

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESTUDO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E DE INIBIÇÃO DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE DAS ESPÉCIES *ZANTHOXYLUM RHOIFOLIUM*
E *ZANTHOXYLUM HYEMALE***

GRACIANE ZANON

PPGQ

SANTA MARIA, RS, 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Análise Fitoquímica e Estudo das Atividades Antimicrobiana,
Antioxidante e de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase das espécies
Zanthoxylum rhoifolium e *Zanthoxylum hyemale*.

por

Graciane Zanon

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de

Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
APROVA a Dissertação de Mestrado

Análise Fitoquímica e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e de
Inibição da Enzima Acetilcolinesterase das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e
Zanthoxylum hyemale.

elaborada por
Graciane Zanon

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

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel - Orientador - UFSM

Prof. Dr^a Ionara Irion Dalcol - UFSM

Prof. Dr^a Graciela Maldaner - URCAMP

Santa Maria - RS, outubro de 2010.

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

**A mãe Rosa pelo amor, incentivo e
exemplo de persistência e dignidade.**

**As minhas irmãs Juliane, Luciane, Rosiane, Liliane
e ao meu irmão Eliandro pelo carinho.**

**Aos meus sobrinho Giordana e João Felipe
pelos momentos de alegria.**

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Ademir Farias Morel pela orientação e amizade.

Professoras Dr^a. Ionara I. Dalcol e Dr^a Graciela Maldaner pela participação e colaboração como banca examinadora.

Dr. Ubiratam Flores da Silva pela colaboração no processo de qualificação.

Aos colegas de NPPN Marcelo Pedroso, Vinicius Ilha e Caroline Stuker pelo auxílio no decorrer deste anos de convivência.

Michele Mantelli Schimdt, aluna de Iniciação Científica pela ajuda e dedicação, principalmente nos últimos meses deste trabalho.

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

Alessandra, Patrícia, Tanize, Karine, Janice, Nalin, Augusto e Felipe, colegas de laboratório pela amizade.

A vizinha, colega e amiga Susiane, que sempre esteve disposta a ajudar, orientar e descontraír. Ao João Lindolfo pelo auxílio.

As amigas Joviana, Mariele, Mara e Pamela pela convivência.

RESUMO

Análise Fitoquímica e Estudo das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*.

AUTORA: Graciane Zanon

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

O presente estudo foi proposto para avaliar a atividade biológica da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*. O extrato metanólico neutro e as frações deste extrato, as frações básicas obtidas após extração ácido-base do extrato metanólico e os compostos puros isolados dessas frações, foram avaliados *in vitro* quanto a atividade antimicrobiana, potencial antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase. Da fração diclorometânica de *Zanthoxylum rhoifolium* foram isolados três alcalóides furoquinolínicos: skimianina, 8-hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico e γ -fagarina, quatro alcalóides benzofenantridínicos: diidrocheleritrina, diidroavicina, zantoxilina e cheleritrina. Da fração hexânica foram isolados a lignana sesamina e o triterpeno lupeol. A partir do extrato metanólico neutro foi isolado o alcalóide aporfínico magnoflorina. A concentração inibitória mínima de cheleritrina (CIM = 1,50 $\mu\text{g/ml}$) para todas as bactérias testadas, e entre 3,12 e 12,5 $\mu\text{g/ml}$ para as leveduras testadas, mostraram que este alcalóide possui uma excelente atividade antimicrobiana em comparação ao cloranfenicol (entre 3,5-6,25 $\mu\text{g/ml}$ para as bactérias) e nistatina (entre 5,5-10,3 $\mu\text{g/ml}$ para as leveduras). O estudo evidenciou a atividade antimicrobiana da casca do caule de *Z. rhoifolium*. Esta atividade é, provavelmente,

devido ao seu alto nível de alcalóides benzofenantridínicos. Os alcalóides furoquinolínicos, mostraram pequena atividade antimicrobiana e foram os mais ativos frente a enzima AChE. Além disso, neste trabalho, a amida tembamida foi isolada da casca do caule de *Zanthoxylum hyemale* e seus derivados utilizados para uma análise de relação estrutura-atividade.

Palavras-chave: *Zanthoxylum rhoifolium*, *Zanthoxylum hyemale*, alcalóides furoquinolínicos e benzofenantridínicos, atividades biológicas, atividade antioxidante.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SANTA MARIA, OUTUBRO - 2010.

ABSTRACT

Phytochemical analysis and antimicrobial activity, antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activity study of species *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum hyemale*

AUTHOR: Graciane Zanon

ACADEMIC ADVISOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

The present study was designed to evaluate the biological activity from the stem bark of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum hyemale*. The neutral methanol extract and fractions of this extract, the basic fractions that were obtained after acid-basic extraction from the methanolic extract, and pure compounds isolated from these fraction, were investigated *in vitro* for antimicrobial activity, antioxidant potential and for acetylcholinesterase inhibition. From the dichlorometane fraction of *Zanthoxylum rhoifolium* were isolated three furoquinoline alkaloids: skimianine, 8-hidroxy-4,7-dimetoxi-furoquinoline, and γ -fagarin, four benzophenantridine alkaloids: dihydrocheleritrine, dihydroavicine, zanthoxyline and cheleritrine. From the hexane fraction, the lignanes sesamine and lupeol were also isolated. From the neutral methanol extract were isolates de aporfinic alkaloid magnoflorine. The minimal inhibitory concentration of cheleritrine (MIC =1.50 $\mu\text{g/ml}$) for all tested bacteria, and between 3.12 and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ for the tested yeasts, showed this alkaloid have a excellent antimicrobial activity compared to chloramphenicol (between 3.5 to 6.25 $\mu\text{g/m}$ for bacteria) and nistatin (between 5.5 to 10.3 $\mu\text{g/ml}$ for yeasts). The study highlighted the antimicrobial activity of *Z. rhoifolium* stem bark. This activity is probably due their higher

benzophenanthridinic alkaloids level. The furoquinoline alkaloids, despite their insignificant antimicrobial activity, were the most active against the enzyme AChE. In addition, in this work, the amide tembamide was isolated from the steam bark of *Zanthoxylum hyemale*, and their derivatives used for a structure-activity analysis.

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium*, *Zanthoxylum hyemale*, furoquinoline and benzophenanthridine alkaloids, biological activities, antioxidant potential.

FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA MARIA
POST-GRADUATE COURSE IN CHEMISTRY
MASTER DISSERTATION IN CHEMISTRY
SANTA MARIA, OCTOBER – 2010.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS	7
2.1 Geral	7
2.2 Específicos.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. Descrição da Planta	9
3.1.1. A Família Rutaceae.....	9
3.1.2. O Gênero <i>Zanthoxylum</i>	9
3.1.3. A espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	9
3.1.4. A espécie <i>Zanthoxylum hyemale</i>	11
3.2. A Química da Família Rutaceae.....	12
3.3. Atividades Farmacológicas.....	22
3.3.1. Atividade Antioxidante.....	25
3.3.2. Atividade Antimicrobiana.....	27
3.3.3. Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase	28

3.3.3.1. A Doença de Alzheimer.....	28
3.3.3.2. Ação Inseticida.....	31
4. EXPERIMENTAL.....	34
4.1. Especificação dos materiais e instrumentos utilizados.....	34
4.1.1. Materiais e métodos cromatográficos.....	34
4.1.2. Reagentes e solventes utilizados	34
4.1.3. Aparelhos utilizados.....	34
4.2. Preparação do Material Vegetal e dos Extratos	35
4.3. Particionamento do Extrato Bruto	37
4.4. Análise Cromatográfica das Frações Obtidas	40
4.4.1. Fração Hexânica obtida do particionamento do extrato bruto metanólico frio de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	41
4.4.1.1. Compostos isolados e identificados da Fração Hexânica de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	43
4.4.1.1.1. Lupeol (33)	43
4.4.1.1.2. Sesamina (58)	44
4.4.2. Fração Diclorometânica obtida do particionamento do extrato bruto metanólico frio de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	45
4.4.2.1. Compostos isolados e identificados da Fração Diclorometânica de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	46
4.4.2.1.1. Skimianina (8)	46
4.4.2.1.2. 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (59).....	47
4.4.2.1.3. γ -Fagarina (53).....	48
4.4.2.1.4. Zantoxilina (60)	49

4.4.2.1.5. Diidrocheleritrina (50)	50
4.4.2.1.6. Diidroavicina (61)	51
4.4.2.1.7. Cheleritrina (20)	52
4.4.3. Precipitado do extrato bruto metanólico quente de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	53
4.4.3.1. Composto isolado e identificado do precipitado do extrato bruto metanólico quente de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	54
4.4.3.1.1. Magnoflorina (62).....	54
4.5. Estudo Bio-guiado de <i>Zanthoxylum hyemale</i>	55
4.5.1. Fração Diclorometânica obtida do particionamento de extrato bruto metanólico frio de <i>Zanthoxylum hyemale</i>	56
4.5.1.1. Composto isolado e identificado da Fração Diclorometânica de <i>Zanthoxylum</i> <i>hyemale</i>	57
4.5.1.1.1. Tembamida (63).....	57
4.6. Derivatização da amida Tembamida	58
4.6.1. Acetilação	58
4.6.2. Oxidação.....	60
4.6.3. Benzilação	61
4.6.3.1. Com utilização de Brometo de Benzil.....	61
4.6.3.2. Com utilização de Brometo de 3-nitrobenzil.....	62
4.6.3.3. Com utilização de Brometo de 4-bromobenzil.....	63
4.7. Determinação da Atividade Antioxidante	64
4.7.1. Método do Radical Livre – Ensaio Qualitativo.....	64
4.7.2. Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo.....	65
4.8. Ensaio Biológicos	66

4.8.1. Determinação da Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.....	66
4.8.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo Método da Microdiluição em Caldo.....	68
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	72
5.1. Rendimentos dos Extratos e Frações.....	76
5.1.1. Comparação dos métodos de extração e fracionamento realizado com a espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	79
5.2. Compostos isolados de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> : Fração Hexânica	81
5.2.1. Lupeol (33).....	81
5.2.2. Sesamina (58).....	82
5.3. Compostos isolados de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> : Fração Diclorometânica	84
5.3.1. Skimianina (8).....	84
5.3.2. γ -Fagarina (53).....	87
5.3.3. 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (59)	89
5.3.4. Zantoxilina (60).....	93
5.3.5. Diidrocheleritrina (50).....	96
5.3.6. Cheleritrina (20).....	99
5.3.7. Diidroavicina (61).....	100
5.4. Compostos isolados de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> : precipitado do extrato bruto metanólico quente.....	102
5.4.1. Magnoflorina (62).....	102
5.5. Composto isolado de <i>Z. hyemale</i> : Fração Diclorometânica	104
5.5.1. Tembamida (63).....	104
5.6. Produtos da Derivatização de Tembamida.....	107
5.6.1. 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (64).....	107

5.6.2. N-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida (65).....	110
5.6.3. N-(2-(benziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (66).....	112
5.6.4. N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (67).....	115
5.6.5. N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (68).....	117
5.7. Avaliação da Atividade Antioxidante	119
5.8. Ensaio Biológico.....	128
5.8.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	128
5.8.2. Avaliação da Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.....	134
6. CONCLUSÃO	139
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Separação em CC da fração hexânica obtida do extrato bruto metanólico frio da espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	41
Tabela 2.	Separação em CC da Sbfração II-12	42
Tabela 3.	Separação por CC da fração diclorometânica obtida do extrato bruto metanólico frio da espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	45
Tabela 4.	Separação por CC da fração diclorometânica obtida do extrato bruto metanólico frio de <i>Zanthoxylum hyemale</i>	56
Tabela 5.	Numeração, estrutura e nomenclatura dos compostos identificados.....	73
Tabela 6.	Rendimento das frações obtidas com o fracionamento do extrato bruto metanólico frio de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	77
Tabela 7.	Rendimentos das frações obtidas com o fracionamento neutro do extrato metanólico quente de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	77
Tabela 8.	Rendimento das frações obtidas com o fracionamento ácido/base do extrato bruto metanólico quente de <i>Z. rhoifolium</i>	78
Tabela 9.	Rendimento das frações obtidas com o fracionamento do extrato bruto metanólico frio de <i>Zanthoxylum hyemale</i>	79
Tabela 10.	Resultado da atividade antioxidante através de “screening” de extratos e frações das espécies <i>Zanthoxylum hyemale</i> e <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	120
Tabela 11.	Resultado da atividade antioxidante (“screening”) dos compostos isolados.....	121
Tabela 12.	Dados de atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	122

Tabela 13.	Dados de atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a quente da espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	122
Tabela 14.	Dados de atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie <i>Zanthoxylum hyemale</i>	126
Tabela 15.	Concentração Inibitória Mínima para os extratos e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	129
Tabela 16.	Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para os extratos e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	130
Tabela 17.	Concentração Inibitória Mínima para os extratos e frações de <i>Zanthoxylum hyemale</i>	131
Tabela 18.	Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para os extratos e frações de <i>Zanthoxylum hyemale</i>	131
Tabela 19.	Concentração Inibitória Mínima para os compostos isolados e/ou sintetizados das espécies <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> e <i>Zanthoxylum hyemale</i>	132
Tabela 20.	Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para os compostos isolados e/ou sintetizados das espécies <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> e <i>Zanthoxylum hyemale</i>	132
Tabela 21.	Valores de pMIQ observados para as substâncias puras através do teste de inibição da AChE com reagente Sal de Fast Blue B.....	135
Tabela 22.	Resultado da Atividade de Inibição da AChE para os extratos e frações das espécies <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> e <i>Zanthoxylum hyemale</i>	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo Bioossintético dos metabólitos secundários	4
Figura 2.	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	10
Figura 3.	<i>Zanthoxylum hyemale</i>	11
Figura 4.	Principais esqueletos carbônicos dos alcalóides das Rutaceas.....	13
Figura 5.	Visão do sítio ativo da Enzima Acetilcolinesterase e dos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica de ação	30
Figura 6.	Docking mostrando a interação entre o sítio ativo da AChE e o Inibidor Rivastigmina	30
Figura 7.	Redução do DPPH.....	65
Figura 8.	Reação do teste colorimétrico para revelação dos inibidores da AChE.....	68
Figura 9.	Placa em CCD comparando os extratos brutos quente (Q) e frio (F), reveladas em luz UV.....	80
Figura 10.	Espectro de RMN de ¹ H de Lupeol (33) em CDCl ₃ a 200MHz.....	81
Figura 11.	Espectro de RMN de ¹ H de Sesamina (58) em CDCl ₃ a 200MHz.....	83
Figura 12.	Espectro de RMN de ¹³ C de Sesamina (58) em CDCl ₃ a 50MHz.....	84
Figura 13.	Espectro de RMN de ¹ H de Skimianina (8) em CDCl ₃ a 200MHz.....	85
Figura 14.	Espectro de RMN COSY de Skimianina (8) em CDCl ₃ a 400MHz.....	86
Figura 15.	Espectro de RMN de ¹³ C de Skimianina (8) em CDCl ₃ a 50MHz.....	87
Figura 16.	Espectro de RMN de ¹ H de γ-Fagarina (53) em CDCl ₃ a 200MHz.....	88
Figura 17.	Espectro de RMN de ¹³ C de γ-Fagarina (53) em CDCl ₃ a 50MHz.....	89
Figura 18.	Espectro de RMN de ¹ H de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (59) em CDCl ₃ a 400MHz.....	90

Figura 19.	Espectro 2D COSY de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (59) em CDCl ₃ a 400MHz.....	91
Figura 20.	Espectro de RMN de ¹³ C de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico em CDCl ₃ a 100MHz	92
Figura 21.	Espectro DEPT 135 de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (59) em CDCl ₃ a 100MHz.....	93
Figura 22.	Espectro de RMN de ¹ H de Zantoxilina (60) em DMSO a 400MHz.....	94
Figura 23.	Espectro de RMN de ¹³ C de Zantoxilina (60) em DMSO a 100MHz.....	95
Figura 24.	Espectro expandido de RMN de ¹³ C de Zantoxilina (60) em DMSO a 100MHz.....	95
Figura 25.	Espectro de RMN de ¹ H de Diidrocheleritrina (50) em CDCl ₃ a 200MHz.....	97
Figura 26.	Espectro de RMN de ¹³ C de Diidrocheleritrina (50) em CDCl ₃ a 50MHz.....	98
Figura 27.	Espectro expandido de RMN de ¹³ C de Diidrocheleritrina (50) em CDCl ₃ a 50MHz	98
Figura 28.	Espectro de RMN de ¹ H de Cheleritrina (20) em DMSO a 200MHz.....	100
Figura 29.	Espectro de RMN de ¹ H de Diidroavicina (61) em CDCl ₃ a 400MHz.....	101
Figura 30.	Espectro de RMN de ¹³ C de Diidroavicina em CDCl ₃ a 100MHz.....	102
Figura 31.	Espectro de RMN de ¹ H de Magnoflorina (62) em MeOD a 400MHz	103
Figura 32.	Espectro de RMN de ¹³ C de Magnoflorina (62) em MeOD a 100MHz.....	104
Figura 33.	Espectro de RMN de ¹ H de Tembamida (63) em CDCl ₃ a 400MHz.....	105
Figura 34.	Espectro expandido de RMN de ¹ H de Tembamida (63) em CDCl ₃ a 400MHz	106
Figura 35.	Espectro de RMN de ¹³ C de Tembamida (63) em CDCl ₃ a 100MHz.....	106
Figura 36.	Espectro de RMN de ¹ H de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (64) em CDCl ₃ a 400MHz.....	108

Figura 37. Espectro expandido de RMN de ^1H de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (64) em CDCl_3 a 400MHz.....	109
Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (64) em CDCl_3 a 100MHz.....	109
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H de N-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida (65) em CDCl_3 a 400MHz.	111
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C de N-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida (65) em CDCl_3 a 100MHz.....	112
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H de N-(2-(benziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (66) em CDCl_3 a 400MHz.....	113
Figura 42. Espectro expandido de RMN de ^1H de N-(2-(benziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (66) em CDCl_3 a 400MHz.....	114
Figura 43. Espectro expandido de RMN de ^1H de N-(2-(benziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (66) em CDCl_3 a 400MHz.	114
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (67) em CDCl_3 a 200MHz.....	116
Figura 45. Espectro expandido de RMN de ^1H de N-(2-(4-metoxifenil) -2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (67) em CDCl_3 a 200MHz	116
Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C de N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (67) em CDCl_3 a 50MHz	117
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H de N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (68) em CDCl_3 a 200MHz.....	118
Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C de N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (68) em CDCl_3 a 50MHz.....	119

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.....123
- Gráfico 2. Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*123
- Gráfico 3. Atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*124
- Gráfico 4. Porcentagem de Inibição do Radical DPPH dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*124
- Gráfico 5. Valores de EC₅₀ verificado para os extratos e frações obtidas pelos métodos de extração frio e quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*126
- Gráfico 6. Atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*.....127
- Gráfico 7. Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*.....127
- Gráfico 8. Valores de EC₅₀ verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*.....128

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparação do extrato bruto metanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> pelos métodos de extrações com metanol a frio e a quente.....	36
Esquema 2. Preparação do extrato bruto metanólico de <i>Zanthoxylum hyemale</i> pelo método de extração a frio.	37
Esquema 3. Fracionamento dos extratos brutos metanólicos frio e quente da espécie <i>Z. rhoifolium</i> . Extrato bruto metanólico frio particionado pelo sistema neutro. Extrato bruto metanólico quente particionado por dois diferentes sistemas de solventes: neutro e ácido/base.....	39
Esquema 4. Fracionamento do extrato bruto metanólico frio da espécie <i>Z. hyemale</i> pelo sistema neutro.....	40

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento Químico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Di-terc-butil metil fenol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	Dimetilaminopiridina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EBMF	Extrato Bruto Metanólico Frio
EBMQ	Extrato Bruto Metanólico Quente
FDA	Food and Drug Administration
FH	Fração Hexânica
FHN	Fração Hexânica Neutra
FD	Fração Diclorometânica
FA	Fração Acetato de etila
FAB	Fração Acetato Básica

FB	Fração Butanólica
FCN	Fração Clorofórmica Neutra
FCB	Fração Clorofórmica Básica
HCl	Ácido Clorídrico
J	Constante de acoplamento
NaH	Hidreto de Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NPPN	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
ppm	Partes por milhão
PDC	Piridínio Dicromato
PN	Produtos Naturais
PF	Ponto de Fusão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rf	Fator de retenção
s	Singleto
THF	Tetrahidrofurano
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas tem sido produzidas pela natureza.¹ Animais marinhos, insetos, microrganismos e principalmente as plantas utilizam seu complexo metabolismo para sintetizar compostos capazes de serem biologicamente ativos. Desta forma, grande parte dos fármacos atualmente em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais.² De acordo com Koehn e col.³ entre 1981 e 2002 cerca de 49% dos fármacos desenvolvidos foram obtidos a partir de produtos naturais ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais.

Dos produtos naturais conhecidos hoje, as plantas superiores são fontes da maior parte.⁴ O uso medicinal das plantas para fins curativos é uma prática conhecida desde épocas remotas, contribuindo para divulgar as potencialidades terapêuticas dos vegetais, mesmo que grande parte das plantas utilizadas popularmente ainda não tenham sido devidamente estudadas sob aspectos químicos e farmacológicos.

Estima-se que existam aproximadamente 600.000 espécies vegetais no mundo e que somente cerca de 15 a 17% já tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades.⁵ No Brasil, até 1996 apenas 8% das espécies da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais.⁵

Esta pequena fração de plantas que são alvo de estudos contrasta com a ampla biodiversidade de nosso país que hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (segundo dados estimados pela Convenção da Diversidade Biológica – CDB).⁶

As substâncias químicas sintetizadas pelos vegetais são produtos de seu metabolismo envolvendo uma série de reações químicas que ocorrem continuamente dentro de cada célula.

Portanto, todos os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transportados são chamados metabólitos.⁷ Tal metabolismo está dividido em primário (lipídios, carboidratos, proteínas) e secundário, do qual são exemplos compostos como os alcalóides, terpenos, lignanas, cumarinas, entre outros. Estes últimos possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias de interesse farmacéutico pela atividade biológica que apresentam.⁷

Os vegetais possuem uma elevada capacidade de biossintetizar os metabólitos secundários, tanto em relação ao número como a diversidade em uma mesma espécie. Para exemplificar esta característica Simões⁷ cita a espécie *Catharanthus roseus* (Vinca) da família Apocynaceae que relacionado aos alcalóides, produz mais de 90 compostos diferentes.

Na figura 1 é possível visualizar a origem de todos os metabólitos secundários, resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

As pesquisas científicas em Produtos Naturais (PN) visam isolar, identificar e estudar novos princípios ativos produzidos, principalmente, pelo metabolismo dos vegetais. É neste contexto que o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria, vem contribuindo com pesquisas nesta área, tendo em vista a descoberta de novos metabólitos secundários extraído das plantas. O grupo realiza uma triagem de espécies nativas no Rio Grande do Sul, buscando o isolamento e a determinação estrutural de compostos das plantas que tenham efeitos medicinais relatados pela cultura popular.

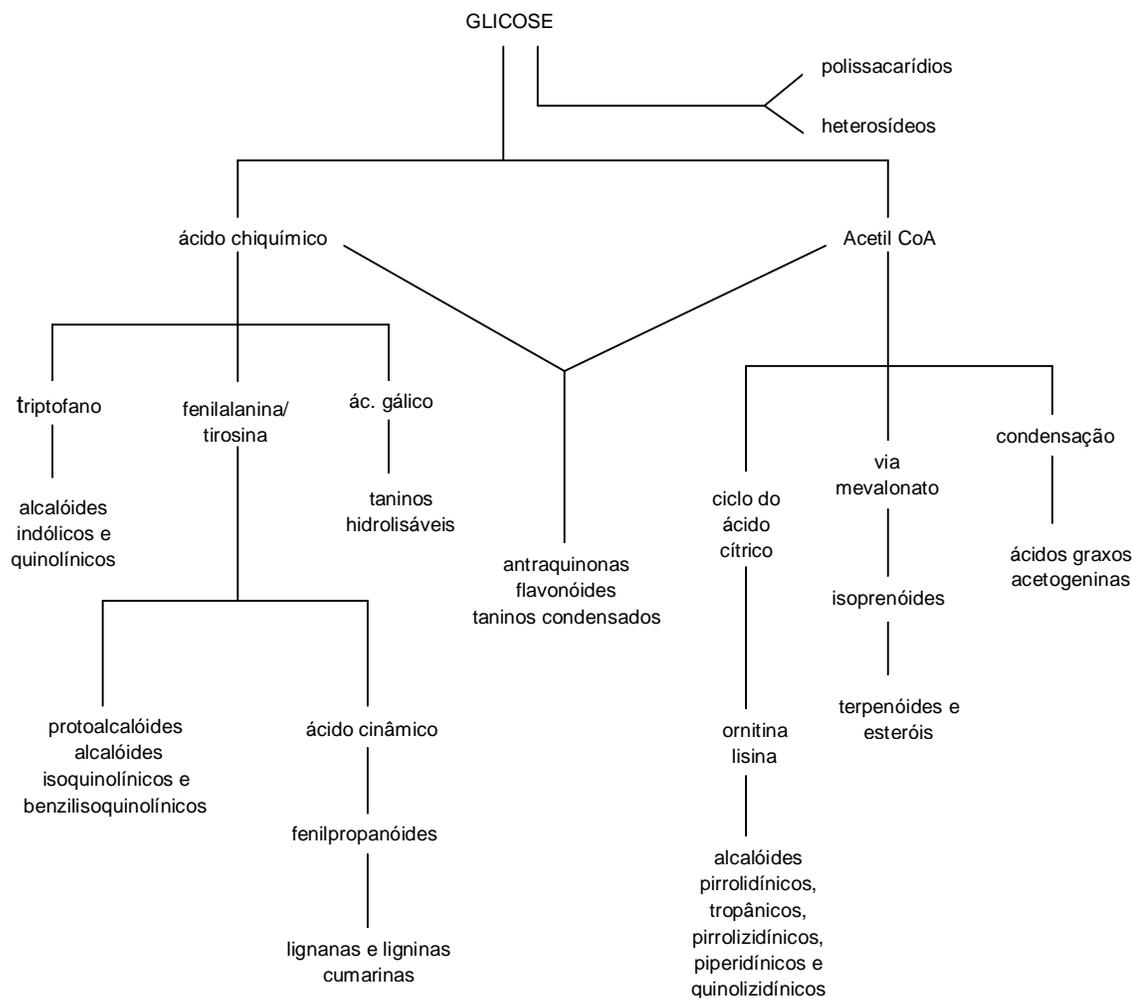


Figura 1: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.⁷

Dentre as espécies estudadas pelo grupo, foram selecionadas para uma investigação mais detalhada duas plantas da família Rutaceae, *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*. Neste trabalho, o principal objetivo é dar continuidade ao estudo químico e biológico já realizado pelo NPPN destas espécies, induzido pela vasta utilidade das mesmas na medicina popular.

As espécies que fazem parte da família Rutaceae geralmente apresentam constituintes químicos como alcalóides, terpenos, lignanas, entre outros. Os alcalóides do tipo benziltetraidroisoquinolínicos, são muito comuns nesta família e estes possuem muitos efeitos

farmacológicos como ação antimicrobiana⁸⁻¹⁰, antiinflamatória¹¹⁻¹², antitumoral¹³ e antiplasmódica.¹⁴

No ano de 2008, o NPPN implantou um novo ensaio para avaliar o potencial biológico dos compostos que isola ou sintetiza: a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase. Este teste possui uma grande importância para as pesquisas científicas, devido a esta enzima estar relacionada com a Doença de Alzheimer, que atualmente vem sendo muito pesquisada na intenção da busca por sua cura.

Com base nos dados referidos, esta dissertação tem como objetivos analisar quimicamente e biologicamente as cascas do caule de duas espécies de plantas encontradas no Pampa gaúcho: *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*, descrevendo os processos realizados para a obtenção e caracterização dos compostos isolados. Ainda, efetuar ensaios biológicos para avaliar a atividade antimicrobiana e atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, como também descrever a atividade antioxidante das frações extrativas da planta e de seus metabólitos isolados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O principal objetivo desta dissertação consiste em realizar o estudo químico e biológico das cascas do caule de duas espécies de plantas nativas do Rio Grande do Sul pertencentes à família Rutaceae: *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar extrações das cascas do caule da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* para obtenção do extrato bruto fazendo uso de dois diferentes métodos, a fim de avaliar a influência de cada método no processo extrativo da planta, assim como verificar o poder de extração de ambos os métodos, pelos rendimentos obtidos e visualização de substâncias extraídas através de análise em CCD.
- Verificar a influência de dois diferentes processos de fracionamento na obtenção dos metabólitos secundários da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.
- Isolar os metabólitos secundários presentes nas cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*, usadas como material vegetal das espécies em estudo;
- Identificar os compostos isolados fazendo uso de técnicas espectroscópicas como RMN ^1H e ^{13}C , COSY e DEPT;
- Estudar biologicamente as espécies selecionadas, através da realização de ensaios biológicos para determinação da atividade antimicrobiana, atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase e atividade antioxidante dos extratos, frações e metabólitos isolados.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DESCRIÇÃO DA PLANTA

3.1.1. A Família Rutaceae

Esta família, reunindo aproximadamente 150 gêneros e 1600 espécies, tem ampla distribuição pelas regiões dos trópicos úmidos e temperados do mundo. Sua ocorrência é grande na América tropical, sul da África e Austrália. Em nosso território, a família está representada por cerca de 29 gêneros e 182 espécies, algumas com importância medicinal, ecológica e econômica.¹⁵

As Rutaceae são plantas lenhosas, de porte arbustivo ou arbóreo. Uma característica importante desta família é que, frequentemente, apresentam glândulas translúcidas nas folhas e desenvolvem glândulas produtoras de óleo fortemente aromático, cujo papel ecológico é provavelmente de protegê-las contra ação de predadores.¹⁶

3.1.2. O Gênero *Zanthoxylum*

A morfologia é variada neste gênero, com árvores altas, arvoretas ou arbustos, geralmente aculeados no tronco, ramos e folhas. Suas flores são geralmente alvas e esverdeadas, com glândulas oleíferas esféricas. Possuem folhas alternas, imparipinadas ou paripinadas. A semente é negra e lisa de endosperma carnosos.¹⁷

Este gênero compreende aproximadamente 200 espécies, a maioria pantropicais, com poucas espécies estendendo-se nas zonas temperadas da América do Norte e leste da Ásia. No Brasil, segundo dados de Flora Brasilienses¹⁷, encontram-se entre 25 e 30 espécies deste gênero.

3.1.3. A espécie *Zanthoxylum rhoifolium*



Figura 2: Zanthoxylum rhoifolium

Trata-se de uma espécie bem distinta, pelos acúleos do tronco, ramos e folhas (mais comum em plantas e ramos jovens). No campo, é facilmente reconhecida pelo porte arbóreo, com altura variando de 6,0 a 12,0 m, de copa densa e arredondada, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo, recomposição de vegetação e recuperação de áreas degradadas. Sua madeira é empregada na construção civil, marcenaria e carpintaria.¹⁸

A espécie *Zanthoxylum rhoifolium* (Lam) (Figura 2), conhecida popularmente como “mamica de porca”, “mamica de cadela”, “juva”, “juvevê”, “espinho de vintém”, “espinho cheiroso” e “tembetari”, possui como sinonímia botânica *Fagara rhoifolia* (Lam) Engl e *Zanthoxylum sorbifolium* ST. Hill, entre outras.¹⁸

Sua distribuição é ampla, sendo encontrada em vários países da América do Sul, como Argentina, Colômbia, Paraguai e Brasil. Em nosso país ocorre principalmente em regiões de cerrado e das florestas Atlântica e Amazônica. Frequentemente seu habitat natural são as bordas das matas ou campos abertos, em solos arenosos e areno-argilosos e raramente se encontram no interior dessas matas.¹⁸

Na medicina popular, esta espécie é empregada no tratamento de doenças cardiovasculares, tuberculose, malária, alívio de dores de dente, mordida de cobra e como analgésico.¹²

3.1.4. A espécie *Zanthoxylum hyemale*



Figura 3: *Zanthoxylum hyemale*

Esta espécie é constituída de árvores pequenas (até 7,0 m de altura), com troncos que possuem acúleos cônicos e fortes na casca fina e quase lisa. Folhas alternadas, flores castanho-esverdeadas, frutos formados de carpelos rugosos e escuros com sementes de cor preta.¹⁹⁻²⁰ As cascas são amargas e as folhas e frutos desprendem odor balsâmico pouco agradável. Ocorre principalmente nos lugares úmidos das matas.²¹

Chamada popularmente de temberatu, culantrilo ou coentrilho, a espécie *Zanthoxylum hyemale* (Figura 3) tem como sinonímia *Fagara hyemale*.¹⁸ É relatada na medicina tradicional como antiparasitário²², antiespasmódico²³ e usado no tratamento de leishmaniose.²²

3.2. A QUÍMICA DA FAMÍLIA RUTACEAE

As plantas da família Rutaceae, especialmente do gênero *Zanthoxylum*, são conhecidas por apresentar uma composição química bastante diversificada, sendo capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários. Destacam-se os compostos como alcalóides, lignanas, cumarinas, amidas, flavonóides e terpenos, que podem ser encontrados nas raízes, caule, ramos e folhas da planta.²⁰ Dieguéz e col.²⁴ após revisão sobre os constituintes químicos do gênero *Zanthoxylum*, relataram que os alcalóides são encontrados em 89,5% das plantas, sendo a família química mais freqüente e relevante neste gênero. Outras substâncias ativas freqüentes são os terpenos (54,7%) e as lignanas (51,6%). Os flavonóides são encontrados em apenas 23,2% das espécies de *Zanthoxylum* estudadas.

Os alcalóides possuem uma vasta ocorrência em espécies das Rutaceas sendo encontradas diversas classes desse metabólito. São substâncias orgânicas heterogêneas, que como similaridade molecular apresentam o átomo de nitrogênio na forma de amina (raramente amida). Esses metabólitos, de forma geral, se formam a partir de aminoácidos, entretanto outros precursores como terpenos e esteróides podem ser incorporados contribuindo na formação do esqueleto final.⁷

Na figura 4 estão demonstrados alguns esqueletos carbônicos freqüentemente encontrados nos alcalóides das Rutaceas.

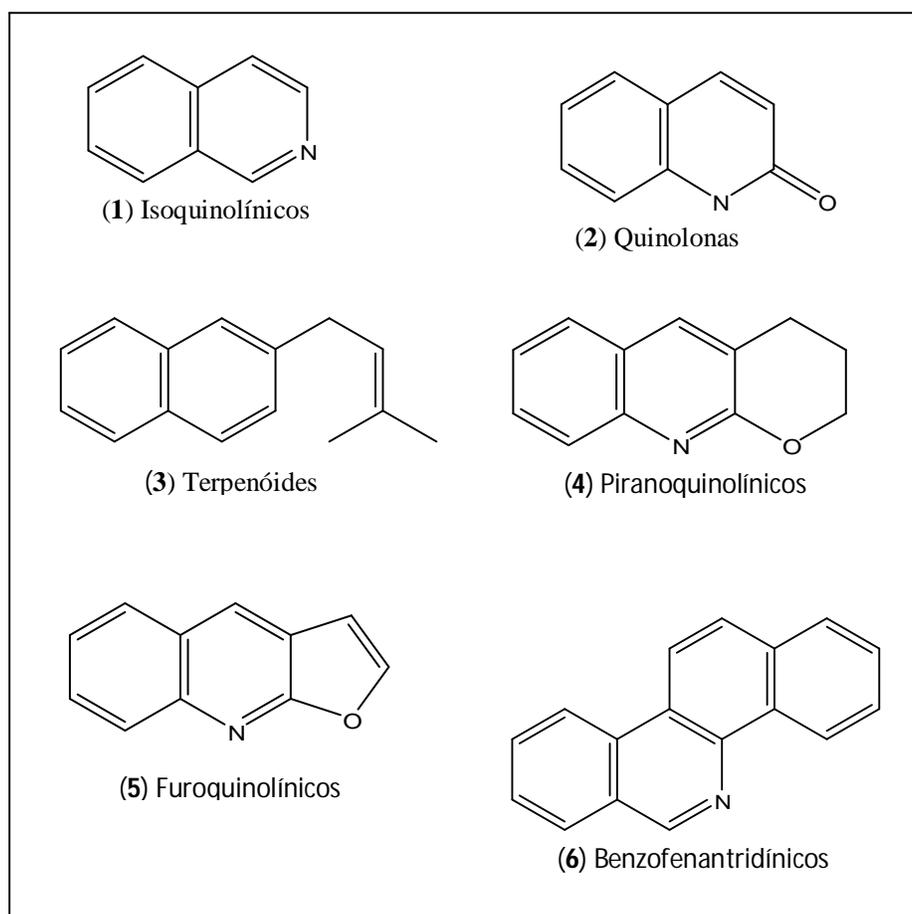
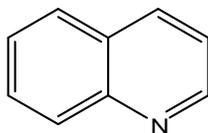


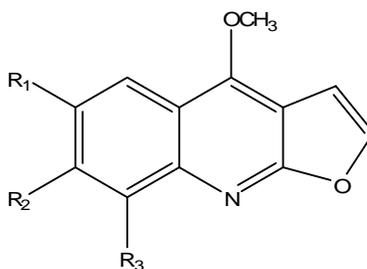
Figura 4: Principais esqueletos carbônicos dos alcalóides das Rutaceas.

Em muitos dos estudos publicados referentes às espécies das Rutaceae, os alcalóides da família dos quinolínicos são citados com frequência. Desta família, os alcalóides da classe dos furoquinolínicos, que possuem o anel furano condensado à estrutura básica da quinolina (7), são os que principalmente são encontrados. Desde 1956 já haviam sido sintetizados alguns alcalóides furoquinolínicos, como Skimianina²⁵ (8), que é um dos alcalóides comumente encontrados no gênero *Zanthoxylum*.^{23,26-27}

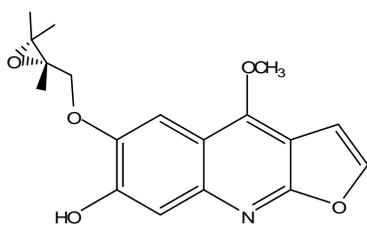
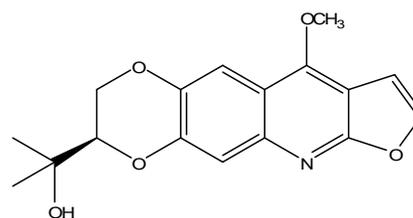
Uma variedade de alcalóides furoquinolínicos é relatada pela literatura na família Rutaceae, entre eles estão Dictamina (9)²⁵, Haplopina^{25,26} (10), Kokusaginina²⁶ (11), Maculina (12), Flindersiamina (13) e Robustina²⁷ (14).



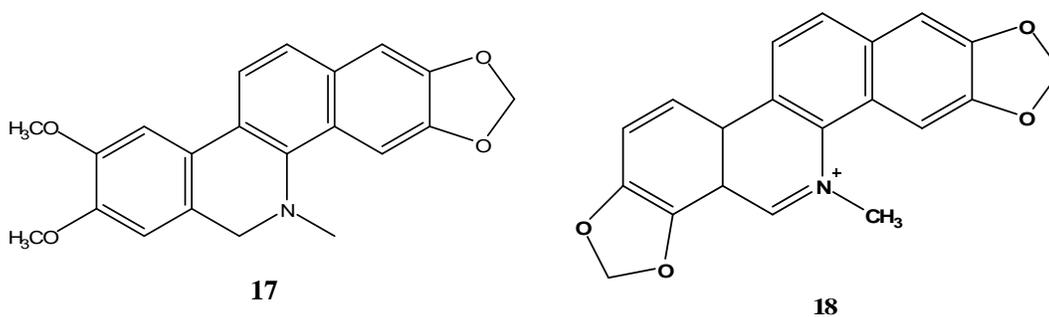
7

**8** $R_1=H, R_2=R_3=OCH_3$ **9** $R_1=R_2=R_3=H$ **10** $R_1=H, R_2=OH, R_3=OCH_3$ **11** $R_1=R_2=OCH_3, R_3=H$ **12** $R_1=R_2=OCH_2O, R_3=H$ **13** $R_1=R_2=OCH_2O, R_3=OCH_3$ **14** $R_1=R_2=H, R_3=OH$

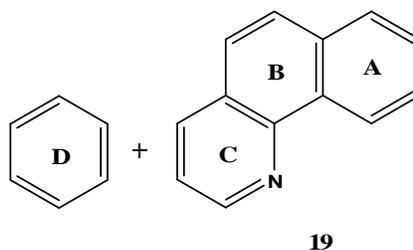
Em 2008, dois novos alcalóides furoquinolínicos foram isolados de plantas da família Rutaceae por Wansi e col.²⁸, Quinosuaveolina A (**15**) e Quinosuaveolina B (**16**).

**15****16**

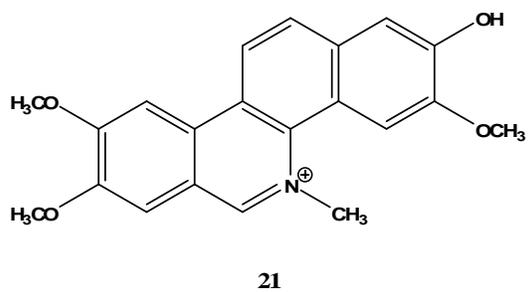
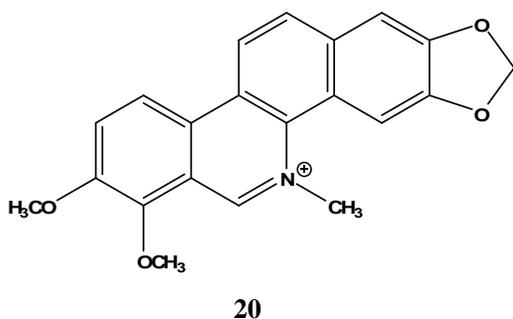
Os alcalóides pertencentes à família dos isoquinolínicos (**1**) também são muito comuns em Rutaceae. Em estudos realizados com espécies de Fagara, foram isolados Nitidina²⁹ (**17**) desta classe, além do sal quaternário Sanguinarina (**18**).³⁰



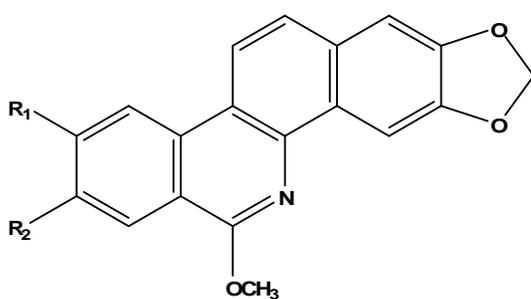
Os alcalóides benzofenatridínicos (**6**) constituem uma importante classe da família dos isoquinolínicos (**1**), que possuem mais de 2000 estruturas descritas.³¹ Eles são caracterizados por apresentarem um núcleo estrutural da fenantridina (**19**), com o anel benzênico condensado ao anel C.



O primeiro isolamento de alcalóides benzofenatridínicos foi descrito na metade do século passado, com a obtenção de Cheliritrina³² (**20**) e Sanguinarina³⁰ (**18**) de *Chelidonium majus* e *Sanguinaria canadensis*, respectivamente. A maioria dos alcalóides benzofenatridínicos isolados estão em três famílias botânicas: Rutaceae, Papaveraceae e Fumariaceae. De plantas da família Rutaceae foram isolados dois importantes alcalóides Nitidina²⁹ (**17**) e Fagaronina³² (**21**), que demonstraram serem potentes inibidores tumorais.³³ Nitidina (**17**) foi isolada primeiramente em 1958 de *Zanthoxylum nitidum*, por Arthur e col. e Fagaronina (**21**) foi isolada pela primeira vez das raízes de *Fagara zanthoxyloides*.

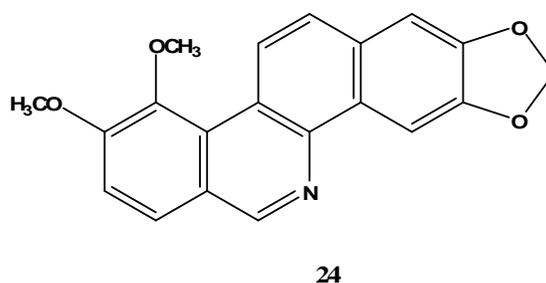


Gonzaga e col.⁸ em trabalho publicado no ano 2003, relataram o isolamento de três novos alcalóides benzofenandridínicos: Rhoifolina A (**22**), Rhoifolina B (**23**) e Zantoxilina A (**24**), extraídos das cascas da raiz da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.

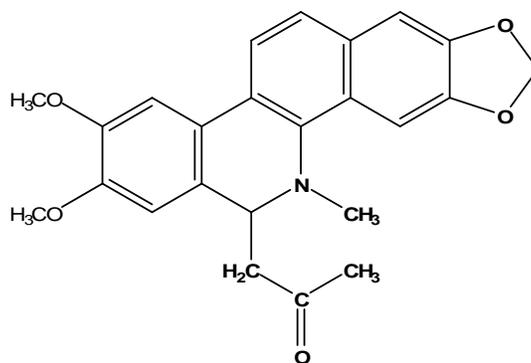


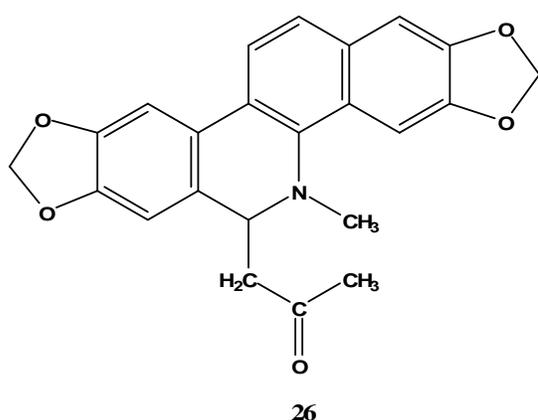
22 $R_1+R_2=OCH_2O$

23 $R_1=R_2=OCH_3$

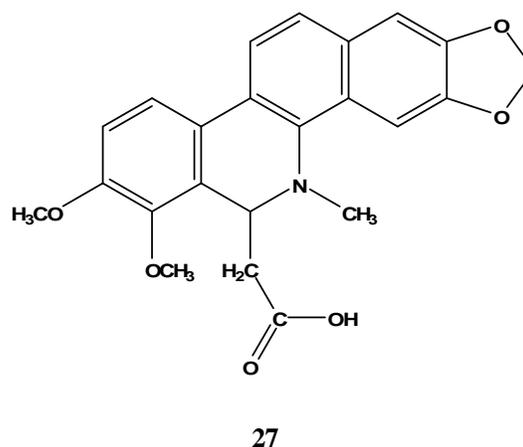


Neste estudo⁸, os autores citam a identificação de compostos já conhecidos, como os alcalóides 6-acetonildiidronitidina (**25**), 6-acetonildiidroavicina (**26**) e 6-carboximetildiidrocheleritrina (**27**), da classe dos diidrobenzofenandridínicos.



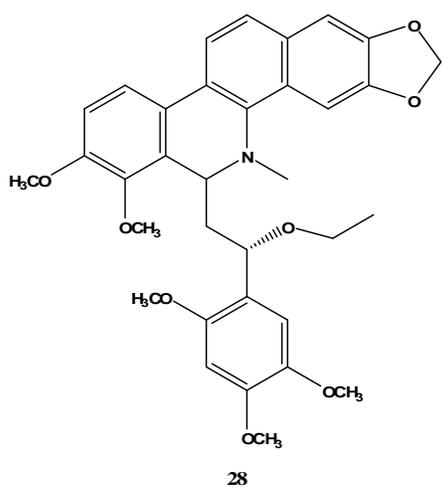


26

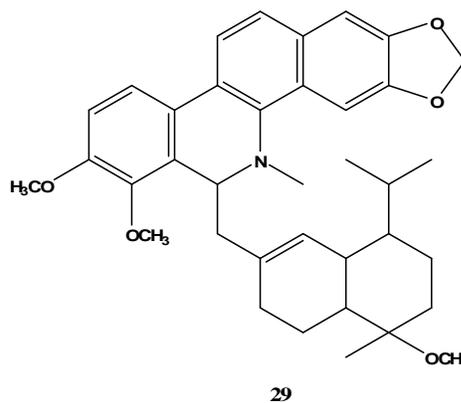


27

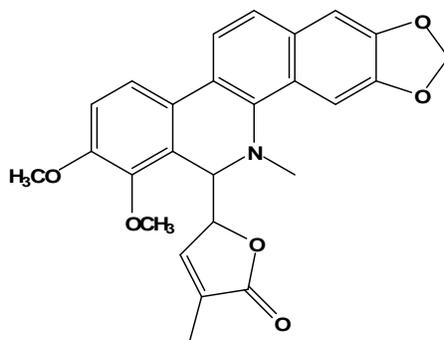
No ano de 2005, Pierre e col.³⁴ descreveram o isolamento de um novo alcalóide benzofenantridínico das cascas do caule de *Zanthoxylum buesgenii*, nomeado Buesgeniina (28). De *Zanthoxylum nitidum* foi isolado em 2008 um novo alcalóide diidrobzenofenantridínico, substituído na posição 6 por uma fração sesquiterpênica ligada ao esqueleto fenantridínico por um carbono metilênico (29).³⁵ Em 2010, Deng e col.³⁶ isolaram um novo alcalóide também pertencente à classe dos diidrobzenofenantridínicos, sendo nomeado Maclekarpine A (30).



28

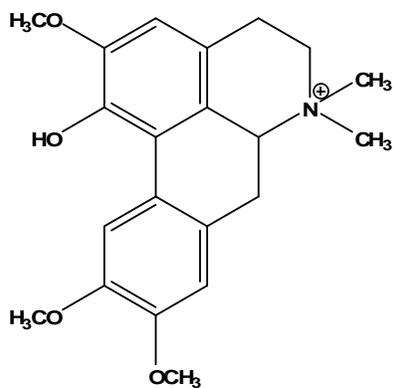


29

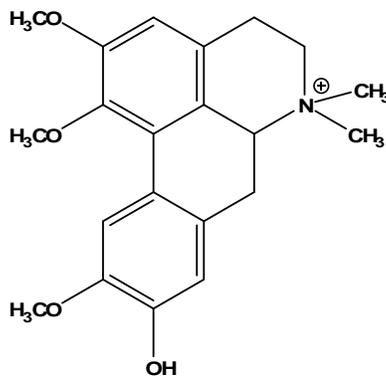


30

Outros alcalóides identificados em espécies do gênero *Zanthoxylum* são os pertencentes à classe dos aporfínicos. Dentre eles estão os alcalóides Cloreto de 1-hidroxi-2,9,10-trimetoxi-N,N-dimetilaporfina (**31**) isolado das cascas do caule de *Zanthoxylum tingoassuiba*³⁷ e Xantoplanina (**32**).³⁸



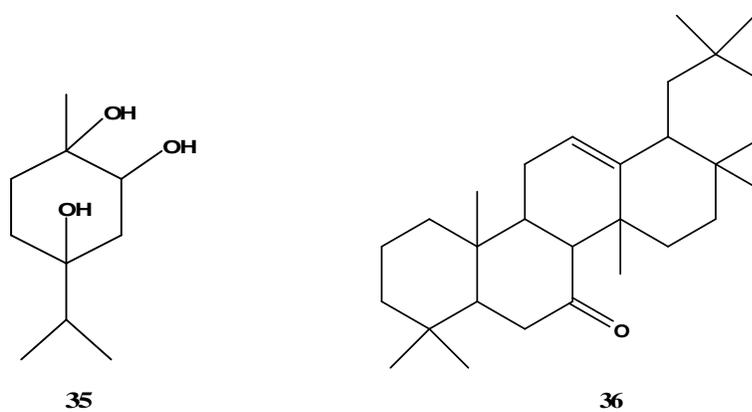
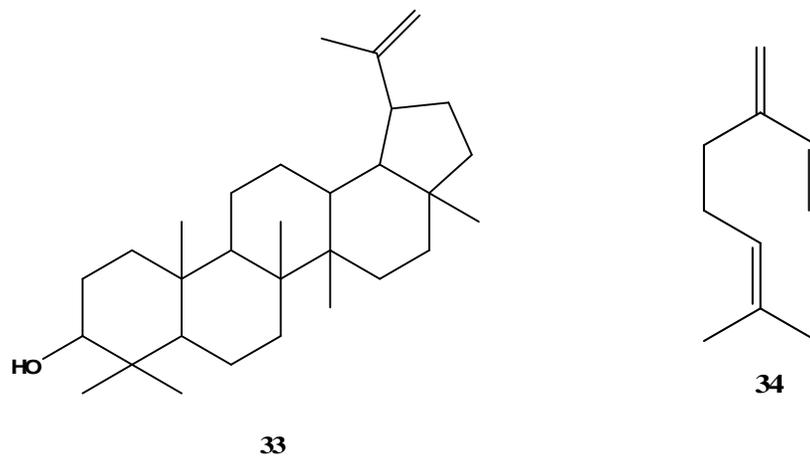
31



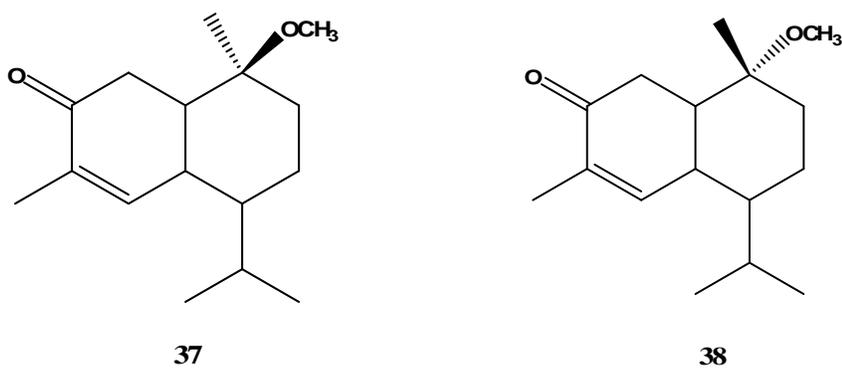
32

Comprovando a diversidade química apresentada por espécies do gênero *Zanthoxylum*, estudos científicos relatam o isolamento de uma grande variedade de classe de metabólitos secundários, tais como terpenos, lignanas, cumarinas e também flavonóides.

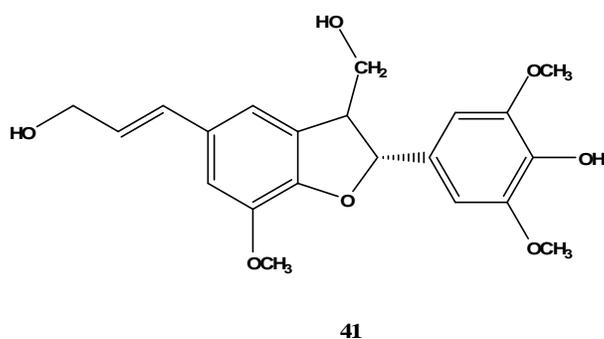
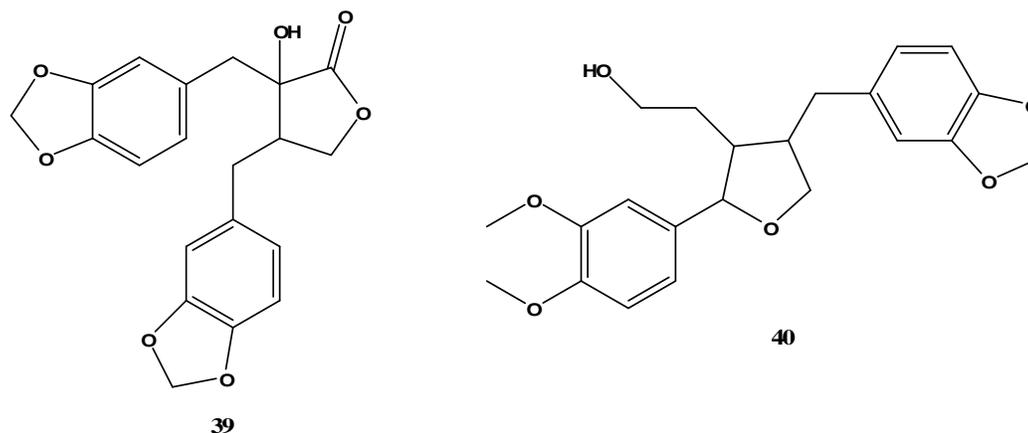
Os terpenos mais comumente identificados em espécies deste gênero são Lupeol (**33**), Mirceno (**34**), o monoterpene Triol (**35**) e Xantolilona (**36**).²⁰



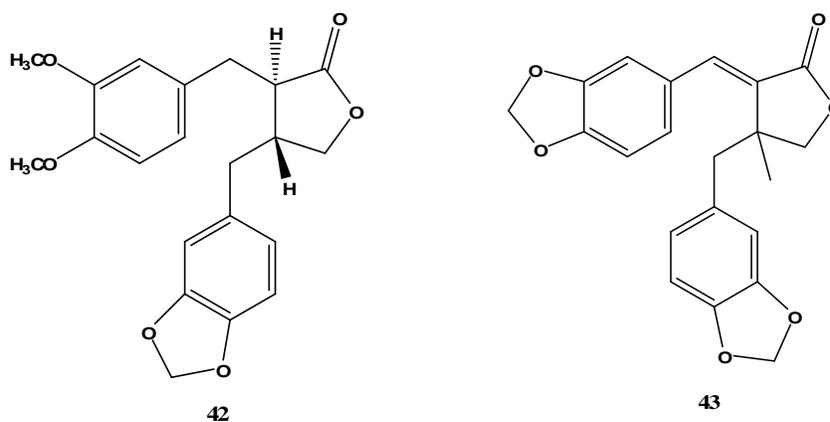
Em 2005, Cheng e col.³⁹ relataram o isolamento de dois novos sesquiterpenos: 10 β -metoximurolan-4-en-3-ona (**37**) e 10 α -metoxicadinan-4-en-3-ona (**38**), identificados da casca do caule de *Zanthoxylum ailanthoides*.



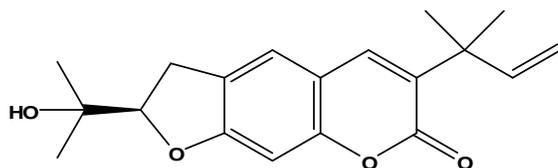
Entre as lignanas identificadas de espécies da família Rutaceae estão Meridinol (**39**) e 7,9-Epoxilignano (**40**).²⁰ A lignana Simulanol (**41**) foi isolada em 2002 por Yang e col.⁴⁰ dos extratos de *Zanthoxylum simulans*.



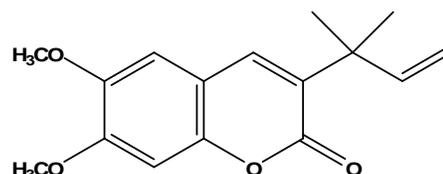
De *Zanthoxylum naranjillo* foi isolada Metilpluviatolídeo (**42**), uma lignana que demonstrou atividade sobre formas de *Trypanosoma cruzi*.²⁰ Morel e col.⁴¹ relataram a identificação da lignana Gadaina (**43**) nas cascas da raiz de *Zanthoxylum rhoifolium*.



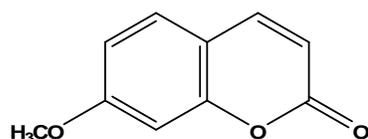
Algumas cumarinas foram isoladas das espécies de Rutaceae, como Chalepina (**44**) de *Zanthoxylum naranjillo*, Rutacultina (**45**) de *Zanthoxylum hyemale*³⁸ e Suberosina (**46**) de *Zanthoxylum dominianum*.²⁰



44

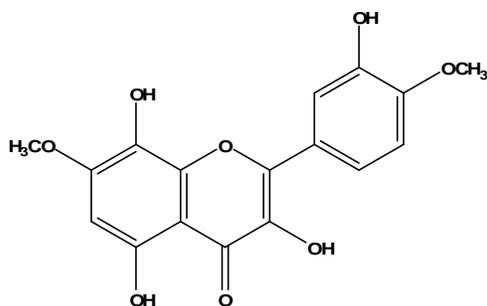


45

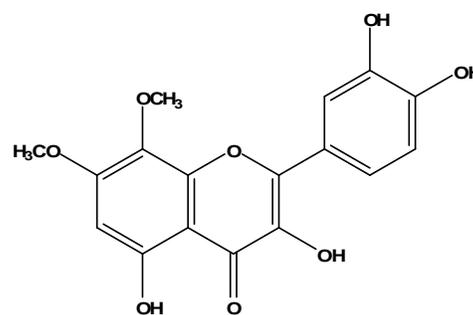


46

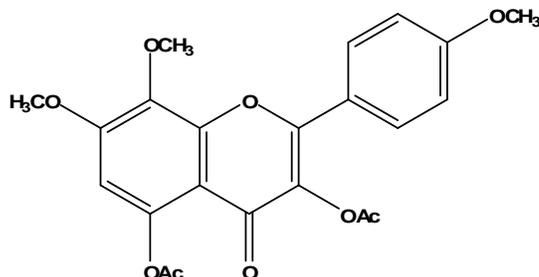
Estudos reportam o isolamento de alguns flavonóides em plantas pertencentes ao gênero *Zanthoxylum*, como Tambuletina (**47**), Zantoxil flavona (**48**) e 3,5-Diacetil-tambulina (**49**).²⁰



47



48



49

3.3. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Em 2003 Diegues e col.²⁴ identificaram 37 diferentes espécies de *Zanthoxylum* que haviam sido relatadas na literatura com utilização na medicina tradicional. Entre as principais propriedades atribuídas estão: alívio de problemas dentários, tratamento de transtornos gastrointestinais, dores estomacais ou abdominais, cura de feridas na pele, tosse e asma, auxílio no tratamento da malária, analgésico, ação diurética, estomáquica, anticonvulsiva, tônica e estimulante.

Vários estudos vêm sendo conduzidos objetivando identificar os constituintes químicos responsáveis pelas atividades farmacológicas nas plantas do gênero *Zanthoxylum*. Entre as ações biológicas relatadas com espécies deste gênero estão as atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida, anti-helmíntica, atividade antitumoral, propriedades antiinflamatórias, de inibição enzimática e atividade antioxidante.²⁴

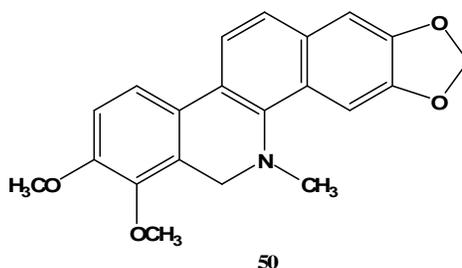
Os alcalóides Nitidina²⁹ (**17**) e Fagaronina³² (**21**) mostraram intensa atividade antitumoral contra células leucêmicas e tumores pulmonares. Outras atividades também foram verificadas para Nitidina (**17**), como inibição de leveduras, atividade cardiovascular e antitripanossômica.²⁹ Jullian e col.¹⁴ demonstraram em estudo realizado *in vitro* que o alcalóide Nitidina (**17**) apresenta atividade antiplasmodial, inibindo o DNA topoisomerase I do *Plasmodium falciparum*.

Outro composto muito ativo presente no gênero é o alcalóide Sanguinarina (**18**). Estudos atribuem a esse metabólito atividades como antimicrobiana e antiinflamatória, além de inibir a formação de placa bacteriana. Também foi descrito o potencial deste alcalóide contra células Leucêmicas HL-60.³⁰

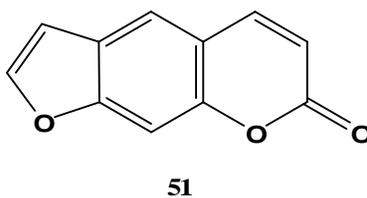
Das raízes de *Z. caudatum* foram isolados compostos alcaloídicos que se mostraram ativos contra bactérias e fungos.⁴² O óleo essencial dos frutos de *Z. xanthoxyloides* foi

eficiente para inibir o crescimento de cepas de *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.⁴³

Também foi descrita a atividade antimicrobiana de alcalóides isolados das cascas do caule de *Z. rhoifolium* (entre eles Rhoifolina A (**22**) e B (**23**)) em publicação de Gonzaga e col.³³ no ano de 2003. Estes mesmos autores avaliaram o óleo essencial das folhas e frutos desta espécie contra bactérias gram-negativas, mostrando-se ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella Setubal*. Outros alcalóides benzofenantridínicos que apresentaram atividade antimicrobiana referem-se aos compostos Cheleritrina (**20**) e Diidrocheleritrina (**50**).



A furanocumarina Psoralen (**51**) isolada de plantas da família Rutaceae tem sido usada no tratamento de doenças de pele como vitiligo e psoríase, segundo estudos de Hanawa e col.²⁶ Neste estudo os autores identificaram os alcalóides furoquinolínicos Kokusaginina (**11**), Haploplina (**10**) e Skimianina (**8**) como compostos com atividade antimicrobiana.



Foram atribuídas às substâncias isoladas da espécie *Zanthoxylum chiloperone* as atividades leishmanicida e antifúngica, assim como tripanomicida.⁴⁴ Os extratos das folhas de

Z. chiloperone mostraram, além de efeito antiinflamatório, atividade antinociceptiva em camundongos, comprovando sua eficácia como analgésico.

Jullian e col.¹⁴ estudaram a espécie *Zanthoxylum rhoifolium* utilizada como antimalárica. Os pesquisadores comprovaram esta atividade através de ensaios biológicos e demonstraram que o alcalóide Nitidina (**17**) seria o componente mais ativo, com valores de IC₅₀ de 0,05µg/mL para *Plasmodium falciparum*.

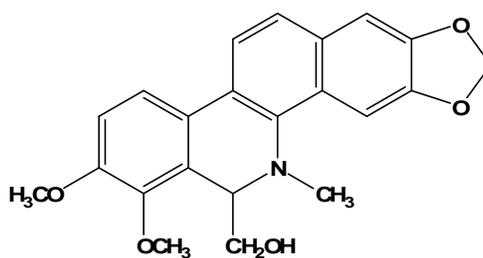
Os extratos metanólicos de *Zanthoxylum simulans* mostraram significativa atividade anti-agregação plaquetária, de acordo com estudos descritos por Yang e col.⁴⁰ em 2002. Tal atividade foi atribuída aos alcalóides furoquinolínicos Skimianina (**8**) e Haplopina (**10**).

De *Fagara zanthoxyloides* Lam, foi isolado o alcalóide Fagaronina (**21**) que revelou atividade contra células leucêmicas P388. Este composto possui potencial inibidor da enzima Transcriptase reversa (RT), que é a enzima responsável pela replicação para formar o DNA viral em tumores causados por vírus.⁴⁵

Cheng e col.³⁹ testaram compostos isolados das cascas do caule de *Zanthoxylum ailanthoides* quanto à inibição da replicação do HIV em células de linfócitos. Os autores atribuíram as maiores atividades aos compostos furoquinolínicos.

Foi comprovada a atividade antinematóide do extrato aquoso das folhas de *Z. rhoifolium* com a observação da redução do número de larvas de nematóides gastrointestinais através de testes *in vitro*.⁴⁶

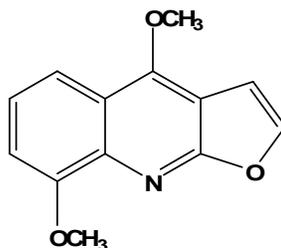
Os alcalóides benzofenantridínicos 6-Acetonildiidroavicina (**26**) e Boconolina (**52**) foram avaliados como antitumorais.⁴¹ Boconolina (**52**) apresentou atividade contra linhagens de células UACC-62 (melanoma) e 6-Acetonildiidroavicina (**26**) foi ativo contra OVCAR (ovário), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (pulmão) e PCO-3 (próstata).



52

Em 2009, Chen e col.⁴⁷ testaram extratos contendo alcalóides aporfínicos contra *Penicillium avellaneum* (UC-4376) e alcançaram resultados positivos.

Compostos isolados de espécies pertencentes à família Rutaceae mostraram atividade inseticida no ninho da formiga cortadeira *Atta sexdens rubripilosa*, de acordo com estudos relatados por Terezan e col.⁴⁸ em 2010. Entre esses compostos estão os alcalóides furoquinolínicos Skimianina (8), Dictamina (9) e γ -Fagarina (53).



53

3.3.1. Atividade Antioxidante

O oxigênio molecular obtido da atmosfera é vital para microrganismos aeróbicos, mas quando os radicais livres oxigenados são gerados *in vivo* em excesso, resulta em estresse oxidativo.⁴ O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção e a degradação dos agentes oxidantes, que são as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo que os mais comuns são os radicais superóxidos, hidroxilas e peroxilas, entre outros, gerados nos processos oxidativos do organismo.^{4, 49}

Acredita-se que um grande número de doenças como esquizofrenia, câncer, envelhecimento precoce, *Diabetes mellitus* e doenças neuro-degenerativas como Mal de Parkinson e Doença de Alzheimer estejam relacionadas com o estresse oxidativo.⁴ Por essa razão, as substâncias com poder antioxidante que retardam a velocidade de oxidação, são utilizadas para prevenir, inibir ou ao menos atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo. Os antioxidantes atuam inibindo os radicais livres (antioxidante primário) ou ainda interagindo em outro mecanismo onde não ocorre a inibição direta dos radicais livres (antioxidante secundário).⁴

Essa atividade antioxidante apresentada por certas substâncias nada mais é que a capacidade que elas possuem de garantir o equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes. Como exemplo do uso de antioxidantes, temos o emprego de tais compostos para aumentar a vida de prateleira em produtos alimentícios, porém, alguns tem restrições em alimentos por estarem associados à processos carcinogênicos. Dessa forma, a procura por antioxidantes de origem natural tem se intensificado.⁴

As plantas, devido a necessidade de proteção contra o estresse oxidativo gerado pela exposição aos raios solares e ao oxigênio, concentram uma grande diversidade de antioxidantes, podendo serem consideradas fontes de novos compostos que apresentem essa atividade. A maioria dos antioxidantes das plantas superiores são os polifenóis, que mostram atividades biológicas diversificadas como antibacteriana, antiinflamatória, antialérgica, estrogênica, entre outras.

Muitos estudos relacionados com plantas superiores que vêm sendo realizados e publicados atualmente têm por objetivo identificar compostos que apresentem boa atividade antioxidante e baixa toxicidade.

Testes *in vitro* usados para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais fazem uso de um radical livre estável (DPPH, por exemplo) e medem a capacidade que tal composto

natural possui em seqüestrar este radical. Na literatura, muitos trabalhos relatam a ação antioxidante de plantas.^{4,20,24, 44, 49}

3.3.2. Atividade Antimicrobiana

A pesquisa por novos compostos com potencial para atividade antimicrobiana tem sido muito relevante nos últimos anos, pois, embora as indústrias farmacéuticas produzam uma variedade de antibióticos com ação diversificada, tem-se observado o aparecimento de novos agentes patógenos, assim como um aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos tradicionais usados para fins terapêuticos, devido a exposição excessiva aos fármacos.⁵⁰

Os processos infecciosos, muito comum em nosso país que são causados por agentes microbianos, preocupam a classe médica tendo destaque no panorama das doenças oportunistas a serem combatidas.⁵⁰⁻⁵¹ Um exemplo é a Bactéria *Staphylococcus aureus*, patógeno muito potente responsável por infecções de ferimentos que representam a terceira causa mais comum de infecção hospitalar.⁵² Outro exemplo são as leveduras do gênero *Candida*, patógenos oportunistas responsáveis por infecções em indivíduos imunocomprometidos.⁵³

O objetivo da cura dessas infecções causadas por agentes patógenos oportunistas leva, cada vez mais, à busca pela descoberta de novos constituintes químicos oriundos de Produtos Naturais com potentes atividades farmacológicas.⁵¹ Na atualidade, grande parte dos agentes bactericidas e fungicidas utilizados são compostos que provém do metabolismo secundários vegetal. Este fato se deve principalmente à menor toxicidade dos compostos oriundos de fontes naturais. Há muito tais compostos vêm servindo para aplicações na medicina popular e devido a isso, novas pesquisas científicas estão sendo realizadas no intuito de comprovar a atividade biológica relatada.

3.3.3. Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

3.3.3.1. A Doença de Alzheimer

Caracterizada pelo neuropatologista alemão Aloiz Alzheimer em 1907, a doença de Alzheimer (DA) é uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível que afeta a memória e acarreta diversos distúrbios cognitivos.⁵⁴ Erroneamente é conhecida como “esclerose” e muitos a denominam “mal do século”, contudo ainda é pouco divulgada mesmo com os grandes impactos que gera na vida dos pacientes.⁵⁵

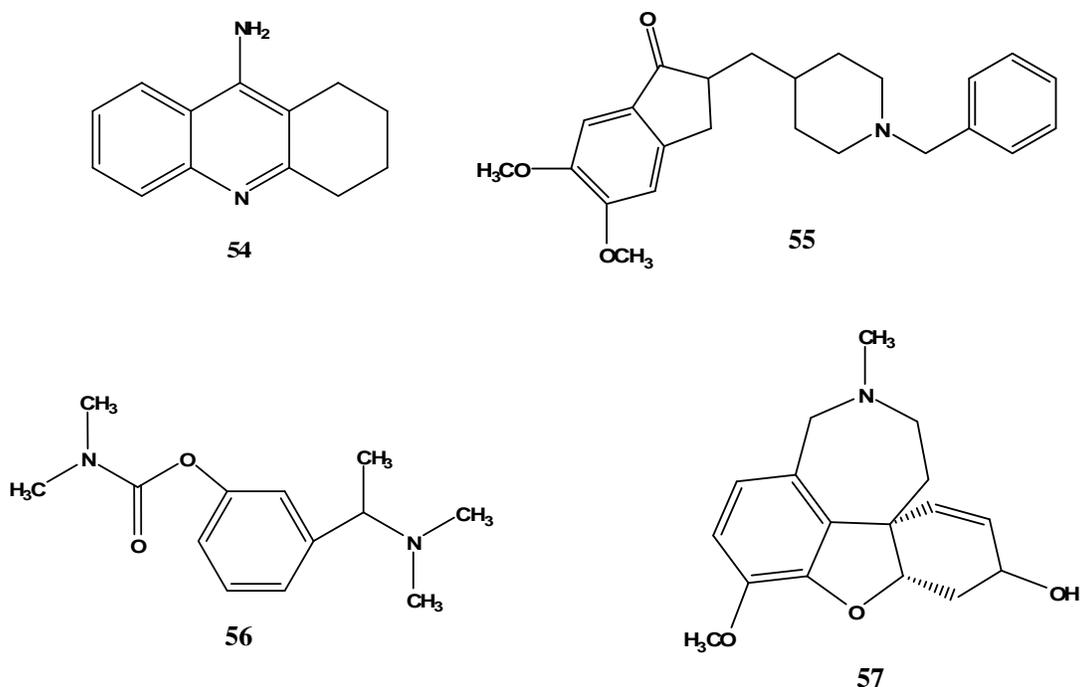
Esta doença ainda não possui cura. Os principais sintomas apresentados por pessoas acometidas são perda gradual da memória, mudanças significativas de personalidade sem motivo, desorientação quanto ao tempo e espaço, dificuldade de memorização, déficit cognitivo e queda na realização de atividade cotidianas.⁵⁴⁻⁵⁵ As causas da DA ainda não são conhecidas, mas acredita-se que fatores genéticos, ambientais e hábitos intelectuais praticados estejam ligados ao desenvolvimento da doença. Algumas características observadas nos pacientes com DA estão diretamente relacionadas ao aparecimento da doença como a presença de placas neuríticas constituídas principalmente de proteína- β -amilóide que se acumulam no meio cerebral, a formação de emaranhados fibrilares intraneurais e a acentuada queda na quantidade de neurotransmissores cerebrais nas regiões da sinapse, principalmente acetilcolina (ACh), dopamina, glutamato e serotonina.⁴ Os neurotransmissores tem a função de transportar mensagens químicas entre dois ou mais neurônios. A acetilcolina é o neurotransmissor mais abundante no cérebro e também o principal responsável pela propagação do impulso nervoso. Seus precursores são a colina e a acetilcolina A (acetil-CoA).⁵⁵

Nos portadores da DA, a concentração da acetilcolina é reduzida devido ao déficit colinérgico que faz com que os neurônios a produzam em baixas quantidades. Desta forma, a funções cognitivas dos pacientes com DA ficam comprometidas.⁴ O tratamento sintomático

da DA envolve em princípio a restauração da função colinérgica, sugerindo que um aumento nos níveis de acetilcolina seria útil melhorando os sinais da doença apresentados por seus portadores.⁵⁶

Os chamados inibidores da enzima Acetilcolinesterase, que atuam melhorando a transmissão dos impulsos nervosos na sinápsis, foram as primeiras drogas investigadas no tratamento da DA. A AChE é impedida de provocar a hidrólise da acetilcolina por inibição da enzima com fármacos que interagem com a mesma, permitindo que a concentração do neurotransmissor (acetilcolina) seja mantida durante a condução dos sinais para os outros neurônios.⁴ A figura 5 (Página 30) mostra o sítio ativo da enzima Acetilcolinesterase e alguns dos resíduos de aminoácidos que o compõem.

Entre as drogas já aprovadas como fármacos pela FDA e no Brasil pela Anvisa para o tratamento da DA então a Tacrina⁵⁸ (**54**), Donepezil⁵⁸ (**55**), Rivastigmina⁵⁸ (**56**) e Galantamina⁵⁸ (**57**), um alcalóide isolado de espécies da família Amaryllidaceae. A figura 6 (Página 30) mostra a interação da AChE com um de seus inibidores.



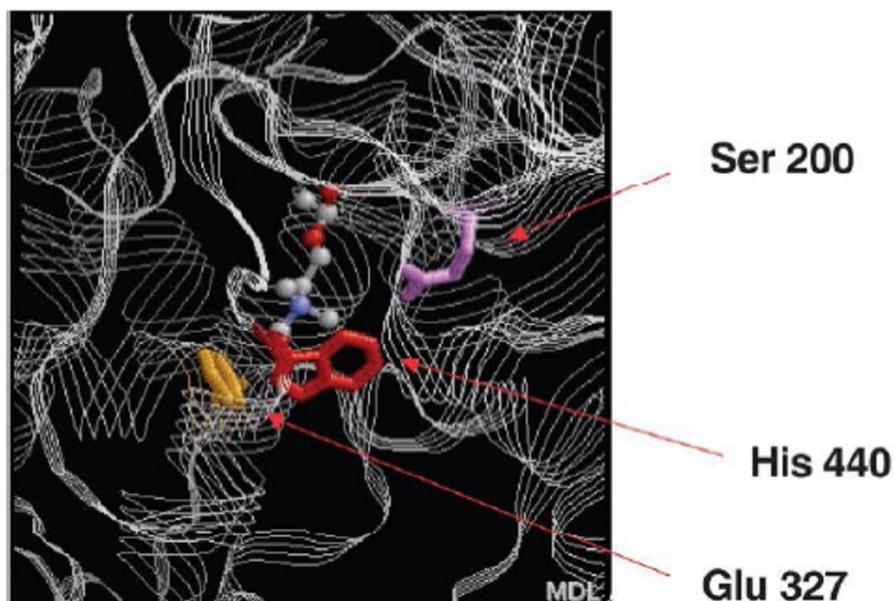


Figura 5: Visão do sítio ativo da Enzima Acetilcolinesterase e dos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica de ação.⁵⁷

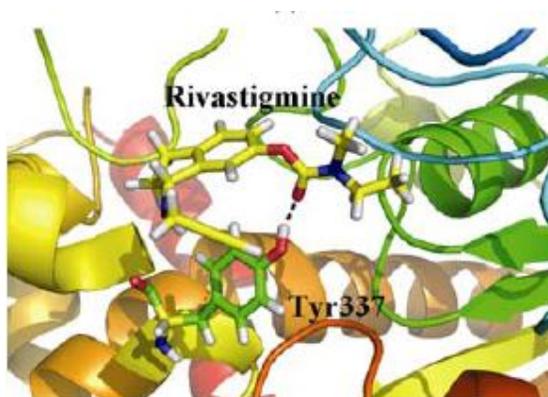


Figura 6: Docking mostrando a interação entre o sítio ativo da AChE e o Inibidor Rivastigmina.⁵⁹

O uso da Galantamina, um fármaco de origem natural, no tratamento de DA e a diversidade estrutural observada nos já conhecidos inibidores da AChE estimularam estudos fitoquímicos com diversas espécies de plantas. Na busca por drogas inibidoras de AChE que tenham menores riscos de efeitos colaterais, maior potência e ação prolongada, o potencial terapêutico das plantas medicinais brasileiras tem demonstrando sucesso. Os constituintes

ativos das plantas cada vez mais são pesquisados e associados ao tratamento de doenças, incluindo a DA. Barbosa-Filho e col.⁶⁰ em uma revisão publicada em 2006 consultaram 175 referências onde identificaram 309 plantas e 260 compostos isolados. Destes compostos, 139 eram pertencentes à classe dos alcalóides, metabólitos que continuamente são focos de pesquisas científicas para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase. Os autores observaram que, assim como os alcalóides, a maioria dos compostos utilizados como inibidores da AChE apresentavam a átomo de nitrogênio em suas estruturas. Portanto, a elevada atividade anticolinesterásica encontrada em plantas pode estar relacionada ao seu conteúdo alcaloídico.

3.3.3.2. Ação Inseticida

Os inseticidas são substâncias amplamente empregadas nas áreas agrícolas e em programas de saúde pública, para o controle de vetores que transmitem doenças ou causam queda na produtividade.⁶¹

Muitos dos inseticidas em uso atualmente pertencem à classe dos Organofosforados e Carbamatos. Esses inseticidas atuam como agentes anticolinesterásicos sendo capazes de inibir ou inativar a enzima Acetilcolinesterase através da ocupação irreversível do sítio ativo desta enzima. A Acetilcolinesterase é uma das enzimas mais importantes e necessárias para o funcionamento do sistema nervoso central de humanos e também de insetos.⁴

Na inibição da atividade da AChE, os inseticidas agem como pseudo-substrato do sítio ativo da enzima, impedindo a hidrólise da acetilcolina, resultando em um acúmulo desse neurotransmissor nas sinapses nervosas, o que desencadeia uma série de efeitos colinérgicos. Um indivíduo intoxicado por qualquer inibidor da AChE sofre uma sobre-estimulação dos receptores da AChE e morre por falência respiratória.⁶²⁻⁶³

Por anos os inseticidas sintéticos foram usados de forma indiscriminada para o controle químico de pragas, mas com o tempo acabavam perdendo o espectro de atividade que mostravam, ocasionando perda de eficácia, além de causarem impacto ambiental devido à contaminação do solo e água.⁶⁴ Percebeu-se que uma alternativa a esta situação seria a produção de inseticidas a partir de fontes naturais.

Pesquisas científicas na área de PN têm estudado a atividade inseticida das mais diversas famílias de plantas. É neste contexto que substâncias originadas do metabolismo vegetal que atuam como inibidores da AChE são investigadas, pois podem levar a protótipos de novos produtos inseticidas.⁶⁴

EXPERIMENTAL

4. EXPERIMENTAL

4.1. ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

4.1.1. Materiais e Métodos Cromatográficos

Nas separações por Cromatografia em Coluna (CC) utilizou-se sílica gel tipo 60 (Sorbent), 70-230 e 230-400 mesh como suporte sólido. Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio e sílica gel 60 F₂₅₄. Para Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) utilizou-se placas de vidro (20 x 20cm) recobertas com o adsorvente gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Sorbent).

A visualização das substâncias foi efetuada sob luz visível e lâmpadas ultravioleta com comprimento de onda $\lambda=254$ e 365 nm (Spectroline). Na revelação dos metabólitos utilizou-se reagente de Dragendorff preparado no laboratório para revelação dos alcalóides e nebulização com solução de ácido sulfúrico/etanol (5:95 v/v) seguido de aquecimento para revelação das lignanas e terpenos.

4.1.2. Reagentes e Solventes Utilizados

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho tiveram a procedência Belga, Vetec e Tedia, de grau comercial sendo purificados por técnicas específicas de destilação. O gradiente de polaridade das misturas de solventes usados nas CC, CCD e CCDP está indicado nos textos correspondentes e apresenta-se na proporção volume/volume (v/v).

4.1.3. Aparelhos Utilizados

Para obtenção dos extratos e frações suas concentrações foram realizadas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, com temperaturas inferiores a 60°C.

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizadas as técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para obtenção dos espectros de ¹H,

^{13}C e 2D (COSY, DEPT, entre outros). Foram empregados o aparelho Bruker DPX 200 (operando em 200,13MHz para ^1H e 50,32 para ^{13}C) e em alguns casos o aparelho Bruker DPX 400 (operando em 400,13MHz para ^1H e 100,62MHz para ^{13}C) do departamento de Química da UFSM.

Os Pontos de Fusão (PF) das substâncias foram determinados em aparelho MQAPF – 302 digital da MicroQuímica Equipamentos.

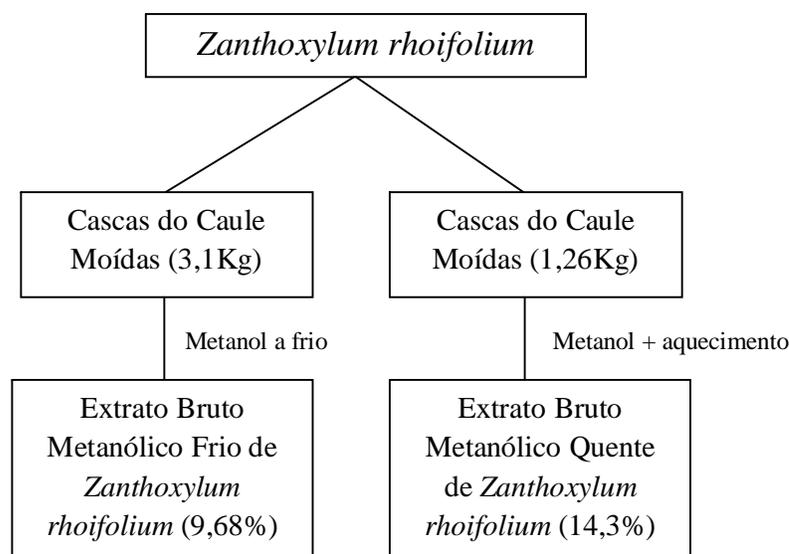
4.2. PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E DOS EXTRATOS

As cascas do caule das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale* foram utilizadas como material vegetal nos experimentos. Estas foram coletadas no município de Santana do Livramento – RS, no mês de setembro de 2008.

O material foi seco sob luz natural e após seco em estufa (50 °C). Posteriormente a secagem, realizou-se a trituração em moinho mecânico, obtendo-se 4,36Kg (*Z. rhoifolium*) e 4,43Kg (*Z. hyemale*) do material vegetal moído. As cascas do caule moídas da espécie *Z. rhoifolium* foram separadas em duas porções (3,1Kg e 1,26Kg) que foram submetidas a dois diferentes métodos de extração (quente e frio) para comparação dos rendimentos obtidos (Esquema 1). Todo o material obtido da espécie *Z. hyemale* foi empregado na obtenção do extrato bruto somente pelo método de extração a frio (Esquema 2).

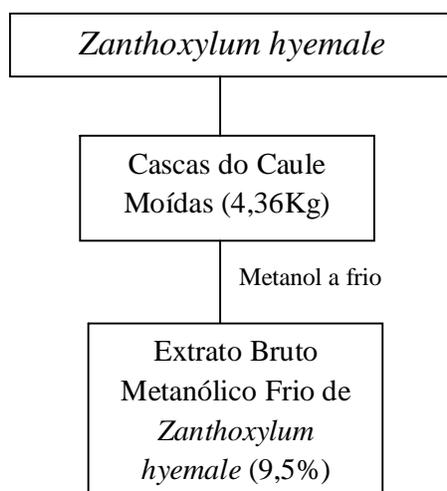
As cascas do caule de *Z. rhoifolium* (3,1Kg) foram suspensos em um balão de 5L contendo metanol em quantidade suficiente para recobrir toda planta. Este material permaneceu em temperatura ambiente para extração de seus componentes, sendo a troca do solvente realizada uma vez ao dia, durante dez dias. Desta forma foram obtidos 300,0g (9,68% do peso da casca do caule) de um resíduo viscoso escuro denominado extrato bruto metanólico frio de *Z. rhoifolium*.

A outra porção (1,26Kg) das cascas do caule moídas de *Z. rhoifolium* foi submetida a um novo processo de extração, com o intuito de comparar os métodos utilizados no preparo do extrato bruto quanto ao rendimento e a capacidade de extração dos metabólitos secundários da planta. Nesta etapa, as cascas do caule de *Z. rhoifolium* após secagem e moagem, foram conduzidas à extração com metanol utilizando aquecimento para obtenção do extrato bruto metanólico quente. O material vegetal foi colocado em balão de 5L contendo metanol numa quantidade suficiente para encobrir toda planta moída, em seguida o balão foi adaptado a uma manta térmica que promoveu o aquecimento necessário para a extração, ficando sob refluxo por um período de 4h. Posteriormente, o solvente foi filtrado e evaporado para concentração do extrato. Repetiu-se este procedimento por cinco dias, resultando em 180,0g (14,3% do peso da casca do caule) de um resíduo viscoso escuro denominado extrato bruto metanólico quente de *Z. rhoifolium*. No esquema 1 abaixo está demonstrado a preparação dos extratos brutos metanólicos quente e frio da espécie *Z. rhoifolium*.



Esquema 1: Preparação do extrato bruto metanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* pelos métodos de extrações com metanol a frio e a quente.

Para a espécie *Zanthoxylum hyemale*, a preparação do extrato bruto foi realizada através de extração com metanol a frio (Esquema 2). Os 4,36Kg das cascas do caule moídas desta espécie foram colocados em um balão de 5L contendo metanol suficiente para encobrir toda a planta. Este material permaneceu em temperatura ambiente para extração de seus componentes, sendo a troca do solvente realizada uma vez ao dia, durante dez dias. Desta forma foram obtidos 420,3g (9,5% do peso da casca do caule) de um resíduo viscoso de cor escura denominado extrato bruto metanólico frio de *Z. hyemale*.



Esquema 2: Preparação do extrato bruto metanólico de *Zanthoxylum hyemale* pelo método de extração a frio.

4.3. PARTICIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

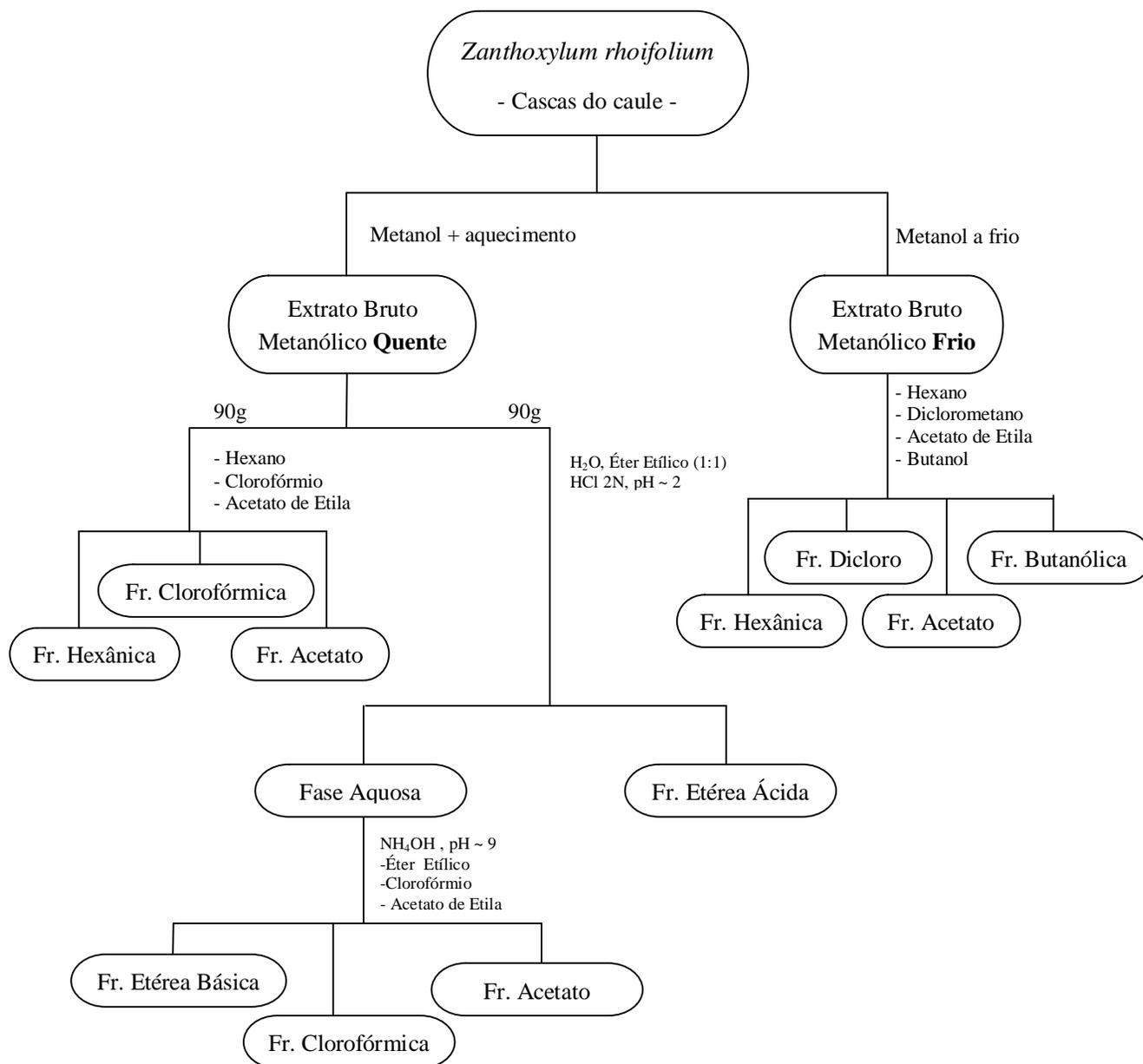
O extrato bruto metanólico frio obtido das cascas do caule da espécie *Z. rhoifolium* foi retomado em água e transferido para uma ampola de separação onde foi efetuado o fracionamento por partição seqüencial utilizando solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (extração exaustiva). O solvente foi eliminado em evaporador rotatório para redução do volume e concentração das frações que foram obtidas: Fração Hexânica (FH), Fração Diclorometânica (FD), Fração Acetato de Etila (FA) e Fração Butanólica (FB).

Particionou-se o extrato bruto metanólico quente da espécie *Z. rhoifolium* através do emprego de dois diferentes sistemas de extração, tendo por finalidade avaliar a forma de fracionamento com melhor capacidade em extrair os metabólitos secundários das plantas, principalmente os alcalóides. Assim, o extrato bruto metanólico quente de *Z. rhoifolium*, foi dividido em duas partes e fracionado fazendo uso de sistema neutro e também de sistema ácido/base de partição.

Para o fracionamento pelo sistema neutro do extrato bruto metanólico quente de *Z. rhoifolium*, fez-se a solubilização de 90g deste extrato em água destilada que posteriormente foram transferidas para uma ampola de separação. Seguiu-se com a adição de solventes numa ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila (100mL, extração exaustiva). A eliminação do solvente foi efetuada em rota evaporador para a concentração das frações obtidas: Fração Hexânica, Fração Clorofórmica e Fração Acetato de Etila.

No particionamento do extrato metanólico quente da espécie *Z. rhoifolium* pelo sistema ácido/base, 90g do extrato bruto foram dissolvidos em água destilada e transferidos para uma ampola de separação. A fração aquosa foi acidificada com solução 2N de ácido clorídrico (HCl) (pH~2) e extraída com éter etílico. Eliminou-se o solvente em rota evaporador, obtendo-se desta maneira a Fração Etérea Ácida (FEA). A fração aquosa remanescente foi alcalinizada com solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH~9 e extraída sucessivamente com éter etílico, clorofórmio e finalmente com acetato de etila. Após cada extração, efetuou-se a evaporação do solvente em rota evaporador para concentração das frações resultantes, Fração Etérea Básica (FEB), Fração Clorofórmica Básica (FCB) e Fração Acetato Básica (FAB).

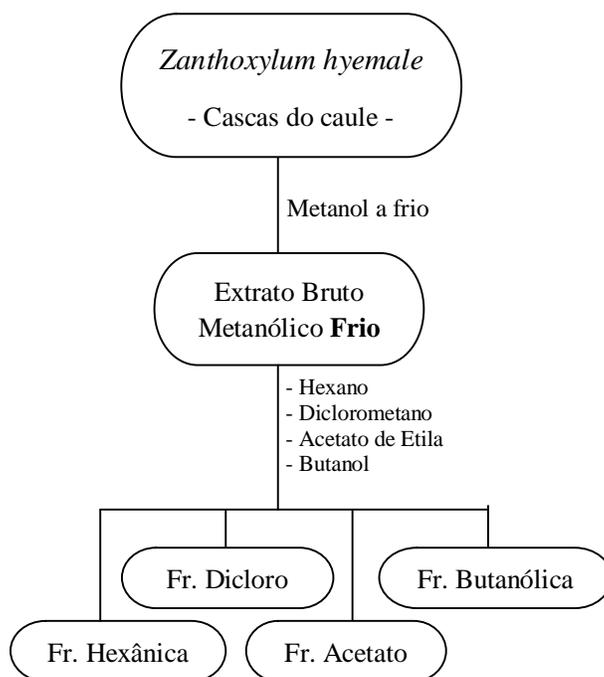
No esquema 3 está representado o modo de fracionamento a que foi submetido os extratos brutos metanólicos frio e quente obtidos das cascas do caule da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.



Esquema 3: Fracionamento dos extratos brutos metanólicos frio e quente da espécie *Z. rhoifolium*. Extrato bruto metanólico frio particionado pelo sistema neutro. Extrato bruto metanólico quente particionado por dois diferentes sistemas de solventes: neutro e ácido/base.

Da espécie *Z. hyemale*, o extrato bruto metanólico frio obtido das cascas do caule foi retomado em água e transferido para uma ampola de separação onde foi efetuado o fracionamento por partição seqüencial utilizando solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (extração exaustiva). O solvente foi eliminado em evaporador rotatório para redução do volume e concentração das frações que foram obtidas:

Fração Hexânica (FH), Fração Diclorometânica (FD), Fração Acetato de Etila (FA) e Fração Butanólica (FB). No esquema 4 está demonstrado o modo de fracionamento a que foi submetido o extrato bruto metanólico frio da espécie *Z. hyemale*.



Esquema 4: Fracionamento do extrato bruto metanólico frio da espécie *Z. hyemale* pelo sistema neutro.

Todas as frações obtidas com o fracionamento das duas espécies estudadas, devidamente pesadas para determinação dos rendimentos, foram analisadas em CCD para revelação dos metabólitos extraídos. As placas em CCD foram tratadas com reativo de Dragendorff na intenção de verificar qual dos sistemas de particionamento utilizados detinha o maior poder de extração dos alcalóides existentes na planta.

4.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Efetuaram-se CCDs das frações obtidas do extrato bruto frio das espécies *Z. rhoifolium* e *Z. hyemale* para uma prévia avaliação dos componentes extraídos. Foram empregados como eluente hexano (100%) para a FH; diclorometano:hexano (20:80 v/v) para a FD; acetato de

etila/diclorometano (20:80 v/v) para a FA e metanol:diclorometano (10:90 v/v) para a FB. Após eluição no solvente, as placas cromatográficas foram borrifadas com reagente de Dragendorff e reveladas posteriormente com solução de ácido sulfúrico/etanol e aquecimento para avaliação quanto à presença de metabólitos secundários.

Todas as frações mostraram alguns pontos de revelação positiva frente ao reagente de Dragendorff. As frações hexânica e diclorometânica da espécie *Z. rhoifolium*, e a fração diclorometânica da espécie *Z. hyemale* devido à apresentarem uma menor complexidade de separação dos Rf's das substâncias presentes e por terem melhor revelação com Dragendorff, foram então, analisadas individualmente.

4.4.1. Fração Hexânica obtida do particionamento do extrato bruto metanólico frio de *Zanthoxylum rhoifolium*

Para o isolamento das substâncias presentes, esta fração (20g) foi primeiramente submetida a uma separação através de CC empregando sílica gel convencional (370g) como fase estacionária e hexano/acetato de etila num gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Obteve-se assim, 80 subfrações que foram coletadas em frascos de 100 mL cada e rotaevaporadas para redução do solvente. Após evaporação, as subfrações foram analisadas individualmente por CCD e unidas por suas semelhança em Rf (Tabela 1).

Tabela 1: Separação em CC da fração hexânica obtida do extrato bruto metanólico frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*

FRAÇÕES	% SOLVENTES	PESO
I – 1 a 6	Hexano 10%	3,1g
II – 7 a 12	Acetato/ Hexano 5%	3g
III – 13 a 21	Ac / Hex 10%	1,4g
IV – 22 a 34	Ac/Hex 20%	1,6g

V – 35 a 50	Ac /Hex 30%	2,8g
VI – 51 a 63	Ac /Hex 50%	1,04g
VII – 64 a 74	Acetato 100%	2,3g
VIII – 75 a 80	Metanol 100%	3,2g

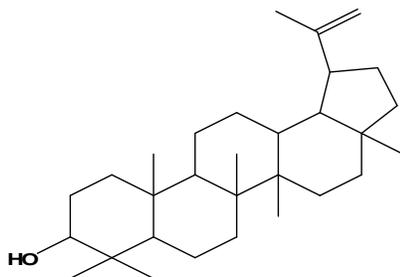
A subfração II (3g) (amostras 7 a 12), que apresentava menor complexidade para separação, novamente foi analisada por CC, com hexano/diclorometano/acetato de etila num gradiente crescente de polaridade. Esta separação resultou em 15 subfrações de 30mL cada, as quais foram reunidas em 15 frações (II-1 a II-15) após análise por CCD. A fração II-12 (350mg) que apresentou uma melhor separação de seus componentes por CCD foi, outra vez, submetida a separação por CC, utilizando sílica gel convencional como fase estacionária e hexano/diclorometano/acetato de etila como solventes, resultando em 36 subfrações. Esta forma de separação está demonstrada na tabela 2.

Tabela 2: Separação em CC da subfração II-12.

SUBFRAÇÕES	%SOLVENTES	SUBSTÂNCIAS	PESO (mg)
A- 1 a 13	Hex/Dicloro 10%	Lupeol + Mistura	180
B- 14 a 15	Hex/Dicloro 20%	Sesamina + Mistura	48
C- 16 a 18	Hex/Dicloro 30%	Mistura	14
D-19	Dicloro 100%	Mistura	10
E- 20 a 23	Dicl/Acet 10%	Mistura	30
F- 24 a 27	Dicl/Acet 20%	Mistura	15
G- 28 a 33	Dicl/Acet 50%	Mistura	25
H- 34 a 36	Metanol 100%	Mistura	10

4.4.1.1. Compostos isolados e identificados da Fração Hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium*

4.4.1.1.1 Lupeol (33)

**33**

Este metabólito (160mg) foi isolado na forma de um sólido branco após ser feita nova CC da subfração II-12-A obtida da FH. Foi utilizado como sistema de solvente para sua purificação diclorometano: hexano (20:80 v/v). Em revelação UV não foi visualizado e ao ser revelado com ácido sulfúrico:etanol (5:95 v/v) seguido de aquecimento apresentou coloração escura. Quando testado por CCD em alguns sistemas de solventes apresentou-se puro. Pela semelhança deste composto com outro metabólito isolado anteriormente desta espécie pelo grupo, fez-se comparação das amostras por CCD, mostrando ambas o mesmo Rf. As análises de RMN de ^1H e ^{13}C realizadas e a comparação dos dados obtidos com dados já descrito na literatura permitiram confirmar a estrutura do composto como o triterpene Lupeol (**33**).

Caracterização de Lupeol

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$

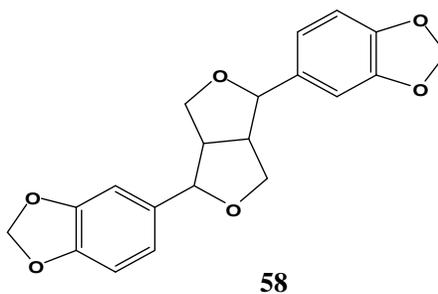
Rf: 0,42 (acetato de etila:hexano 10:90 v/v)

Ponto de Fusão: 197,5 – 202,0 °C (Literatura: 198 – 200 °C)⁴¹

Massa molecular: 410

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ= 4,68/4,56 (1H, s, H-29, -29'), 3,17 (1H, dd, H-3); 2,36 (1H, m, H-19); 1,91 (1H, m, H-13); 0,75, 0,78, 0,82, 0,94, 0,96, 1,02, 1,65 (3H, s, CH₃-23, -24, -25, -26, -27, -28, -30), 0,65 – 1,65 (m, outros hidrogênios).

4.4.1.1.2. Sesamina (58)



A substância **58** (18mg) foi obtida na forma de um sólido branco quando purificada. Foi isolada da subfração II-12-B (Tabela 2) da FH, sendo utilizado como sistema de solvente diclorometano:hexano (20:80 v/v) para eluição da CC e purificada por CCDP com diclorometano:hexano (30:70 v/v) como solvente. Apresenta coloração azul em luz ultravioleta e revela em ácido/etanol sob aquecimento.

Caracterização de Sesamina

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: C₂₀H₁₈O₆

Rf: 0,46 (clorofórmio 100%)

Ponto de Fusão: 121,2 – 123,4 °C (Literatura: 122 – 123 °C)⁴¹

Massa molecular: 354

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3): δ = 3,04 (1H, dd, H-2); 3,86 (1H, dd, J=3,2 e 9,2Hz, H-1a); 4,22 (1H, dd, J=6,6 e 8,8Hz, H-1b); 4,70 (1H, dd, J=3,8Hz, H-3); 5,94 (1H, s, H-10); 6,78 (1H, d, J=8,0 Hz, H-6); 6,84 (1H,s, H-9)

RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3): δ = 54,24 (C-2), 71,62 (C-1), 85,70 (C-3), 100,99 (C-10), 106,42 (C-6), 108,10 (C-5), 119,27 (C-9), 134,99 (C-4), 147,03 (C-7), 147,89 (C-8)

4.4.2. Fração Diclorometânica obtida do particionamento do extrato bruto metanólico frio de *Zanthoxylum rhoifolium*

A quantidade obtida desta fração (6g) foi cromatografada por coluna para separação dos compostos presentes, utilizando sílica gel 60 (180g) como suporte sólido e diclorometano/acetato de etila/metanol num gradiente crescente de polaridade como solventes. Frações de 50 mL cada foram coletadas e concentradas em rota evaporador até a completa remoção do solvente. As 360 subfrações obtidas foram agrupadas após análise por CCD, em 25 amostras com perfis cromatográficos semelhantes (Tabela 3). As CCDs das amostras que apresentaram revelação positiva frente ao reagente de Dragendorff e boa separação de seus componentes foram submetidas a novas separações cromatográficas (coluna e preparativa).

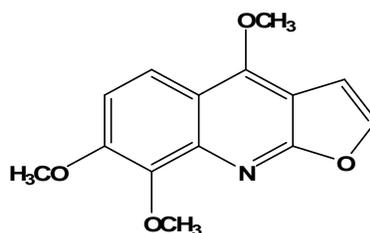
Tabela 3: Separação por CC da fração diclorometânica obtida do extrato bruto metanólico frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.

SUBFRAÇÕES	% SOLVENTE	SUBSTÂNCIAS	PESO (mg)
I - 1 a 17	Dicloro 100%	Mistura de Subst.	157
II - 18 a 30	Dicloro 100%	Diidroavicina + Mistura	316
III - 31 a 43	Acet/Dicl 1%	Diidrocheler. + Mistura	104
IV - 44 a 100	Acet/Dicl 1%	Mistura de Subst.	169
V - 101 a 121	Acet/Dicl 3%	γ -Fagarina + Mistura	270

VI - 122 a 127	Acet/Dicl 3%	Mistura de Subst.	83
VII - 128 a 140	Acet/Dicl 6%	Zantoxilina + Mistura	190
VIII - 141 a 153	Acet/Dicl 10%	Mistura de Subst.	215
IX - 154 a 165	Acet/Dicl 10%	Mistura de Subst.	300
X - 166 a 173	Acet/Dicl 15%	Mistura de Subst.	233
XI - 174 a 198	Acet/Dicl 15%	Mist. + Skim. + 8-hidro.	150
XII - 199 a 215	Acet/Dicl 20%	Mistura de Subst.	314
XIII - 216 a 225	Acet/Dicl 30%	Mistura de Subst.	170
XIV - 226 a 248	Acet/Dicl 35%	Mistura de Subst.	169
XV - 249 a 260	Acet/Dicl 40%	Mistura de Subst.	277
XVI - 261 a 273	Acet/Dicl 50%	Mistura de Subst.	114
XVII - 274 a 284	Acetato 100%	Mistura de Subst.	86
XVIII - 285 a 300	Met/Acet 5%	Mistura de Subst.	258
XIX - 301 a 310	Met/Acet 10%	Mistura de Subst.	330
XX - 311 a 323	Met/Acet 15%	Mistura de Subst.	161
XXI - 324 a 330	Met/Acet 20%	Cheleritrina + Mistura	287
XXII - 331 a 339	Met/Acet 30%	Mistura de Subst.	180
XXIII - 340 a 348	Met/Acet 35%	Mistura de Subst.	120
XXIV - 349 a 356	Met/Acet 50%	Mistura de Subst.	173
XXV - 357 a 360	Metanol 100%	Mistura de Subst.	250

4.4.2.1. Compostos isolados e identificados da Fração Diclorometânica de *Zanthoxylum rhoifolium*.

4.4.2.1.1. Skimianina (8)



Este composto (10mg) foi retirado da subfração XI-195 obtida da FD. A subfração foi separada por CC e então purificada por CCDP utilizando metanol:diclorometano (1:99 v/v) como eluente. O composto mostrou revelação positiva com Dragendorff sugerindo tratar-se de um alcalóide. Testes em diferentes sistemas de solvente foram executados para comprovar sua pureza.

Caracterização de Skimianina

Aspecto físico: sólido branco cristalino

Fórmula molecular: C₁₄H₁₃O₄N

Rf: 0,55 (acetato de etila:diclorometano 20:80 v/v)

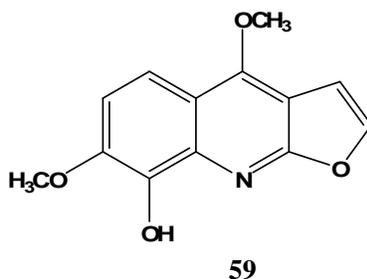
Ponto de Fusão: 163,5 – 169 °C (Literatura: 177 – 179 °C)²⁵

Massa molecular: 259

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ= 4,02 (3H, s, H-12), 4,11 (3H, s, H-11), 4,42 (3H, s, H-10), 7,03 (1H, d, J=2,8Hz, H-3), 7,22 (1H, d, J=9,4Hz, H-6), 7,57 (1H, d, J=2,8Hz, H-2), 8,00 (1H, d, J=9,4Hz, H-5)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ= 56,73 (C-12), 58,90 (C-10), 61,58 (C-11), 101,92 (C-3a), 104,56 (C-3), 111,98 (C-6), 114,81 (C-4a), 118,09 (C-5), 141,41 (C-7), 141,97 (C-8a), 142,90 (C-2), 152,06 (C-8), 157,10 (C-4), 164,29 (C-9a)

4.4.2.1.2. 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (59)



Este composto (9mg), juntamente com o metabólito **8**, foi retirado da subfração XI-195 obtida da FD. Após separação por CC esta subfração foi purificada por CCDP utilizando metanol:diclorometano (1:99 v/v) como eluente. O composto mostrou revelação positiva com Dragendorff sugerindo a presença de nitrogênio básico característico de alcalóide.

Caracterização de 8-hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico

Aspecto físico: sólido amarelo claro

Fórmula molecular: C₁₃H₁₁O₄N

Rf: 0,38 (diclorometano 100%)

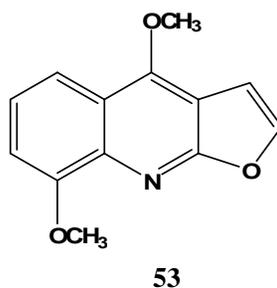
Ponto de Fusão: 110,0 °C (Literatura: 129-130°C)²⁵

Massa molecular: 245

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ= 4,21 (3H, s, H-10); 4,42 (3H, s, H-11); 7,04 (1H, d, J=2,8 Hz, H-3); 7,17 (1H, d, J=9,2Hz, H-6); 7,57 (1H, d, J=2,8Hz, H-2); 7,96 (1H, d, J=9,2Hz, H-5)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ= 58,98 (C-10), 61,97 (C-11), 101,71 (C-3a), 104,77 (C-3), 114,42 (C-4a), 114,57 (C-6), 118,71 (C-5), 138,61 (C-7), 140,55 (C-8a), 142,69 (C-2), 149,08 (C-8), 157,48 (C-4), 164,04 (C-9a)

4.4.2.1.3. γ-Fagarina (**53**)



A substância **53** apresentou-se como um sólido amarelo alaranjado quando purificada. Conduziu-se o isolamento deste composto após separação em CC da fração V-110 (Tabela 3)

seguido de análise em CCDP com hexano:diclorometano (1:2 v/v). Apresentava resultado positivo quando revelado em CCD com reativo de Dragendorff, sendo caracterizado como alcalóide.

Caracterização de γ -Fagarina

Aspecto físico: sólido amarelo alaranjado

Fórmula molecular: C₁₃H₁₁O₃N

Rf: 0,44 (acetato de etila:clorofórmio 5:95 v/v)

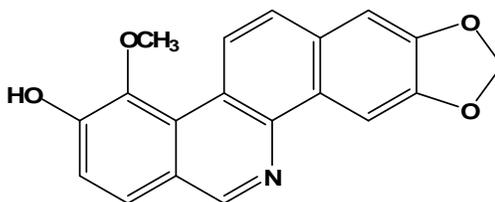
Ponto de Fusão: 140 °C (Literatura: 142-145 °C)³⁸

Massa molecular: 229

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ = 4,07 (3H, s, H-11), 4,42 (3H, s, H-10), 7,04 (1H, d, J=7,6Hz, H-7), 7,06 (1H, d, J=2,8 Hz, H-3), 7,34 (1H, dd, J=8,6 e 7,6Hz, H-6), 7,63 (1H, d, J=2,8Hz, H-2), 7,82 (1H, d, J=8,6Hz, H-5)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ = 55,88 (C-11), 58,93 (C-10), 103,79 (C-3a), 104,47 (C-3), 107,66 (C-7), 114,02 (C-5), 119,58 (C-4a), 123,36 (C-6), 137,42 (C-8a), 143,81 (C-2), 154,48 (C-8), 156,81 (C-4), 163,15 (C-9a)

4.4.2.1.4. Zantoxilina (60)



60

A substância **60** foi retirada em pequena quantidade (5mg) da subfração VII-128 (Tabela 3) obtida da FD. Após solubilização com diclorometano e lavagem com metanol formou-se um precipitado ao fundo do balão, que foi separado do líquido, lavado com hexano

e novamente com metanol. Em seguida o precipitado foi solubilizado com diclorometano e analisado por CCD, mostrando-se puro e revelando positivamente em reativo de Dragendorff, indicando a presença de nitrogênio básico na estrutura molecular, característico de alcalóides.

Caracterização de Zantoxilina

Aspecto físico: sólido marrom

Fórmula molecular: C₁₉H₁₃O₄N

Rf: 0,62 (acetato de etila:clorofórmio 25:75 v/v)

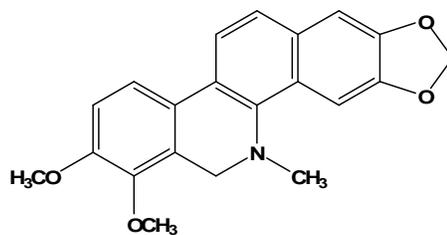
Ponto de Fusão: 234,2 – 236 °C (Literatura: 233°C)³⁸

Massa molecular: 319

RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ= 4,01 (3H, s, H-14), 6,21 (2H, s, H-13), 7,49 (1H, s, H-1), 7,57 (1H, d, J=8,8Hz, H-8), 7,95 (1H, d, J=8,8Hz, H-12), 8,45 (1H, d, J=8,8Hz, H-11), 8,50 (1H, d, J=8,8Hz, H-7), 8,53 (1H, s, H-4), 9,57 (1H, s, H-6)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO): δ= 61,16 (C-14), 100,83 (C-13), 101,43 (C-4), 104,46 (C-1), 118,60 (C-11), 118,72 (C-7), 119,97 (C-8), 121,58 (C-10b), 123,52 (C-10a), 126,31 (C-12), 127,03 (C-6a), 128,23 (C-4a), 129,12 (C-12a), 138,60 (C-4b), 142,06 (C-10), 145,76 (C-6), 147,47 (C-2), 147,84 (C-3), 148,08 (C-9).

4.4.2.1.5. Diidrocheleritrina (50)



50

O alcalóide Diidrocheleritrina (**50**) (21mg) foi identificado na subfração III obtida da FD, que foi purificada por CCDP com acetato de etila:clorofórmio (2:98 v/v). Apresentou-se como um sólido amarelo reagindo de forma positiva com o reagente de Dragendorff e mostrando coloração azul em ambos os comprimentos de onda da luz ultravioleta, característico de alcalóides do tipo benzofenantridínicos.

Caracterização de Diidrocheleritrina

Aspecto físico: sólido amarelo

Fórmula molecular: C₂₁H₁₉O₄N

Rf: 0,66 (acetato de etila:hexano 20:80 v/v)

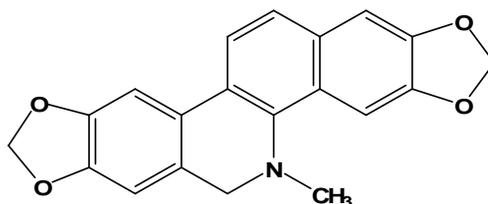
Ponto de Fusão: 161,8-163,6 °C (Literatura: 160-161°C)⁴¹

Massa molecular: 349

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ= 2,58 (3H, s, H-14), 3,86 (3H, s, H-15), 3,91 (3H, s, H-16), 4,28 (1H, s, H-4), 6,03 (2H, s, H-13), 6,92 (1H, d, J=8,4Hz, H-9), 7,01 (1H, s, H-1), 7,46 (1H, d, J=8,6Hz, H-12), 7,49 (1H, d, J=8,6Hz, H-10), 7,66 (1H, s, H-4), 7,68 (1H, d, J=8,6Hz, H-11)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ= 41,26 (C-14), 48,69 (C-6), 55,76 (C-16), 61,05 (C-15), 100,67 (C-4), 100,97 (C-13), 104,30 (C-1), 110,92 (C-9), 118,63 (C-10), 120,07 (C-11), 123,73 (C-12), 124,20 (C-6a), 126,10 (C-10b), 126,21 (C-10a), 126,33 (C-4a), 130,76 (C-12a), 142,66 (C-4b), 146,05 (C-7), 147,42 (C-2), 148,02 (C-3), 152,22 (C-8).

4.4.2.1.6. Diidroavicina (61)



61

A substância identificada pela estrutura **61** (32mg) foi isolada da subfração II (Tabela 3) da FD. Sua purificação foi obtida por CCDP com hexano:diclorometano (1:1 v/v). Ao ser visualizada em UV revelava como uma única mancha azul, que quando tratada com reativo de Dragendorff reagia positivamente, revelando uma mancha laranja na CCD.

Caracterização de Diidroavicina

Aspecto físico: sólido amarelo claro

Fórmula molecular: C₂₁H₁₉O₄N

Rf: 0,58 (clorofórmio 100%)

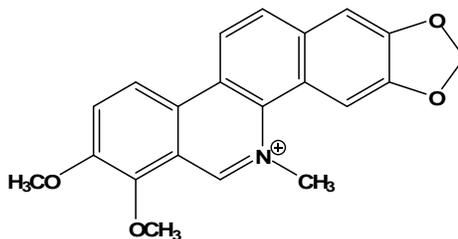
Ponto de Fusão: 199 – 202°C

Massa molecular: 319

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ= 2,58 (3H, s, H-15), 4,09 (2H, s, H-6), 5,98 (2H, s, H-14), 6,04 (2H, s, H-13), 6,76 (1H, s, H-7), 7,10 (1H, s, H-1), 7,27 (1H, s, H-10), 7,47 (1H, d, J=8,4Hz, H-12), 7,61 (1H, d, J=8,4Hz, H-11), 7,64 (1H, s, H-4)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ= 40,73 (C-15), 55,13 (C-6), 100,68 (C-4), 100,90 (C-14), 103,58 (C-10), 104,32 (C-1), 107,39 (C-7), 120,08 (C-11), 123,84 (C-12), 124,48 (C-10b), 125,77 (C-6a), 126,28 (C-10b), 128,38 (C-4a), 130,80 (C-12a), 142,74 (C-4b), 147,01 (C-9), 147,44 (C-8), 147,51 (C-3), 148,09 (C-2).

4.4.2.1.7. Cheleritrina (20)



20

Este metabólito (150mg – sólido alaranjado) foi isolado da subfração XXI – 325 (Tabela 3) da FD, purificado em CCDP com 10% de metanol em acetato de etila. Ao ser analisado em CCD apresentou-se puro, reagindo positivamente com reagente de Dragendorff. Algumas características observadas para este metabólito (polaridade, coloração, forma de revelação em CCD) assemelhavam-se ao composto Cheleritrina (**20**) isolado anteriormente desta mesma espécie. Assim, fez-se uma comparação entre o padrão do composto existente no laboratório e o metabólito isolado, ambos apresentando o mesmo Rf.

Caracterização de Cheleritrina

Aspecto físico: sólido alaranjado

Fórmula molecular: C₂₁H₁₈O₄N

Rf: 0,38 (metanol:clorofórmio 5:95 v:v)

Ponto de Fusão: 193 °C (Literatura: 191-193°C)⁴¹

Massa molecular: 348

RMN ¹H (200 MHz, DMSO): δ= 4,08 (3H, s, H-15), 4,16 (3H, s, H-16), 4,94 (3H, s, H-14), 6,30 (2H, s, H-13), 7,65 (1H, s, H-1), 8,19 (1H, d, J=8,4Hz, H-10), 8,20 (1H, d, J= 9,6 Hz, H-12), 8,21 (1H, s, H-4), 8,66 (1H, d, J=9,6Hz, H-11), 8,68 (1H, d, J=8,6 Hz, H-9).

4.4.3. Precipitado do extrato bruto metanólico quente de *Zanthoxylum rhoifolium*

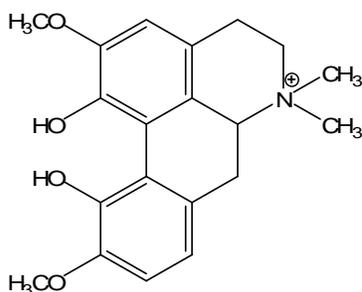
Quando no preparo do extrato bruto metanólico quente das cascas do caule da espécie *Z. rhoifolium*, ocorreu a precipitação de um sólido acinzentado. Este sólido foi lavado com metanol e a parte solubilizada (200mg) foi cromatografada em CC, utilizando sílica de fase reversa e água/metanol num gradiente decrescente de polaridade para eluição.

Obteve-se 20 subfrações que foram reunidas por semelhanças de seus Rf's. As subfrações foram analisadas por CCD e reagidas com Dragendorff. A subfração que

apresentou revelação positiva frente ao reagente de Dragendorff foi submetida a separações cromatográficas em CCDP para sua purificação.

4.4.3.1. Composto isolado e identificado do precipitado do extrato bruto metanólico quente de *Zanthoxylum rhoifolium*.

4.4.3.1.1. Magnoflorina (62)



62

As frações 4-6 (20mg) obtidas após eluição (utilizando água:metanol 1:1 v/v) da fração solúvel do precipitado do extrato bruto metanólico quente, que revelava em Dragendorff, foram reunidas e novamente cromatografadas em CCDP, utilizando metanol:acetato de etila (20:80 v/v). O composto obtido (5mg) foi analisado por CCD apresentando revelação positiva frente ao reagente de Dragendorff. Para elucidar sua estrutura, este metabólito foi submetido a análise de RMN de ^1H e ^{13}C .

Caracterização de Magnoflorina

Aspecto físico: sólido acinzentado

Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}$

Massa molecular: 316

RMN ¹H (400 MHz, MeOD): δ= 2,50 (1H, t, H-7), 2,63 (2H, m, H-4), 2,82 (3H, s, N-CH₃) 2,98 (1H, m, H-7), 3,14 (1H, m, H-5), 3,17 (1H, m, H-4), 3,25 (3H, s, N-CH₃), 3,48 (1H, m, H-6a), 3,45 (1H, m, H-5), 3,77 (3H, s, CH₃O-2), 3,80 (3H, s, CH₃O-10), 3,98 (1H, m, H-6a), 6,50 (1H, s, H-3), 6,51 (1H, d, H-8), 6,68 (1H, d, H-9).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD): δ= 24,74 (C-4), 31,78 (C-7), 43,57 (N-CH₃), 53,9 (N-CH₃), 56,08 (CH₃O-2), 56,36 (CH₃O-10), 62,47 (C-5), 71,28 (C-6a), 109,49 (C-3), 110,57 (C-9), 115,85 (C-3a), 117,04 (C-8), 121,09 (C-1b), 123,60 (C-11), 123,72 (C-1a), 126,09 (C-7a), 149,89 (C-11), 150,87 (C-1), 151,81 (C-10), 153,18 (C-2).

4.5. ESTUDO BIOGUIADO DE *Zanthoxylum hyemale*

Com a espécie *Zanthoxylum hyemale* optou-se por executar um fracionamento bioguiado. Esta abordagem é muito utilizada atualmente na área de PN e de fundamental importância, visto que o fracionamento dos extratos é feito com base nos resultados dos ensaios biológicos.

Neste estudo bioguiado, as frações obtidas da espécie *Z. hyemale* (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica), foram submetidas ao ensaio de inibição enzimática da AChE para identificar quais frações apresentariam atividade (ensaio realizado conforme descrito no item 4.8.1. da página 66). As frações com resultados positivos são consideradas candidatas a novos fracionamentos, com o objetivo de isolar e identificar os metabólitos presentes em tais frações que poderiam ser os responsáveis pela atividade verificada na fração.

Depois de realizado o ensaio, observou-se que a FD foi a fração que apresentou resultado positivo entre todas as analisadas da espécie *Zanthoxylum hyemale*.

4.5.1. Fração Diclorometânica obtida do particionamento de extrato bruto metanólico frio de *Zanthoxylum hyemale*

Esta fração (6,1g) foi separada por CC utilizando 120g de sílica gel convencional como suporte e diclorometano/acetato de etila num gradiente crescente de polaridade como eluente. Obteve-se 81 subfrações que foram novamente agrupadas após análise por CCD conforme semelhança dos Rf's em 11 frações (I a XI - Tabela 4). As frações I a VII por apresentarem melhores condições de separação e melhor revelação em Dragendorff e ácido/etanol com aquecimento, foram testadas novamente para atividade de inibição da AChE. A fração IV inibiu a enzima neste teste e foi então separada por CC para purificação de seus compostos. O metabólito em maior quantidade nesta fração foi isolado por precipitação com metanol após lavagem com diclorometano e identificado através de comparação com amostra autêntica existente no laboratório e através dos dados de RMN como sendo a amida Tembamida (**63**). Novamente analisado no teste da inibição da AChE, mostrou resultado positivo. Também foi realizado um teste, onde a CCD continha a amostra pura e a fração que continha a amostra. Desta forma, pode-se comparar que o metabólito isolado poderia ser o responsável pela atividade na fração da qual o composto foi isolado.

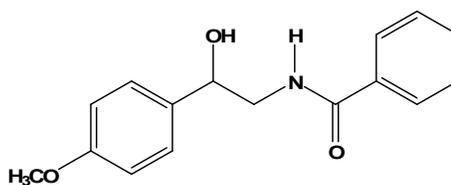
Tabela 4: Separação por CC da fração diclorometânica obtida do extrato bruto metanólico frio de *Zanthoxylum hyemale*.

SUBFRAÇÕES	% SOLVENTE	SUBSTÂNCIAS	PESO (mg)
I - 1 a 12	Dicloro 100%	Mistura de Subst.	1280
II - 13 e 14	Dicloro 100%	Mistura de Subst.	170
III - 15 a 21	Acet/Dicl 5%	Mistura de Subst.	438
IV - 22 a 33	Acet/Dicl 10%	Tembamida +Mistura	508
V - 34 a40	Acet/Dicl 20%	Mistura de Subst.	420
VI - 41 a 46	Acet/Dicl 30%	Mistura de Subst.	350
VII - 47 a 49	Acet/Dicl 50%	Mistura de Subst.	640
VIII - 50 a 52	Acetato 100%	Mistura de Subst.	260

IX - 53 a 56	Met/Acet 10%	Mistura de Subst.	390
X - 57 a 71	Met/Acet 10%	Mistura de Subst.	215
XI - 72 a 81	Met/Acet 50% + Met 100%	Mistura de Subst.	287

4.5.1.1. Composto isolado e identificado da Fração Diclorometânica de *Zanthoxylum hyemale*

4.5.1.1.1. Tembamida (63)



63

O metabólito (180mg) foi obtido após separação por CC da subfração IV (22 a 33-Tabela 4) retirada da FD. Desta subfração, que foi eluída com acetato de etila:diclorometano (10:90 v/v), ocorreu a precipitação de um sólido branco que foi solubilizado com metanol e precipitado novamente com a adição de diclorometano, separando-se quase totalmente das impurezas presentes. A purificação deste metabólito foi realizada por CCDP eluída com acetato de etila/diclorometano (1:1 v/v). Este composto não reagia positivamente com reagente de Dragendorff quando analisado por CCD, apenas era visualizado quando tratado com solução de ácido sulfúrico/etanol sob aquecimento como uma mancha marrom escura.

Caracterização de Tembamida

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: C₁₆H₁₇O₃N

Rf: 0,33 (acetato de etila:clorofórmio 25:75 v/v)

Ponto de Fusão: 150,5-153 °C (Literatura: 153 – 154 °C)³⁸

Massa molecular: 271

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ= 3,53 (1H, m, H-8); 3,81 (3H, s, H-17); 3,87 (1H, m, H-8); 4,91 (1H, dd, J=3,2 e 3,2Hz, H-4); 6,53 (1H, s, H-9), 6,90 (2H, d, J=8,8Hz, H-3), 7,33 (2H, d, J=7,6Hz, H-2 e H-6), 7,42 (2H, dd, J=7,6 e 7,6Hz, H-13 e H-15), 7,49 (2H, dd, J=7,6 e 7,6Hz, H-14), 7,75 (2H, d, J=7,6Hz, H-12)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ= 47,70 (C-8), 55,14 (C-17), 70,90 (C-7), 113,58 (C-3), 127,30 (C-12), 127,32 (C-2), 128,42 (C-13), 131,32 (C-14), 134,58 (C-11), 135,77 (C-1), 158,49 (C-4), 166,77 (C-10).

Devido ao metabólito **63** ter sido retirado da fração com resultado positivo frente ao ensaio de inibição da AchE, nesta etapa do trabalho optou-se por derivatizar o composto e então, após testar biologicamente os produtos obtidos, verificar a influência da estrutura química na atividade biológica por ventura apresentada por tais compostos.

4.6. DERIVATIZAÇÃO DA TEMBAMIDA

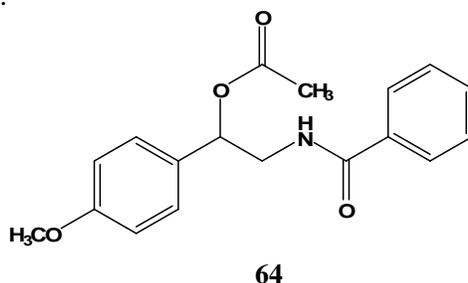
A derivatização do composto tembamida (**63**) isolado da espécie *Z. hyemale* foi realizada através de reações de acetilação, oxidação e benzilação, resultando em cinco produtos, cujas estruturas foram comprovadas por análise de RMN de ¹H e ¹³C.

4.6.1. Acetilação⁶⁵

O composto (**63**) (20mg) foi solubilizado em aproximadamente 2mL de piridina e tratado com anidrido acético (1mL). A mistura foi mantida sob agitação, sendo então adicionada uma pequena porção de DMAP. A agitação foi mantida por duas horas em

temperatura ambiente, onde fez-se o acompanhamento da reação por meio de CCD. Passada duas horas observou-se o final da reação.

O solvente foi evaporado em evaporador rotatório e após, seco sob vácuo, para eliminação total. A mistura foi vertida sobre água, lavada com solução de HCl (1%) e extraída com clorofórmio (3x5mL). Após secagem com sulfato de sódio anidro o solvente foi eliminado em rota evaporador. O produto foi purificado por CC utilizando sílica gel e acetato de etila:diclorometado (10:90 v/v) como solvente. Obteve-se 17mg do produto (**64**) com rendimento de 72,97%.



Caracterização de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: C₁₈H₁₉O₄N

Rf: 0,57 (acetato de etila:clorofórmio 10:90 v/v)

Ponto de Fusão: 137,8-141,3 °C

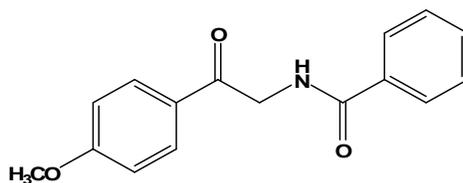
Massa molecular: 313

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ= 2,09 (3H, s, H-18), 3,80 (3H, s, H-19), 3,83 (2H, m, H-8), 5,94 (1H, dd, H-7), 6,47 (1H, s, H-9), 6,90 (2H, d, J= 8,8Hz, H-3), 7,32 (2H, d, J=8,8Hz, H-2), 7,42 (2H, dd, J=7,6 e 7,6Hz, H-13), 7,49 (1H, dd, J= 8,0 e 8,0Hz, H-14), 7,71 (2H, d, J=7,6Hz, H-12)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃): δ= 21,18 (C-18), 44,96 (C-8), 55,26 (C-19), 74,30 (C-7), 114,09 (C-3), 126,85 (C-12), 127,91 (C-2), 128,58 (C-13), 129,64 (C-14), 131,54 (C-11), 134,24 (C-1), 159,71 (C-4), 167,46 (C-10), 170,73 (C-17)

4.6.2. Oxidação⁶⁶

Solubilizou-se 20mg do composto tembamida (**63**) com 2mL de clorofórmio à quente em um balão de 25mL sob agitação. Uma pequena quantidade (ponta de espátula, três vezes) de PDC foi adicionada e a mistura permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por uma noite. Acompanhou-se o final da reação por CCD, sendo então adicionado 5mL de éter dietílico. A suspensão foi filtrada e o solvente evaporado sob vácuo. O resíduo foi dissolvido em 5mL de éter dietílico, lavado com água e seco com sulfato de sódio. Após filtração do conteúdo para separação do sulfato de sódio, o solvente foi evaporado. A oxidação resultou em 12mg do produto (**65**) com rendimento de 60,27%.



65

Caracterização de N-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: C₁₆H₁₅O₃N

Rf: 0,66 (acetato de etila:clorofórmio 10:90 v/v)

Ponto de Fusão: 92,0-94,7 °C

Massa molecular: 269

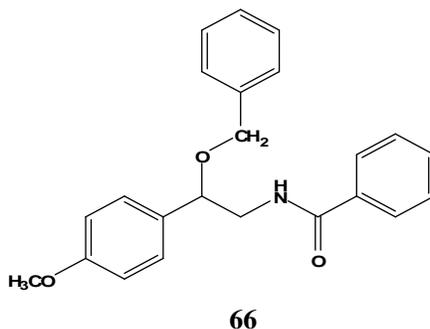
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ= 3,91 (3H, s, H-17), 4,92 (2H, s, H-8), 7,00 (2H, d, J= 8,8Hz, H-3), 7,35 (1H, s, H-9), 7,48 (2H, dd, J=7,6 e 7,6Hz, H-13), 7,52 (1H, dd, J=7,6 e 7,6Hz, H-14), 7,90 (2H, d, J= 7,2Hz, H-12), 8,02 (2H, d, J=8,8Hz, H-2)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃): δ= 46,46 (C-8), 55,56 (C-17), 114,16 (C-3), 127,10 (C-12), 127,36 (C-2), 128,58 (C-13), 130,31(C-14), 131,68 (C-11), 133,97 (C-1), 164,36 (C-4), 167,35 (C-10), 192,58 (C-7)

4.6.3. Benzilação⁶⁷

4.6.3.1. Com utilização de brometo de benzil

Pesou-se 20mg da substância à ser derivatizada (tembamida) que foi solubilizada em 2mL de THF em um balão de fundo redondo, ficando a mistura sob agitação até completa solubilização da tembamida. Mantendo-se a agitação, pequenas porções de NaH foram adicionadas e após 15 minutos, 0,8mL de brometo de benzila gota a gota também foram adicionado ao recipiente da reação. Em temperatura ambiente manteve-se a reação cujo andamento foi acompanhado por CCD. Depois de uma hora a reação estava finalizada. A adição de água à mistura teve como objetivo destruir qualquer resíduo de NaH que tenha permanecido sem reagir. Evaporou-se o solvente e seguiu-se a extração do produto, onde foi adicionado água, lavado com solução diluída de HCl e utilizado clorofórmio como agente extrator. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por filtração em coluna, utilizando clorofórmio como solvente. Desta reação obteve-se 5mg do produto (**66**), com rendimento de 18,71%.



Caracterização de N-(2-(benziloxi)-2-(4-metoxifenil etil) benzamida

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: C₂₃H₂₃O₃N

Rf: 0,69 (acetato de etila:clorofórmio 10:90 v/v)

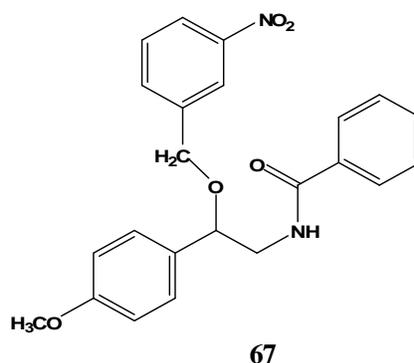
Ponto de Fusão: 88,5-93,0 °C

Massa molecular: 361

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ= 3,43 (1H, m, H-8), 3,83 (3H, s, H-24), 3,91 (1H, m, H-8), 4,27 (1H, d, J=12Hz, H-17), 4,53 (1H, d, J=12Hz, H-17), 4,54 (1H, dd, J=8,8Hz, H-7), 6,55 (1H, s, H-9), 6,94 (2H, d, J=8,4Hz, H-3), 7,30 (5H, d, H-19 a 23), 7,34 (2H, d, J=8,4Hz, H-2), 7,43 (2H, dd, J=8,0 e 8,0Hz, H-13), 7,49 (1H, dd, J= 7,2 e 7,2Hz, H-14), 7,69 (2H, d, J=8,0Hz, H-12).

4.6.3.2. Com utilização de brometo de 3-nitrobenzil

O composto tembamida (31mg) foi solubilizado em 2mL de THF e tratado com NaH e brometo de 3-nitrobenzila (27mg) adicionado em pequenas quantidades ao recipiente da reação, permanecendo em agitação à temperatura ambiente por cerca de duas horas quando o fim da reação foi verificado por CCD. A mistura foi vertida sobre água e o solvente evaporado. O produto obtido foi lavado com água e solução diluída de HCl e extraído com clorofórmio (3x5mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada. O produto (**67**) foi purificado em CC, obtendo-se 15mg e o rendimento da reação foi de 32,37%.



Caracterização de N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida

Aspecto físico: sólido amarelado

Fórmula molecular: C₂₃H₂₂O₅N₂

Rf: 0,77 (acetato de etila:clorofórmio 10:90 v/v)

Ponto de Fusão: 86,5-90,0 °C

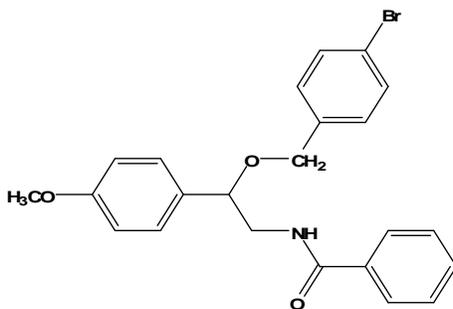
Massa molecular: 406

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ= 3,51 (1H, m, H-8a), 3,83 (3H, s, H-24), 3,92 (1H, m, H-8b), 4,48 (2H, dd, H-17), 4,60 (1H, m, H-7), 6,62 (1H, s, H-9), 6,94 (2H, d, J=8,6Hz, H-3), 7,33 (2H, d, J=8,6Hz, H-2), 7,47 (2H, m, H-19 e H-20), 7,54, (1H, t, H-13), 7,56 (1H, t, H-14), 7,74 (2H, d, J=8Hz, H-12), 8,11 (1H, d, J=8,8Hz, H-21), 8,19 (1H, s, H-23).

RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ= 46,00 (C-8), 55,28 (C-24), 69,16 (C-7), 80,19 (C-17), 114,27 (C-3), 122,32 (C-21), 122,61 (C-23), 126,80 (C-12), 128,04 (C-2), 128,61 (C-13), 129,32 (C-20), 130,48 (C-14), 131,58 (C-19), 133,43 (C-11), 134,22 (C-1), 140,29 (C-18), 148,26 (C-22), 159,75 (C-4), 167,36 (C-10).

4.6.3.3. Com utilização de brometo de 4-bromobenzil

27mg de tembamida foram solubilizadas em 2mL de THF em um balão de fundo redondo, ficando sob agitação até completa solubilização do composto. Mantendo-se a agitação, pequenas porções de NaH foram adicionadas e também 31mg de brometo de 4-bromobenzil em pequenas quantidades. A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente onde o andamento da reação foi acompanhado por CCD sendo finalizada após duas horas. Água foi adicionada à mistura reacional para que resíduos de NaH que tenham permanecido sem reagir fossem destruídos; após evaporou-se o solvente e lavou-se com água e solução diluída de HCl. Fez-se a extração do produto com clorofórmio sendo a fase orgânica seca, filtrada e evaporada. O produto (**68**) foi purificado em coluna com clorofórmio como solvente, onde foram obtidos 13mg com rendimento de 29,80%.



68

Caracterização de N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida

Aspecto físico: sólido branco

Fórmula molecular: C₂₃H₂₂O₃NBr

Rf: 0,86 (acetato de etila:clorofórmio 10:90 v/v)

Ponto de Fusão: 124,8-127,0 °C

Massa molecular: 439,5

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ= 3,44 (1H, m, H-8), 3,83 (3H, s, H-24), 3,84 (1H, m, H-8), 4,34 (2H, dd, H-17), 4,51(1H, m, H-7), 6,54 (1H, s, H-9), 6,94 (2H, d, J=8,6Hz, H-3), 7,15 (2H, d, J= 8,2Hz, H-2), 7,34 (2H, d, J=8,8Hz, H-19 e H-23), 7,44 (1H, H-20), 7,49 (1H, H-14), 7,51, (1H, H-13), 7,69 (2H, d, J=8Hz, H-12)

RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ= 46,00 (C-8), 55,28 (C-24), 69,67 (C-7), 79,58 (C-17), 114,12 (C-3), 121,67 (C-21), 126,81 (C-23), 128,03 (C-12), 128,57 (C-2), 129,52 (C-13), 130,83 (C-19), 131,50 (C-11), 131,56(C-1), 134,39 (C-18), 137,00 (C-22), 159,62 (C-4), 167,29 (C-10).

4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tendo o objetivo de avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações neste trabalho, foram utilizados dois processos. Em um ensaio qualitativo, aplicou-se o método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) descrito por Hostettmann,⁶⁸ onde o ensaio é feito através de um “screening” das amostras testadas. Outro método empregado foi o método quantitativo realizado pela medida da leitura da absorbância das amostras contra uma amostra em branco e um padrão (BHT).

4.7.1. Método do Radical Livre – Ensaio Qualitativo

O método fundamenta-se na redução do radical DPPH (avalia a capacidade dos compostos testados em serem doadores de hidrogênio - ação antioxidante). A solução do

DPPH possui uma coloração violeta que descolore progressivamente tornando-se amarelada, permitindo assim observar a ação antioxidante da amostra testada (Figura 7).

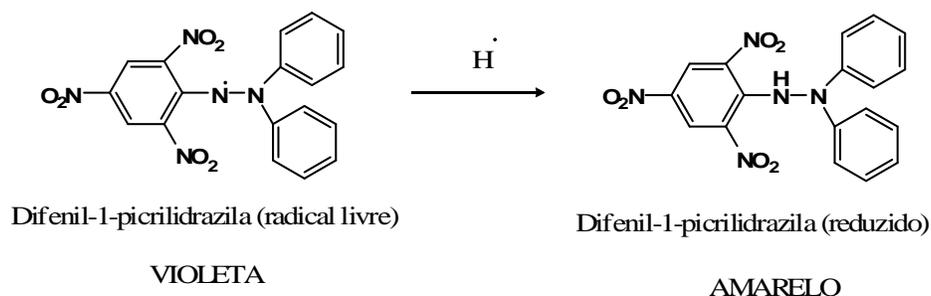


Figura 7: Redução do DPPH

Para a execução deste ensaio, as amostras a serem testadas (extratos, frações e os compostos **8**, **20**, **50**, **53**, **59**, **60**, **61**, **63**, **64** e **65**) foram solubilizadas em metanol e aplicadas pontualmente em cromatoplasmas na concentração de 30µg/mL e eluídas em solventes adequados conforme suas polaridades. O DPPH (solução metanólica de 0,2%) é aplicado através de borrifamento sobre as cromatoplasmas que ficam com a coloração violeta do DPPH. Estas são, então, deixadas em repouso por 30 minutos a 1 hora. As amostras testadas, quando ativas, descolorem o DPPH formando manchas claras sobre a placa violeta, que são avaliadas como atividade antioxidante positiva.

4.7.2. Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo

Quando a capacidade antioxidante é avaliada pelo método quantitativo, as amostras testadas juntamente com o padrão BHT (di-terc-butil metil fenol) são preparados nas concentrações de 20µg/mL em etanol. Em seguida, 1mL da amostra é transferida para tubos de ensaio onde é acrescentado 2mL de etanol, procedendo-se as diluições seriadas, até obter as concentrações de 500 a 3,09 µg/mL. A cada diluição foram acrescentados 0,5mL de solução de DPPH (0,004%). As amostras permanecem à temperatura ambiente por 30 minutos

sob proteção da luz. Após este tempo, a leitura da absorbância é feita em espectrofotômetro em 517nm para medir a redução do radical livre DPPH, contra uma amostra em branco preparada para cada diluição. Empregou-se uma solução de etanol (2mL) acrescentado de 0,5mL de solução metanólica 0,004% de DPPH como controle (sendo 0% de inibição).

A porcentagem de inibição para avaliar a atividade de captura do radical pelas amostras testadas é calculada pela fórmula demonstrada na equação abaixo, onde **Ac** é a absorbância da solução controle e **Aa** é a absorbância da amostra testada no tempo de 30 minutos.

$$\% \text{ inibição} = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$$

Foi obtida, através de regressão linear a partir das médias das porcentagens, a EC_{50} (concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH).

4.8. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.8.1. Determinação da Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

Para execução deste ensaio, utilizou-se o método elaborado por Martson e Hostettmann⁶⁹ para CCD que emprega o reagente colorimétrico Sal de Fast Blue B, solução da enzima acetilcolinesterase (250 U/mL) e albumina de soro bovino solubilizadas em solução tampão de ácido-tris-hidroclorídrico a pH 7,8 para borrifamento nas placas.

As placas de CCDs utilizadas no ensaio são previamente eluídas em acetona para que sejam removidos qualquer resíduo ou sujidade das mesmas. Os extratos e frações a serem testados são agrupados conforme semelhança de suas polaridades e, após serem solubilizados em solvente adequado de acordo com a solubilidade de cada amostra, são aplicados nas CCDs 1µL de uma solução contendo 20µg da substância, observando uma distância de no mínimo 0,5cm entre cada ponto de aplicação. Essas CCDs são então eluídas com solvente apropriado

conforme a polaridade das amostras. Após eluição, as placas são visualizadas em câmara de UV e marcam-se as manchas visualizadas nos dois comprimentos de onda.

Para as substâncias puras, inicialmente foi preparada uma solução de concentração 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada composto puro (2 mg) dissolvido em 500 μL de solvente (metanol, acetato de etila ou clorofórmio de acordo com a solubilidade de cada um). A partir da solução inicial foram realizadas diluições em série, obtendo-se assim novas soluções nas concentrações de 5,0; 1,0; 0,2; 0,04; $8,0 \cdot 10^{-3}$; $1,6 \cdot 10^{-3}$ e $3,2 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Foi aplicado na forma pontual, 1 μL de cada solução a ser testada na CCD, observando-se uma distância de 1,5 cm entre cada ponto de aplicação. Fisostigmina (ativa nas quantidades testadas de 5 a $6,0 \cdot 10^{-3}$ μg) foi utilizada como controle positivo neste ensaio.

Após preparação das CCDs, a solução da enzima é aplicada sobre as placas que novamente são secas e então incubadas. Para incubação utilizou-se atmosfera úmida a 37°C por 20 minutos. Passado esse tempo, são preparados imediatamente antes do uso, os reveladores Acetato de 1-naftila (12,5mg de acetato de 1-naftila em 5mL de etanol) e Solução de Fast Blue B (50mg de sal de Fast Blue B em 20mL de água destilada). As CCDs são então reveladas com estas soluções, onde os reveladores são aplicados na forma de borrifamento sobre as placas. Com a revelação, observa-se o aparecimento de coloração violeta sobre as placas, sendo que onde ocorre a inibição da enzima provocada pelos compostos testados visualiza-se o desenvolvimento de halos brancos no fundo violeta.

A figura 8 esquematiza a reação ocorrida no ensaio com o reagente Sal de Fast Blue B. O reagente Acetato de Naftila serve como substrato e sofre a quebra pela acetilcolinesterase formando o 1-naftol, o qual continua a reagir agora com o reagente colorimétrico Sal de Fast Blue B para formar um sal de Diazônio de coloração violeta. Os inibidores da enzima são diretamente detectados na CCD devido à formação de halos brancos sobre o fundo violeta.⁷⁰

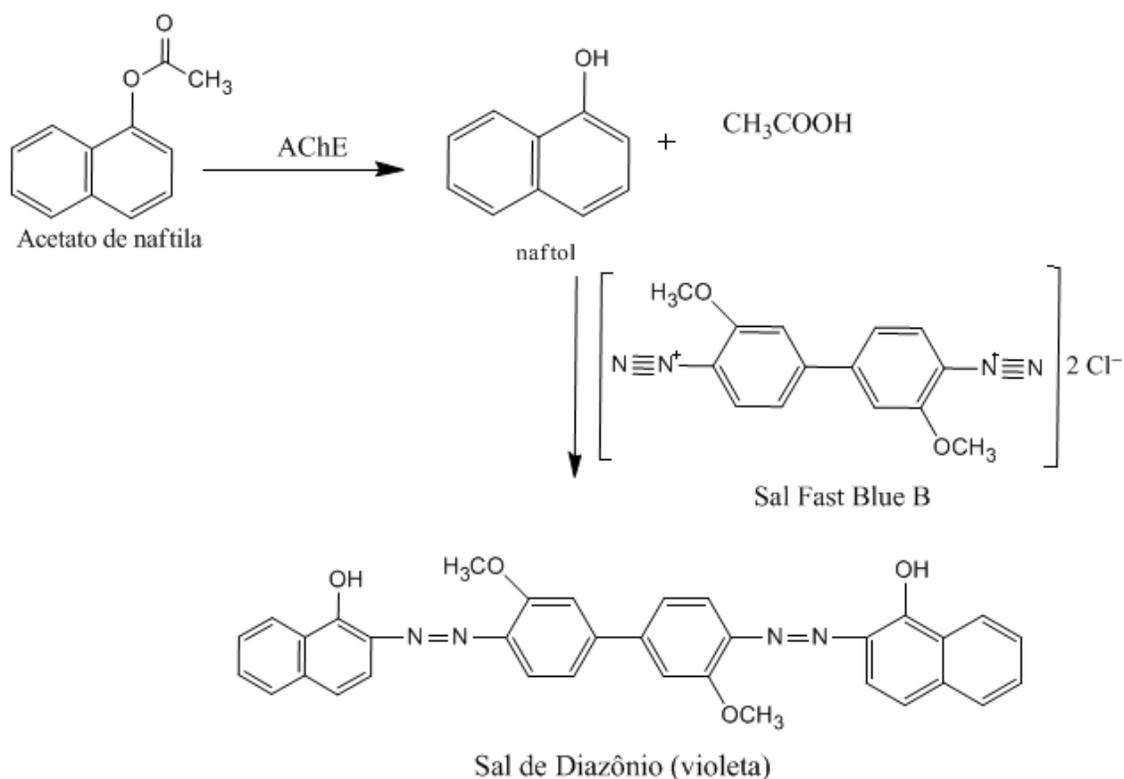


Figura 8: Reação do teste colorimétrico para revelação dos inibidores da AChE.

A atividade de inibição da AChE dos compostos é expressada como pMIQ, que representa o logaritmo negativo da mínima quantidade inibitória (em mol) que produziu uma mancha com o mínimo de brancura observável.⁷⁰ O limite de atividade é fixado em um pMIQ mínimo de 10,5. Compostos com valores de pMIQ abaixo deste são considerados inativos ou pouco ativos.

4.8.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição em Caldo

A susceptibilidade antimicrobiana de um composto é avaliada com base na determinação de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração do composto necessária para inibir o crescimento de um dado microrganismo após incubação *in*

vitro. Quanto menor a CIM, maior a potência do antimicrobiano e maior a dificuldade da bactéria ou fungo em desenvolver resistência.

Um grande número de trabalhos publicados faz referência à ação antimicrobiana de compostos isolados e/ou sintetizados, descrevendo a CIM de tais compostos. A maioria utiliza o Método da Microdiluição em Caldo⁷¹⁻⁷³ (diluições sucessivas) para essa determinação, que foi o método também empregado neste trabalho.

Ensaio:

Foram utilizados os seguintes microrganismos indicadores (cepas padrão ATCC):

Como representantes do grupo de microrganismos gram-positivos:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633);

Como representantes do grupo dos microrganismos gram-negativos:

- *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883);

Como representantes de leveduras:

- *Candida albicans* (ATCC 10231), *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) e *Cryptococcus neoformans*(ATCC 208821).

Os padrões antibióticos, preparados conforme FDA⁷⁴ empregados como referência foram Cloranfenicol e Nistatina para bactérias e leveduras, respectivamente. Sal de tetrazóleo (metiltiazol tetrazóleo, MTT; *p*-iodo tetrazóleo, INT; 2,3,5-trifenil tetrazóleo, TTC) foi o revelador deste ensaio, sendo que os microrganismos quando ativos colorem este sal, e a substância testada cria assim, uma zona de inibição possível de ser visualizada.

Os meios de culturas empregados foram:

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

- Caldo Sabouraud dextrosado (para leveduras): dextrose (40,0g), peptona de carne (5,0g), peptona de caseína (5,0g) e água destilada (1L).

A CIM foi determinada pelo Método de Microdiluição em Caldo, conforme recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratories Standards.⁷¹

As amostras a serem testadas foram diluídas em meio líquido (metanol, DMSO – 2,5 mg/mL) que continha 2% do surfactante Tween 80 e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 500 a 3,12 µg/mL. Cada poço foi inoculado com os microrganismos (1×10^6 células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias e por 48 horas a 25 °C para as leveduras. Passado o tempo de incubação foi possível observar a turvação do meio, que indicou o crescimento microbiano, determinando-se a CIM.

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

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Com o intuito de testar novas (e já existentes) atividades biológicas implantadas no NPPN, as espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*, estudadas anteriormente pelo grupo, foram novamente alvo de estudos para isolamento de metabólitos inéditos ou mesmo já isolados.

O fracionamento do extrato bruto metanólico frio das espécies *Z. rhoifolium* e *Z. hyemale* resultaram em quatro frações (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica). Apenas duas destas frações de *Z. rhoifolium* foram analisadas: frações hexânica e diclorometânica.

A investigação das FH e FD obtidas do extrato metanólico frio das cascas do caule de *Z. rhoifolium* através dos procedimentos descritos em Experimental (Página 40), conduziu ao isolamento e a identificação de dez compostos. Oito deles são alcalóides já classificados na literatura, como os alcalóides benzofenantridínicos Diidrocheleritrina, Diidroavicina, Cheleritrina e Zantoxilina, o alcalóide aporfínico Magnoflorina e os alcalóides furoquinolínicos Skimianina, 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico e γ -Fagarina. Também foi possível identificar o triterpeno Lupeol e a lignana Sesamina.

Com a espécie *Z. hyemale* realizou-se um estudo bioguiado, onde a análise das frações foi feita baseando-se em resultados obtidos com ensaios biológicos para avaliar a atividade das frações como inibidores da enzima acetilcolinesterase. Este estudo conduziu ao isolamento da amida Tembamida retirada da FD que havia apresentado resultado positivo no ensaio para inibição da AChE. O metabólito Tembamida foi derivatizado por meio de reações de acetilação, oxidação e benzilação, obtendo-se cinco produtos.

As estruturas de todos os compostos isolados ou sintetizados foram determinadas através de comparações por CCD, análise de dados espectroscópicos uni e bidimensionais (RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, COSY) e comparando os dados de deslocamento químicos obtidos

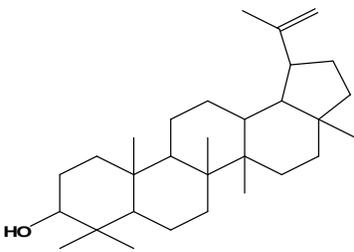
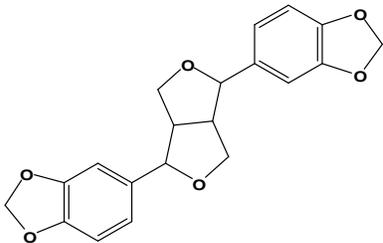
por RMN com os dados encontrados na literatura. Dados de PF e Rf também foram úteis para comprovação das estruturas.

Estes compostos, e ainda os extratos brutos e as frações dos extratos, foram submetidos a ensaios biológicos visando determinar suas atividades microbiológicas, como atividade antimicrobiana e atividade de inibição da AChE, além da atividade antioxidante.

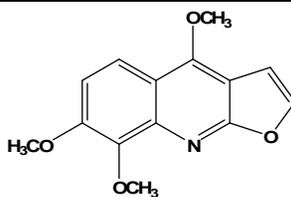
O trabalho descreve ainda o uso de diferentes métodos de extração no preparo do extrato bruto e diferentes métodos de particionamento deste extrato na obtenção das frações resultantes, para que fosse feita uma comparação quanto ao rendimento e eficiência na extração dos metabólitos secundários.

Abaixo, na tabela 5, estão demonstrados os compostos identificados durante a elaboração desta dissertação.

Tabela 5: Numeração, estrutura e nomenclatura dos compostos identificados.

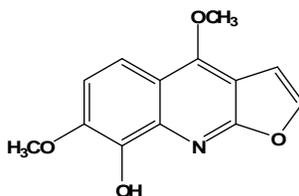
NUMERAÇÃO	ESTRUTURA	IDENTIFICAÇÃO
33		Lupeol (Isolamento: pg 43 Identificação: pg 79 Ensaio: pg 133)
58		Sesamina (Isolamento: pg 44 Identificação: pg 80)

8

**Skimianina**

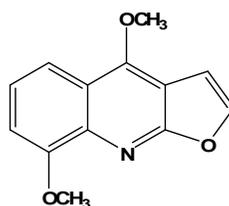
(Isolamento: pg 46
Identificação: pg 82
Ensaio: pg 119, 130 e 132)

59

**8-hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico**

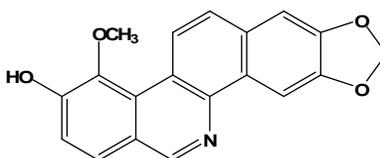
(Isolamento: pg 47
Identificação: pg 87
Ensaio: pg 119 e 132)

53

**γ-Fagarina**

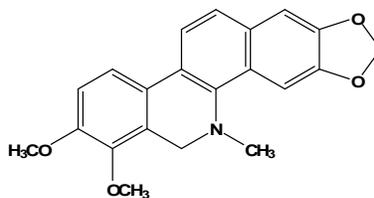
(Isolamento: pg 48
Identificação: pg 85
Ensaio: pg 119, 130 e 132)

60

**Zantoxilina**

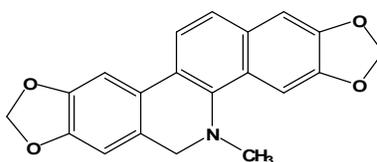
(Isolamento: pg 49
Identificação: pg 91
Ensaio: pg 119 e 132)

50

**Diidrocheleritina**

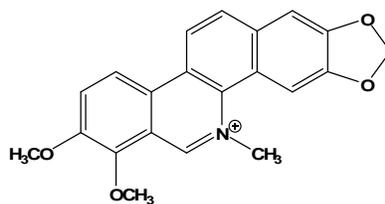
(Isolamento: pg 50
Identificação: pg 94
Ensaio: pg 119, 130 e 132)

61

**Diidroavicina**

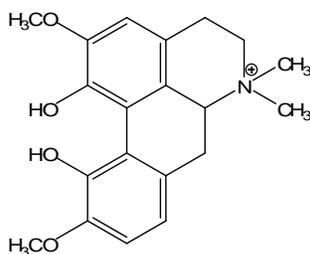
(Isolamento: pg 51
Identificação: pg 98
Ensaio: 119 e 130)

20

**Cheliritrina**

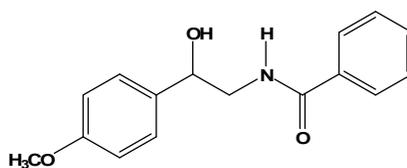
(Isolamento: pg 52
Identificação: pg 97
Ensaio: pg 119, 130 e
132)

62

**Magnoflorina**

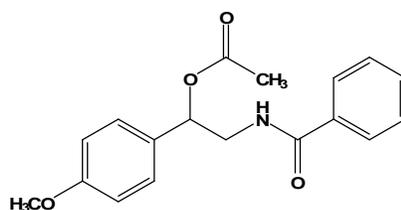
(Isolamento: pg 54
Identificação: pg 100)

63

**Tembamina**

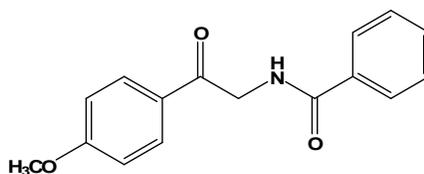
(Isolamento: pg 57
Identificação: pg 102
Ensaio: pg 119, 130 e
132)

64

**2-benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato**

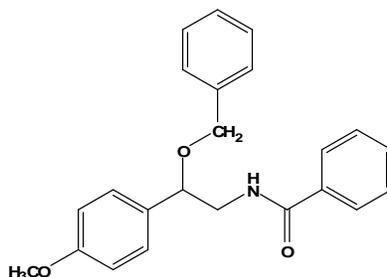
(Obtenção: pg 58
Identificação: pg 105
Ensaio: pg 119, 130 e
132)

65

**N-(2-(4-metoxifenil) 2-oxietil) benzamida**

(Obtenção: pg 60
Identificação: pg 108
Ensaio: pg 119, 130 e
132)

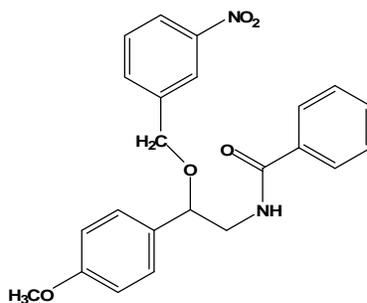
66



**N-2- (benziloxi) 2 (4-
metoxifenil) etil
benzamida**

(Obtenção: pg 61
Identificação: pg 110
Ensaio: pg 132)

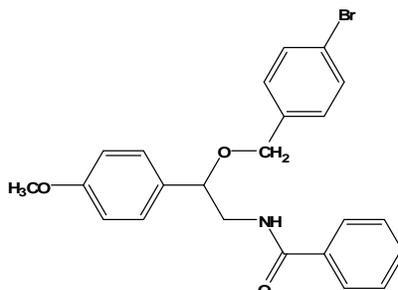
67



**N-2-4-metoxifenil -2-3-
nitrobenziloxi etil
benzamida**

(Obtenção: pg 62
Identificação: pg 113)

68



**N-2-4 bromobenzil oxi-
2-4-metoxifenil etil
benzamida**

(Obtenção: pg 63
Identificação: pg 115)

5.1. RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Após coleta, secagem, moagem e extração do material vegetal (casca do caule das espécies *Z. rhoifolium* e *Z. hyemale*) conseguiu-se o denominado extrato bruto metanólico (EBM), do qual seguiu-se o fracionamento para obtenção das frações que posteriormente foram cromatografadas e purificadas.

Da espécie *Z. rhoifolium* a moagem da casca do caule resultou em 4,36 Kg do material vegetal seco. Foram extraídos com metanol a frio 3,1Kg das cascas do caule moída de *Z.*

rhoifolium, resultando em 300,0 g de um resíduo viscoso escuro, o EBMF de *Z. rhoifolium*, com rendimento de 9,68% em relação a planta moída. O particionamento do extrato bruto metanólico frio resultou em quatro frações, hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica. As frações foram secas e pesadas para que fosse conhecido o rendimento de cada uma delas, tanto em relação ao extrato bruto, como em relação ao material vegetal usado (casca do caule). Os resultados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Rendimento das frações obtidas com o fracionamento do extrato bruto metanólico frio de *Z. rhoifolium*.

Frações	Quantidade obtida	Rendimento quanto à casca do caule seca (%)	Rendimento quanto ao extrato bruto (%)
Hexânica	23,5g	0,758	7,81
Diclorometânica	6,2g	0,200	2,06
Acetato de etila	7,6g	0,245	2,52
Butanólica	15,1g	0,487	5,02
Total	52,4g	1,690	17,46

Ainda da espécie *Z. rhoifolium*, 1,26Kg das cascas do caule moídas foram extraídas com metanol sob aquecimento. Esta extração resultou em 180g de um resíduo viscoso denominado EBMQ de *Z. rhoifolium* com rendimento de 14,3%. O EBMQ foi dividido em duas partes (90g cada), sendo uma das partes fracionada utilizando sistema neutro de partição e a segunda parte fracionada pelo sistema ácido/base. O rendimento obtido com o fracionamento do EBMQ por ambos os sistemas de partição estão demonstrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Rendimentos das frações obtidas com o fracionamento neutro do extrato metanólico quente de *Z. rhoifolium*.

Frações	Quantidade obtida	Rendimento quanto à casca do caule seca (%)	Rendimento quanto ao extrato bruto (%)
Hexânica	26,3g	2,08	29,22
Clorofórmia	3,5g	0,27	3,88

Acetato	1,7g	0,13	1,88
Total	31,5	2,50	35,0

Tabela 8: Rendimentos das frações obtidas com o fracionamento ácido/base do extrato metanólico quente de *Z. rhoifolium*.

Frações	Quantidade obtida	Rendimento quanto à casca do caule seca (%)	Rendimento quanto ao extrato bruto (%)
Éter Ácido	18,4g	1,46	20,04
Éter Básico	1,8g	0,14	2,00
Clorofórmio Básica	0,9g	0,07	1,00
Acetato Básica	15,2g	1,2	16,88
Total	36,3	2,88	40,33

Com a análise dos rendimentos obtidos após preparo dos extratos brutos metanólicos da espécie *Z. rhoifolium* com dois métodos de extração (frio e quente), foi possível observar que com o uso de aquecimento uma maior quantidade de compostos foram extraídos da planta, apresentando o método à quente maior rendimento. O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade das substâncias, motivo pelo qual uma maior quantidade de compostos é extraída. Outra vantagem do uso de aquecimento no preparo do extrato bruto é a rapidez, tomando menos tempo que no processo efetuado em temperatura ambiente. Contudo, a utilização de aquecimento para obtenção do extrato bruto pode acarretar degradação de compostos instáveis e a formação de artefatos, através da modificação de substâncias após reações provocadas pelo calor. Este fato deve ser levado em consideração na escolha do método a ser empregado para extração do material vegetal.

Em relação aos dois sistemas de fracionamento empregado neste trabalho para comparação de ambos quanto a capacidade de extração dos compostos presentes na planta, os dados apresentados nas tabelas 7 e 8 mostram que o sistema de particionamento ácido/base apresentou um maior poder de extração. O sistema ácido/base teve um rendimento de 40,33%

em relação ao extrato bruto, contrastando com 35,0% de rendimento observado para o sistema neutro de partição.

Da espécie *Z. hyemale* a moagem da casca do caule rendeu 4,43 Kg. Este material extraído com metanol a frio resultou em 420,3g de um resíduo viscoso que foi denominado extrato bruto metanólico frio (EBMF) de *Z. hyemale*, com rendimento de 9,5% em relação ao peso da planta. O extrato bruto foi fracionado e as frações obtidas (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica) foram secas e devidamente pesadas para o cálculo do rendimento, que está demonstrado na tabela 9.

Tabela 9: Rendimento das frações obtidas com o fracionamento do extrato bruto metanólico frio de *Z. hyemale*.

Frações	Quantidade obtida	Rendimento quanto à casca do caule seca (%)	Rendimento quanto ao extrato bruto (%)
Hexânica	32,1g	0,724	7,637
Diclorometânica	6,8g	0,153	1,617
Acetato de etila	8,05g	0,181	1,915
Butanólica	17,2g	0,388	4,092
Total	64,15g	1,448	15,26

5.1.1. Comparação dos métodos de extração e fracionamento realizado com a espécie *Zanthoxylum rhoifolium*

No intuito de avaliar o potencial de extração dos metabólitos secundários de alguns solventes e também o método empregado, tanto no preparo do extrato bruto como no processo de partição deste extrato, realizou-se análise em CCD de todos os extratos e frações obtidos neste trabalho com as cascas do caule da espécie *Z. rhoifolium*. As CCDs foram reveladas com reagente de Dragendorff e, posteriormente, com solução de ácido sulfúrico/etanol seguido de aquecimento para visualização dos metabólitos secundários extraídos da planta.

Os dois extratos brutos metanólicos (quente e frio) obtidos das cascas do caule de *Z. rhoifolium* foram analisados em CCD com revelação em Dragendorff. Foi verificado em ambos a presença de alcalóides, porém para alguns pontos de revelação na placa do extrato bruto quente não havia pontos correspondentes na CCD do extrato bruto frio (Figura 9).

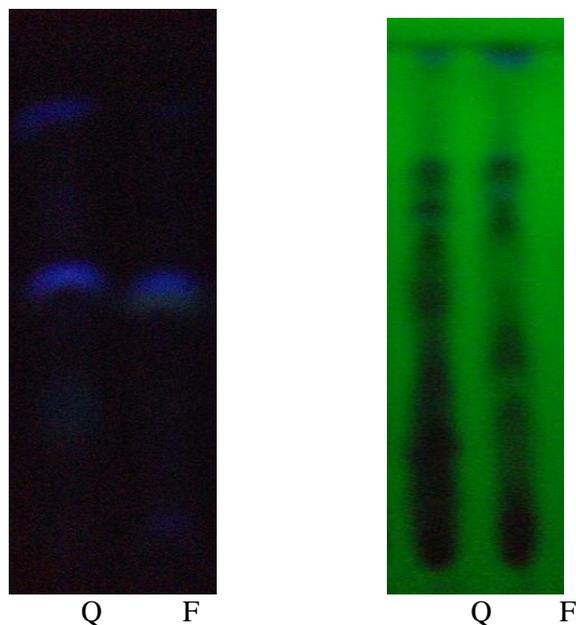


Figura 9: Placas em CCD comparando os extratos brutos quente (Q) e frio (F), reveladas em luz UV.

O extrato bruto metanólico quente de *Z. rhoifolium* foi dividido e particionado, para obtenção das frações do extrato, utilizando dois métodos de extração: sistema neutro e sistema ácido/base (Página 37). Essa etapa do trabalho tem a finalidade de avaliar a forma de fracionamento com melhor capacidade de extrair os metabólitos secundários da planta, principalmente alcalóides. Para isso, todas as frações resultantes foram analisadas em CCD e reveladas em Dragendorff.

A comparação das CCDs reveladas com reagente de Dragendorff demonstra que as frações obtidas com o particionamento ácido/base foram as que apresentaram melhor extração dos alcalóides. Essas CCDs apresentaram mais pontos de revelação do que as efetuadas com

as frações obtidas do particionamento do extrato bruto metanólico quente pelo sistema neutro. Contudo, todas as CCDs efetuadas para cada fração obtida do particionamentos neutro e ácido/base mostraram alguns pontos de revelação positiva para Dragendorff.

5.2. Compostos isolados de *Zanthoxylum rhoifolium*: fração hexânica

5.2.1. Lupeol (33)

No item 4.4.1.1.1 (Página 43), está descrito o isolamento deste composto. Sua pureza foi confirmada por CCD e por dados de RMN de ^1H (Figura 10) e ^{13}C . A comparação dos dados de RMN obtidos neste trabalho, com dados da literatura, e também através de comparação em CCD com padrão existente no laboratório, permitiu a confirmação da estrutura como sendo do triterpeno Lupeol (**33**) já descrito anteriormente pelo grupo.

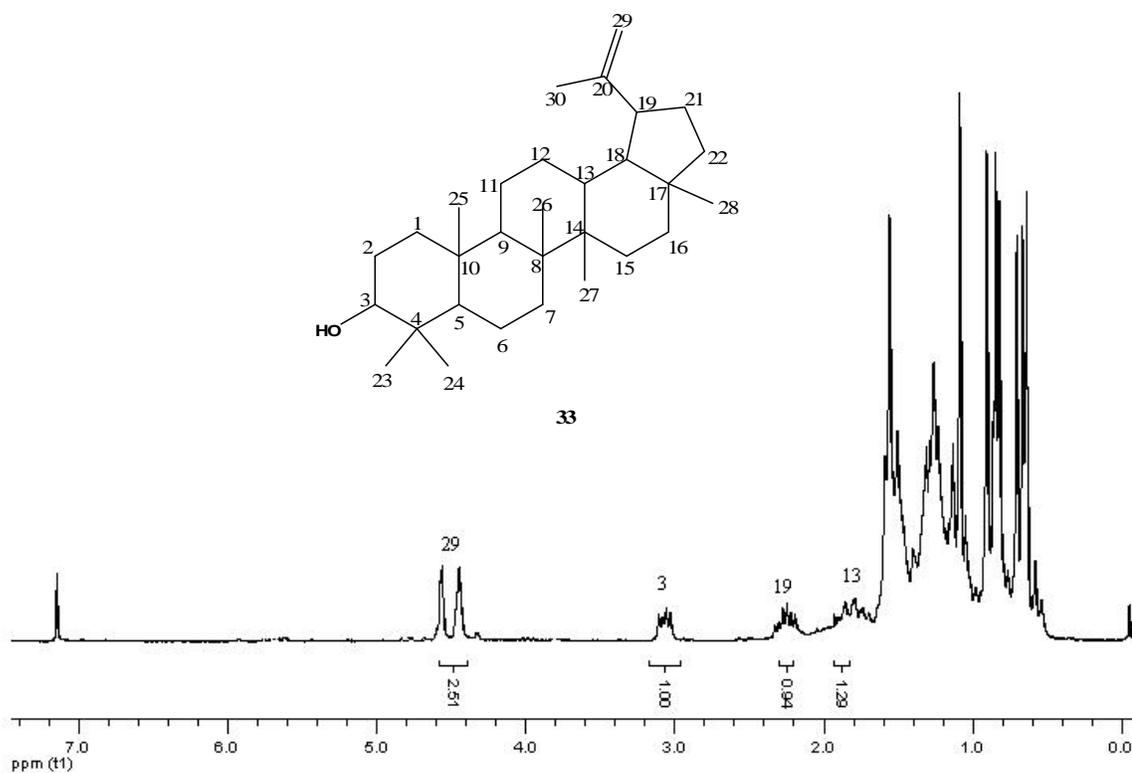
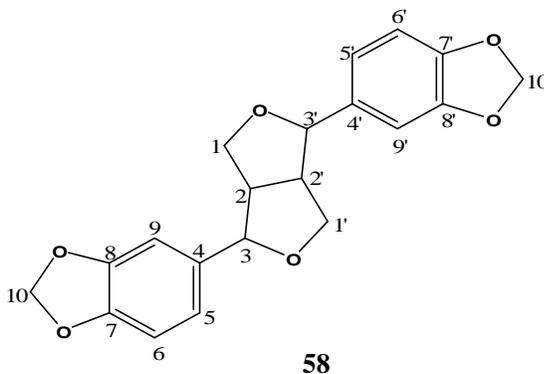


Figura 10: Espectro de RMN de ^1H de Lupeol (**33**) em CDCl_3 a 200MHz.

5.2.2. Sesamina (58)

A forma de isolamento deste metabólito está descrito no item 4.4.1.1.2. (Página 44). Foi obtido como um sólido branco cristalino que reagia positivamente com solução de ácido sulfúrico/etanol seguido de aquecimento e não reagia com Dragendorff. Para elucidar sua estrutura, o composto foi submetido à análise de RMN.



Pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foi possível observar sinais que coincidem com dados já apresentados na literatura para a lignana Sesamina (**58**), podendo assim, ser confirmada sua estrutura. Comparou-se a substância isolada por CCD com padrão autêntico existente no laboratório, apresentando ambas o mesmo Rf.

Nos dados de RMN de ^1H (Figura 11), o sinal intenso em $\delta=5,94\text{ppm}$ (2H, s) reporta ao grupo metilenodioxila (-O-CH₂-O-); dois sinais em $\delta=3,86\text{ppm}$ e $\delta=4,22\text{ppm}$ ambos como duplo dubleto de $J=3,6$ e $9,4\text{ Hz}$ e $J=6,8$ e $9,0\text{ Hz}$, respectivamente, são atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-1 e 1'; os três hidrogênios dos anéis aromáticos estão sinalizados em $\delta=6,84\text{ ppm}$ (1H, s, H-9), $\delta=6,78\text{ ppm}$ e $\delta=6,77\text{ ppm}$, relativo aos hidrogênios H-5 e H-6 respectivamente, que apresentando $J=8,0\text{ Hz}$, demonstram uma relação orto na substituição deste anel. Em $\delta=3,05\text{ ppm}$ observa-se o sinal do hidrogênio H-2, como um duplo dubleto pelo acoplamento com os hidrogênios vizinhos diastereotópicos H-1 e 1'.

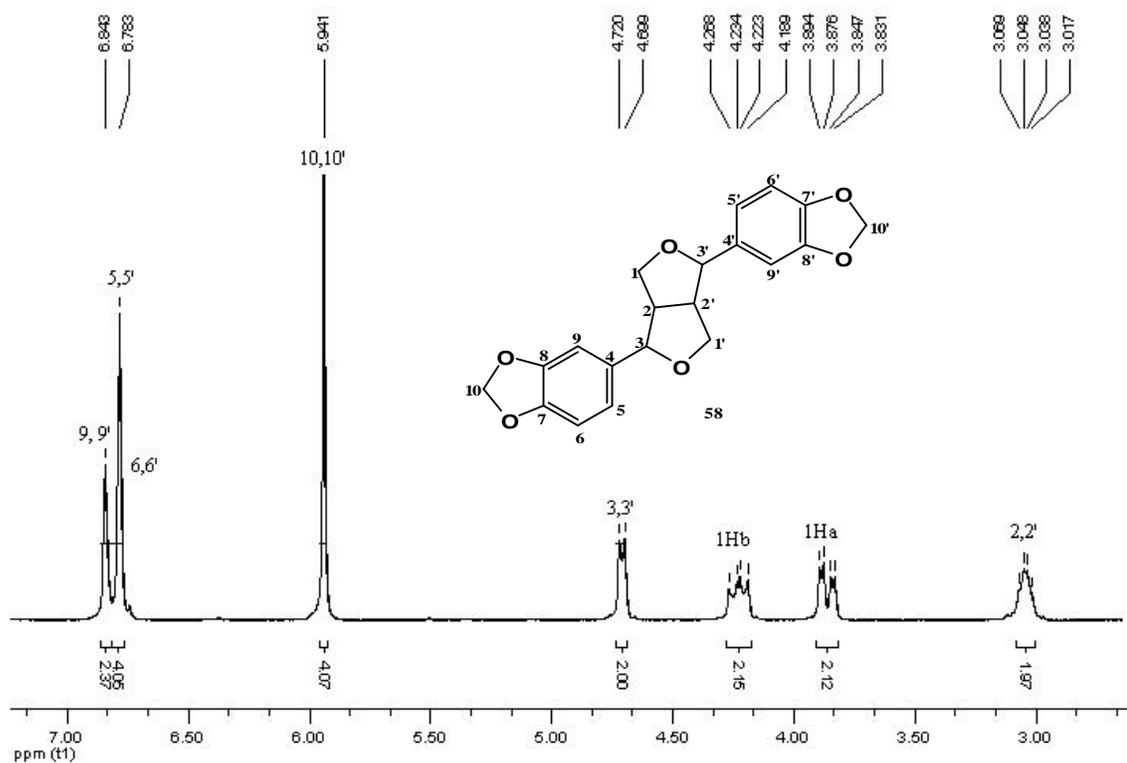


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H de Sesamina (**58**) em CDCl_3 a 200MHz.

A análise dos dados de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 12) apresentou dez sinais que estão distribuídos na região espectral entre δ 54,20 – 147,90ppm. O conjunto de dados espectroscópicos obtidos para este metabólito é compatível com dados registrados na literatura para a lignana Sesamina (**58**), comprovando sua estrutura.

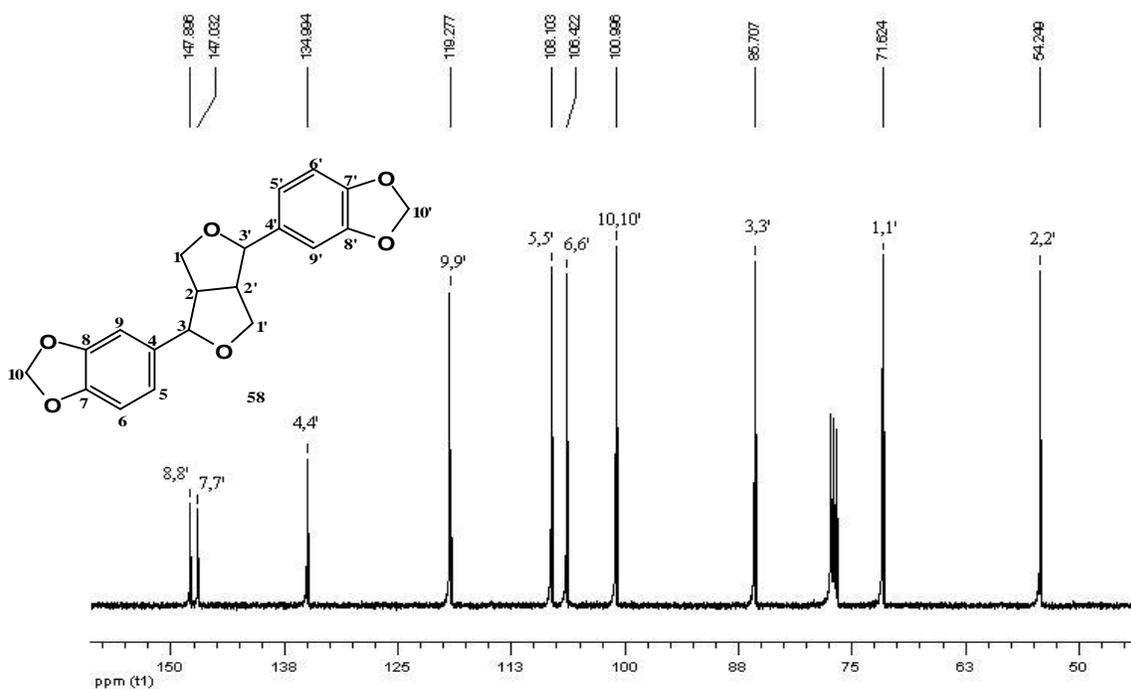
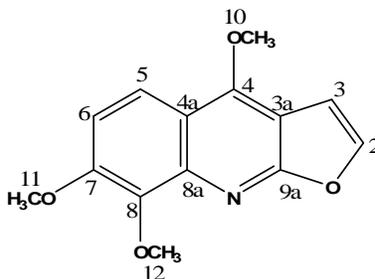


Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C de Sesamina (**58**) em CDCl_3 a 50MHz.

5.3. Compostos isolados de *Zanthoxylum rhoifolium*: fração diclorometânica

5.3.1. Skimianina (**8**)

Este metabólito, isolado conforme descrito no item 4.4.2.1.1. (Página 46), foi identificado baseando-se nos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C , através de comparação destes dados com os descritos na literatura.³⁸ Da classe dos furanoquinolínicos, este alcalóide havia sido isolado anteriormente pelo grupo da espécie *Z. hyemale*.



Dois dubletos observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 13), com $J= 2,8\text{Hz}$, ($\delta= 7,57\text{ppm}$, H-2 e $\delta= 7,03\text{ppm}$, H-3) confirmam a presença do anel furânico 1,2-dissubstituído. O espectro apresenta também dois sinais (d, $J=9,4\text{Hz}$), correspondente aos hidrogênios aromáticos ($\delta 7,22\text{ppm}$ - H6 e $\delta 8,00\text{ppm}$ - H5) e três sinais singletos absorvendo em $\delta 4,02$, $\delta 4,11$ e $\delta 4,42\text{ppm}$ que se referem aos hidrogênios dos três grupos metoxilas desta estrutura.

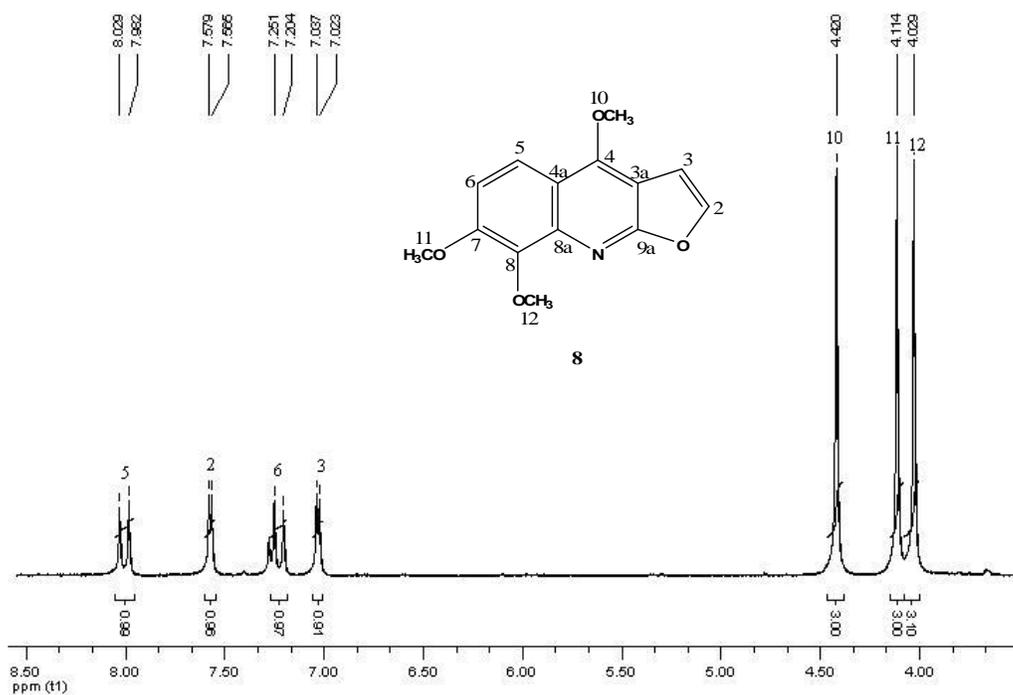


Figura 13: Espectro de RMN de ^1H de Skimianina (**8**) em CDCl_3 a 200MHz.

No espectro 2D COSY (Figura 14) foi observado os dois sistemas de spins desta estrutura, referindo-se o primeiro acoplamento ao que ocorre entre os hidrogênios do anel furano (H-2 e H-3) e o segundo, entre os hidrogênios do anel aromático orto substituído (H-5 e H-6).

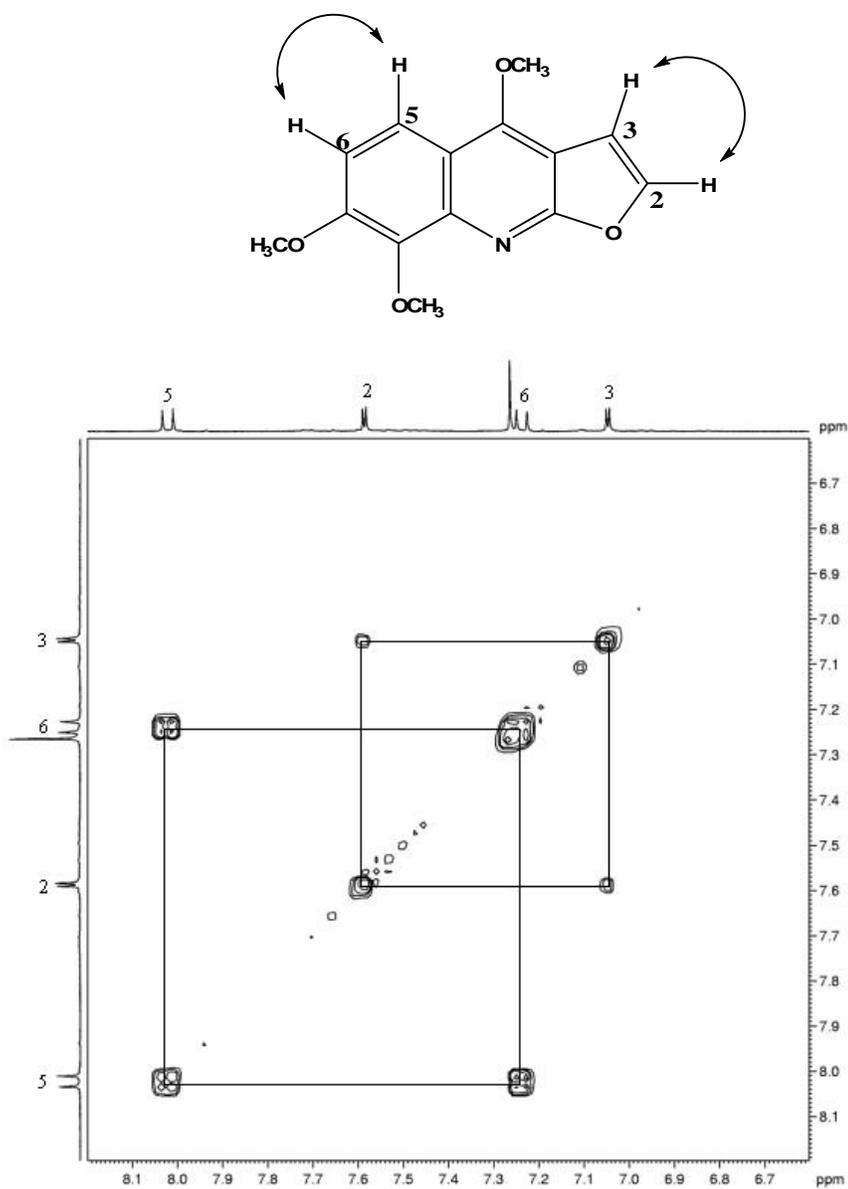


Figura14: Espectro de RMN COSY de Skimianina (**8**) em CDCl_3 a 400MHz.

A análise do RMN de ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 15) sugere a existência de 14 carbonos na estrutura. Dois sinais em δ 104,56ppm e δ 142,90ppm confirmam a presença da dupla ligação do anel furano. As três metoxilas estão sinalizadas neste espectro em δ 56,73ppm, δ 58,90ppm e δ 61,58ppm, respectivamente C-12, C-10 e C-11. Os dados obtidos neste trabalho são comparáveis com os apresentados na literatura³⁸ para a estrutura.

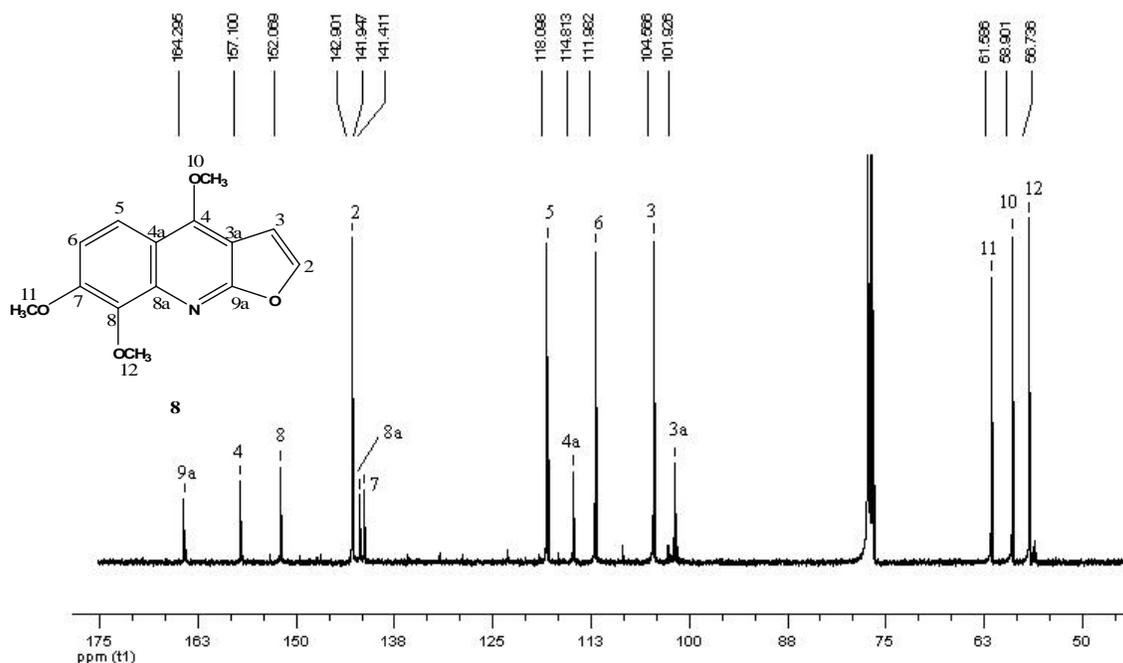
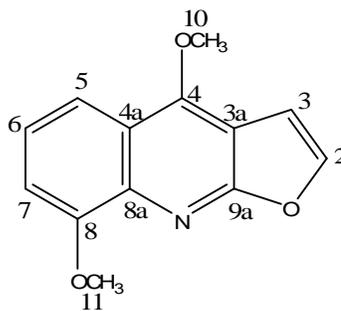


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C de Skimianina (**8**) em CDCl_3 a 50MHz.

5.3.2. γ -Fagarina (**53**)

O isolamento deste composto está descrito no item 4.4.2.1.3 da página 48. Ele foi isolado da FD na forma de um sólido amarelado que ao revelar positivamente com Dragendorff soube-se tratar de um alcalóide.



53

Baseando-se nos dados obtidos após análise de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto e através de comparações destes dados com os da literatura e com os dados de RMN do composto (**8**) descrito anteriormente, chegou-se a estrutura (**53**) como sendo do alcalóide

furanoquinolínico γ -Fagarina. Este alcalóide já havia sido isolado anteriormente das espécies *Z. rhoifolium* e *Z. hyemale* pelo grupo NPPN.³⁸

No espectro de RMN de ^1H (Figura 16), pela integração dos sinais, é possível identificar os 11 hidrogênios presentes na molécula. Seis desses hidrogênios pertencem as duas metoxilas – deslocamentos químicos de δ 4,07ppm (s, 3H, H-11) e δ 4,42ppm (s, 3H, H-10) – outros dois hidrogênios apresentam-se como dubletos com $J=2,8\text{Hz}$, em δ 7,63 e δ 7,06ppm, sendo característico de hidrogênios de anel furano (H-2 e H-3). Ainda, na região dos aromáticos, verifica-se a presença de três sinais de hidrogênios com deslocamento químico em δ 7,80 e δ 7,04ppm ambos na forma de dubletos com $J=7,6\text{Hz}$, e em δ 7,34ppm como um duplo dubleto, com $J=7,6$ e $J=7,6\text{Hz}$. Essas constantes de acoplamento demonstram a existência de anel aromático, com os hidrogênios apresentando uma relação orto entre si.

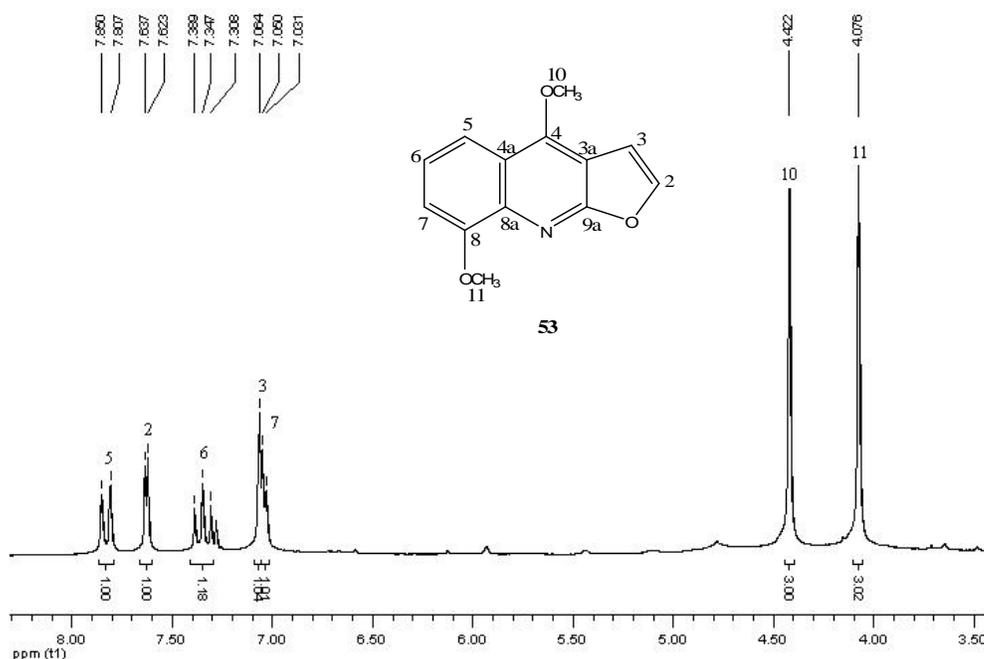


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H de γ -Fagarina (**53**) em CDCl_3 a 200MHz.

Na análise de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 17), confirma-se a presença de treze carbonos. Os carbonos dos grupos metoxilas ligados ao anel aromático,

estão caracterizados pelos sinais neste espectro em δ 55,88ppm e 55,93ppm. Os carbonos do anel furano estão sinalizados em δ 143,81ppm e δ 104,47ppm.

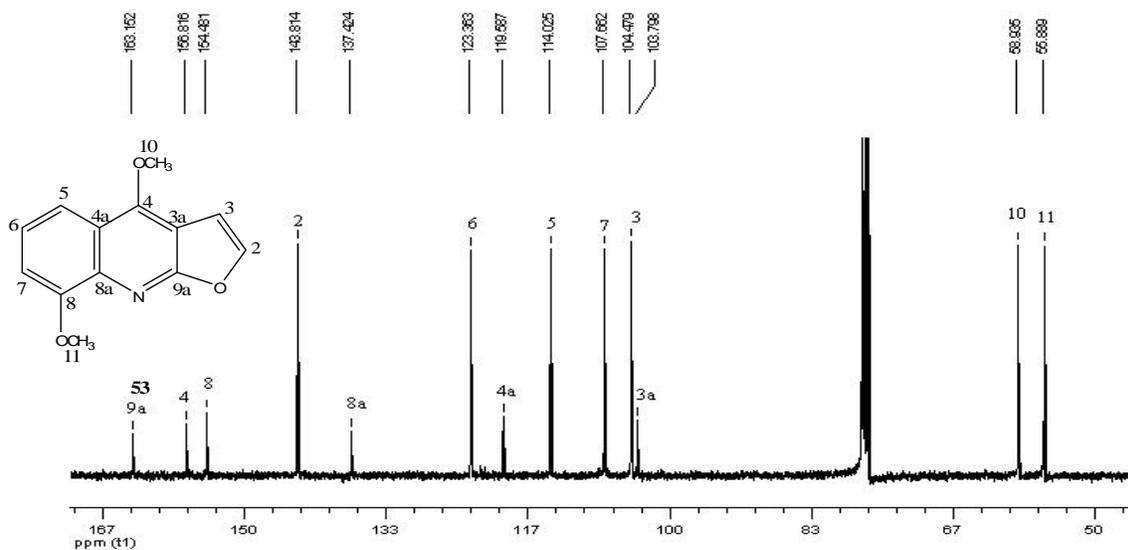
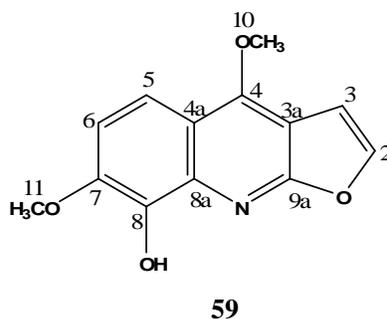


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C de γ -Fagarina (**53**) em CDCl_3 a 50MHz.

5.3.3. 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (**59**)

O isolamento deste metabólito resultou em 9mg de um sólido amarelo claro. Juntamente com o composto (**8**), foi retirado da subfração 195 da FD, revelando positivamente após reação com reativo de Dragendorff, sendo caracterizado como alcalóide.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C deste composto mostraram muitas semelhanças com o composto (**8**) e (**53**), sabendo-se tratar da mesma classe de alcalóides.



Na análise dos dados espectrais de RMN de ^1H (Figura 18), são observados seis sinais na região entre δ 3 e 8ppm, sendo dois singletos intensos e quatro dubletos. Os sinais singletos estão em δ 4,21 e 4,42ppm e com integração de 3H, indicam a presença de duas metoxilas na estrutura. Na região dos aromáticos, dois dubletos em δ 7,05 e 7,58ppm, integração para 1H, com constante de acoplamento $J=2,8\text{Hz}$ são característicos do anel furano. Além disso, a existência de outros dois sinais dubletos na região dos aromáticos, cuja constante de acoplamento $J=9,2\text{Hz}$, demonstram que a estrutura em discussão possui um anel aromático onde os hidrogênios das posições não substituídas encontram-se em uma relação orto. Esse acoplamento foi comprovado pelo espectro COSY.

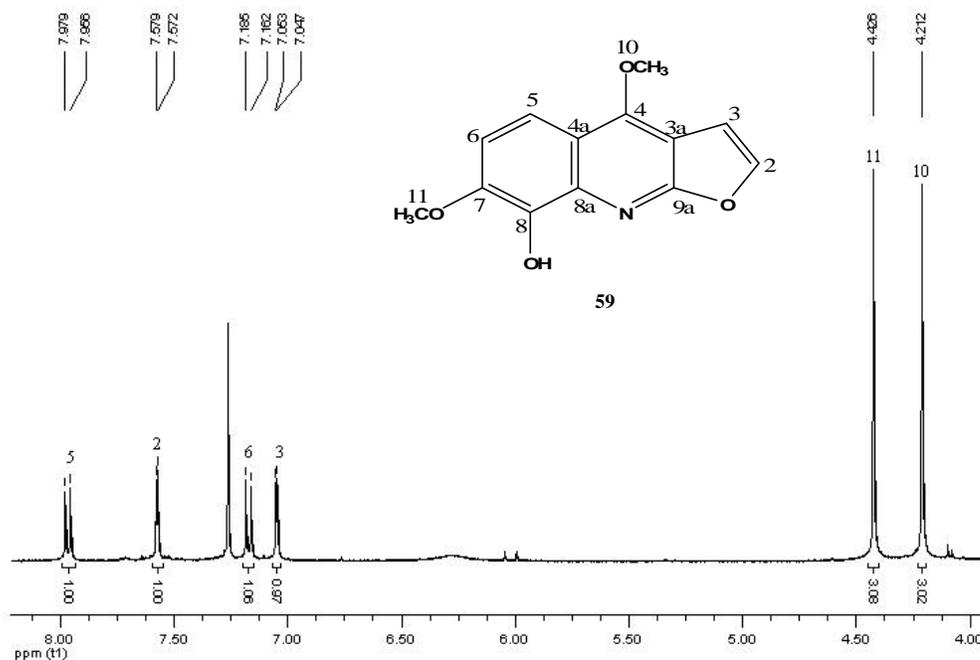


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (**59**) em CDCl_3 a 400MHz.

No espectro 2D COSY (Figura 19), estão demonstrados dois sistemas de spins: o primeiro sistema refere-se ao acoplamento entre os hidrogênios da dupla ligação do anel furânico enquanto que no segundo sistema de spins observado neste espectro, visualiza-se o

acoplamento dos hidrogênios pertencentes ao anel aromático. Os acoplamentos observados no espectro de COSY para o composto (**59**) são compatíveis aos sistemas de spins de Skimianina (**8**), o que permite confirmar a semelhança de suas estruturas.

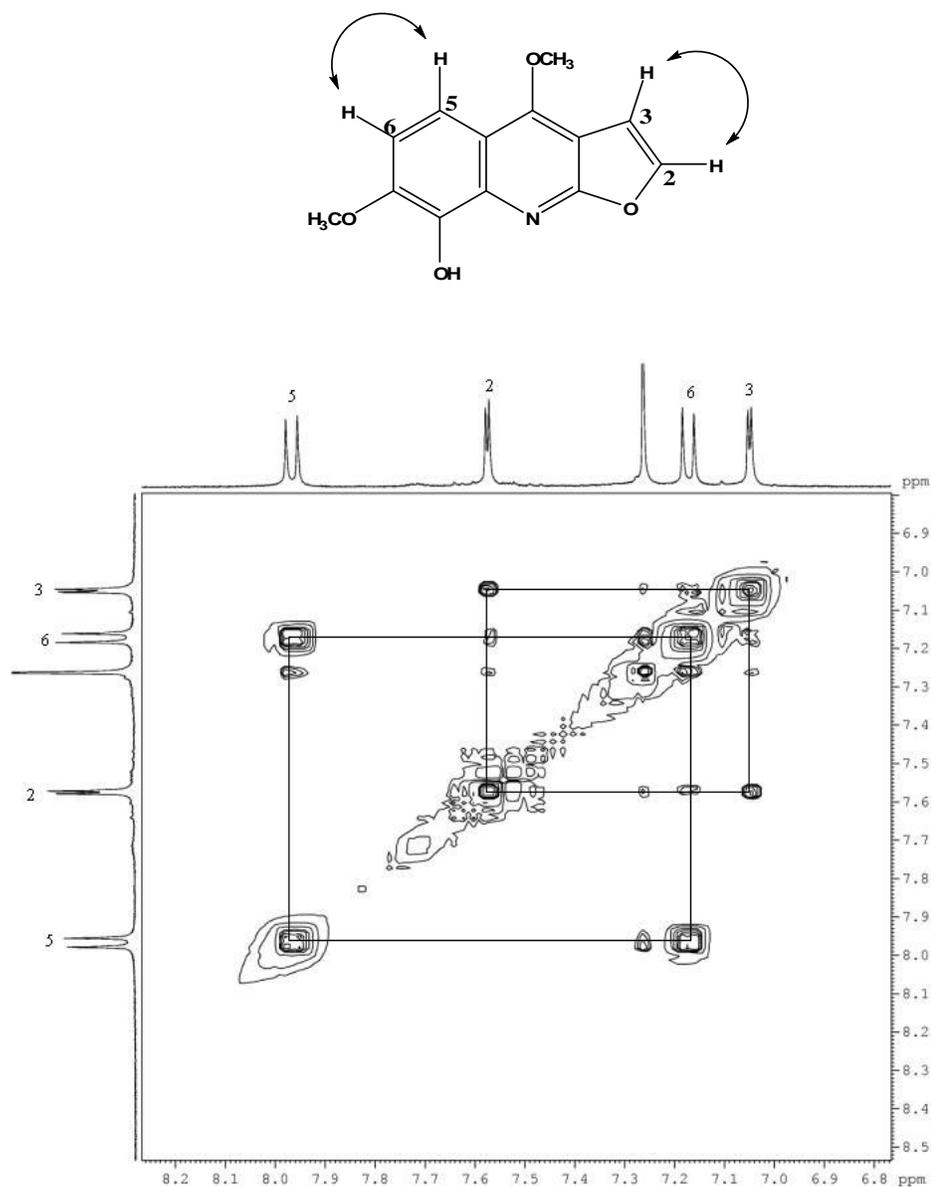


Figura 19: Espectro 2D COSY de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (**59**) em CDCl_3 a 400MHz.

O espectro de carbono totalmente desacoplado (Figura 20) mostrou a existência de treze sinais na região espectral compreendida entre δ 58 e 165ppm. Com o auxílio de espectro

de DEPT 135° (Figura 21) observou-se as posições substituídas do anel aromático e que a estrutura é composta por sete carbonos quaternários, dois carbonos metílicos e quatro carbonos metínicos.

As metoxilas estão sinalizadas no espectro de ^{13}C em δ 58,99 e 61,97ppm. Os carbonos do anel furano são visualizados em δ 142,69 e 104,77ppm e os carbonos metínicos aromáticos absorvem neste espectro em δ 118,71 e 114,57ppm.

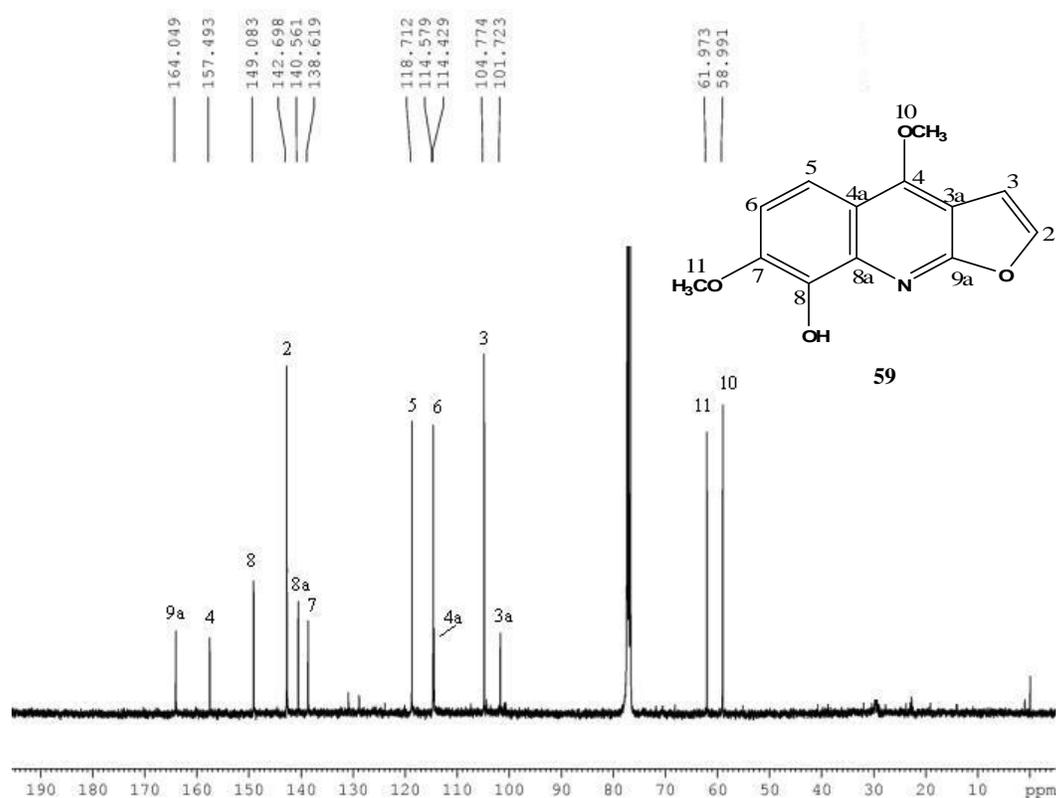


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (**59**) em CDCl_3 a 100MHz.

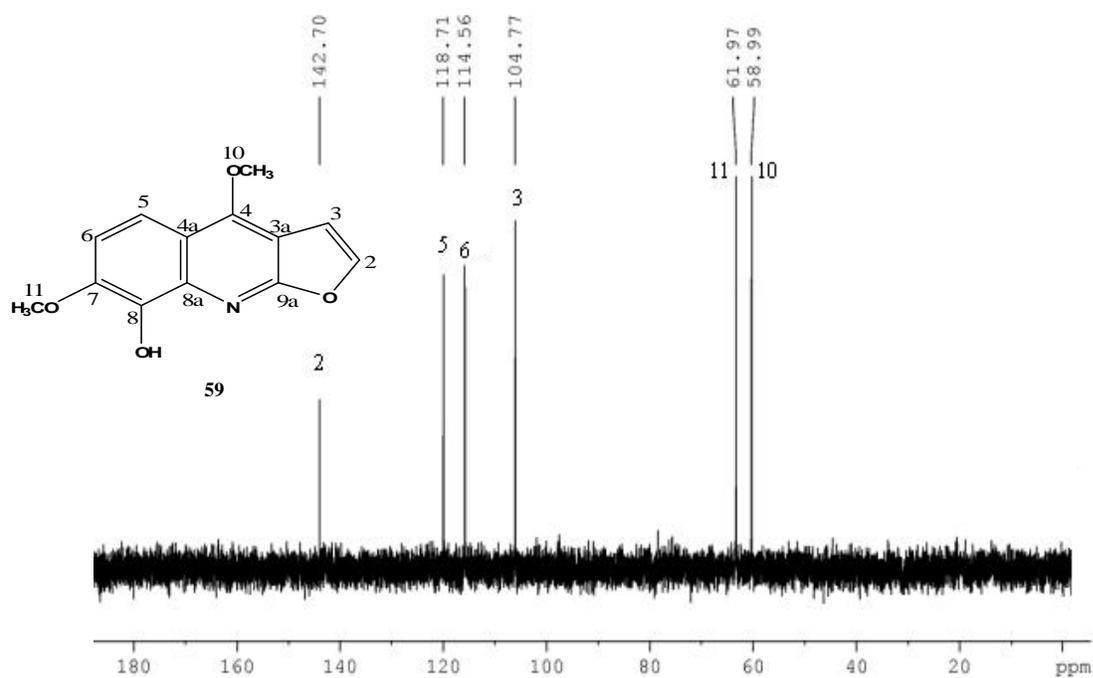
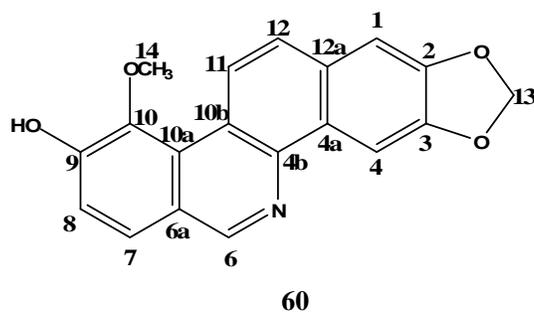


Figura 21: Espectro DEPT 135 de 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (**59**) em CDCl_3 a 100MHz.

5.3.4. Zantoxilina (**60**)

Esta substância foi obtida como um sólido marrom, apresentando reação positiva quando revelado em CCD com reagente de Dragendorff. Seu isolamento está descrito no item 4.4.2.1.4. (Página 49). Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C obtidos para o composto assemelham-se com os dados apresentados na literatura para o alcalóide Zantoxilina (**60**).³⁸



Pelo espectro de RMN de ^1H (Figura 22) fez-se a atribuição dos sinais dos prótons presentes na estrutura, como do singlete intenso em δ 4,01ppm, que apresentando integração

para três hidrogênios foi atribuído à metoxila da posição 14 e do singlete em δ 6,20ppm, que corresponde aos dois prótons metilênicos do grupo metilenodioxila.

Neste espectro são observados ainda sete sinais na região dos prótons aromáticos, compreendida entre δ 7,3 e 9,6ppm, quatro deles na forma de dubletos e três na forma de singletos. Os sinais singletos em δ 7,49ppm e δ 8,53ppm correspondem aos hidrogênios das posições 1 e 4 do anel aromático ao qual está diretamente ligado o grupo metilenodioxila. O outro singlete em δ 9,57ppm está atribuído ao próton vizinho ao átomo de nitrogênio (H-6). Além disso, pode-se observar os quatro sinais dos hidrogênios aromáticos como dubletos, em dois sistemas de spins, cuja constante de acoplamento de $J=8,8\text{Hz}$ sugere uma relação orto para cada par.

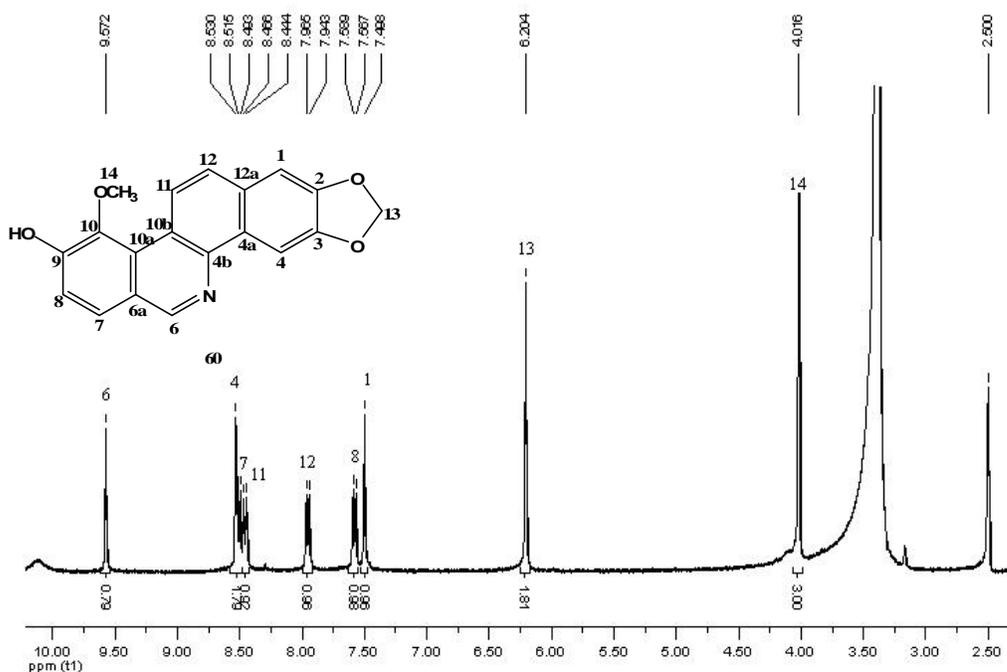


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H de Zantoxilina (**60**) em DMSO a 400MHz.

Na análise dos dados de RMN de ^{13}C (Figuras 23 e 24), são observados dezenove sinais numa região espectral compreendida entre δ 61 e 149ppm. Na região dos aromáticos sete sinais estão presentes. O sinal em δ 100,83ppm refere-se ao carbono metilênico da

metilendioxila desta estrutura e em δ 61,16ppm está o carbono do grupo metoxila. Os dados obtidos neste trabalho condizem com dados observados na literatura.³⁸

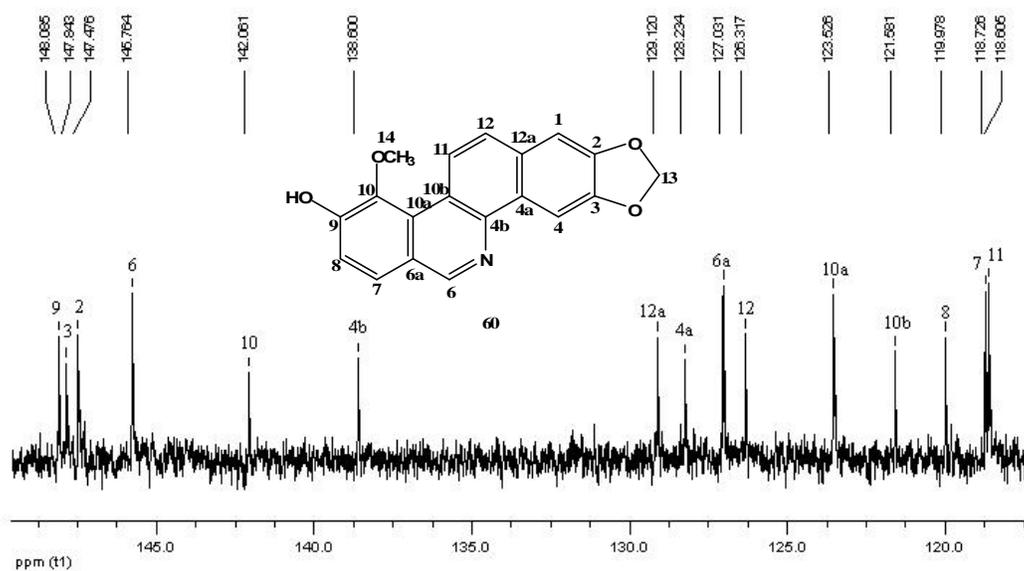


Figura 23: Espectro de RMN de ¹³C de Zantoxilina (**60**) em DMSO a 100MHz.

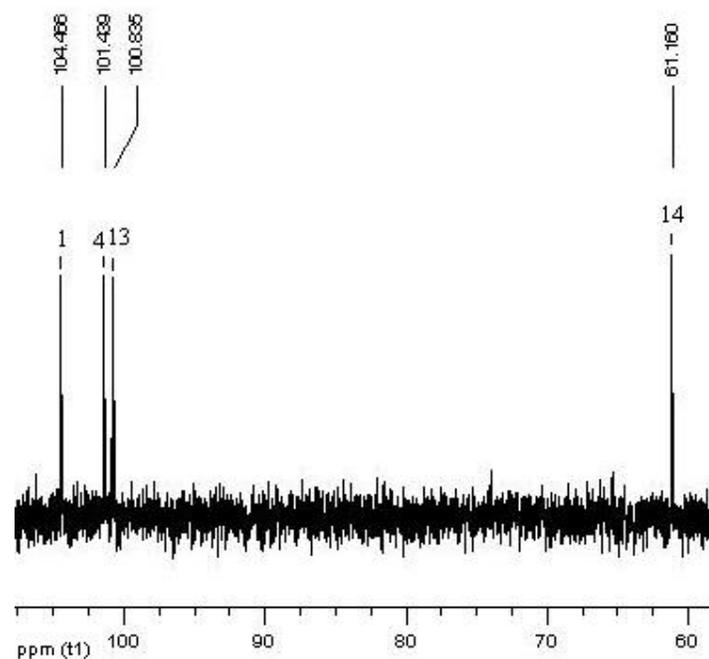


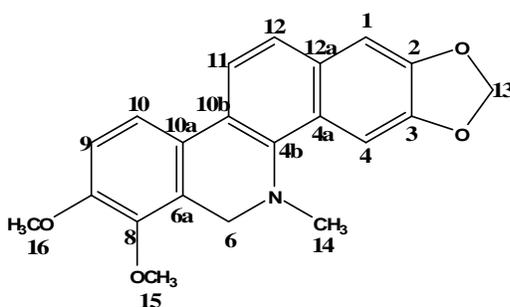
Figura 24: Espectro expandido de RMN de ¹³C de Zantoxilina (**60**) em DMSO a 100MHz.

5.3.5. Diidrocheleritrina (50)

O composto foi obtido na forma de um sólido de coloração amarela, isolado da FD conforme descrito no item 4.4.2.1.5 (Página 50). Na análise cromatográfica (CCD) com revelação em reagente de Dragendorff é visualizado como uma única mancha laranja intensa, caracterizado como um alcalóide.

Este metabólito, devido a semelhanças de suas características com outro alcalóide já identificado pelo grupo, como o alcalóide Diidrocheleritrina, foi comparado por CCD com amostra padrão existente no laboratório e ambas apresentaram o mesmo Rf. Sua estrutura foi, então, confirmada por análise de RMN de ^1H e ^{13}C e a comparação dos dados obtidos neste trabalho com dados encontrados na literatura.⁴¹

Através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 25, 26 e 27), foram atribuídos os deslocamentos químicos caracterizando os átomos de hidrogênio e carbono que compõem a estrutura deste metabólito.



50

A análise do RMN de ^1H (Figura 25) mostra, pela soma das integrais dos sinais, que ele possui 19 átomos de hidrogênio. Este espectro forneceu importantes informações sobre a estrutura em discussão, como o sinal singlete com integração para dois hidrogênios em δ 6,03ppm, que se refere ao grupo metilenodioxí (-O-CH₂-O-; s). Também a observação de dois singletos intensos, com integração para três hidrogênios cada, em δ 3,86ppm e δ 3,91ppm, atribuídos as metoxilas da estrutura e a presença de outro singlete intenso em δ 2,58ppm (s,

3H) que indica a presença de uma metila ligada a um átomo de nitrogênio. Observam-se seis sinais de prótons aromáticos: quatro deles estão na forma de dubletos, que integram para quatro hidrogênios, com J compatível com acoplamento orto entre si (8,4Hz). Os outros dois sinais são singletos, com integração para um hidrogênio cada, que se referem ao anel aromático no qual os hidrogênios estão numa relação de substituição para.

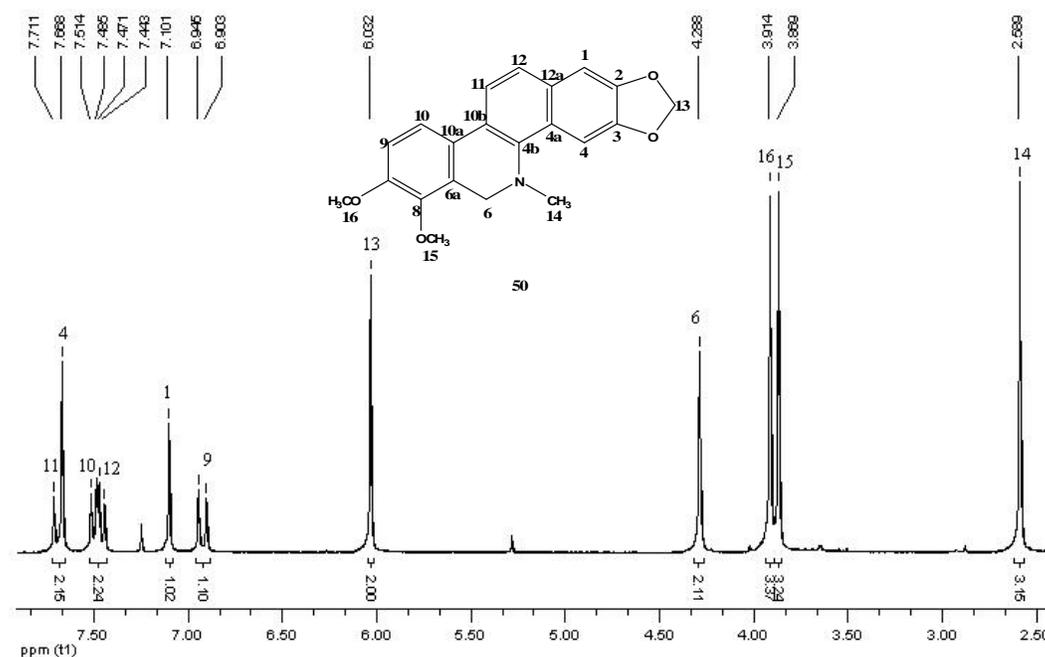


Figura 25: Espectro de RMN de ¹H de Diidrocheleritrina (**50**) em CDCl₃ a 200MHz.

O espectro de ¹³C totalmente desacoplado (Figuras 26 e 27) indicou a presença de 21 átomos de carbono. As duas metoxilas desta estruturas estão em δ 55,76ppm e δ 61,05ppm. A metila ligada ao nitrogênio absorve em δ 41,26ppm. Ainda na região de campo alto do espectro, pode-se observar o sinal do carbono metilênico (C-6 em δ 48,69ppm), o outro carbono metilênico devido à vizinhança com dois átomos de oxigênio do grupo metilenodioxila (-O-CH₂-O-) está sinalizado em δ 100,97ppm.

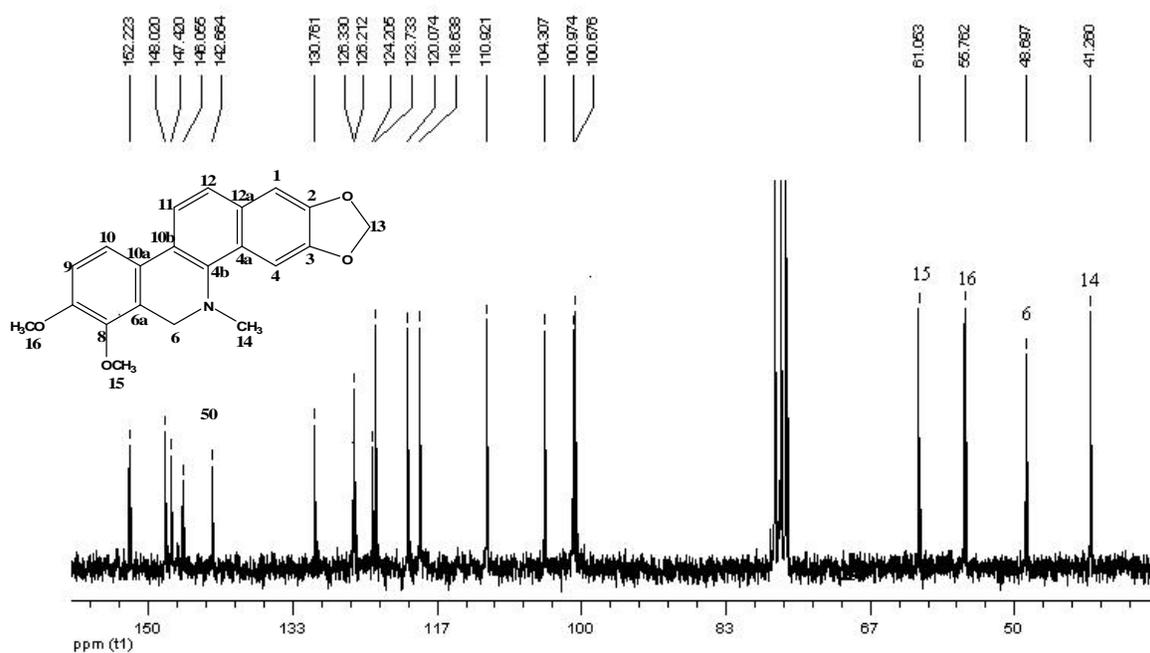


Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C de Diidrocheleritrina (**50**) em CDCl_3 a 50MHz.

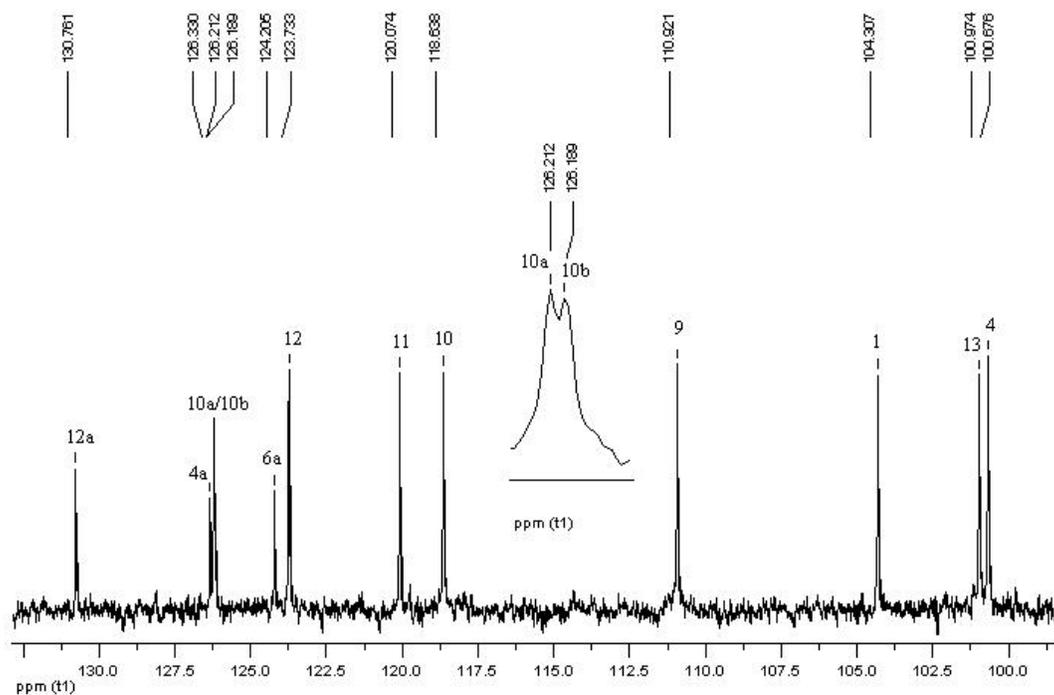


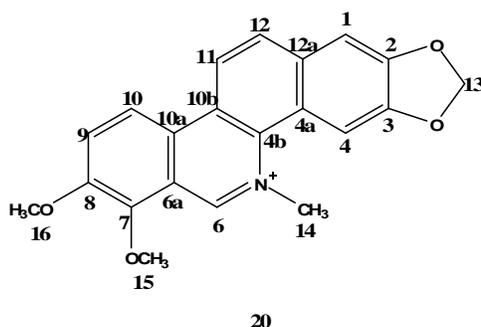
Figura 27: Espectro expandido de RMN de ^{13}C de Diidrocheleritrina (**50**) em CDCl_3 a 50MHz

A estrutura deste metabólito foi então confirmada pela análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e pela comparação dos dados obtidos no trabalho com dados encontrados na literatura.⁴¹

5.3.6. Cheleritrina (20)

O isolamento deste metabólito, um sal quaternário de coloração laranja, esta descrito na página 52. É um composto muito comum em espécies da família Rutaceae e geralmente é retirado em grandes quantidades. Depois de submetido a análise de RMN de ^1H e ^{13}C , verificou-se que os dados observados no espectro deste metabólito possuíam semelhanças com outro alcalóide já descrito (como Diidrocheleritrina (**50**)), contudo um sinal em δ 9,92ppm sugere que o hidrogênio na posição C-6 pertence a um sistema aromático.

Para confirmar a estrutura deste composto também fez-se comparação em CCD com padrão de referência do laboratório, e ambas amostras tiveram o mesmo Rf.



No espectro de RMN de ^1H (Figura 28), identificou-se dois singletos em δ 9,9 e δ 4,07ppm, que com integração para três hidrogênios foram atribuídos as metoxilas da estrutura (**20**). O grupo metilenodioxila esta sinalizado no espectro em δ 6,22ppm. Observa-se ainda o singlete do grupo metil ligado ao átomo de nitrogênio absorvendo em δ 4,87ppm.

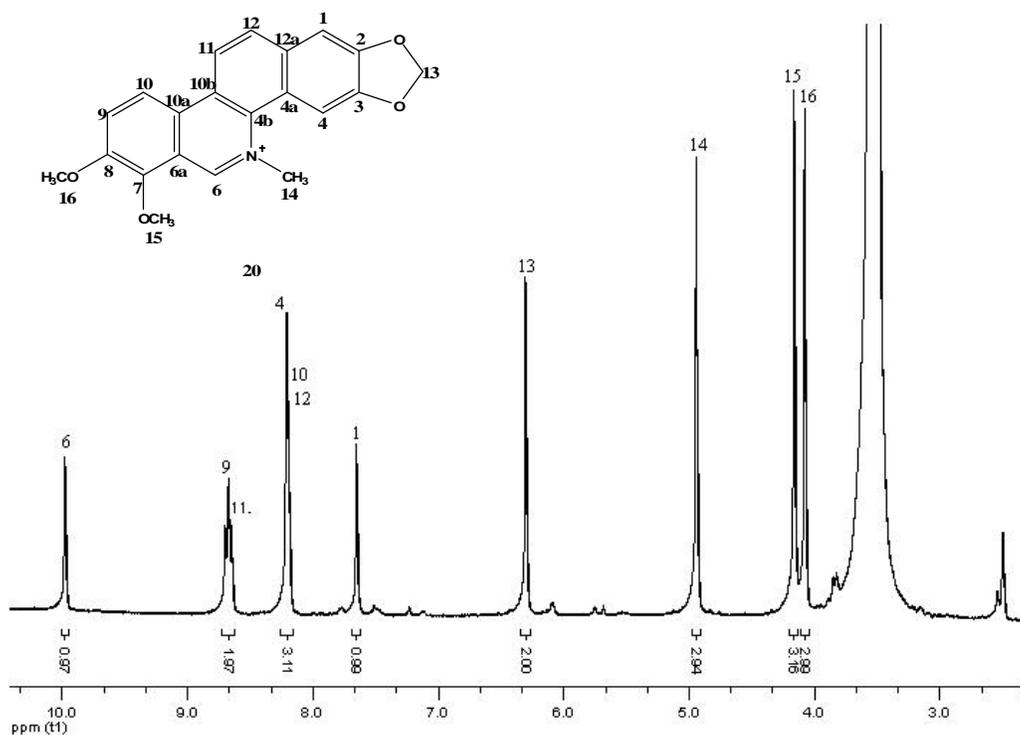
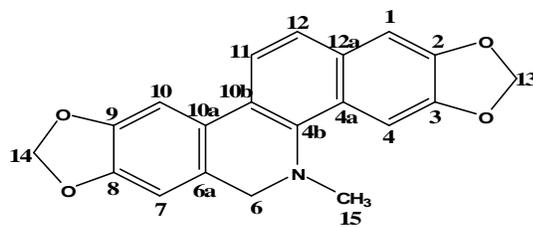


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H de Chelitrina (**20**) em DMSO a 200MHz.

5.3.7. Diidroavicina (**61**)

O composto isolado como um sólido amarelo, purificado conforme descrito na página 51, reagiu positivamente quando tratado com reagente de Dragendorff, tratando-se de um alcalóide. A análise dos dados obtidos por técnicas de RMN e a comparação com dados descritos na literatura permitiram propor que a estrutura deste metabólito corresponde ao alcalóide Diidroavicina (**61**), isolado anteriormente pelo NPPN.



61

Pelo espectro de RMN de ^1H (Figura 29) foram atribuídos os sinais dos prótons da molécula. Neste espectro observa-se em δ 2,58ppm um singlete com integração para três hidrogênios, referente ao grupo metila ligado ao átomo de nitrogênio. Em δ 4,09ppm, um sinal singlete com integração para dois hidrogênio reporta aos hidrogênios da posição 6, vizinhos ao átomo de nitrogênio. Dois outros singletos sinalizados em δ 5,98 e 6,04ppm sugerem a presença de dois grupos metilenodioxilas. Na região dos prótons aromáticos são observados seis sinais, dois dubletos (δ 7,61 e δ 7,47ppm, $J=8.4\text{Hz}$, 1H cada) e quatro singletos com integração para um hidrogênio cada (δ 6,76, 7,10, 7,27 e 7,64ppm).

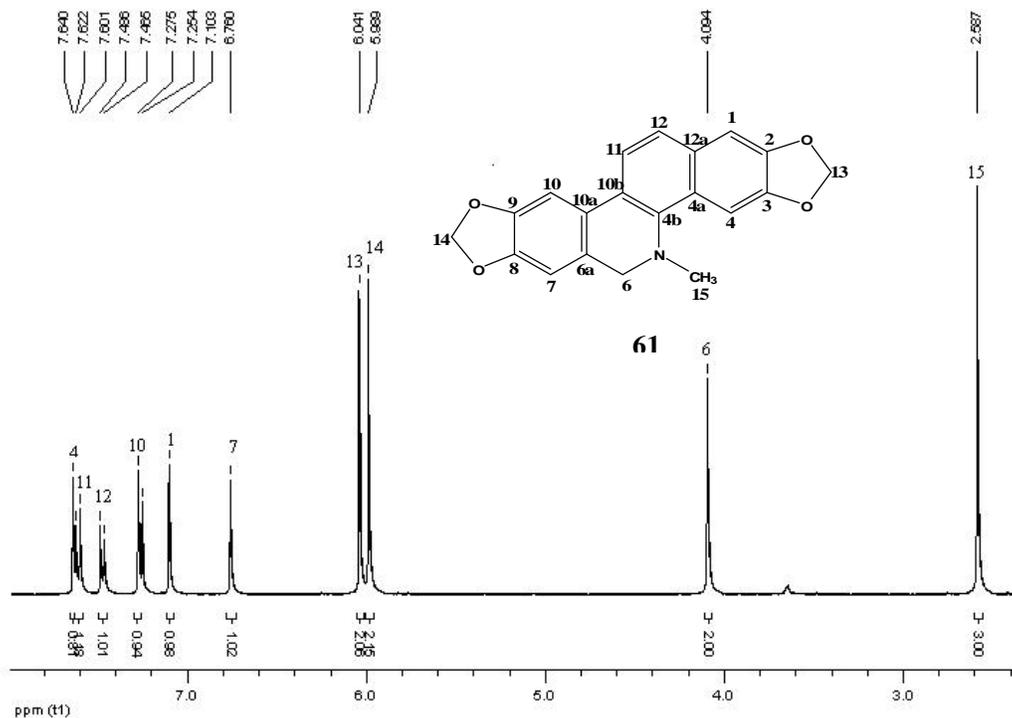


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H de Diidroavicina (**61**) em CDCl_3 a 400MHz.

O RMN de ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 30) apresentou vinte sinais numa região espectral compreendida entre δ 40,72 e 148,09ppm. O sinal da metila ligado ao nitrogênio esta sinalizado em δ 40,73ppm. Os grupos metilenodioxila absorvem em δ 100,69 e δ 100,96ppm.

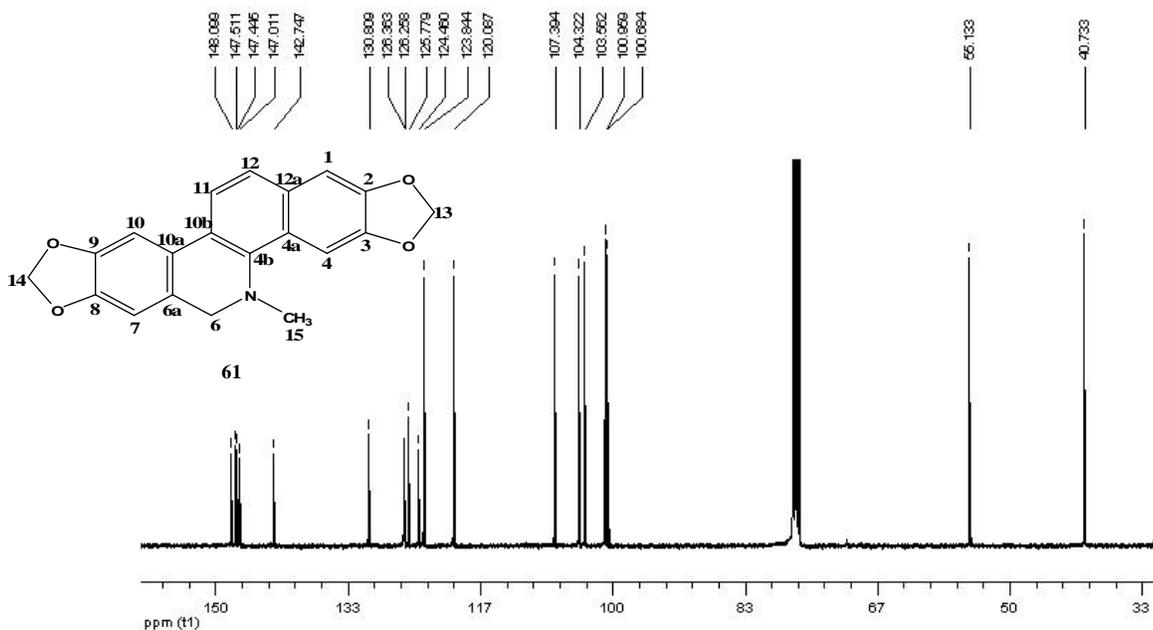
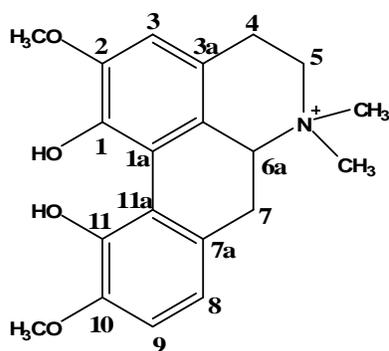


Figura 30: Espectro de RMN de ¹³C de Dihydroavicina (**61**) em CDCl₃ a 100MHz.

5.4. Compostos isolados de *Zanthoxylum rhoifolium*: precipitado do extrato bruto metanólico quente

5.4.1. Magnoflorina (**62**)

Este metabólito, purificado conforme descrito na página 54 foi isolado na forma de um sólido acinzentado que, quando analisado em CCD com revelação em Dragendorff, reagiu positivamente tratando-se de um alcalóide. A análise dos dados obtidos por técnicas de RMN e a comparação com dados descritos na literatura⁴⁷ permitiram propor que a estrutura deste metabólito corresponde ao alcalóide da classe dos aporfínicos denominado Magnoflorina (**62**).



62

No espectro de RMN de ^1H (Figura 31) são observados 14 sinais entre δ 2 e 7ppm, que pela integração correspondem aos 22 átomos de hidrogênio da estrutura (62). As metoxilas estão sinalizadas como singletos em δ 3,77 e 3,80ppm. Dois sinais em δ 2,82 e 3,25ppm reportam as metilas ligadas ao átomo de nitrogênio. O sinal multipletto em δ 3,98ppm sinaliza o próton 6a, vizinho ao nitrogênio.

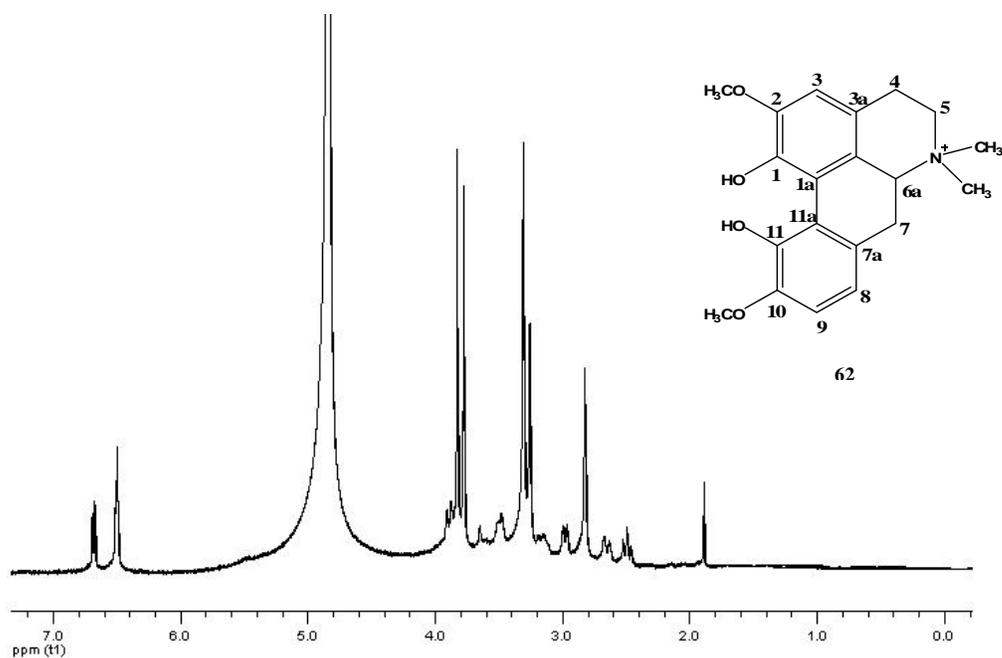


Figura 31: Espectro de RMN de ^1H de Magnoflorina (62) em MeOD a 400MHz.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 32) foi possível observar a presença de 20 carbonos sinalizados numa região espectral compreendida entre δ 20 e 160ppm. Os sinais em δ 149,89 e 150,81ppm correspondem aos carbonos que se ligam as hidroxilas. Em δ 56,08 e 56,36ppm estão os carbonos das metoxilas 2 e 10, respectivamente. Os carbonos 5 e 6a que se ligam ao átomo de nitrogênio absorvem no espectro em δ 62,4 e 71,28ppm.

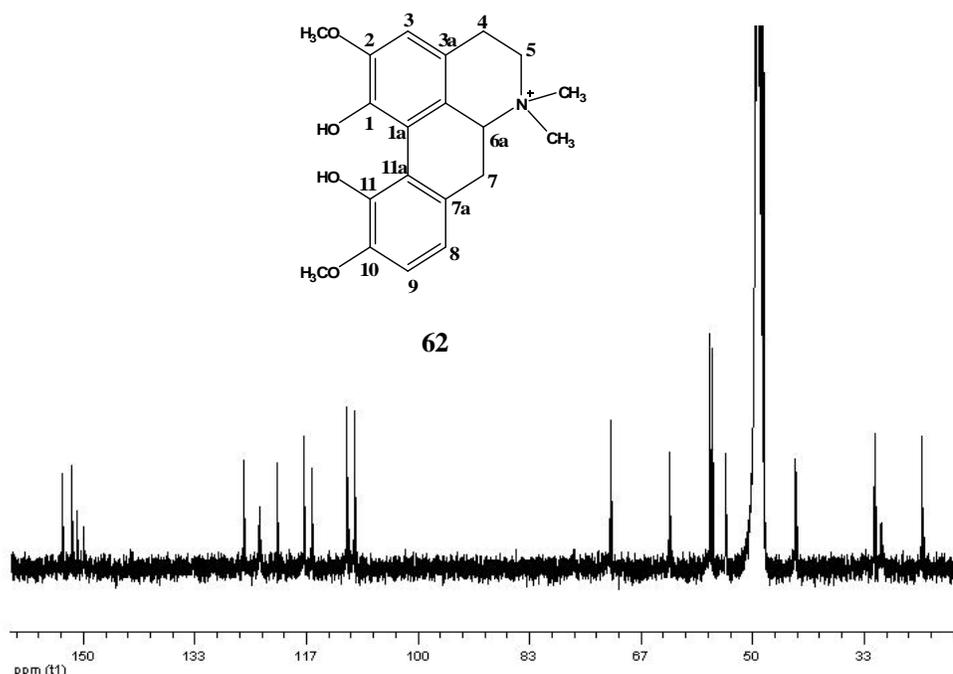


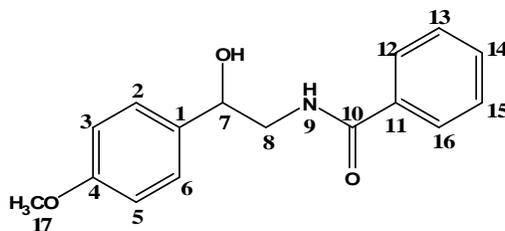
Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C de Magnoflorina (**62**) em MeOD a 100MHz.

5.5. Composto isolado de *Zanthoxylum hyemale*: fração diclorometânica

5.5.1. Tembamida (**63**)

Na página 57, item 4.5.1.1.1., está descrito o isolamento deste metabólito. Sua forma física foi de um sólido branco que revelava somente em solução de ácido sulfúrico/etanol e aquecimento. Este metabólito foi submetido à análise de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais

para elucidação de sua estrutura. Sendo possível confrontar os dados obtidos neste trabalho com resultados já descritos na literatura,³⁸ chegou-se a estrutura da amida Tembamida (**63**).

**63**

Na caracterização deste composto, o espectro de RMN ^1H (Figuras 33 e 34) apresenta dez sinais na região entre 3 e 8ppm. Em $\delta=3,53$ e $\delta=3,87$ ppm estão identificados os sinais dos hidrogênios metilênicos (posição 8), que por estarem adjacentes a um carbono quiral (C-7) não possuem equivalência química (hidrogênios diasterotópicos) e apresentam desdobramentos diferentes em seus sinais. Neste espectro os átomos de hidrogênios diasterotópicos estão sinalizados como multipletos. Em $\delta=3,81$ ppm, um singlete intenso sinaliza a presença do grupo metoxila da posição 17 e o sinal do hidrogênio vizinho ao grupamento hidroxila está sinalizado em $\delta=4,91$ ppm, (dd, $J=4,2$ e $4,0$ Hz). O espectro de ^{13}C (Figura 35) confirmou os sinais dos carbonos da estrutura (**63**).

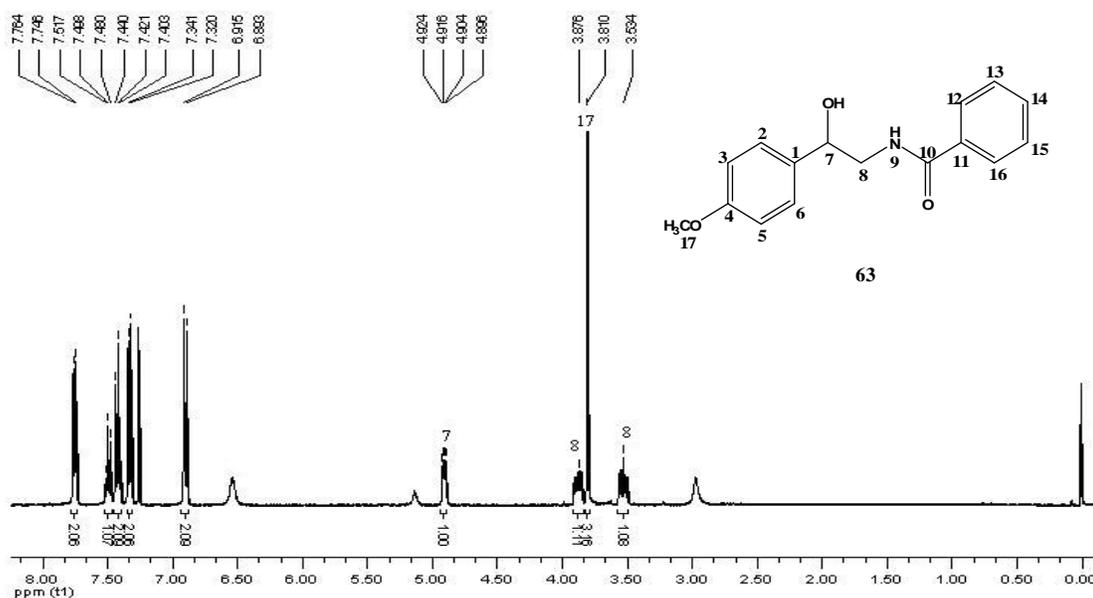


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H de Tembamida (**63**) em CDCl_3 a 400MHz.

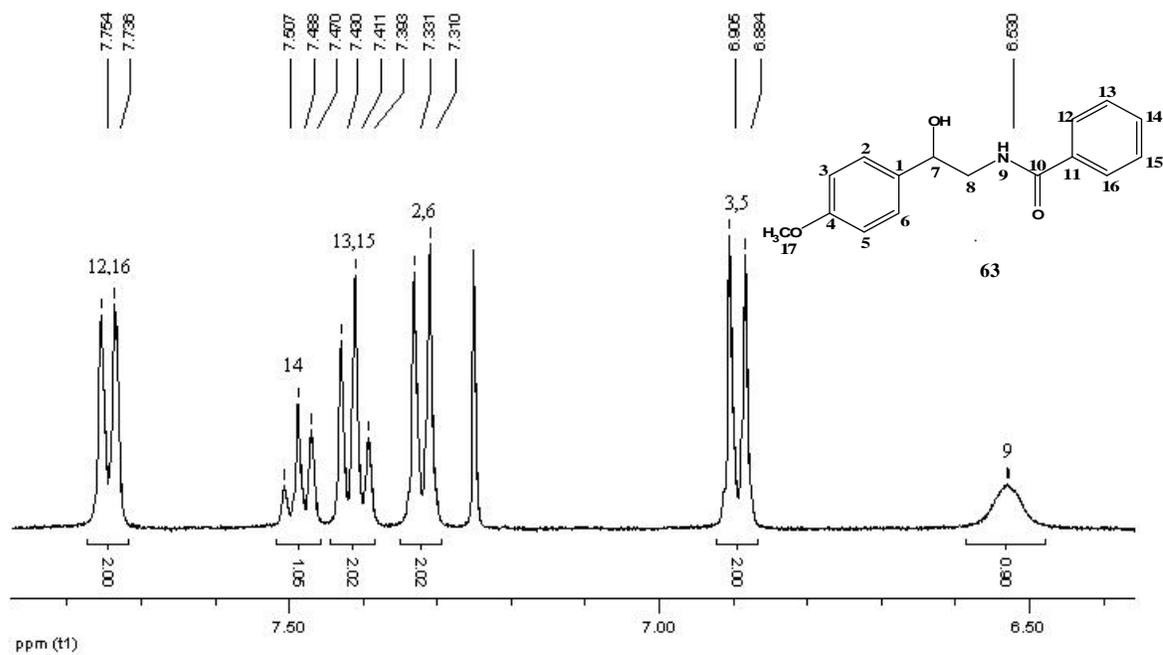


Figura 34: Espectro expandido de RMN de ^1H de Tembamida (**63**) em CDCl_3 a 400MHz.

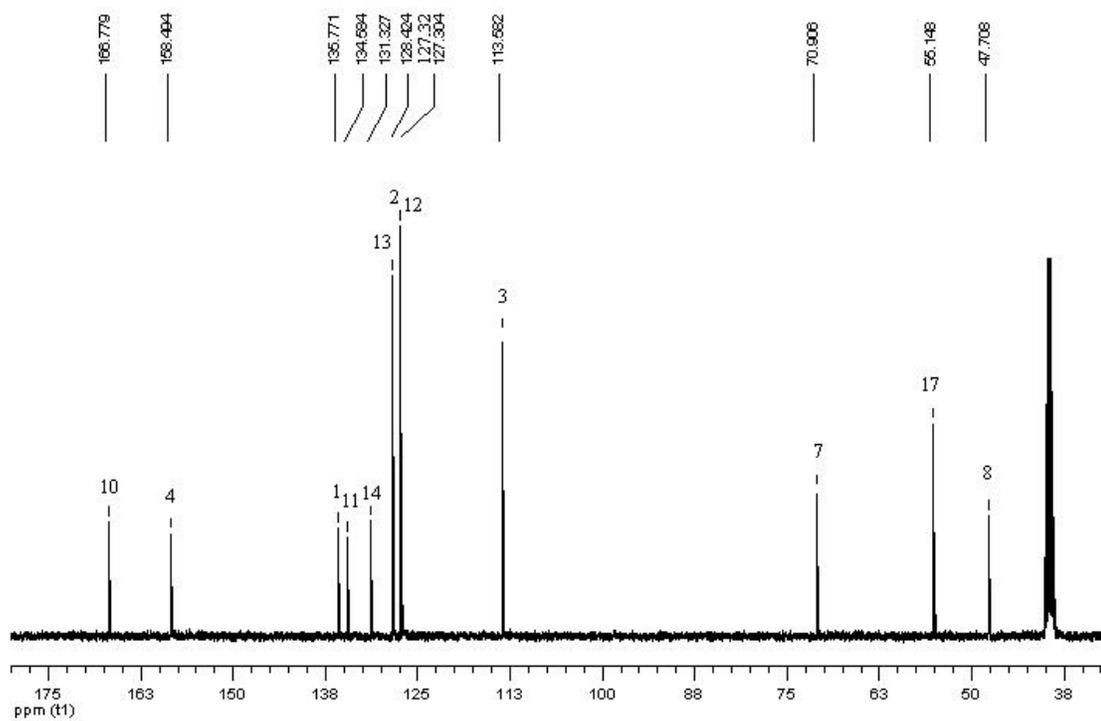


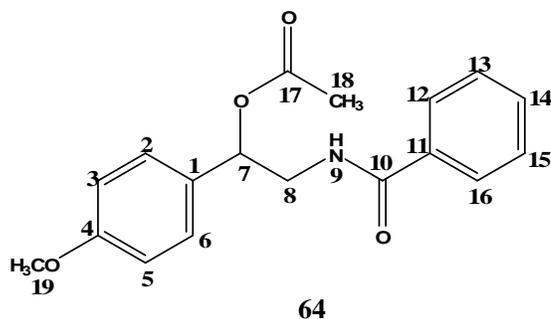
Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C de Tembamida (**63**) em CDCl_3 a 100MHz.

5.6. Produtos da derivatização de Tembamida

Em trabalho publicado no ano de 2001, Moura e col.²³ descreveram algumas atividades biológicas testadas frente aos compostos que haviam isolado das cascas do caule da espécie *Z. hyemale*. Neste estudo, verificou-se que a amida Tembamida (**63**) estava entre os compostos submetidos aos ensaios microbiológicos que objetivava avaliar as atividades antimicrobiana e antiespasmódica desses compostos. Contudo, a amida não apresentou resultados relevantes frente aos ensaios à que foi submetida. Com a identificação do metabólito novamente neste trabalho, decidiu-se obter derivados do mesmo para análise de atividades biológicas e verificação da influência da estrutura dos compostos na atividade apresentada.

5.6.1. 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**)

O metabólito secundário tembamida (**63**) isolado das cascas do caule da espécie *Z. hyemale* foi submetido a reação de acetilação com anidrido acético. Passado duas horas de reação o produto foi purificado em CC com solventes adequados, conforme descrito na página 58. A fim de confirmar a ocorrência da reação, o produto obtido foi enviado para análise de RMN de ¹H e ¹³C.



Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 36, 37 e 38) do composto, os dados obtidos são compatíveis com a estrutura esperada. As diferenças em relação ao espectro de ^1H do precursor tembamida foram observadas na presença de um singlete intenso em δ 2,09ppm (integração para três hidrogênios) que se refere a metila do grupo acetato, nos dois hidrogênios da posição 8 que neste espectro estão sinalizados como um sinal multipletto em δ 3,83ppm e no sinal do próton da posição 7, que está absorvendo em δ 5,94ppm. Na região dos aromáticos a mesma multiplicidade do espectro da tembamida foi observada, sendo três dubletos e dois duplo dubletos (Figura 36).

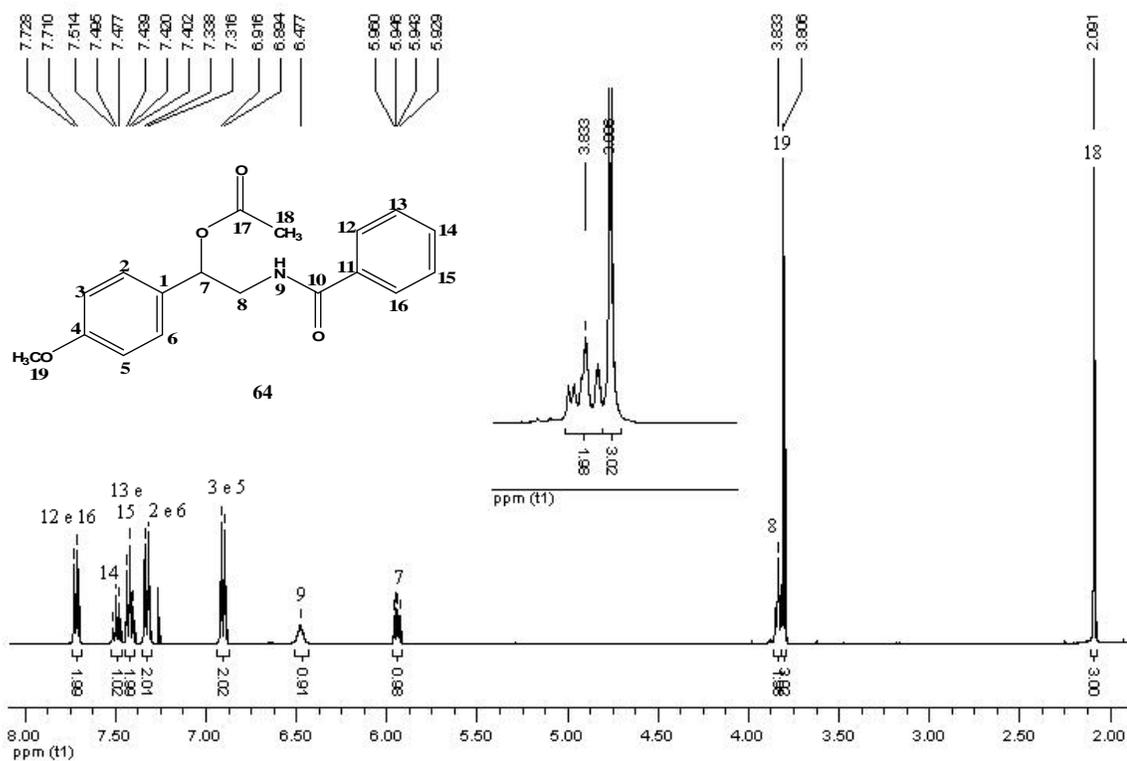


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**) em CDCl_3 a 400MHz.

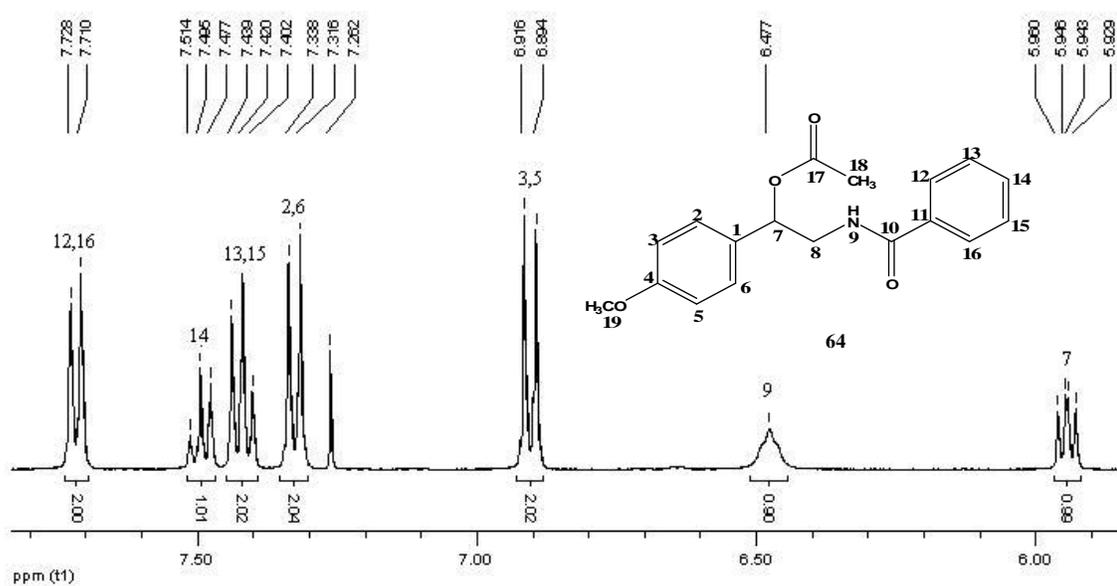


Figura 37: Espectro expandido de RMN de ^1H de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**) em CDCl_3 a 400MHz.

A análise dos dados de RMN de ^{13}C (Figura 38) permitiu confirmar a presença da carbonila do éster na posição 17 (δ 170,73ppm) e o grupo metila em δ 21,18ppm (C-19).

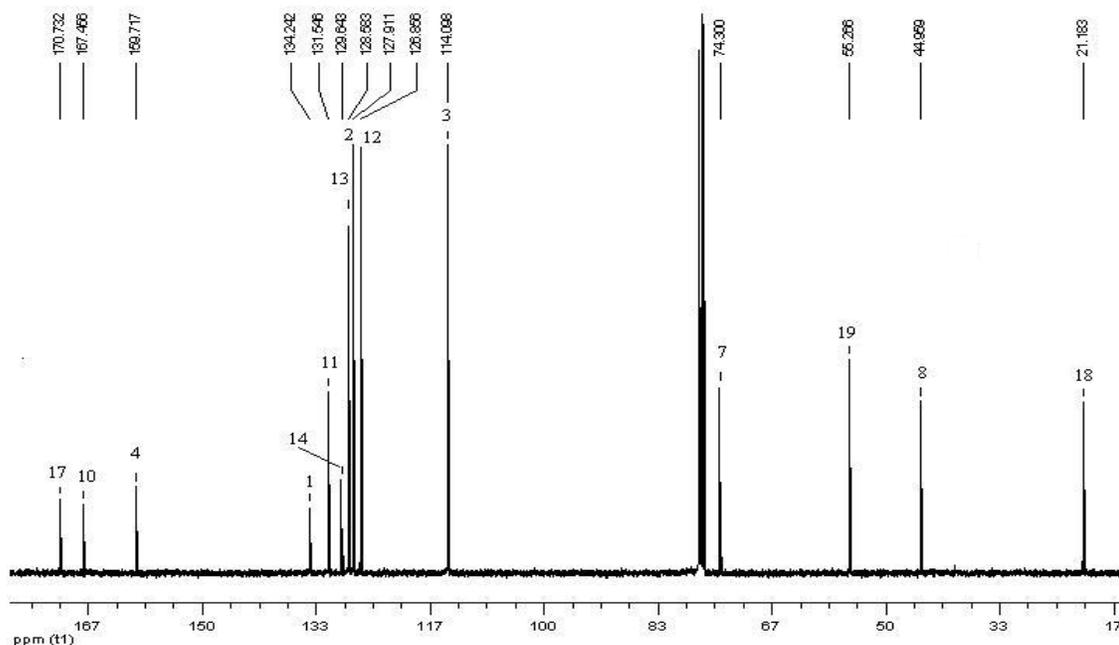
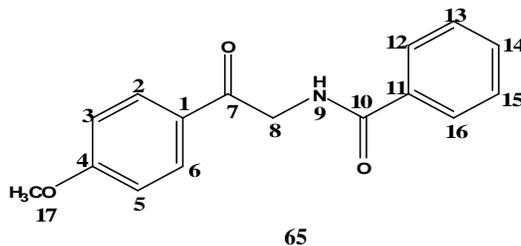


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C de 2-benzamida-1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**) em CDCl_3 a 100MHz

5.6.2. N-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida (65)

A reação de oxidação da tembamida com PDC, permitiu a obtenção do composto N-2-(4-metoxifenil) 2-oxietil benzamida (65). Na página 60 está descrito a reação executada e o modo de purificação. Para confirmar que o produto obtido foi o esperado para a reação, fez-se análise em RMN e os dados encontrados são compatíveis para a estrutura do composto.



Na figura 39 o espectro de ^1H permite observar um sinal em δ 4,92ppm na forma de duplete com integração para dois átomos que se refere aos hidrogênios da posição 8, vizinhos a carbonila resultante da oxidação do grupo OH. Na região de campo baixo, esta sinalizado em δ 7,34ppm o sinal singlete alargado que reporta ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio. Em comparação com o espectro da tembamida onde este sinal estava sinalizado em δ 6,53ppm, observamos a mudança no campo pela presença da carbonila introduzida na molécula.

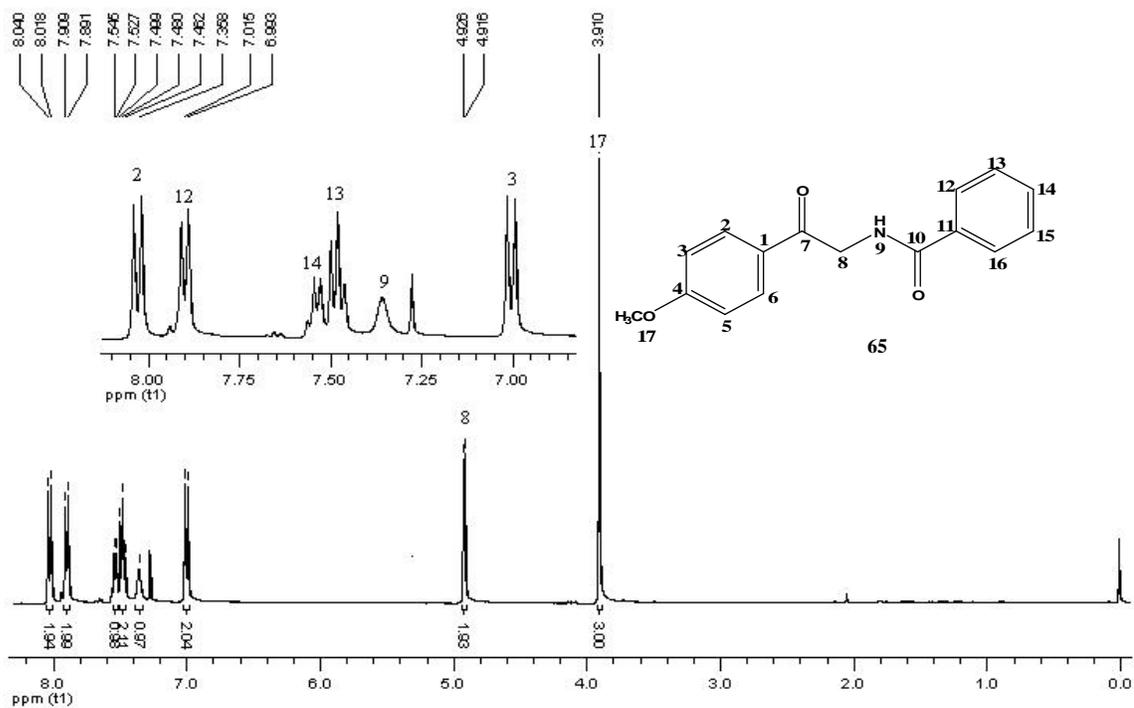


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H de *N*-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida (**65**) em CDCl_3 a 400MHz.

Com os dados obtidos na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 40) foi possível confirmar a presença da carbonila de cetona, absorvendo em δ 192,58ppm. Em relação ao espectro do material de partida tembamida, é verificada a ausência do sinal de carbono de álcool em δ 70,90ppm.

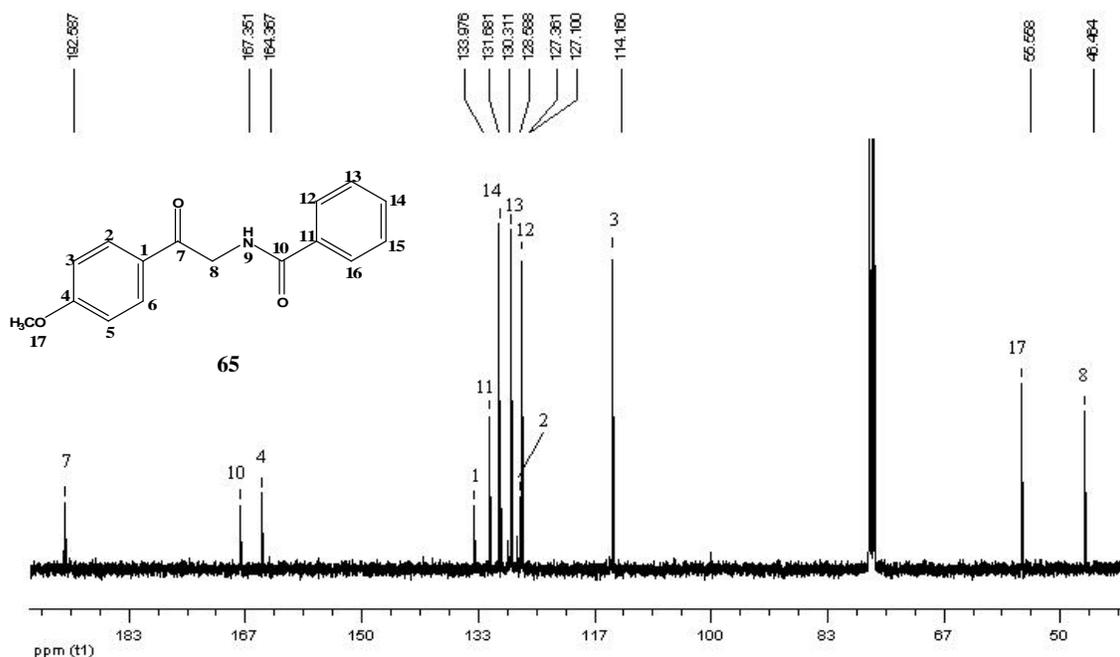
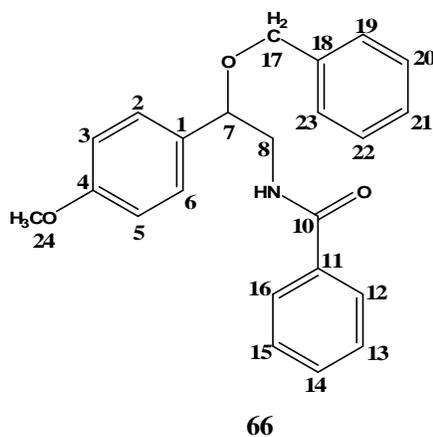


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C de N-(2-(4-metoxifenil)-2-oxietil) benzamida (65) em CDCl_3 a 100MHz.

5.6.3. N-(2-(benziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (66)

Este composto foi obtido da derivatização da tembamida através da reação de benzilação com brometo de benzila (Página 61) que após purificado por CC foi enviado para análise em RMN de ^1H .



Os dados de RMN obtidos evidenciam a ocorrência da reação. O espectro de ^1H (Figuras 41, 42 e 43) nos mostra 23 átomos de hidrogênios nesta estrutura, sendo quatorze na região dos aromáticos e oito entre δ 3 e 5ppm, região dos prótons alifáticos. Sinalizado em δ 7,30ppm o singlete intenso com integração para cinco hidrogênios reporta ao anel aromático do benzil (Ph-CH_2 -). Os outros sinais na região dos prótons aromáticos coincidem com os sinais observados no espectro do composto tembamida, três dubletos (H-2, H-3 e H-12) e dois duplo dubletos (H-13 e H-14).

Os prótons diastereotópicos da posição 8 vizinhos ao centro quiral (C-7) desdobram como multipletos em dois sinais (δ 3,43 e δ 3,91ppm) e o hidrogênio ligado ao centro quiral aparece neste espectro como um sinal dubleto em δ 4,54ppm. Ainda é possível observar na região dos alifáticos o sinal dos prótons metilênicos do benzil sinalizados em δ 4,27 e 4,53ppm como dubletos ($J \sim 11\text{Hz}$), confirmando o produto esperado da reação.

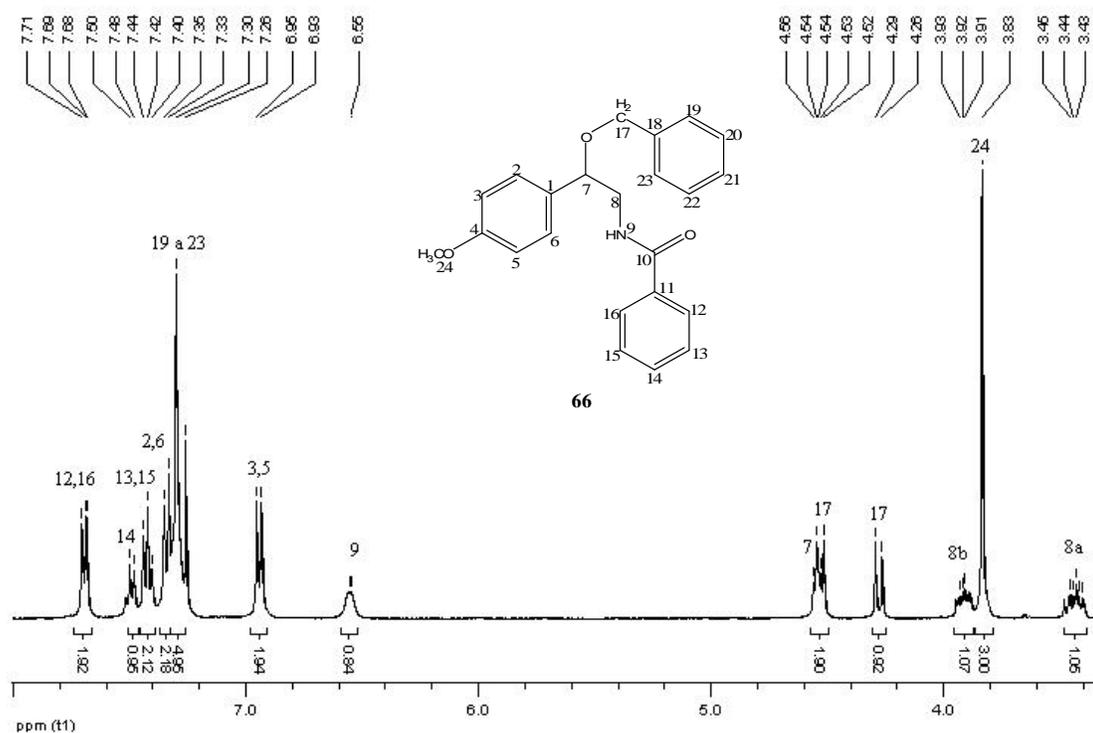


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H de N-(2-(benziloxy)-2-(4-metoxifenil etil) benzamida (**66**) em CDCl_3 a 400MHz.

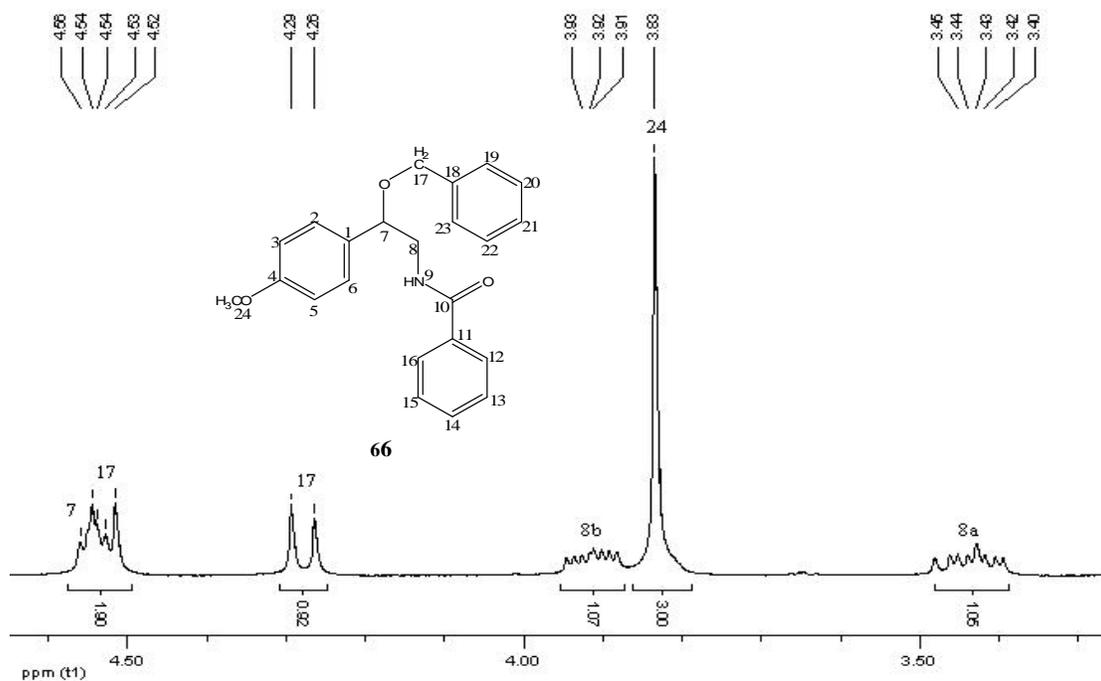


Figura 42: Espectro expandido de RMN de ^1H de N-(2-(benziloxi)-2-(4-metoxifenil)etil) benzamida (**66**) em CDCl_3 a 400MHz.

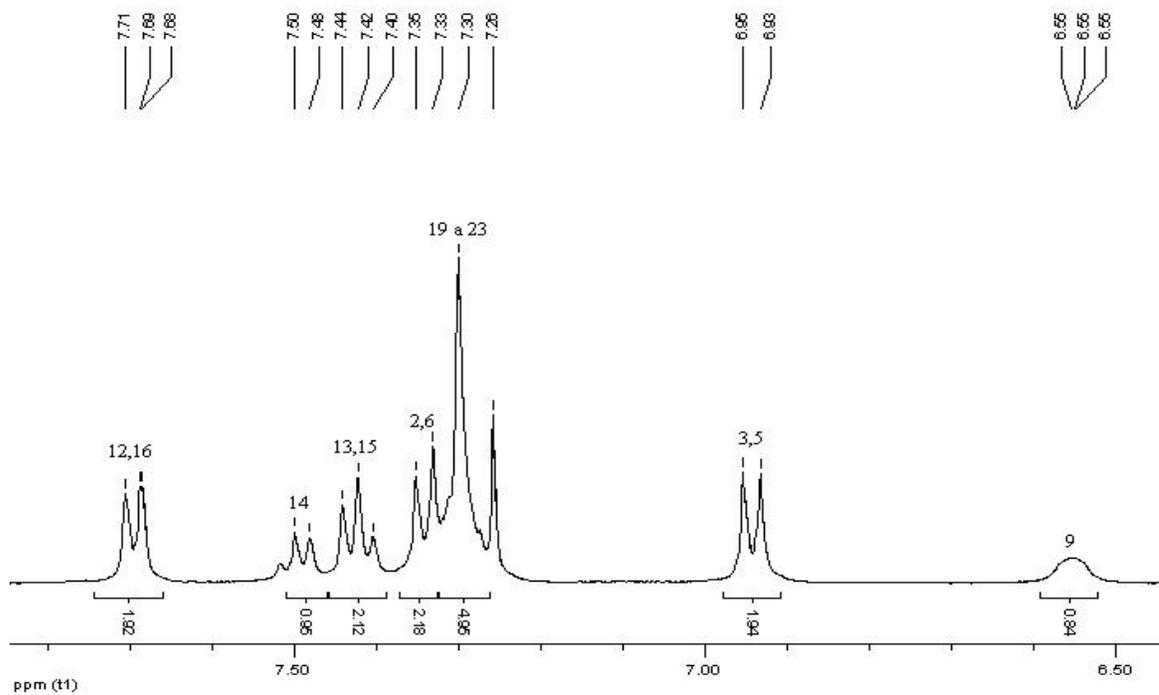
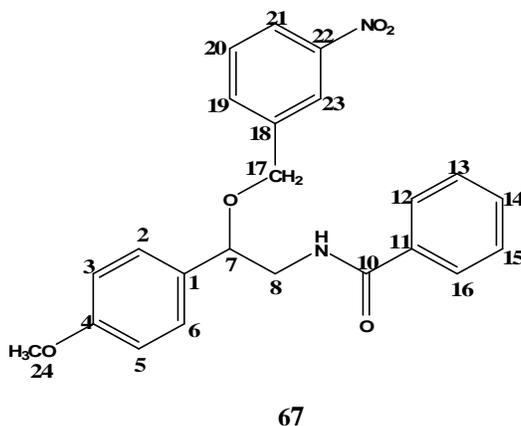


Figura 43: Espectro expandido de RMN de ^1H - região dos aromáticos - de N-(2-(benziloxi)-2-(4-metoxifenil)etil) benzamida (**66**) em CDCl_3 a 400MHz.

5.6.4. N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (67)

Com a utilização do 3-nitro brometo de benzila realizou-se a derivatização do composto tembamida. Esta reação está descrita na página 61 e nas figuras 44, 45 e 46 que seguem estão demonstrados os espectros de RMN do produto a fim de comprovar sua estrutura.



Neste espectro de ^1H (Figuras 44 e 45), dois sinais na região dos aromáticos foram muito importantes para confirmar o produto esperado para a reação realizada. O sinal singlete em δ 8,19ppm com integração para um átomo de hidrogênio evidencia a existência de um anel aromático meta substituído.

O deslocamento químico observado para este hidrogênio condiz com o substituínte NO_2 desblindando o próton da posição adjacente. Este deslocamento químico observado para o átomo confere com o deslocamento calculado de δ 8,14ppm. Em δ 8,11ppm está sinalizado como dubleto o sinal do hidrogênio aromático da posição 21 do grupo benzila com $J \sim 9\text{Hz}$.

No espectro de ^{13}C (Figura 46) observamos 14 sinais na região dos aromáticos. O C-17 do grupo benzila está sinalizado em δ 80,19ppm. Em δ 167,36ppm temos o sinal da carbonila da estrutura (67). O C-22 que possui o grupo NO_2 absorve no espectro em δ 148,26ppm.

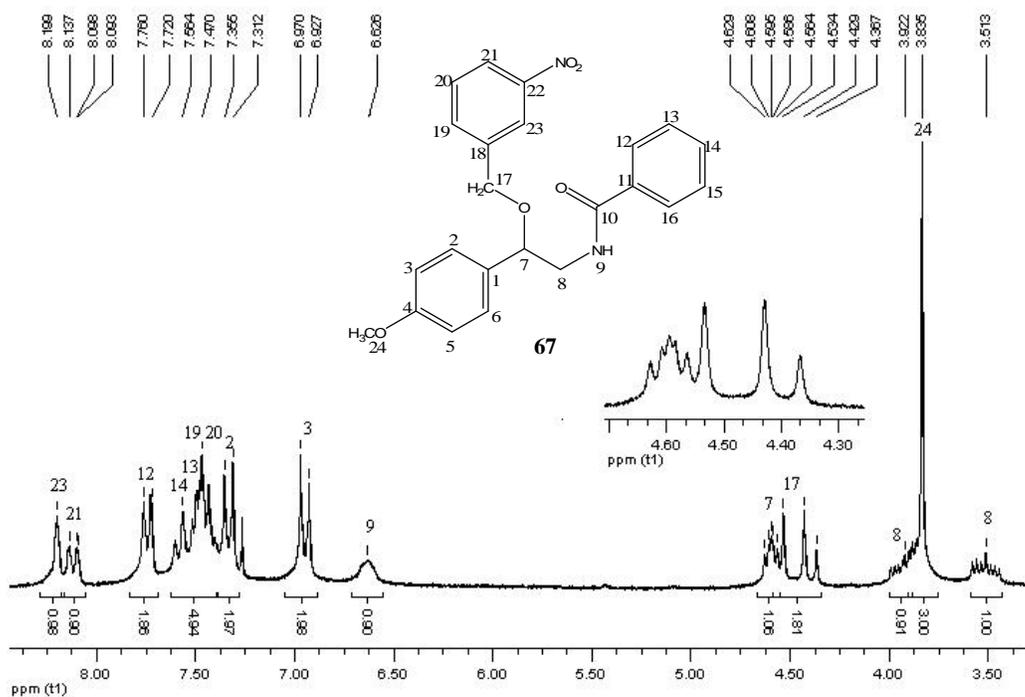


Figura 44: Espectro de RMN de ¹H de N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (**67**) em CDCl₃ a 200MHz.

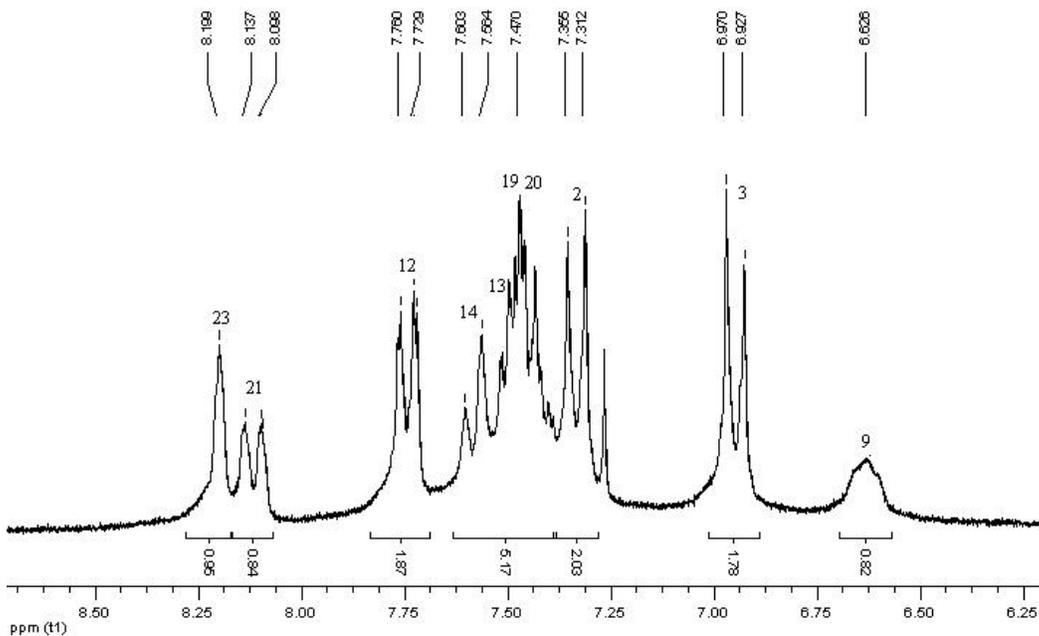


Figura 45: Espectro expandido de RMN de ¹H de N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (**67**) em CDCl₃ a 200MHz.

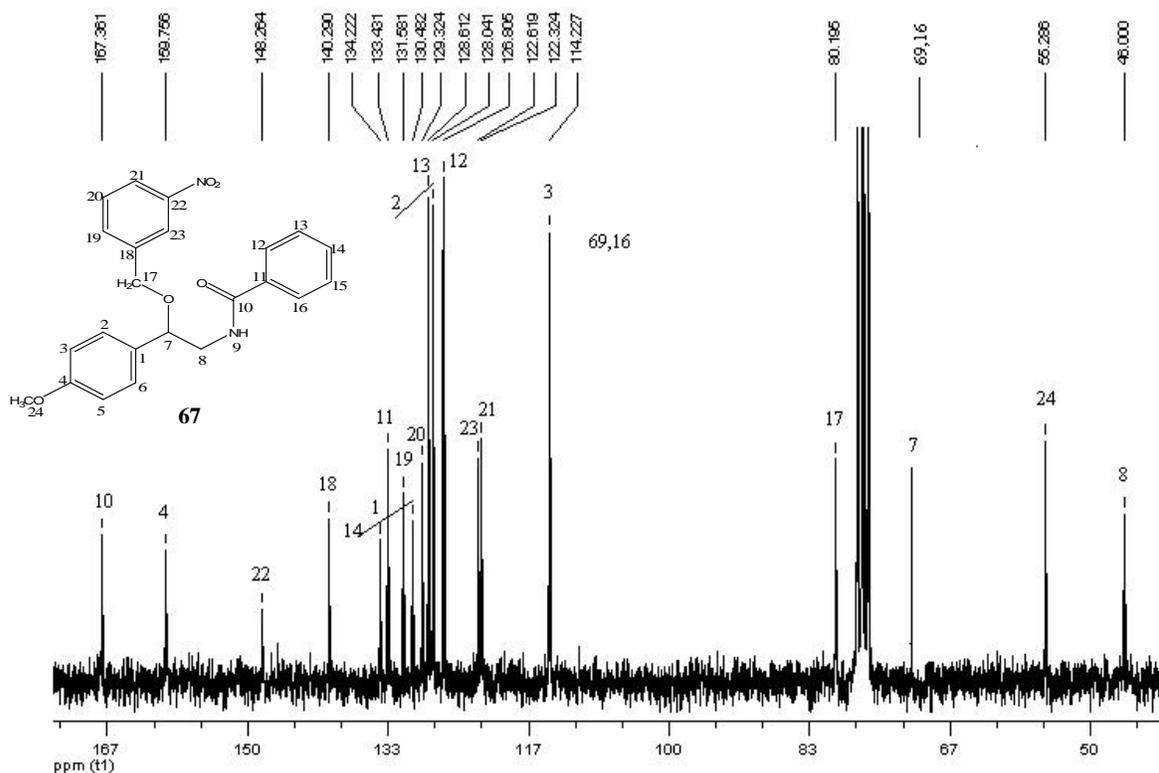
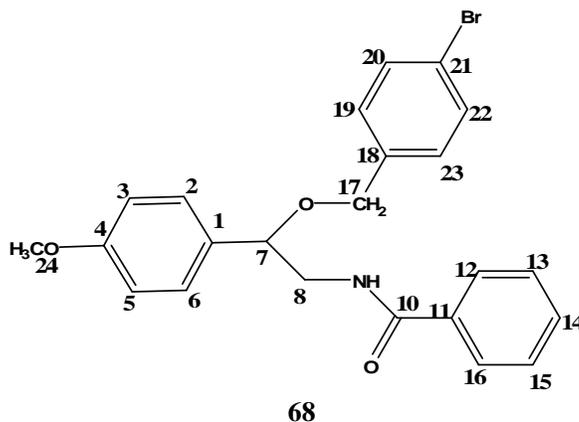


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C de N-(2-(4-metoxifenil)-2-3-nitrobenziloxi etil) benzamida (**67**) em CDCl_3 a 50MHz.

5.6.5. N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (**68**)

Este composto foi obtido da reação de benzilação realizada para derivatizar o composto tembamida. Sua forma física foi de um sólido branco solúvel em clorofórmio e revelando em ácido/etanol sob aquecimento como uma única mancha escura.



O espectro de RMN de ^1H (Figura 47) obtido para o composto mostrou pela integração dos sinais que a estrutura possui 22 prótons, numa região espectral compreendida entre δ 3,4 e 7,8ppm. Os sinais observados no espectro são compatíveis com a estrutura esperada para o produto da reação de benzilação. Vemos o sinal dos hidrogênios do anel aromático do grupo benzil em δ 7,46ppm como um singlete intenso integrando para quatro átomos. Em campo alto no espectro os prótons metilênicos estão absorvendo em δ 4,49ppm.

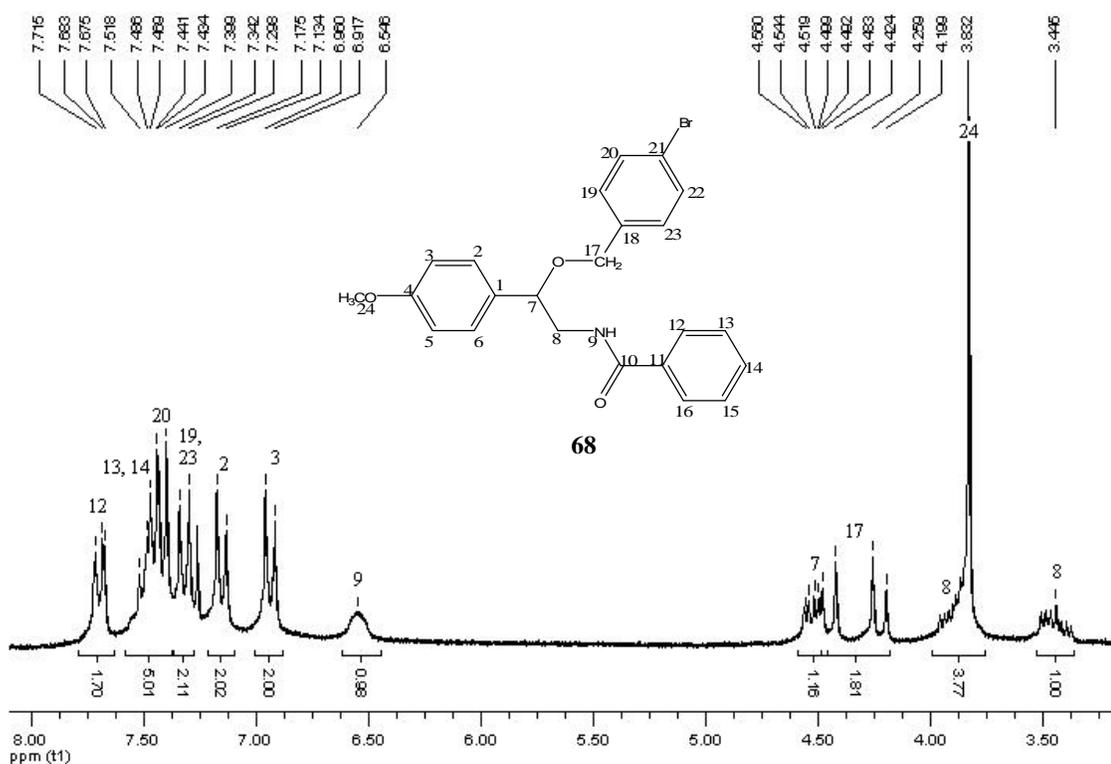


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (**68**) em CDCl_3 a 200MHz.

Na análise do RMN de ^{13}C (Figura 48) observamos a presença do sinal do carbono metilênico da posição 17 em δ 79,58ppm e na região dos aromáticos os sinais dos 13 carbonos referente aos três anéis que compõem esta estrutura.

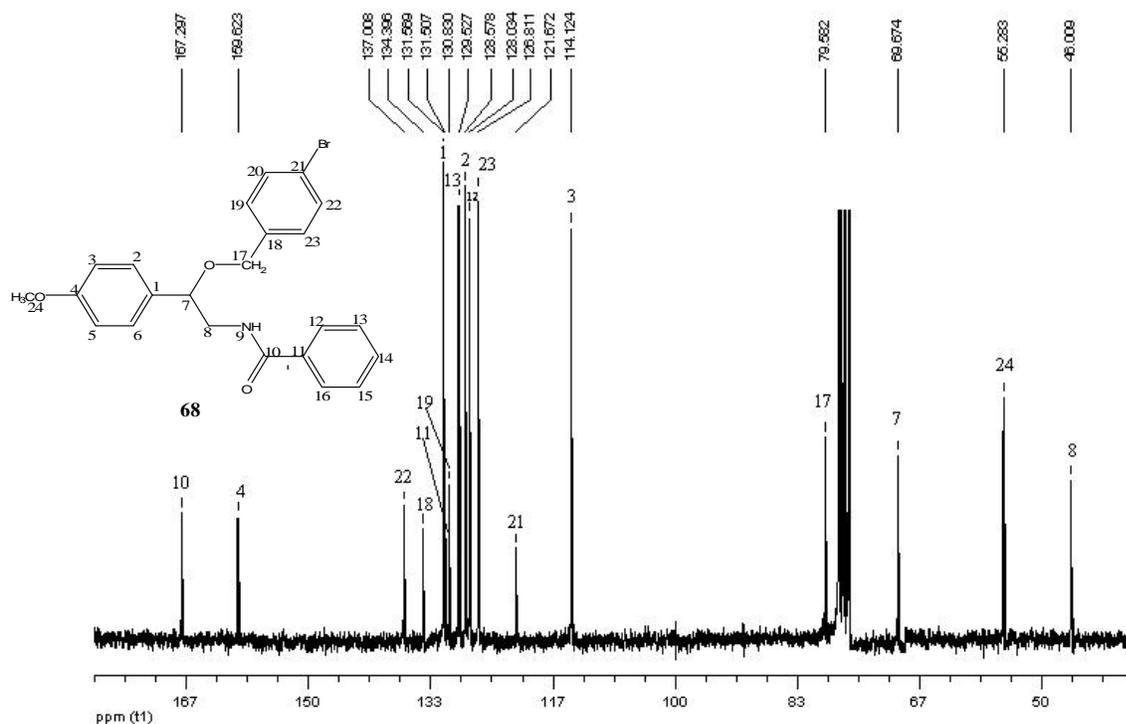


Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C de N-(2-(4-bromobenziloxi)-2-4-metoxifenil etil) benzamida (**68**) em CDCl_3 a 50MHz.

5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste trabalho, o método do DPPH (Página 64) foi usado para avaliar a atividade antioxidante das espécies em estudo. Primeiramente um “screening” das substâncias foi realizado a fim de observar quais delas apresentariam atividade. Após o resultado desse “screening”, as amostras que melhores resultados apresentaram, foram novamente testadas pelo método do DPPH Quantitativo, sendo feitas análises em diferentes concentrações.

Devido a quantidade de amostras utilizadas neste ensaio, somente foi possível testar os extratos e frações, pois alguns metabólitos haviam sido purificados em poucas quantidades, o que impediu-os de serem testados.

Os resultados obtidos para ambos os ensaios: qualitativo (“screening”) e quantitativo estão demonstrados nas tabelas 10 a 14 e nos gráficos 1 a 8 que seguem.

Tabela 10: Resultado da atividade antioxidante através de “screening” de extratos e frações das espécies *Zanthoxylum hyemale* e *Zanthoxylum rhoifolium*.

Amostras	Atividade
EBMF <i>Z. hyemale</i>	+
FH <i>Z. hyemale</i>	+
FD <i>Z. hyemale</i>	+
FA <i>Z. hyemale</i>	+
FB <i>Z. hyemale</i>	+
EBMF <i>Z. rhoifolium</i>	+
FH <i>Z. rhoifolium</i>	+
FD <i>Z. rhoifolium</i>	+
FA <i>Z. rhoifolium</i>	+
FB <i>Z. rhoifolium</i>	+
FCN <i>Z. rhoifolium</i>	+
FCB <i>Z. rhoifolium</i>	+
FAB <i>Z. rhoifolium</i>	+
FEA <i>Z. rhoifolium</i>	+
FEB <i>Z. rhoifolium</i>	+

+ = zona de inibição observada; - = zona de inibição não observada.

Todos os extratos e frações de ambas as espécies estudadas demonstraram potencial de captura do radical DPPH quando esta atividade foi avaliada através do “screening” das amostras. A determinação da atividade foi observada pela formação de halos brancos no fundo violeta da CCD utilizada no teste.

Tabela 11: Resultado da atividade antioxidante (“screening”) dos compostos isolados.

Substâncias	Atividade
Skimianina	+
8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico	+
γ -Fagarina	+
Zantoxilina	+
Diidrocheleritrina	+
Diidroavicina	+
Cheleritrina	+
Tembamida	-
2-benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato	-
N-(2-(4-metoxifenil) 2-oxietil benzamida	+

+ = zona de inibição observada; - = zona de inibição não observada.

No ensaio para avaliação da atividade antioxidante das substâncias puras realizado através do “screening”, foi observado potencial antioxidante em todos os alcalóides testados. Neste teste a amida Tembamida (**63**) e seu derivado 2-benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**) não apresentaram poder de captura do radical DPPH, não sendo visualizado o halo esbranquiçado na CCD que representa a ocorrência de atividade antioxidante. Para o derivado N-(2-(4-metoxifenil) 2-oxietil benzamida (**65**) observou-se atividade.

Espécie *Zanthoxylum rhoifolium*

Tabela 12 : Dados de atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*

Concentração ^{a/} Amostras	% de Inibição					
	FH	FD	FA	FB	EBMF	BHT
500	87,1	72,1	87,1	82,0	90,1	96,7
250	86,2	72,5	87,8	82,5	90,7	94,5
125	89,0	71,4	86,5	81,2	89,5	86,2
62,5	64,2	62,5	84,0	70,4	80,3	81,0
31,25	32,2	43,9	51,1	44,5	45,6	75,5
15,62	19,7	19,8	24,4	18,7	20,8	25,5
7,81	16,0	12,5	13,6	6,0	4,1	12,2
3,09	8,0	5,4	5,4	1,7	0,9	10,7

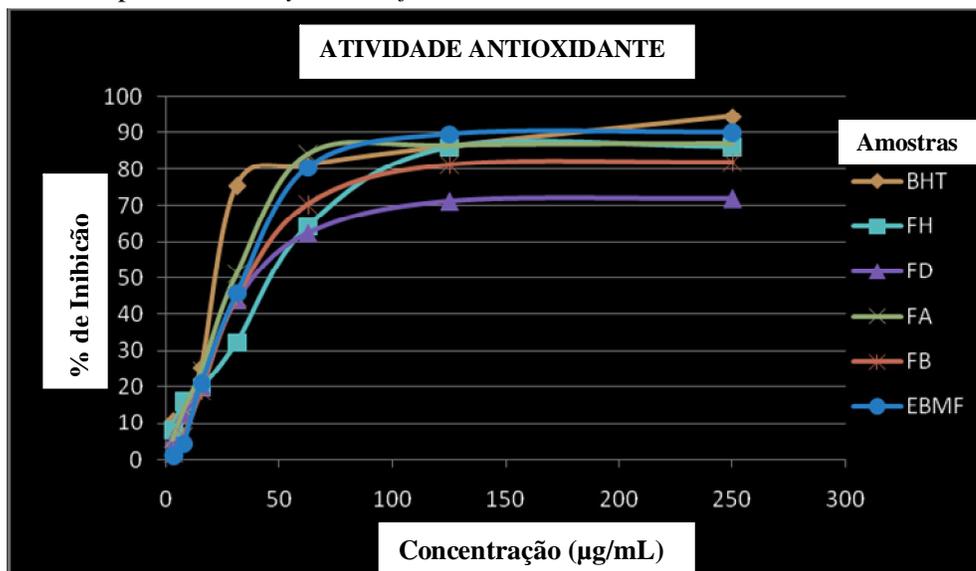
^a em µg/mL. BHT = padrão.

Tabela 13: Dados de atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*

Concentração ^{a/} Amostras	% de Inibição							
	FHN	FCN	FCB	FEA	FAN	FAB	EBMQ	BHT
500	90,0	91,2	94,7	85,0	90,7	97,0	94,2	96,7
250	86,4	90,5	86,7	84,7	90,1	86,0	94,0	94,5
125	86,0	90,0	83,7	76,7	89,5	59,5	93,0	86,2
62,5	64,5	89,7	82,5	46,5	80,3	36,5	91,2	81,0
31,25	31,8	74,7	79,2	24,5	45,6	22,7	58,0	75,5
15,62	20,7	45,2	47,5	14,0	20,8	15,0	28,0	25,5
7,81	15,0	23,0	28,7	9,0	4,1	12,2	16,5	12,2
3,09	8,0	7,5	14,0	5,0	0,9	5,0	9,7	10,7

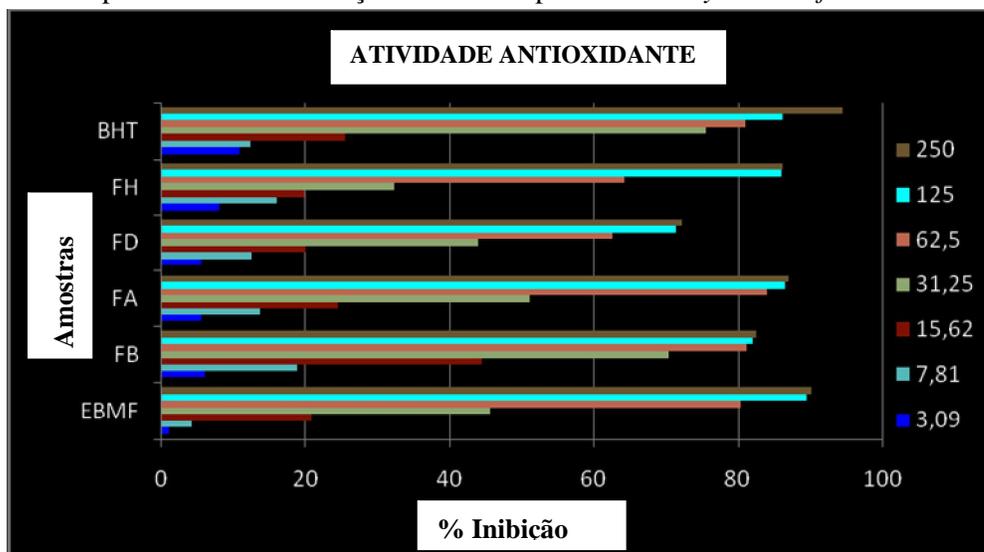
^a em µg/mL. BHT = padrão.

Gráfico 1: Atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*



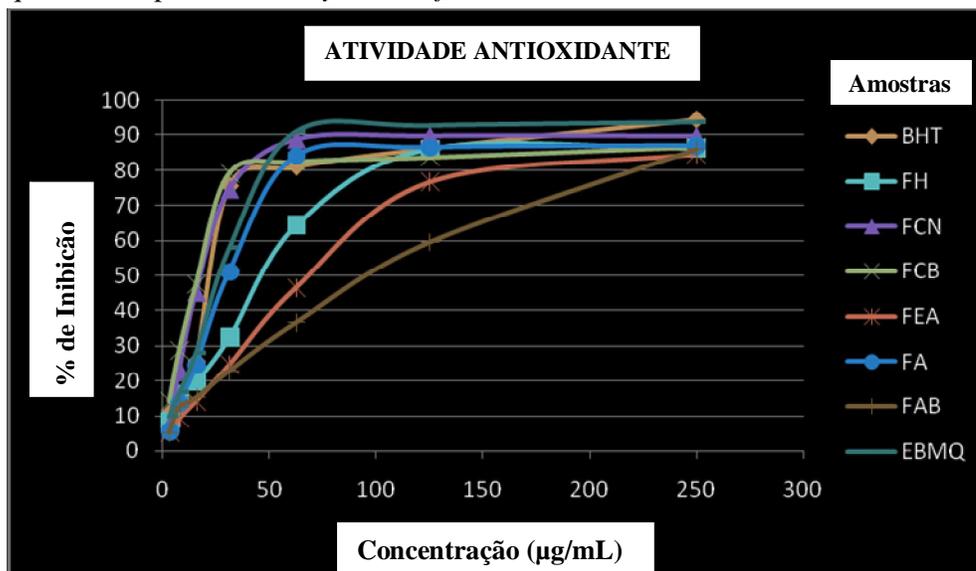
BHT = padrão.

Gráfico 2: Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*



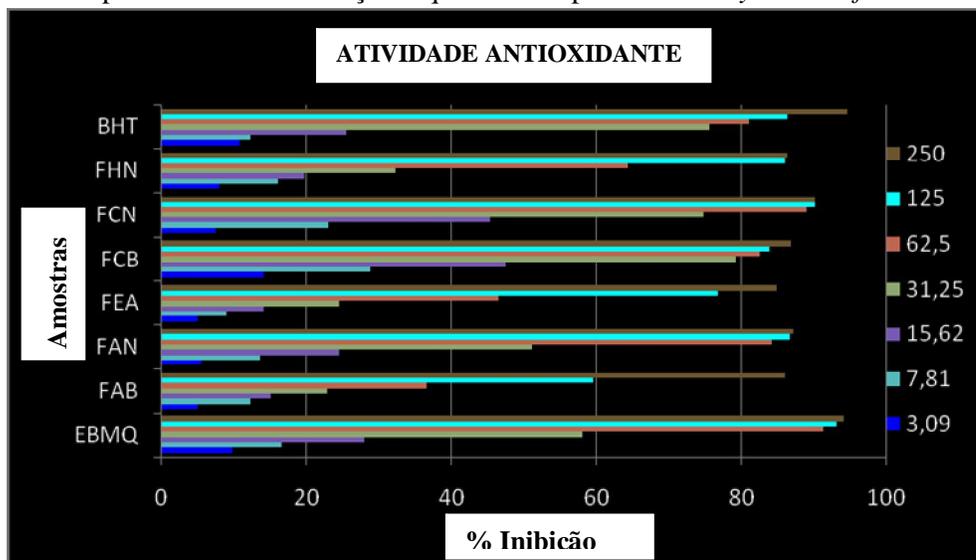
A legenda na direita do gráfico refere-se as concentrações (em µg/mL) em que foram testadas as amostras. BHT = padrão.

Gráfico 3: Atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*



BHT = padrão.

Gráfico 4: Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*



A legenda na direita do gráfico refere-se as concentrações (em µg/mL) em que foram testadas as amostras. BHT = padrão.

Das amostras testadas da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* quanto ao seu potencial antioxidante, tem destaque os resultados observados para as FCN e FCB que apresentaram melhores porcentagens de inibição na maioria das concentrações testadas, em comparação ao

padrão BHT. Os resultados foram mais relevantes na concentração de 15,62 $\mu\text{g/mL}$, onde as frações inibiram 45,25% e 47,50%, respectivamente, enquanto o BHT teve capacidade de inibir apenas 25,50%.

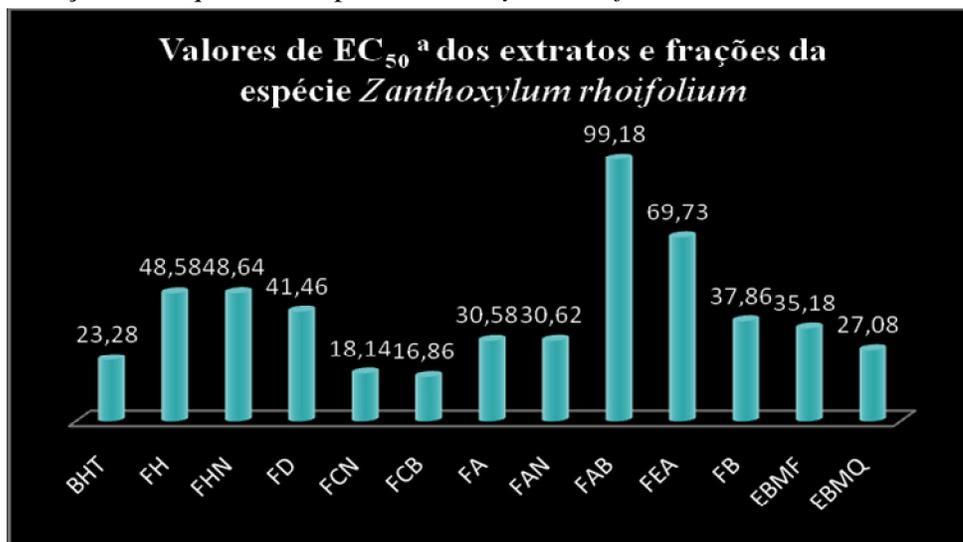
O EBMQ apresentou boa atividade antioxidante, alcançando 91,25% de inibição do DPPH em 62,5 $\mu\text{g/mL}$. A FAN consumiu 89,58% do radical livre na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. Outras frações que obtiveram valores de inibição semelhantes ao BHT em 125 $\mu\text{g/mL}$ foram as FH, FHN e FA.

Em uma comparação entre as frações obtidas pelos diferentes sistemas de fracionamento utilizados no trabalho, fica evidente que os melhores resultados foram demonstrados pelas frações derivadas do extrato bruto metanólico quente, como as FCN e FCB e a FAB. Essas frações apresentaram boa atividade de captura do radical DPPH.

A atividade verificada foram dose-dependentes, o que permitiu o cálculo de EC_{50} (concentração necessária para inibir 50% da atividade do radical livre DPPH) para cada uma das frações analisadas. Os resultados estão expressos no gráfico 5 (Página 126).

Analisando o gráfico 5, é possível afirmar que das amostras testadas as frações clorofórmica neutra e básica são as com melhor atividade antioxidante. Os valores de EC_{50} para estas frações (18,14 e 16,86 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), foram ainda menores que o do padrão BHT (23,28 $\mu\text{g/mL}$), evidenciando a boa capacidade de inibirem o radical DPPH e atuarem como antioxidantes. O EBMQ também apresentou resultado relevante no cálculo de EC_{50} (27,08 $\mu\text{g/mL}$), ficando o valor obtido para este extrato próximo ao valor do padrão. As frações extraídas com acetato de etila (FA e FAB) mostraram bons resultados como antioxidantes, consumindo 50% do DPPH já na concentração de 30,58 e 30,62 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Gráfico 5: Valores de EC₅₀ verificado para os extratos e frações obtidas pelos métodos de extração frio e quente da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*



^a em µg/mL, BHT = padrão

Espécie *Zanthoxylum hyemale*

Tabela 14: Dados de atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*

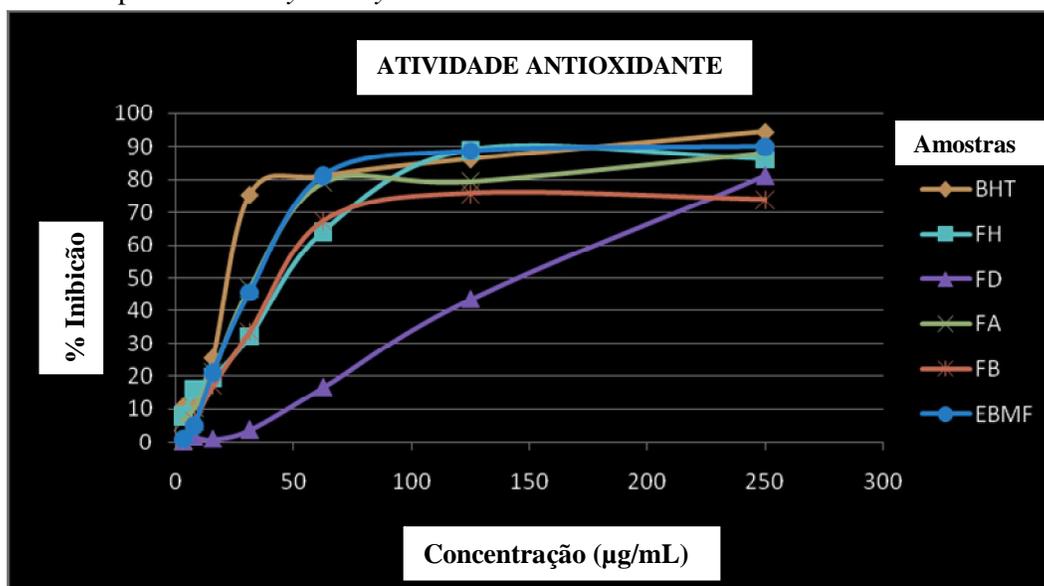
Concentração ^a / Amostras	% de Inibição					
	FH	FD	FA	FB	EBMF	BHT
500	85,4	89,3	94,2	75,9	90,6	96,7
250	82,5	81,2	88,0	74,0	90,0	94,5
125	80,1	43,5	79,3	71,9	89,0	86,2
62,5	70,2	16,6	79,0	67,4	80,3	81,0
31,25	41,2	3,7	47,0	33,5	45,5	75,5
15,62	18,1	1,5	21,2	17,0	21,7	25,5
7,81	14,5	0,9	10,5	6,2	5,5	12,2
3,09	6,2	0,0	6,5	0,3	0,8	10,7

^a em µg/mL. BHT = padrão.

Todas as amostras testadas da espécies *Zanthoxylum hyemale* apresentaram capacidade de captura de radicais DPPH, ou seja, capacidade de neutralizar o poder reativo do radical decorrente da presença de elétrons desemparelhados, por meio da doação de hidrogênios. No entanto, os resultados obtidos evidenciam algumas frações com maior

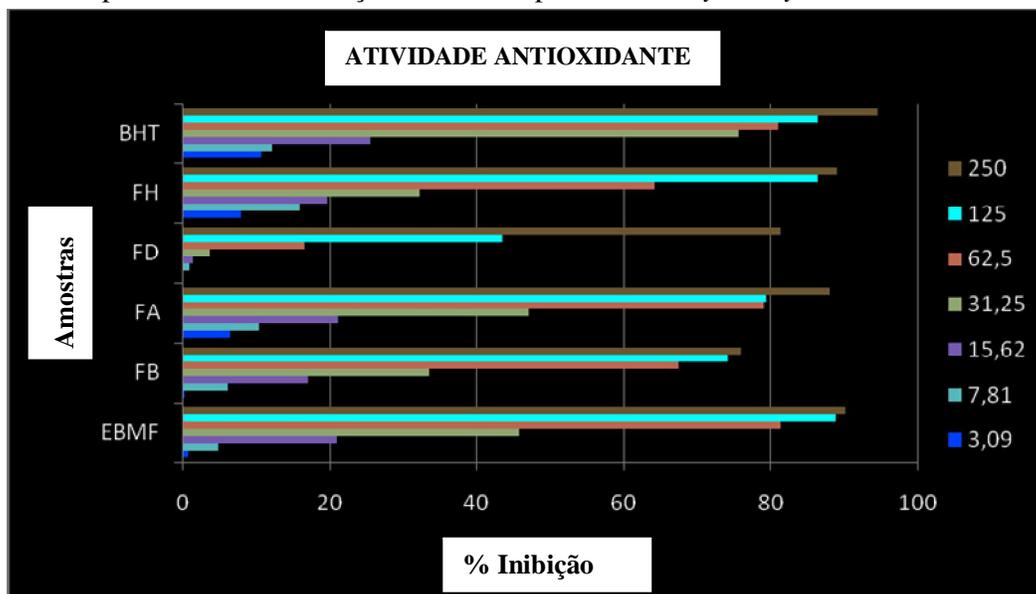
atividade antioxidante, como a FA e o EBMF, que em algumas concentrações inibiram o DPPH em porcentagens semelhantes a apresentada pelo padrão BHT.

Gráfico 6: Atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*.



BHT = padrão.

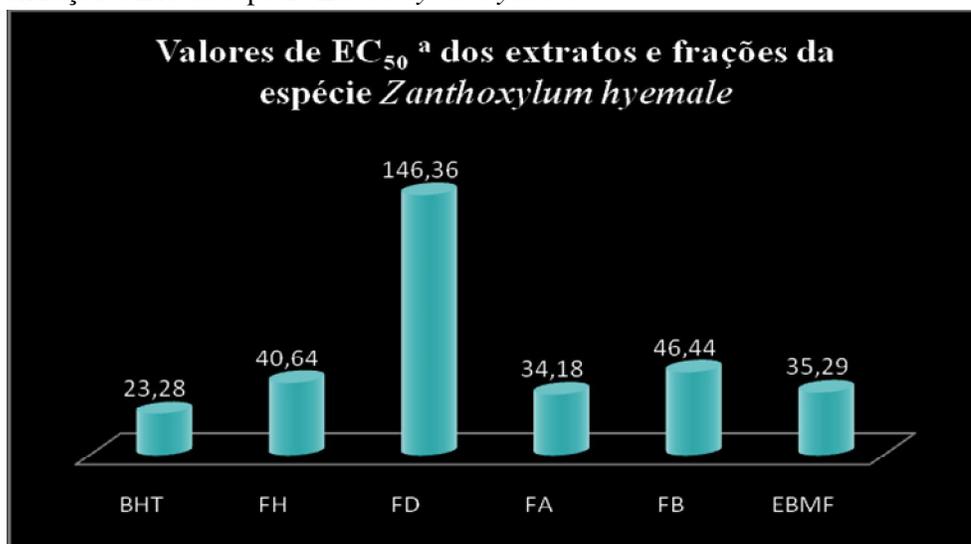
Gráfico 7: Porcentagem de Inibição do Radical DPPH verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*.



A legenda na direita do gráfico refere-se as concentrações (em µg/mL) em que foram testadas as amostras. BHT = padrão.

O gráfico 8 expressa os resultados dos cálculos de EC_{50} para cada uma das frações obtidas. Neste gráfico observa-se que a FA mostrou boa atividade antioxidante, consumindo 50% dos radicais DPPH em uma concentração de 34,18 $\mu\text{g/mL}$. O EBMF, da mesma forma que a FA, apresentou bom potencial antioxidante ($EC_{50} = 35,29 \mu\text{g/mL}$). A FD não apresentou bons resultados neste teste, precisando de uma alta concentração (146,36 $\mu\text{g/mL}$) para inibir metade do quantidade de DPPH utilizada.

Gráfico 8: Valores de EC_{50} verificada para os extratos e frações obtidos pelo método de extração a frio da espécie *Zanthoxylum hyemale*



^a em $\mu\text{g/mL}$, BHT = padrão

5.8. ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.8.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O grupo NPPN faz uso do método da microdiluição em caldo descrito pela NCCL (National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁷¹ para determinar a atividade antimicrobiana das substâncias isoladas das plantas que pesquisa cientificamente. O NCCL é um órgão que padroniza os teste executados na avaliação da atividade antimicrobiana de

compostos naturais, pois dessa forma torna-se possível descrever verdadeiramente o potencial bioativo e a utilidade clínica dos mesmos.

Sendo assim, no estudo das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale* foram testados os extratos, frações e substâncias isoladas durante a elaboração do trabalho, com o objetivo de identificar quais compostos teriam potencial antimicrobiano contra cepas bacterianas e fúngicas que reconhecidamente são causadoras de processos infecciosos oportunistas. O ensaio está descrito no ítem 4.8.2. da página 68 e os resultados estão tabelados abaixo (Tabelas 15 a 20). Os compostos isolados **33, 58, 59** e os produtos de derivatização da tembamida **64, 65 e 66** não puderam ser testados devido a problemas de solubilidade e quantidade.

Zanthoxylum rhoifolium

Tabela 15: Concentração Inibitória Mínima para os extratos e frações de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Substâncias	CIM (µg/mL)								
	Bactérias Gram-positivas ^a				Bactérias Gram-negativas ^a			Leveduras ^a	
	<i>Se</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Bs</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>
EBMF	250	250	250	250	500	500	500	>500	>500
EBMQ	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FH	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FD	250	>500	>500	250	>500	250	>500	>500	>500
FA	500	500	500	>500	500	500	>500	>500	>500
FAB	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FB	>500	>500	500	500	500	>500	>500	>500	500
FEA	250	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FEB	125	>500	>500	125	>500	125	>500	>500	250
FCN	500	500	500	500	500	500	500	>500	>500
FCB	500	500	500	500	500	500	>500	>500	>500
Padrão^b	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	10,3	5,15	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection) - *Se*= *Staphylococcus epidermidis*; *Sa*= *Staphylococcus aureus*; *Sp*= *Streptococcus pyogenes*; *Bs*= *Bacillus subtilis*; *Ec*= *Escherichia coli*; *Kp*= *Klebsiella pneumoniae*; *Sc*= *Sacharomyces cerevisiae*; *Ca*= *Candida albicans*; *Cn*= *Cryptococcus neoformans*.

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

Tabela 16: Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para os extratos e frações de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Substâncias	CBM / CFM (µg/mL) <i>zanthoxylum rhoifolium</i>								
	Bactérias Gram-positivas ^a				Bactérias Gram-negativas ^a			Leveduras ^a	
	<i>Se</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Bs</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>
EBMF	250	250	250	250	500	500	500	>500	>500
EBMQ	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FH	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FD	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FA	500	500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
FAB	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FB	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500
FEA	250	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FEB	500	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500
FCN	>500	>500	500	>500	>500	>500	500	>500	>500
FCB	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Padrão ^b	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	10,3	5,15	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection) - *Se*= *Staphylococcus epidermidis*; *Sa*= *Staphylococcus aureus*; *Sp*= *Streptococcus pyogenes*; *Bs*= *Bacillus subtilis*; *Ec*= *Escherichia coli*; *Kp*= *Klebsiella pneumoniae*; *Sc*= *Sacharomyces cerevisiae*; *Ca*= *Candida albicans*; *Cn*= *Cryptococcus neoformans*.

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

Entre as amostras testadas da espécie *Zanthoxylum rhoifolium*, EBMF, FD, FEA e a FEB apresentaram os melhores resultados frente aos microrganismos testados.

O EBMF foi mais ativo frente a bactérias Gram-positivas, com valores de CIM de 250 µg/mL. A FD apresentou potencial antimicrobiano contra uma maior variedade de cepas, sendo ativa para microrganismos Gram-positivos (*Se* e *Bs*) e Gram-negativos (*Ec*).

Outra fração que frente aos microrganismos nas concentrações testadas apresentou-se ativa foi a FEA. Os valores de CBM de 250 µg/mL para as cepas de *Se* e *Sp* conferem atividade bacteriostática a esta fração. Para a FEB, os valores de CIM (125 µg/mL) foram significantes frente aos microrganismos Gram-positivos *Se* e *Bs*, ao Gram-negativo *Ec* e a Levedura *Cn*. Esta fração, entre todas as testadas, foi a que apresentou atividade também contra Leveduras.

As amostras EBMQ, FH, FA, FAB, FB, FCN e FCB não demonstraram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Seus valores de CBM e CFM foram maiores que 500 µg/mL para todos as cepas microbianas que se utilizou neste teste.

Pelos dados visualizados nas tabelas 15 e 16, verificamos que as frações de *Z. rhoifolium* demonstraram maior poder antimicrobiano frente aos microrganismos Gram-positivos utilizados no ensaio. Frente as cepas de leveduras empregadas na avaliação da CIM, a grande maioria dos extratos e frações de *Z. rhoifolium* não foram ativos, não desempenhando a função de fungicida.

Zanthoxylum hyemale

Tabela 17: Concentração Inibitória Mínima para os extratos e frações de *Zanthoxylum hyemale*.

Substâncias	CIM (µg/mL)								
	Bactérias Gram-positivas ^a				Bactérias Gram-negativas ^a			Leveduras ^a	
	<i>Se</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Bs</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>
EBMF	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FH	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FD	500	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500
FA	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FB	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Padrão ^b	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	10,3	5,15	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection) - *Se*= *Staphylococcus epidermidis*; *Sa*= *Staphylococcus aureus*; *Sp*= *Streptococcus pyogenes*; *Bs*= *Bacillus subtilis*; *Ec*= *Escherichia coli*; *Kp*= *Klebsiella pneumoniae*; *Sc*= *Sacharomyces cerevisiae*; *Ca*= *Candida albicans*; *Cn*= *Cryptococcus neoformans*.

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

Tabela 18: Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para os extratos e frações de *Zanthoxylum hyemale*.

Substâncias	CBM / CFM (µg/mL) zant hyemale								
	Bactérias Gram-positivas ^a				Bactérias Gram-negativas ^a			Leveduras ^a	
	<i>Se</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Bs</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>
EBMF	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FH	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FD	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FA	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FB	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Padrão ^b	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	10,3	5,15	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection) - *Se*= *Staphylococcus epidermidis*; *Sa*= *Staphylococcus aureus*; *Sp*= *Streptococcus pyogenes*; *Bs*= *Bacillus subtilis*; *Ec*= *Escherichia coli*; *Kp*= *Klebsiella pneumoniae*; *Sc*= *Sacharomyces cerevisiae*; *Ca*= *Candida albicans*; *Cn*= *Cryptococcus neoformans*.

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

De forma geral, os extratos e frações da espécie *Zanthoxylum hyemale* não apresentaram potencial como antimicrobiano. Verificou-se inibição das cepas de microrganismos apenas para o EBMF e para a FH, sendo ambos ativos somente frente a

bactéria Gram-positiva *Se*, com valor de CIM de 250 µg/mL, conferindo atividade bacteriostática. Nas demais frações testadas não foi verificada atividade bactericida ou fungicida, pois as amostras tiveram valores de CIM e CLM maior que 500 µg/mL.

Substâncias Isoladas

Tabela 19: Concentração Inibitória Mínima para os compostos isolados e/ou sintetizados das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*.

Substâncias	CIM (µg/mL)								
	Bactérias Gram-positivas ^a			Bactérias Gram-negativas ^a			Leveduras ^a		
	<i>Se</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Bs</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>
8	100	100	100	>100	>100	>100	100	100	NT
53	100	50	50	100	50	100	100	100	50
60	50	50	50	25	50	50	50	100	50
50	6,12	12,5	12,5	25	12,5	25	>100	>100	>100
61	100	100	100	100	100	100	>100	>100	>100
20	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,1	6,25	3,1
63	100	100	50	>100	>100	>100	100	100	>100
64	100	100	50	100	100	100	100	50	NT
68	>100	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100	>100
Padrão ^b	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	10,3	5,15	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection) - *Se*= *Staphylococcus epidermidis*; *Sa*= *Staphylococcus aureus*; *Sp*= *Streptococcus pyogenes*; *Bs*= *Bacillus subtilis*; *Ec*= *Escherichia coli*; *Kp*= *Klebsiella pneumoniae*; *Sc*= *Sacharomyces cerevisiae*; *Ca*= *Candida albicans*; *Cn*= *Cryptococcus neoformans*.

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

Tabela 20: Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para os compostos isolados e/ou sintetizados das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*.

Substâncias	CBM e CFM (µg/mL) substâncias puras								
	Bactérias Gram-positivas ^a			Bactérias Gram-negativas ^a			Leveduras ^a		
	<i>Se</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Bs</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>
8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	NT
53	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
60	50	50	>100	50	>100	>100	>100	100	100
50	12,5	50	50	50	25	25	>100	>100	>100
61	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
20	12,5	3,1	6,2	50	50	25	3,1	6,25	6,25
63	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	100	>100
64	100	100	50	100	100	100	100	50	NT
68	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Padrão ^b	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	10,3	5,15	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection) - *Se*= *Staphylococcus epidermidis*; *Sa*= *Staphylococcus aureus*; *Sp*= *Streptococcus pyogenes*; *Bs*= *Bacillus subtilis*; *Ec*= *Escherichia coli*; *Kp*= *Klebsiella pneumoniae*; *Sc*= *Sacharomyces cerevisiae*; *Ca*= *Candida albicans*; *Cn*= *Cryptococcus neoformans*.

^b Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras.

Conforme pode ser observado nas tabelas 19 e 20, o alcalóide Cheleritrina (**20**) exibiu um excelente resultado no ensaio de determinação da CIM, apresentando potencial antimicrobiano tanto para bactérias como para leveduras. Frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas este composto foi ativo na concentração de 1,5 µg/mL, sendo mais ativo que o padrão utilizado Cloranfenicol (3,12 µg/mL). O resultado expressa a ótima atividade bactericida deste alcalóide benzofenantridínico. Contra as cepas de leveduras que se empregou no ensaio, Cheleritrina também mostrou-se ativo, com valores de CIM de 3,1 µg/mL para *Ca* e *Cn* e de 6,25 µg/mL contra *Sc*, conferindo atividade fungicida.

Outro alcalóide benzofenantridínico de estrutura muito semelhante ao alcalóide Cheleritrina (**20**) e que também mostrou-se ativo foi o alcalóide Diidrocheleritrina (**50**). Este composto apresentou uma boa atividade contra bactérias, porém não teve potencial para inibição das leveduras. Frente a bactéria Gram-positiva *Se*, Diidrocheleritrina (**50**) foi ativo na concentração de 6,12 µg/mL, melhor resultado obtido para este alcalóide. Ainda da classe dos benzofenantridínicos foi testado o alcalóide Diidroavicina (**61**). Para este composto não foi observada atividade antimicrobiana frente as cepas utilizadas, obtendo CIM maior que 100 µg/mL para todos os microrganismos do ensaio.

O composto γ -Fagarina (**53**) apresentou atividade antimicrobiana frente as bactérias *Sa*, *Sp* e *Kp* e contra a levedura *Cn*, sendo os valores de CIM iguais a 50 µg/mL. As concentrações não foram menores que 100 µg/mL para as bactérias *Se*, *Bs* e *Ec* e também para as leveduras *Ca* e *Sc*, não sendo este alcalóide furoquinolínico ativo como antimicrobiano para essas cepas utilizadas. Já o alcalóide Skimianina (**8**) que também pertence a classe dos furoquinolínicos não foi considerado bactericida ou fungicida, pois foi ativo somente em concentrações maiores ou iguais a 100 µg/mL.

A amida Tembamida (**63**), isolada da espécie *Zanthoxylum hyemale* e dois de seus derivados obtidos neste trabalho foram testados como antimicrobiano. Destes compostos,

tembamida (**63**) e o derivado 2-benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**) apresentaram atividade frente a bactéria Gram-positiva *Sp* com valores de CIM de 50 µg/mL. 2-benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato (**64**) também inibiu o crescimento da levedura *Sc*. O derivado N-2-4 bromobenzil oxi-2-4-metoxifenil etil benzamida (**68**) apenas foi ativo contra a cepa bacteriana de *Bs*. Para os demais microrganismo, a CIM destes composto foram iguais ou superiores a 100 µg/mL.

5.8.2. Avaliação da Atividade de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

No presente trabalho foi realizado o ensaio biológico onde avaliou-se os extratos, frações e metabólitos isolados quanto ao seu potencial como inibidores da AChE. Para tal, os extratos e frações foram aplicados em CCD na quantidade de 2µg/µL e após foi feita a eluição da placa com solvente adequado de acordo com a polaridade da amostra em teste. Os metabólitos puros também foram aplicados em CCD, contudo, a partir de uma solução inicial contendo 4µg/µL foram realizadas diluições em série, obtendo-se assim novas soluções nas concentrações de 5,0; 1,0; 0,2; 0,04; $8,0 \cdot 10^{-3}$; $1,6 \cdot 10^{-3}$ e $3,2 \cdot 10^{-4}$ µg/µL. As substâncias são aplicadas pontualmente de acordo com as diluições realizadas e a CCD é borrifada com os reveladores. Os halos esbranquiçados observados na CCD mostram onde ocorreu a inibição da enzima frente as substâncias testadas.

Para as substâncias purificadas ou sintetizadas neste trabalho, pode-se observar que a maioria mostrou-se ativo frente a enzima acetilcolinesterase, inibindo a enzima em algumas das concentrações testadas. Os metabólitos Lupeol (**33**), Skimianina (**8**) e γ -Fagarina (**53**) apresentaram na menor concentração testada ($3,2 \cdot 10^{-4}$ µg/µL) poder de inibir a enzima. O alcalóide furoquinolínico 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico (**59**) mostrou-se ativo até $8,0 \cdot 10^{-3}$ µg/µL, tendo menor poder como inibidor da AChE que os outros dois alcalóides da mesma classe (Skimianina e γ -Fagarina).

Os alcalóides benzofenantridínicos Cheleritrina (**20**) e Zantoxilina (**60**) mostraram-se ativos apenas nas concentrações de 5, 1, 0,2 e 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Outro alcalóide testado da classe dos benzofenantridínicos, Diidrocheleritrina (**50**), foi mais potente que os demais pertencentes a mesma classe, inibindo a AChE até $8,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Fazendo-se uma comparação entre a classe dos alcalóides testados, podemos verificar que os furoquinolínicos são compostos mais promissores na inibição da AChE. Os alcalóides Skimianina (**8**) e γ -Fagarina (**53**), exemplos desta classe, foram ativos em concentrações menores que as apresentadas pelos compostos Zantoxilina (**60**), Diidrocheleritrina (**50**) e Cheleritrina (**20**), metabólitos que fazem parte da família dos benzofenantridínicos.

Dos compostos avaliados neste ensaio, a amida Tembamida (**63**) foi o que revelou-se com menor potencial para ser um inibidor da AChE, resultando em inibição apenas na maior concentração testada, 5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Contudo, seus derivados (**64**), (**65**) e (**66**) apresentaram potencial maior para inibição da enzima, sendo ativos nas concentrações de 5 a $1,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

A atividade de inibição da AChE dos compostos foi expressa como pMIQ, que representa o logaritmo negativo da mínima quantidade inibitória (em mol) que produziu um halo com o mínimo de brancura observável.⁷⁰ O limite de atividade é fixado em um pMIQ mínimo de 10,5. Compostos com valores de pMIQ abaixo deste são considerados inativos ou pouco ativos.⁷⁰ Na tabela 21 estão demonstrados os valores de pMIQ de todos os compostos avaliados como inibidores da AChE neste trabalho.

Tabela 21: Valores de pMIQ observados para as substâncias puras através do teste de inibição da AChE com reagente Sal de Fast Blue B

Substâncias	pMIQ
Lupeol	12,10
Skimianina	11,20
γ -Fagarina	11,85
8-Hidroxi-4,7-dimetoxifuroquinolínico	10,48
Zantoxilina	9,90

Diidrocheleritrina	10,64
Cheleritrina	9,94
Tembamida	7,73
2-Benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato	11,29
N-2-(4-metoxifenil) 2-oxietil benzamida	11,22
N-2- (benziloxi) 2 (4-metoxifenil) etil benzamida	11,35

A observação dos dados apresentados na tabela 21 permite avaliar as substâncias Lupeol, Skimianina e γ -Fagarina como potenciais inibidores da AChE. Os valores de pMIQ encontrados para esses metabólitos foram superiores ao limite 10,5 para serem os compostos considerados ativos. Os derivados da Tembamida, 2-Benzamida, 1-(4-metoxifenil) etil acetato, N-2-(4-metoxifenil) 2-oxietil benzamida e N-2- (benziloxi) 2 (4-metoxifenil) etil benzamida também demonstraram relevantes valores de pMIQ, todos superiores a 11,00 (11,29; 11,22 e 11,35, respectivamente), sendo os compostos mais ativos.

Com o resultado do teste para determinação da atividade de inibição da AChE foi possível verificar que os alcalóide furoquinolínicos, de forma geral, apresentaram melhores respostas ao teste, em comparação aos alcalóides benzofenantridínicos.

Tabela 22: Resultado da Atividade de Inibição da AChE para os extratos e frações das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*

Amostras	Atividade	Amostras	Atividade
Bruto Frio <i>Z. rhoif.</i>	+	Hexano <i>Z. hyemale</i>	NT
Bruto Frio <i>Z. hyemale</i>	+	Dicloro <i>Z. hyemale</i>	+
Bruto Quente <i>Z. rhoif.</i>	+	Acetato <i>Z. hyemale</i>	-
Dicloro <i>Z. rhoif.</i>	-	Butanol <i>Z. hyemale</i>	-
Hexano <i>Z. rhoif.</i>	-	Hexano Neutro	NT
Acetato <i>Z. rhoif.</i>	-	Butanol básica <i>Z. rhoif.</i>	-
Butanol <i>Z. rhoif.</i>	+	Acetato básica <i>Z. rhoif.</i>	-
Clorof. neutra <i>Z. rhoif.</i>	+	Etérea básica <i>Z. rhoif.</i>	+
Clorof. básica <i>Z. rhoif.</i>	-	Etérea ácida <i>Z. rhoif.</i>	NT

+ = zona de inibição observada; - = zona de inibição não observada. NT=Não Testado

Para os extratos e frações das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*, foi verificada atividade de inibição da AChE em EBMF de ambas as espécies, EBMQ de *Zanthoxylum rhoifolium*, FB, FCN, FEB de *Zanthoxylum rhoifolium* e FD de *Zanthoxylum hyemale* (Tabela 22). A baixa atividade observada nestas amostras, pode ser devido a grande quantidade de substâncias presentes nestes extratos e frações, ocorrendo um mascaramento dos compostos.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- O presente trabalho contribuiu para o estudo das atividades biológicas apresentadas por plantas da família Rutaceae.

- Com a utilização de diferentes métodos de extração (quente e frio) no preparo dos extratos brutos das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale*, foi possível verificar que com a utilização de aquecimento consegue-se os melhores rendimentos. Também observou-se através de análises por CCD que no método a quente ocorre a extração de uma maior quantidade de metabólitos, onde mais pontos visualizados na CCD reagem positivamente com reagente de Dragendorff, o que evidencia uma melhor extração dos metabólitos, principalmente os alcalóides presentes na planta.

- Comparou-se a obtenção das frações dos extratos com o uso de dois métodos de particionamento, sistema neutro e sistema ácido/base. O rendimento obtido permitiu concluir que o sistema ácido/base detem a melhor capacidade em extrair os metabólitos das plantas. Todas as frações obtidas através dos sistemas de particionamento foram analisadas em CCD e foi verificado nas frações do particionamento ácido/base mais pontos de revelação frente ao reagente de Dragendorff, o que evidenciou a melhor capacidade de extração dos alcalóides por este sistema de fracionamento.

- Foram isolados da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* oito alcalóides já descritos na literatura. Três deles são alcalóides quinolínicos pertencentes a classe dos furoquinolínicos (Skimianina, 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico e γ -Fagarina). Outros quatro são alcalóides isoquinolínicos da classe dos benzofenantridínicos (Diidrocheleritrina, Diidroavicina, Zantoxilina e Cheleritrina). Foi isolado ainda o alcalóide Magnoflorina,

pertencente a classe dos aporfínicos. O alcalóide 8-Hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolínico foi descrito pela primeira vez nesta espécie. Identificou-se de *Z. rhoifolium* a lignana Sesamina e o triterpeno Lupeol.

- A amida Tembamida foi isolada da espécie *Zanthoxylum hyemale* através de estudo bio guiado pelo teste de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase. Com este metabólito foram obtidos cinco derivados após realizada derivatização.

- O isolamento de quatro classes de metabólitos secundários, permite comprovar a composição química diversificada das espécies das Rutaceas, capaz de produzir uma variedade de metabólitos.

- Pelo método do DPPH foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos, frações e compostos isolados, que apresentaram potencial antioxidante, excetuando a amida tembamida e seus derivados.

- A ação antimicrobiana dos compostos isolados foi testadas pelo método de microdiluição em caldo. Neste ensaio pode-se observar um maior potencial antimicrobiano dos alcalóides pertencentes a classe dos benzofenantridínicos, comparado com os alcalóides furoquinolínicos também avaliados. O alcalóide benzofenantridínico Cheleritrina demonstrou excelente atividade frente as cepas de bactérias e leveduras utilizadas no ensaio. Para os extratos e frações de ambas as espécies, a atividade antimicrobiana não foi satisfatória, pois os valores de CIM foram geralmente maiores que 500µg/mL.

- No ensaio de inibição da AChE observou-se que os alcalóides da classe dos furoquinolínicos possuem melhor capacidade de inibição da enzima AChE, em comparação aos alcalóides benzofenantridínicos. Pela avaliação do triterpeno Lupeol que mostrou valor de pMIQ de 12,10, verifica-se atividade inibitória da AChE também nesta classe de composto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PINTO, A. C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; ALMEIDA, R.E. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
2. BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
3. KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, n. 3, p. 206-220, 2005.
4. MORAIS, S.M.; FILHO, R.B. Produtos Naturais. Estudos químicos e biológicos. Fortaleza, Ed UECE, 2007.
5. VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.27, n.1, p.1-7, 2006
6. Convensão da Biodiversidade Biológica - CDB. Disponível em <http://www.cdb.gov.br/CDB>. Acesso em: 5 julho 2010.
7. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed Universidade/ UFRGS/ Ed da UFSC, 1999.
8. GONZAGA, A.W.; MOREL, N.F.; BURROW, A.R.; MOSSMER-MAICHLE, C. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica** 69(4), p. 371-374, 2003.
9. GODOWSKI, K.C. **J. Clin. Dentistry**, v.1, p.96, 1989.

10. SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.S.; YANO, T. Antibacterial and antifungal activities of volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* leaves. **Pharmac. biology**, v. 44, no. 9, p. 657-659, 2006.
11. LENFELD, J.; KROUTIL, M.; MARSALEK, E.; SLAVIK, J.; PREININGER, V.; SIMANEK, V. **Planta Medica** 43(2), p. 161-165, 1981.
12. VILLALBA, M.A.; CARMO, M.I.; LEITE, M.N.; SOUSA, O.V. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**, 17(2), p. 236-241, 2007.
13. ZEE-CHENG, R.K.Y.; CHENG, C.C. **J. Med. Chem.**, v.18, p. 66, 1975.
14. JULLIAN, V; BOURDY, G.; MAUREL, S.; SAUVAIN, M. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **J. Ethnopharmacology**, v. 106, p. 348-352, 2006.
15. MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* e *Esenbeckia* (Rutaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 18(1), p. 73-90, 2004.
16. ALBUQUERQUE, B.W.P.; Revisão taxonômica das Rutaceae do estado do Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 6, no. 3, p. 1-67, 1976.
17. Flora brasiliensis. Disponível em <http://flora.cria.org.br/>. Acesso em: 5 julho 2010.
18. LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Ed Plantarum, 1992.
19. CRUZ, G.L. Dicionário de plantas úteis do Brasil, 1985.
20. BRUGNOLI, S.L.V.; PORCAR, R. Fitoquímica del género *Zanthoxylum*. **XVII Com. Vem. Bot.** p.568-572, 2007.

21. Boletim de Pesquisas Florestais, Colombo, n. 45, p. 41-55, 2002.
22. FACUNDO, V.A.; SILVERA, A.S.P.; FILHO, R.B.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii*. **Química Nova**, v. 28, n.2, p.224-225, 2005.
23. MOURA, N.F.; MOREL, A.F.; DESSOY, E.C.; ZANATTA, N.; AHLERT, N.; PORTO, G.P.; BALDISSEROTTO, B. Alkaloids, amides and antispasmodic activity of *Zanthoxylum hyemale*. **Planta Medica**, 68, p.534-538, 2002.
24. DIÉGUEZ, R.; RIVAS, Y.; GONZÁLEZ, S.P.; GARRIDO, G.; TORRES, J. M. Potencialidad del género *Zanthoxylum* como fuente de agentes com actividad biológica. **Acta Farm. Bonaerense**, 23(2), p.243-251, 2004.
25. GRINA, J. A.; RATCLIFF, M. R.; STERMITZ, F.R. Old and new alkaloids from *Zanthoxylum arborescens*. **J. Org. Chem**, n.47, p.2648-2651, 1982.
26. HANAWA, F.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A-L. Photo-activated DNA binding and antimicrobial activities of furoquinoline and pyranoquinolone alkaloids from Rutaceae. **Planta Medica**, 70, p.531-535, 2004.
27. BIAVATTI, M.W.; VIEIRA, P.C.; SILVA, F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VICTOR, S.R.; PAGNOCCA, F.C.; ALBUQUERQUE, I.C.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of Flindersiamine. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 13, n.1, p.66-70, 2002.
28. WANSI, J.D.; MESAİK, M.A.; CHIOZEM, D.D.; DEVKOTA, K.P.; GABORIAUD-KOLAR, N.; LALLEMAND, M.C.; WANDJI, J.; CHOUDHARY, M. I.; SEWALD, N. Oxidative burst inhibitory and cytotoxic indoloquinazoline and furoquinoline alkaloids from *Oricia suaweolens*. **J. Nat. Prod**, 71, p. 1942-1945, 2008.

29. BARRY, D.K.; FAGBULE, M.O.; SHAMMA, M.; GOZLER, B. The benzophenanthridine alkaloids. **J. Nat. Prod.**, 47 (1), p.1-43, 1984.
30. JIRÍ, V.; DOLEZEL, P.; VICAR, J.; ULRICHOVA, J. Citotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, 23, p. 580-588, 2009.
31. FISH, F.; WATERMANN, P.G. **Phytochemistry**, v.10, p.3322, 1971.
32. TILLEQUIN, F. Rutaceous alkaloids as models for the desing of novel antitumor drugs. **Phytochem. Rev.**, n.6, p. 65-69, 2007.
33. MOCCELINI, S.K.; SILVA, V.C.; NDIAYE, E.A.; SOUSA, P.T.J.; VIEIRA, P.C. Estuo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. e Bonpl. ex. Willd (Rutaceae). **Química Nova**, v.32, n.1, p. 131-133, 2009.
34. PIERRE, T.; HIPPOLYTE, W.K.; CONNOLLY, J.D. A new benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum buesgenii*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 656-660, 2005.
35. YANG, C.H.; CHENG, M.J.; CHIANG, M. Y.; KUO, Y.H.; WANG, C.J.; CHEN, Y.S. Dihydrobenzophenanthridine alkaloids from stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. **J. Nat. Prod.**, 71, 669-673, 2008.
36. DENG, A.J.; HAI-LIN, Q. Cytotoxic dihydrobenzophenanthridine alkaloids from the roots of *Macleaya microcarpa*. **Phytochemistry**, 71, p.816-822, 2010.
37. SILVA, C.V.; DETONI, C.B.; VELOZO, E.S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. ST. HIL. **Química Nova**, v.31, n.8, p.2051-2055, 2008.

38. MOURA, N.F Estudo fitoquímico de plantas pertencentes a família Rutaceae: Gêneros *Zanthoxylum e Helietta*. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
39. CHENG, M.J.; LEE, K.H.; TSAI, I-L; CHEN, I-S. Two new sesquiterpenoids and Anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Bioorganic e Med. Chem.**, 13, P.5915-5920, 2005.
40. YANG, Y-P; CHENG, M-J.; TENG, C-M.; CHANG, Y-L.; TSAI, I-L.; CHEN, I-S. Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, 61, p. 567-572, 2002.
41. WEBER, A.D. Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
42. NISSANKA, A.P.K.; KARURANATNE, V.; BANDARA, B. M. R.; KUMAR, V.; NAKANISHI, T. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *Zanthoxylum caudatum*. **Phytochemistry**, v.56, n.8, p. 857-861, 2001.
43. NGASSOUM, M.B.; ESSIA-NGANG, J.J.; TATSADJIEU, L.N.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ADDOUDJ, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxylum* fruits from Caneroon. **Fitoterapy**, v.74, n.3, p. 284-287, 2003.
- 44 VILLALBA, M.A.; CARMO, M.I.; LEITE, M.N.; SOUSA, O.V. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**, n.17 (2), p. 236-241, 2007.
45. ZEE-CHENG, R.K.Y.; CHENG, C.C. **J. Med. Chem.**, v.18, p.66, 1975.

46. PENELUC, T.; DOMINGUES, L.F.; ALMEIDA, G.N.; AYRES, M.C.C.; MOREIRA, E.L.T.; CRUZ, A.C.F.; BITTERN COURT, T.C.S.C. Anthelmintic activity of aqueous extract of leaves of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal**, v.18 (1), p. 43-48, 2009.
47. CHEN, J-H.; DU, Z-Z.; SHEN, Y-M.; YANG, Y-P. Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. **Arch. Pharm. Res.**, v.32, n.1, p.3-5, 2009.
48. TEREZAN, A.P.; ROSSI, R.A.; ALMEIDA, R.N.A.; FREITAS, T.G.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; PIRANI, J.R. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting Ants and symbiotic fungus. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.21, n.5, p. 882-886, 2010.
49. VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.17(3), p.384-387, 2007
50. OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 18(2), p. 301-307, 2008.
51. ARAÚJO, J.C. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev. Patol. Tropical**, v. 33 (1), p. 55-64, 2004.
52. PONZI, E.A.C.; OLIVEIRA, T.L.; MORAIS, I.A.F. SILVA, J.J.; GERBI, I.A.S.; PSIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Mormodica charantia* L. **Rev.Cir. Traumatol.** v.10, n.1, p.89-94, 2010.

53. CASTILHO, E.R.; PASCHOALIN, F.L.; LYON, J.; MARMO, L. Avaliação da atividade antimicrobiana de surfactantes sobre *Candida albicans*. VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade do Vale do Paraíba, 2000.
54. SMITH, M.A.C. Doença de Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 21, 1999.
55. SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B.F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 30 (1), 2008.
56. TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. MEENT, M.V.; RHEE, I.K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v.26, n.3, p.301-304, 2003.
57. VIEGAS, C.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v.27, n.4, p.655-660, 2004.
58. ORHAN, G.; ORHAN, I.; SENER, B.; Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. **Lett. Drug Desing Discov.**, n.3, p.268-274, 2006.
59. CHUAN, Z.Q.; YING, C.H.; JUAN, R.N.; CHUNG, S.C. Theoretical studies of interaction models of human acetylcholine esterase with different inhibitors. **Sc. in China Series B: Chem.**, v. 52, n.11, p.1911-1916, 2009.
60. BARBOSA-FILHO, G.M.; MEDEIROS, K.C.P.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.; ALMEIDA, J.R.G.S. Natural products inhibitors of the enzyme acetilcholinesterase. **Rev. Bras. Farmacognosia**, n.16, p.258-285, 2006.
61. SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L. DA COSTA, J.B.N.; CAIXEIRO, J.M.R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e

aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v.30, n.1, p.159-170, 2007.

62. VIEGAS, C.J. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p. 140-145, 2003.

63. POGACNIK, L.; FRANKO, M. Determination of organophosphate and carbamate in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. **Biosensor e Bioelectronics**, v.14, p.569-578, 1999.

64. ZOU, M.Q.; YANG, R.; WANG, D.N.; LI, J.F.; FIN, Q.H. Anovel immobilized cholinesterase for on-site screening of organophosphate and carbamate compounds. **Pesticide Biochem. Physiol.**, v.86, p.162-166, 2006.

65. CRUZADO, C.; BERNABE, M.; MARTIN-LOMAS, M. **J. Org.Chem.**, n.54, p. 465, 1989.

66. BECKER, H.G.O.; BERGER, W.; DOMSCHKE, E.G.; FANGHANEL, E.; FAUST, J.; FISCHER, M.; GENTZ, F.; GEWALD, K.; GLUCH, R.; MAYER, R.; MULLER, K.; PAVEL, D.; SCHMIDT, H.; SCHOLLBERG, K.; SCHWETLICK, K.; SEILER, E.; ZEPPENFELD, G. Organikum. Química Orgânica Experimental. 2ª ed, Fundação Calouste Gulbenkiau, Lisboa, 1997.

67. VAN TAMELEN, E.E.; ZAWACKY, S.R.; RUSSELL, R.K.; CARLSON, J.G. **J. Am. Chem. Soc.**, v.105, p.142, 1983.

68. HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química, IV, Ed UFSCar, São Carlos, 2003.

69. MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v.13, p.51-54, 2002.
70. DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P-A.; REIST, M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **European J. Pharmac. Sc.**, v.33, p.109-119, 2008.
71. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5th ed, **NCCLS document M7-A5**, 2000.
72. HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T. **J. App. Microbiol.**, v. 86, p.985, 1999.
73. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food- a review. **Ins. J. Food Microbiol.**, n.94, p.223, 2004.
74. Food and Drug Administration: Code of Federal Regulations, v.21, p.300, 1991.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)