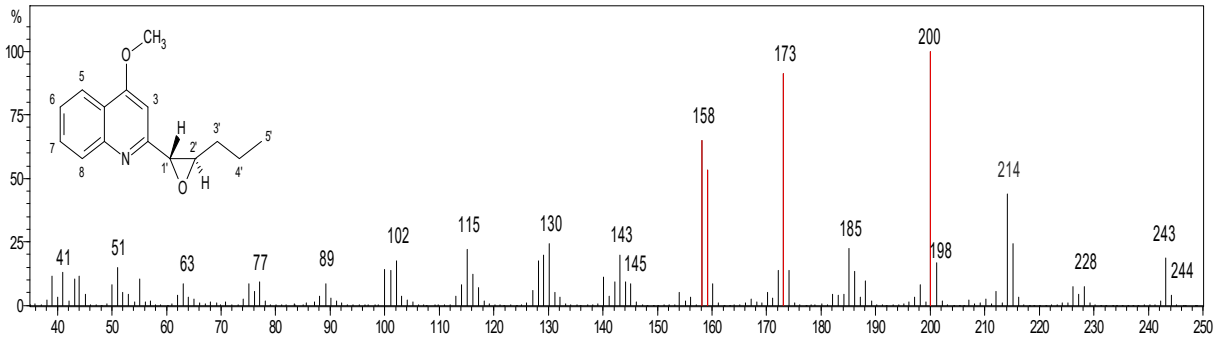


Figura 20. Espectro de massas da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina).

O espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) (Figura 21) apresentou sinais característicos de alcaloides quinolínicos semelhantes aos sinais apresentados pelo 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropil)quinolina (AB-2), diferindo apenas nos sinais em δ 3,97 (1 H, *d, J* = 2,0 Hz), δ 3,09 (1 H, *ddd*, *J* = 6,5, 4,6, 2,0 Hz), δ 1,03 (3 H, *t, J* = 7,4 Hz), δ 1,82 (1 H, *m*), δ 1,68 (1 H, *m*), δ 1,58 (2 H, *m*) associados a cadeia lateral epoxipentila, cuja estereoquímica dos hidrogênios grupo epóxido também é *trans,* de acordo com a constante de acoplamento entre H1' e H2', que é 2,0 Hz.

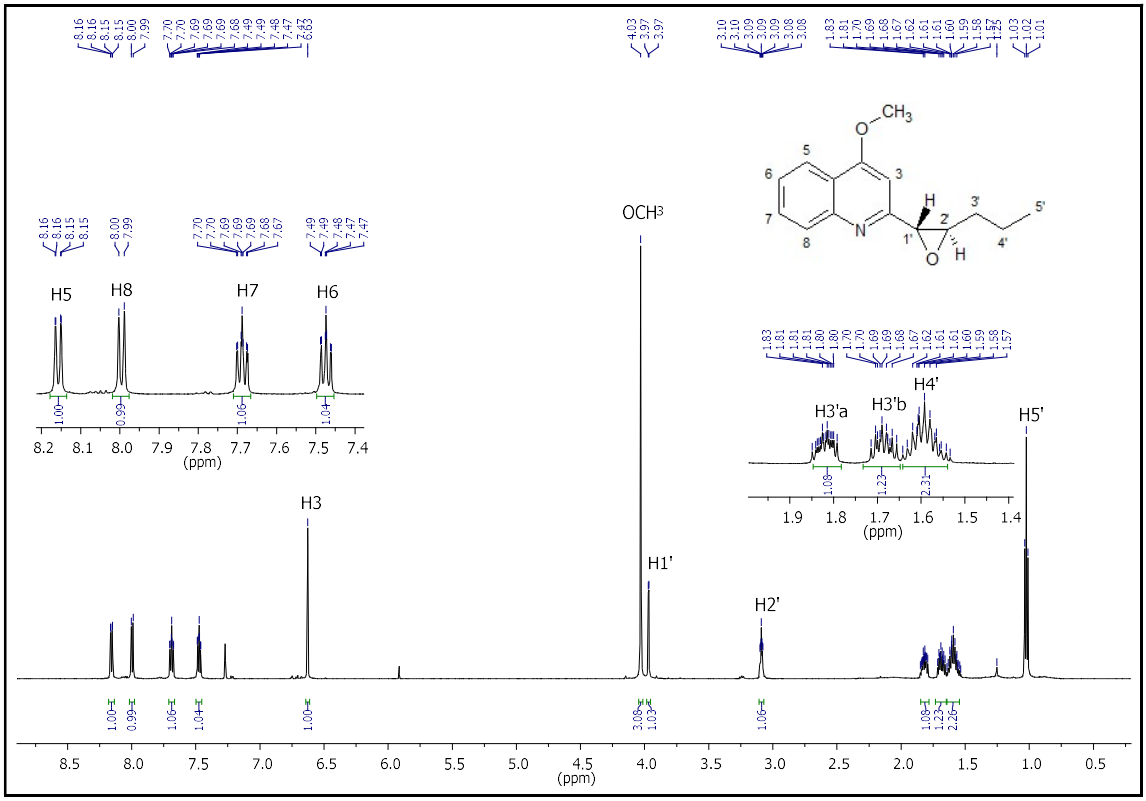


Figura 21. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-trans-epoxipentilquinolina).

O espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) apresentou 15 sinais (Figura 22). O mapa de contorno HSQC mostrou as relações entre carbono e hidrogênio a uma ligação (Figura 23). Os dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono encontram-se na Tabela 5.

A partir das informações obtidas com os dados do CG/EM e os espectros de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C e comparação com os dados da literatura para um alcaloide de estrutura semelhante (FOURNET et al., 1989) sugeriu-se para o alcaloide AB-4 a estrutura do 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina) (Figura 24).

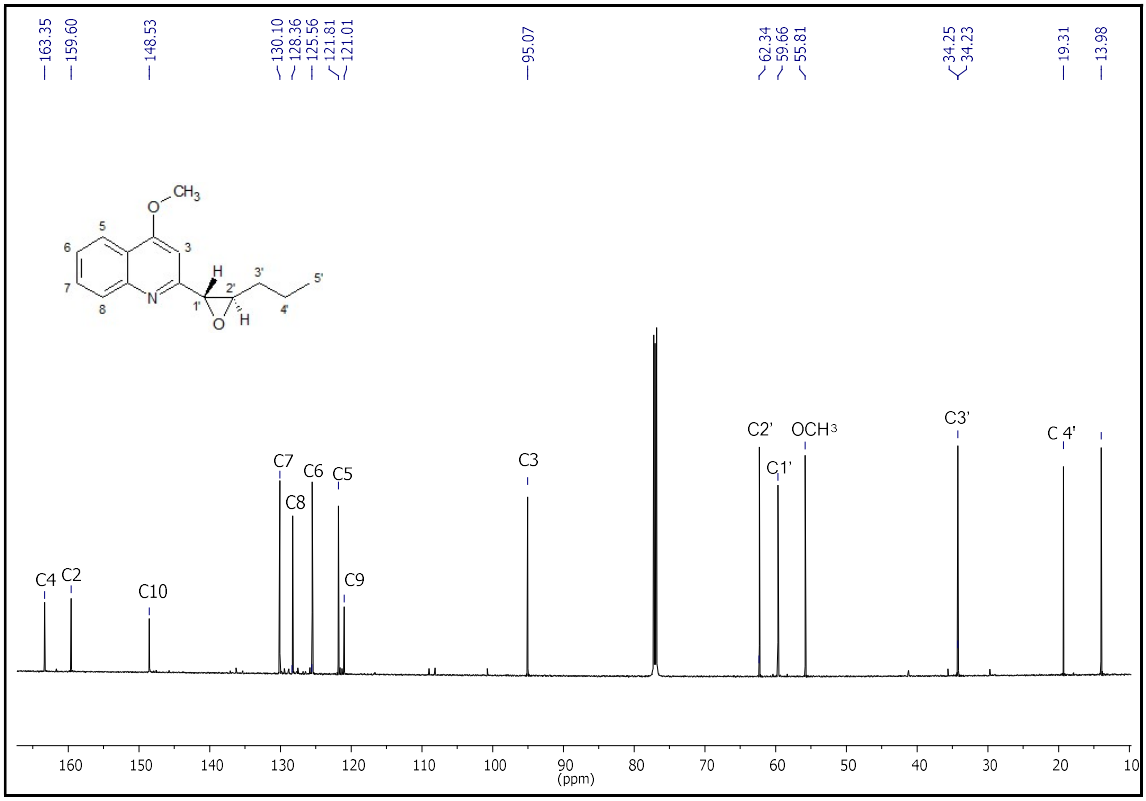


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina).

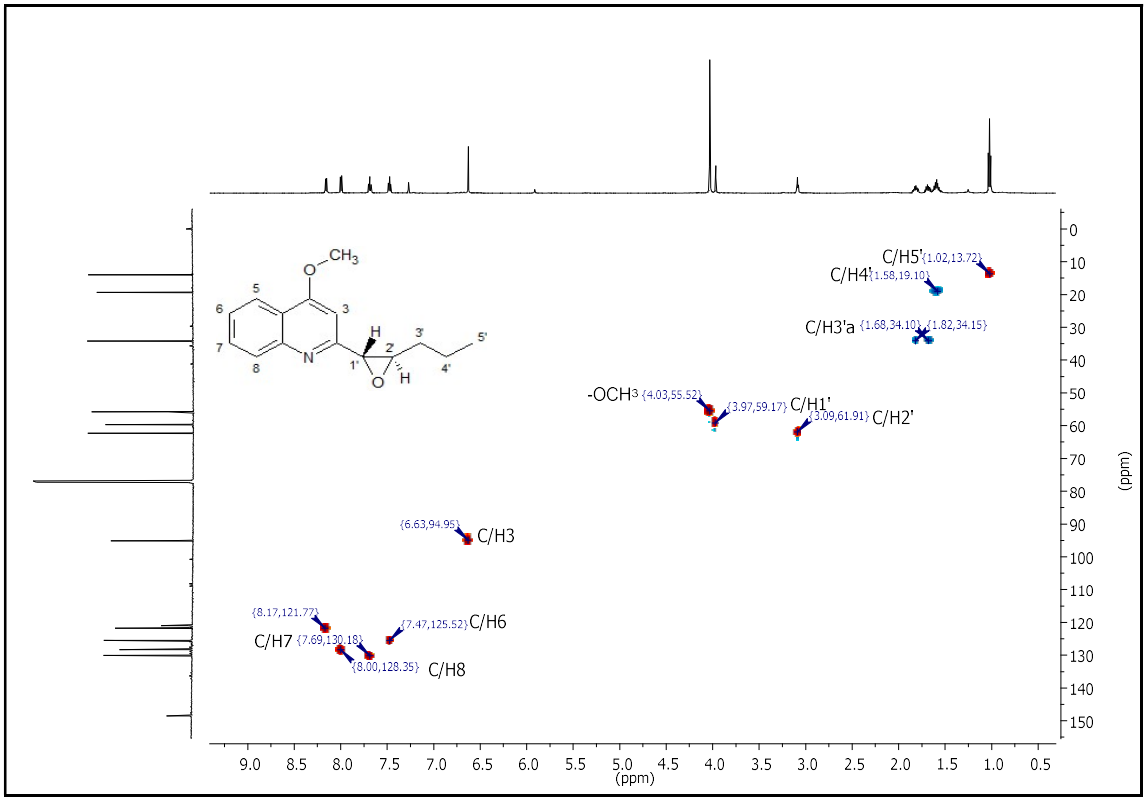


Figura 23. Mapa de contorno HSQC da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina).

Tabela 5. Dados espectrais de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) e RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) para a substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina)

H/C	δ_H (mult., *J*/Hz)	δ C (ppm)
2	-	159,6
3	6,63 (*s*)	95,1
4	-	163,3
5	8,15 *dd* (8,3; 0,8)	121,7
6	7,48 *m*	125,5
7	7,69 *m*	130,1
8	8,00 (*d*, 8,3)	128,3
9	-	120,9
10	-	148,4
$-OCH_3$	4,03 *s*	55,8
1'	3,95 *d* (2,0)	59,6
2'	3,09 ddd (6,5, 4,6, 2,0 Hz)	62,3
3'a	1,82 *m*	34,2
3'b	1,68 *m*	34,2
4'	1,58 *m*	19,3
5'	1,03 *t* (7,4)	13,9

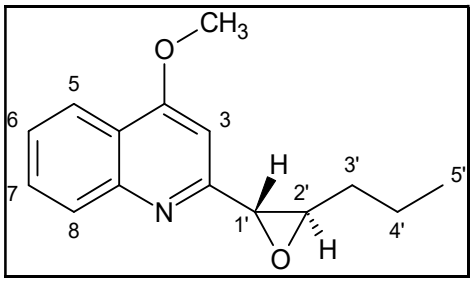


Figura 24. Fórmula estrutural da substância AB-4: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentil)quinolina.

5.1.5 Identificação da substância AB-5: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina)

A substancia AB-5 (fração HGAB 4.7.4) foi isolada sob a forma de um óleo com coloração levemente avermelhada, apresentando as mesmas características da AB-4, quando analisada por CCD. Ao analisar seu espectro de RMN de ^{1}H foi possível verificar que os sinais eram idênticos aos sinais presentes no espectro de AB-4 (Figura 25), o que indica que AB-4 e AB-5 correspondem ao mesmo alcaloide descrito anteriormente, o 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentil)quinolina.

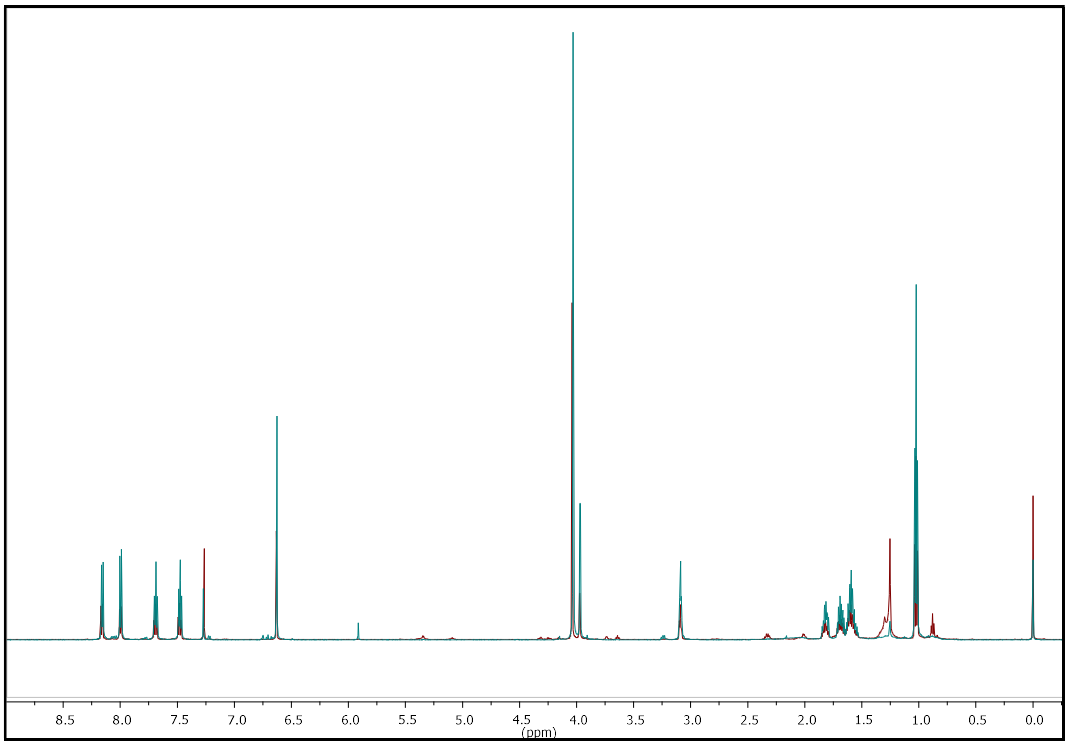


Figura 25. Sobreposição dos espectros de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de AB-4 e AB-5: 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina).

5.1.6 Identificação da substância AB-6

A fração HGAB 8.5.2, codificada como AB-6 foi isolada sob a forma de um óleo com coloração amarelada e solúvel em diclorometano. Ao ser submetida a análise por CCD e revelada através da luz ultravioleta apresentou fluorescência e apenas um ponto. Ao submeter a CCD aos vapores de iodo também foi observado apenas um ponto. Apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff. Porém, durante o processo de identificação fração AB-6, observou-se uma alteração da coloração, tornando-se mais escura, e ao ser submetida novamente a análise por CCD apresentou vários pontos, indicando que houve degradação da substância. O cromatograma (Figura 26) obtido na análise por CG-EM pode comprovar a decomposição da amostra, em função da grande quantidade de picos observados, e, portanto, não foi possível identificar a substância isolada.

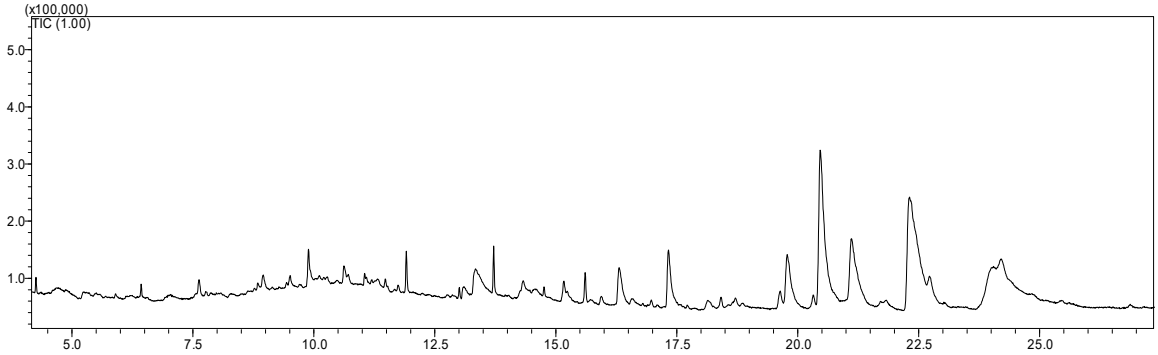


Figura 26. Cromatograma obtido para a fração AB-6 na análise por CG-EM/IE.

5.1.7 Identificação da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina

A substância AB-7 foi isolada sob a forma de um óleo amarelado e solúvel em diclorometano. Apresentou fluorescência quando submetida à CCD e revelada na câmara de luz UV (254 nm); apresentou coloração alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcaloide. Seu espectro de massas (Figura 27) apresentou pico do íon molecular com m/z de 307 Da, compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{17}NO_3$, a qual foi confirmada pelos de dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C.

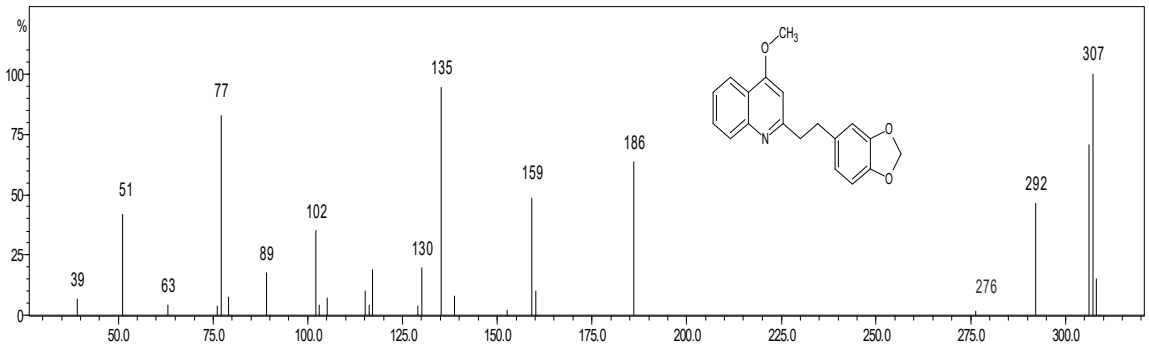


Figura 27. Espectro de massas da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.

Seu espectro de RMN de ^{1}H (Figura 28), assim como os das amostras AB-2 e AB-4, apresentou sinais característicos de alcaloides quinolínicos, 2,4 dissubstituído. Os sinais dos hidrogênios em δ 8,14 (1H, *dd,* 8,4; 1,2 Hz), δ 8,00 (1H, *d*, 8,4 Hz), δ 7,67 (1H, *ddd*, 8,4; 7,2; 1,2 Hz) e δ 7,45 (*m*) foram associados ao anel benzênico. Os sinais em δ 6,53 (1H, *s*) e em δ 3,98 (3H, *s*) foram associados a um hidrogênio na posição 3 e uma metoxila ligada ao carbono 4 do anel quinolínico. Os demais sinais foram atribuídos ao substituinte [3',4'-(metilenodioxi)etil], ligado em C-2 do anel quinolínico. O padrão 1',3',4'-trissubstituído do anel aromático foi evidenciado pela multiplicidade dos sinais em δ 6,77 (1H, *d*, 1,3 Hz), δ 6,72 *d* (1H, *d*, 7,9 Hz) e em δ 6,69 (1H, *dd,* 7,9; 1,3 Hz). O sinal em δ 5,92 (2H, *s*) evidenciou a presença do grupo 3',4'-metilenodioxi, e os sinais em δ 3,07 (2H, *m*) e δ 3,19 (2H, *m*) foram associados ao fragmento –CH_2CH_2- ligado em C-2 do anel quinolínico e em C1' do grupo [3',4'-(metilenodioxi)fenil]. Estes sinais apesar de terem uma aparência de *dd*, são considerados como multipletos, pois, os hidrogênios de cada grupo -CH_2- são quimicamente equivalentes, mas não são magneticamente equivalentes. Desta forma, foi possível propor a estrutura do alcaloide 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina (Figura 29) para AB-7.

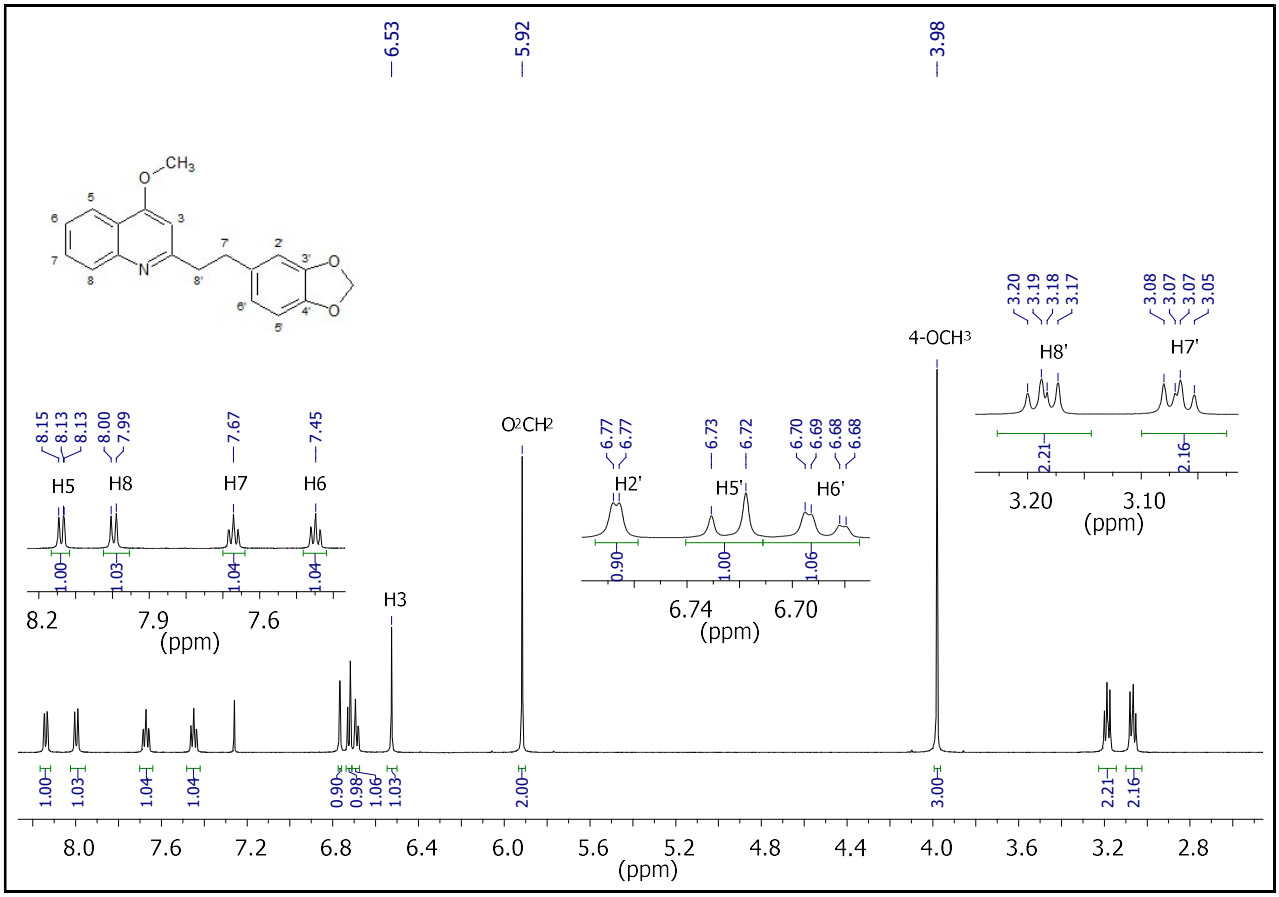


Figura 28. Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.

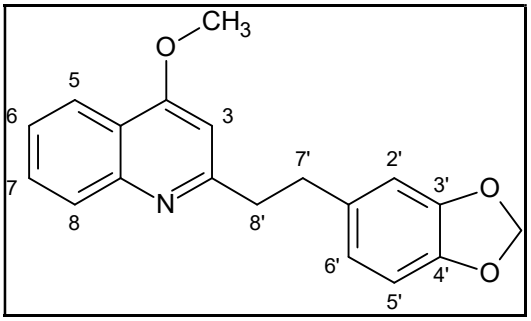


Figura 29. Fórmula estrutural da substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30) apresentou 19 sinais. Os sinais em δ 162,3; 100,7; 162,8; 121,6; 128,2; 135,4; 124,9; 120,0 e 145,7 foram atribuídos aos carbonos da porção quinolínica da molécula. Os sinais em δ 129,8; 109,0; 148,7; 147,5; 108,1 e 121,3 foram relacionados aos carbonos da porção

aromática; os sinais em δ 35,7 e 41,8 foram atribuídos ao grupo $–CH_2CH_2$-, localizado entre a porção quinolínica e a porção aromática da molécula e os sinais em δ 55,5 e 100,2 foram atribuídos aos carbonos da metoxila e do grupo metilenodioxi, respectivamente.

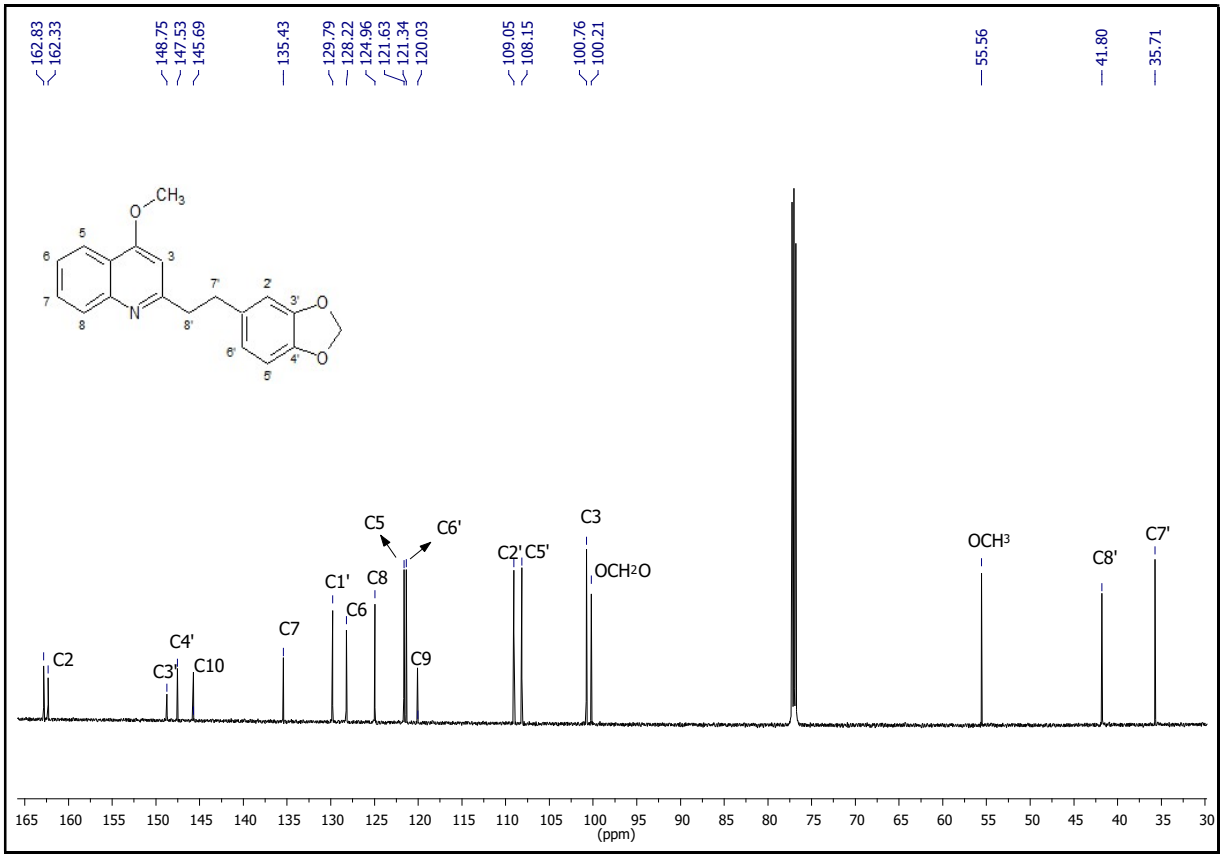


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância AB-7: 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina.

Após análise e comparação dos dados espectroscópicos (Tabela 6) com os dados da literatura (FOURNET et al., 1989; RAKOTOSON et al., 1998), foi possível confirmar a estrutura proposta para AB-7, sendo este identificado como o alcaloide 4-metoxi-2-[3',4'-(metilenodioxifenil)etil]quinolina, também conhecido como cusparina. Este alcaloide foi isolado previamente da casca do caule e também dos galhos de *Angostura longiflora* (FOURNET et al., 1989, FOURNET et al., 1994; HOUGHTON et al., 1999 e RAKOTOSON et al., 1998).

Tabela 6. Comparação dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de AB-7 com dados da literatura

C/H	AB-7 δ_H (mult, *J*/Hz)	Literatura* δ_H (mult, *J*/Hz)	AB-7 δ_C	Literatura* δ_C
2	---	---	162,3	162,4
3	6,53 (*s*)	6,53 (s)	100,7	100,8
4	---	---	162,8	162,9
5	8,14 (*dd*, 8,4/1,2)	8,14 (*ddd*, 8,3/1,5/0,6)	121,6	121,7
6	7,45 (*ddd,* 8,4/7,2/1,2)	7,45 (*ddd*, 8,3/7,7/1,2)	128,2	128,8
7	7,67 (*ddd*, 8,4/7,2/1,2)	7,68 (*ddd*, 8,5/7,7/1,5)	135,4	135,5
8	8,00 (*d*, 8,4)	7,99 (*ddd,* 8,5/ 1,2/0,4)	124,9	125,0
9	----	---	120,0	120,1
10	---	---	145,7	145,7
1'	---	---	129,8	129,8
2'	6,77 (*d*, 1,2)	6,77 (*dd,* 1,6/0,4)	109,0	109,1
3'	---	---	148,7	148,8
4'	---	---	147,5	147,6
5'	6,72 (*d*, 7,8)	6,73 (dd, 8,0/0,4)	108,1	108,2
6'	6,69 (*dd,* 7,8/1,2)	6,68 (dd, 8,0/1,6)	121,3	121,4
7'	3,07 (*m*)	3,07 (*m*)	35,7	35,8
8'	3,19 (*m*)	3,18 (*m*)	41,8	41,8
-O**CH_2**O-	5,92 (*s*)	5,89 (*s*)	100,2	100,3
4-O**CH_3**	3,98 (*s*)	3,98 (*s*)	55,5	55,6

*(FOURNET et al., 1989; RAKOTOSON, et al., 1998)

5.1.8 Identificação da amostra AB-8: vanilina

A fração HGAB 8.5.9.2, codificada como AB-8, foi isolada sob a forma de um sólido de coloração marrom clara, apresentando um forte aroma de baunilha. Seu espectro de massas (Figura 31) apresentou pico do íon molecular com razão *m/z* = 152 Da, e apresentou 91% de similaridade com o espectro de massas do aldeído vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) (Figura 32), disponível na biblioteca NIST 14. Os fragmentos mais abundantes que aparecem no espectro correspondem aos picos com *m/z* =152 [$C_8H_8O_3^+$], 109 [$C_6H_5O_2^+$] e 81 [$C_5H_5O^+$]. A partir da similaridade entre os espectros de massas de AB-8 e da vanilina, foi possível confirmar a estrutura desta amostra (Figura 33).

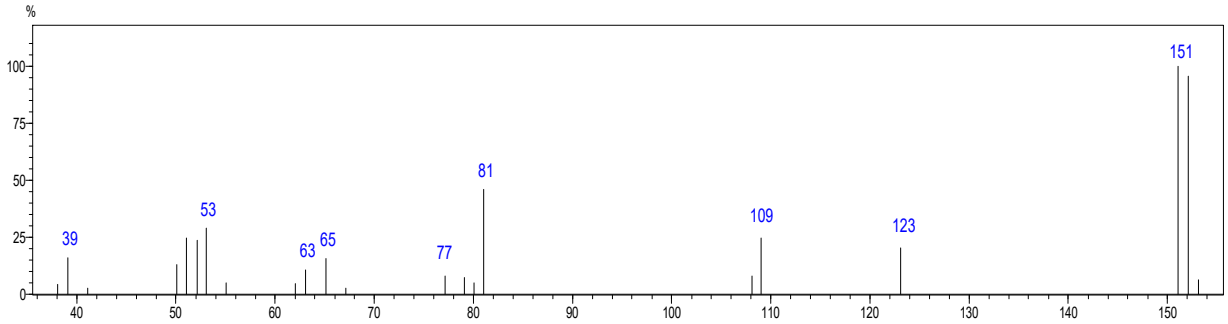


Figura 31. Espectro de massas da substância AB-8: vanilina.

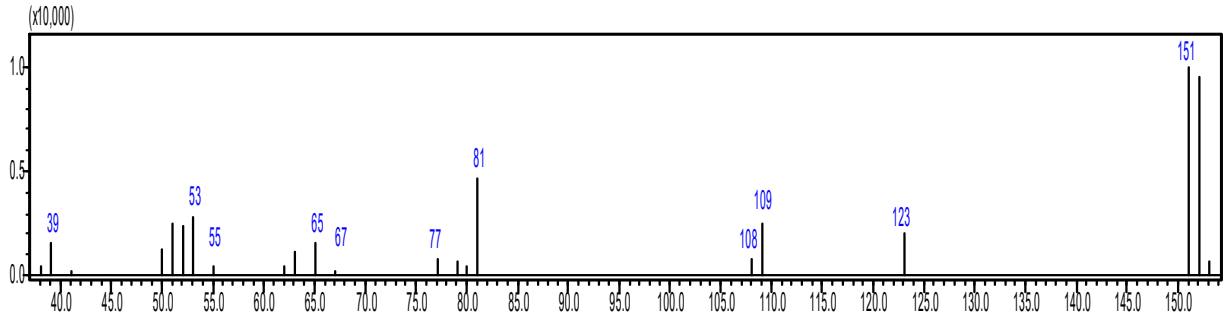


Figura 32. Espectro de massas da substância vanilina, fornecido pela biblioteca NIST 14.

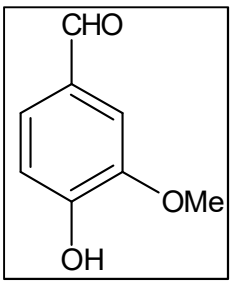


Figura 33. Fórmula estrutural da substância AB-8: vanilina.

5.1.9 Identificação da amostra AB-9: evolitrina

A substância AB-9 (17 mg) foi isolada da fração HGAB 8.5.9.4, e caracterizada como um sólido de coloração amarelada. Mostrou fluorescência quando revelada sob a luz UV (254 e 365 nm); e apresentou coloração alaranjada quando revelada com o reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcaloide. Seu espectro de massas (Figura 34) apresentou o pico do íon molecular em *m/z* = 229 Da, compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{11}NO_3$.

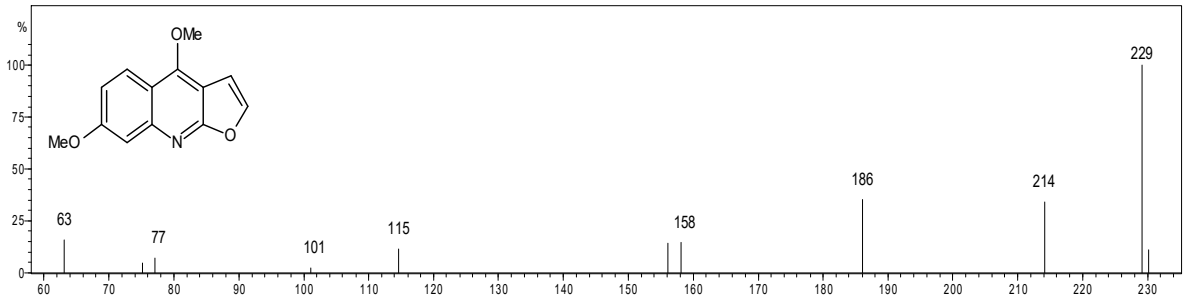


Figura 34. Espectro de massas da substância AB-9: evolitrina.

O espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de AB-9 (Figura 35) apresentou sinais de hidrogênios em δ 8,11 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz), δ 7,07 (1H, *dd*, *J* = 9,0; 2,4 Hz) e δ 7,33 (1H, *d, J* = 2,4 Hz) característicos um anel aromático 1,2,4-trissubstituído, típicos de alcalóides furoquinolínicos (PUSSET et al., 1991, RATNAYAKE et al., 2019; OKWEMBA et al., 2018). Os sinais em δ 7,54 (1H, *d, J* = 2,7) e δ 7,01 (1H, *d, J* = 2,7) foram atribuídos aos hidrogênios de um anel furano 2,3 dissubstituído; e os sinais em 4,39 (3H, *s*) e 3,93 (3H, *s*) atribuídos a duas metoxilas.

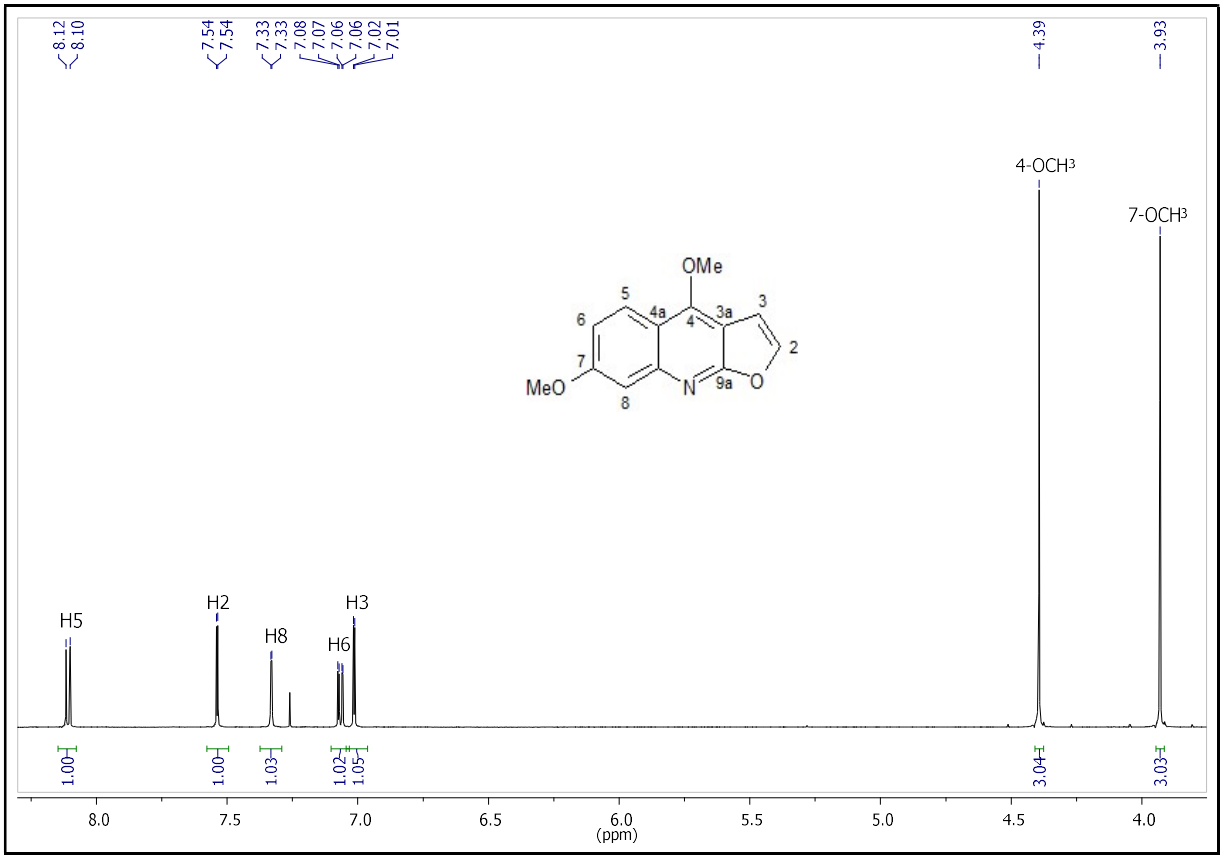


Figura 35. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da substância AB-9: evolitrina.

A partir do padrão de substituição 1,2,4 do anel aromático, compatível com as multiplicidades dos sinais de RMN de ^{1}H, haveria duas possibilidades de estrutura para AB-9 (Figura 36), ambas já descritas na literatura (PUSSET et al.,1991) para os alcaloides furoquinolínicos pteleína e evolitrina. A comparação dos dados de RMN de ^{1}H de AB-9 com aqueles descritos para pteleína e evolitrina (Tabela 7), permitiu propor a estrutura da evolitrina para AB-9.

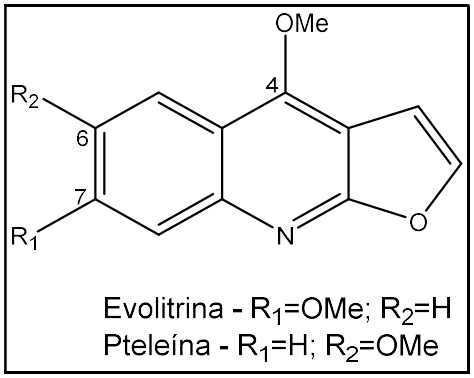


Figura 36. Fórmula estrutural dos alcaloides furoquinolínicos evolitrina e pteleína.

Tabela 7. Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da substância AB-9 com aqueles reportados para evolitrina e pteleina

HIDROGÊNIO	AB-9	Evolitrina*	Pteleina*
	δ (ppm), multiplicidade (*J*/Hz)		
H_{Ar}-1	8,11, d (9,3)	8,15, d (9,3)	7,87, d (9,0)
H_{Ar}-2	7,33, d (2,5)	7,33 d (2,6)	7,36, d (2,9)
H_{Ar}-3	7,07, dd (9,3/2,5)	7,09 dd (9,3/2,6)	7,31, dd (9,0/2,9)
H_{furano}-1	7,54, d (2,7)	7,57, d (2,8)	7,50, d (2,8)
H_{furano}-2	7,01, d (2,7)	7,05, d (2,8)	6,90, d (2,8)
4-OCH_3	4,39, s	4,43, s	4,30, s
6 ou 7-OCH_3	3,93, s	3,95, s	3,88, s

*Pusset et al. (1991). Dados obtidos em $CDCl_3$, a 200 MHz.

O espectro de DEPTq (Figura 37) apresentou 13 sinais de ^{13}C, sendo seis carbonos não hidrogenados, cinco carbonos metínicos e dois metílicos (metoxilas). A atribuição completa dos sinais de carbono (Tabela 8), foi realizada com base nas correlações C-H a uma ligação (^{1}J), observadas no mapa contornos HSQC (Figura 38), e a duas e três ligações (^{2}J e ^{3}J), observadas no mapa de contornos HMBC (Figuras 39 e 40).

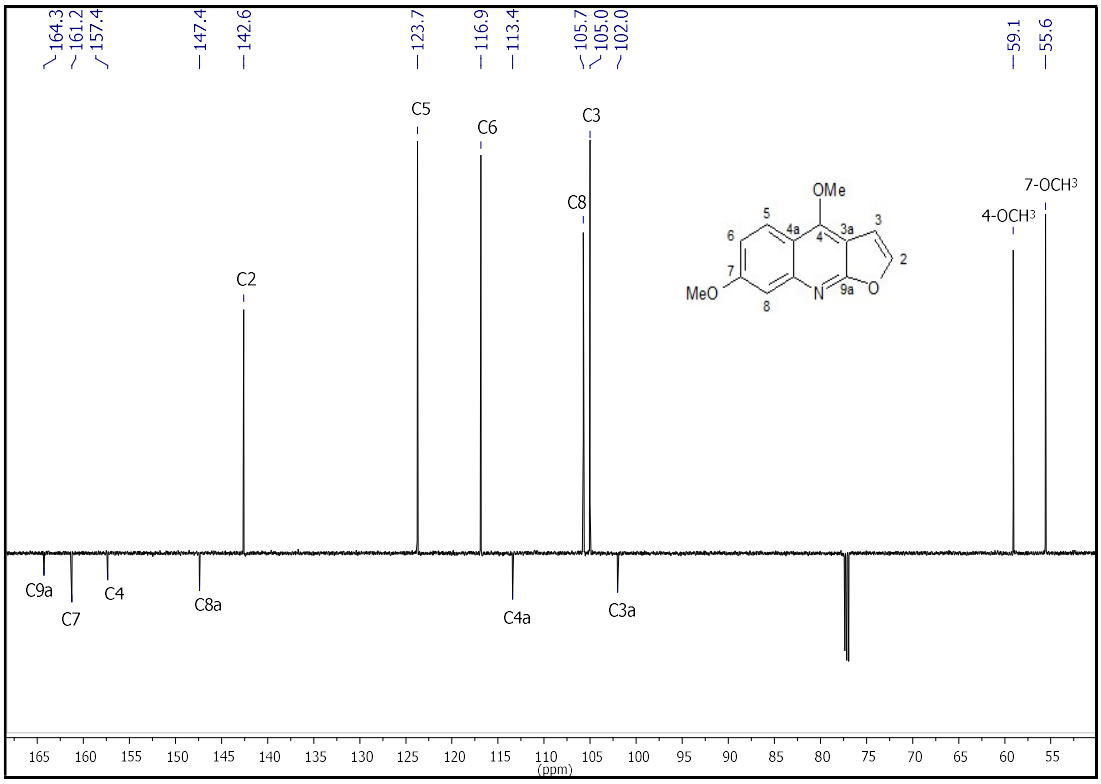


Figura 37. Espectro de RMN de DEPTq (150 MHz, $CDCl_3$) da substância AB-9: evolitrina.

Tabela 8. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância AB-9 e comparação dos dados de RMN de ^{13}C, com os dados da literatura para evolitrina

C/H	AB-9 δ_H (mult, *J*/Hz)	AB-9 δ_C	Evolitrina[1] *δ_C	Evolitrina[2] *δ_C
2	7,54 (d, 2,7)	142,6	142,5	142,4
3	7,01 (d, 2,7)	105,1	104,9	104,7
3ª	---	102,0	102,2	102,0
4	---	157,4	157,3	158,0
4ª	--	113,4	113,6	118,3
5	8,11 (d, 9,3)	123,7	116,8	123,8
6	7,07 (dd, 9,3/2,5)	116,9	123,6	116,6
7	---	161,2	147,7	157,0
8	7,33 (d, 2,5)	105,7	106,0	106,0
8ª	---	147,4	142,5	161,0
9ª	---	164,3	161,3	148,0
4-OCH_3	4,39 (s)	59,1	59,0	58,8
7-OCH_3	3,93 (s)	55,6	55,5	55,4

[1]PUSSET et al., 1991. [2]JAGDEESH et al., 2000.
* Dados obtidos a 50 MHz ($CDCl_3$)

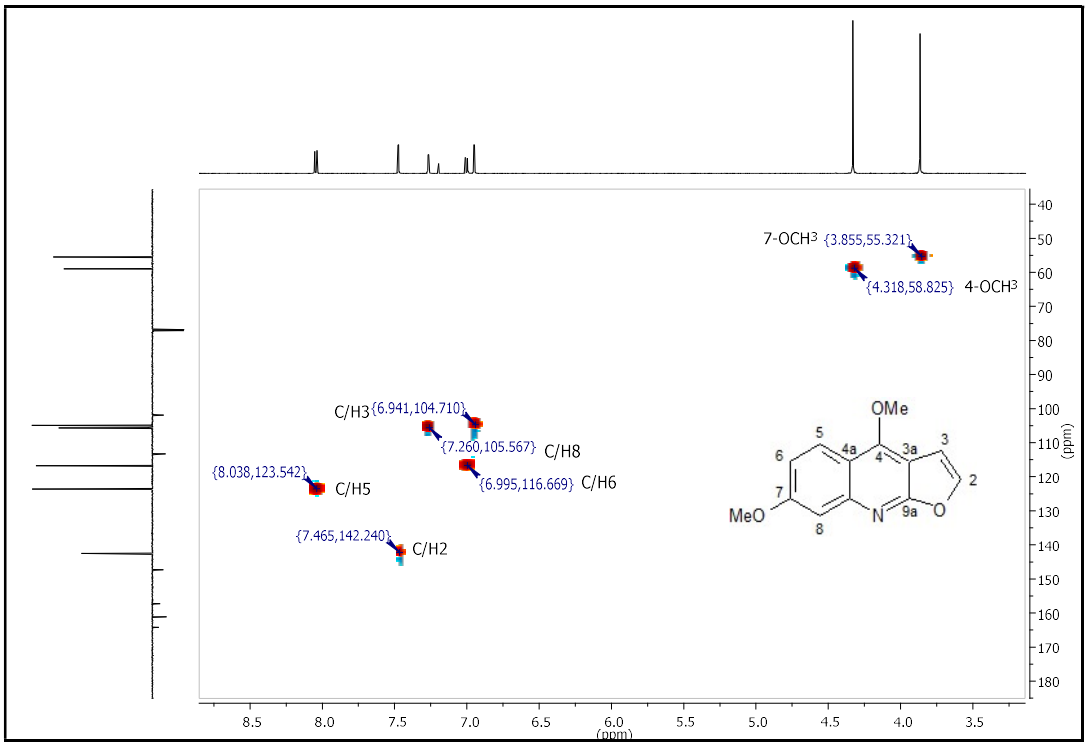


Figura 38. Mapa de contornos HSQC da substância AB-9: evolitrina.

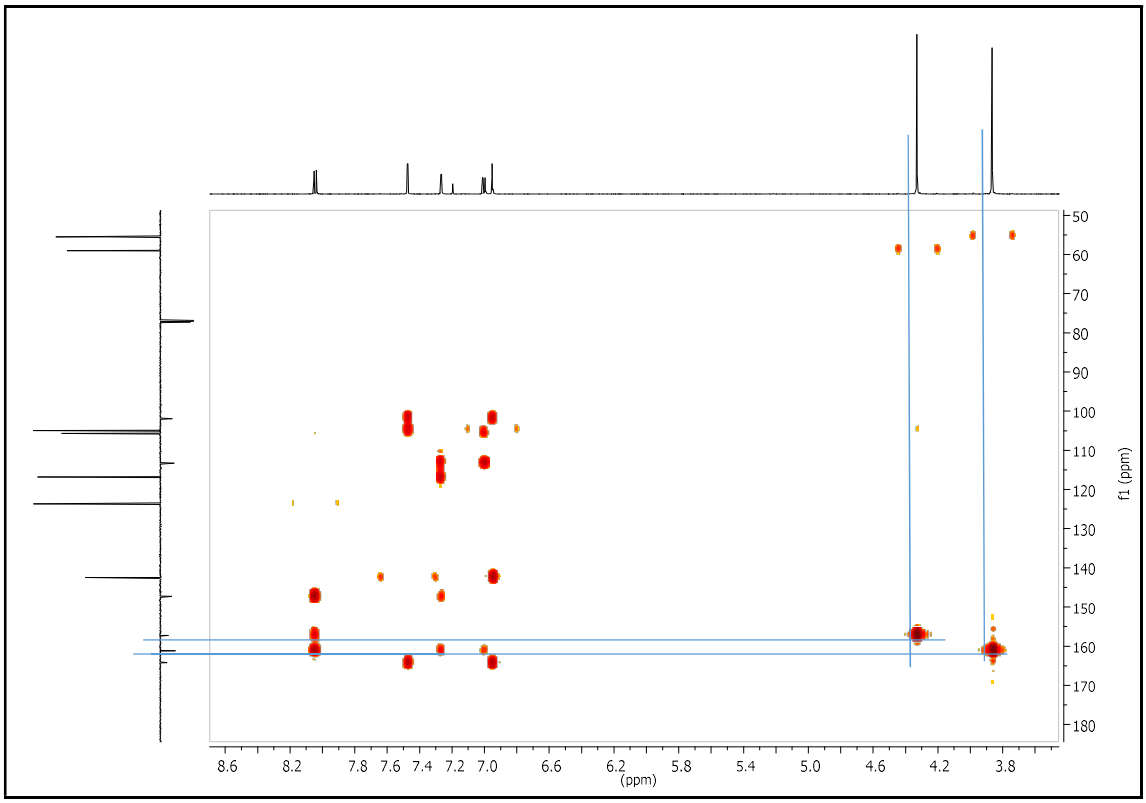


Figura 39. Mapa de contornos HMBC da substância AB-9: evolitrina.

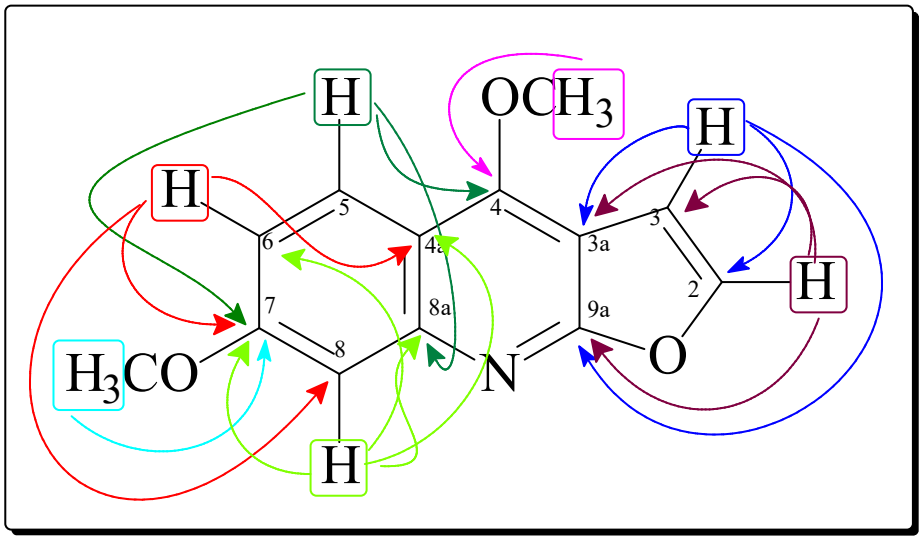


Figura 40. Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância AB-9: evolitrina.

Após a comparação dos dados de RMN de ^{13}C de AB-9 com dados presentes na literatura (PUSSET et al., 1991; RATNAYAKE et al., 2019) para a evolitrina (Tabela 7), observou-se grande semelhança na maioria dos valores, entretanto, os valores de deslocamentos químicos de C-7, C-8a e C-9a foram bem diferentes. Também verificou-se que nos dados publicados por Pusset e col. (1991) a atribuição dos sinais de C-5 e C-6 foram trocadas. Em trabalho publicado por Ratnayake e col. (2019), a atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C foi realizada por comparação com os dados reportados previamente por Pusset e col. (1991) e, portanto, manteve a mesma atribuição equivocada. Ao comparar os dados de RMN ^{13}C de AB-9 (150 MHz) com aqueles da evolitrina (a 50 MHz), reportados por Jagadeesh e col. (2000) (Tabela 7), observou-se também diferença nos valores de deslocamento químico dos carbonos C-4a, C-7, C-8a e C-9a, mas grande semelhança nos valores dos demais sinais. Além disso, claramente percebe-se a troca na atribuição dos sinais de C-8a e C-9a.

Apesar das divergências entre os dados de RMN de ^{13}C para alguns carbonos (C-4a, C-7, C-8a e C-9a), com aqueles da literatura (PUSSET et al., 1991; JAGADEESH et al., 2000), com a realização dos experimentos 2D (HSQC e HMBC) foi possível fazer a atribuição inequívoca de todos os sinais de carbono de AB-9, e não há qualquer dúvida de que AB-9 se trata da própria evolitrina (Figura 40). É possível que tenha ocorrido algum equívoco na transcrição e

atribuição dos valores de deslocamentos químicos desses carbonos, uma vez que os dados da literatura para evolitrina foram obtidos a 200 MHz, e a atribuição foi feita baseada apenas nos espectros de RMN unidimensionais, e também, por comparação com dados de RMN 2D do isômero pteleína (PUSSET et al., 1991). Esta deve ser, portanto, a primeira atribuição inequívoca dos sinais de RMN de ^{13}C, baseada em experimentos de RMN 2D, para a evolitrina. A presença dessa substância já foi reportada nas espécies *A. longiflora* (FOURNET et al., 1989) e *A. bracteata* (ANDRADE, 2003), mas os dados de RMN de ^{13}C não foram disponibilizados em nenhum desses trabalhos.

5.1.10 Identificação da amostra AB-10: 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina

A fração AB-10 (8 mg) foi obtida sob a forma de um sólido amarelado e solúvel em diclorometano. Apresentou fluorescência quando submetida à CCD e revelada na câmara de luz UV. Quando analisada por CG-EM, observou-se pelo cromatograma (Figura 41) que essa fração é constituída de um composto majoritário (pico 2), correspondendo à uma concentração relativa de aproximadamente 87%, e de outros dois constituintes, nas concentrações relativas de 11% e 1,5%. O espectro de massas do constituinte majoritário (Figura 42) apresentou o pico do íon molecular com *m/z* = 305 Da. A comparação desse espectro com a biblioteca de espectros de massas NIST14, indicou uma similaridade com os dados do composto 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina ($C_{19}H_{15}NO_3$) (Figura 43), a qual foi confirmada posteriormente pelos dados de RMN.

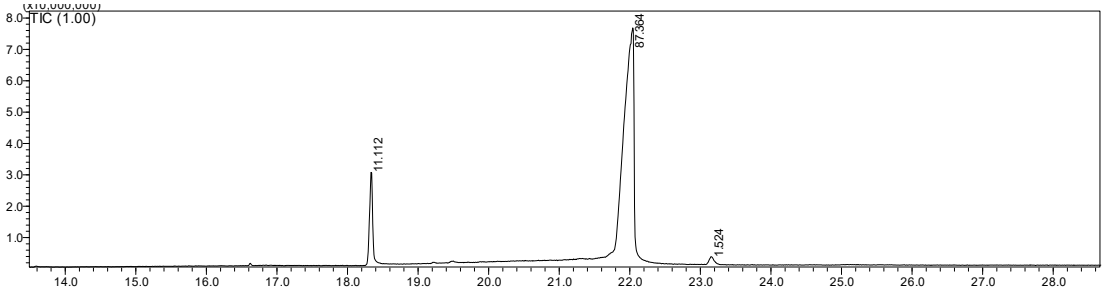


Figura 41. Cromatograma (CG-EM/IE) da fração AB-10.

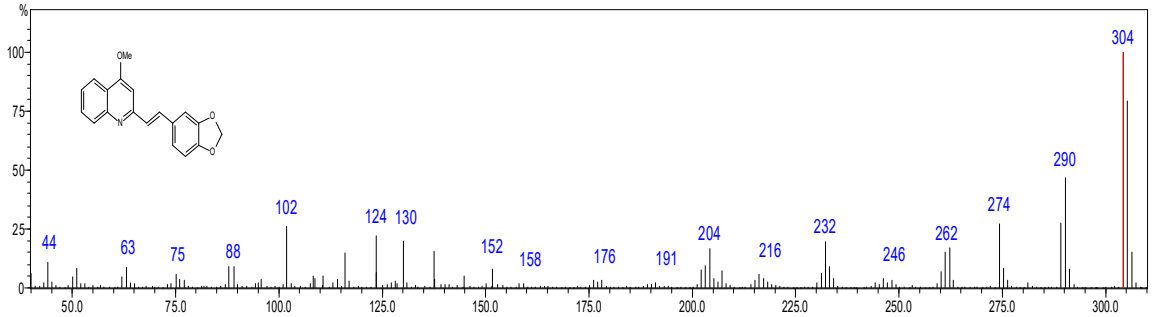


Figura 42. Espectro de massas (CG-EM/IE) do constituinte majoritário da fração AB-10: 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina.

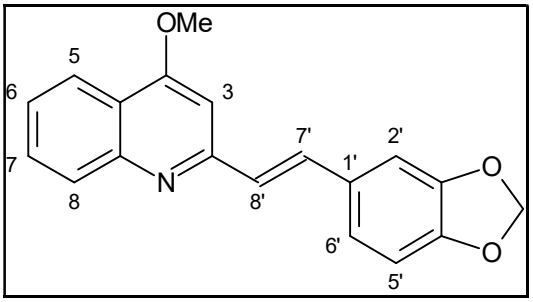


Figura 43. Fórmula estrutural do alcaloide majoritário da fração AB-10: 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina.

O constituinte minoritário (pico 1, 11%) também apresentou íon molecular com *m/z*=305 Da, sugerindo se tratar de uma mistura de isômeros, no entanto, este constituinte não foi identificado, dada a complexidade e sobreposição dos sinais de RMN de ^{1}H e ^{13}C.

O espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de AB-10 (Figura 44) apresentou sinais característicos de alcaloides quinolínicos 2,4-dissubstituídos. Sendo o substituinte em C-4 um grupo metoxila (δ 4,11, *s*, 3H) e o substituinte em C-2, um grupo (3',4'-metilenodioxiestiril). Os sinais desse substituinte foram observados em δ 7,59 e 7,20 (*J* = 16,2 Hz), atribuídos aos hidrogênios da ligação dupla *trans*; em δ 6,84 (1H, d, *J* = 8,0 Hz), δ 7,09 (1H, *dd*, *J* = 8,0/1,4 Hz) e δ 7,19 (1H, *d, J* = 1,4 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático 1',3',4'-trissubstituído, sendo o substituinte das posições 3',4', um grupo metilenodioxi (δ 6,01, *s*, 2H). Os demais sinais, em δ 6,95 (*s*), δ 8,14 (1H,

dd, *J* = 8,4; 1,2 Hz), δ 7,68 (1H, m), δ 7,45 (*m*) e δ 8,05 (1H, *dd*, *J* = 8,4; 1,2 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios da porção quinolínica da molécula. A análise dos dados espectroscópicos, assim como, a comparação com os dados de RMN de ^{1}H da literatura (FOURNET et al., 1989; CARON et al., 1993), permitiram identificar o alcaloide majoritário de AB-10 como 2-(3',4'-metilenodioxiestiril)-4-metoxiquinolina (Figura 45), como já sugerido na análise dos dados de massas.

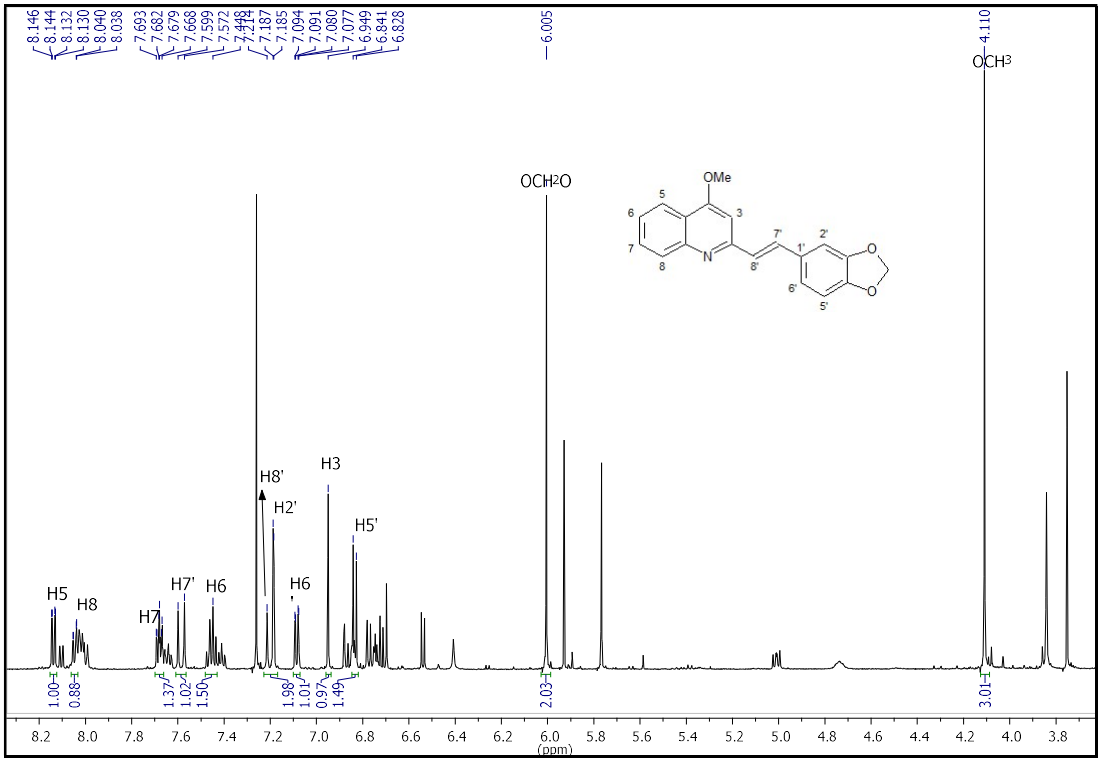


Figura 44. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-10.

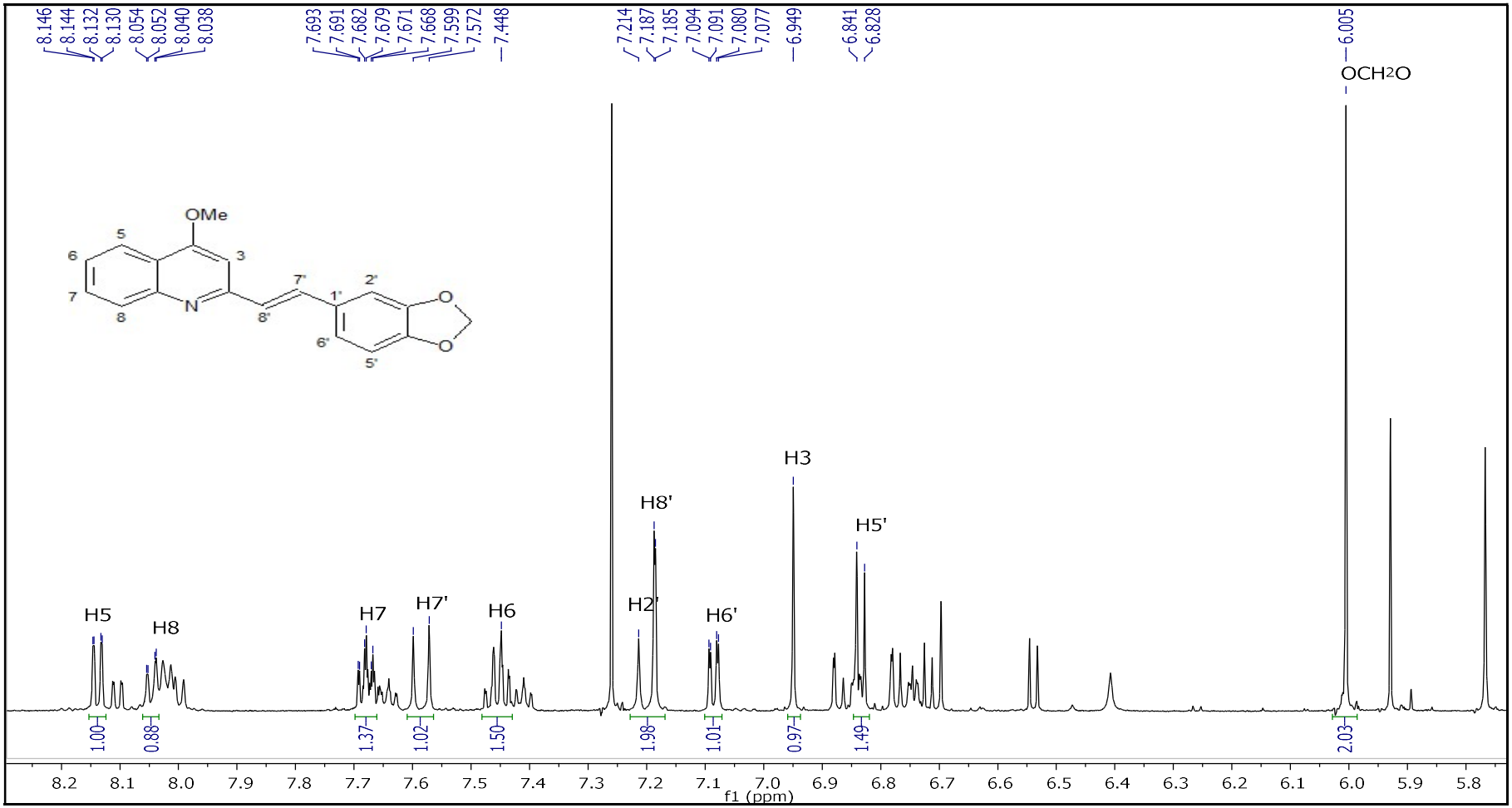


Figura 45. Ampliação da região contendo os sinais dos hidrogênios ligados ao anel quinolínico do constituinte majoritário [2-(3',4'-metilenodioxiestiril)quinolina] da fração AB-10.

O espectro de DEPTq (150 MHz, $CDCl_3$) de AB-10 (Figura 46) apresentou 18 sinais: 7 sinais de carbonos quaternários, 10 carbonos metínicos, 1 carbono metilênico e 1 carbono metílico (Tabela 9), estes dados foram comparados com a literatura (CARON et al., 1993).

Em pesquisa realizada no Scifinder, consta que essa substância previamente havia sido isolada de *Angostura longiflora* (sin. *Galipea longiflora*) (FOURNET et al., 1989). Este é, portanto, o segundo relato de isolamento dela, e ambos no gênero *Angostura*. Um único trabalho (CARON et al., 1993) foi encontrado reportando a síntese desta substância, mas sem qualquer estudo de atividade biológica.

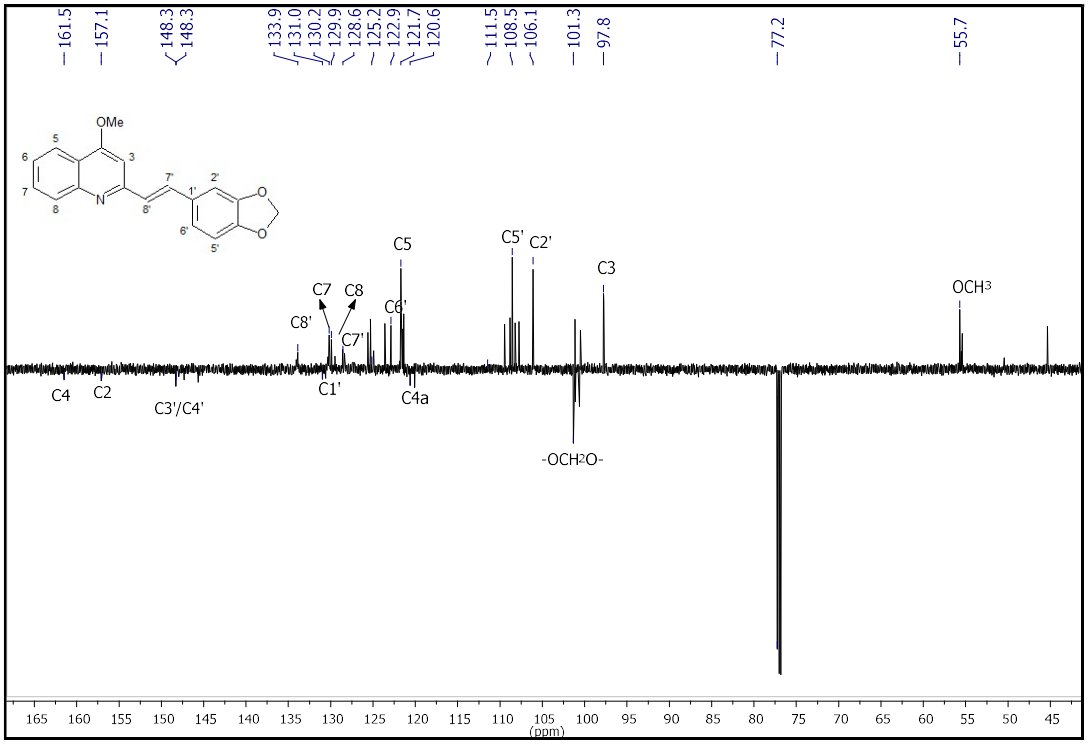


Figura 46. Espectro de DEPTq da fração AB-10, destacando os sinais do constituinte majoritário: [2-(3',4'-metilenodioxiestiril)quinolina].

Tabela 9. Correlação entre os sinais de RMN de ^{1}H e ^{13}C para o constituinte majoritário de AB-10: [2-(3',4'-metilenodioxiestiril)quinolina].

C/H	δ_H (ppm), (mult., *J*/Hz)	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)*
2	-	157,1	156,9
3	6,95 (s)	97,8	97,7
4	---	161,5	162,3
4a		120,6	120,5
5	8,14 (dd, 8,4/1,2)	121,7	121,5
6	7,45 (m)	125,3	125,0
7	7,68 (m)	129,9	128,4
8	8,05 (dd, 8,4/1,2)	130,2	129,9
8a	-	ni	148,9
1'	-	131,0	130,9
2'	7,19 (d, 1,4)	106,1	105,9
3'	-	148,3	148,1
4'	-	148,3	148,0
5'	6,83 (d, 8,0)	108,5	108,4
6'	7,09 (dd, 8,0/1,4)	122,9	122,6
7'	7,59 (d, 16,2)	128,6	127,5
8'	7,20 (d, 16,2)	133,9	133,6
$-OCH_3$	4,11 (s)	55,7	55,6
$-OCH_2O-$	6,01 (s)	101,3	101,2

*Caron et al. (1993) – dados obtidos em $CDCl_3$ a 50 MHz.
ni = valor não identificado no espectro, devido à amostra não estar pura.

5.1.11 Identificação da amostra AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida

A amostra AB-11 (11 mg) foi obtida sob a forma de um óleo castanho escuro e solúvel em diclorometano. Apresentou fluorescência quando submetida à CCD e revelada na câmara de luz UV. Seu espectro de massas de baixa resolução (Figura 47) apresentou pico do íon molecular em *m/z* = 327 Da e o pico base em m/z=177. No espectro de alta resolução (UPLC-HRMS) o pico $[M+H]^+$ foi observado em 328,1545 compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{21}NO_4$, além de outro fragmento em *m/z* = 177,0545, compatível com a fórmula $[C_{10}H_9O_3]^+$, de um grupo feruloíla (Figura 48).

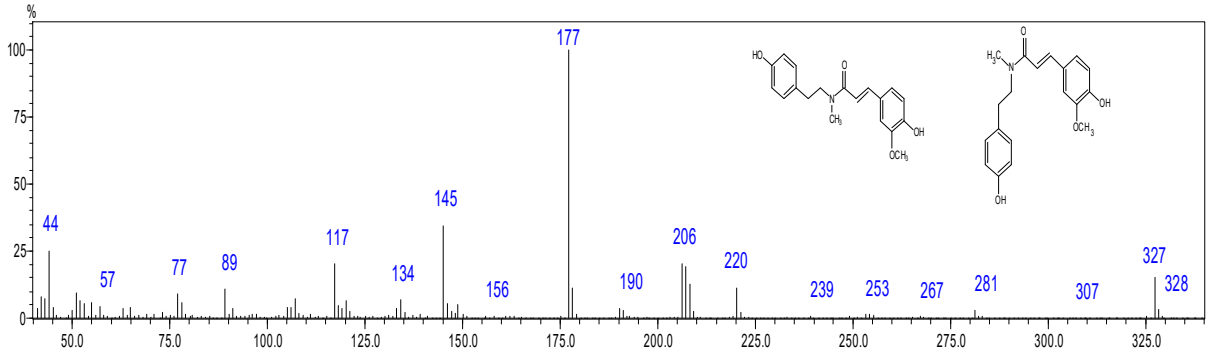


Figura 47. Espectro de massas (CG-EM-IE) para a fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

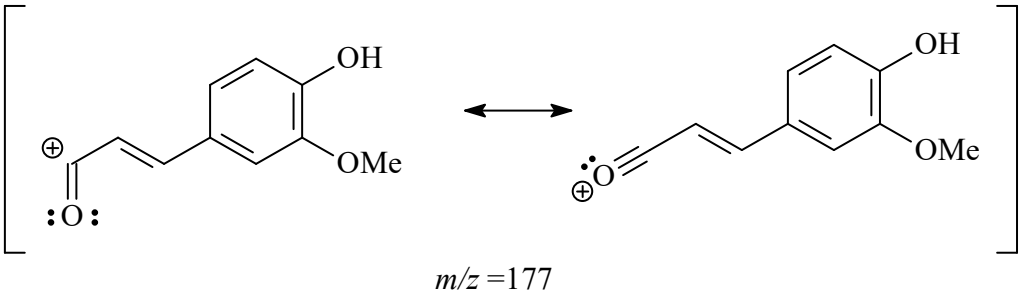


Figura 48. Fragmento correspondente ao pico base no espectro de massas (IE) de AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

A análise do espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de AB-11 (Figuras 49 e 50) sugeriu a presença de uma mistura de isômeros rotaméricos de uma amida derivada do ácido *trans*-ferúlico e da *N*-metiltiramina, caracterizando assim a *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida (Figura 52), também conhecida como *N*-*trans*-feruloil-*N*-metiltiramina. Os isômeros rotaméricos foram observados numa proporção aproximada de 3:2, em $CDCl_3$. As evidências para uma mistura de rotâmeros, se deve à grande semelhança nos valores de deslocamento e multiplicidade dos sinais, variando apenas a intensidade de cada sinal.

Os dados de RMN de ^{1}H do constituinte majoritário (~60%), permitiram identificar a porção *trans*-feruloíla, a qual foi caracterizada pelo sinal em δ 3,82 (*s*, 3H) atribuído ao grupo metoxila; pelos dois dubletos em δ 7,37 e δ 6,18, acoplados entre si (*J* = 15,6 Hz), atribuídos aos hidrogênios olefínicos com configuração *trans*; e os sinais dos hidrogênios do anel aromático trissubstituído, foram observados em δ 7,01 (*d, J*=7,8 Hz) foi atribuído a H-6, que mostrou acoplamento com o sinal em δ 7,82 (*d*, *J*=7,8 Hz); e o sinal em δ 6,70 (*sl*) foi

atribuído a H-2. Não foi observado, neste caso, o acoplamento entre os hidrogênios em posição *meta* (H-6 e H-2).

A parte derivada da *N*-metiltiramina foi evidenciada pelos sinais de hidrogênios ligados a um anel aromático *p*-substituído, em δ 6,98 (2H, d, *J*=8,4 Hz), atribuídos a H-13/H-17, e em δ 6,77 (2H, *d*, *J*=8,4 Hz), atribuídos a H-14/H-16. O sinal em δ 3,62 (2H, t, *J*=6,6 Hz) foi atribuído a H-10, e o sinal em δ 2,81 (2H, m), foi atribuído a H-11, que embora acoplado com H-10, aparece sobreposto com o sinal do rotâmero minoritário e, portanto, não foi possível determinar a constante de acoplamento. Finalmente, o sinal em δ 3,01 (3H, s) foi atribuído à metila ligada ao nitrogênio (*N*-CH_3). Os sinais dos hidrogênios do isômero rotamérico minoritário foram muito semelhantes aos do rotâmero majoritário e são mostrados na Tabela 10. A atribuição dos sinais foi confirmada pela comparação com dados de RMN de ^{1}H com os dados da *beecheyamida* (Cheng et. al. 2004), uma amida semelhante à AB-11, com o mesmo padrão de substituição e oxigenação, diferindo apenas no fato de que no lugar de duas hidroxilas (4-OH e 4'-OH) (Figura 47, ver estrutura de AB-11), são duas metoxilas (4-OCH_3 e 4'- OCH_3). A *beecheyamida* também existe como uma mistura de rotâmeros (3:2).

Os dados de RMN de ^{1}H de AB-11 também foram comparados com dados da *N*-(4-hidroxifenetil)*trans*-ferulamida (MUÑOZ et al., 1996). A diferença dessa amida comparada com AB-11 é apenas a ausência de um grupo *N*-CH_3.

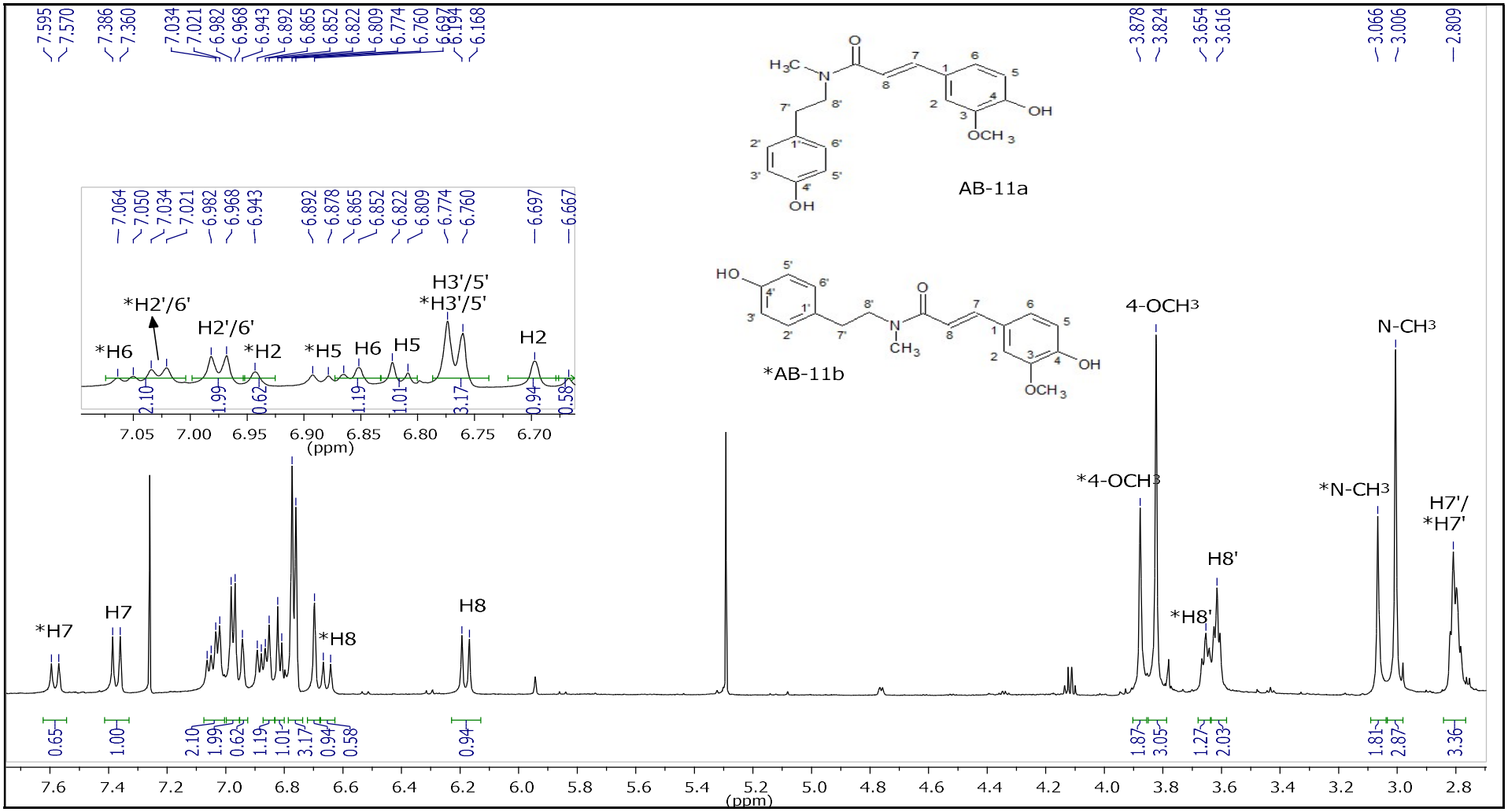


Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida (*sinais de hidrogênio do composto minoritário).

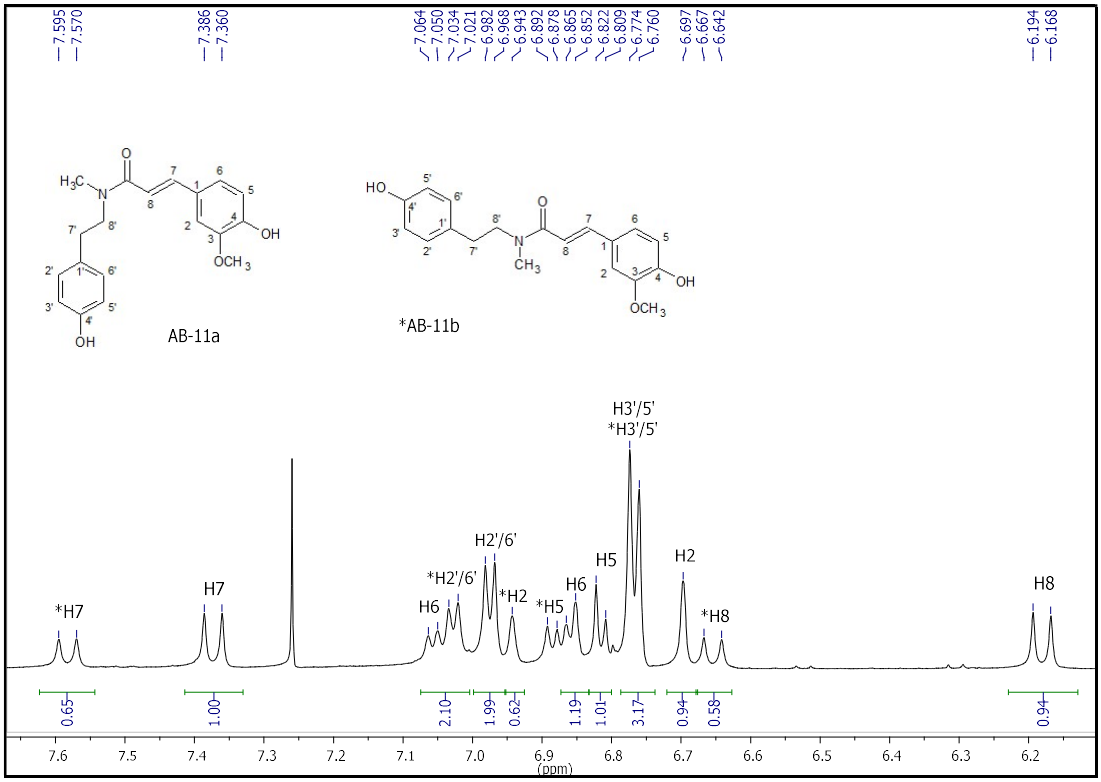


Figura 50. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida, na região de hidrogênios ligados ao carbono *sp*^{2}.

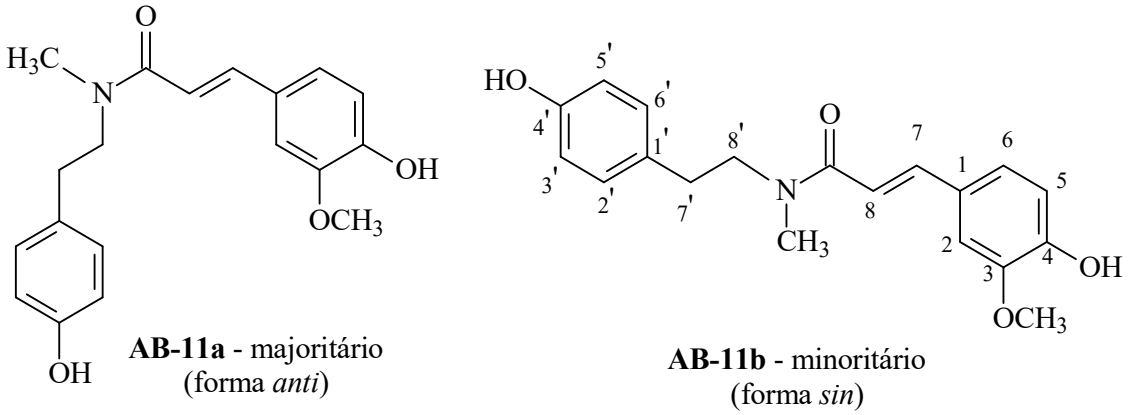


Figura 51. Mistura de rotâmeros da substância *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida (AB-11).

Tabela 10. Comparação entre os dados de RMN de ^{1}H de AB-11, *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida, (600 MHz) e beecheyamida (400 MHz), ambos em $CDCl_3$

H	AB-11 δ (mult., *J*/Hz)		*Beecheyamida** δ (mult., *J*/Hz)	
	forma *anti* (major.)	forma *sin* (minor.)	forma *anti* (major.)	forma *sin* (minor.)
2	6,70 (*sl*)	6,94 (*sl*)	6,86 (*d*, 2,0)	7,04 (*d*, 2,0)
5	6,82 (*d*, 7,8)	6,89 (*d*, 8,4)	6,82 (*d*, 8,4)	6,88 (*d*, 8,4)
6	6,86 (*d*, 7,8)	7,06 (*d*, 8,4)	7,01 (*dd*, 8,4/2,0)	7,14 (*dd*, 8,4/2,0)
7	7,37 (*d*, 15,6)	7,58 (*d*, 15,0)	7,47 (*d*, 15,6)	7,64 (*d*, 15,6)
8	6,18 (*d*, 15,6)	6,65 (*d*, 15,0)	6,40 (*d*, 15,6)	6,71 (*d*, 15,6)
2'/6'	6,98 (*d*, 8,4)	7,03 (*d*, 8,4)	7,09 (*d*, 8,8)	7,17 (*d*, 8,8)
3'/5'	6,77 (*d*, 8,4)	6,77 (*d*, 8,4)	6,84 (*d*, 8,8)	6,84 (*d*, 8,8)
7'	2,81 (*t*, 7,2)	2,81 (*t*, 7,2)	2,86 (*t*, 7,2)	2,86 (*t*, 7,2)
8'	3,62 (*t*, 7,2)	3,65 (*t*, 7,2)	3,64 (*t*, 7,2)	3,64 (*t*, 7,2)
4-OCH_3	3,82 (*s*)	3,88 (*s*)	3,92 (*s*)	3,90 (*s*)
N-CH_3	3,01 (*s*)	3,07 (*s*)	3,04 (*s*)	3,04 (*s*)

*Cheng et al., (2004).

Os sinais no espectro DEPTq (Figura 52) também foram observados em duplicidade, com valores muito semelhantes ou, em alguns casos, coincidentes. As atribuições dos sinais de ^{13}C para cada rotâmero foi realizada a partir do dados obtidos no DEPTq, das correlações observadas nos mapas de contornos HSQC (Figura 53 e 54) para carbonos hidrogenados e HMBC (Figura 55 e 56) para carbonos não hidrogenados, além da comparação com dados da literatura (Tabela 11) para a *beecheyamida* (CHENG et al., 2004), amida semelhantes à AB-11 [*N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida]. Apesar de haver diversos relatos na literatura para a *N*-(4-hidroxifenetil)*trans*-ferulamida (MUÑOZ et al., 1996; FUKUDA et al., 1983; CHANG et al., 2001; ACHANTA et al., 2010) não foi encontrado na literatura qualquer registro para a amida AB-11 [*N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida]. Portanto, este parece ser o primeiro isolamento desta amida como produto natural, sendo encontrada em *A. bracteata* como uma mistura de isômeros rotaméricos.

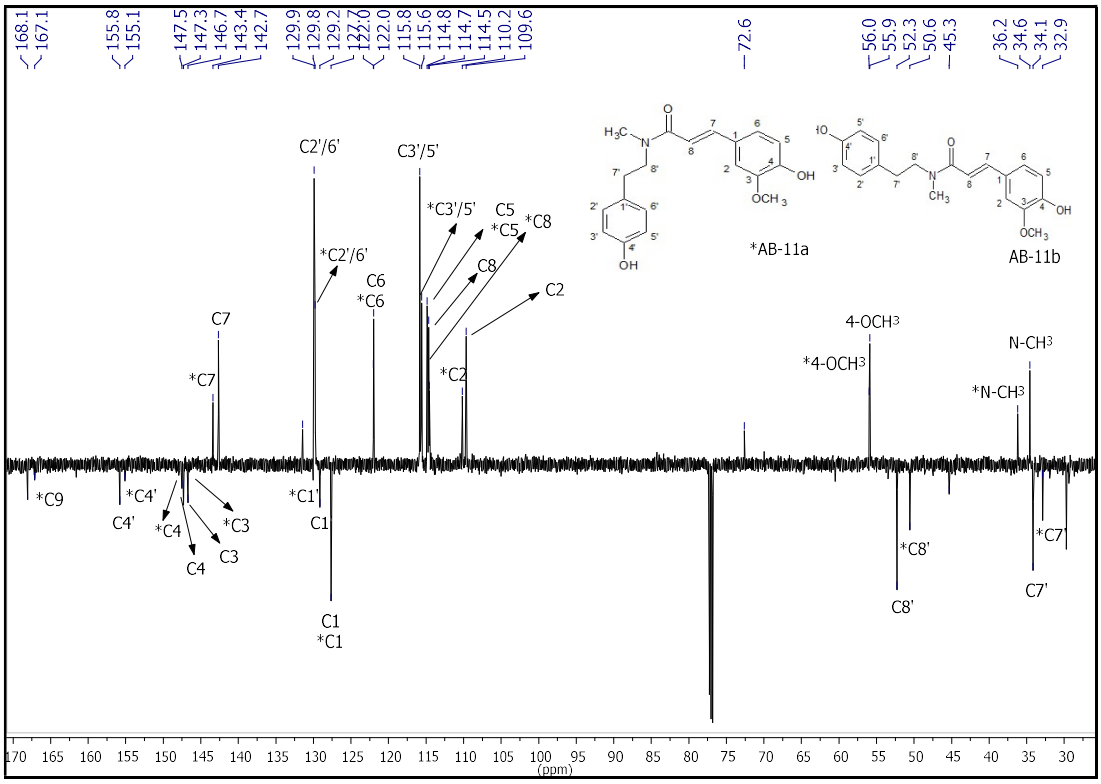


Figura 52. Espectro de DEPTq (150 MHz, $CDCl_3$) da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

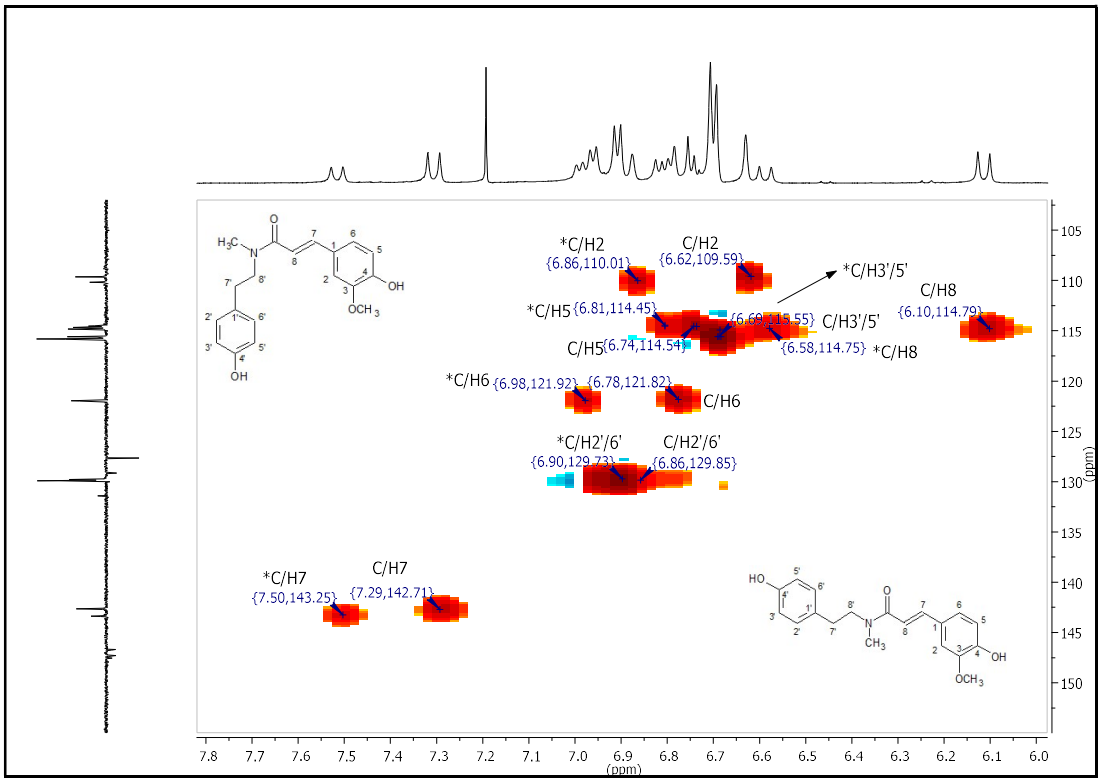


Figura 53. Mapa de contorno HSQC da região de hidrogênios ligados em carbonos *sp*^{2} da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

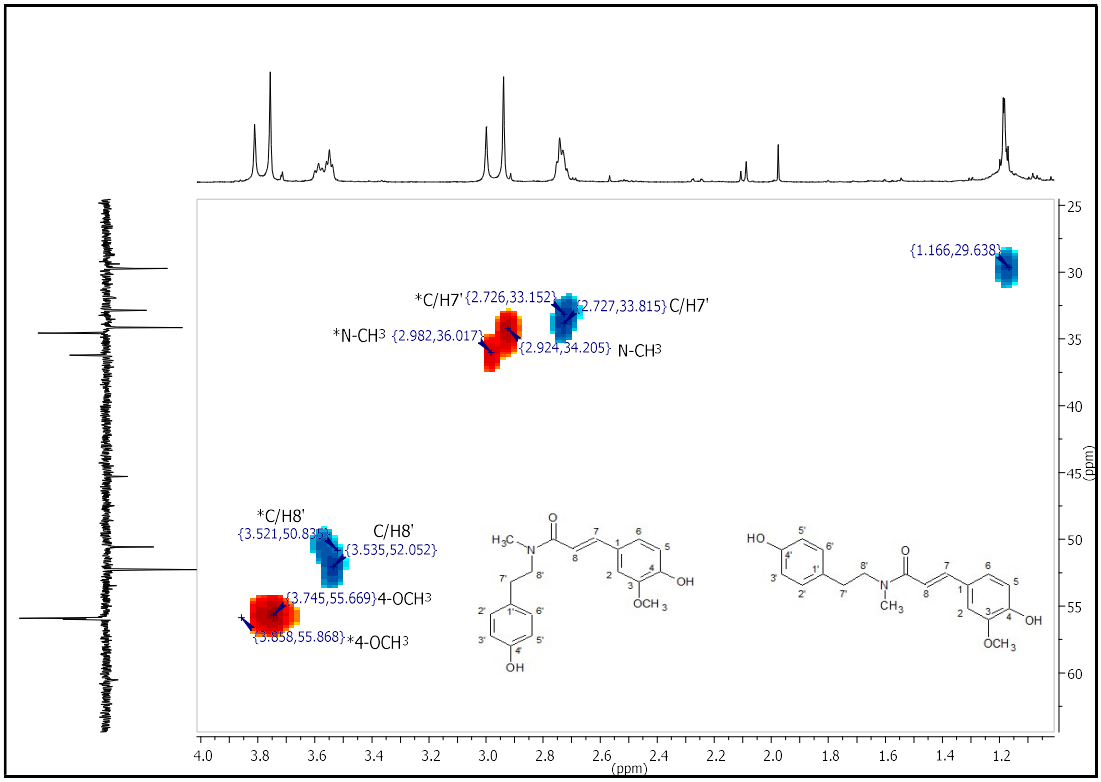


Figura 54. Mapa de contorno HSQC da região de hidrogênios ligados em carbonos *sp*^{3} da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

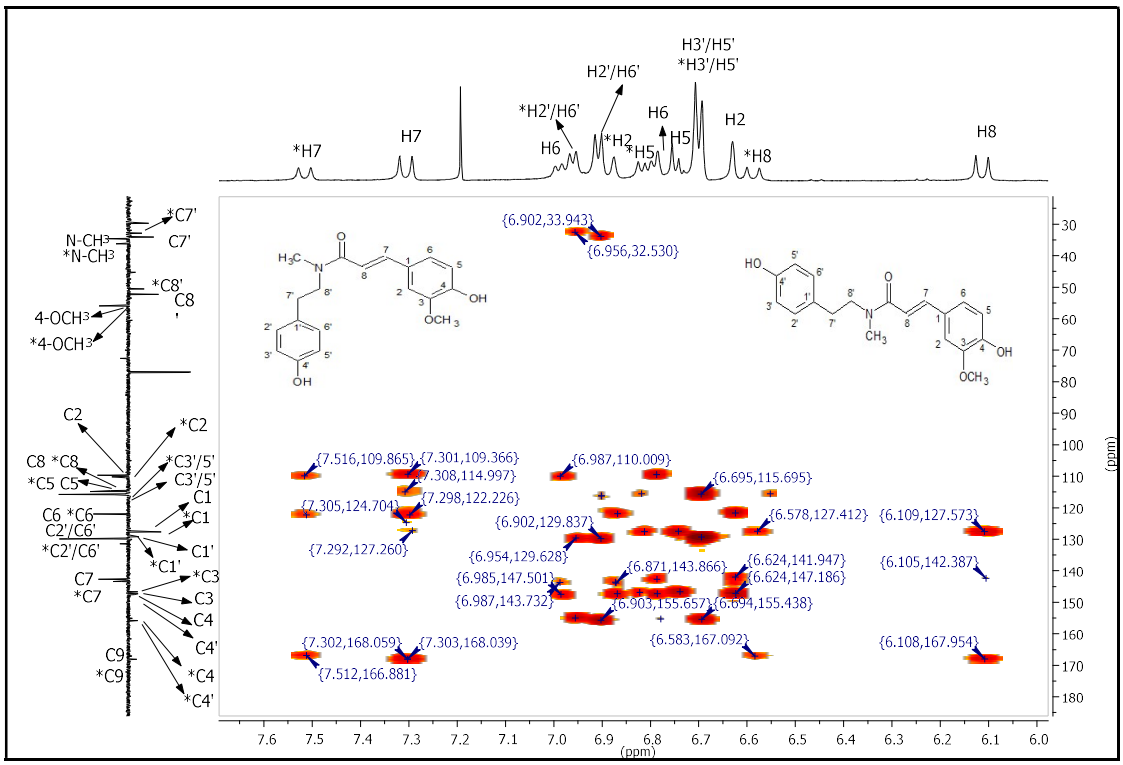


Figura 55. Mapa de contorno HMBC da região de hidrogênios ligados em carbonos *sp*^{2} da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

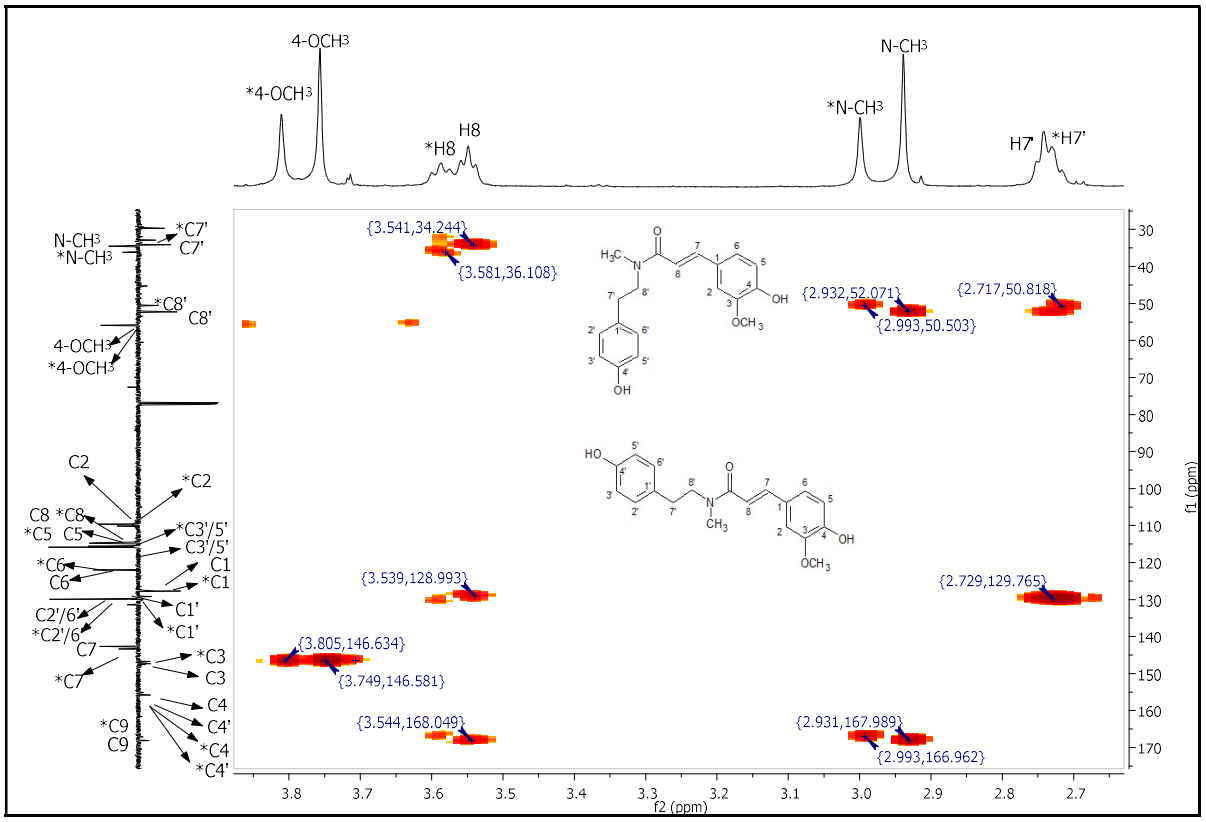


Figura 56. Mapa de contorno HMBC da região de hidrogênios ligados em carbonos *sp*^{3} da fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida.

Tabela 11. Correlações de ^{1}H e ^{13}C observadas no HSQC para a fração AB-11: *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida e comparação com dados da literatura*

H/C	AB-11				*Beecheyamida**	
	δ (mult., *J*/Hz)		**δ_C (150 MHz)**		**δ_C (100 MHz)**	
	forma *anti* (major.)	forma *sin* (minor.)	forma *anti* (major.)	forma *sin* (minor.)	forma *anti* (major.)	forma *sin* (minor.)
1	---	---	127,7	127,7	128,3	128,2
2	6,70 (*sl*)	6,94 (*sl*)	109,6	110,2	110,9	110,0
3	---	---	146,7	146,8	150,2	150,4
4	---	---	147,3	147,5	148,9	150,0
5	6,82 (*d*, 7,8)	6,89 (*d*, 8,4)	114,8	114,8	109,8	109,8
6	6,86 (*d*, 7,8)	7,06 (*d*, 8,4)	122,0	122,0	114,1	115,3
7	7,37 (*d*, 15,6)	7,58 (*d*, 15,0)	142,7	143,4	141,6	142,4
8	6,18 (*d*, 15,6)	6,65 (*d*, 15,0)	114,7	114,5	121,5	121,8
9	---	---	168,1	167,1	166,9	166,4
1'	---	---	129,2	130,0	130,2	131,2
2'/6'	6,98 (*d,* 8,4)	7,03 (*d*, 8,4)	129,9	129,8	129,6	129,6
3'/5'	6,77 (*d*, 8,4)	6,77 (d, 8,4)	115,8	115,6	113,9	113,8
4'	---	---	155,8	155,1	158,4	158,0
7'	2,81 (*m*)	2,81 (*m*)	34,1	32,9	34,4	32,9
8'	3,62 (*t*, 7,2)	3,65 (*t*, 7,2)	52,3	50,6	52,0	50,7
4-OCH_3	3,82 (*s*)	3,88 (*s*)	55,9	56,0	55,8	55,8
N-CH_3	3,01 (*s*)	3,07 (*s*)	34,6	36,2	34,3	36,3

*Cheng et al., (2004).

5.1.12 Identificação da substância AB-12: esquimianina

A substância AB-12 (4 mg) foi isolada sob a forma de um sólido amarelado. Apresentou fluorescência e uma única mancha quando submetida à luz UV por meio da CCD. Seu espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) (Figura 57) apresentou sinais característicos de alcaloides furoquinolínicos: os sinais em δ 7,66 (1H, *d, J* = 1,8 Hz) e δ 7,12 (1H, *d, J* = 1,8 Hz) foram relacionados aos hidrogênios do anel furano e os sinais em δ 8,05 (1H, *d, J* = 9,6 Hz) e δ 7,28 (1H, *d, J* = 9,6 Hz) atribuídos a H-5 e H-6, respectivamente (Tabela 12).

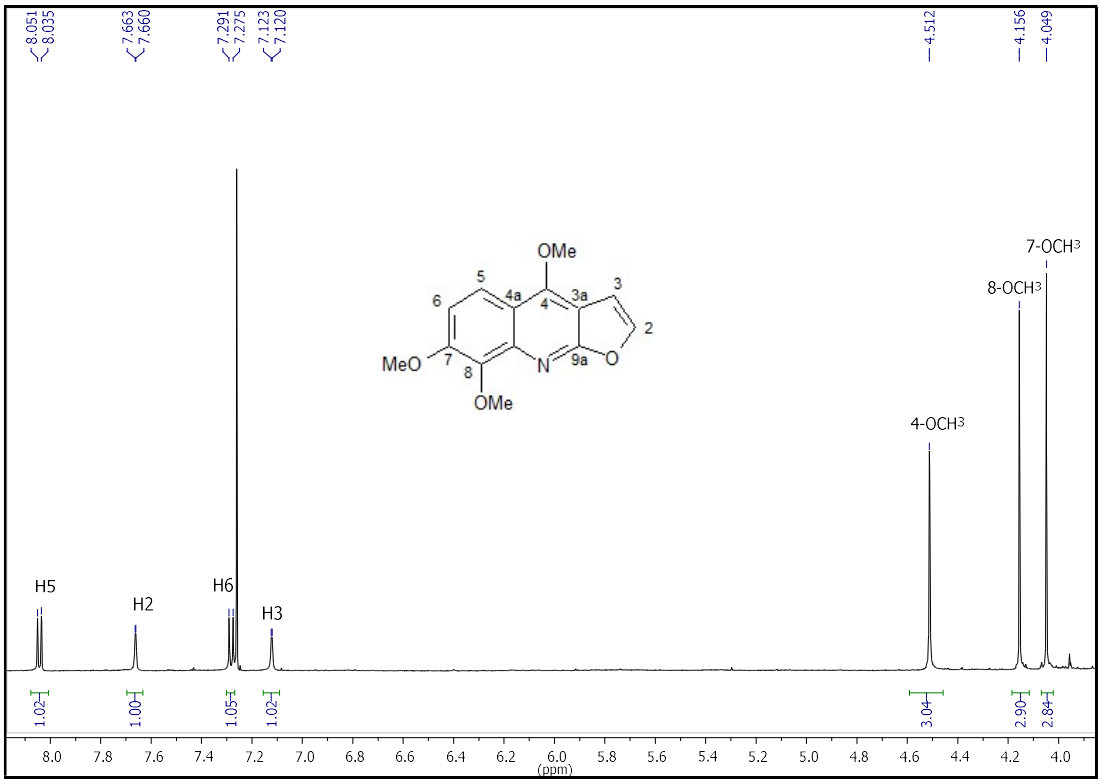


Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz) para a substância AB-12: esquimianina.

Tabela 12. Comparação entre os dados de RMN de ^{1}H (600 MHz) obtidos para AB-12 e os dados constantes na literatura para a esquimianina

Hidrogênio	AB-12 δ (ppm), *J* (Hz)	Literatura*
2	7,66 (1H, *d, J* = 1,8)	7,61 (*J* = 2,8 Hz)
3	7,12 (1H , *d*, *J* = 1,8)	7,07 (*d*, *J* = 2,8 Hz)
5	8,04 (1H , *d, J* = 9,6)	8,0 (*d*, *J* = 9,4 Hz)
6	7,28 (1H, *d, J* = 9,6)	7,27 (*d, J* = 9,4 Hz)
4-OCH_3	4,51 (3H, *s*)	4,45 (*s*)
7- OCH_3	4,05 (3H, *s*)	4,10 (*s*)
8- OCH_3	4,16 (3H, *s*)	4,21 (*s*)

* JACKSON et al.,1990.

O espectro de DEPT-135 (Figura 58) apresentou 7 sinais referentes aos carbonos metílicos e metínicos. A análise do mapa de contorno HSQC (Figura 59) permitiu correlacionar os hidrogênios e carbonos presentes na molécula. Os sinais em δ 4,51 (3H, *s*), δ 4,05 (3H, *s*) e δ 4,16 (3H, *s*) foram relacionados a três metoxilas ligadas a C-4, C-7 e C-8, respectivamente. Os valores de deslocamento dos carbonos não hidrogenados foram obtidos a partir das correlações obtidas no mapa de contornos HMBC (Figura 61).

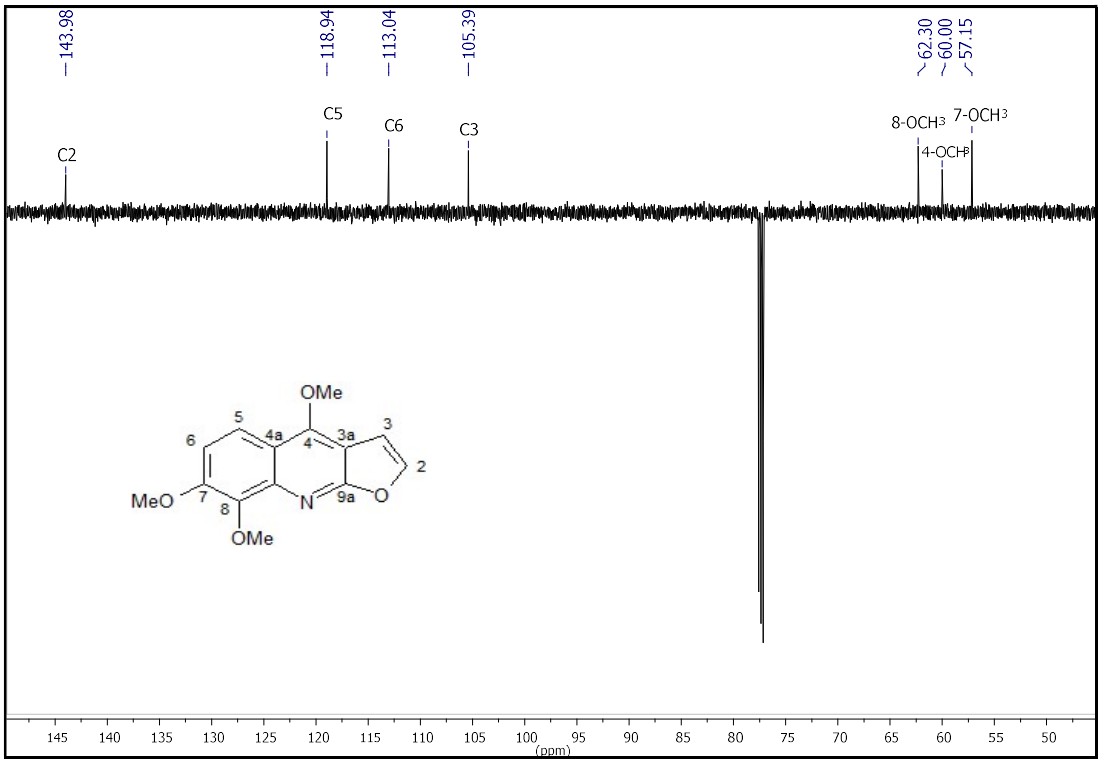


Figura 58. Espectro de DEPT-135 para a substância AB-12: esquimianina.

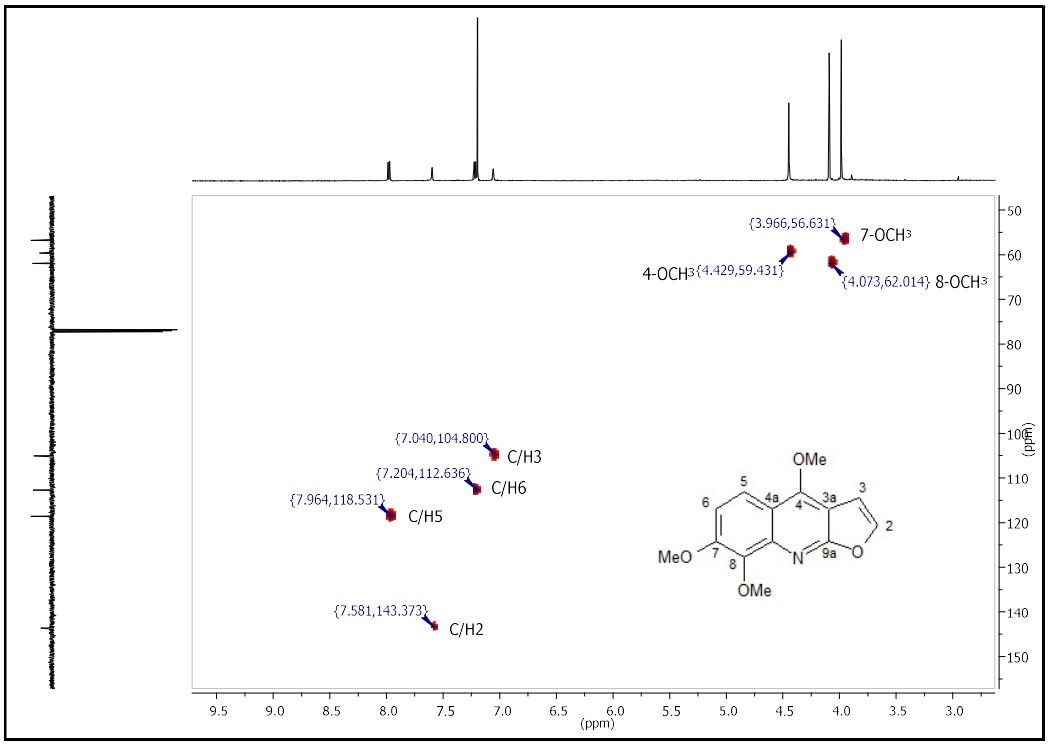


Figura 59. Mapa de contorno HSQC para a substância AB-12: esquimianina.

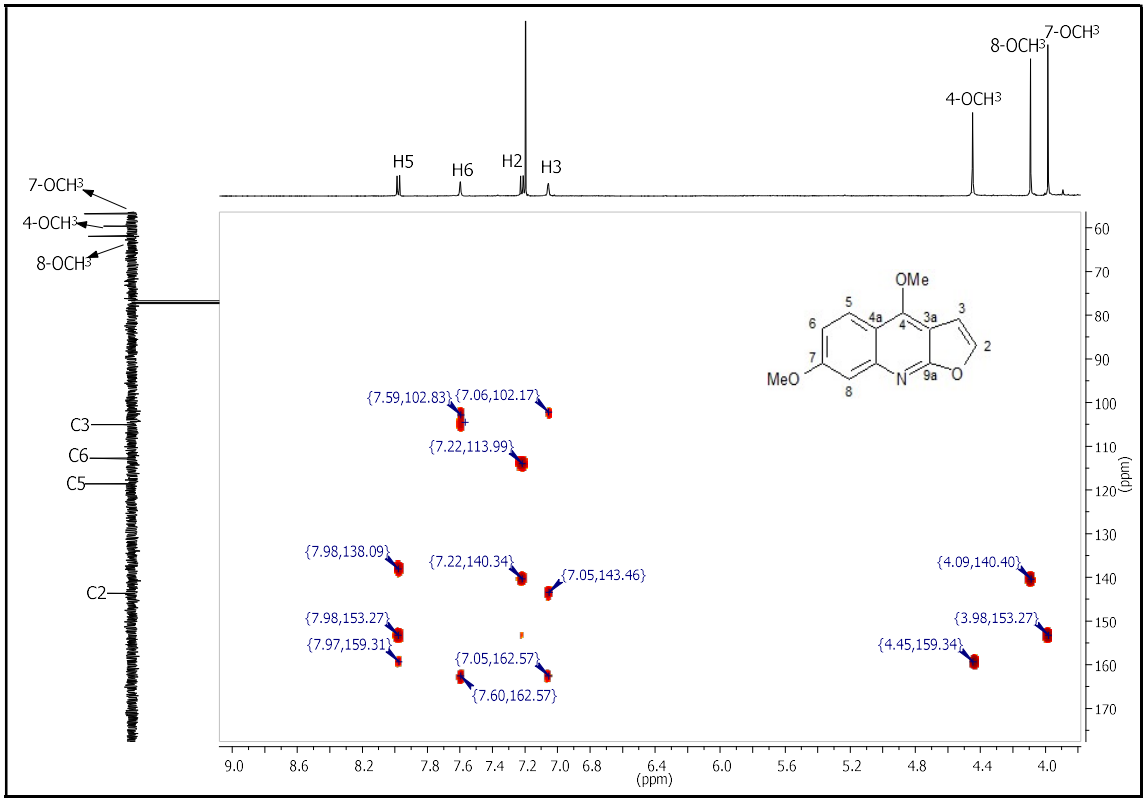


Figura 60. Mapa de contorno HMBC para a substância AB-12: Esquimianina

A partir da análise dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C, bem como, a comparação com os dados da literatura (JACKSON et al.,1990; RATHEESH et al., 2013) pode-se concluir que a amostra AB-12 se trata do alcaloide furoquinolínico esquimianina (Figura 61). Os dados completos de ^{13}C são apresentados na Tabela 13.

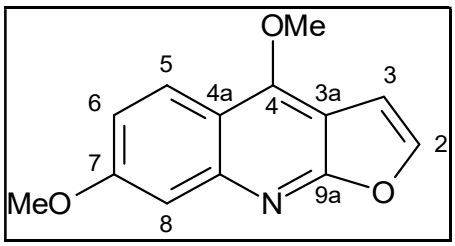


Figura 61. Fórmula estrutural da substância AB-12: esquimianina.

Esse alcaloide é muito comum em espécies de Rutaceae (CHENG et al., 1994; YANG et al., 2012; RATHEESH et al., 2013; GAJBHIYE et al., 2012), incluindo *Angostura longiflora,* (FOURNET et al., 1989) e *Angostura bracteata* (ANDRADE, 2003).

Tabela 13. Atribuição dos dados de RMN de ^{13}C de AB-12 e comparação com dados da literatura da esquimianina (*skimmianine*)

C	AB-12	Esquimianina (*skimmianine*)	
	δ_C (150 MHz)	**δ_C (125 MHz)***	**δ_C****
2	144,0	142,0	142,7
3	105,4	104,6	104,5
3a	102,2	102,0	101,7
4	159,3	157,2	156,9
4a	114,0	114,9	114,6
5	118,9	118,2	118,0
6	113,0	112,1	111,7
7	153,3	152,1	151,9
8	140,0	143,0	141,8
8a	138,1	141,5	141,3
9a	162,6	164,3	164,2
4-OCH_3	60,0	59,0	58,8
7-OCH_3	57,1	56,8	56,6
8-OCH_3	62,3	61,7	61,4

* RATHEESH et al. 2013.
** JACKSON et al.1990.

5.1.13 Identificação da fração AB-13: magnolamida e magnolamida b

A substancia AB-13 (10 mg) foi isolada sob a forma de um óleo amarelado. Apresentou fluorescência e uma única mancha quando submetida à luz UV por meio da CCD. Seu espectro de massas (CG-EM/IE) (Figura 62) apresentou pico do íon molecular em *m/z* = 372 Da. Apresentou também um pico em *m/z* = 343 Da, indicando a perda de um radical CHO; e um pico base em *m/z* = 177 Da, que corresponde a perda de uma porção feruloíla. Seu espectro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS) mostrou o pico $[M+H]^+$ em *m/z* =373,1754, indicando a fórmula molecular $C_{20}H_{24}N_2O_5$ para AB-13.

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) (Figura 63) foi possível constatar que a amostra AB-13 corresponde a uma mistura de isômeros *trans* e *cis* na proporção aproximada de 7:3, respectivamente e, portanto, o composto majoritário (*trans*) foi chamado AB-13a, e o minoritário (*cis*), de AB-13b.

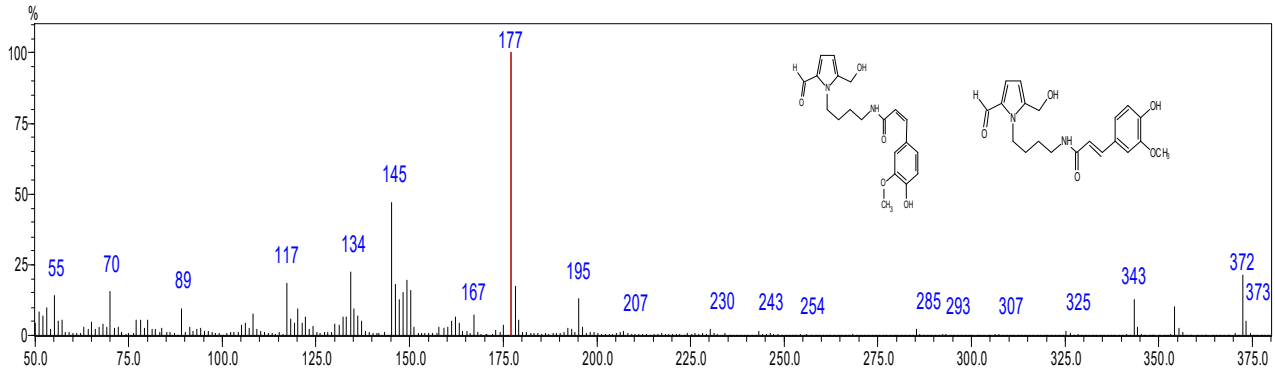


Figura 62. Espectro de massas da fração AB-13: magnolamida e magnolamida b

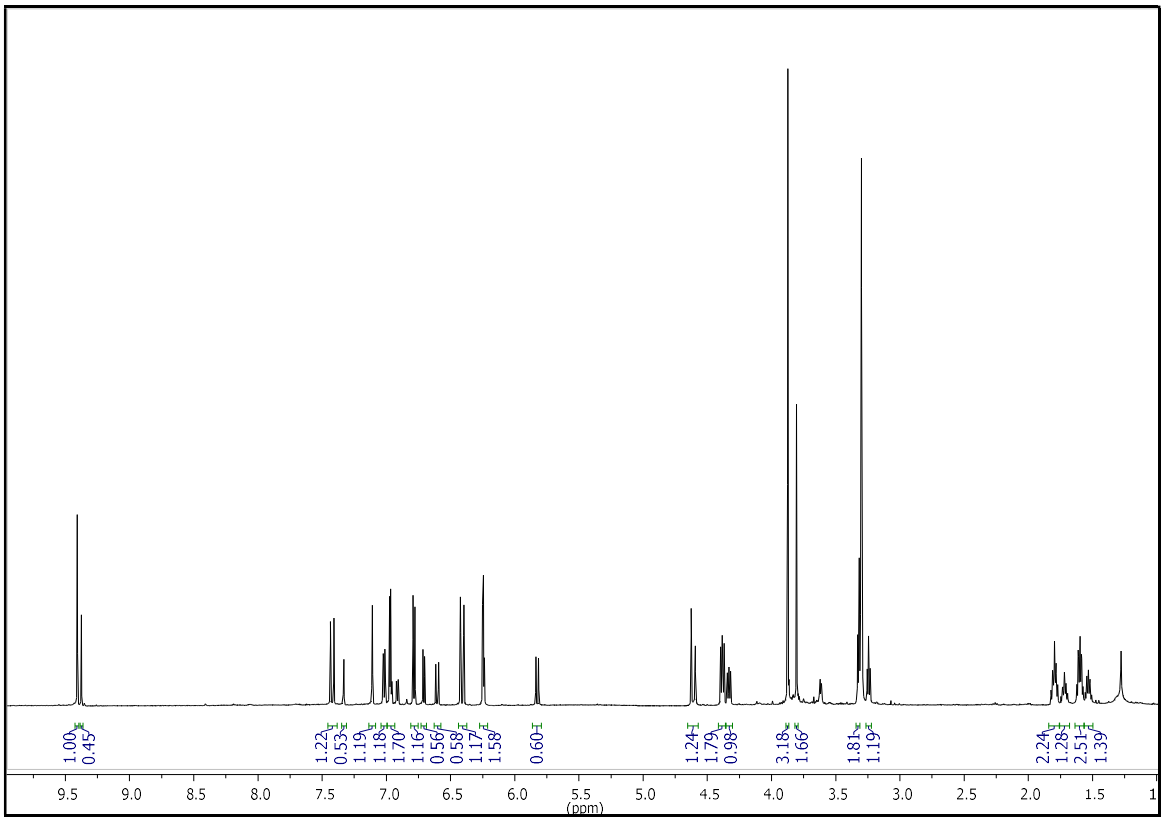


Figura 63. Espectro de RMN de ^{1}H da mistura de isômeros *trans* e *cis* de AB-13: magnolamida e magnolamida b.

Os dados de RMN de ^{1}H de AB-13a (Figura 63) confirmaram a presença de uma porção *trans*-feruloíla, destacando-se um sinal em δ 3,87 (*s*, 3H) atribuído ao grupo metoxila; os sinais em δ 6,41 e δ 7,42 (*J* = 15,7 Hz), atribuídos aos hidrogênios olefínicos com configuração *trans*; e os sinais de três hidrogênios em δ 7,11 *(d*, *J* = 1,8 Hz, 1H), δ 7,02 (*dd, J* = 8,4; 1,8 Hz, 1H) e δ 6,78 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 1H), evidenciando a presença de um anel aromático 1,3,4-

trissubstituído. A comparação dos demais sinais do espectro de RMN de ^{1}H, com dados da literatura (YU et al., 1998; CHIOU et al., 2005; DONG e LE QUESNE, 2002) revelou que o composto majoritário (AB-13a), se trata da magnolamida (Figura 67), uma amida derivada do ácido *trans*-ferúlico e do 1-(4-aminobutil)-5-(hidroximetil)-1*H*-pirrol-2-carbaldeido, isolada pela primeira vez da planta *Magnolia coco* (Magnoliaceae).

Os sinais em δ 6,97 *(d*, *J* = 4,1 Hz, 1H) e δ 6,25 *(d*, *J* = 4,1 Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios do anel pirrol, 1,2,5-trissubstituído; o sinal em δ 9,41 (s) foi atribuído a um grupo formil, um dos substituintes do anel pirrólico (em C-2') e o sinal em δ 4,62 (s) ao outro substituinte em C-5', caracterizado como um grupo –CH_2OH. O substituinte ligado ao N do anel pirrólico, foi caracterizado como um grupo 4-aminobutil (-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$), para o qual foram observados quatro sinais integrando para 2H cada, em δ 4,38 (*m*, H6'), δ 3,32 (*t*, 7,0 Hz), δ 1,80 (*m*) e δ 1,60 (*dt*, *J*=14,5/7,2 Hz), correspondentes aos hidrogênios metilênicos.

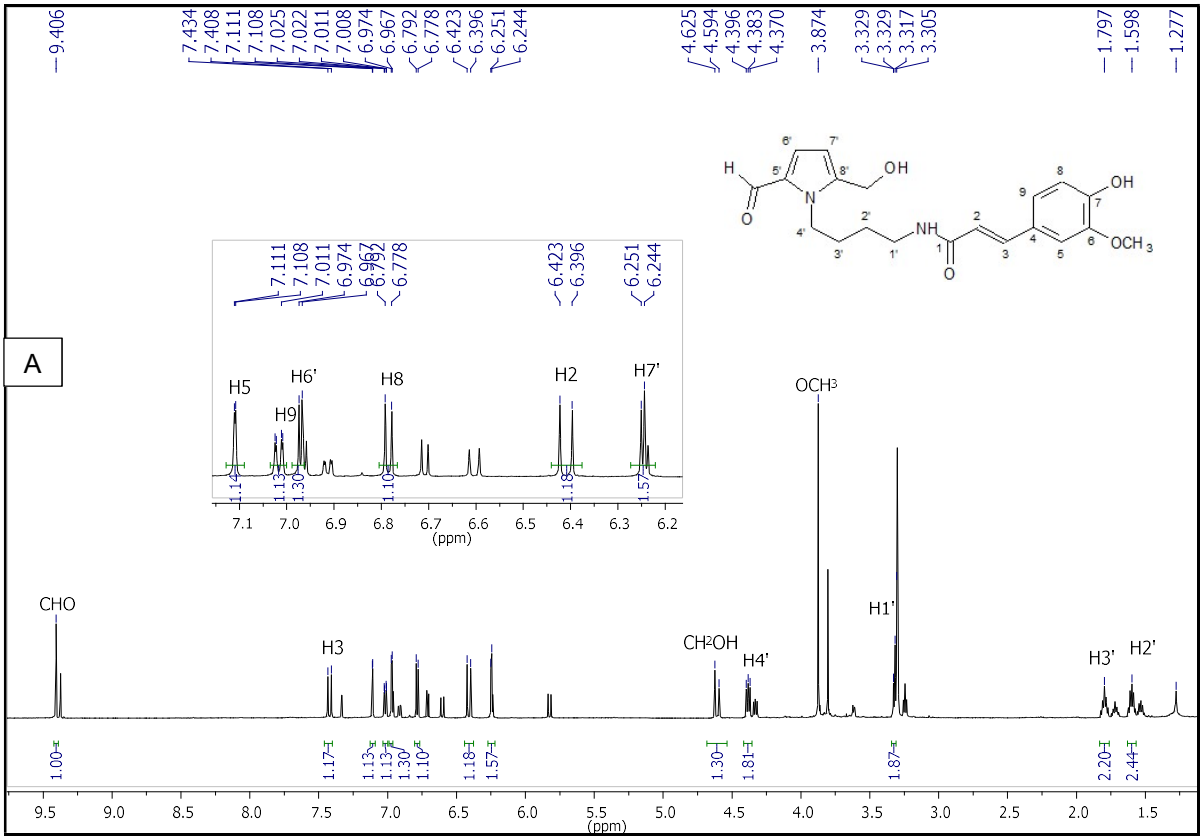


Figura 64. Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, CD_3OD) da fração AB-13, destacando os sinais do isômero majoritário AB-13a: magnolamida.

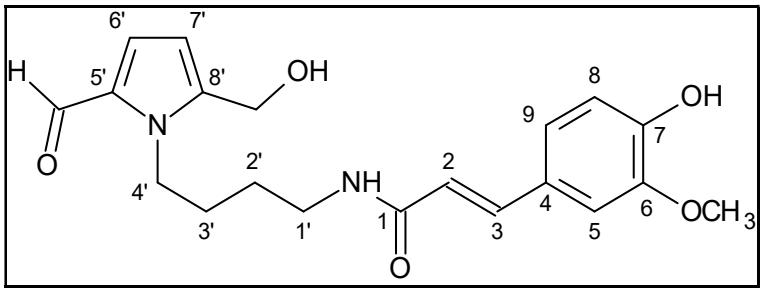


Figura 65. Estrutura molecular de AB-13a: magnolamida.

Os sinais de RMN de ^{1}H (Figura 65) atribuídos a AB-13b apresentaram o mesmo padrão de deslocamentos e multiplicidade relativos a AB-13a, salvo a diferença na intensidade dos picos e também entre os sinais de H-7 e H-8 que para AB-13b foram observados em δ 6,60 e δ 5,82, respectivamente, com *J*=12,6 Hz, indicando a estereoquímica *cis* da ligação dupla, confirmando a presença de uma porção *cis* feruloíla na molécula (Figura 66). Em AB-13a, esses sinais foram observados em δ 6,41 e δ 7,42, com *J* = 15,7 Hz.

A atribuição completa dos sinais de RMN de ^{1}H dos isômeros *cis* e *trans* da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1*H*-pirrol-1-il)butil]ferulamida são apresentadas na Tabela 14, onde os deslocamentos químicos são comparados com dados da literatura da magnolamida (isômero *trans*), isolada de *Magnolia coco* (YU et al.,1998) e obtida como produto sintético (CHIOU et al., 2005).

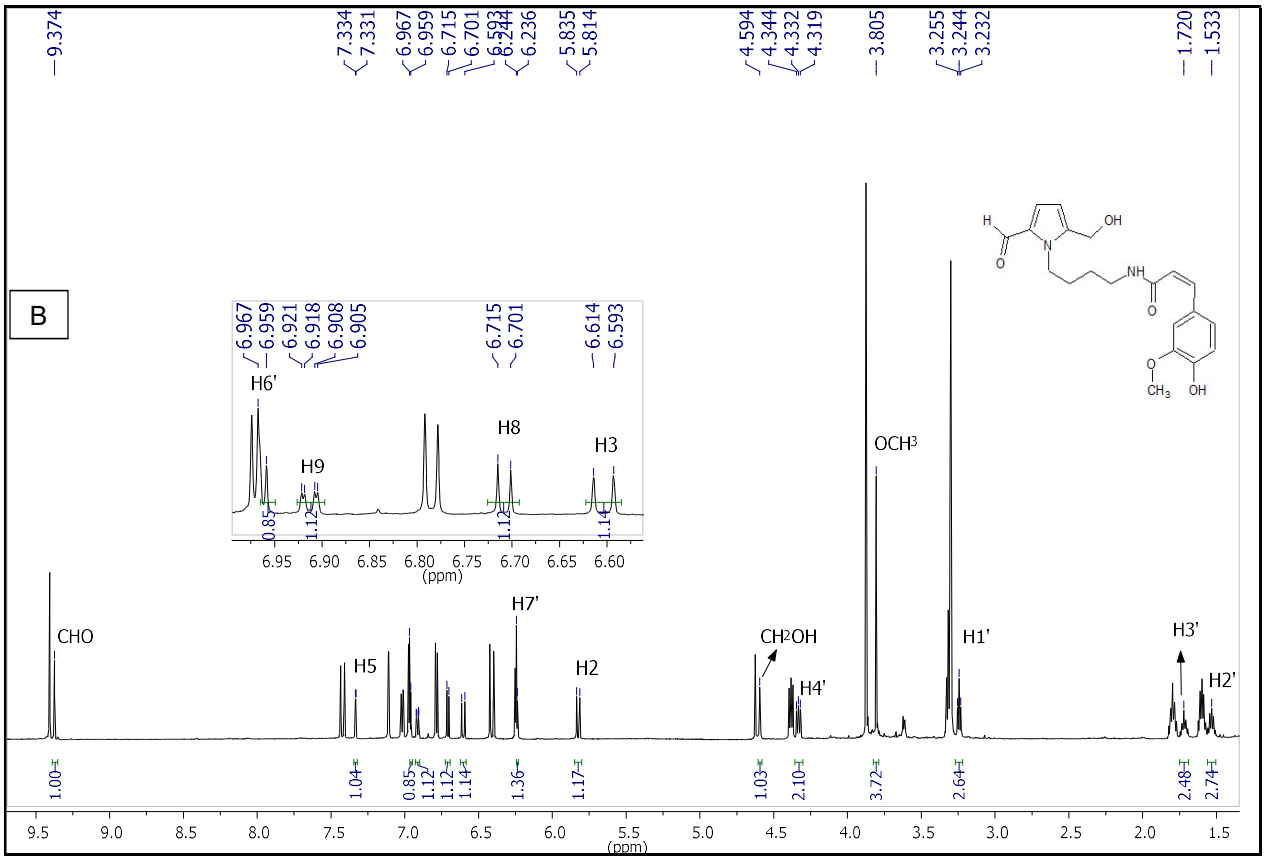


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da fração AB-13, destacando os sinais do isômero minoritário AB-13b: magnolamida b.

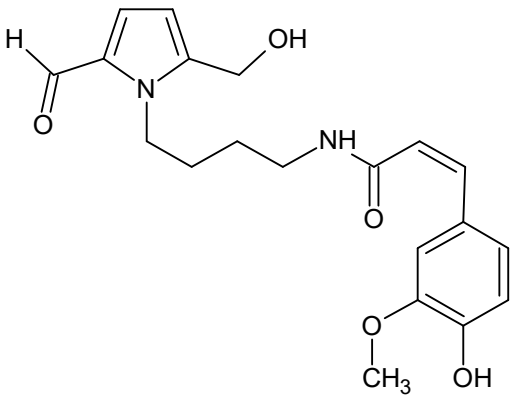


Figura 67. Estrutura molecular de AB-13b: magnolamida b.

Tabela 14. Comparação de dados de RMN de ^{1}H (600 MHz, CD_3OD) para os isômeros *trans* (AB-13a) e *cis* (AB-13b) da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1*H*-pirrol-1-il)butil]ferulamida

H	AB-13b (isômero *cis*)	AB-13a (isômero *trans*)	Magnolamida# (isômero *trans*)	
	δ_H (mult.,*J*/Hz)	δ_H (mult.,*J*/Hz)	δ_H (mult., *J*/Hz)*	δ_H (mult., *J*/Hz)**
1'	3,24 (*t*, 7,0)	3,32 (*t*, 7,0)	3,30 (*t,* 7,2)	3,31 (*t*, 7,0)
2'	1,53 (*m*)	1,60 (*dt*, 14,5/7,2)	1,57 (*m*)	1,56-1,62 (*m*)
3'	1,72 (*m*)	1,80 (*m*)	1,78 (*m*)	1,76-1,82 (*m*)
4'	4,33 (*m*)	4,38 (*m*)	4,35 (*t*, 7,2)	4,38 (*t*,7,5)
6'	6,96 (*d,* 4,5)	6,97 (*d*, 4,1)	6,95 (*d*, 4,0)	6,96 (*d*, 4,0)
7'	6,24 (*d*, 4,5)	6,25 (*d*, 4,2)	6,23 (*d*, 4,0)	6,24 (*d*, 4,0)
2	5,82 (*d*, 12,6)	6,41 (*d*, 15,7)	6,41 (*d*, 15,7)	6,39 (*d*, 15,5)
3	6,60 (*d*, 12,6)	7,42 (*d*, 15,7)	7,42 (*d*, 15,7)	7,42 (*d*, 15,5)
5	7,33 (*d*, 1,9 Hz)	7,11 (*d*, 1,8)	7,08 (*d,* 2,0)	7,09 (*s*)
8	6,71 (*d,* 8,2)	6,78 (*d*, 8,1)	6,78 (*d*, 8,2)	6,77 (*d*, 8,5 Hz)
9	6,91 (*dd*, 8,2/1,9)	7,02 (*dd*, 8,2/1,8)	7,03 (*dd*, 8,2/2,0)	7,00 (*d*, 8,5)
CHO	9,37 (*s*)	9,41 (*s*)	9,38 (*s*)	9,40 (*s*)
CH_2OH	4,59 (*s*)	4,62 (*s*)	4,61 (*s*)	4,62 (*s*)
OCH_3	3,87 (*s*)	3,87 (*s*)	3,85 (*s*)	3,86 (*s*)

#Corresponde ao isômero *trans* da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1*H*-pirrol-1-il)butil]ferulamida (AB-13a).
* YU et al. (1998). Dados obtidos em CD_3OD, a 300 MHz.
** CHIOU et al. (2005). Dados obtidos em CD_3OD, a 500 MHz.

A partir da análise do espectro de DEPTq (Figura 70), dos mapas de contornos HSQC (Figura 71) e HMBC (Figura 72) da mistura de isômeros foi possível atribuir 20 sinais para AB-13a, sendo 10 sinais referentes aos carbonos da porção *trans*-feruloíla em δ 126,85; 110,13; 147,88; 143,08; 115,06; 121,78 referentes aos carbonos do anel aromático, o sinal em δ 54,96 referente ao carbono da metoxila ligada ao anel; δ sinal em 167,79 referente ao carbono carbonílico e os sinais em δ 117,31 e 140,65 referentes aos carbonos do grupo vinil; um sinal em δ 179,53 referente ao carbono do grupo CHO; quatro sinais em δ 132,07, 125,01, 110,08, 143,08 referentes aos carbonos do anel pirrólico; quatro sinais de carbonos metilênicos formando ligação simples em δ 38,60, 28,42; 26,28 e 44,89; um sinal em δ 55,07 referente ao carbono do grupo CH_2OH.

Para AB-13b também foram atribuídos 20 sinais: 10 sinais referentes aos carbonos da porção *cis*-feruloíla em δ 112,3; 147,8; 143,1; 114,5 e 123,6 referentes aos carbonos do anel aromático; δ sinal em 169,05 referente ao carbono carbonílico e os sinais em δ 120,3 e 136,7 referentes aos carbonos do grupo vinil; Um sinal em δ 179,50 referente ao carbono do grupo CHO; quatro sinais em δ 132,0; 124,0; 109,8 e 143,00 referentes aos carbonos do anel pirrólico; quatro sinais de carbonos metilênicos formando ligação simples em δ

38,29; 28,20; 25,7 e 44,50; um sinal em δ 54,8 referente ao carbono do grupo CH_2OH. As atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C do isômero *trans* (AB-13a) também foi comparada com dados da literatura da magnolamida (YU et al., 1998; CHIOU et al., 2005), os quais são apresentados na Tabela 15, juntamente com os dados do isômero *cis* (AB-13b).

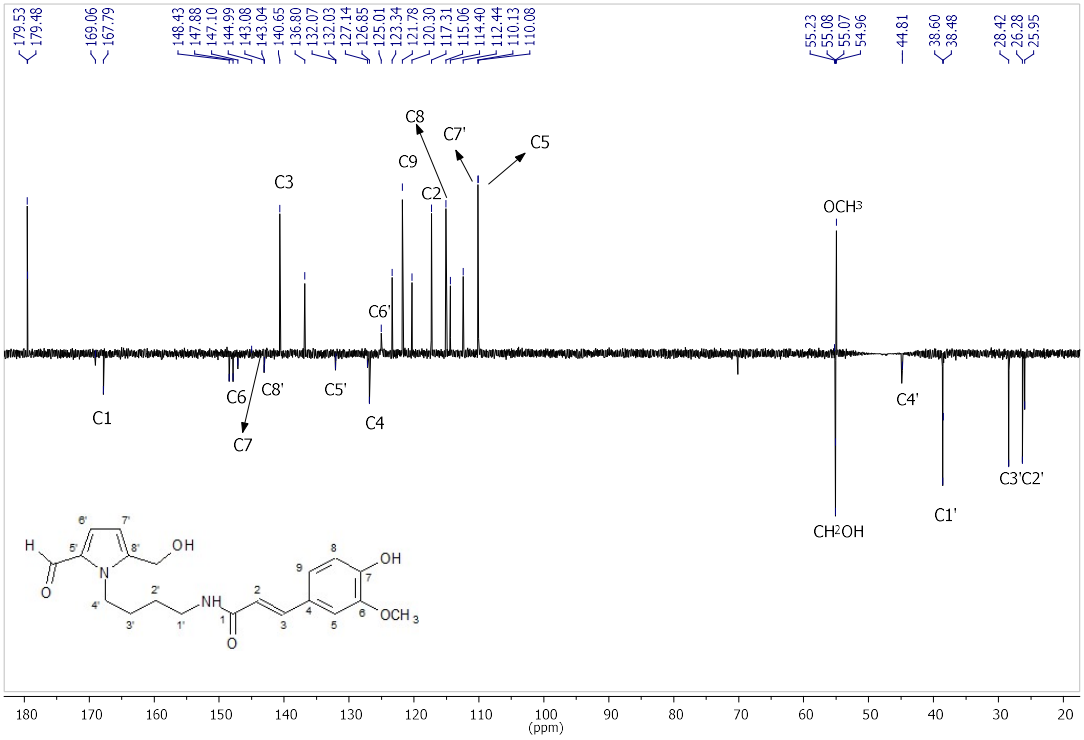


Figura 68. Espectro de DEPTq da fração AB-13, destacando os sinais do isômero majoritário AB-13a: magnolamida.

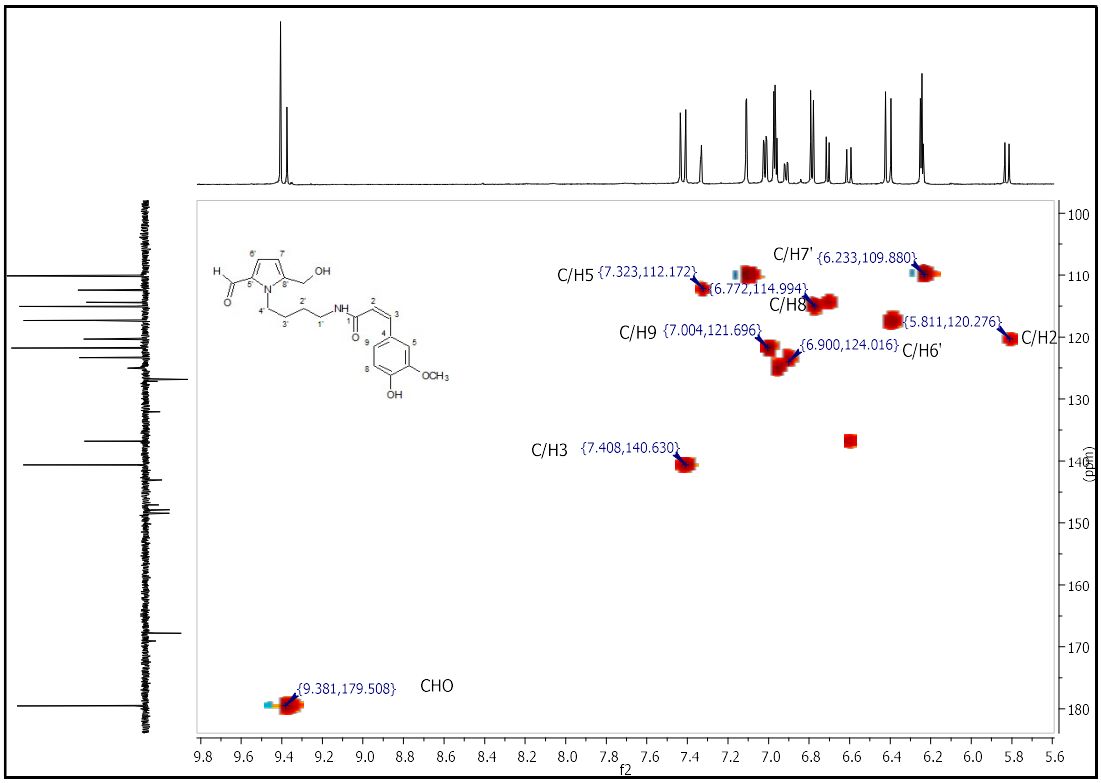


Figura 69. Mapa de contornos HSQC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{2} destacando os sinais do isômero minoritário AB-13b: magnolamida b.

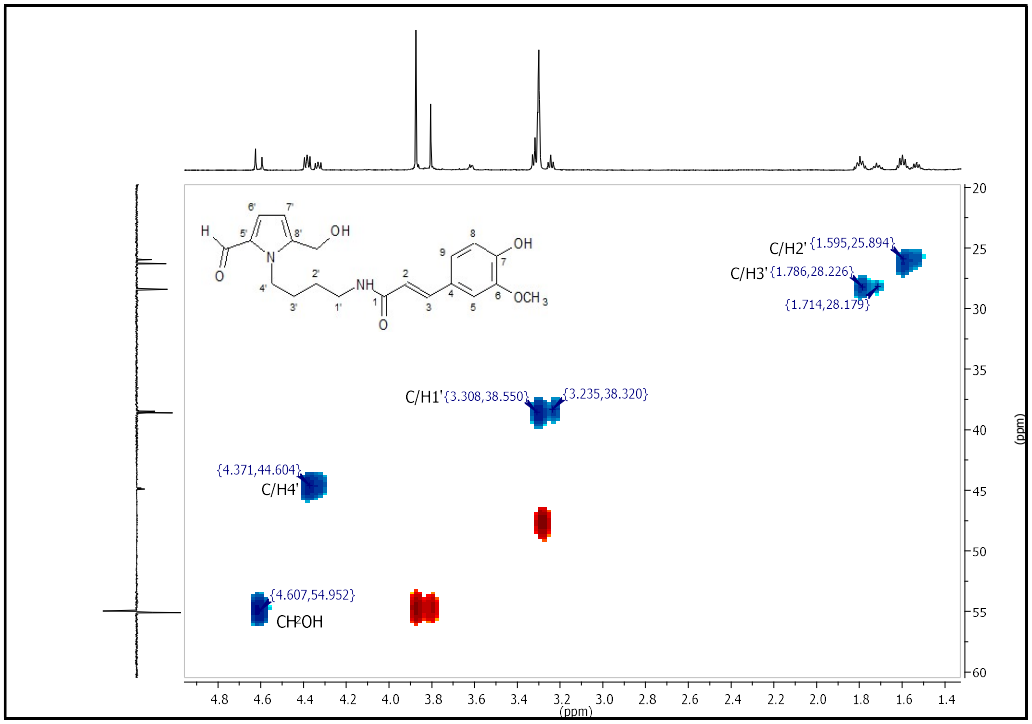


Figura 70. Mapa de contornos HSQC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{3}, destacando os sinais do isômero majoritário AB-13a: magnolamida.

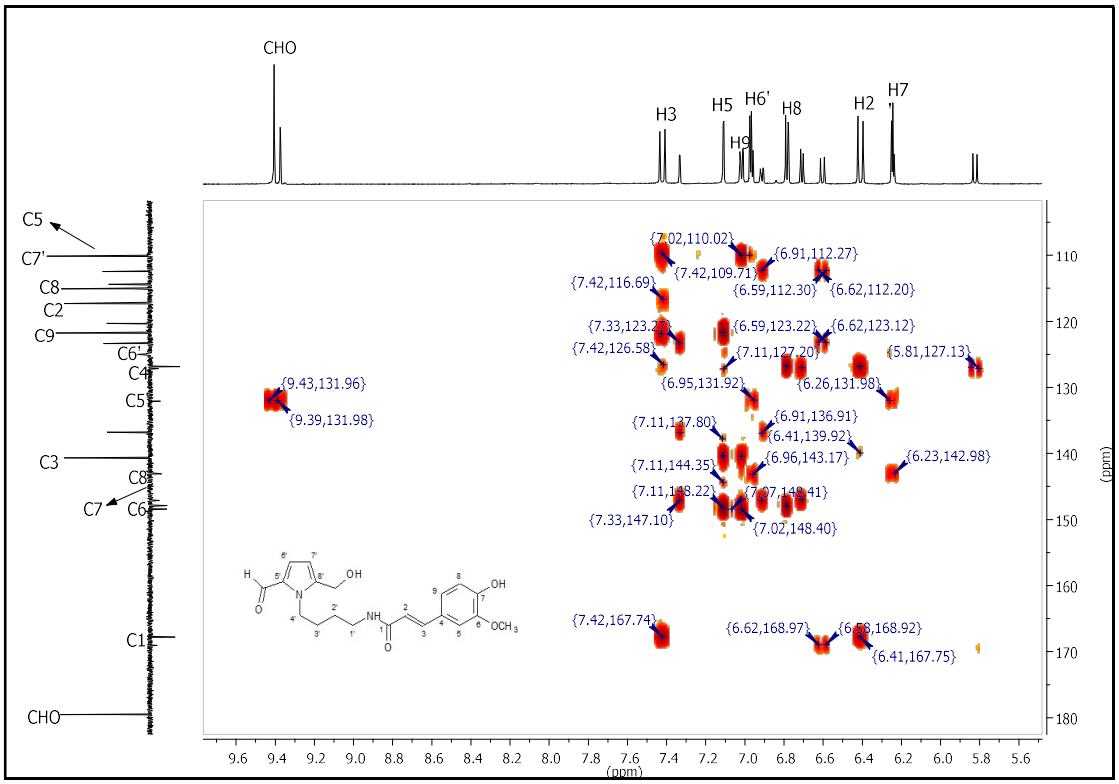


Figura 71. Mapa de contornos HMBC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{2}.

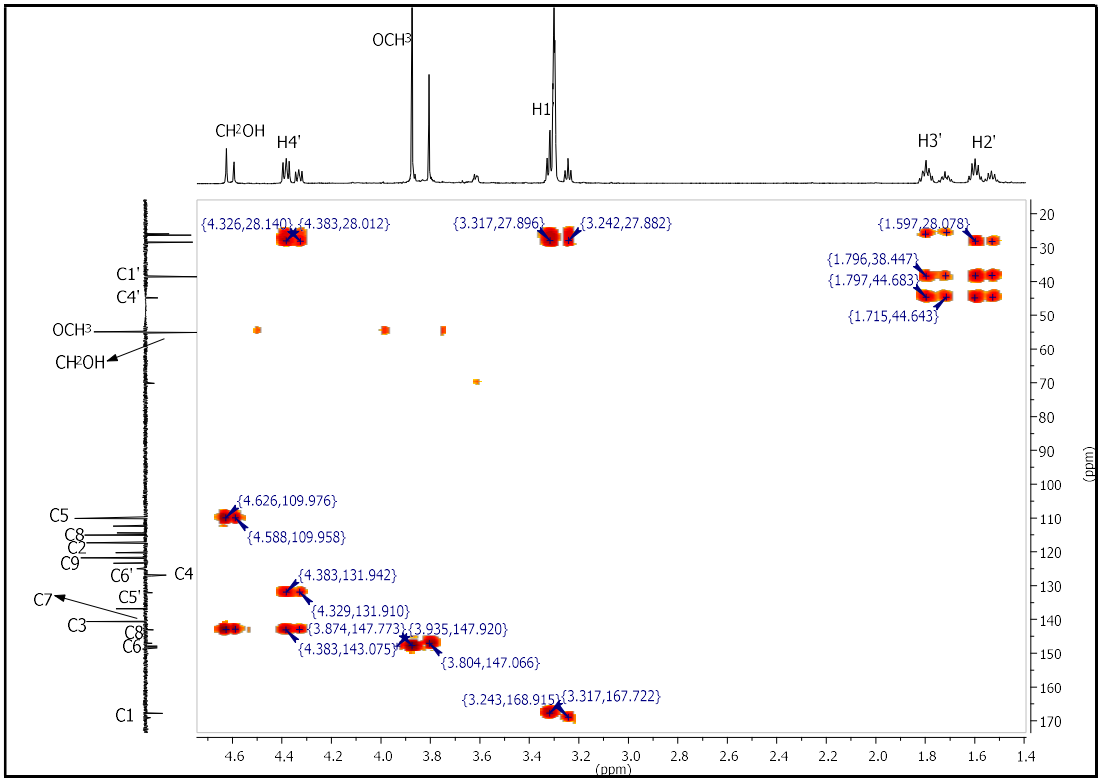


Figura 72. Mapa de contornos HMBC: região dos hidrogênios ligados a carbono *sp*^{3}.

Tabela 15. Comparação de dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) para os isômeros *trans* (AB-13a) e *cis* (AB-13b) da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1*H*-pirrol-1-il)butil]ferulamida

C	AB-13b (isômero *cis*)	AB-13a (isômero *trans*)	Magnolamida# (isômero *trans*)	
	δc	δ_C	δ_C *	δ_C **
1'	38,3	38,6	40,0	40,0
2'	25,7	26,3	27,6	27,7
3'	28,2	28,4	29,8	29,8
4'	44,5	44, 9	46,2	46,3
5'	132,0	132,1	133,4	133,5
6'	124,0	125,0	126,3	126,4
7'	109,8	110,1	111,6	111,5
8'	143,0	143,1	144,4	144,5
1	169,1	167,8	169,1	169,3
2	120,3	117,3	118,8	118,3
3	136,7	140,7	142,0	142,2
4	127,1	126,9	128,3	127,7
5	112,3	110,1	111,4	111,5
6	147,8	147,9	149,2	149,6
7	143,1	143,1	149,7	150,8
8	114,5	115,1	116,5	116,7
9	123,6	121, 8	123,1	123,4
CHO	179,5	179,5	180,8	180,9
CH_2OH	54,8	55,1	56,5	56,5
OCH_3	55,9	55,0	56,4	56,3

#Corresponde ao isômero *trans* da *N*-[4-(2-formil-5-hidroximetil-1*H*-pirrol-1-il)butil]ferulamida (AB-13a).
* YU et al. (1998). Dados obtidos em CD_3OD, a 75 MHz.
** CHIOU et al. (2005). Dados obtidos em CD_3OD, a 125 MHz.

Pode-se concluir que AB-13a (isômero majoritário) corresponde à magnolamida, isolada previamente de *Magnolia coco*, Magnoliaceae (YU et al., 1998), de *Alisma plantago-aquatica* subsp. orientale, Alismataceae (ZHAO et al., 2018) e de *Caulophyllum robustum*, Berberidaceae (QIN et al., 2019). Portanto, apesar de ter sido isolada de plantas pertencentes a outras famílias, este é o primeiro isolamento desta amida na família Rutaceae. Entretanto, AB-13b, um isômero *cis* da magnolamida, está sendo descrito pela primeira vez, seja como produto natural ou sintético.

5.2 Atividade leishmanicida

As amostras foram avaliadas em triplicata e os e os resultados do ensaio de atividade leishmanicida foram expressos como porcentagem da inibição do crescimento das formas amastigotas em relação aos controles sem amostra.

Para este ensaio, seriam consideradas ativas as amostras com porcentagem de inibição acima de 70%.

Portanto, os extratos das folhas e galhos e as substâncias isoladas de *A. bracteata*, respectivamente, não apresentaram atividade leishmanicida (Tabelas 16 e 17) contra *Leishmania amazonensis* (Leishmania), apesar de haver relatos na literatura da atividade leshmanicida apresentada por extratos e algumas substâncias isoladas de espécies do gênero, como *Galipea longiflora (*sin*. A. longiflora)* (Fournet et al., 1993; Fournet et al., 1994). Porém, entre os compostos isolados de *A. longiflora* ativos contra *L. amazonensis* destacam-se a chimanina D e a 2-n-propilquinolina, que são alcaloides quinolinicos substituídos na posição 2, por uma cadeia com três átomos de carbono. Segundo Fournet e col. (1993) a substituição do anel quinolínico na posição 4, pelo grupo metoxila (o que ocorre em AB-2 e AB-4) resulta em menor atividade antileishmania. Provavelmente, por esse fator, os compostos testados neste trabalho não exibiram atividade leishmanicida, o que torna importante a investigação de outros tipos de atividades biológicas que estes compostos possam apresentar.

Em relação a AB-11, não há nenhum relato na literatura sobre o estudo de suas atividades biológicas, já que trata-se de uma mistura rotamérica de uma amida (*N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida) isolada pela primeira vez como produto natural.

Quanto a AB-13 (magnolamida), não há relatos na literatura sobre determinação de sua atividade leishmanicida. No entanto, há um estudo que relata sua atividade anti-inflamatória ao inibir a produção de óxido nítrico (NO), produzido a partir de *L*-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), induzida por LPS (lipolissacarídeo) em células RAW 264.7 (ZHAO, et al., 2018). Estudos realizados por Chiou e col. (2005) mostraram que a magnolamida também apresenta atividade antioxidante semelhante ao resveratrol e probucol (antioxidantes de referência) pois ela inibe os efeitos da oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) induzida por $CuSO_4$.

Algumas amidas são conhecidas por apresentarem a inibição *in vitro* da biossíntese da enzima prostaglandina, atividade antioxidante e efeito inibitório contra agregação de plaquetas (CHIOU, et al., 2005), essas atividades já relatadas para certas amidas pode servir como base para futuras avaliações de

atividade biológica que AB-11 e AB-13 possam apresentar, já que ambas são amidas.

Tabela 16. Resultados do ensaio da atividade leishmanicida dos extratos das folhas (EFAB) e galhos (EGAB) de *Angostura bracteata.*

Extrato	Concentração	Resultado (%)
EGAB	200 µg/ml	34
EFAB	200 µg/ml	37

Tabela 17. Resultados do ensaio da atividade leishmanicida das substâncias isoladas de *Angostura bracteata*

Substância	Concentração	Resultado (%)
AB 2	200 µg/ml	28
AB 4	200 µg/ml	53
AB 11	200 µg/ml	55
AB 13	200 µg/ml	60

6.0 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos galhos de *Angostura bracteata* levou ao isolamento e identificação de substâncias com o perfil químico bastante diverso sendo composto, em sua maioria, por alcaloides quinolínicos, o que é muito comum em espécies do gênero *Angostura.* Entre os alcaloides isolados, destaca-se o 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipropilquinolina) e o 4-metoxi-2-(1'2'-*trans*-epoxipentilquinolina), pois na literatura não há publicações relativas a estas substâncias. Neste trabalho, destacam-se também, um mistura de isômeros rotaméricos da *N*-(4-hidroxifenetil)-*N*-metil-*trans*-ferulamida, isolada pela primeira vez como produto natural e a mistura de isômeros *cis* e *trans da* magnolamida*,* cujo isômero *cis* está sendo descrito pela primeira vez como produto natural, e o isômero *trans*, sendo encontrado pela primeira vez na família Rutaceae.

Com relação a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis,* não foi verificada atividade dos extratos, assim como, de nenhuma das substâncias testadas, o que torna

importante a realização de outros ensaios para verificar o potencial biológico destas substâncias, principalmente aquelas inéditas.

De forma geral, os resultados obtidos a partir do estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *A. bracteata* contribuem para o conhecimento e valorização da flora brasileira, em especial da família Rutaceae, já que são apresentadas informações relevantes e inéditas. Algumas perspectivas para este trabalho são a obtenção de uma maior quantidade dos compostos isolados e com um grau de pureza mais elevado, o estudo mais detalhado da fração metanólica, que se mostrou-se rica em alcaloides, mas que foi apenas parcialmente estudada e a realização de novos ensaios biológicos para os extratos e as substâncias obtidas, especialmente a atividade antimalárica, pois em um ensaio realizado com os extratos das folhas de *A. bracteata*, foi verificada atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária em seres humanos.

7.0 REFERÊNCIAS

ACHANTA, S.; LIAUTARD, V.; PAUGH, R. e ORGAN, M. G. The Development of a General Strategy for the Synthesis of Tyramine-Based Natural Products by Using Continuous Flow Techniques. **Chem. Eur. J.**, v. 16, p. 12797–12800, 2010.

ALICE, B.C.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. Metodologia de análise de Plantas. **Plantas medicinais de uso popular:** Atlas farmacognóstico. Canoas: Editora ULBRA, 1995, p. 11-19.

ANDRADE, M. R. **Alcaloides de Rutaceae: química e atividade biológica.** 2003. 216 f. Tese (Doutorado em química orgânica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

ARAÚJO, M. V.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, J. F. M.; SILVA, A. E.; SILVA, J.K.S.; SILVA, G. R.; SILVA, E. C. O.; SOUZA, S. T.; FONSECA, E. J. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. e ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Flavonoids induce cell

death in *Leishmania amazonensis*: in vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 144, p. 5232-5244, 2019.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDERD, T.; WAWROSCHA, C.; UHRINE, P.; TEMMLF, V.; WANGA, L.; SCHWAIGERB, S.; HEISSA, E. H.; ROLLINGERA, J. M.; SCHUSTERF, D.; BREUSSE, J. M.; BOCHKOVG, V.; MIHOVILOVICD, M.D.; KOPPA, B.; BAUERC, R.; DIRSCHA, V. M. E STUPPNERB, H.; Discovery and resupply of pharmacologically active plant derived natural products: A review. **Biotechnol Adv.,** v. 33, n. 8, p.1582–1614, 2015.

BRIESKORN, C. H.; BECK, V. Uber die Bitterstoffiz der Angusturarinde. **Phytochemstry,** Inglaterra**,** v. 10, p. 3205- 3211, 1971.

CALLAHAN, H.L.; PORTAL A.C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n.4, p. 818-822, 1997.

CALLA-MAGARIÑOS, J., GIMENEZ, A., TROYE-BLOMBERG, M., FERNANDEZ, C. An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as antileishmania agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-λ production in polyclonally activated cells. **Scand. J. Immunol**., v. 69, n.3, p.251-258, 2009.

CARON, S.; DESFOSSÉS, S.; DIONNE, R.; THÉBERGE, N. e BURNELL, R. H. Synthesis of some minor quinoline alkaloids found in *Galipea longiflora.* **Journal of Natural Products** v. 56, n. 1, p.138-139, 1993.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Embrapa Informação Tecnológica, Colombo- Embrapa Florestas, 1039 p., 2003.

CHANG, Y.; CHEN, C.; CHANG, F.; e WUB, Y. Alkaloids from *Lindera glauca.* **J. Chin. Chem. Soc.**, v. 48, n. 4, p. 811-815, 2001.

CHENG, J.; CHANG, T. K. e CHEN, I. Skimmianine and related furoquinolines function as antagonists of 5-hydroxytryptamine receptors in animals. **J. Auton. Pharmacol**. v. 14, p.365-374, 1994.

CHENG, M.; WUB, C.; TSAIA, I. e CHENA, I. Chemical and Antiplatelet Constituents from the Stem of *Zanthoxylum beecheyanum*. **J. Chin. Chem. Soc**., v. 51, n. 5A, p. 1065-1072, 2004.

CHIOU, W.; SHEN, C.; YU, H.; CHIANG, C.; CHEN, C.; CHANG, W. e DON, M. Total synthesis and antioxidative activity of magnolamide from *Magnolia coco.* **Heterocycles**, v. 65, n.5, p. 1215-1220, 2005.

DEWICK, P.M. **Medicinal Nature Products**: A biosynthetic approach. 3. ed. Chichester: John Wiley e Sons Ltd. p. 359-365, 2002.

DONG, Y. e LE QUESNE, P. W. Total synthesis of magnolamide. **Heterocycles**, v. 56, p. 221-225, 2002.

FOURNET, A.; VAGNEUR, B.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. **Can. J. Chem.**, Canadá, v. 67, p. 2116-2118,1989.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BRUNETON, J. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 859-863, 1993a.

FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P.; e BRUNETON, J. Les chimanines, nouvelles quinoleines substituees en 2, isolees d’une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. **Journal of Natural Products**. v. 56, n. 9, p. 1547-1552, 1993b.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A., MUNOZ, V., HOCQUEMILLER, R., ROBLOT, F., CAVE, A., RICHOMME, P., BRUNETON, J. Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment

for Cutaneous Leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v. 8, n.3, p. 174-178. 1994.

FUKUDA, N.; YONEMITSU, M.; KIMURA, T. Studies on the Constituents of the Stems of *Tinospora tuberculata* BEUMÉE. I. N-*trans*- and N-*cis*-Feruloyl Tyramine, and a new Phenolic Glucoside, Tinotuberide. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 1, p. 156-161, 1983.

GAJBHIYE, N. A.; MAKASANA, J. e THORAT, T. Simultaneous Determination of Marmin, Skimmianine, Umbelliferone, Psoralene, and Imperatorin in the Root Bark of Aegle marmelos by High-Performance Thin-Layer Chromatography. **Journal of Planar Chromatography**, v. 25, n. 4, p.306-313, 2012.

GALLAGE, N. J.; JORGENSEN, K.; JANFELT, C.; NIELSEN, A. J. Z.; NAAKE, T.; DUNSKI, E.; DALSTEN, L.; GRISONI, M.; MOLLER, B. L. The Intracellular Localization of the Vanillin Biosynthetic Machinery in Pods of *Vanilla planifolia.* **Plant Cell Physiol**., v. 59, n. 2, p. 304–318, 2018.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R.; SALATINO, M. L. F.; BLANCO, S. R.; KALLUNKI, J. A.; Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**. v. 95, n. 8, p. 985–1005, 2008.

HOUGHTON, P.J.; WOLDEMARIAM, T.Z.; WATANAB, Y.; YATES, M. Activity against Mycobacterium tuberculosis of alkaloid constituents of Angostura bark, *Galipea officinalis*. **Planta Med.,** v. 65, n. 3, p. 250-254,1999.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potential of Brazilian native plants for the development of phytomedicines having *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) as example. **Saúde, Santa Maria**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHE, S.; FABRE, N.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C. Two tetrahydroquinoline alkaloids from *Galipea officinalis.* **Phytochemistry,** v. 51, p. 1167-1169, 1999.

JACQUEMOND-COLLET, I.; BESSIÉRE, J.; HANNEDOUCHE, S.; BERTRAND, C.; FOURASTÉ, I.; MOULIS, C. Identification of the Alkaloids of *Galipea officinalis* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Phytochem. Anal.** v. 12, p. 312–319, 2001.

JACQUEMOND-COLLET, I.; BENOIT-VICAL, F.; VALENTIN, A.; STANISLAS, E.; MALLIÉ, M. e FOURASTÉ, I. Antiplasmodial and cytotoxic activity of galipinine and other tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. **Planta Med.**, Nova York, v. 68, p. 68-69, 2002.

JACKSON, G., E.; CAMPBELL, W., E.; DAVIDOWITZ, B. Two Dimensional NMR Study of 8-Methoxyflindersine, Skimmianine and Monocrotaline. **Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication**, v. 23, n. 8, p. 971-982, 1990.

JAGADEESH, S. G.; KRUPADANAM, G. L. D. e SRIMANNARAYANA, G. Antifeedant activity of the constituents of *Evodia lunu-ankenda*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 39B, p. 475-476, 2000.

KALLUNKI, J.; A. A new species of *Galipea* (Rutaceae) from Nicarágua and Costa Rica. **Brittonia,** v. 40, n. 3, p. 241-244, 1988.

KALLUNKI, J. A; PIRANI, J. R; Synopses of Angostura Roem. & Schult. and Conchocarpus J. C. Mikan (Rutaceae). **Kew Bulletin**, v. 53., n. 2, p. 257-334, 1998.

LÓPEZ, J. A; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; MARTIN, G. E.; LIN, F.; AL-REHAILY, A. J.; ZEMAITIS, M. A; SCHIFF JR, P. L. Granulosin, a New Chromone from *Galipea granulosa.* **J. Nat. Prod***.,* v. 60, n. 1, p. 24–26, 1997.

LÓPEZ, J. A; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; MARTIN, G. E.; LIN, F.; AL-REHAILY, A. J.; ZEMAITIS, M. A; SCHIFF JR, P. L. Galiposin: a new beta-hydroxychalcone from *Galipea granulosa*. **Planta Med**., v. 64, n. 1, p. 76-77, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2001.

MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBÊLO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. e COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2006.

MIRANDA, M. L. D.; SOUZA, A. F.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, F. R. e GARCEZ, W. S. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* harms (leguminosae). **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1306-1311, 2012.

MUÑOZ, O.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.; HELLWING, V. e BREITMAIER, E. Tropane alkaloids from *Schizanthus litoralis.* **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 709-713, 1996.

NAKAYAMA, H.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; BILBAO, N. V.; TORRES, S.; SCHININI, A. e FOURNET, A. Experimental Treatment of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice with 2-n-Propylquinoline. **Phytother. Res**., v. 15, p. 630–632, 2001.

OKWEMBA, R. I.; TARUS, P. K.; MACHOCHO, A. K.; WANYONYI, A. W.; WAWERU, I. M.; ONYANCHA, J. M.; ONANI, M. O. e AMUKA, O. Isolation, characterization and biological activity of organic extractives from *Calodendrum capense* (L.f.) Thunb.(Rutaceae). **J. Med. Plants Res.,** v. 12, n. 33, p. 139-163, 2018.

PUSSET, J.; LOPEZ, J. L.; PAIS, M.; NEIRABEYEH, M. A.; VEILLON, JM. Isolation and 2D NMR Studies of Alkaloids from *Comptonella sessilfoliola*. **Planta Med**., v. 57, 1991.

QIN, B.; QIAO, Y.; LIU, X. Q.; HAN, H. e JING, W. A new phenolic compound with anti-inflammation activity from *Caulophyllum robustum*. **Chemistry of Natural Compounds.** v. 55, n. 3, p. 465–468, 2019.

RAKOTOSON, J. H.; FABRE, N.; JACQUEMOND-COLLET, I.; HANNEDOUCHES, S.; FOURASTÉ, I. E MOULIS, C. Alkaloids from *Galipea officinalis*. **Planta Med**., v. 64, p. 762-763, 1998.

RATNAYAKE, W. M. K. M. SURESH, T. S. ABEYSEKERA, A. M. SALIM, N. CHANDRIKA, U. G. Acute anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of crude extracts, alkaloid fraction and evolitrine from *Acronychia pedunculata* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 238, n. 28, 2019 (no prelo) .

RATHEESH, L. M.; SINDHU, G. e HELEN, A. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. **Inflamm. Res.,** v. 62, n. 4, p. 367-376, 2013.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. MACÊDO, R.O. e BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** v. 12, p. 514–535, 2003.

Rutaceae in **Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB212>. Acesso em: 14 de Jul. 2019.

SAVI, D. C; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Med**., New York, v. 85, p. 619–636, 2019.

SERENO, D.; LEMESTRE, J.L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 972-976, 1997.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES, J. A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis** v. 16, n. 3, p. 402-413, Botucatu, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., p. 206, 1994.

TEIXEIRA, M.J.S.R.; SAMPAIO R.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; SANTOS, W.L. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania species*. **Parasitology Research,** v. 88, p. 963-968, 2002.

VERA-IZAGUIRRE, D.; VEGA-MEMIJE, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.; ARENAS, R. Leishmaniasis revisión. ***DCMQ***., v. 4, n. 4, p. 252–260, 2006.

VIEIRA, P. C. e KUBO, I. Molluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 813-815, 1990.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION): **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases**, 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION): **Clinical forms of the leishmaniases,** 2019. Disponivel em: <https://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniases/en/> Acesso em 26 de Set. 2019.

YANG, Z.; ZHANG, D.; REN, J.; YANG, M. Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. **Med Chem Res**, v .21, p. 722–725, 2012.

YU, H.; CHEN, C.; SHIEH, B. Two New Constituents from the Leaves of *Magnolia coco*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p.1017-1019, 1998.

ZHAO, X.; WANG, G.; WANG, Y.; TIAN, X.; ZHAO, J.; HUO, X.; SUN, C.; FENG, L.; NING, J.; WANG, C.; ZHANG, B.; WANG, X. Chemical constituents from *Alisma plantago-aquatica* subsp. *orientale* (Sam.) Sam and their anti-inflammatory and antioxidant activities. **Natural Products Research,** v. 32, p. 2749-2745, 2018.