

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Heros Horst

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA ESPÉCIE
Esenbeckia leiocarpa Engl.**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis
2012

Heros Horst

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA ESPÉCIE
***Esenbeckia leiocarpa* Engl.**

Esta Tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, 06 de junho de 2012.

Prof. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
(Orientadora – UFSC)

Prof. Dr. Anderson Barison
(Relator – UFPR)

Prof. Dr. Luciano Fernandes
(Examinador – UTFPR)

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
(Examinador – UFSC)

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
(Examinador – UFSC)

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
(Examinador – UFSC)

AGRADECIMENTOS

Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contribuições de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realizadas. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, meu muito obrigado pela amizade, paciência e orientação ao longo de todos estes anos.

À amiga Doutoranda Lizandra Bretanha, não só pela amizade, carinho e auxílio, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes.

À Profa. Inês Costa Brighente pela dedicação e esforço no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de laboratório Leandro, Tiago, Ana Paula, Gustavo, Juliana Bastos, Francieli, Cristian, Luciana, Henrique, Ingrid, Suelen, Guilherme, Rafael, pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

Ao doutorando Aldo Sena pela realização dos ensaios de atividade antioxidantes e acetilcolinesterase.

Ao Prof. Dr. Anderson Barison (UFPR - QMC), ao Prof. Dr. Luciano Fernandes (UTFPR-Ponta Grossa), Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado (UFSC - QMC), Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke (UFSC - QMC) e Prof. Dr. Eduardo Monguilhot Dalmarco (UFSC - Fármacia) que, como membros da banca de avaliação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef (UFSC - QMC), que permitiu o uso do equipamento RMN - 200 MHz indispensável à realização deste trabalho.

À Profa. Dr. Tânia Silva Frode (UFSC) e aos alunos de doutorado Patrícia Pozzatti e Rafael de Liz pela realização dos ensaios de atividade antiinflamatório.

À Dra. Danielle Fontana Pereira pelo fornecimento do material de pesquisa.

Aos funcionários da Central de Análises Marcelene Bonin Martins, à Eliane de Oliveira Tabalipa pela aquisição dos espectros de

RMN, em especial ao Angelo Adolfo Ruzza pelo esforço e comprometimento nas aquisições dos espectros de RMN e Marcelo L. Quint pela aquisição dos espectros de IV.

Ao Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro (UFSC – QMC), pelas discussões acerca dos espectros de RMN para elucidação dos compostos isolados.

Aos meus irmãos, Henri e Heron e respectivas esposas Eliza e Solange, pela amizade e apoio manifestados no decorrer desse tempo.

À equipe do Laboratório de Eletroforese Capilar e Cromatografia por disponibilizar o equipamento HPLC e espaço para realização desse trabalho. E também agradecer pelo esforço e comprometimento da Doutoranda Melina Heller, pelas análises em eletroforese capilar, do Prof. Dr. Luciano Vitali e ao doutorando Daniel Spudeit pelo auxílio nas técnicas de cromatografia.

Agradeço às seguintes Instituições pelo apoio, excelentes condições de trabalho que me proporcionaram e colaboração prestadas, sem o qual não seria possível a concretização do trabalho de doutoramento:

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A investigação fitoquímica biomonitorada das cascas da espécie *Esenbeckia leiocarpa* confirmou a presença de alcaloides de núcleo indólico como principais metabólitos secundários da espécie. O particionamento do extrato bruto por extração ácido-base originou uma fração rica em alcaloides (FRA) e por outro lado, o particionamento com solventes de diferentes polaridades originou as frações solúveis em hexano (Fr Hex), acetato de etila (FrAcOEt) e a fração aquosa (FrAq). A avaliação do extrato e frações da espécie na atividade anti-inflamatória, no modelo de pleurisia induzida em camundongos, demonstrou que o extrato bruto e frações inibiram a migração de leucócitos, neutrófilos e células mononucleares, assim como na exsudação. O fracionamento cromatográfico da fração rica em alcaloides (FRA) levou ao isolamento e caracterização de alcaloides de núcleo indólico, dihidrocorinanteol [1] *N*-óxido isositsiriquina [2] e do dihidrocorinanteol acetilado [3] além destes, obteve-se dois fitoesteróis, β -sitosterol glicosilado e estigmasterol. A purificação em CLAE semipreparativa dos compostos isolados da fração aquosa levou ao isolamento de dois glucoalcaloide da classe β -carbolínico, um inédito [4] e a desoxicordifolina [5]. A análise do extrato bruto e frações através da eletroforese capilar demonstrou a abundante presença do alcaloide dihidrocorinanteol no extrato bruto e frações, exceto na fração hexânica. Todos os compostos isolados a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa* foram caracterizados com auxílio de espectroscopia de IV, espectrometria de massas ESI-MS e RMN ^1H , ^{13}C e mapas de correlação bidimensionais. O extrato bruto, frações e os alcaloides presentes na espécie, foram avaliados através de ensaios antioxidantes e de inibição da acetilcolinesterase. Os resultados obtidos nos testes antioxidantes para extrato e frações apresentaram baixos teores totais de flavonóides e fenólicos, demonstrando que na constituição química da espécie não consta quantidades significativas destes compostos. A avaliação da capacidade sequestradora de radical livre DPPH, como esperado não foi significativa, o que confirma os resultados anteriores, no entanto o teste para poder redutor foi considerado interessante, sugerindo que os alcaloides podem agir como redutores, por mecanismos distintos aos dos fenólicos. Para o ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, percebeu-se um efeito antagônico dos constituintes presentes no extrato bruto e frações, já que os resultados foram menores que o controle, no entanto para os alcaloides isolados da fração FRA: acetildihidrocorinanteol [3], *N*-óxido isositsiriquina [2a-b] e a da fração FrAq desoxicordifolina [5] os resultados foram excelentes, inibindo a enzima em até 100% numa concentração de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, o que representa 500 vezes mais potente que o controle, galantamina, 80% de inibição a 50 $\mu\text{g/mL}$.

ABSTRACT

The phytochemical research of bark of *Esenbeckia leiocarpa* guided by biological assays showed the presence of indole alkaloids as the main secondary metabolites. The acid-base partitioning of crude hydroalcoholic extract gave a fraction rich in alkaloids (FRA), on the other hand, the crude hydroalcoholic extract partitioned with n-hexane, and ethyl acetate yielded the n-hexane (Fr Hex), ethyl acetate (FrAcOEt) and aqueous fraction (FrAq) fractions. The anti-inflammatory activity of the crude hydroalcoholic extract and fractions on the model of pleurisy induced in mice showed that the crude hydroalcoholic extract and fractions inhibited the migration of leukocytes, neutrophils and mononuclear cells, as well as the process of exudation. For myeloperoxidase (MPO), adenosine deaminase (ADA) and concentrations of cytokines (TNF- α and IL- β) pro-inflammatory results were similar to the control, indomethacin and dexamethasone. The fraction rich in alkaloids (FRA) was subjected to silica gel chromatographic column led to the isolation and characterization of indole alkaloids, dihydrocorinanteol [1], N-oxide isositsiriquina [2] and dihydrocorinanteol acetylated [3], besides, we obtained two phytosterols, β -sitosterol and stigmasterol glycoside. The semipreparative HPLC purification of compounds isolated from the aqueous fraction led to the isolation of two β -carboline glucoalcaloide, a reported for the first time [4] and the desoxicordifolina [5]. The analysis of the crude hydroalcoholic extract and fractions by capillary electrophoresis demonstrated the abundant presence of the alkaloid dihydrocorinanteol less in the n-hexane fraction. All compounds isolated were characterized by IR spectroscopy, mass spectrometry, ESI-MS and ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra and *two dimensional NMR spectroscopy*. *The crude hydroalcoholic extract, fractions and alkaloids were evaluated by testing antioxidants and inhibition of acetylcholinesterase. The antioxidant tests revealed low levels of flavonoids and phenolic compounds, demonstrating that there is no significant amounts of these compounds class in the chemical constitution in this specie.* DPPH radical scavenging assay, as expected was not significant, confirming the previous results, but reducing power test was considered interesting, suggesting that the alkaloids can act as reducers by mechanisms other than of phenol compounds. It was observed an antagonistic effect of constituents present in the crude hydroalcoholic extract and fractions when tested for inhibition of acetylcholinesterase, since the results were lower than control, However, the alkaloid isolated from FRA: acetildihydrocorinanteol [3], N-oxide isositsiriquina [2a-b] and from fraction FrAq desoxicordifolina [5] the results were excellent, by inhibiting the enzyme by up to 100% at a concentration of 0.1 mg / mL , which is 500 times more potent than the control, Galanthamine, 80% inhibition at 50 mg / mL. These results demonstrate that the alkaloids obtained from *E.leiocarpa* are potential drugs for the treatment of inflammatory and anti-Alzheimer's disease.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura base para formação de alguns alcaloides.....	31
Figura 2. Árvore da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	87
Figura 3. Rota biossintética dos alcaloides indólicos derivados do triptofano	91
Figura 4. Representante de alcaloides utilizado como fármacos.....	92
Figura 5. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (10-100 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito do EBH sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.	99
Figura 6. Efeito da fração n-hexano (Hex) (10-50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração Hex sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.	100
Figura 7. Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10-50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração AcOEt sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados	

previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01. 101

Figura 8. Efeito da fração aquosa (Aq) (2-10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração Aq sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01. 103

Figura 9. Efeito da fração rica em alcaloides (FRA) (1-10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração Alc sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01. 104

Figura 10. CCD do EB indicando a presença de alcaloides 106

Figura 11. Bandas em CCD reveladas em sulfato cérico 107

Figura 12. Manchas que apresentaram fluorescência..... 108

Figura 13. Cromatografia em camada delgada revelada em Dragendorff 108

Figura 14. Perfil eletroforético e detecção do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) no EB (A), FrHex (com padrão interno) (B);

Fr ACOEt (C); FRAq (D), FRA (com adição de padrão interno) (E) em $\lambda = 280$ nm	115
Figura 15. Cromatograma do extrato bruto EB isolado a partir das cascas da espécie <i>E. leiocarpa</i>	118
Figura 16. Cromatograma da fração acetato de etila (FrAcOEt) isolada a partir das cascas da espécie <i>E. leiocarpa</i>	119
Figura 17. Cromatograma da fração rica em alcaloides (FRA) isolada a partir das cascas da espécie <i>E. leiocarpa</i>	120
Figura 18. Cromatograma da fração aquosa (FrAq) isolada a partir das cascas da espécie <i>E. leiocarpa</i>	121
Figura 19. Proposta de fragmentação do ion quasi-molecular do composto 1	123
Figura 20. Representação das correlações heteronuclear (HMBC).....	125
Figura 21. Sistema de acoplamentos e multiplicidade de um sistema de spins do <i>N</i> -óxido-isositsiriquina.....	137
Figura 22. Sistema de spins dos átomos H3, H14A, H14B e H15	139
Figura 23. Sistema de spin dos hidrogênios do C17 do composto 2a .	141
Figura 24. Representação dos $^3J_{CH}$ a partir do HMBC.....	143
Figura 25. Proposta de fragmentação do ion quasi-molecular composto 4	146
Figura 26. Sistema de spin de carbonos 18HA, 18HB, 19H, 20H 21H e 15H do composto 5	149
Figura 27. Análise HMBC para o composto 4	150
Figura 28. Proposta de fragmentações para o composto 5	153
Figura 29. Sistema olefínico cis-trans para o composto 7.....	160
Figura 30: Equação básica da reação do DPPH com um sequestrador de radical livre.....	164
Figura 31. Atividade seqüestradora do radical livre DPPH para extrato bruto (EB) e fraçõesg (FrAq, FRA, Fr Hex e FrAcOEt). Os valores são significantes \pm D.P. n= 3, $p < 0,05$, significativamente diferente com teste de Fischer (ANOVA)	165
Figura 32. Alcaloide boldina extraído a partir da espécie <i>Peumus boldus</i>	166
Figura 33: Alcaloide galantamina extraído da espécie <i>Gallanthus</i>	168

Figura 34. Espectro de infravermelho (KBr) do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	201
Figura 35. Espectro de ESI-MS do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	202
Figura 37. RMN de ^{13}C do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	203
Figura 38. DEPT 135 do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	204
Figura 39. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	205
Figura 40. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	206
Figura 41. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	207
Figura 42. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	210
Figura 43. Espectro de ESI-MS do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	211
Figura 44. RMN de ^1H do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	212
Figura 45. RMN de ^{13}C do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	213
Figura 46. DEPT 135 do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	214
Figura 47. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	215
Figura 48. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HSQC do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	216

Figura 49. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	217
Figura 50. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto isositsiriquina <i>N</i> -Óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	219
Figura 51. Espectro de ESI-MS do composto isositsiriquina <i>N</i> -óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	220
Figura 52. RMN de ¹ H do composto isositsiriquina <i>N</i> -Óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	221
Figura 53. RMN de ¹³ C do composto isositsiriquina <i>N</i> -Óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	222
Figura 54. DEPT 135 do composto isositsiriquina <i>N</i> -óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	223
Figura 55. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto isositsiriquina <i>N</i> -óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	224
Figura 56. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto isositsiriquina <i>N</i> -óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	225
Figura 57. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto isositsiriquina <i>N</i> -óxido [2a-b] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	226
Figura 58. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	229
Figura 59. Espectro de ESI-MS do composto desoxicordifolina deriv.[4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	230
Figura 60. RMN de ¹ H do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	231
Figura 61. RMN de ¹³ C do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	232
Figura 62. DEPT 135 do composto desoxicordifolina deriv.[4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	233

Figura 63. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	234
Figura 64. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	235
Figura 65. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	236
Figura 66. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	239
Figura 67. Espectro de ESI-MS do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	240
Figura 68. RMN de ^1H do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	241
Figura 69. RMN de ^{13}C do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	242
Figura 70. DEPT 135 do composto desoxicordifolina [4] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	243
Figura 71. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	244
Figura 72. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	245
Figura 73. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	246
Figura 74. RMN de ^{13}C para o composto [6] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	249
Figura 75. RMN de ^1H do composto [7] isolado a partir da espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	250

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Separação cromatográfica da Fração Rica em Alcaloides (FRA)	96
Fluxograma 2. Separação cromatográfica da Fração Rica em Alcaloides (FRA)	110
Fluxograma 3: Separação cromatografia da Fração Aquosa (FrAq)...	112

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Atividade biológica de extratos e compostos isolados de espécies do gênero <i>Esenbeckia</i>	30
Tabela 2 Metabolitos secundários isolados do gênero <i>Esenbeckia</i>	32
Tabela 3. Principais estruturas básicas dos alcaloides e seus respectivos precursores	89
Tabela 4. Concentração do DHC no EB e frações isoladas das cascas da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	114
Tabela 5. Dados de espectrometria de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para o composto [1].....	127
Tabela 6. Dados de espectrometria de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) para o composto [3].....	132
Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δppm) para os compostos Isositsiriquina [2a -2b]	144
Tabela 8. Dados de espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto [4].....	151
Tabela 9. Dados de espectrometria de ^1H e ^{13}C para o compostos [5]	155
Tabela 10. Dados de espectrometria de RMN de ^{13}C para o composto [6]	158
Tabela 11: Resultados para testes de compostos fenólicos totais.....	162
Tabela 12: Resultados para testes de flavonoides	163
Tabela 13: Resultados obtidos para teste de poder redutor para EB e frações.	167
Tabela 14. Resultados de inibição da acetilcolinesterase para amostras complexas.....	170
Tabela 15. Resultados de inibição da acetilcolinesterase para compostos isolados.....	170
Tabela 16. Determinação de classe de compostos através de reveladores cromatográficos	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A – alcaloides
- AChE – Acetilcolinesterase
- AcOEt – acetato de etila
- ADA- Adenosina deaminase
- alil – alílico
- Aq - Aquosa
- CC - Cromatografia em Coluna
- CCD - Cromatografia de Camada Delgada
- Cg – Carragenina
- CLAE– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COSY - Correlation spectroscopy
- d – Duplete
- DA – Doença de Alzheimer
- dd – duplo-duplete
- ddd – duplo-duplo-duplete
- DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
- Dexa – Dexametasona
- DHC – Dihidrocorinanteol
- dl – duplete largo
- e.p.m – Erro padrão da média
- EB – extrato bruto
- EC₅₀ – Concentração efetiva
- ESI-MS – electrospray ionisation mass spectrometry
- FR – Fração
- Fr AcOEt – fração acetato de etila
- Fr Aq – fração aquosa
- Fr Hex – fração hexânica
- FRA – fração rica em alcaloides
- gem – geminal
- Hex – Hexano
- HMBC - Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

- HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
- homoalil - homoalílico
- i.p. - Intraperitoneal
- i.pl – Intrapleural
- IC₅₀ – Concentração inibitória
- IL- 1 β – Interleucina 1 β
- Indo – Indometacina
- IV – Infravermelho
- *J* – Constante de acoplamento.
- m – Multipleteo
- m/z – Relação massa/carga
- M+. – Íon molecular
- MPO- Mieloperoxidase
- *R_f* – Fator de retenção
- RMN de ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13
- RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- *R_t* – tempo de retenção
- s – Simpleto
- t – Tripleto
- TNF α - Fator de necrose tumoral α
- UV – Vis – ultravioleta visível
- vic – vicinal
- δ - Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>ESENBECKIA</i>	29
2.2. ESPÉCIE <i>ESENBECKIA LEIOCARPA</i> ENGL.....	86
2.3. ALCALOIDES	87
2.4. BIOSÍNTESE.....	90
2.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	91
3. OBJETIVO GERAL.....	94
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	94
4. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	95
5. RESULTADOS PRELIMINARES DE ATIVIDADES BIOLÓGICA.....	97
5.1. EFEITO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA ESPÉCIE <i>ESENBECKIA LEIOCARPA</i> ENGL. SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR E A EXSUDAÇÃO	97
6. ANÁLISE FITOQUÍMICA	105
7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	106
7.1. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO FRA E FRAQ.....	107
7.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO FRA	107
7.2.1. <i>Análise cromatográfica da fração FrAq</i>	111
8. ELETROFORESE CAPILAR DO EB, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA ESPÉCIE <i>ESENBECKIA LEIOCARPA</i> ENGL.....	113
9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	117
10. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	122
<i>Composto 1</i>	122
<i>Composto 3</i>	129
<i>Composto 2</i>	134
<i>Composto 4</i>	145
<i>Composto 5</i>	152

Composto 6.....	157
Composto 7.....	159
11. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA <i>ESENBECKIA LEIOCARPA</i>	161
11.1. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES A PARTIR DA ESPÉCIE <i>E. LEIOCARPA</i>	161
11.2. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOÍDES NOS EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES A PARTIR DA ESPÉCIE <i>E. LEIOCARPA</i>	162
11.2.1. <i>Determinação da ação sequestradora de radicais livres no extrato bruto, frações e alcaloides isolados a partir da espécie E. leiocarpa</i>	163
11.3. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL REDUTOR NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES A PARTIR DA ESPÉCIE <i>E. LEIOCARPA</i>	166
12. AÇÃO INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE).....	167
13. CONCLUSÕES.....	173
14. MATERIAIS E MÉTODOS.....	177
14.1. MATERIAL BOTÂNICO	177
14.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES	177
14.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	177
14.3.1. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE</i>	178
14.4. ELETROFORESE CAPILAR (EC)	179
14.5. FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALOÍDES A PARTIR DAS CASCAS DA ESPÉCIE <i>E. LEIOCARPA</i>	180
14.6. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	180
14.7. AÇÃO INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE	181
14.8. EFEITO DA <i>ESENBECKIA LEIOCARPA</i> ENGL. SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR E A EXSUDAÇÃO.....	182
14.8.1. <i>Avaliação de atividade anti-inflamatória</i>	182
Animais	182
14.8.2. <i>Pleurisia induzida pela carragenina em camundongos</i>	182
14.8.3. <i>TÉCNICAS UTILIZADAS</i>	184
A) <i>CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS</i>	184
B) <i>COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS CELULARES</i>	184

C) DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO	185
14.9. AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS	
ISOLADOS A PARTIR DA ESPÉCIE ESENBECKIA LEIOCARPA	185
A) Determinação da atividade antioxidante.....	185
B) Determinação do teor de compostos fenólicos totais nas amostras	185
C) Determinação do teor de flavonoides nas amostras.....	186
D) Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH (2,2-Difenilpicril-hidrazil)	186
E) Determinação do potencial redutor	187
15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
16. ANEXOS	197

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos, os fármacos eram integralmente de origem natural, derivados de plantas, animais e/ou da matéria inorgânica. Os fármacos empregados para tratar algumas doenças, inicialmente, eram combinados com bruxaria, misticismo, astrologia, ou religião, mas é certo que os tratamentos eficazes foram posteriormente registrados e documentados. A Química dos Produtos Naturais, sobretudo a investigação dos constituintes bioativos de origem natural, cresceu a partir dessas observações e enriqueceu os registros contendo as descrições teóricas e científicas desses produtos naturais usados na medicina. As plantas empregadas como remédios foram por muito tempo as principais fontes para controlar patologias.

O crescente interesse em novas substâncias biologicamente ativas está diretamente relacionado à riqueza da biodiversidade. O Brasil conta com 22% de toda a biodiversidade vegetal do mundo, o que faz da nossa flora nativa uma das mais ricas fontes de substâncias com potencial farmacológico (Carvalho 2009).

Estima-se que do total de medicamentos consumidos hoje, cerca de 40% são de origem natural. Os fitoterápicos movimentam anualmente cerca de 22 bilhões de dólares, com um crescimento de 12% ao ano. No Brasil, este segmento responde por cerca de 7% do mercado farmacêutico, ou seja, 400 milhões de dólares por ano, gerando cerca de 100 mil empregos diretos e indiretos. O interesse internacional nas plantas medicinais nativas do Brasil é grande, pois o país possui a maior biodiversidade do planeta e uma rica medicina tradicional, pouco conhecida e difundida. Neste contexto, a busca por novos fármacos estimulam o investimento na pesquisa por produtos naturais biologicamente ativos, tanto em microrganismos, como em animais ou em plantas (Carvalho 2009).

Com o avanço da química, os constituintes ativos foram isolados das plantas e caracterizados estruturalmente, aliados a isso muitas estruturas foram sintetizadas. A síntese ou semissíntese através de modificações estruturais produziu fármacos mais toleráveis.

A pesquisa guiada por ensaios biológicos tem envolvido a descoberta de inúmeros princípios ativos relevantes com alto potencial terapêutico. Isso também se deve ao estudo do mecanismo pelo qual essas moléculas agem sobre sistemas biológicos, desvendando interações destes nos organismos vivos. As plantas são constituídas de um rico arsenal de substâncias com potencial ação sobre sistemas biológicos. Neste contexto, torna-se indispensável a colaboração com grupos de pesquisa para se realizar a investigação fitoquímica em busca das classes de compostos presentes nos extratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *ESENBECKIA*

Os gêneros da família Rutaceae Juss. com aproximadamente 1.600 espécies, estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, com grande ocorrência na Austrália e África. No Brasil, a família está representada por cerca de 30 gêneros e 182 espécies (Melo and Zickel 2004).

O gênero *Esenbeckia Kunth* com aproximadamente 30 espécies, está distribuído nas Américas, do sul dos Estados Unidos (Texas), nordeste do México até o Chile, Argentina e Brasil. Os principais centros de diversidade estão no sudeste do Brasil e no México. (Melo and Zickel 2004).

Apesar do grande número de representantes, poucas espécies do gênero *Esenbeckia* foram estudadas do ponto de vista biológico, destacando-se as espécies *E. leiocarpa*, *E. yaaxhokob*, *E. febrifuga*, *E. grandiflora* e a *E. alata*. A **Tabela 1** sumariza os estudos de atividades biológicas já realizadas com plantas deste gênero. Na literatura há descrição de estudos dos extratos e compostos, sobretudo alcaloides, para o tratamento de doenças negligenciadas, entre elas: malária e no combate de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, assim como o tratamento da patologia, dengue, causada pelo mosquito.

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que os extratos, frações e compostos isolados de *E. leiocarpa* apresentaram atividade biológica *in vivo* e *in vitro* no combate de processos inflamatórios (Liz, Pereira et al. 2011; Pozzatti, Oliveira et al. 2011).

Tabela 1. Atividade biológica de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Esenbeckia*

Espécie	Atividade biológica	Compostos/Extratos	Referência
<i>E. leiocarpa</i>	Antiinflamatória	Extrato/Alcaloide/Esterois	(Liz, Pereira et al. 2011; Pozzatti, Oliveira et al. 2011) (Cardoso-Lopes, Maier et al. 2010)
	Doença de Alzheimer	Extrato/Alcaloide	(Nakatsu, Johns et al. 1990)
	Antifeedant	Alcaloides	(Aguilar-Guadarrama and Rios 2004)
<i>E. yaaxhokob</i>	Antimicrobiana	Amina/Terpeno	(Carvalho, Brandao et al. 1991; Carvalho and Krettl 1991; Dolabela, Oliveira et al. 2008)
<i>E. febrifuga</i>	Antiplasmodial (malaria)	Alcaloide	(Napolitano, Silva et al. 2004)
	Antileishmania	Cumarina	(Brito, Conserva et al. 2005)
<i>E. grandiflora</i>	Antilarvicida	Extrato/Cumarina	(Beltran and Suarez 2003)
<i>E. alata</i>	Antimicrobiana	Extrato	

Estudos fitoquímicos têm mostrado a presença de diversos metabólitos secundários no gênero *Esenbeckia* (Tabela 2) tais como os terpenos fridelanol [85] isolado de *E. yaaxhokob*, *E. alata*, *E. litoralis* (Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002; Aguilar-Guadarrama and Rios 2004; Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011); cumarinas, como a pimpinelina [51] de *E. almawillia* (Oliveira, Santana et al. 1996), xantotoxina [53]

de *E. grandiflora* (Brito, Conserva et al. 2005), bergapteno [55] de *E. febrifuga* (Dolabela, Oliveira et al. 2008); flavonóides livres e heterosídicos, como quercetina-3-O- α -raminosídeo [136] e epigalocatequina [137] isolados das folhas de *E. grandiflora* subespécie *grandiflora* (Trani, Delle et al. 1997); e triterpeno como lupeol [128] isolado das folhas de *E. yaaxhokob*, *alata*, *nesiotica* e *ovata* (Rios and Delgado 1992; Mata, Macias et al. 1998; Rios and Delgado 2002; Cuca and Coy 2007).

No entanto, os alcaloides são os compostos mais frequentemente encontrados, sendo considerados bons marcadores quimiotaxonômicos para o Gênero *Esenbeckia*. Os alcaloides isolados caracterizam-se pela variação no tipo de esqueleto quinolínicos (a), quinolinônicos (b), quinolônnicos (c) e indólicos (d), conforme a **Figura 1**.

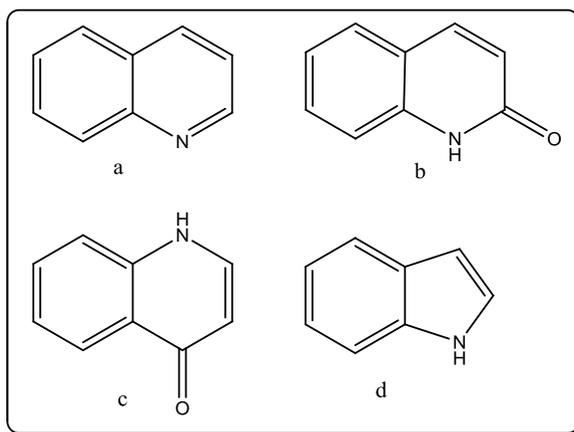


Figura 1. Estrutura base para formação de alguns alcaloides

Tabela 2 Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenecchia*

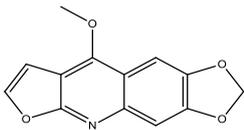
Alcaloides Quinolínicos (Quinolinas)	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Ref.
Maculina [1]		<i>E. almawillia</i>	Raízes	(Barros-Filho, Nunes et al. 2007)
		<i>E. grandiflora e almawillia</i>	Folhas e raízes	(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. febrífuga</i>	Cascas	(Vitagliano and Comin 1970)
		<i>E. grandiflora</i>		(Nunes, Barros-Filho et al. 2005)
		<i>E. pilocarpoides</i>	Raízes	(Bevalot, Fournet et al. 1984)
		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
		<i>E. hieronimi</i>	Caule	(Dreyer 1980)
			(Delle, Trani et al. 1995)	

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenecchia*

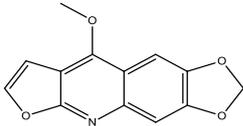
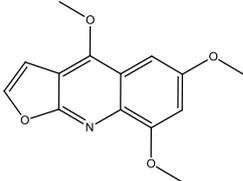
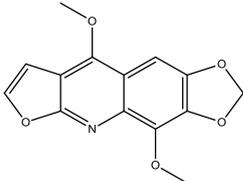
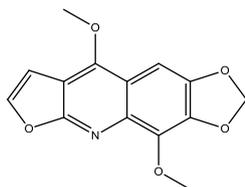
Maculina [1]		<i>E. leicarpa</i>	Caules	(Cardoso-Lopes, Maier et al. 2010)
Maculosidina [2]		<i>E. almawillia e grandiflora</i>	Raízes	(Delle, Delle et al. 1989)
		<i>E. conspecta</i>	Folhas e raízes	(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. yaaxhokob</i>	Caule	(Rios, Rosas-Alonso et al. 2002)
		<i>E. alata</i>	Folhas	(Aguilar-Guadarrama and Rios, 2004)
Flindersiamina [3]		<i>E. almawillia e E. grandiflora</i>	Folhas e raízes	(Cucu-Suarez, Barrera et al. 2011)
		<i>E. febrifuga</i>	Caule e Cascas	(Oliveira, Santana et al. 1996)
				(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
				(Vitagliano and Comin 1970)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Eseneckia*

Flindersiamina
[3]



<i>E. grandiflora</i> <i>subsp. E.</i> <i>brevipetiolata</i>	Raízes	(Trani et al., 2004)
<i>E. pilocarpoides</i>	Raízes	(Bevalot, Fournet et al. 1984)
<i>E. pentaphylla</i>	Caule	(Simpson and Jacobs 2005)
<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar- Guadarrama et al. 2002)
<i>E. hieronimi</i>	Folhas	(Delle, Trani et al. 1995)
<i>E. leiocarpa</i>	Caules	(Adams, Kunert et al. 2004; Cardoso- Lopes, Maier et al. 2010)
	Raízes	(Delle, Delle et al. 1989)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

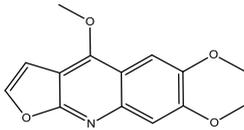
Cocusagenina [4]		<i>E. almawillia</i> e <i>E. grandiflora</i>	Folhas e raízes	(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. febrífuga</i>		(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
		<i>E. alata</i>	Folhas e caule	(Cuca- Suarez, Barrera et al. 2011)
		<i>E. grandiflora</i>	Caule	(Januario, Vieira et al. 2009)
		<i>E. grandiflora</i> <i>subsp.</i>	Raízes	(Trani, et al., 2004)
		<i>E. brevipetiolata</i>		(Bevalot, Fournet et al. 1984)
		<i>E. pilocarpoides</i>	Raízes	(Simpson and Jacobs 2005)
		<i>E. pentaphylla</i>	Caule	(Rios, Aguilar- Guadarrama et al. 2002)
		<i>E. litoralis</i>	Folhas	

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

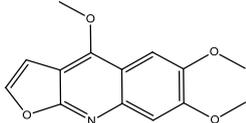
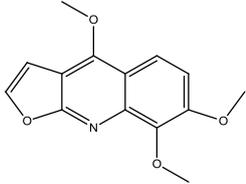
			Cascas das sementes	(Dreyer 1980)
			Caule	
Cocusagenina [4]		<i>E. litoralis</i>	(Delle, Trani et al. 1995)	
			Folhas	
			Caules	(Cardoso- Lopes, Maier et al. 2010)
			Raízes	(Delle, Delle et al. 1989)
			Caule	(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
			Raízes	(Vitagliano and Comin 1970)
			Raízes	(Trani, Carbonetti et al. 2004)
Esquimiamina [5]		<i>E. febrifuga</i>		(Cuca and Coy 2007)
			Raízes	
			Folhas	

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

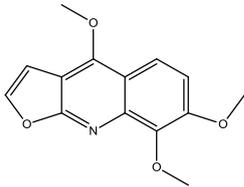
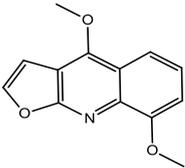
Esquimiamina [5]		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
		<i>E. hieronimi</i>	Folhas	(Delle, Trani et al. 1995)
		<i>E. leiocarpa</i>	Caules	(Cardoso-Lopes, Maier et al. 2010)
		<i>E. almawillia</i> e <i>E. grandiflora</i>	Folhas e raízes	(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. febrifuga</i> <i>E. grandiflora</i> subsp.		
γ -fagarina [6]		<i>E. brevipetiolata</i>	Caule	(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
		<i>E. alata</i>	Raízes	
		<i>E. pentaphylla</i>		
		<i>E. hieronimi</i>		

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

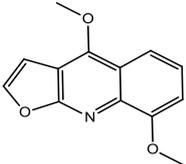
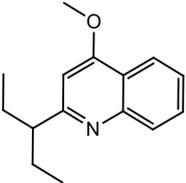
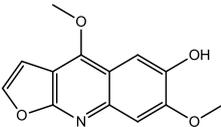
γ -fagarina [6]		<i>E. almawillia</i> e	Caule	(Trani, et al., 2004)(Trani, Carbonetti et al. 2004)
		<i>E. grandiflora</i>		
		<i>E. febrifuga</i>	Raízes	(Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011)
		<i>E. grandiflora</i> subsp.		
		<i>E. brevipetiolata</i>	Caule	(Simpson and Jacobs 2005)
		<i>E. alata</i>	Caule	(Delle, Trani et al. 1995)
		<i>E. pentaphylla</i>	Folhas	
<i>E. hieronimi</i>				
2-(1-etilpropil)-4-metoxi- Quinolina [7]		<i>E. leiocarpa</i>	Raízes	(Delle, Delle et al. 1989)
Delbina [8]		<i>E. grandiflora</i>	Raízes	(Trani, et al., 2004)
		<i>E. grandiflora</i> subsp.		
		<i>E. brevipetiolata</i>		

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Eseneckia*

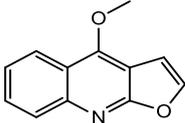
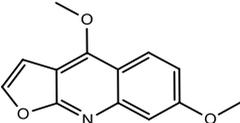
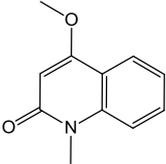
Dictamina [9]		<i>E. alata</i>	Caule	(Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011) (Simpson and Jacobs 2005)
		<i>E. pentaphylla</i>		(Dreyer 1980)
		<i>E. litoralis</i>		(Delle, Delle et al. 1989)
		<i>E. leiocarpa</i>	Raízes	
Evolitrina [10]			Caule	(Dreyer 1980)
Alcaloide Quinolonas (quinolônicos)	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
N-metil-4-metoxi-2-quinolona [11]		<i>E. almawillia</i> e <i>E. grandiflora</i>	Casca e raízes	(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. pentaphylla</i>	Caule	(Simpson and Jacobs 2005)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

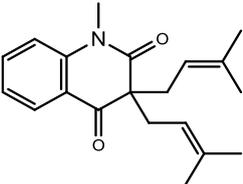
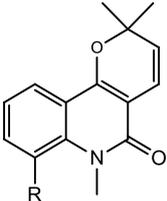
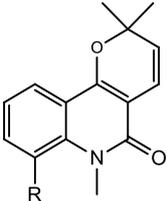
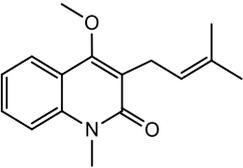
3,3-diisopentenil-N-metil-quinoldiona [12]		<i>E. almawillia</i>	Rraízes e caules	(Nunes, Barros-Filho et al. 2006)
R = H N-metil-flindersina [13]		<i>E. alata</i>	Caule	(Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011)
R = OMe 8-metoxi- N-metil-flindersina [14]		<i>E. pentaphylla</i>		(Simpson and Jacobs 2005)
4-metoxi-3-(3'-metil-butenil)-N-metil-quinolinona [15]		<i>E. alata</i>	Caule	(Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

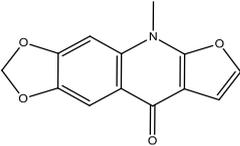
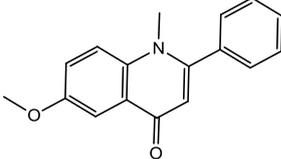
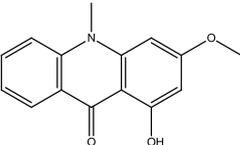
Alcaloide Quinolinônicos (Quinolinonas)	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
Isomaculina [16]		<i>E. pilocarpoides</i>	Raízes	(Bevalot, Fournet et al. 1984)
Edulina [17]		<i>E. almawillia e grandiflora</i>		(Oliveira, Santana et al. 1996)
1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona [18]		<i>E. almawillia e E. grandiflora</i>	Caule	(Simpson and Jacobs 2005)
		<i>E. pentaphylla</i>	Caule	(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
		<i>E. almawillia e E. grandiflora</i>		(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. pilocarpoides</i>	Raízes	(Bevalot, Fournet et al. 1984)
		<i>E. pentaphylla</i>	Caule	(Simpson and Jacobs 2005)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

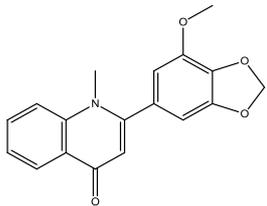
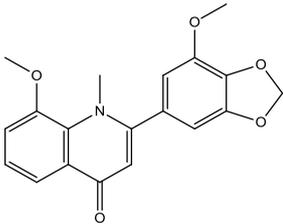
		<i>E. litoralis</i>	Cascas	(Dreyer 1980)
3'-metoxigraveolina [19]		<i>E. almawillia</i>	Raízes	(Barros-Filho, Nunes et al. 2007)
8-metoxi-2-(7-metoxi- 1,3-benzodioxol-5-il)-1- metil-quinolinona [20]		<i>E. almawillia</i> e <i>E. grandiflora</i>		(Oliveira, Santana et al. 1996)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

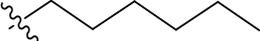
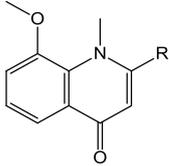
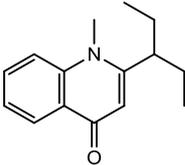
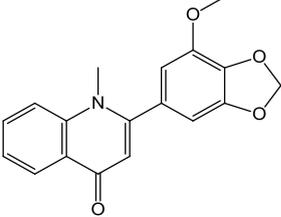
R = 				
8-metoxi-1-metil-2-hexil-quinolinona [21]		<i>E. almawillia</i>	Cascas	(Guilhon, Baetas et al. 1994)
8-metoxi-1-metil-2-heptil-quinolinona [22]				
Leioquinina B [23]		<i>E. leiocarpa</i>	Raízes	
2-(7-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-metil-quinolinona [24]		<i>E. almawillia</i>		(Barros-Filho, Nunes et al. 2007)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

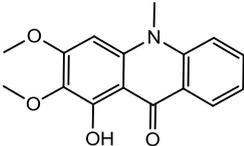
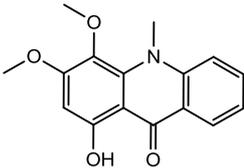
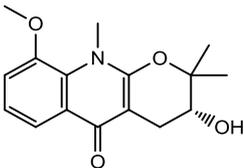
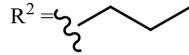
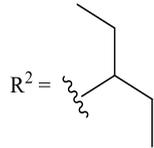
Arborinina [25]		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar- Guadarrama et al. 2002)
1-hidroxi-3,4-dimetoxi- N-metil-acridona [26]				
Lunacrinol [27]		<i>E. hieronimi</i>	Folhas	(Delle, Trani et al. 1995)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*R¹ = OMe

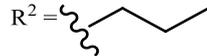
Leioquinina A

[28]

R¹ = H

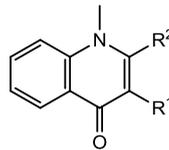
Leioquinina B

[29]

R¹ = H

Leptomerina

[30]

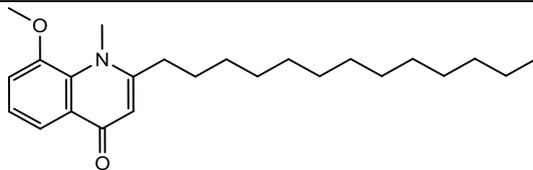
*E. leiocarpa*

Caules

(Cardoso-
Lopes, Maier
et al. 2010)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Eseneckia*

8-metoxi-1-metil-2-
tridecil-4-quinolinone
[31]



E. leiocarpa

Caules

(Cardoso-
Lopes,
Maier et
al. 2010)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

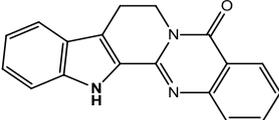
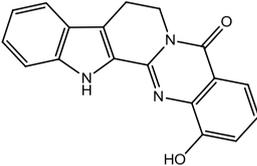
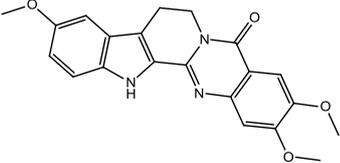
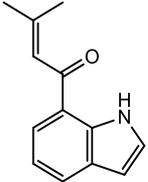
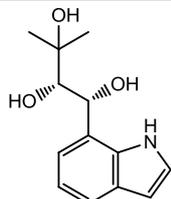
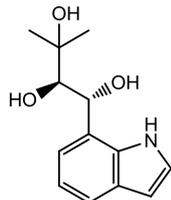
Alcaloide indólicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
Rutaecarpina [32]		<i>E. grandiflora</i>	Folhas e Raizes	(Januario, Vieira et al. 2009)
1-hidroxi-rutaecarpina [33]				
Euxiloforicina [34]		<i>E. leiocarpa</i>	Raizes	(Delle, Di et al. 1990)
1-(indol-7-il)-3-metil-2-Buten-1-ona [35]				

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

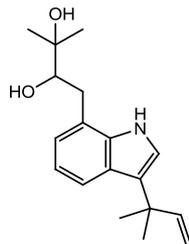
treo-Leiocarpatriol A
[36]



eritro-Leiocarpatriol B
[37]



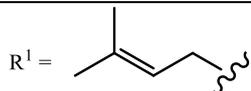
Leiocarpadiol
[38]



E. leiocarpa

Raízes

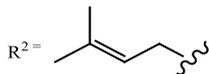
(Delle,
Di et al.
1990)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

$$R^2 = R^3 = H$$

7-Prenil-indol

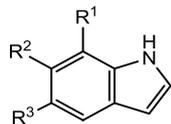
[42]



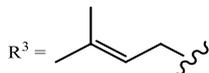
$$R^1 = R^3 = H$$

6- Prenil-indol

[43]

*E. leiocarpa*

Raizes

(Delle,
Delle et
al. 1989)

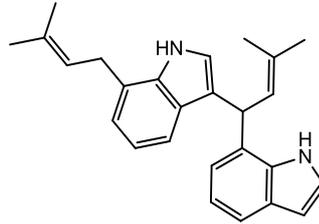
$$R^1 = R^2 = H$$

5- Prenil-indol

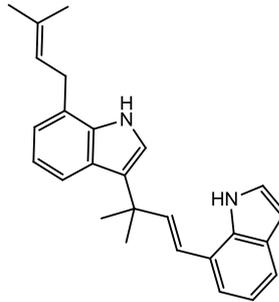
[44]

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

Anonidina A
[45]



Anonidina C
[46]



E. leiocarpa

Raizes

(Delle,
Delle et
al. 1989)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Eseneckia*

Compostos Nitrogenados	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Ref.
Geranyl N-dimethylallylanthranilate [47]		<i>E. yaaxhokob</i>	Folhas	(Aguilar-Guadarrama and Rios 2004)
<i>(E)</i> -N-isobutil-3-metoxi-4,5-metilenodioxicinamoilamida [48]		<i>E. almawillia</i>	Raízes	(Barros-Filho, Nunes et al. 2007)
R = H 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-metil-N-(2-feniletil)-2(E)-Propenamida, [49]		N.I.	(Delle, Di et al. 1990)	
R = OMe (E)-Podocarpamida [50]				

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

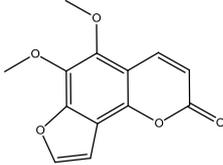
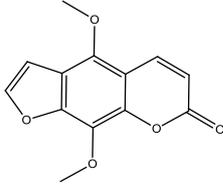
Cumarinas	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Ref.
		<i>E. almawillia</i> e <i>grandiflora</i>		(Oliveira, Santana et al. 1996)
Pimpinellina [51]		<i>E. grandiflora</i>		(Januario, Vieira et al. 2009) (Brito, Conserva et al. 2005) (Conserva, S. et al. 2004)
		<i>E. grandiflora</i> subsp. <i>E. brevipetiolata</i>	Raízes	(Trani, et al., 2004)
		<i>E. almawillia</i>	Caule	(Guilhon, Baetas et al. 1994)
Isopimpinellina [52]		<i>E. febrífuga</i>		(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
		<i>E. grandiflora</i>		(Brito, Conserva et al. 2005)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

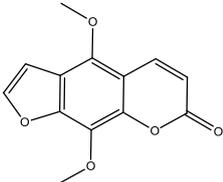
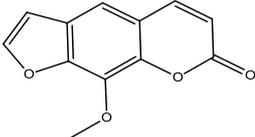
Isopimpinina [52]		<i>E. grandiflora</i> subsp.	Raízes	(Trani, et al., 2004)(Trani, Carbonetti et al. 2004)
		<i>E. brevipetiolata</i>		
		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002)
		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
Xantoxina [53]		<i>E. almawillia</i> e <i>E. grandiflora</i>	Sementes	(Dreyer 1980)
		<i>E. grandiflora</i>		(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. grandiflora</i> subsp. <i>E. brevipetiolata</i>		(Januario, et al., 2009) (Brito, Conserva et al. 2005)
			Raízes	(Trani, et al., 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

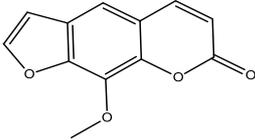
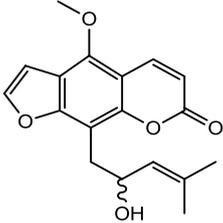
Xantotoxina [53]		<i>E. alata</i>	Folhas	(Cuca and Coy 2007)
		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002)
		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
		<i>E. hieronimi</i>	Folhas	(Delle, Trani et al. 1995)
5-(1'-hidroxi-isopentenil)- bergapteno [54]		<i>E. grandiflora</i>		(Brito, Conserva et al. 2005)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

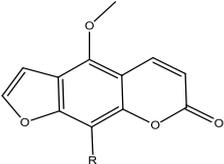
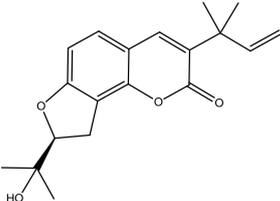
R = H Bergapteno [55]		<i>E. febrifuga</i>	Caule	(Dolabela, Oliveira et al. 2008)
R = OH 8-hidroxi-bergapteno [56]		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002) (Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
3-(1',1')- dimetilalilcolumbianetina [57]		<i>E. litoralis</i>	Cascas das sementes	(Dreyer 1980)
		<i>E. almawillia</i>	Cascas	
		<i>E. grandiflora</i>	Caule	(Oliveira, Santana et al. 1996)
		<i>E. grandiflora</i>	Raízes	(Brito, Conserva et al. 2005)
		<i>E. grandiflora</i> subsp. <i>E. brevipetiolata</i>		(Trani, Carbonetti et al. 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

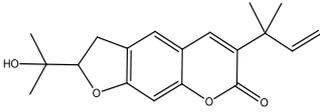
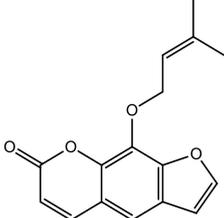
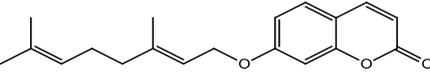
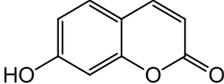
Chapelina [58]		<i>E. almawillia</i> e <i>E. grandiflora</i>		(Oliveira, Santana et al. 1996)
Imperatorina [59]		<i>E. yaaxhokob</i>	Folhas	(Mata, Macias et al. 1998)
Aurapteno [60]		<i>E. febrífuga</i> <i>E. grandiflora</i> <i>E. hieronimi</i> <i>E. conspecta</i>	Folhas Folhas Folhas Caule	(Napolitano, Silva et al. 2004) (Januario, Vieira et al. 2009) (Delle, Trani et al. 1995) (Rios, Rosas-Alonso et al. 2002)
Umbeliferona [61]		<i>E. grandiflora</i>		(Januario, Vieira et al. 2009)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

3,8-dimetoxi-furanocumarina [62]		<i>E. grandiflora</i>	(Nunes, Barros-Filho et al. 2005)
7-metoxi -8-preniloxi- cumarina [63]		<i>E. grandiflora</i>	(Brito, et al., 2005)
Dímero pimpineline [64]		<i>E. grandiflora</i>	(Brito, et al., 2005) (Conserva, S. et al. 2004)
5-Senecioilxantoxina [65]		<i>E. grandiflora</i>	(Brito, et al., 2005)
		<i>E. grandiflora</i> subsp. <i>brevipetiolata</i>	Raízes (Trani, Carbonetti et al. 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

Swietenocumarina B [66]		<i>E. grandiflora</i> <i>E. grandiflora</i> <i>subsp.</i> <i>brevipetiolata</i>	Raízes	(Brito, et al., 2005) (Trani, Carbonetti et al. 2004)
Marmelosina [67]		<i>E. grandiflora</i> <i>subsp. grandiflora</i>	Folhas e ramos	(Trani, Delle et al. 1997)
Anisocumarina H [68]		<i>E. grandiflora</i> <i>subsp. grandiflora</i>	Folhas e ramos	(Trani, Delle et al. 1997)
7-[(E)-7'-hidroxi-3',7'- dimetilocta-2',5'- dieniloxi]-cumarina [69]		<i>E. grandiflora</i> <i>subsp. grandiflora</i>	Folhas e ramos	(Trani, Delle et al. 1997)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

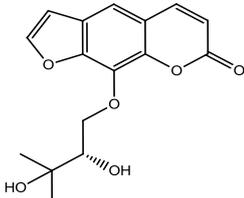
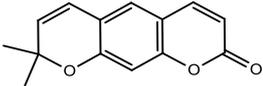
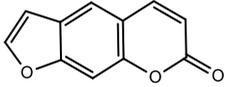
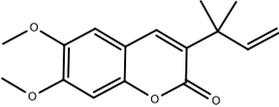
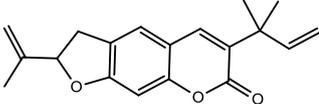
(-)-Heraclenol [70]		<i>E. grandiflora</i> subsp. <i>grandiflora</i>	Folhas e ramos	(Trani, Delle et al. 1997)
Xantiletina [71]		<i>E. alata</i>	Folhas	(Cuca and Coy 2007)
Psoraleno [72]		<i>E. alata</i>	Folhas	(Cuca and Coy 2007)
Rutacultina [73]		<i>E. alata</i>	Folhas e cascas	(Garcia- Beltran and Cuca- Suarez 2005)
Exo- dehidrochalepina [74]		<i>E. alata</i>	Folhas e cascas	(Garcia- Beltran and Cuca- Suarez 2005)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

5-hidroxi-2-metil-cromanona [75]		<i>E. alata</i>	Folhas e cascas	(Garcia-Beltran and Cuca-Suarez 2005) (Beltran and Suarez 2003)
Escopoletina [76] R = OMe		<i>E. pentaphylla</i>	Caule	(Simpson and Jacobs 2005)
8-metoxi-marmesina [77] R = H Marmesina [78]		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
Felopterina [79]		<i>E. conspecta</i> <i>E. ovata</i>	Caule Folhas	(Rios, Rosas-Alonso et al. 2002) (Rios and Delgado 2002)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

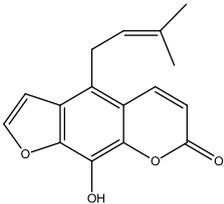
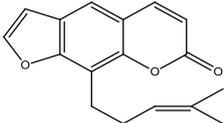
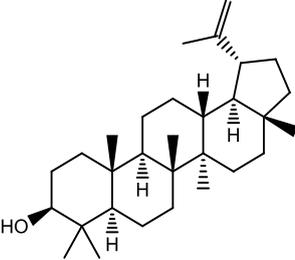
Aloimperatorina [80]		<i>E. litoralis</i>	Cascas	
Imperatorina [81]				
Terpenos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Ref.
Lupeol [82]		<i>E. yaaxhokob</i>	Folhas	(Mata, Macias et al. 1998)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

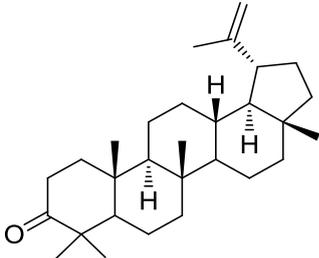
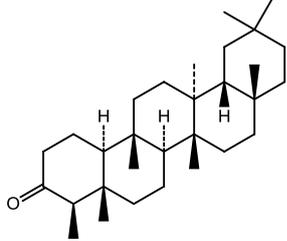
Lupenona [83]		<i>E. alata</i>	Folhas	(Cuca and Coy 2007)
Friedelanona [84]		<i>E. yaaxhokob</i>	Folhas	(Aguilar-Guadarrama and Rios 2004)
		<i>E. alata</i>		(Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011)
		<i>E. nesiotica</i>		(Rios and Delgado 1992)
		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002)
		<i>E. litoralis</i>		(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

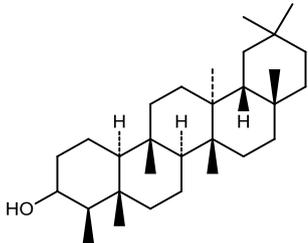
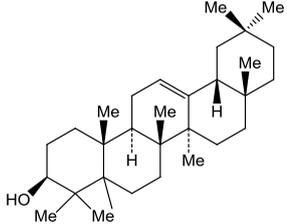
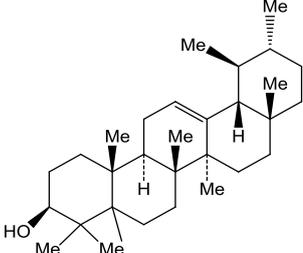
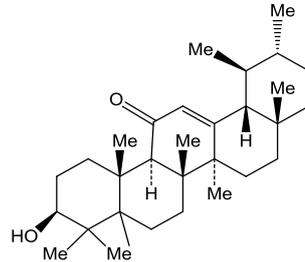
Friedelanol [85]		<i>E. yaaxhokob</i>	(Aguilar-Guadarrama and Rios 2004) (Cuca-Suarez, et al., 2011)
		<i>E. alata</i>	Folhas
		<i>E. litoralis</i>	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
β -amirina [86]		<i>E. grandiflora</i>	(Januario, Vieira et al. 2009)
α -amirina [87]		<i>E. grandiflora</i>	(Januario, Vieira et al. 2009)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

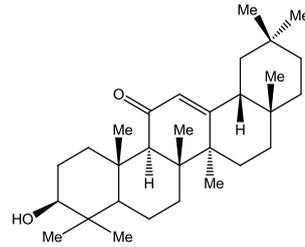
α -amirinonol
[88]



E. grandiflora

(Januario, Vieira et al. 2009)

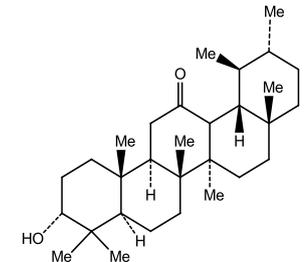
β -amirinona
[89]



E. grandiflora

(Januario, Vieira et al. 2009)

3 α -hidroxiursan-12-ona
[90]



E. grandiflora

(Januario, Vieira et al. 2009)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

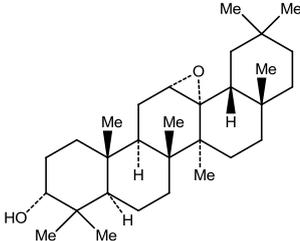
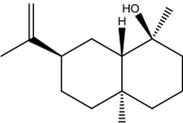
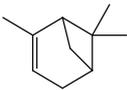
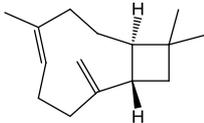
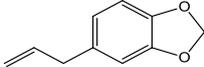
3 α -hidroxi-12,13-epoxy- oleanano [91]		<i>E. grandiflora</i>	(Januario, Vieira et al. 2009)	
Intermediol [92]		<i>E. almawillia</i>	Raízes	(Barros- Filho, Nunes et al. 2007)
α -pineno [93]		<i>E. almawillia</i>		(Barros- Filho, Nunes et al. 2004)
β -cariofileno [94]		<i>E. almawillia</i>		(Barros- Filho, Nunes et al. 2004)
Safrol [95]		<i>E. almawillia</i>		(Barros- Filho, Nunes et al. 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

Acorenol [96]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Turmerona [97]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
γ -cadineno [98]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Mirceno [99]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
β -Felandreno [100]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
2-tridecanona [101]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

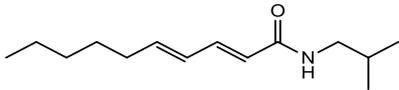
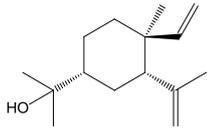
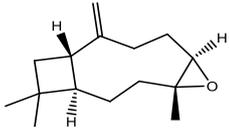
Pelitorina [102]		<i>E. alata</i>	Folhas	(Beltran and Suarez 2003)
α -elemol [103]		<i>E. almawillia</i>		(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Patchulano [104]		<i>E. almawillia</i>		(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
β -óxido-cariofileno [105]		<i>E. yaaxhokob</i>	Folhas	(Aguilar-Guadarrama and Rios 2004)
		<i>E. almawillia</i>		(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
		<i>E. nesiotica</i>	Folhas	(Rios and Delgado 1992)
		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002)
		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)

Tabela 2 (continuação) Metabólitos secundários isolados do gênero *Esenecia*

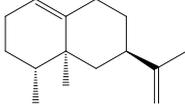
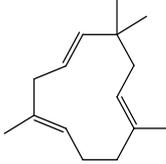
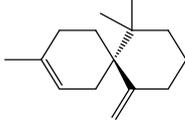
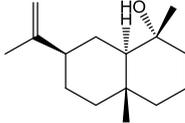
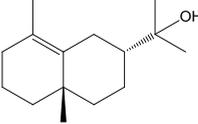
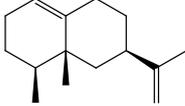
Valenceno [106]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
α -cariofileno [107]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Chamigreno [108]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Selin-11-4 α -ol [109]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Epi-eudesmol [110]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Eremofileno [111]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

Cis-lanceol [112]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
γ -muroleno [113]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Decadienal [114]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Trans-tagetenona [115]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Cis-tagetenona [116]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Trans-nerolidol [117]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

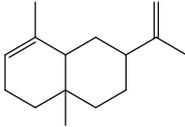
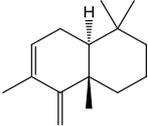
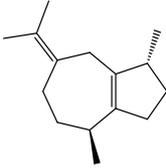
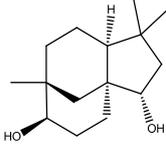
Epi- α -selineno [118]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Drimeneno [119]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Trans- β -guaieno [120]		<i>E. almawillia</i>	(Barros-Filho, Nunes et al. 2004)
Clovano-2 β -9 α -diol [121]		<i>E. nesiotica</i>	(Rios and Delgado 1992)
		<i>E. litoralis</i>	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
		<i>E. conspecta</i>	(Rios, Rosas-Alonso et al. 2002)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

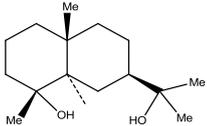
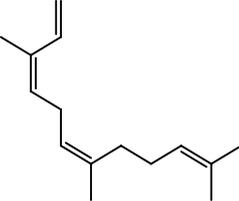
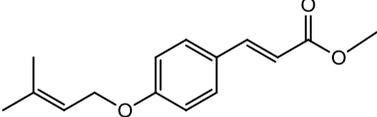
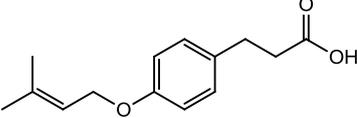
Criptomeridiol [122]		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002)
Cis- α -farneseno [123]				
R = Me Cinamato-4- isopreniloxi de metila [124]		<i>E. hieronimi</i>	Folhas	(Delle, Trani et al. 1995)
R = H Ácido cumárico-4- isopentenil-oxi [125]			N.I.	(Genovese, Epifano et al. 2011)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

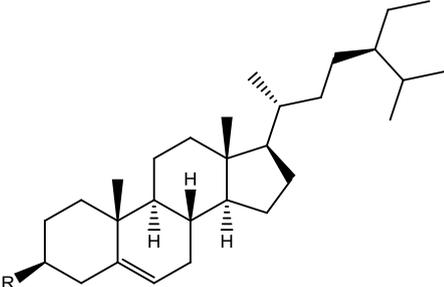
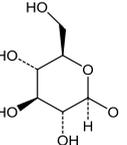
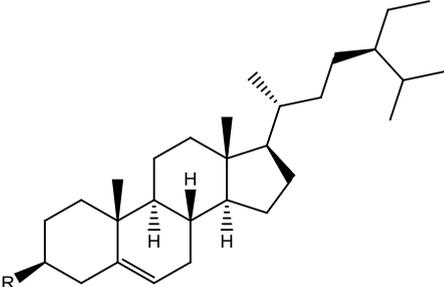
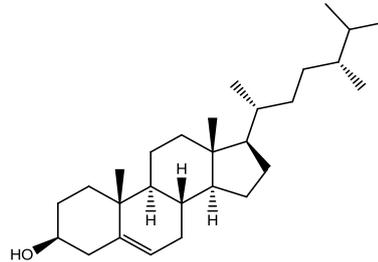
Esteróis	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Ref.
<p>R = OH</p> <p>β-sitosterol</p> <p>[126]</p>		<i>E. yaaxhokob</i>	Folhas	(Aguilar-Guadarrama and Rios 2004)
<p>R =</p>  <p>β-sitosterol-3β-O-β-D-glicopiranosideo</p> <p>[127]</p>		<i>E. grandiflora</i>	Folhas	(Januario, Vieira et al. 2009) (Brito, Conserva et al. 2005)
		<i>E. alata</i>	Folhas	(Beltran and Suarez 2003)
		<i>E. nesiotica</i>	Folhas	(Rios and Delgado 1992)
		<i>E. ovata</i>	Folhas	(Rios and Delgado 2002)
		<i>E. litoralis</i>	Folhas	(Rios, Aguilar-Guadarrama et al. 2002)
		<i>E. conspecta</i>	Caule	(Rios, Rosas-Alonso et al. 2002)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

3 β -acetato-24-metil-Dammara-20,25-dien-3-ol [128]		<i>E. grandiflora</i>	(Januario, Vieira et al. 2009)
Estigmasterol [129]		<i>E. grandiflora</i>	(Januario, Vieira et al. 2009)
		<i>E. hieronimi</i>	Folhas (Delle, Trani et al. 1998)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

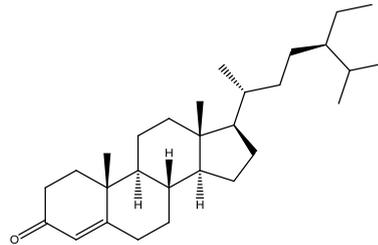
Campesterol
[130]



E. grandiflora

(Januario,
Vieira et
al. 2009)

Sitostenone
[131]



E. grandiflora

(Brito,
Conserva
et al.
2005)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

Flavonoides e fenólicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Ref.
Hespiridina [132]		<i>E.</i> <i>yaaxhokob</i>	Folhas	(Mata, Macias et al. 1998)
R = OMe Gardenina B [133]		<i>E.</i> <i>almawillia</i>	Raízes	(Barros-Filho, Nunes et al. 2007)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

<p>R = OH Nevadesina [134]</p>		<i>E. almawillia</i>	Raízes	(Barros-Filho, Nunes et al. 2007)
<p>Caenferol 3-O-α- raminosídeo [135]</p>		<i>E. grandiflora</i> <i>subsp.</i> <i>Brevipetiolata</i>	Raízes	(Trani, Carbonetti et al. 2004)
		<i>E. grandiflora</i> <i>subsp.</i> <i>grandiflora</i>	Folhas	(Trani, Delle et al. 1997)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenuekia*

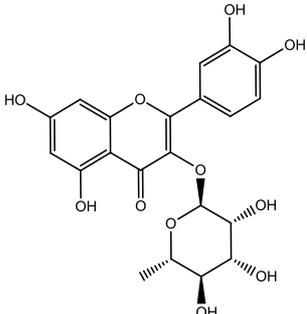
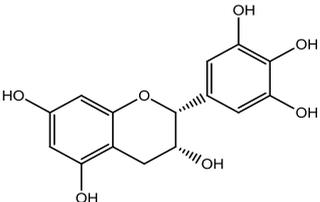
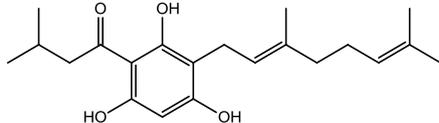
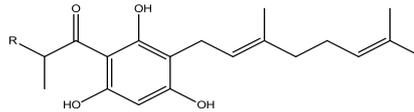
<p>Quercetina-3-O-α- raminosídeo [136]</p>		<p><i>E. grandiflora</i> subsp. <i>Brevipetiolata</i></p>	<p>Raízes</p>	<p>(Trani, Carbonetti et al. 2004)</p>
<p>Epi-galocatequina [137]</p>		<p><i>E. grandiflora</i> subsp. <i>grandiflora</i></p>	<p>Folhas</p>	<p>(Trani, Delle et al. 1997)</p>
<p>1-(3-metil-butan-3- ona), 3-[(3,7-dimetil- 2,6-octadienil-3-(E)- metil] floroglucinol [138]</p>		<p><i>E. nesiotica</i></p>	<p>Folhas</p>	<p>(Rios and Delgado 1992)</p>

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

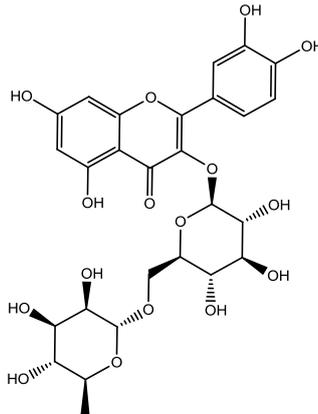
R = H 3-geranil-1-
(propanoil)-
floroglucinol
[139]

*E. nesiotica*

Folhas

(Rios and Delgado 1992)

R = Me 3-geranil-1-
(2'-metilpropanoil)-
floroglucinol
[140]

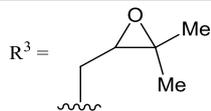


Rutina
[141]

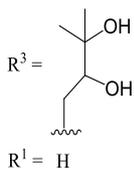
E. pumila

Folhas

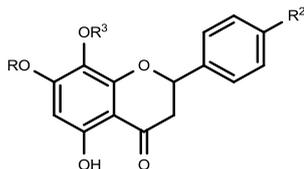
(Kubo 1991)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

5,7-dihidroxi-8-(2,3-epoxy-3-metilbutil)
flavanona (2''3''-epoxy-
glabranina)
[142]



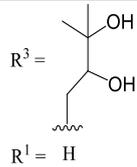
5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-
(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)
flavanona (7-metil-8-
(2'',3''-dihidroxiprenil)-
naringenina
[143]



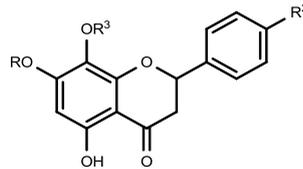
E. berlandieri
subsp.
accapulcensis

Folhas

(Cano,
Espinoza et
al. 2006)

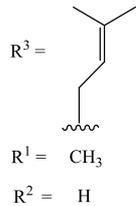
Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

5,7,4'-dihidroxi-7-
metoxi-8-(2,3-dihidroxi-
3-metilbutil)
flavanona (7-metil-8-
(2'',3''-dihidroxi-prenil)-
naringenina
[144]

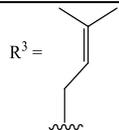


E. berlandieri
subsp.
accapulcensis

Folhas (Cano, Espinoza et al.
2006)

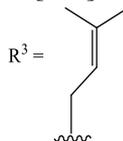


7-metilglabrarina
[145]

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia* $R^1 = \text{H}$ $R^2 = \text{H}$

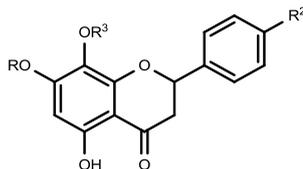
Glabrarina

[146]

 $R^1 = \text{H}$ $R^2 = \text{OH}$

8-prenil-naringenina

[147]

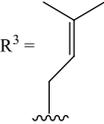
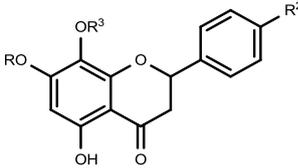
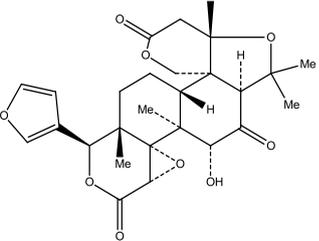


E. berlandieri
subsp.
accapulcensis

Folhas

(Cano, Espinoza
et al. 2006)

Tabela 2 (continuação) Metabolitos secundários isolados do gênero *Esenbeckia*

<p> $R^3 =$  $R^1 = CH_3$ $R^2 = OH$ 7-metil-8-prenil-naringenina [148] </p>		<p> <i>E. berlandieri</i> <i>subsp.</i> <i>accapulcensis</i> </p>	Folhas	(Cano, Espinoza et al. 2006)
Limonoides	Estrutura	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
<p> Rutaevina [149] </p>		<p><i>E. febrifuga</i></p>		(Vitagliano and Comin 1970)

Os alcaloides quinolínicos como maculina [1], flindersiamina [3], cocusagenina [4] e esquimiamina [5] estão presentes na maioria das espécies do gênero *Esenbeckia*, conforme **Tabela 2**. Outra variedade de alcaloides significantes no gênero são os quinolinônicos como isomaculina [16] isolado das raízes da espécie *E. pilocarpoides* (Bevalot, Fournet et al. 1984), 3'-metoxigraveolina [19] isolado das raízes de *E. almawillia* (Barros-Filho, Nunes et al. 2007).

A espécie vegetal *Esenbeckia almawillia* tem como constituição química cumarinas como pimpinelina [51], compostos derivados do cinamaldeído como cinamato-4-isopreniloxi de metila [124], alcaloides como edulina [17] e o flavonóide nevadesina [134]. Barros-Filho e colaboradores obtiveram o óleo essencial por hidrodestilação das folhas desta espécie o qual foi fracionado em cromatografia, conduzindo ao isolamento do safrol [95], 3,3-diisopentenil-*N*-metil-2,4-quinoldiona [12], monoterpenos (α -pineno [93], β -felandreno [100]) e sesquiterpenos (α -cariofileno [107], patchulano [104]) em maior concentração. Paralelo ao isolamento, um estudo de RMN de ^{13}C e de ^1H e técnicas bidimensionais levaram à identificação do alcaloide 3,3-diisopentenil-*N*-metil-2,4-quinoldiona [12] e de cinco derivados produtos de modificação estrutural. Em 2006 Nunes e colaboradores realizaram testes antitumorais das frações e do alcaloide [12] isolados das cascas e das raízes de *E. almawilla* e além disso realizaram a semissíntese de 11 derivados do alcaloide. Desta triagem as frações mais ativas foram as de menor polaridade e o alcaloide [12].

Outra espécie que merece destaque no Gênero *Esenbeckia*, pela rica presença de alcaloides quinolínicos é a *E. febrífuga* (Vitagliano and Comin 1970; Dolabela, Oliveira et al. 2008). Desta espécie foram identificadas a maculina [1], flindersiamina [3] e esquimiamina [5] (Vitagliano and Comin 1970). Outros metabólitos isolados desta espécie foi o limonoide rutaevina [149] (Vitagliano and Comin 1970), além da cumarina aurapteno [60] capaz de inibir o crescimento do parasita *Leishmania major*. (Napolitano, Silva et al. 2004). Há relatos na literatura a respeito da ação antiplasmodial das frações e compostos desta espécie.

A espécie *E. grandiflora* tem como perfil químico a predominância de alcaloides da classe indolpiridoquinazolina, a rutaecarpina [32](**Januario, Vieira et al. 2009**). A subespécie *grandiflora* apresenta como constituintes cumarinas, dentre elas a isopimpinellina [52] e flavonóides como o caenferol-3-O- α -raminosídeo [135] isolados a partir das folhas e galhos (**Trani, Delle et al. 1997**). Outra subespécie encontrada é a brevipetiolata, a qual possui estruturas de furoquinolinas, como por exemplo, a delbina [8] e cumarinas, do tipo xantotoxina [53] isoladas a partir das raízes da espécie (**Trani, Carbonetti et al. 2004**). Oliveira e colaboradores através de um estudo de difração em raios X discutiram a conformação estrutural de dois compostos isolados das raízes desta espécie: a pimpinellina [51] e a xantotoxina [53] (**Pereira, Conserva et al. 2004**).

A partir das cascas da espécie *E. alata* foram isolados as substâncias, β -sitosterol [126] e 5-hidroxi-2-metilcromanona [75], ambos apresentaram atividade antimicrobiana (Beltran and Suarez 2003). Além destas estruturas, a espécie em questão apresenta em sua composição química alcaloides do tipo quinolínicos, como a cocusagenina [4] e triterpenos do tipo fridelano (fridelanona [84] e fridelanol [85]) (Cuca-Suarez, Barrera et al. 2011). Garcia-Beltran e colaboradores (2005) descrevem o processo de isolamento e as técnicas mais utilizadas para identificar duas cumarinas a partir da espécie *E. alata*.(Garcia-Beltran and Cuca-Suarez 2005).

Segundo a literatura métodos cromatográficos empregados para o isolamento de compostos a partir da espécie vegetal *E. pumila*, mostraram a presença do flavonoide glicosilado rutina [141].(**Kubo, Vieira et al. 1990; Kubo 1991**).

A espécie *E. pilocarpoides* é caracterizada pela abundância em alcaloides entre eles uma 4-furoquinolona (1-hidroxi-3-metil-N-metil acridona [26]), e uma furoquinolina (maculina [1])(**Bevalot, Fournet et al. 1984**). Estudos farmacológicos mostraram que esses alcaloides são responsáveis pela atividade antidepressiva (**Worthley and Schott 1969**).

Dentre as espécies do gênero *Esenbeckia* pouco estudadas, estão a *E. pentaphyla*, contendo alcaloides como a flindersiamina [3],

cocusagenina [4], dictamina [9], edulina [17] e a cumarina escopoletina [76] em sua constituição química (**Simpson and Jacobs 2005**). A espécie *E. ovata* que apresenta terpenoides criptomeridiol [122], β -cariofileno [94], fridelanol [85], furocumarinas como felopterina [79] e os triterpenos lupeol [82] e lupenona [83] (**Rios and Delgado 2002**). Na *E. nesiotica* foram identificados derivados do floroglucinol [138-140], terpeno lupeol [82] e o fitoesterol β -sitosterol [126] (**Rios and Delgado 1992**).

Na investigação fitoquímica do gênero *Esenbeckia* destaca-se a presença de metabólitos secundários da classe dos alcaloides como marcadores quimiosistemáticos. Em virtude disso, a investigação da espécie *Esenbeckia leiocarpa* vem a contribuir com os estudos biológicos, sobretudo quimiotaxonômicos deste gênero.

2.2. Espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

O escopo desta pesquisa tratou de um estudo fitoquímico da espécie *Esenbeckia leiocarpa* conhecida popularmente como guarantã ou guarataia-vermelha. A espécie apresenta como principais características botânicas: arbusto ou árvores de 5 a 12 m de altura com ramos castanhos, folhas simples, alternas a subopostas e flores com pétalas elípticas com aspecto acinzentado (Figura 2). No Brasil esta espécie localiza-se nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (**Melo and Zickel 2004**).



Figura 2. Árvore da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Estudos fitoquímicos anteriores da espécie *Esenbeckia leiocarpa*, destacam a presença de alcaloides quinolônicos (leioquinina B [23], leptomerina [30])(Delle, Delle et al. 1989), da classe das furoquinolinas (flindersiamina [3], cocusagenina [4] e γ -fagarina [6])(Delle, Delle et al. 1989; Cardoso-Lopes, Maier et al. 2010) e da classe de composto indólicos como, por exemplo, treo-leiocarpatriol [36], leiocarpol [39] e anonidina A [45] (Tabela 2). A presença destes alcaloides na espécie atribui à planta a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase, a qual está associada à doença de Alzheimer. O extrato bruto hidroalcoólico, a fração hexânica e a fração clorofórmica das folhas de *E. leiocarpa* foram testadas nesse modelo de inibição enzimática, onde a fração clorofórmica (rica em alcaloides) apresentou baixa IC_{50} (concentração inibitória de 50 %) sendo o alcaloide [30] o que apresentou a menor concentração ($IC_{50} = 2,5 \mu\text{molL}^{-1}$) capaz de inibir a acetilcolinesterase, similar ao composto referência, galantamina ($IC_{50} = 1,7 \mu\text{molL}^{-1}$)(Cardoso-Lopes, Maier et al. 2010).

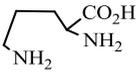
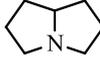
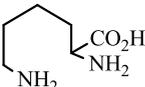
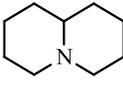
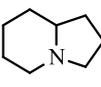
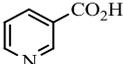
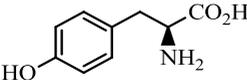
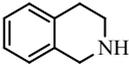
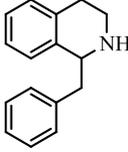
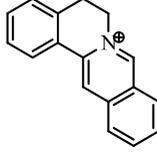
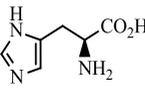
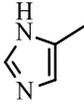
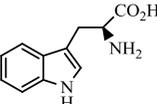
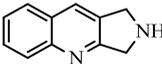
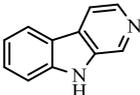
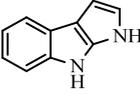
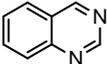
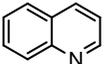
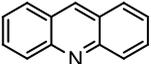
2.3. Alcaloides

Os alcaloides são estruturas compostas por bases nitrogenadas orgânicas encontradas principalmente em plantas, em animais e microrganismos. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes na

forma de amins primárias ou secundárias e ou terciárias, conferindo-lhes propriedades básicas. Estas propriedades são úteis para o isolamento, pois o tratamento de uma solução aquosa rica em alcaloides com ácido mineral é transformado em seus respectivos ácidos conjugados. A acidez destes compostos varia conforme a estrutura da molécula e a presença e localização dos grupos funcionais. No entanto, podem ser encontrados naturalmente como amins quaternárias. A atividade biológica de muitos alcaloides está baseado no fato que as funções amins são transformadas em sistema quaternário pela protonação em pH fisiológico(Dewick 2002; Simões, Schenkel et al. 2003).

Os alcaloides podem ser classificados conforme o esqueleto carbonado contendo sistema heterociclo nitrogenado, por exemplo, pirrolidina, quinolina, piperidina, isoquinolina, indol, etc. embora, a complexidade estrutural de alguns aumente o número de subdivisões. Os átomos de nitrogênios nos alcaloides são derivados de um grupo aminoácido e em geral, o esqueleto carbônico destes aminoácidos precursores é mantido na estrutura do alcaloide, e o grupo carboxila do ácido carboxílico é frequentemente perdido por descarboxilação. Em vista disso, a subdivisão dos alcaloides em grupos é baseada no aminoácido precursor, sendo este responsável por sua classificação. Relativamente há poucos aminoácidos precursores diretamente envolvidos na biossíntese dos alcaloides tais como: tirosina, lisina, ornitina, ácido nicotínico, ácido antranílico, triptofano e histidina. A Tabela 3 relaciona os principais aminoácidos precursores e as respectivas classes de alcaloides biossintetizados. Alguns blocos construtores como a via acetato, chiquimato e mevalonato são também incorporados nas estruturas dos alcaloides. Além disso, muitos grupos de alcaloides são formados pela ligação de um átomo de nitrogênio do grupo aminoácido através de reações chamadas transaminação, enquanto o restante da molécula pode ser derivado da via acetato ou chiquimato, ou ainda pode ser de origem terpenoídica ou esteroidal. O termo pseudoalcaloide é algumas vezes usado para distinguir estes grupos(Dewick 2002; Simões, Schenkel et al. 2003).

Tabela 3. Principais estruturas básicas dos alcaloides e seus respectivos precursores

Aminoácido precursor	Principais classes de alcaloides		
 L-ornitina	 pirrolidina	 tropano	 pirrolizidina
 L-lisina	 piperidina	 quinolizidina	 indolizidina
 ácido nicotínico		 pridina	
 L-tirosina	 tetrahydroisoquinolina	 benziltetrahydroisoquinolina	 protoberberina
 L-histidina		 imidazol	
 L-triptofano	 indol	 quinolina	 pirrolquinolina
	 b-carbolina	 pirrolindol	
 ácido antranílico	 quinazolina	 quinolina	 acridina

Fonte: (Dewick 2002)

Várias gerações de pesquisadores têm trabalhado na investigação, principalmente, no isolamento, determinação estrutural, em transformações químicas e na síntese total dos alcaloides. Muito esforço tem sido realizado, também, para elucidar a rota biossintética e qual a função deste metabolito secundário na sobrevivência e competição no ambiente das plantas(**Dewick 2002**).

Os metabólitos secundários exercem funções específicas nas plantas, das quais dependem do pH do solo, clima, sazonalidade e sobretudo proteção e reprodução(**Richard 2001**). Alguns alcaloides exercem função de proteção nas plantas, em virtude dos insetos e animais evitarem estas plantas, isto certamente devido a sua toxicidade ou ao fato de a maioria dos alcaloides possuírem sabor amargo. Outras hipóteses da presença de alcaloides nas plantas seriam como um mecanismo de desintoxicação, ou ainda atuarem como hormônios reguladores do crescimento, ou da manutenção do equilíbrio iônico do organismo(**Simões, Schenkel et al. 2003**).

2.4. Biossíntese

A via chiquimato (ácido chiquímico) permite a obtenção de uma variedade de metabólitos secundários entre eles os fenóis, derivados do ácido cinâmico, ligninas e alguns alcaloides(**Dewick 2002**). O chiquimato é um produto da combinação do fosfoenolpiruvato, um intermediário glicolítico, e do 4-fosfato eritrose (1ª etapa) (Figura 3). O chiquimato é o precursor dos aminoácidos aromáticos *L*-fenilalanina, *L*-tirosina e *L*-triptofano. O fragmento indol de um alcaloide indólico é produto da descarboxilação (ou não) do aminoácido *L*-triptofano, originando o bloco construtor indol C₂N (2ª etapa), este através de uma reação de Mannich/Pictet - Spengler com secoridoides (R= secologanina) formam os alcaloides indólicos simples (coriantos) e quando há sucessivas oxidações dão origem aos β -carbólicos (**Simões, Schenkel et al. 2003**) (Figura 3).

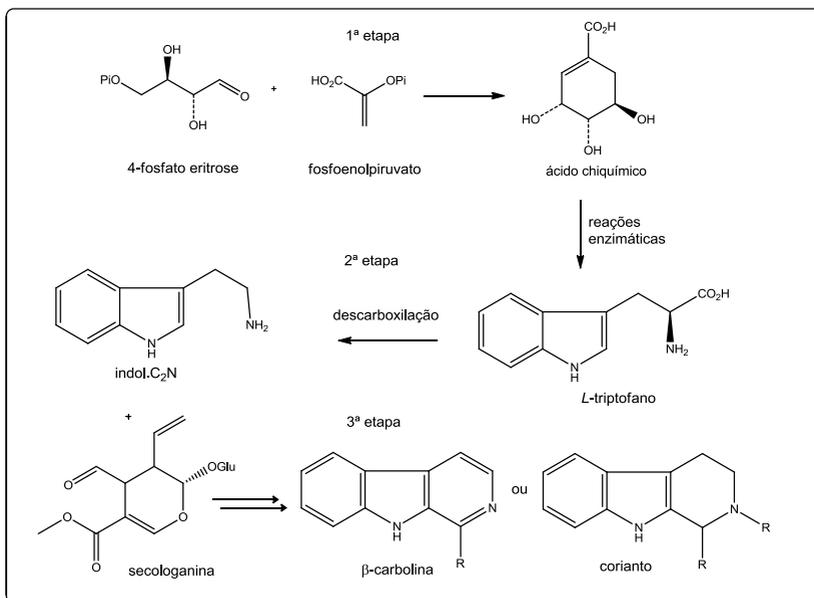


Figura 3. Rota biossintética dos alcalóides indólicos derivados do triptofano

2.5. Atividades Biológicas

A investigação química, em geral, visa à descoberta de compostos bioativos, sejam de origem natural, por exemplo, quinina (Figura 4) princípio ativo antimalárico isolado das cascas do caule do gênero *Cinchona* (*Cinchona officinalis*), seja de origem semissintética ou sintética. Neste contexto, os bioensaios são excelentes ferramentas que contribuem para o desenvolvimento de novos fármacos com fins terapêuticos (Simões, Schenkel et al. 2003).

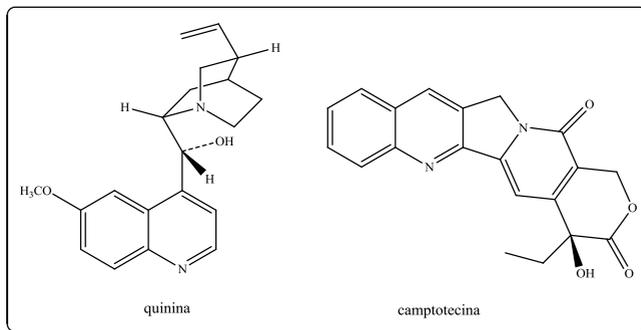


Figura 4. Representante de alcaloides utilizado como fármacos

A ampla variedade de estruturas dos alcaloides indica os motivos pelos quais, estas substâncias agem sobre sistemas biológicos. Os alcaloides são responsáveis por diversas atividades biológicas, dentre eles podemos citar a quinina (antimalárico)(**Kalotka-Kreglewska 2011**), camptotecina (antitumoral)(**Adane, Liu et al. 2011**), galantamina (tratamento do mal de Alzheimer) entre outros(**Guo, Xie et al. 2010**).

Os testes mais utilizados para estudos preliminares de atividade biológica são os testes antioxidantes, os quais mimetizam processos fisiológicos ou reações químicas envolvidas nesses processos. Os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais e a maioria de seus efeitos biologicamente ativos são derivados das funções antioxidantes(**Prior, Wu et al. 2005**). Recentemente, tem havido um aumento no interesse em antioxidantes naturais com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido a seus efeitos colaterais, tais como carcinogenicidade. Além disso, os antioxidantes naturais possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, e proporcionar benefícios adicionais à saúde(**Simões, Schenkel et al. 2003**).

Atualmente, sabe-se também que o dano causado por espécies reativas de oxigênio é considerado um fator contribuinte de diversas doenças, incluindo a doença de Alzheimer (DA). Identificar o potencial antioxidante de uma substância pode credenciá-la a ser uma molécula

bioativa mais completa quando se considera o conjunto de suas propriedades. Dessa forma, é adequada a associação de ambos os ensaios para um estudo bioguiado mais eficiente(**Giordani, Pagliosa et al. 2008**). A etiologia da DA permanece desconhecida, no entanto, estudos têm mostrado que a doença é caracterizada pela diminuição da função colinérgica no cérebro. Ensaio desenvolvidos para detectar esta atividade são utilizados para avaliar um grande número de plantas empregadas popularmente para melhorar a memória(**Giordani, Pagliosa et al. 2008**).

Além dos testes preliminares (citados acima), existem outros ensaios (com utilização de cobaias) com a finalidade de avaliar o potencial farmacológico do composto, frente às manifestações do organismo quando afetado por agentes externos. A inflamação, por exemplo, é uma reação caracterizada por reação de vasos sanguíneos, levando ao acúmulo de fluidos e leucócitos com objetivos de destruir, diluir e isolar os agentes lesivos. O processo inflamatório é caracterizado por rubor, calor, tumor e dor(**Santos, Passos et al. 2011**). As plantas medicinais são amplamente utilizadas na medicina popular de muitos países para o tratamento de diferentes condições inflamatórias e, em particular, nas inflamações da pele. No entanto, para muitas das plantas em uso, a eficácia real e os princípios ativos relevantes são desconhecidos.

Consequentemente, os estudos experimentais que visam demonstrar as propriedades farmacológicas destas plantas e identificar os princípios ativos são necessários(**Santos, Passos et al. 2011**). A investigação fitoquímica vem colaborar com a busca de fármacos com potencial terapêutico que sirvam de modelo para produção de fármacos no tratamento de patologias.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo investigar a composição química das cascas da espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl, bem como avaliar a potencial atividade biológica do extrato bruto, frações e compostos isolados.

3.1. Objetivos específicos

1. Preparar os extratos vegetais e frações;
2. Realizar análise fitoquímica preliminar;
3. Determinar tanto o perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o perfil eletroforético através de eletroforese capilar do EB, frações e compostos isolados;
4. Isolar por métodos cromatográficos em escala preparativa os componentes químicos representativos da espécie *Esenbeckia leiocarpa*;
5. Purificar os componentes por técnicas de recristalização, cromatografia flash, e cromatografia líquida preparativa (CLAE);
6. Determinar as propriedades físico-químicas dos componentes isolados;
7. Determinar a estrutura molecular dos compostos isolados, através de técnicas espectrométricas (EM, UV, IV e RMN).
8. Avaliar a inibição da enzima acetilcolinesterase e a atividade antiinflamatória do EB e frações obtidas das cascas da espécie *E. leiocarpa*, bem como dos componentes isolados a partir desta.

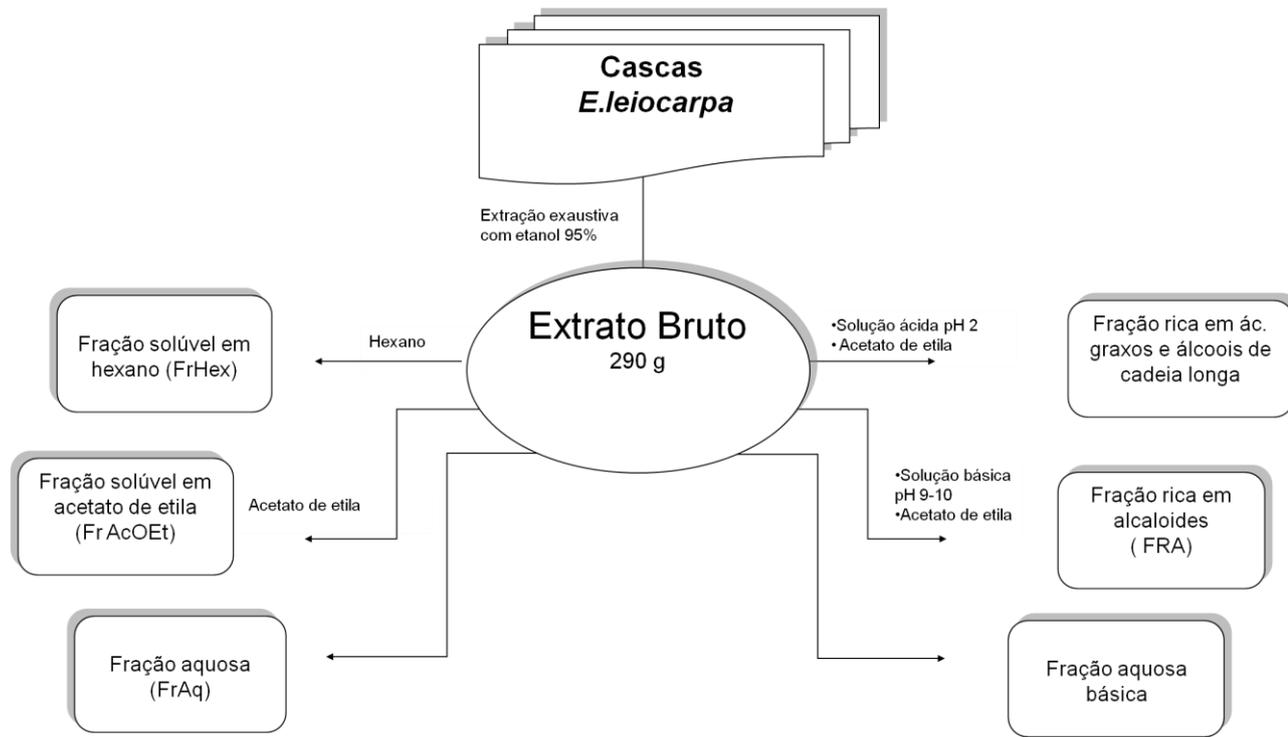
4. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

As cascas da *Esenbeckia leiocarpa* (5,4 kg), após a coleta e identificação foram secas em estufa de circulação de ar, moídas e submetidas à extração por maceração em etanol 95% (3x) à temperatura ambiente, durante sete dias. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob vácuo, rendendo 290,0 g de extrato bruto hidroalcoólico (EB).

O EB seco foi dividido em duas porções de 100 g e aplicado à extração por partição líquido-líquido (**Fluxograma 1**), porém com objetivos distintos. À primeira porção de extrato bruto EB adicionou-se uma solução aquosa 10 % etanol, originando uma suspensão. A mistura foi particionada com auxílio de solventes com diferentes polaridades, *n*-hexano e acetato de etila, originando as respectivas frações solúveis em *n*-hexano (FrHex) (9,9 g), em acetato de etila (FrAcOEt) (22 g), e a fração aquosa (FrAq) (68 g).

A outra parte foi submetida à partição ácido-base (Kam and Tan 1990) na qual à suspensão hidroalcoólica é adicionada uma solução aquosa ácida 2% de HCl, mantendo o pH 2, e em seguida particionada com acetato de etila por três vezes, resultando numa fração rica em ácidos graxos, álcoois de cadeia longa e esteróis (890 mg). O pH da suspensão aquosa foi elevado a aproximadamente pH 10 pela adição de uma solução amoniacal 10% e então extraída com acetato de etila, resultando numa fração rica em compostos nitrogenados, denominada fração rica em alcaloides (FRA) (12,5 g).

Fluxograma 1. Separação cromatográfica da Fração Rica em Alcaloides (FRA)



5. RESULTADOS PRELIMINARES DE ATIVIDADES BIOLÓGICA

5.1. Efeito do extrato bruto e frações da espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a migração celular e a exsudação

O extrato bruto hidroalcoólico (EB) obtido das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. reduziu significativamente a migração de leucócitos nas doses de 25 a 100 mg/kg (25 mg/kg: $41,5 \pm 5,9\%$, 50 mg/kg: $49,3 \pm 4,6\%$ e 100 mg/kg: $65,4 \pm 3,8\%$ ($P < 0,01$) (**Figura 5A**). Este efeito ocorreu devido à diminuição da migração de neutrófilos (25 mg/kg: $41,6 \pm 7,2\%$, 50 mg/kg: $48,6 \pm 4,9\%$ e 100 mg/kg: $66,5 \pm 3,9\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 5B**) e de mononucleares (25 mg/kg: $40,9 \pm 3,3\%$, 50 mg/kg: $52,2 \pm 3,5\%$ e 100 mg/kg: $61,1 \pm 5,4\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 5C**). Além disso, o EBH (10-100 mg/kg) inibiu também a exsudação (10 mg/kg: $17,7 \pm 3,5\%$, 25 mg/kg: $19,6 \pm 2,8\%$, 50 mg/kg: $27,4 \pm 2,6\%$ e 100 mg/kg: $33,0 \pm 2,5\%$) ($P < 0,05$) (**Figura 5D**).

A fração n-hexano (Hex), nas doses de 25 e 50 mg/kg, também demonstrou importante efeito anti-inflamatório, pois inibiu significativamente a migração leucocitária (25 mg/kg: $53,2 \pm 2,2\%$ e 50 mg/kg: $56,2 \pm 2,9\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 6A**) e de neutrófilos (25 mg/kg: $12,35 \pm 4,7\%$ e 50: mg/kg $19,0 \pm 6,8\%$) ($P < 0,05$) (**Figura 6B**). A fração Hex (10-50 mg/kg) também reduziu o número de mononucleares (10 mg/kg: $34,1 \pm 0,5\%$, 25 mg/kg: $39,8 \pm 1,7\%$ e 50 mg/kg: $39,7 \pm 5,4\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 6C**). Além disso, a dose de 50 mg/kg inibiu a exsudação em $27,0 \pm 6,6\%$ ($P < 0,01$) (**Figura 6D**).

A fração acetato de etila (AcOEt) mostrou efeito anti-inflamatório similar ao da fração Hex. Nas doses de 25 e 50 mg/kg inibiu significativamente a migração leucocitária (25 mg/kg: $56,8 \pm 3,3\%$ e 50 mg/kg: $58,3 \pm 2,9\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 7A**) e de neutrófilos (25 mg/kg: $23,6 \pm 5,7\%$ e 50 mg/kg: $27,2 \pm 4,9\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 7B**). A fração AcOEt (10 - 50 mg/kg) também inibiu a migração de mononucleares (10 mg/kg: $22,3 \pm 7,5\%$, 25 mg/kg: $25,9 \pm 6,3\%$ e 50 mg/kg: $24,5 \pm 8,2\%$) ($P < 0,05$) (**Figura 7C**). Além disso, assim como

observado para a fração Hex, apenas a dose de 50 mg/kg da fração AcOEt inibiu a exsudação em $26,2 \pm 7,7\%$ ($P < 0,01$) (**Figura 7D**).

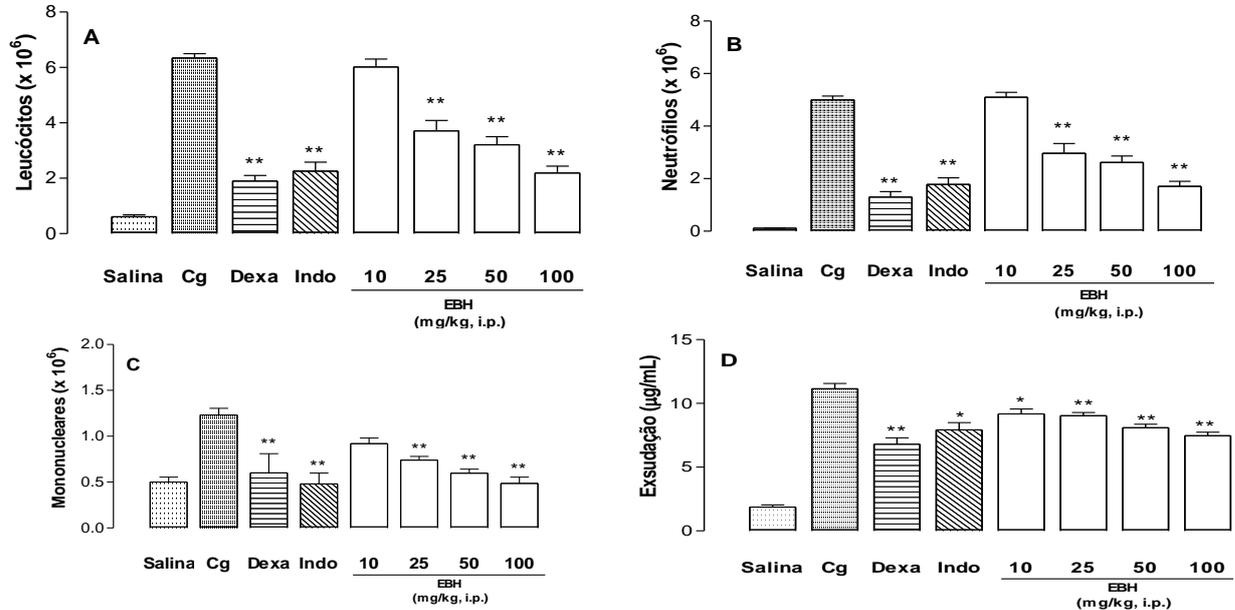


Figura 5. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (10-100 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito do EBH sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

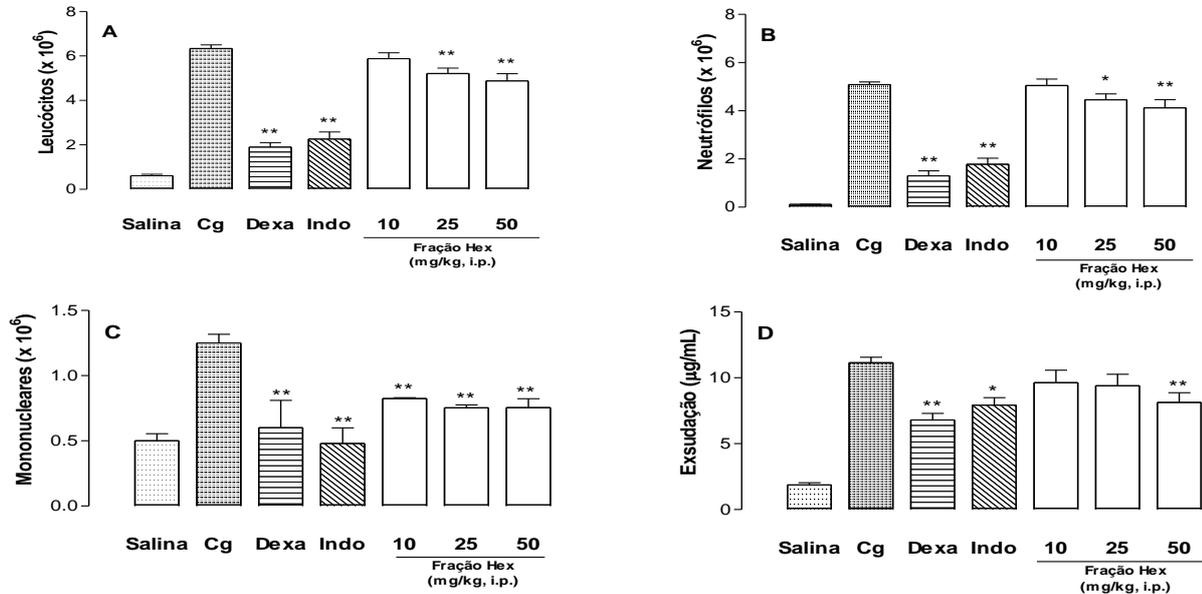


Figura 6. Efeito da fração n-hexano (Hex) (10-50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração Hex sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

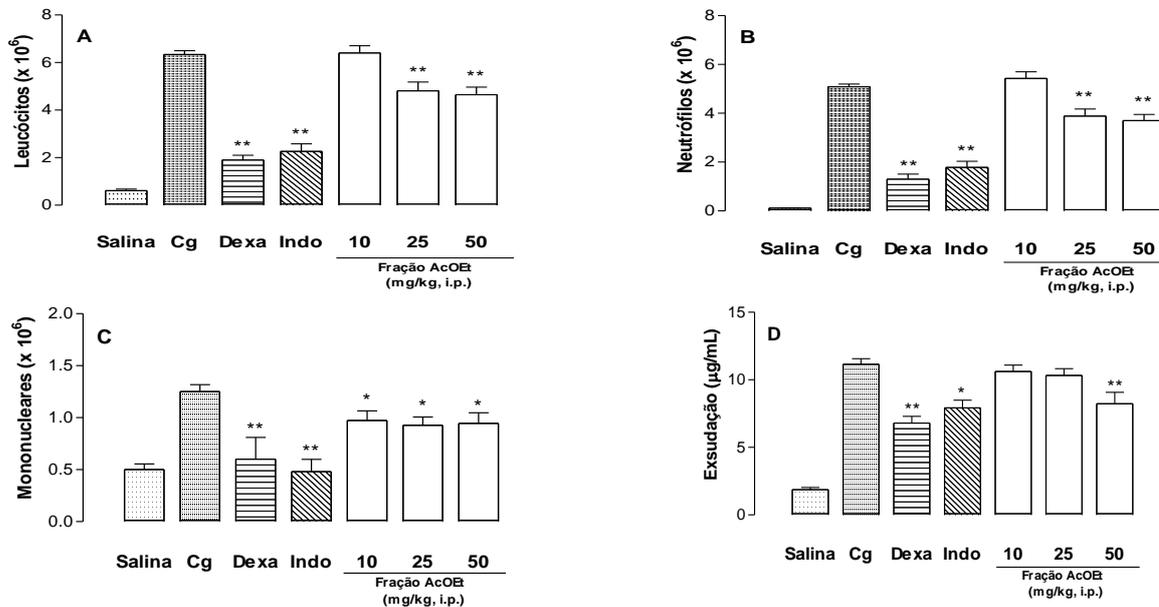


Figura 7. Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10-50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração AcOEt sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

A fração aquosa (FrAq) apresentou melhor efeito anti-inflamatório que as frações Hex e AcOEt. As doses de 5 e 10 mg/kg promoveram inibição significativa do número total e diferencial de leucócitos bem como da exsudação. Neste contexto, observou-se inibição da migração leucocitária (5 mg/kg: $24,3 \pm 4,0\%$ e 10 mg/kg: $32,4 \pm 6,9\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 8 A**), de neutrófilos (5 mg/kg: $20,1 \pm 6,3\%$ e 10 mg/kg: $30,2 \pm 9,2\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 8B**) e da exsudação (5 mg/kg: $23,4 \pm 2,9\%$ e 10 mg/kg: $23,6 \pm 4,9\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 8D**). Ainda, a FrAq inibiu o influxo de mononucleares nas doses de 2 a 10 mg/kg (2 mg/kg: $43,5 \pm 2,4\%$, 5 mg/kg: $41,1 \pm 6,0\%$ e 10 mg/kg: $41,1 \pm 2,2\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 8C**).

A fração rica em alcaloides (FRA) demonstrou efeito anti-inflamatório similar aos observados com a FrAq. A fração FRA (5 e 10 mg/kg) inibiu a migração leucocitária (5 mg/kg: $67,7 \pm 3,8\%$ e 10 mg/kg: $69,7 \pm 1,5\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 9A**), de neutrófilos (5 mg/kg: $45,9 \pm 5,2\%$ e 10 mg/kg: $46,7 \pm 4,3\%$) ($P < 0,01$) (**Figura 9B**) e de mononucleares (5 mg/kg: $32,3 \pm 15,4\%$ e 10 mg/kg: $46,6 \pm 7,7\%$) ($P < 0,05$) (**Figura 9C**). A dose de 10 mg/kg dessa fração também inibiu a exsudação em $15,6 \pm 5,1\%$ ($P < 0,05$) (**Figura 9D**).

Nas **Figuras 5A-D, 6A-D, 7A-D, 8A-D e 9A-D** as colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

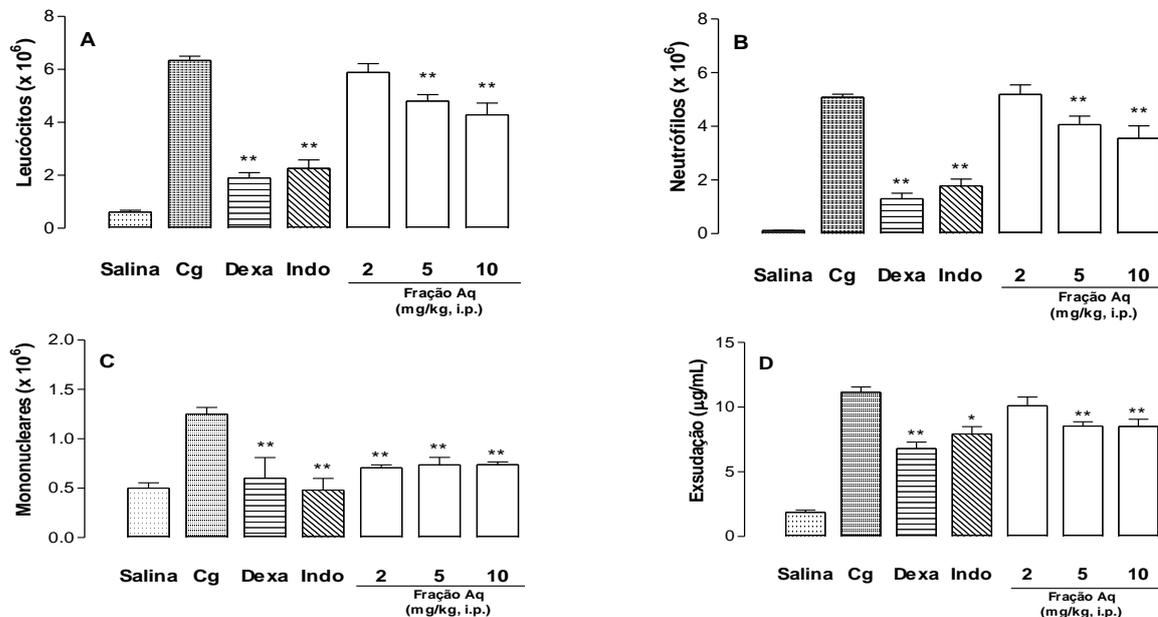


Figura 8. Efeito da fração aquosa (Aq) (2-10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração Aq sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

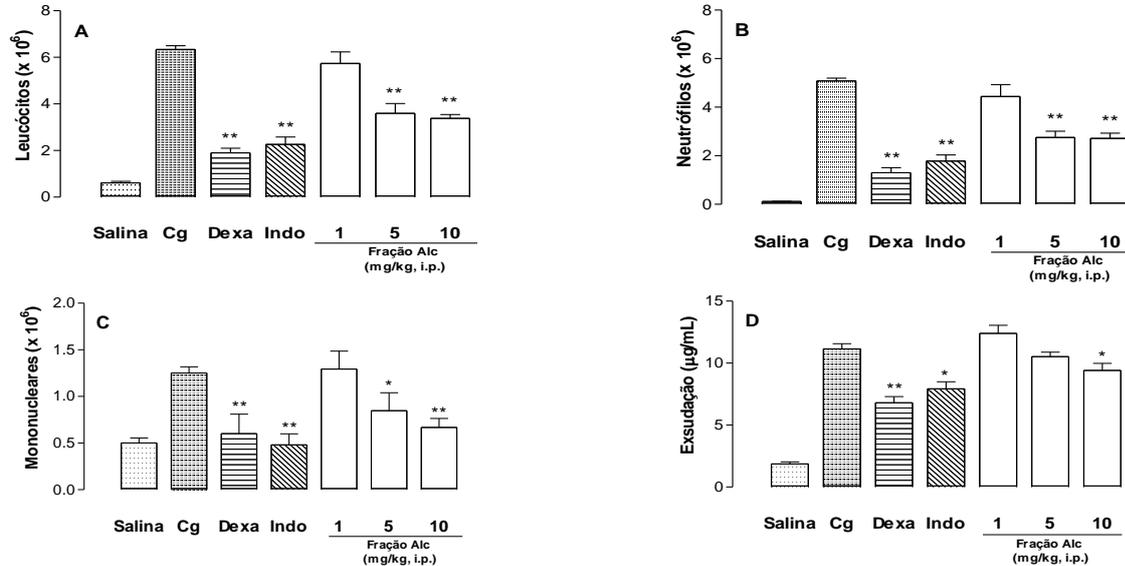


Figura 9. Efeito da fração rica em alcaloides (FRA) (1-10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. Efeito da fração Alc sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina: animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl., Cg: animais tratados somente com carragenina (1%, i.pl.), Dexa: animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo: animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de Student), N: 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Como esperado, os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, inibiram significativamente a migração de leucócitos (dexa (0,5 mg/kg, i.p): $70,0 \pm 5,6\%$ e indo (5,0 mg/kg, i.p.): $64,4 \pm 5,0\%$), de neutrófilos (dexa: $74,4 \pm 7,5\%$ e indo: $65,0 \pm 8,3\%$), de mononucleares (dexa: $52,0 \pm 6,5\%$ e indo: $61,6 \pm 8,6\%$), bem como a exsudação (dexa: $39,0 \pm 9,5\%$ e indo: $28,8 \pm 7,8\%$) ($P < 0,05$) (**Figuras 6 a 9**).

O estudo da curva dose-resposta demonstrou que as melhores doses do EB e frações que inibiram os parâmetros inflamatórios estudados foram as seguintes: 25 mg/kg para o EB, 50 mg/kg para a fração Hex, 50 mg/kg para a fração AcOEt, 5 ou 10 mg/kg para a fração Aq, 10 mg/kg para a FRA. Além disso, a análise da curva tempo-resposta demonstrou que o EB foi eficaz em inibir os parâmetros inflamatórios somente quando administrado 0,5 h antes da injeção da carragenina, sendo este resultado utilizado como parâmetro para as frações.

6. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A cromatografia em camada delgada do EB da espécie *E. leiocarpa* empregando n-hexano, acetona e NH_4OH (60:40:1) como eluente exibiu teste positivo frente ao reagente Dragendorff, através do aparecimento da coloração laranja das respectivas bandas de eluição (**Figura 10**) evidenciando a presença de compostos alcaloídicos nesta espécie. Em seguida procedeu-se ao particionamento ácido-base do extrato bruto, originando uma fração rica em alcaloides FRA.

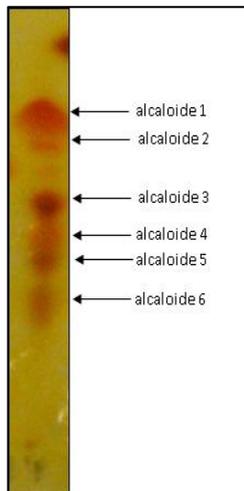


Figura 10. CCD do EB indicando a presença de alcaloides

Conforme os resultados obtidos nos ensaios de atividade anti-inflamatória no modelo da pleurisia induzida pela carragenina as frações aquosa (FrAq) e a rica em alcaloides (FRA) apresentaram os melhores resultados, sendo assim estas passaram a ser o foco da investigação fitoquímica.

Após o fracionamento do extrato bruto originaram-se as frações solúveis em hexano (FrHex), acetato de etila (FrAcOEt) e fração aquosa (FrAq). A fração rica em alcaloides (FrA) foi obtida por extração ácido-base do EB. Essas foram submetidas às análises por eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A princípio o método analítico desenvolvido buscou a obtenção do perfil cromatográfico que demonstrasse uma separação eficiente dos constituintes presentes no EB e frações. Posteriormente, foi empregada a cromatografia semipreparativa com a finalidade de isolar os compostos. Os compostos isolados foram submetidos para análises espectrométricas (IV, RMN, EM), para elucidação estrutural.

7.1. Fracionamento cromatográfico FRA e FrAq

O fracionamento biomonitorado destacou as frações Fr Aq e a FRA como mais ativas frente ao ensaio anti-inflamatório, sendo assim estas passaram a ser objetivo da investigação fitoquímica. Inicialmente, as frações foram submetidas à cromatografia em coluna utilizando como eluente a mistura dos solventes hexano/acetona com 1 % de amônia, no modo gradiente crescente de polaridade.

7.2. Análise cromatográfica da fração FRA

A separação cromatográfica da fração rica em alcaloides FRA resultou em 64 frações, as quais foram reunidas conforme suas semelhanças através de análise em cromatografia de camada delgada (**Figura 11**). Segundo o **fluxograma 2** pode-se observar o isolamento de cinco compostos numerados de acordo com a classe a que pertencem (comp. **1 – 3** alcaloides/ comp. **6 e 7** fitoesteróis).

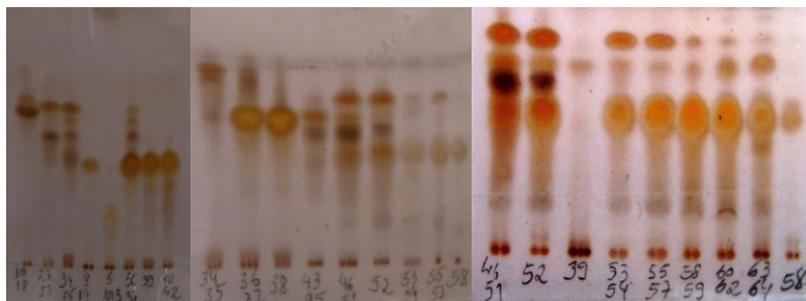


Figura 11. Bandas em CCD reveladas em sulfato cérico

Os compostos foram visualizados sob luzes visível e ultra-violeta longo (365 nm) e curto (254 nm), apresentando intensa fluorescência 254 nm, conforme a **Figura 12**. A seguir, as placas de sílica-gel, secas, foram mergulhadas nos reativos Dragendorff e sulfato cérico, o primeiro revelador para detectar alcaloides (manchas laranjas) e o segundo específico para alcaloides indólicos (manchas amarelas).

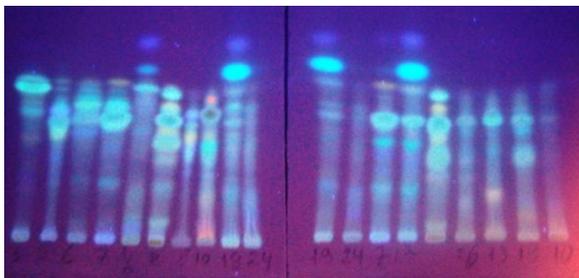


Figura 12. Manchas que apresentaram fluorescência

O composto **1** foi isolado a partir das frações 36 e 42, apresentando-se na forma de cristais brancos bem definidos, e quando revelado em reagente Dragendorff, mostrou manchas laranjas, características de alcaloides. O composto **2** foi obtido através da cromatografia em coluna flash das frações 53 e 54, originando 30 frações nas quais as Fr 26 – 30 apresentaram resultados positivos frente ao reagente Dragendorff (**Figura 13**), confirmando a presença de um alcaloide de maior polaridade. O composto **3** foi obtido a partir da cromatografia das frações 23 a 33, onde das 12 frações separadas, as que apresentaram resultados positivos com reagente Dragendorff, foram as **7** e **8**.

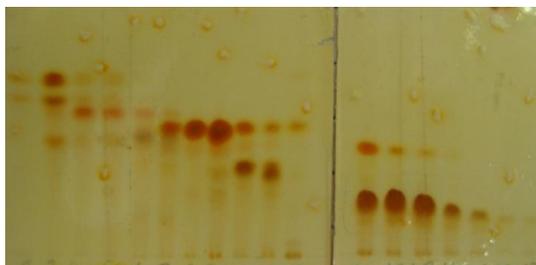
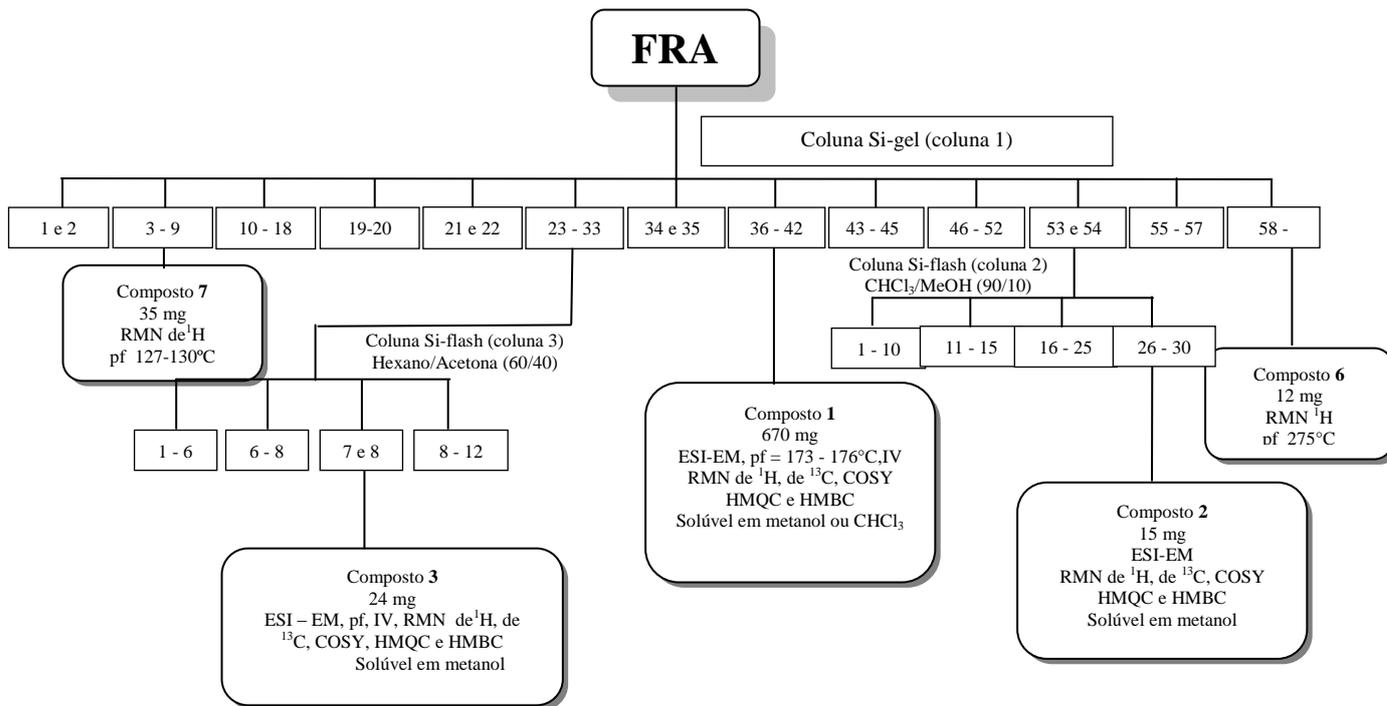


Figura 13. Cromatografia em camada delgada revelada em Dragendorff

Os compostos **6** e **7** foram isolados das frações 3 – 9 e das frações 56 e 57, respectivamente. Estes compostos não reagiram ao teste com o reagente Dragendorff. No entanto, na presença do reagente sulfato cérico apresentaram manchas de coloração escura típicas de compostos

esteroidais. Todos os compostos foram submetidos a análises de ponto de fusão e espectrométricas. Os dados de RMN de ^1H do composto **6** foram comparados com os encontrados na literatura (Jácome, Oliveira et al. 2004) confirmando a presença do estigmasterol. O composto **7** foi confirmado através da comparação de dados de ^{13}C do composto β -sitosterol glicosilado, isolado a partir da espécie da *Satureja khuzistanica* em um trabalho realizado por Moghaddam e colaboradores (Moghaddam, Farimani et al. 2007).

Fluxograma 2. Separação cromatográfica da Fração Rica em Alcaloides (FRA)



7.2.1. Análise cromatográfica da fração FrAq

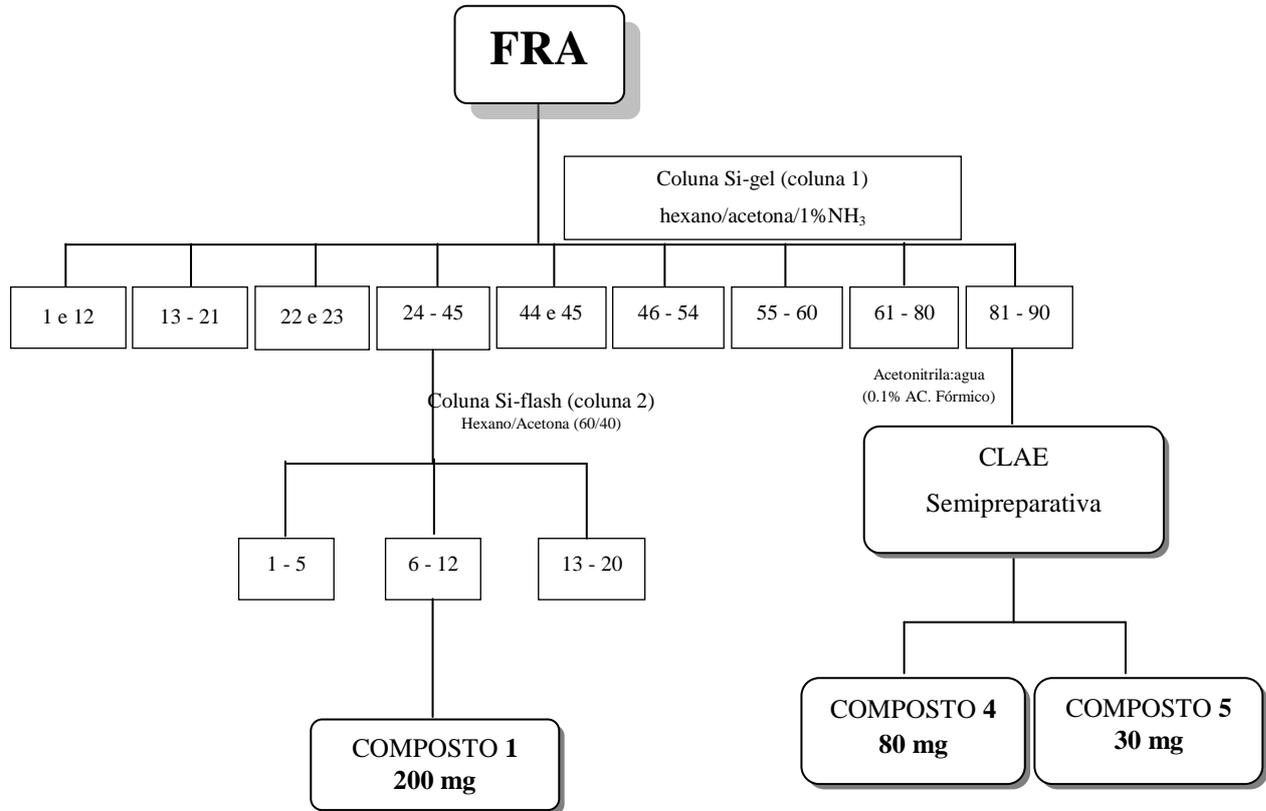
A separação cromatográfica da fração FrAq em coluna de sílica gel (70-230 mesh) foi desenvolvida partindo de 68 g de massa seca, utilizando mistura de solvente hexano/acetona 50:50 com 1% de amônia, como eluente inicial. A força do eluente foi aumentada gradativamente. Foram coletadas 90 frações as quais foram reunidas conforme perfil em CCD (**Fluxograma 3**).

As frações 24 a 45 foram reunidas e recromatografadas em coluna flash com eluente acetona/hexano 40:60, obtendo-se 20 frações. As frações 6 a 12 foram analisadas em CCD e se utilizou como padrão o composto **1** para fins comparativos, onde se observou a semelhança entre os perfis cromatográficos

As análises em CCD das frações mais polares demonstraram uma baixa resolução, evidenciando que não seria possível uma separação em cromatografia usando sílica como fase estacionária, pois os compostos de maior polaridade permanecem retidos. Sendo assim, foi necessário o emprego de cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa (C18) onde se utilizou como fase móvel A (água ultra pura com 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico), e a detecção dos compostos foi a 280 nm. Anterior à separação, foram efetuadas análises prévias no método analítico, em coluna C₁₈, para se determinar as condições ótimas para o procedimento semipreparativo. O resultado foi a observação de dois compostos majoritários com tempos de retenção de 26.7 e 34.1 min, condição adequada para o sistema semi preparativo.

A purificação em CLAE semi preparativa deu origem a dois compostos, **4** e **5**, um deles inédito, ambos possuindo como estrutura básica o núcleo indólico característico dos alcaloides presentes na espécie e ambos glicosilados, o que explica a dificuldade em separação por coluna de sílica. Os compostos (**1-7**) foram elucidados através de técnicas de espectrometria de massas, IV, RMN de ¹H e ¹³C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, comparação dos dados obtidos com os da literatura e também com base na rota biossintética dos alcaloides indólicos.

Fluxograma 3: Separação cromatografia da Fração Aquosa (FrAq)



8. ELETROFORESE CAPILAR DO EB, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO A PARTIR DA ESPÉCIE *Esenbeckia leiocarpa* ENGL.

A eletroforese capilar é uma técnica analítica vantajosa para separação de muitos compostos em análise fitoquímica, principalmente porque possibilita a análise de extratos brutos sem pré-purificação ou separação dos compostos ativos, fornecendo vantagens em termos de velocidade, alta eficiência, baixo custo e simplicidade, sobretudo, no emprego de pequenas quantidades de eletrólito e amostra, baixo consumo de solventes e consequentemente produzindo pequenas quantidades de resíduos (Feng and Li 2002).

Em geral, os alcaloides são compostos que podem ser separados utilizando um eletrólito com pH baixo, visto que estes são facilmente protonados, formando espécies com cargas positivas (Leena 2002), os quais migram e são detectados antes do sinal do fluxo eletro-osmótico. Baseado neste fato, a eletroforese capilar foi utilizada com o intuito de traçar um perfil dos constituintes alcaloídicos presentes no EB e frações, além de quantificar o alcaloide indólico dihidrocorinanteol, este já havia sido evidenciado por cromatografia em camada delgada (CCD).

A **Figura 14** descreve os eletroferogramas do EB e frações a partir da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. por meio da análise de eletroforese capilar, onde apresentou sinais característicos de compostos nitrogenados confirmados através da presença de padrão interno, benzilamina com detecção em 215 nm. E sendo assim, foi possível identificar o alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) nas seguintes proporções: EB (8,54%) (**Figura 14A, Tabela 4**), fração Hex (0,067%) (**Figura 14B, Tabela 4**), fração AcOEt (14,11%) (**Figura 14C, Tabela 4**), fração Aq (1,1%) (**Figura 14D, Tabela 4**), fração FRA (23,83%) (**Figura 14E, Tabela 4**).

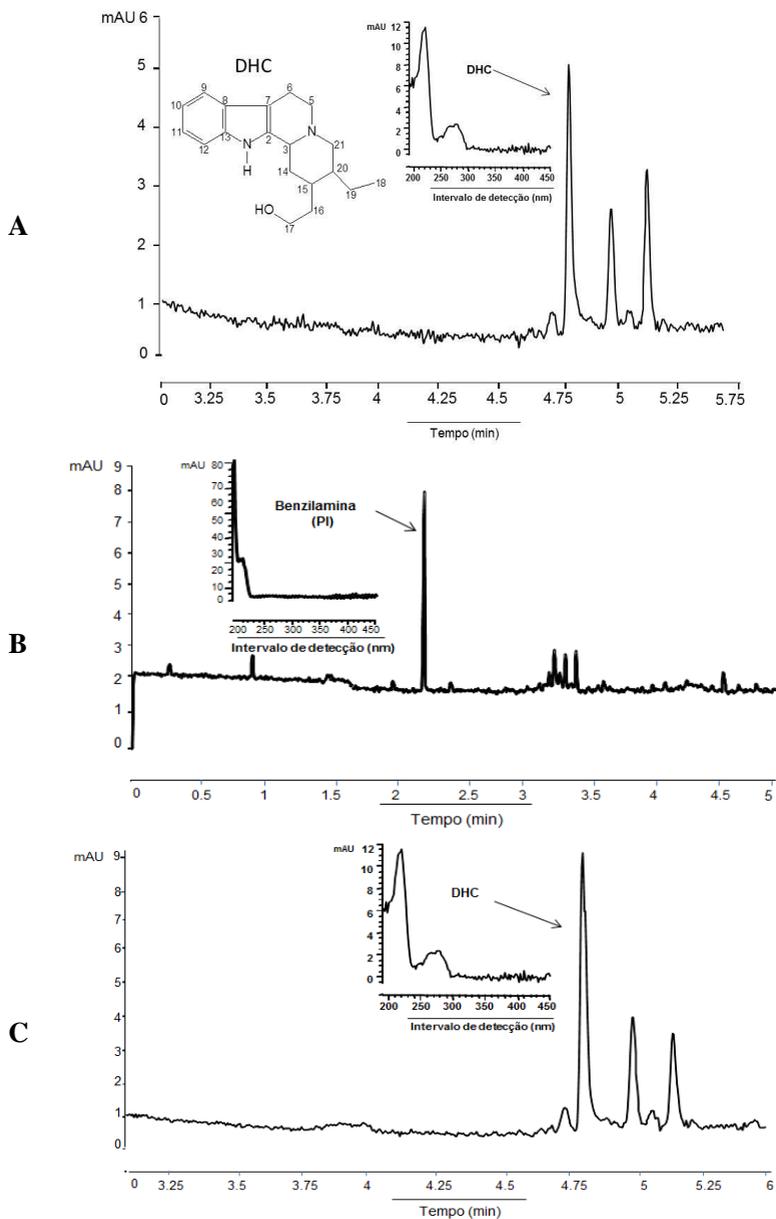
O estudo guiado por separação biomonitorada sugere que a presença dos alcaloides no EB (**Figura 14 A**) e nas frações AcOEt (**Figura 14 C**), Aq (**Figura 14 D**) e FRA (**Figura 14 E**) estejam atuando nos processos anti-inflamatórios em camundongos, entretanto a FrHex (**Figura 14 B**) não apresentou atividade. As frações FRA e FrAq foram

as que apresentaram melhores resultados na atividade farmacológica. Os eletroferogramas (**Figura 14 D e E**) das frações mais ativas apresentam perfis distintos: a **Figura 14 E** (FRA) demonstra a predominância do alcaloide dihidrocorinanteol (23,83%) e no **D** (FrAq) há a predominância de cinco substâncias, com espectro de UV semelhante ao do di-hidrocorinanteol, sugerindo a presença de alcaloides com estruturas semelhantes, porém de maior polaridade. Os resultados da ação anti-inflamatória da FrAq sugere ação sinérgica dos cinco compostos presentes, potencializando a atividade biológica. No entanto, a FRA indica que o alcaloide presente em maior quantidade pode ser o responsável pela ação anti-inflamatória. Estes resultados evidenciam a importância das investigações fitoquímicas tanto para determinação e caracterização dos constituintes, quanto para os ensaios biológicos. A tabela 4 mostra as porcentagens do DHC presente nas frações e extrato bruto.

Tabela 4. Concentração do DHC no EB e frações isoladas das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl

Extratos	DHC (% m/m)	DPR
Extrato bruto (EB)	8,54	1,14
Fração n-hexano (Hex)	0,067	4,70
Fração acetato de etila (AcOEt)	14,11	3,17
Fração aquosa (AQ)	1,10	2,54
Fração rica em alcalóide (FRA)	23,83	1,24

DHC: di-hidrocorinanteol, DPR: desvio padrão relativo.



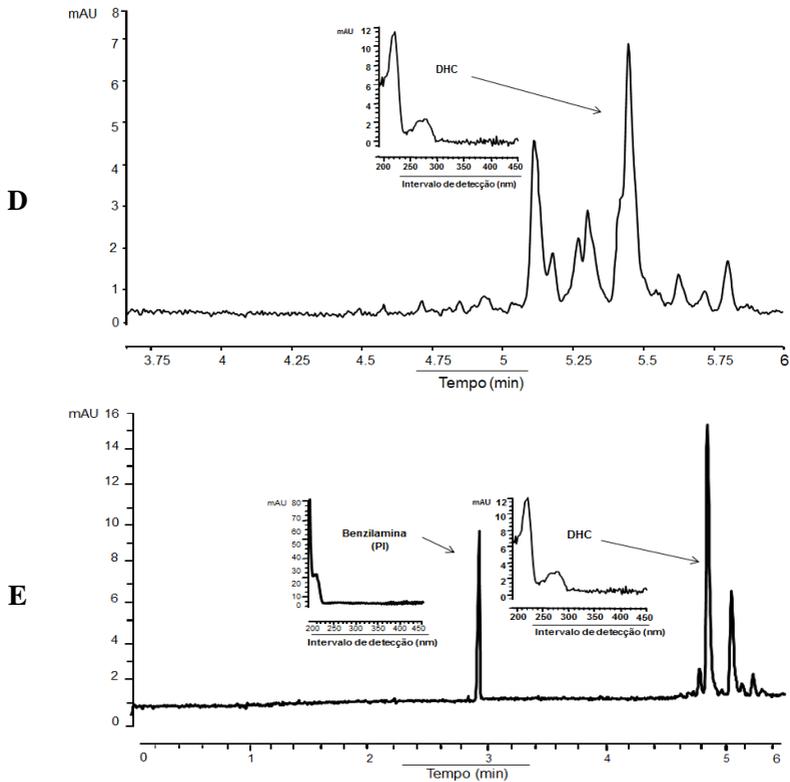


Figura 14 (continuação): Perfil eletroforético e detecção do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) no EB (A), FrHex (com padrão interno) (B); Fr ACOEt (C); FRAq (D), FRA (com adição de padrão interno) (E) em $\lambda = 280$ nm

9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise em CLAE teve o objetivo não somente de traçar o perfil cromatográfico, mas também o de encontrar uma metodologia eficaz e capaz de isolar os compostos majoritários presentes nas frações oriundas da espécie *E. leiocarpa*.

As análises de alcaloides em CLAE são amplamente discutidas na literatura (Cardoso-Lopes, Maier et al. 2010; Du, Ren et al. 2011; Mbeunkui, Grace et al. 2012), nas quais se empregam metodologias capazes de isolar compostos de estruturas moleculares e polaridades semelhantes conforme descrito por Cardoso-Lopes et al, onde os autores isolaram, a partir das folhas da espécie *E. leiocarpa*, isômeros constitucionais cocusagenina [4] e esquimiamina [5] (**Tabela 2**).

As primeiras análises em CLAE do extrato bruto EB e frações serviram para traçar um perfil cromatográfico e detectar compostos majoritários. O cromatograma do extrato bruto (**Figura 15**) apresenta dois picos de maior intensidade em comprimento de onda 280 nm e tempo de retenção de 25,8 min para o de maior concentração e de 34,3 min para o segundo. A fração acetato de etila Fr AcOEt (**Figura 16**) apresenta uma boa resolução com picos com tempo de retenção 6,5, 13,3, 18,9, 23,8, 24,9, 28,6 e 33,7 min. sendo o de maior intensidade o de 28,6 min. e o de menor 24,9 min. Os dados cromatográficos da FRA (**Figura 17**) demonstram a presença de picos com tempo de retenção entre 23 e 30 min. sendo o pico em 23,7 min o de maior intensidade. O cromatograma da fração aquosa FrAq (**Figura 18**) apresenta um perfil semelhante ao do EB, no qual se percebe a presença de picos de alta intensidade em tempo de retenção 25,6 e 34,1 min.

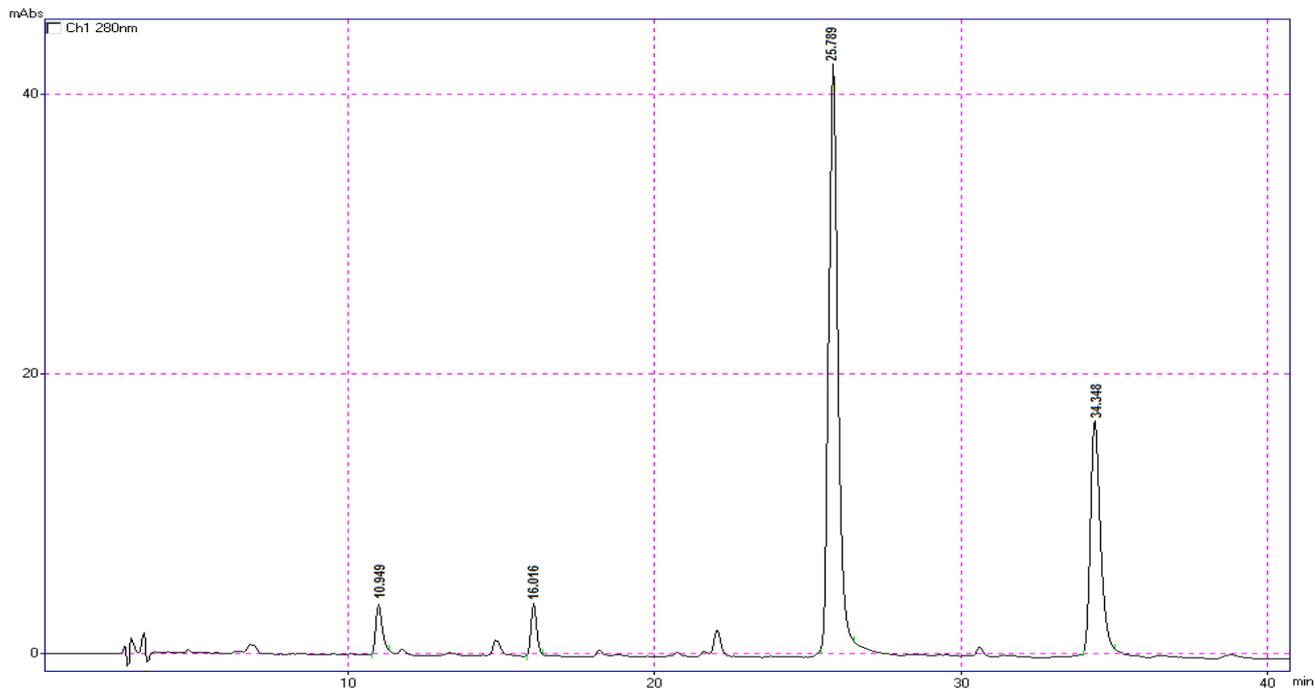


Figura 15. Cromatograma do extrato bruto EB isolado a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa*

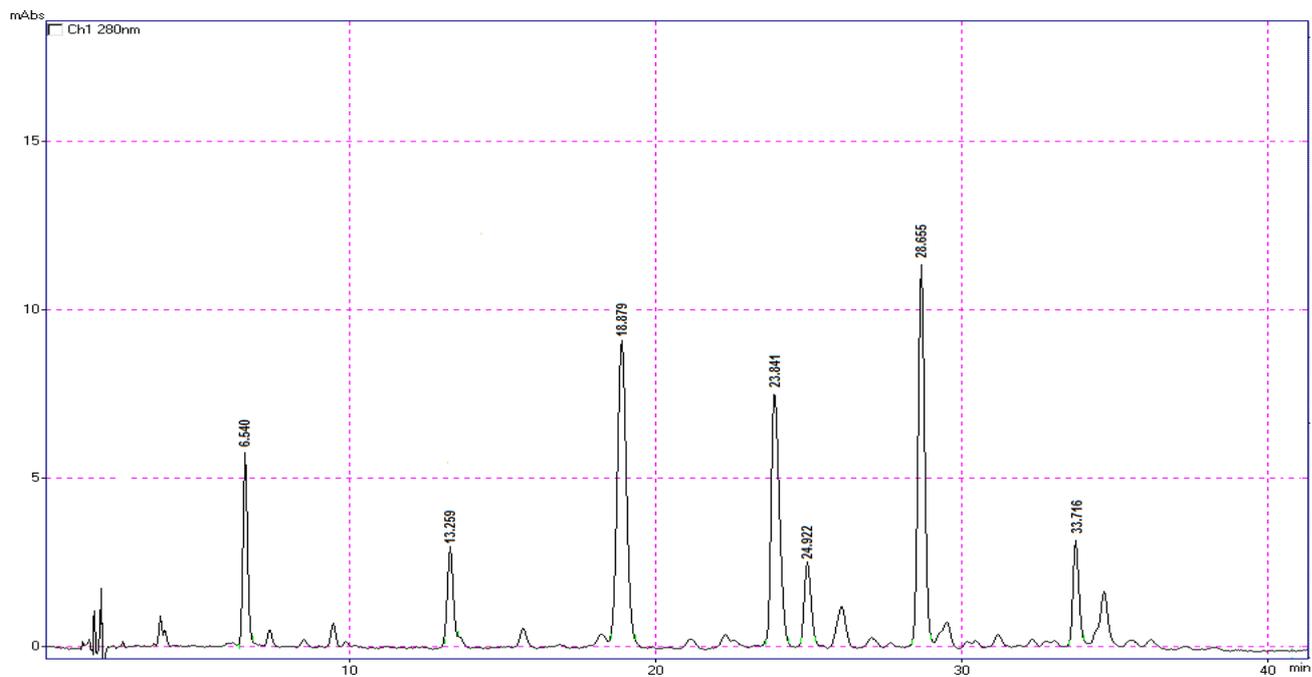


Figura 16. Cromatograma da fração acetato de etila (FrAcOEt) isolada a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa*

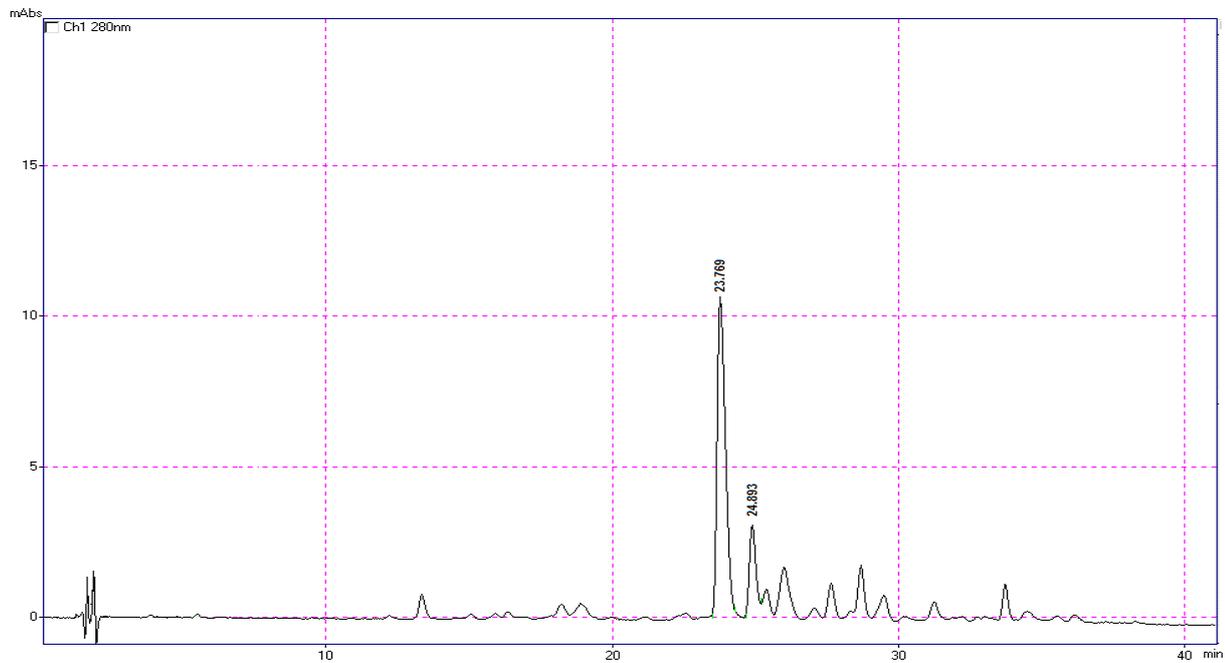


Figura 17. Cromatograma da fração rica em alcaloides (FRA) isolada a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa*

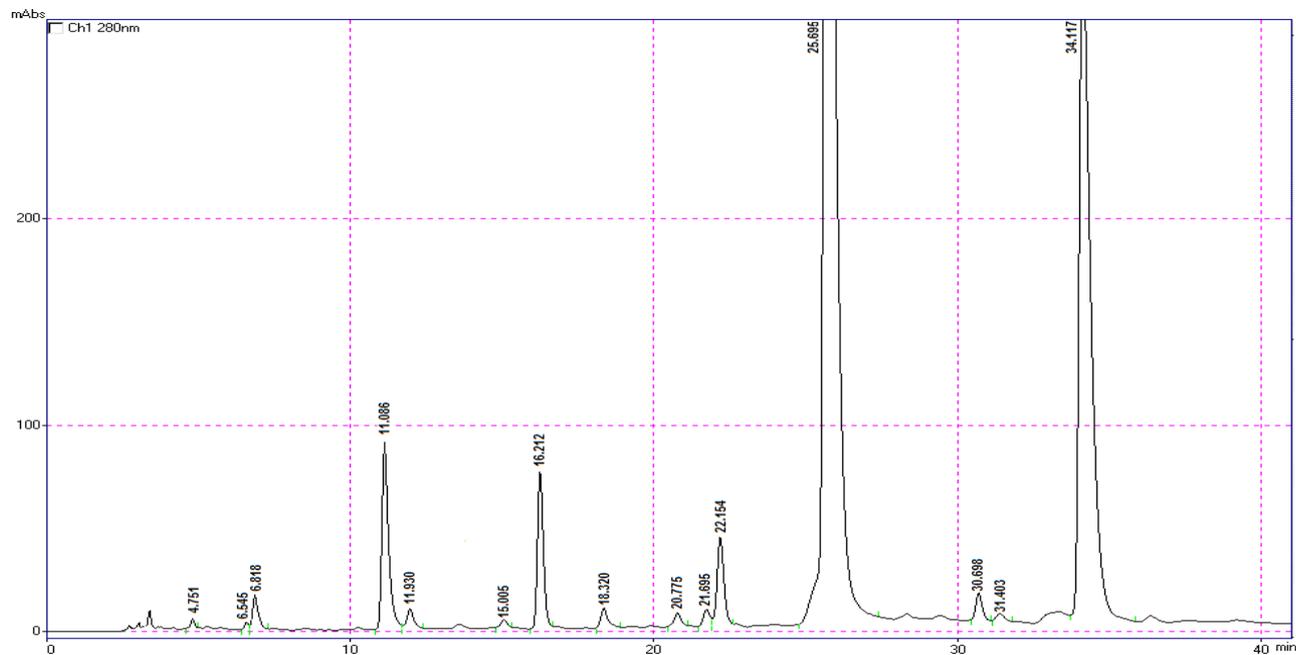


Figura 18. Cromatograma da fração aquosa (FrAq) isolada a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa*

Estabelecendo uma relação com a atividade apresentada, percebe-se que a fração rica em alcaloides (FRA) possui um comportamento cromatográfico distinto das outras frações e, sobretudo observa-se a presença de uma substância majoritária com tempo de retenção de 23,8 minutos para o composto majoritário. Podemos supor que o responsável pela ação anti-inflamatória seja este componente em maior concentração, ou por outro lado pode-se sugerir uma potencialização da atividade em virtude do efeito sinérgico de outras substâncias presentes nesta fração. Enquanto isso, a fração aquosa FrAq apresentou dois compostos majoritários com diferentes tempos de retenção, de 25,7 e 34,1 min, indicando que a ação anti-inflamatória obtida está relacionada a esses dois compostos mais polares que estão presentes no extrato bruto.

10. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Composto 1

Os fracionamentos cromatográficos das frações FRA e FrAq resultaram em 670 e 200 mg do composto **1**, respectivamente. Este se apresenta sob a forma de cristais incolores com ponto de fusão na faixa de 173 – 176 °C. O espectro de infravermelho (IV) (**Anexo, Figura 34**) indica a presença de estiramentos para os grupos O—H e N—H com absorção em 3410 e 3258 cm^{-1} , respectivamente. A absorção em 1452 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial da ligação N—H, e em 1622 cm^{-1} é característica de C—C sp^2 conjugados. A banda de absorção intensa e fina em 740 cm^{-1} evidencia a presença de anel aromático 1,2-dissubstituído (Hesse, Meier et al. 1991).

A análise de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-EM) do composto **1** (**Anexo, Figura 35**) em modo positivo contribuiu para elucidar esta estrutura alcaloídica permitindo a identificação do íon quasi-molecular $[\text{M}+1]^+$ m/z 299,1 através da detecção da molécula protonada. O fragmento mais abundante corresponde ao íon com massa de 144 que sugere a quebra das ligações C13—N1H, C2—C7, C3—N4 e C20—C21, conforme mostrado na **Figura 19**.

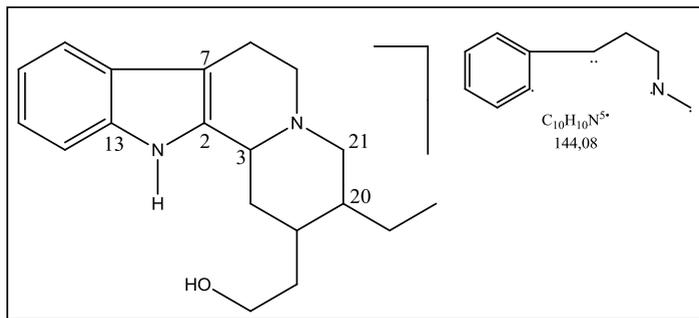


Figura 19. Proposta de fragmentação do ion quasi-molecular do composto 1

A partir dos dados de RMN do composto **1** (**Anexo Figura 34-41**) foi possível propor a elucidação da estrutura de um alcaloide com núcleo indólico. O espectro de RMN de ^{13}C informa que o composto possui 19 carbonos, apresentando onze sinais na região de 10 a 65 ppm e oito sinais de carbonos desblindados. Através da análise de RMN de DEPT 135 (**Anexo Figura 38**) pôde-se observar todos os carbonos protonados, onde se destaca a presença de um sinal para metila (C18) em δ_{C} 10,96 ppm; de sete carbonos metilênicos (CH_2) dos quais, dois ligados ao átomo de nitrogênio N4 com δ_{C} 53,04 (C5); 60,09 (C21) e um CH_2 carbinólico (C17) em δ_{C} 60,33 ppm; três sinais de carbonos metínicos (CH) na região de alta frequência com respectivos deslocamentos δ_{C} 37,21; 41,57 e 59,82 ppm, estes atribuídos aos átomos de carbono C15, C20 e C3, este o mais desblindado ligado ao nitrogênio N4; quatro carbonos metínicos (CH) na região de baixa frequência atribuídos aos átomos de carbonos hidrogenados aromáticos e finalmente a presença de quatro carbonos quaternários na região de δ_{C} 107 a 137 ppm, que foram atribuídos aos átomos de carbonos do sistema indólico. Estas atribuições foram comparadas e se mostraram coerentes com os dados encontrados na literatura (**Tabela 5**).

O espectro de RMN de ^1H (**Anexo Figura 36**) mostra um grupo de sinais características do sistema indólico, constituído de um anel aromático orto-substituído com sinais na forma de um par de dupletos

centrados em δ_{H} 7,50 e 7,31 ppm com constante de acoplamento $J_{9,12} = 8,00$ Hz atribuídos aos átomos de hidrogênios ligados aos átomos de carbono C9 e C12, também pôde-se observar dois duplo dupletos centrados em δ_{H} 7,10 e 7,14 ppm atribuídos aos átomos de hidrogênios ligados aos átomos de carbonos C10 e C11. Os deslocamentos químicos dos respectivos carbonos C9, C10, C11 e C12 são δ_{C} 118,01; 119,15; 121,07 e 110,83 ppm. O deslocamento químico do C12 é justificado pelo efeito mesomérico do nitrogênio N1, tornando esse carbono mais blindado do que o esperado (**Anexo Figura 37**). Todos os átomos de carbonos distantes três ligações do NH (δ_{H} 7,96 ppm) apresentam acoplamento 3J intenso no mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (**Anexo Figura 41**).

A análise dos experimentos de correlação heteronuclear (HMQC e HMBC **Anexo Figura 40 e 41**) permitiu a completa atribuição dos deslocamentos químicos para os átomos de hidrogênio e carbono, conforme demonstrado na **Tabela 5**.

A representação das correlações heteronucleares (HMBC **Figura 20**) mostra que o átomo de carbono C8 (δ_{C} 127,33 ppm) possui acoplamento (3J) intenso com os átomos de hidrogênio δ_{H} 7,10; 7,31; 7,50 e 7,96 ppm ligados aos átomos C10, C12, C9 e N1, respectivamente. O átomo de carbono C13 (δ_{C} 136,09 ppm) apresenta acoplamento a longa distância com os átomos de hidrogênios δ_{H} 7,14 e 7,50 ligados aos átomos C11 e C9, respectivamente. O sinal em δ_{C} 107,66 ppm atribuído ao carbono quaternário C7, apresenta acoplamento a longa distância com os átomos de hidrogênio δ_{H} 7,50 ppm do carbono C9, δ_{H} 7,96 ppm do NH e com os átomos de hidrogênios em δ_{H} 3,00 e 3,09 ppm dos átomos dos carbonos C6 e C5, respectivamente. O carbono C2 δ_{C} 135 ppm apresenta acoplamento a longa distância com os átomos de hidrogênios δ_{H} 2,75 e 3,00 ppm do carbono C6 (δ_{C} 21,60 ppm).

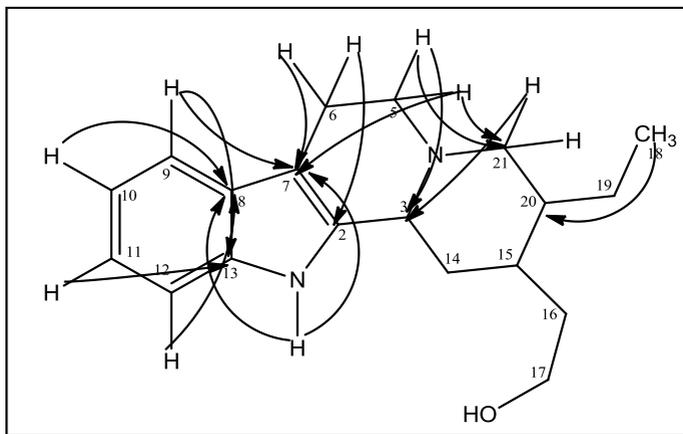


Figura 20. Representação das correlações heteronuclear (HMBC)

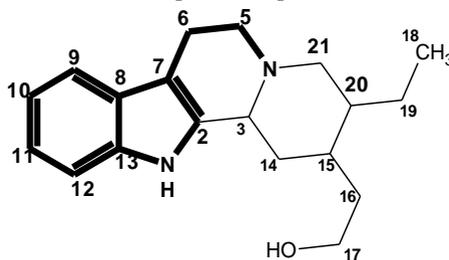
Analisando o mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (Anexo Figura 39) observa-se um sistema de spin correspondente ao acoplamento entre os átomos de hidrogênios dos carbonos C6 e C5 indicando a presença do fragmento $-CCH_2-CH_2N-$. O átomo de hidrogênio do C3 com deslocamento químico em δ_H 3,09 ppm apresenta acoplamento com hidrogênio em δ_H 2,19 e 1,33 ppm indicando a presença de ligação entre $N-C_3-CH_2-$. A presença de um tripleto em δ_H 0,93 ppm (3H- C18) acoplado com os átomos de hidrogênios do C19 cujo deslocamento químico são δ_H 1,68 e 1,14 ppm e $J_{18,19} = 7,1$ Hz sugere a presença de um fragmento etil ligado ao carbono C20. Este dado pôde ser confirmado através do acoplamento a longa distância (3J) do carbono C20 em δ_C 41,57 ppm com hidrogênio em δ_H 0,93 ppm do carbono C18 (CH_3). Os átomos de hidrogênios do carbono C17 possuem deslocamento de δ_H 3,72 ppm, e a análise do COSY demonstra um acoplamento intenso com os átomos de hidrogênios sinais em δ_H 1,95 e 1,33 ppm atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono C16 δ_C 35,41 ppm. Outra informação a respeito do átomo de hidrogênio em δ_H 1,95 ppm (C16) é que este acopla com um átomo de hidrogênio do carbono C15 cujo deslocamento químico é de δ_H 1,44 ppm. Os átomos de hidrogênio com deslocamento em δ_H 2,19 e 3,10 ppm são atribuídos ao átomo de carbono C21 com

deslocamento químico de 60,09 ppm, estes átomos de hidrogênios por sua vez exibem somente acoplamento vicinal, sugerindo que os ângulos entre os átomos de hidrogênios do C21 (CH₂) e C20 (CH) é de aproximadamente 90°. Segundo o diagrama de Karplus, quando a curva apresenta um $^3J = 0$ o ângulo entre os átomos de hidrogênios vicinais é de 90° (Hesse, Meier et al. 1991).

Os dados obtidos a partir das análises de espectrometria de RMN foram comparados com os trabalhos realizados por Robert e Verpoorte, que descrevem o isolamento do DHC a partir da espécie *Aspidosperma marcgravianum* (Verpoorte, Ruigrok et al. 1982; Robert, Ahond et al. 1983). Apesar de ter a estrutura elucidada e confirmada através da literatura, não foi possível chegar a uma configuração exata da estrutura, podendo apenas determinar que o composto **1** trata-se de um alcaloide indólico denominado di-hidrocorinanteol DHC de fórmula molecular C₁₉H₂₆N₂O de massa molecular 298,42. Esses dados corroboram com os obtidos através da análise de espectrometria de massa.

A estrutura proposta está de acordo com a rota biossintética dos alcaloides indólicos, onde o núcleo indólico é proveniente da tripitilamina fragmento constituído de 10 átomos de carbonos fragmento destacado demonstrado na (TABELA 5), e o outro fragmento constituídos de 9 átomos de carbonos que é de origem terpenoidal, produto de rearranjo e descarboxilação da secologanina (Dewick 2002).

Tabela 5. Dados de espectrometria de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para o composto [1]



Nº	δ_{C} ppm	^1H - ^{13}C -HMQC- $^1J_{\text{CH}}$ ppm	DEPT 135	H-H COSY	^1H - ^{13}C - HMBC- $^3J_{\text{CH}}$
C18	10,96	0,93 t	CH ₃	1,14 1,68	1,14 1,68
C6	21,60	2,75 3,00	CH ₂	2,75 – 3,00 3,00 – 2,58	2,58 3,09
C19	23,40	1,14 m 1,68 m	CH ₂	1,68 – 0,93 1,68 – 1,14	0,93
C14	35,23	1,33 2,19	CH ₂	1,33 – 2,19 1,33 – 3,09 2,19 – 3,09	2,00 3,09
C16	35,41	1,33 1,95	CH ₂	1,33 – 1,95 1,95 – 1,44	3,72
C15	37,21	1,44	CH	1,95	1,33 1,50 1,95 2,19 3,09 3,72 0,93
C20	41,57	1,50	CH	-	1,14 1,95 2,19 3,10
C5	53,04	2,58 3,09	CH ₂	2,58 – 2,75 2,58 – 3,00 2,58 – 3,09	2,19 3,00 3,10
C3	59,82	3,09	CH	1,95 2,19	1,33 2,19 2,58 3,09
C21	60,09	3,10 2,19	CH ₂	3,10 – 2,19	2,58 3,09
C17	60,33	3,72 3,72	CH ₂	1,33 1,95	1,95

Tabela 5 (continuação). Dados de espectrometria de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para o composto [1]

Nº	δ_{C} ppm	^1H-^{13}C-HMQC-$^1J_{\text{CH}}$ ppm	DEPT 135	H-H COSY	^1H-^{13}C- HMBC-$^3J_{\text{CH}}$
					3,00
					3,09
C7	107,66	-	C	-	2,58
					2,75
					7,50
					7,96 (NH)
C12	110,83	7,31 d	CH	-	7,14
					7,50
C9	118,01	7,50 d	CH	-	7,14
					7,31
C10	119,15	7,10 dd	CH	-	7,31
C11	121,07	7,14 dd	CH	-	7,50
					7,10
C8	127,33	-	C	-	7,31
					7,50
					7,96 (NH)
C2	135,00	-	C	-	2,75
					3,00
C13	136,09	-	C	-	7,14
					7,50
					7,96 (NH)

Composto 3

O composto **3** foi isolado a partir da purificação em coluna flash das frações 23-33, rendendo 24 mg de um sólido amorfo marrom. Apresentou ponto de fusão na faixa de 148-150 °C. A análise em CCD exibiu um perfil cromatográfico de um composto menos polar quando comparado ao composto **1**. A espectrometria de massas com ionização por electrospray apresentou molécula protonada com $m/z = 340,9$ (**Anexo, Figura 43**) e um fragmento mais abundante de $m/z = 144,0$, semelhante ao observado para o composto **1** di-hidrocorinanteol. Destas análises preliminares, sobretudo, a diferença entre a massa do íon quasi-molecular do di-hidrocorinateol e do composto **3** apresenta um valor de 41,8 indicando a presença de um grupo acetil na molécula. Este dado pôde ser confirmado através de análise de IV (**Anexo, Figura 42**), onde se observou a presença de banda de alta intensidade em 1740 cm^{-1} referente ao estiramento de C=O. O espectro de IV do composto **3** também apresentou um perfil de absorção muito semelhante ao do composto **1** diferenciando-se apenas pela ausência de uma banda de alta intensidade na região de 3500 cm^{-1} referente ao estiramento de OH. Com intuito de elucidar a estrutura, utilizaram-se as técnicas de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 135, além de técnicas bidimensionais como COSY, HMQC e HMBC (**Anexo - Figuras 42 - 49**). Apesar do composto **3** apresentar menor polaridade que o di-hidrocorinanteol (composto **1**), foi necessário utilizar metanol deuterado nas análises, com a finalidade de obter boa resolução dos sinais no espectro de RMN e também para uma comparação mais fidedigna. Estes dados podem ser observados na **Tabela 6**.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Anexo Figura 45**) mostrou a presença de 21 átomos de carbono com deslocamentos químicos semelhantes aos do composto **1** (di-hidrocorinanteol DHC), diferenciando-se apenas pelos sinais referentes aos átomos de carbonos do grupo acetil de $\delta_{\text{C}} 21,07$ ppm característicos do CH_3 e $\delta_{\text{C}} 173,23$ ppm característicos do C=O.

Através da análise de RMN de ^1H (**Anexo Figura 44**) foi possível identificar a presença de um simpleto correspondente ao CH_3

do grupo acetil apresentando deslocamento químico em δ_{H} 2,06 ppm e com integral para 3 hidrogênios. Pôde-se também observar um sinal em δ_{H} 4,20 ppm na forma de multipletto, com integração para dois hidrogênios, correspondente aos dois átomos de hidrogênios do carbono C17. Este dado contribuiu na identificação do composto acetil di-hidrocorinanteol, visto que o perfil do espectro de RMN de ^1H foi semelhante ao do composto **1**.

A presença de um tripleto em δ_{H} 0,95 ppm com integração para 3 hidrogênios é atribuído aos átomos de hidrogênios da metila C18, com constante de $J_{18,19} = 7,4$ Hz, resultado do acoplamento com o grupo metileno C19 em δ_{H} 1,69 e 1,21 ppm como multipletto.

O hidrogênio δ_{H} 3,26 ppm ligado ao carbono C3 δ_{C} 61,69 ppm, apresenta-se como dupletto largo ($J = 11,3$ Hz, dl), esta multiplicidade (dl) indica a presença de uma constante de acoplamento de menor valor, $J \approx 2,0$ Hz, ou seja, este átomo de hidrogênio H3 acopla com os dois átomos de hidrogênios do grupo metileno C14 ($\delta_{\text{H}14\text{A}}$ 1,29 e $\delta_{\text{H}14\text{B}}$ 2,47 ppm). Através da análise do mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (**Anexo Figura 47**) observa-se o acoplamento intenso do átomo de H3 δ_{H} 3,26 ppm com o átomo de hidrogênio H14A δ_{H} 1,29 ppm, entretanto, não foi possível observar o acoplamento de menor valor. O átomo de hidrogênio $\delta_{\text{H}14\text{B}}$ 2,47 ppm apresenta-se como um duplo tripleto com constante de acoplamento $J_{\text{gem}(\text{H}_\text{A},\text{H}_\text{B})} = 13$ Hz. Com auxílio do programa de simulação de espectro de RMN de ^1H FOMSC3_rm foi possível simular os sistemas de spins dos átomos de hidrogênio H3 e H14B, no qual se obteve a $J_{\text{vic}(\text{H}_3,\text{H}14\text{B})} = 2,56$ Hz e $J_{(\text{H}14\text{B},\text{H}15)} \approx 4,00$ Hz, indicando um ângulo diedro entre os átomos de hidrogênios próximo a 60 ou 120°(Hesse, Meier et al. 1991).

Na região de δ_{H} 1,40 a 1,52 ppm, observa-se um multipletto de integral para três átomos de hidrogênios. Com auxílio da técnica HSQC (**Tabela 6**) (**Anexo Figura 48**) foi possível correlacionar os sinais destes hidrogênios com seus respectivos carbonos. O carbono metilênico C16, por exemplo, com deslocamento em δ_{C} 32,68 ppm possui um hidrogênio em δ_{H} 1,43, o átomo de carbono quiral C15 com deslocamento em δ_{C} 38,29 ppm tem um hidrogênio em δ_{H} 1,45 e o átomo de carbono quiral C20 com deslocamento químico de δ_{C} 42,73

ppm com hidrogênio em δ_{H} 1,48 ppm. Este último, demonstra acoplamento com hidrogênio em δ_{H} 3,09 e 2,16 ppm atribuídos ao átomo de carbono C21, cujo deslocamento é de δ_{C} 61,32 ppm. Com auxílio da técnica de COSY (**Anexo Figura 47**), pôde-se observar o acoplamento do átomo de hidrogênio δ_{H} 1,43 ppm ligado ao carbono C16 (δ_{C} 32,68 ppm) com os átomos de hidrogênios δ_{H} 4,20 ppm ligados ao carbono metilênico C17 (δ_{C} 63,68 ppm). Estes dados caracterizam o sistema cíclico C3—C14—C15—C20 e C21, contendo o fragmento ligado ao átomo de carbono C15 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCOCH}_3$ e o substituinte etil-(C20), o qual foi atribuído com auxílio da técnica HMBC.

No sistema de spin na faixa de δ_{H} 2,55 a 3,14 ppm percebe-se o acoplamento geminal do hidrogênio δ_{H5A} 2,63 ppm com o átomo de hidrogênio em δ_{H5B} 3,14 ppm ($J_{\text{HA,HB}} = 11,53$ Hz), o átomo de hidrogênio δ_{H5B} 3,14 ppm por sua vez, acopla com hidrogênio vicinal em δ_{H6A} 2,98 ppm e com $J_{\text{H5B,H6A}} = 4,69$ Hz. O hidrogênio em δ_{H6A} 2,98 ppm acopla com hidrogênio em δ_{H6B} 2,73 ppm. Estes hidrogênios são atribuídos aos carbonos C5 e C6.

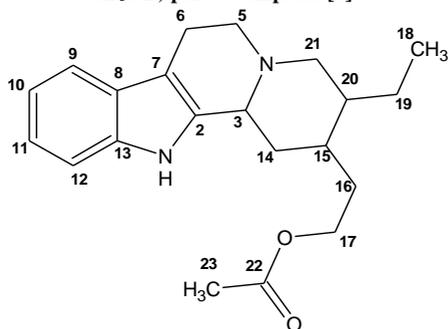
Para o sistema de spins de átomos de hidrogênios de anel aromático característico de alcaloides indólicos percebe-se sinais bem resolvidos na região de δ_{H} 6,90 a 7,45 ppm pertencentes aos átomos de carbonos C12 (δ_{C} 112,12), C9 (δ_{C} 118,74); C10 (δ_{C} 119,91); C11 (δ_{C} 122,11) (**Anexo Figura 45**). Os átomos do hidrogênio H9 δ_{H9} 7,38 ppm e H12 δ_{H} 7,29 ppm apresentam-se na forma de um par de dupletos com constante de acoplamento $J_{\text{H9,H10}} = 7,5$ Hz e $J_{\text{H12,H11}} = 7,8$ Hz. Observa-se ainda a presença de dois duplo dupletos: H10 δ_{H} 6,97 ppm ($J_{\text{orto}} = 7,5$ e $J_{\text{m}} = 1,0$ Hz) e H11 δ_{H} 7,04 ppm ($J_{\text{orto}} = 7,8$ e $J_{\text{m}} = 1,0$ Hz).

O emprego de metanol como solvente deuterado se mostrou mais eficiente para as análises de espectrometria de RMN, visto que os seus sinais apareceram bem resolvidos, possibilitando a determinação das constantes de acoplamento com mais segurança para este composto.

Não há registro na literatura do composto di-hidrocorinanteol acetilado de origem natural, no entanto a rota biossintética da maioria dos metabólitos secundários é iniciada pela acetil-CoA indicando que o

composto di-hidrocorinanteol pode reagir com a acetil-CoA levando à formação do composto acetilado.

Tabela 6. Dados de espectrometria de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) para o composto [3]



Nº	δ_{C} ppm	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC- $^1J_{\text{CH}}$ ppm	DEPT 135	H-H COSY	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC- $^3J_{\text{CH}}$
C18	11,32	0,95 t	CH ₃	1,21 1,69	1,69
C23	21,07	2,06 s	CH ₃	4,20	-
C6	22,43	2,98 dd 2,73 m	CH ₂	2,73 – 2,98	3,14
C19	24,54	1,69 m 1,21 m	CH ₂	1,69 – 1,21 0,95	0,95 (forte)
C16	32,68	1,43 m 2,07 m	CH ₂	1,44 – 1,44 1,29 2,16	-
C14	35,62	2,47 dd 1,29 m	CH ₂	2,47 – 1,29 1,29 – 1,48	-
C15	38,29	1,45 m	CH	1,29 4,20	1,44 1,48 1,49 2,16 3,09 (forte) 4,20 (fraco) 0,95 (forte)
C20	42,73	1,48 m	CH	-	1,21 2,16 3,09
C5	54,51	3,14 m 2,63	CH ₂	3,14 – 2,63 2,63 – 3,09 3,09 – 2,16	-
C21	61,32	3,09 m 2,16 dd	CH ₂	3,09 – 2,63 3,09 – 2,63 2,16 – 1,44	1,21 1,69 (forte)

Tabela 6. (continuação) Dados de espectrometria de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) para o composto [3]

Nº	δ_{C} ppm	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC- $^1J_{\text{CH}}$ ppm	DEPT 135	H-H COSY	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC- $^3J_{\text{CH}}$
C3	61,69	3,26 dd	CH	1,29	2,63 (forte) 3,14 (forte)
C17	63,68	4,20 m 4,20 m	CH_2	1,48 2,06	-
C7	107,85	-	C	-	2,73 (fraca) 3,14 (forte) 7,38 (fraca)
C12	112,12	7,29 d	CH	7,29 – 7,04	6,97 (forte)
C9	118,74	7,38 d	CH	7,38 – 6,97	7,04 (fraca)
C10	119,91	6,97 dd	CH	7,04 7,38	7,29 (forte)
C11	122,11	7,04 dd	CH	7,29 6,97	7,38 (forte)
C8	128,44	-	C	-	6,97 (forte) 7,29 (fraca)
C2	135,67	-	C	-	-
C13	138,22	-	C	-	7,04 (fraca) 7,38 (forte)
C22	173,23	-	C	-	2,06

Composto 2

A análise cromatográfica em CCD das frações 53 e 54 apresentou três manchas características de alcaloides depois de reveladas em Dragendorff. Na análise comparativa com o composto **1** pôde-se perceber que um dos compostos da mistura se tratava do dihidrocorinanteol DHC (composto **1**). A cromatografia em coluna flash levou à separação do composto **1** e do composto **2**, conforme pode-se observar no **Fluxograma 2 (Pág. 74)**. Este alcalóide foi isolado como um sólido amarelo, e submetido às análises espectrométricas (**Anexo Figura 50 - 57**).

No espectro de IV (**Anexo Figura 50**), percebe-se a presença de uma banda em 1730 cm^{-1} , característica de estiramento C=O, atribuída a um grupo éster que posteriormente foi confirmado através da técnica de RMN de ^{13}C . Outras bandas significativas no IV reportam a presença de estiramentos N—H e O—H na região de 3378 e 3200 cm^{-1} e absorções características de deformação axial dos carbonos aromáticos orto-substituídos revelada principalmente pelo pico de absorção de alta intensidade em 740 cm^{-1} . Na análise de espectrometria de massa (**Anexo Figura 51**) (ESI-MS) pode-se observar a presença do íon molecular protonado de razão massa carga m/z 371,1 sugerindo que o alcaloide apresenta uma massa molar de 370,1. Não se observa no espectro a presença de nenhum outro íon considerado significativo, sugerindo que a estrutura apresenta uma estabilidade maior que os outros, já que a energia de ionização é a mesma para todos os alcaloides.

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (**Anexo Figura 53 e 54**) observa-se a presença de oito CH, cinco CH_2 e um CH_3 . Estes sinais de carbono estão duplicados, o que pode estar sugerindo a presença de uma mistura de possíveis isômeros ou de um equilíbrio conformacional na molécula.

No espectro de RMN de ^1H (**Anexo Figura 52**) pôde-se perceber com mais nitidez a presença de uma mistura isomérica ou de um possível equilíbrio conformacional em virtude de alguns sinais apresentarem a mesma multiplicidade, no entanto, com deslocamentos

químicos diferentes (**Tabela 7**) numa proporção de 67:33 que de agora em diante denominaremos de **2a** e **2b**, respectivamente.

O sinal em 1,69 ppm do composto majoritário (**2a**) com integração de 3 hidrogênios, juntamente com o de menor intensidade em 1,79 ppm (**2b**), ambos na forma de duplo duplete, foi atribuído ao grupo metila (CH₃), que no espectro de RMN de ¹³C pode ser observado em 13,98 ppm para **2a** e δ_C 14,20 para **2b**. As constantes de acoplamento do referido duplo duplete, são de $J_{vicinal} = 7,0$ Hz e um acoplamento a longa distância de $J = 1,3$ Hz. Com auxílio da técnica de COSY foi possível identificar com qual sistema de spin o grupo metil possui acoplamento a longa distância, visto que a presença de um acoplamento forte com hidrogênio da dupla em δ_H 5,75 ppm para composto **2a** e δ_H 5,87 ppm para **2b** aparece na forma de um quarteto (q), com constante de acoplamento de $J = 7,0$ Hz. O mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (**Anexo Figura 56**) confirma que este átomo de hidrogênio está ligado ao carbono da ligação dupla e tem deslocamento δ_C 131,92 ppm para **2a** e δ_C 132,82 ppm para **2b**, está de acordo com o espectro de DEPT 135, que mostra CH sp² (C19). Assim a multiplicidade (dd) para os sinais das metilas (CH₃) em δ_H 1,69 e 1,79 ppm com $J = 7,0$ e 1,3 Hz para ambos **2a** e **2b** é explicada pelos acoplamentos vicinal e ⁵J homoalílico (Atta ur, Malik et al. 1986; Hesse, Meier et al. 1991) Este acoplamento pode ser confirmado pelo mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY no qual se percebe o acoplamento de hidrogênios do carbono C21 δ_C 67,62 ppm, com deslocamento químico de δ_H 4,45 ppm (triplete) para **2a** e δ_H 4,32 ppm (triplete) para **2b**. Com auxílio do programa FOMSC3_rm, simulador de acoplamentos de RMN de ¹H, foi possível estimar um acoplamento alílico J_{alil} do hidrogênio H19 com os hidrogênios 21HA e 21HB no qual se encontrou um valor de J alílico de aproximadamente 2,0 Hz. Na **Figura 21** ilustra os acoplamentos e as respectivas constantes para esses sistemas de spins de ambos os compostos.

Também é nítida a presença do acoplamento alílico com $J = 2,0$ Hz para os átomos de hidrogênios HA21 e HB21 (δ_H 4,45 ppm para **2a** e δ_H 4,33 para **2b**) e o acoplamento homoalílico somente para o átomo de hidrogênio HB21 cujo sinal se apresenta como um duplo triplete. No

entanto, com auxílio do programa FOMSC3_rm, este sinal pôde ser identificado como um ddd com constante de acoplamento geminal $J = 12,0$ Hz com HA21, acoplamento alílico $J = 2,0$ Hz com H19 e acoplamento homoalílico $J = 1,3$ Hz com o grupo metil C18, conforme ilustrado na **Figura 21**.

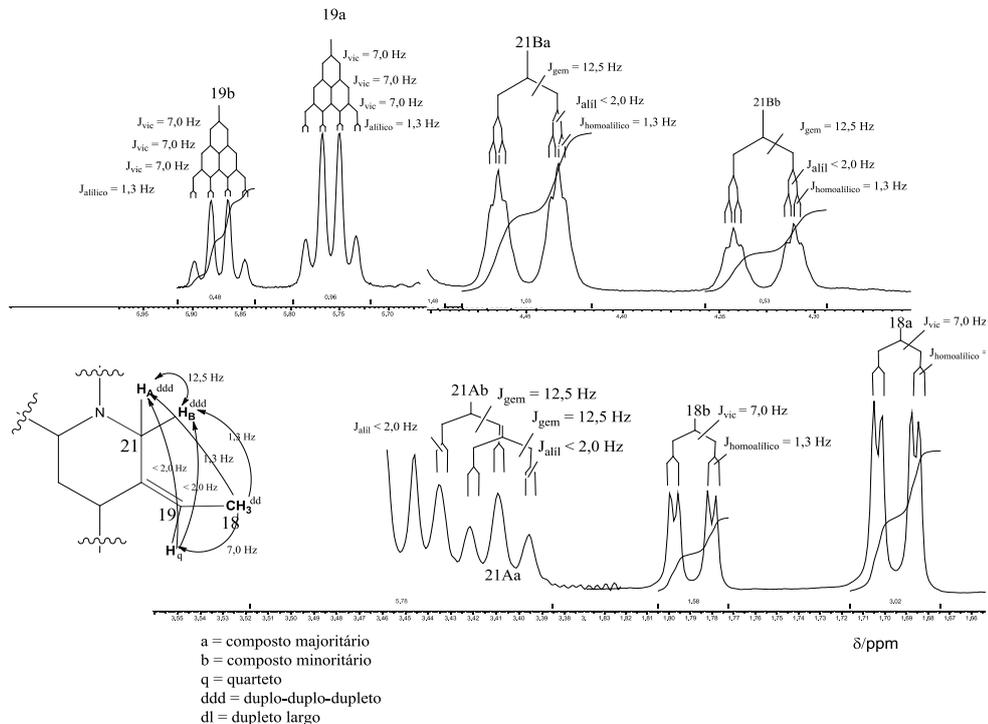


Figura 21. Sistema de acoplamentos e multiplicidade de um sistema de spins do *N*-óxido-isositsiriquina

Por outro lado, os mapas de correlação bidimensionais HMQC, HMBC e COSY dão suporte à análise acima. O átomo de carbono com δ_C 71,10 ppm cujo átomo de hidrogênio δ_H 4,52 ppm demonstrou acoplamento à longa distância 3J com os átomos de hidrogênios δ_H 3,74, e δ_H 3,44 ppm ligados aos carbonos C5 e C21, e 2J com o átomo de hidrogênio δ_H 2,75 ppm do carbono C14. O sinal que tem aparência de duplo tripleto representa o átomo de hidrogênio δ_H 4,52 ppm com integral de 1,5 indicando a presença dos respectivos átomos de hidrogênios da mistura. No mapa de correlação homonuclear COSY (**Anexo Figura 55**), este átomo de hidrogênio em δ_{H3} 4,52 ppm exibe acoplamento com o átomo de hidrogênio em δ_{H14A} 2,75 ppm com $J_{H3,H14A} = 5,5$ Hz para **2a** e δ_{H14B} 2,71 ppm com $J_{H3,H14B} = 5,1$ Hz para **2b** e também acoplamento com δ_{H14ab} 2,33 ppm, e segundo HMQC, indica que estes átomos de hidrogênios estão ligados ao carbono C14 (δ_C 28,78 ppm para **2a** e δ_C 28,00 ppm para **2b**).

O sistema de spins ilustrado na **Figura 22** demonstra os acoplamentos interpretados no espectro de RMN de 1H o qual nos indica através da curva de Karplus quais os ângulos formados entre H14A e H3, assim como os H14B e H15. O átomo de hidrogênio com δ_{HB} 2,33 ppm (m), por sua vez, exibe um acoplamento geminal com o átomo de hidrogênio em δ_{HA} 2,75 (dd), e também acoplamento com o átomo de hidrogênio em δ_H 3,11 ppm do carbono C15. O sinal dos átomos de hidrogênios na região de δ_{H14} 2,73 ppm (C14) na forma de dois duplo dupletos demonstram acoplamento com H3 com $J_{vic,H14A-H3} = 5,5$ Hz (**2a**) e 5,1 Hz (**2b**) e $J_{gem, HAB} = 11,33$ Hz (**2a** e **b**). O valor de acoplamento de aproximadamente 5 Hz dos hidrogênios H3 e H14A (**2a** e **b**) indica que esses átomos de hidrogênio formam um ângulo diedro de aproximadamente 130° ou 45° , segundo o diagrama de Karplus (Hesse, Meier et al. 1991). A ausência de acoplamento dos átomos de hidrogênio na região de δ_H 2,73 com hidrogênio δ_H 3,11 ppm pressupõe um $J = 0$ indicando a presença de um ângulo diedro de aproximadamente 90° . O átomo de hidrogênio com δ_H 3,11 ppm do carbono C15 (δ_C 34,05 ppm) demonstra acoplamento com os átomos de hidrogênios em δ_H 2,34 ppm referente a um multipletto, o qual pode ser atribuído ao carbono C16 (CH).

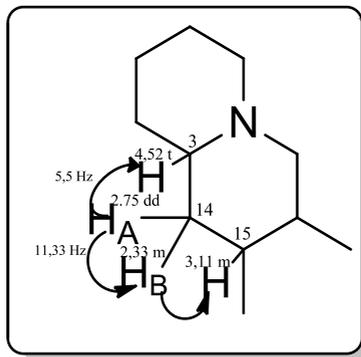


Figura 22. Sistema de spins dos átomos H3, H14A, H14B e H15

Outro sistema de spin que pode ser identificado no mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY é mostrado na **Figura 23**. O átomo de hidrogênio δ_{H} 2,34 ppm está acoplado com dois átomos de hidrogênio H17A e H17B quimicamente diferentes em δ_{H} 3,87 e 3,96 ppm para o composto **2a**. E esses átomos de hidrogênio estão ligados ao carbono carbinólico C17 (δ_{C} 62,78 ppm). Os sistemas de spins formados pelos átomos de hidrogênio do carbono C17 demonstram claramente a diferença entre os hidrogênios HA e HB em virtude da diferença de deslocamento químico e acoplamento polarizado como dois duplo-dupletos com $J_{\text{gemHAB}} = 10,5$ Hz e $J_{\text{vic (H17A-H16)}} = 4,3$ Hz, e $J_{\text{gem(H17B-H16)}} = 9,0$ Hz (**Figura 23**). Este comportamento pode ser justificado pela presença de ligação de hidrogênio entre a carbonila C22 formando um pseudoanel de seis membros, tornando um sistema rígido. Por outro lado, o composto **2b** não apresenta esse comportamento indicando que o composto **2a** é o mais estável, o que pode explicar sua presença em maior quantidade na mistura. Outra informação relevante é que os átomos de hidrogênio do carbono carbinólico do composto **2b** permanecem em ambiente químico semelhante na região de δ_{H} 3,47 ppm apresentando-se como um duplete $J = 5,9$ Hz, indicando a livre rotação deste sistema no composto **2a**. Estes dados demonstram claramente as diferenças existentes entre os compostos **a** e **b**, em termos de deslocamentos químicos de H e C, indicando que podemos estar frente a

uma mistura isomérica ou um equilíbrio conformacional conforme ilustrado na **Figura 23**.

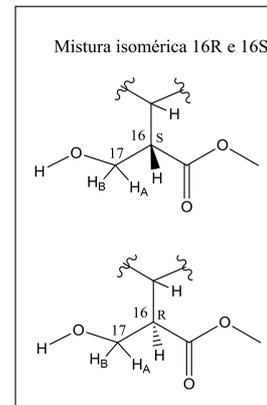
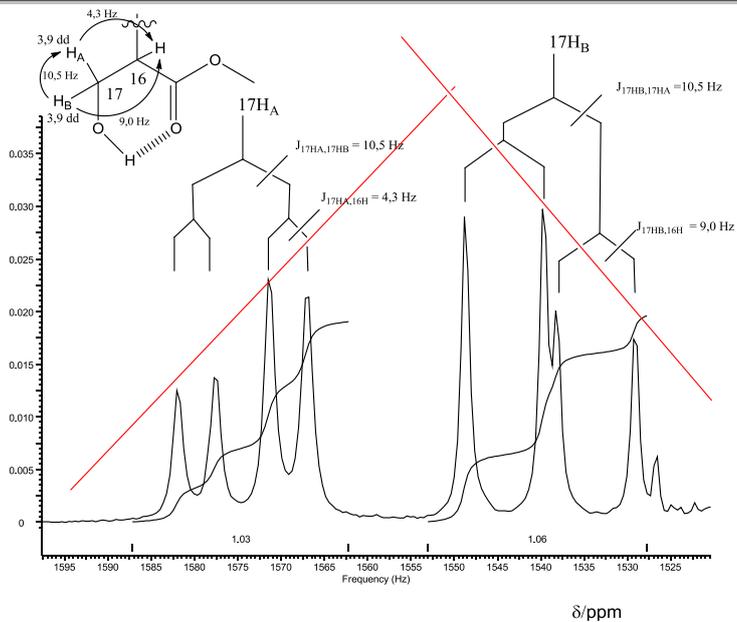
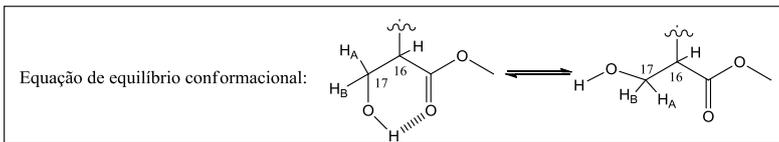


Figura 23. Sistema de spin dos hidrogênios do C17 do composto 2a

O grupo éster (C22 para **2a** δ_C 175,70 e para **2b** δ_C 174,18 ppm) ligado ao carbono C16 é confirmado através da técnica HMBC, onde estes exibem acoplamento a longa distância (3J) com os átomos de hidrogênios do carbono C17 e com o grupo CH₃ (**Anexo Figura 57**).

No mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY pode-se perceber o acoplamento entre os hidrogênios δ_H 3,74 e 3,13 ppm de carbonos diferentes. Através do HMQC pôde-se atribuir os hidrogênios em δ_H 3,13 ao carbono metilênico C6 com δ_C 20,19 ppm, e para os hidrogênios em δ_H 3,74 ppm atribuiu-se ao carbono metilênico C5 com δ_C 67,72 ppm, para ambos os compostos (**2a e b**) (**Anexo Figura 56**).

O sistema indólico destes compostos apresentou um perfil para os deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio, aos compostos **1** e **3** o que também foi confirmado através dos mapas de correlação bidimensionais de HMQC, HMBC e COSY (**Tabela 7**).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos C3 (δ_C 71,10 ppm), C5 (δ_C 67,62 ppm) e C21 (δ_C 67,62 ppm) para os compostos **2a** e **b**, apresentam valores maiores do que o esperado (C3 (δ_C 59,82 ppm), C5 (δ_C 53,04 ppm) e C21 (δ_C 60,06 ppm)) para carbonos ligados ao nitrogênio N4, considerando a elucidação estrutural do composto **1**. Esta incomum desblindagem dos carbonos ligados ao átomo de nitrogênio indica a presença de um grupo retirador de elétrons possivelmente ligado ao nitrogênio. Dessa forma, recorreremos à espectrometria de massas na tentativa de elucidar este fenômeno. Observamos que a fórmula molecular deduzida pelos espectros de RMN foi de C₂₁H₂₆N₂O₃ o que equivale à massa molecular de 354,44. No entanto, o espectro de massa revelou o íon [M+1]⁺ 371,1, uma surpreendente diferença de 16 mostrando claramente que a molécula possui um oxigênio a mais do esperado pelos dados de RMN. Este dado foi exatamente o necessário para propor uma estrutura *N*-óxido (N⁺—O⁻) no nitrogênio N4, e explicar os deslocamentos químicos mais desprotegidos dos carbonos ligados ao átomo de nitrogênio. Assim, o composto **2** apresenta uma fórmula molecular de C₂₁H₂₆N₂O₄.

Os dados encontrados na literatura para compostos *N*-óxidos não foram absolutamente conclusivos (Robert, Ahond et al. 1983). No entanto, a comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³C com

dados do composto isositsiriquina (Atta *et al.*, 1986) um alcaloide indólico de estrutura semelhante, porém sem grupo *N*-óxido, dá suporte à nossa proposta estrutural.

A **Figura 24** ilustra os principais acoplamentos envolvidos entre os carbonos e hidrogênios a três ligações de distância (3J), dados coletados do mapa de correlação bidimensional HMBC, representado em (**Anexo Figura 57**).

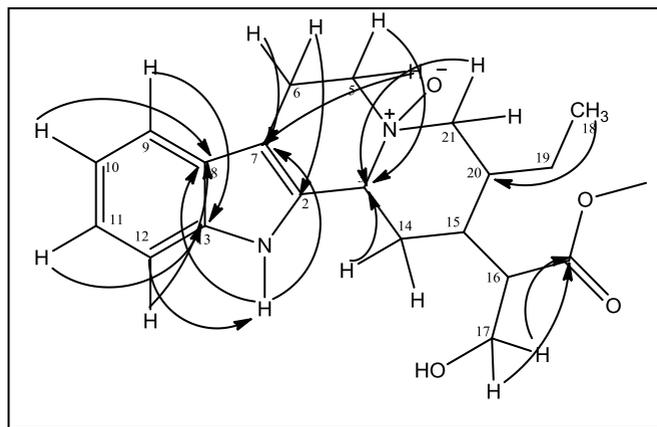
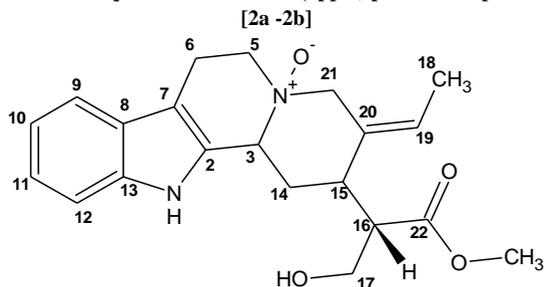


Figura 24. Representação dos $^3J_{CH}$ a partir do HMBC.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ_{ppm}) para os compostos Isositsiriquina

Nº	Composto 2a		Composto 2b		Literatura (CDCl_3) δ_{C} (ppm)
	^{13}C (MeOH) δ_{C} (ppm)	^1H (MeOH) δ_{H} (ppm)	^{13}C (MeOH) δ_{C} (ppm)	^1H (MeOH) δ_{H} (ppm)	
C18	13,98	1,69 (3H, dd)	14,20	1,79 (3H, dd)	13,48
C6	20,19	3,13 (2H, m)	20,19	3,13 (2H, m)	17,96
C14	28,78	2,33 m 2,75 dd	28,00	2,33 m 2,71 dd	29,73
C15	34,05	3,11 m	33,30	3,11 m	32,81
C16	51,22	2,34 m	50,40	2,20 m	53,23
OMe	52,09	3,49 (3H, s)	52,54	3,76 (3H, s)	52,18
C17	62,78	3,96 3,87	62,91	3,47 3,47	61,60
C5	67,62	3,74 (2H, m)	67,62	3,74 (2H, m)	50,21
C21	67,62	3,43 dl 4,45	67,62	3,41 dl 4,32	53,77
C3	71,10	4,52 tl	71,24	4,52 tl	49,63
C7	106,54	-	106,13	-	106,96
C12	112,77	7,37 d	112,64	7,34 d	111,50
C9	119,30	7,49 d	119,30	7,47 d	118,06
C10	120,81	7,06 dd	120,70	7,05 dd	119,60
C11	123,52	7,13 dd	123,44	7,15 dd	122,11
C8	127,72	-	127,72	-	126,90
C20	129,61	-	128,83	-	131,33
C2	131,10	-	131,20	-	131,40
C19	131,92	5,75 q	132,82	5,87 q	127,22
C13	138,84	-	138,78	-	136,56
C22	175,70	-	174,18	-	174,68

Composto 4

O composto **4** foi obtido a partir da FrAq (**Fluxograma 2**), baseado no perfil cromatográfico (**Figura 18**). O isolamento foi efetuado por cromatografia de alta resolução CLAE em modo semipreparativo, utilizando uma coluna C8 e o sistema de eluição acetonitrila/água com 0,1% ácido fórmico. Desta purificação obtiveram-se 84 mg de um sólido amarelo com ponto de fusão indefinido, visto que a 200°C o composto degradou e não apresentou faixa de fusão. O composto foi submetido a análises espectrométricas de IV, de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C uni e bidimensionais e ESI-MS para a total elucidação estrutural.

Pela análise de espectrometria de IV (**Anexo Figura 58**) pôde-se observar uma banda larga na faixa de 2726 a 3650 cm^{-1} atribuída às sobreposições das absorções devido aos estiramentos de grupos OH de álcoois e ácidos carboxílicos e NH de aminas secundárias. A presença de uma banda intensa em 1671 cm^{-1} demonstra o estiramento típico de carbonila, duas bandas em 1366 e 1383 cm^{-1} , que podem ser atribuídas aos estiramentos de ligações de carbonos aromáticos conjugados, além de uma banda em 1625 cm^{-1} indicando a presença de uma função β -alcoxiacrilato (Brandt, Tits et al. 1999). Em seguida, a análise de espectrometria de massas (ESI-MS) (**Anexo Figura 59**) apresentou íon quasi-molecular de m/z de 556,8, e fragmentação mais abundante de 376,8 e 394,8, resultado da perda de uma unidade glicosídica, através da quebra nas ligações C21—OGlu e O—C1' (**Figura 25**).

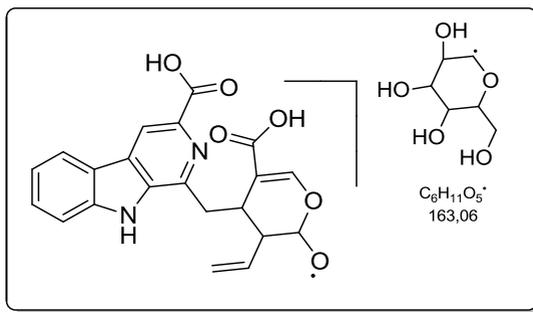
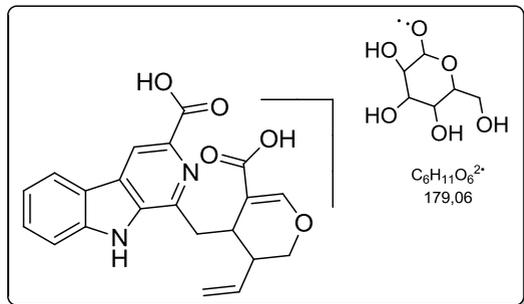


Figura 25. Proposta de fragmentação do ion quasi-molecular composto 4

As análises preliminares de IV e espectrometria de massa, a qual apresentou o íon quasi-molecular m/z de 556,8, e das fragmentações mais abundantes de 376,8 e 394,8 o que indica perda de unidade glicosídica, nos orientaram a trabalhar numa estrutura alcaloídica glicosilada.

De fato nossa hipótese pode ser confirmada através dos espectros de RMN de 1H , RMN de ^{13}C , DEPT 135 e com o auxílio das técnicas bidimensionais HMQC, HMBC e COSY, (Anexos **Figura 58 – 65**). O espectro de RMN de 1H (Anexo **Figura 60**) indicou sinais de hidrogênios na região de δ_H 3,00 a 3,27 ppm, que através do mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (Anexo **Figura 64**) foram atribuídos aos átomos de carbono δ_C 70,42 (C4'), δ_C 73,49 (C2'), δ_C 77,13 (C5') e δ_C 77,77 ppm (C3'), além de um carbono metilênico (C6') em δ_C 61,94 ppm, com hidrogênios em δ_H 3,46 (dd) e 3,66 ppm (m) e o carbono anomérico em δ_C 98,86 ppm (C1') com um hidrogênio

na forma de duplete (δ_{H} 4,59 ppm), com constante $J_{\text{axial-axial}} = 7,8$ Hz referente ao acoplamento com o hidrogênio (δ_{H} 3,00 ppm, dd) atribuído ao carbono C2' com deslocamento químico de δ_{C} 73,49 ppm indicando a configuração β -glicosídica (Valverde, Tamayo et al. 1999) (**Tabela 8**).

A observação do CH δ_{C} 95,80 ppm cujo hidrogênio absorve em δ_{H} 5,57 ppm na forma de um duplete com constante de acoplamento $J = 5,6$ Hz sugere a presença de um grupo hemiacetal adicional. Estes dados, juntamente com a análise dos acoplamentos a longa distância descrita a seguir, permitiu atribuir estes sinais ao CH da posição 21.

Através da técnica de HMBC (**Anexo Figura 65**) foi observado um acoplamento a longa distância do carbono δ_{C} 95,80 ppm (C21) exibindo acoplamento com um hidrogênio em δ_{H} 7,49 ppm (s) (**Figura 27**), este foi atribuído ao carbono δ_{C} 151,9 (C17), pelos dados de HMQC. A multiplicidade deste sinal (simpleto) sugere que não há átomos de hidrogênio vizinhos 3J ao H17.

O fragmento ligado ao carbono C16 foi determinado através do acoplamento a longa distância (HMBC) (**Anexo Figura 65**), observando-se claramente os acoplamentos 2J do hidrogênio do carbono olefínico C17 com o carbono C16 δ_{C} 110,71 ppm e 3J com o carbono quaternário C22 com δ_{C} 168,57 ppm. Também se pode observar o carbono C15 com δ_{C} 30,98 ppm (CH) e hidrogênio de δ_{H} 3,70 ppm, este acopla a longa distância com o carbono C3 (quaternário) com δ_{C} 144,18 ppm (**Figura 27**).

Um sistema de spin de dois hidrogênios encontrados para o carbono C18 metilênico com δ_{C} 119,02 ppm e para os hidrogênios H18A δ 4,78 ppm (d) com 3J (Z) = 10,5 e H18B δ 4,88 ppm (d) com 3J (E) = 17,6 Hz com hidrogênio δ_{H} 5,70 ppm (ddd) do carbono C19 (CH) com δ_{C} 134,85 ppm, típico de um sistema de hidrogênios vinílicos, conforme a **Figura 26**. Através do mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (**Anexo Figura 63**) observa-se o acoplamento do hidrogênio C19 com o hidrogênio em δ_{H} 2,65 ppm (ddd) com $J = 14,0$; 10,0 e 5,5 Hz do carbono C20 com δ_{C} 43,76 ppm.

O carbono C3 com δ_{C} 144,18 ppm acopla com fraca intensidade, segundo dados do HMBC (**Anexo Figura 65**), com um hidrogênio simpleto com δ_{H} 8,74 ppm atribuído a um carbono sp^2 C6 com δ_{C}

115,78 ppm e com dois hidrogênios de δ_{H} 3,18 e 3,63 ppm do carbono C14 (CH_2) com δ_{C} 33,46 ppm. Os hidrogênios do carbono C14 estão em ambiente químico diferente, provavelmente em virtude da posição das carbonilas C22 e C23, estabelecendo um sistema rígido por impedimento estérico e eletrônico em função das nuvens eletrônicas (anel piridínico e carbonilas).

Para determinar o sistema de anéis conjugados partiu-se dos dados dos mapas de correlação bidimensionais heteronucleares (HMQC e HMBC) (**Anexo Figura 64 e 65**) do hidrogênio δ_{H} 8,74 ppm do carbono C6 δ_{C} 115,78 ppm. O hidrogênio δ_{H} 8,74 acopla a longa distância 3J com carbono δ_{C} 121,74 (C8), δ_{C} 136,60 (C2) e δ_{C} 167,22 (C23) e 2J com carbono δ_{C} 127,60 (C7) e 144,18 (C3). Espera-se que o carbono C5 com δ_{C} 136,63 ppm, devido a sua posição na molécula, que ele acople 2J com o hidrogênio δ_{H} 8,74 ppm (C6). No entanto, não se observa isso nos dados espectrométricos devido à sobreposição do sinal do acoplamento 3J (de forte intensidade) do carbono C2 de aproximadamente mesmo deslocamento químico.

Inicialmente o sistema indólico foi determinado através dos acoplamentos a longa distância dos carbonos δ_{C} 127,62 ppm (C7) com um hidrogênio duplete em δ_{H} 8,31 ppm e também com NH δ 11,96 ppm. A partir do hidrogênio duplete com δ_{H} 8,31 com $J = 7,4$ Hz, atribuído ao carbono C9 com δ_{C} 122,47. Com ao auxílio de técnica de COSY, pode-se observar o acoplamento com hidrogênio em δ_{H} 7,29 ppm atribuído ao carbono C10 com $\delta_{\text{C}} = 120,45$ ppm. Outro acoplamento observado à longa distância pelo hidrogênio H9 é com o carbono quaternário C13 de δ_{C} 141,17 ppm, este carbono por sua vez acopla fortemente com hidrogênio em δ_{H} 7,58 ppm atribuído ao carbono C11(CH) com δ_{C} 128,77 ppm. Com o objetivo de confirmar o último carbono C12, percebe-se o acoplamento do carbono C8 (δ_{C} 121,74) com o hidrogênio com δ_{H} 7,62 ppm atribuído ao carbono C12 (δ_{C} 112,69 ppm). São observados e confirmados após a elucidação estrutural que os carbonos quaternários do núcleo indólico acoplam em 2J e 3J com o hidrogênio do nitrogênio N1.

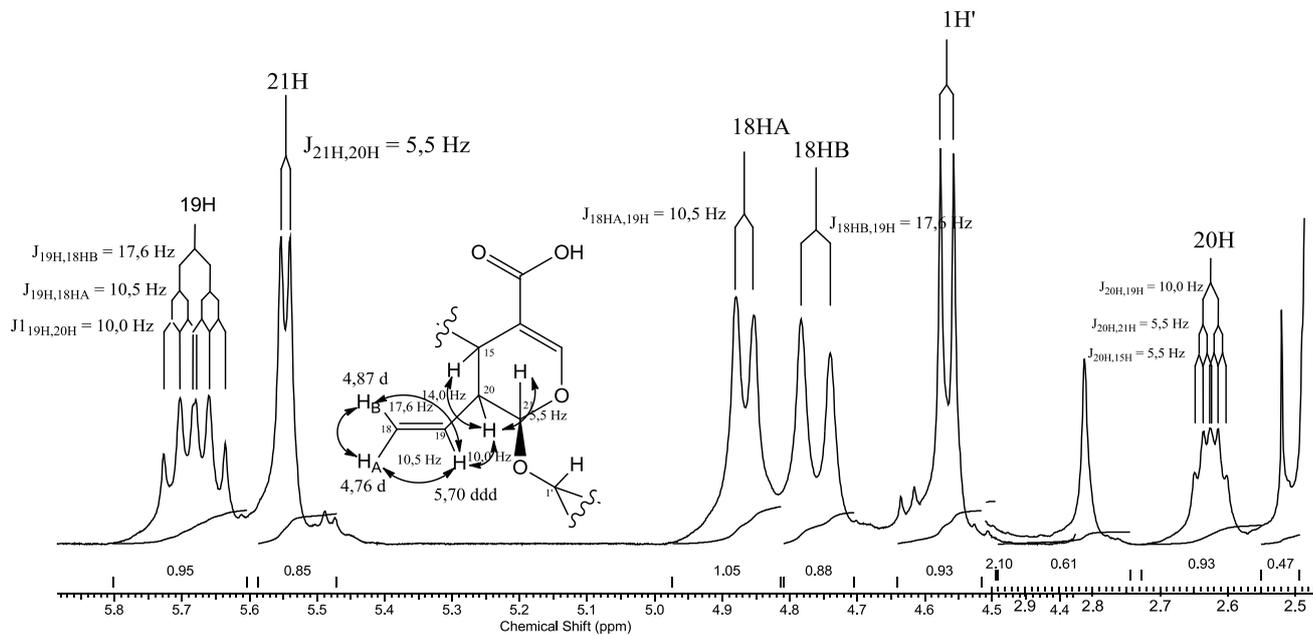


Figura 26. Sistema de spin de carbonos 18HA, 18HB, 19H, 20H 21H e 15H do composto 5

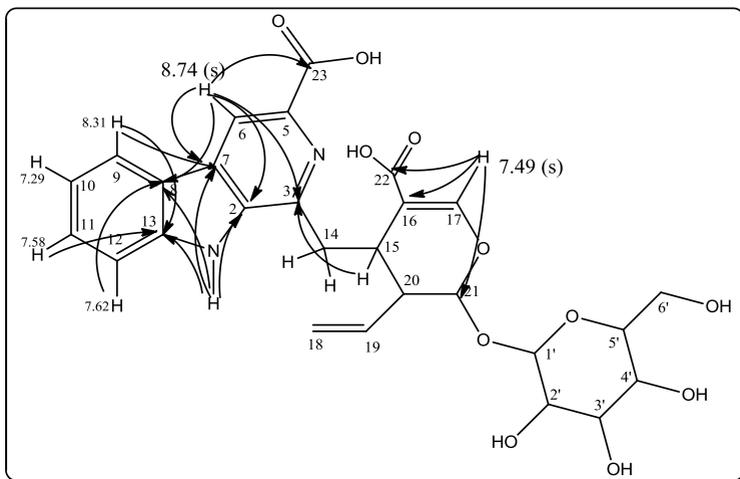


Figura 27. Análise HMBC para o composto 4

A estrutura elucidada a partir dos dados espectrométricos contribuiu para propor uma estrutura de um glucoalcaloide de anel β -carbólico, até então inédito na literatura, de fórmula molecular $C_{27}H_{28}N_2O_{11}$ e massa de 556,51. A presença de duas carbonilas α,β -insaturadas com δ_C 168,57 e 167,22 ppm e a ausência de sinais no espectro de hidrogênio de grupos OMe de éster indica a presença de grupos ácidos livres na molécula.

A estrutura proposta corrobora com dados da literatura, onde os 27 átomos de carbono (**Tabela 8**) atribuídos ao alcaloide indólico, mais uma unidade glicosídica, são oriundos da biossíntese a partir de uma reação de Mannich entre secologanina (10) e triptilamina (10 carbonos) (**Figura 3**)(Dewick 2002).

Tabela 8. Dados de espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto [4]

Nº	δ_{C} ppm	^1H - ^{13}C HMQC- $^1J_{\text{CH}}$ ppm	DEPT 135	H-H COSY	^1H - ^{13}C MBC- $^3J_{\text{CH}}$
C15	30,98	3,70 (m)	CH	2,65 3,16	110,72
C14	33,46	3,18 m 3,63 m	CH ₂		
C20	43,76	2,65 (ddd)	CH	5,70 5,57	
C6'	61,49	3,46 (dd) 3,66 (m)	CH ₂	3,46-3,66 3,66-3,16	3,46-77,13
C2'	73,49	3,00(dd)	CH		77,77 98,86
C3'	77,77	3,16 (m)	CH	78,78	3,38
C4'	70,42	3,06 (d)	CH	74,80	3,23
C5'	77,13	3,18 (m)	CH	78,13	3,41
C21	95,80	5,57(d)	CH	2,65	
C1'	98,86	4,59(d)	CH		73,49 77,77 95,80
C16	110,72		C		
C12	112,69	7,62(dd)	CH	7,58	119,02 120,45 121,74
C6	115,78	8,74(s)	CH		121,74(forte) 136,60(forte) 167,22(forte)
C18	119,02	4,78 (d) 4,88(dd)	CH ₂	4,78-5,70 4,88-5,70	95,80
C10	120,45	7,29(m)	CH	8,33 7,58	121,74
C8	121,74		C		
C9	122,47	8,31 (s)	CH	7,29	127,62 141,17
C7	127,62		C		
C11	128,77	7,58(d)	CH	7,29 7,62	141,17
C19	134,85	5,70(ddd)	CH	4,78 4,88	
C2	136,74		C		
C5	136,63	C	C	-	-
C13	141,17		C		
C3	144,18		C		

Tabela 8. (continuação) Dados de espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto [4]

Nº	δ_{C} ppm	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC- $^1J_{\text{CH}}$ ppm	DEPT 135	H-H COSY	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ MBC- $^3J_{\text{CH}}$
					95,80
C17	151,90	7,49(s)	CH		110,72
					168,57
					30,98
C23	167,22		C		
C22	168,57		C		

Composto 5

O composto **5** foi isolado da mesma forma que o composto **4**, a partir da CLAE semipreparativa. Conforme o tempo de retenção de 34,1 minutos observado no perfil cromatográfico (**Figura 18**), percebe-se que o composto **5** apresentou polaridade menor que o composto **4**.

As características físicas observadas para o composto **5** foram de aspecto amorfo, coloração verde, com ponto de fusão 178 - 180°C. A análise de espectrometria de massa ESI-MS apresentou um íon quasi-molecular de m/z de 571, mostrando um fragmento mais abundante de 409 gerado a partir da perda de glicose $[\text{M} - \text{Glu} + \text{H}]^+$, o segundo fragmento mais abundante do processo de quebra é de m/z 391, referente à quebra na ligação C21—OGlu, e um outro fragmento de mesma intensidade que o segundo, com m/z de 289 refere-se à quebra subsequente do íon 391 nas posições C16-C22 e C5-C23 (**Figura 28**) (**Anexo Figura 67**).

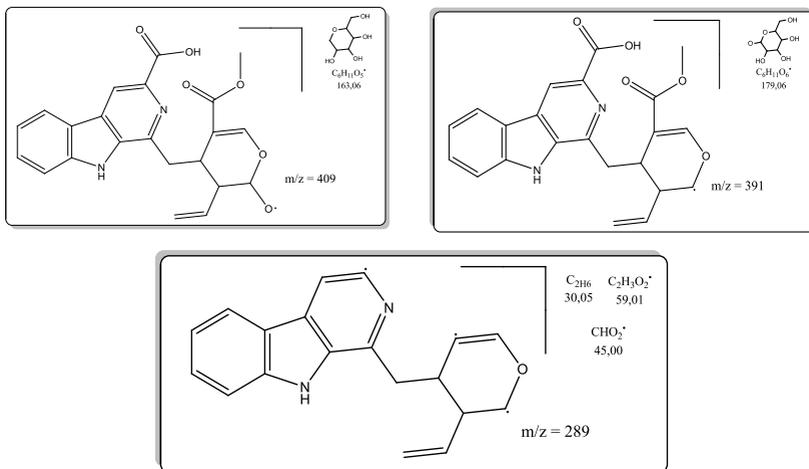


Figura 28. Proposta de fragmentações para o composto 5

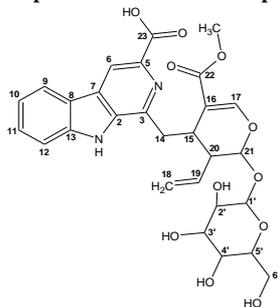
Na análise do espectro de IV notou-se a presença de bandas semelhantes a do composto 4 na região de 2750 a 3600 cm^{-1} características de OH, NH e CH (aromático), banda intensa em 1630 cm^{-1} atribuída a ligação C=C do sistema conjugado e em 1388 cm^{-1} , diferenciando apenas nas bandas características de grupos carbonilas, onde pode-se verificar que no composto 4 a banda referente ao grupo C=O apresenta-se mais definida com uma intensidade considerada média em 1671 cm^{-1} . No entanto, no espectro do composto 5 essa banda apresenta-se, embora na mesma região (1671 cm^{-1}), de forma sobreposta (menos definida e de menor intensidade) típica de éster conjugado (Valverde, Tamayo et al. 1999). Além dessa banda, também pode-se notar no espectro do composto 5 uma outra banda na região de 1700 cm^{-1} , de mesma intensidade, sugerindo que a estrutura deste composto apresentou dois grupos carbonila de diferentes funções (Anexo Figura 66).

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo Figura 69) do composto 5 apresenta sinais correspondentes a 27 carbonos (Tabela 9). Esses sinais possuem deslocamento químico semelhantes aos do composto 4 diferenciando-se pela presença de uma metila característica de grupo éster em δ_c 50,74 ppm. O DEPT 135 (Anexo Figura 70) demonstrou 19

carbonos protonados (15 CH, 3 CH₂ e 1 CH₃). Assim como no espectro de RMN de ¹³C, o de RMN de ¹H (**Anexo Figura 68**) apresenta semelhança com o composto **4**. No entanto, a presença de um sinal de alta intensidade com δ_{H} 3,22 ppm demonstra a formação de um grupo OMe com multiplicidade de um simpleto, e um sinal em δ_{C} 166,89 ppm de uma carbonila, concorda com o espectro de IV, onde nota-se a presença de uma banda de estiramento típica de éster α,β -insaturado em 1671 cm⁻¹. Além dessa banda, no espectro de RMN de ¹³C nota-se também um sinal com δ_{C} 166,59 ppm referente a uma carbonila conjugada de ácido. E sendo assim, podemos contabilizar a presença de dois grupamentos carbonílicos na estrutura, um proveniente de ácido e outro de éster, ambos bem definidos e caracterizados segundos dados de espectrometria de IV, de RMN de ¹H e RMN de ¹³C. Com auxílio de experimentos de RMN 2D (HMBC) percebe-se os acoplamentos a longa distância ³J de um hidrogênio (δ_{H6} 8,74 ppm) do sistema β -carbolínico aromático (C6, δ_{C} 115,37 ppm), com a carbonila do ácido (C23, δ_{C} 166,59 ppm) e o acoplamento do hidrogênio δ_{H17} 7,48 ppm do carbono C17 (δ_{C} 152,02 ppm) com a carbonila do éster (C22, δ_{C} 166,89 ppm). Estes acoplamentos exibidos no HMBC confirmam a presença de substituintes carbonílicos de um ácido no carbono C5 e de um éster no carbono C16 (**Anexo Figuras 68 - 73**).

Os dados espectrométricos foram comparados com os da literatura, (**Tabela 9**)(Itoh, Tanahashi et al. 2003). O composto **5** é conhecido como um glucoalcaloide β -carbolínico, desoxicordifolina, e foi isolado a partir das espécies *Strychnos mellodora*, *Palicourea adusta*, *Neonauclea sessilifolia* ,(Brandt, Tits et al. 1999; Itoh, Tanahashi et al. 2003), no entanto não há relatos desses constituintes no gênero *Esenbeckia*.

Tabela 9. Dados de espectrometria de ^1H e ^{13}C para o compostos [5]



Nº	δCppm (DMSO)*	δCppm (MeOH)	DEPT*	$\delta\text{H-C}^*$	$\delta\text{C-H}^*$	lit.
						^{13}C . (MeOH)
C15	30,94	33,98	CH	3,70 (m)	3,71	34,0
C14	33,03	35,17	CH ₂	3,24(m) 3,51	7,68	34,9
C20	43,17	45,72	CH(td)	2,67 (dt)	5,21 5,25	45,7
MeO	50,74	51,97	CH ₃	3,22	-	51,9
C6'	61,11	63,04	CH ₂ (dd)	3,47 3,68 2Hz	-	63,0
C2'	70,02	71,79	CH	3,09(dd) $J=10$ Hz	-	71,7
C3'	73,09	74,80	CH	3,02(dd) $J=8.21;7.82\text{Hz}$	-	74,7
C4'	76,72	78,13	CH	3,18(dd)	-	78,1
C5'	77,39	78,78	CH	3,18(m)	-	78,7
C21	95,59	97,47	CH	5,62(d) $J=7.42$ Hz	7,68	97,4

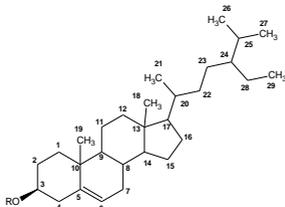
Tabela 9. (continuação) Dados de espectrometria de ^1H e ^{13}C para o compostos [5]

Nº	δCppm (DMSO)*	δCppm (MeOH)	DEPT*	$\delta\text{H-C}^*$	$\delta\text{C-H}^*$	lit.
						^{13}C . (MeOH)
C1'	98,61	100,47	CH	4,59(d) $J=7.82$ Hz	3,36	100,4
C16	109,55	110,09	C	-	7,68	110,1
C12	112,29	113,71	CH	7,63(ddd)	-	113,5
C6	115,37	116,59	CH	8,74(s)	8,75	116,4
C18	118,96	120,10	CH ₂	4,91 5,02(dd)	-	119,9
C10	120,06	122,60	CH	7,28(m)	8,95	122,4
C8	121,30	122,64	C	-	7,82	122,6
C9	122,06	123,66	CH	8,33 $J=7.82$ Hz	7,82	123,4
C7	127,24	131,67	CH	7,58(dd)	8,44	131,3
C11	128,39	135,24	CH	-	-	135,2
C19	134,24	137,42	C	5,74(dt)	8,96	137,3
C2	136,37	137,54	C	-	8,96	137,8
C13	140,81	142,98	C	-	3,71	143,0
C3	143,48	144,34	C	-	8,44	144,0
C17	152,02	155,02	CH	7,48(s)	-	154,8
C23	166,59	167,19	C	-	8,86	167,4
C22	166,89	169,35	C	-	3,32 7,57	169,3

Composto 6

O composto **6** foi obtido a partir do fracionamento da FRA, apresentando-se como um precipitado, com características físicas de um sólido branco e amorfo, com ponto de fusão na faixa de 275-277°C, parcialmente solúvel em piridina. A primeira análise em CCD revelada em Dragendorff, apresentou resultado negativo para alcaloide. O emprego do revelador sulfato cérico levou à formação de mancha de coloração escura diferente do esperado para alcaloides, supondo que se trata de um fitoesterol glicosilado, levando em conta a polaridade do eluente (acetona/hexano, 80:20), e ao Rf (0,2) observado.

Baseado no fato de se esperar uma estrutura de fitoesterol já descrita na literatura, foi utilizada técnica de RMN de ^{13}C com a finalidade de comparação dos dados existentes, sendo a técnica de RMN de ^{13}C mais conclusiva, dando possibilidade de identificar com maior segurança a estrutura (**Anexo Figura 74**). Observa-se no espectro de RMN de ^{13}C que o composto **6** encontra-se como constituinte majoritário de uma mistura, sendo o outro composto difícil de ser identificado. Através dos dados demonstrados na **Tabela 10**, por comparação da literatura (Moghaddam, Farimani et al. 2007), pôde-se confirmar a estrutura do β -sitosterol glicosilado.

Tabela 10. Dados de espectrometria de RMN de ^{13}C para o composto [6]

Nº	Composto 6	Literatura
	^{13}C (CDCl ₃)	(Py)
C1	38,75	38,8
C2	33,45	33,5
C3	79,79	79,8
C4	41,21	41,3
C5	142,17	142,3
C6	123,20	123,2
C7	31,52	31,6
C8	33,32	33,4
C9	51,60	51,7
C10	38,19	38,2
C11	22,55	22,7
C12	40,60	40,7
C13	43,75	43,8
C14	58,09	58,1
C15	25,77	25,8
C16	29,82	29,9
C17	57,50	57,7
C18	13,43	13,5
C19	20,69	20,7
C20	37,66	37,7
C21	20,28	20,3
C22	35,47	35,5
C23	27,62	27,7
C24	47,30	47,4
C25	30,71	30,7
C26	21,25	21,3
C27	20,47	20,5
C28	24,65	24,7
C29	13,25	13,3
C1'	103,84	103,9
C2'	76,62	76,7
C3'	79,90	79,9
C4'	72,95	73,0
C5'	79,34	79,4
C6'	64,09	64,1

Composto 7

O composto **7** foi obtido a partir do fracionamento da FRA, apresentando aspectos físicos de um sólido cristalino na forma de agulhas, típico de fitoesterol, e ponto de fusão na faixa de 127-130°C, solúvel em clorofórmio.

A proposta estrutural foi possível com emprego da técnica de RMN de ^1H e comparação de dados da literatura (Jácome, Oliveira et al. 2004), podendo-se perceber quatro sinais de hidrogênios desblindados, sendo um duplete largo em δ_{H} 5,36 ppm, atribuído ao hidrogênio do carbono C6 olefínico, um duplo duplete em δ_{H} 5,02 atribuído ao hidrogênio do carbono olefínico C22 com constante de acoplamento $J = 15,0$ e $8,6$ Hz e outro duplo duplete em δ_{H} 5,16 ppm com constante de acoplamento de $J = 15,0$ e $8,6$ Hz. Levando-se em conta a constante $J = 15,0$ Hz é possível determinar uma configuração espacial dos hidrogênios olefínicos H22-H23 como sendo trans. A presença de um multiplete centrado em δ_{H} 3,53 ppm é atribuído ao hidrogênio carbinólico C3 típico de fitoesteróis (**Figura 29**). Além disso, é possível perceber a presença de sinais em δ_{H} 0,50 – 2,40 ppm que são atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteróide. Os dados espectrais de RMN de ^1H apresentam multiplicidade semelhante aos do fitoesterol conhecido como estigmasterol, entretanto, o composto **7** apresentou pequenas diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do carbono carbinólico e dos hidrogênios sp^2 dos carbonos C6, C22 e C23. Para se obter resultados conclusivos haveria a necessidade de adquirir mais dados espectrométricos, no entanto, a massa obtida deste composto foi insuficiente para outras análises (**Anexo Figura 75**).

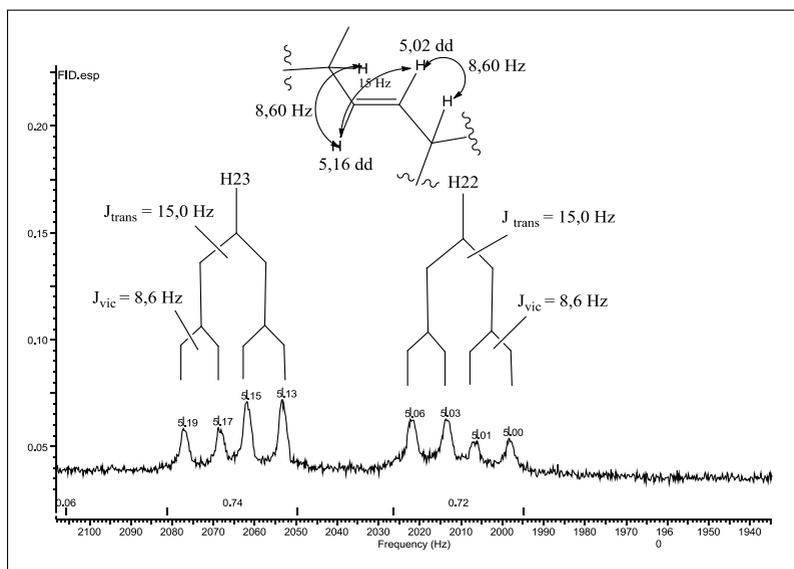
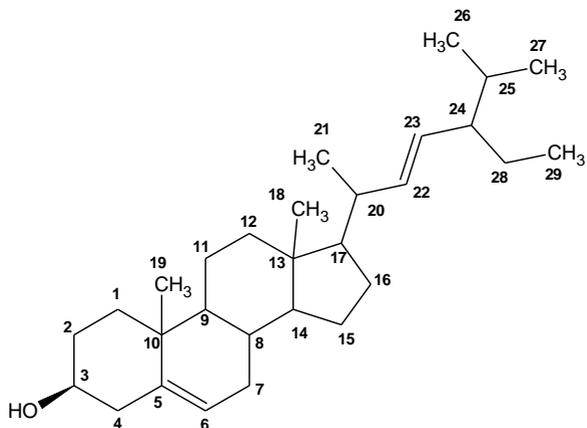


Figura 29. Sistema olefínico cis-trans para o composto 7

11. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA *Esenbeckia leiocarpa*

O potencial de atividade antioxidante reside no fato dos compostos terem a capacidade de sequestrar radicais livres. Em geral, os flavonoides exibem esta ação, por serem compostos fenólicos com a capacidade de doar um próton tornando-se um radical estável (Govindappa, Bharath et al. 2011).

A investigação fitoquímica tem demonstrado a abundante presença de alcaloides nas cascas da espécie *E. leiocarpa*, no entanto, a literatura não traz nenhum estudo a respeito de atividade antioxidante da espécie, o que tornou o presente trabalho interessante do ponto de vista terapêutico. Neste contexto, fizeram-se necessários testes para determinar compostos fenólicos que estejam atuando como potencial agente promotor de proteção contra radicais livres. Sendo assim, foram efetuados testes para avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações, através dos métodos de captura de radicais DPPH e poder redutor.

11.1. Determinação de compostos fenólicos totais nos extrato bruto e frações a partir da espécie *E. leiocarpa*

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou, Kefalas et al. 2006). O reagente de Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ . Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, que são oxidados a íon fenolato, em condições básicas, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais é 5^+ e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Waterman and S. 1994; Sousa, Silva et al. 2007).

Nos resultados observados para compostos fenólicos totais (**Tabela 11**) percebe-se a presença reduzida desses compostos no extrato e nas frações das cascas da *E. leiocarpa*, quando comparadas com

espécies como *Eugenia umbeliflora* e *Eugenia brasiliensis*, estas com reconhecida quantidade de compostos fenólicos em sua constituição química (MAGINA 2008).

Tabela 11: Resultados para testes de compostos fenólicos totais

AMOSTRA	Compostos Fenólicos (mgAG/g)
EB	55,86 ± 0,54
FRA	60,75 ± 1,09
FrAcOEt	94,66 ± 0,38
FrHEX	5,57 ± 0,33
FrAQ	51,55 ± 0,99

*Quando maior a quantidade de ácido gálico encontrada em equivalente por g de extrato ou fração, maior a porcentagem de compostos fenólicos presentes.

Nos resultados observados para fenólicos totais para o EB e frações percebeu-se uma reduzida quantidade de fenólicos sendo a fração acetato de etila a que apresentou maior quantidade 94,66 mgAG/g de extrato, enquanto a fração hexânica com 5.57 mgAG/g. Os resultados apresentados vêm confirmar o que existe na literatura sobre a espécie, visto que na constituição química da *E.leiocarpa* não constam compostos fenólicos.

11.2.Avaliação do conteúdo de flavonoides nos extrato bruto e frações a partir da espécie *E. leiocarpa*

Os flavonoides fazem parte de uma classe de metabólitos vegetais secundários, de natureza fenólica, que possuem notável capacidade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, sobretudo ao tratamento de diabetes (Cazarolli, Zanatta et al. 2006).

Foi realizada a determinação do teor de flavonoides nos extratos e frações através do método utilizando a complexação com o reagente cloreto de alumínio (AlCl₃). Esse agente forma um quelato com as hidroxilas orto fenólicas e com o grupo carbonila nos flavonoides, proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvância do espectro de UV/VIS para uma região característica (Simões, Schenkel et al. 2003). Para o cálculo do teor de flavonoides nas

espécies estudadas, foi construída uma curva analítica utilizando o flavonoide quercetina, de onde se obteve a equação da reta $y = 10,36x - 9,63$; $r^2 = 0,996$.

A **Tabela 12** mostra os resultados para estes testes. Quanto maior o teor de quercetina encontrado no extrato e frações testados, maior a porcentagem de flavonóides encontrados por grama de extrato bruto ou fração. Para o teste de flavonoides os resultados apresentados, demonstraram, assim como para compostos fenólicos, que a espécie *E. leiocarpa* não apresenta em sua constituição química quantidades expressivas capazes de promover algum efeito biológico.

Tabela 12: Resultados para testes de flavonoides

AMOSTRA	Flavonoides (mg Querc/g)	% flavonoides em relação aos fenólicos
EB	1,32 ± 0,41	2,36
FRA	2,76 ± 0,35	4,54
AcOEt	6,14 ± 0,49	6,49
HEX	1,32 ± 0,34	23,70
AQ	5,53 ± 0,05	10,73

11.2.1. Determinação da ação sequestradora de radicais livres no extrato bruto, frações e alcaloides isolados a partir da espécie *E. leiocarpa*

Muitos estudos têm demonstrado que os radicais livres são os principais causadores de diversas doenças degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, neurológicas e algumas formas de câncer. Os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, e como quelantes de metais e a maioria de seus efeitos biologicamente ativos são derivados das funções antioxidantes. Recentemente, há um aumento no interesse em antioxidantes naturalmente encontrados em frutos para uso em fitoterápicos, a fim de substituí-los pelos antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido a seus efeitos colaterais, tais como carcinogenicidade. Além disso, os antioxidantes naturais possuem a

capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, e proporcionar benefícios adicionais à saúde.

O ensaio utilizando o radical livre DPPH avalia a capacidade sequestradora de radicais livres da amostra analisada. O radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é relativamente estável e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água, como o etanol. A ação sequestradora de radicais livres deve-se à reação entre o DPPH e compostos presentes nos extratos e frações, geralmente fenólicos, através da abstração de um radical hidrogênio (**Figura 30**). O DPPH, ao reagir, forma espécies mais estáveis, diminuindo a intensidade de sua coloração, o que pode ser facilmente determinado sob luz Visível (517 nm). A estabilização de radicais livres e formação de espécies pouco reativas inibem a propagação do processo de peroxidação lipídica, um dos eventos biológicos mais importantes relacionados aos processos oxidativos (Lugasi, Dworschák et al. 1998).

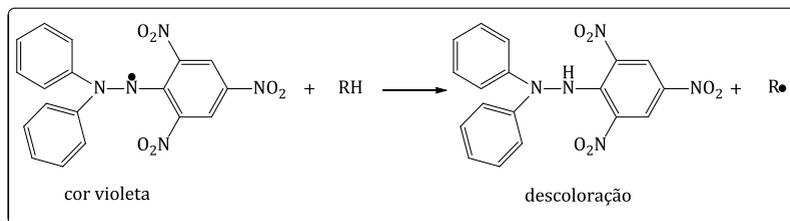


Figura 30: Equação básica da reação do DPPH com um sequestrador de radical livre.

O gráfico a seguir mostra os resultados obtidos para o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH (**Figura 31**). Considera-se, para interpretação do ensaio, que a diminuição da absorbância em 517 nm e o aumento do aparecimento da coloração amarela em solução corresponde a um maior potencial antioxidante por parte da solução teste.

Os resultados obtidos são expressos em EC_{50} , que significa a concentração de extrato, fração ou composto isolado necessária para reduzir em 50 % a concentração de DPPH em solução, e pode ser obtida através do gráfico da concentração do DPPH em solução versus a concentração da amostra com o extrato ou a fração analisada. Neste

caso, quanto menor a concentração necessária para alcançar a EC_{50} , melhor a capacidade sequestradora do radical livre por parte da amostra.

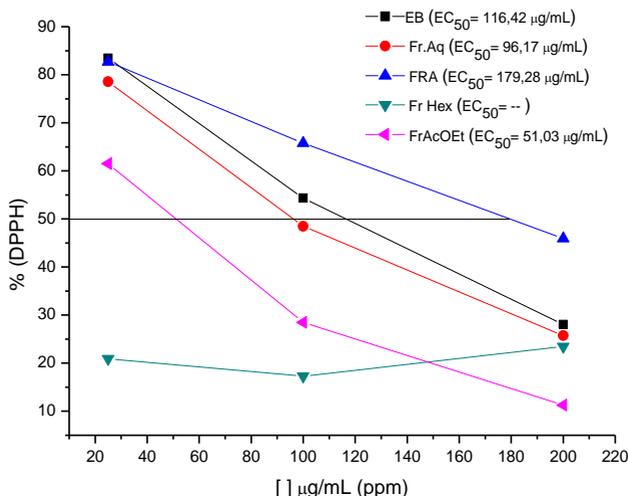


Figura 31. Atividade sequestradora do radical livre DPPH para extrato bruto (EB) e frações (FrAq, FRA, Fr Hex e FrAcOEt). Os valores são significantes \pm D.P. $n = 3$, $p < 0,05$, significativamente diferente com teste de Fischer (ANOVA)

Analisando os resultados apresentados no gráfico (**Figura 31**) percebe-se que o extrato bruto e frações demonstraram capacidade moderada de captação de radicais livres. A FrAcOEt entre todas, foi a que apresentou melhor resultado, $EC_{50} = 51,03 \mu\text{g/mL}$.

Correlacionando o teor de compostos fenólicos totais da FrAcOEt (94,66 mg AG/g extrato seco) com o resultado obtido para DPPH, percebe-se a concordância com a reduzida ação de sequestrar radicais livres, visto que os principais responsáveis por essa atividade são a classe de compostos fenólicos. Conforme os testes, podemos observar que tanto no extrato bruto quanto nas frações, a presença de compostos fenólicos é reduzida, levando a supor que a atividade, embora baixa, seja promovida pelos alcaloides.

Os compostos isolados [1 a 5] e testados como agentes sequestradores de radical livre DPPH não apresentaram ação

antioxidante, visto que para um composto ser considerado ativo deve apresentar EC_{50} numa concentração menor que 50 ppm.

De acordo com a literatura alcaloides que apresentam atividade sequestradora de radical livre DPPH apresentam hidroxilas fenólicas com capacidade de doar prótons e neutralizar os radicais como, por exemplo, a boldina (**Figura 32**), um alcaloide aporfínico extraído a partir da espécie *Peumus boldus* (boldo) (Schmeda-Hirschmann, Rodriguez et al. 2003).

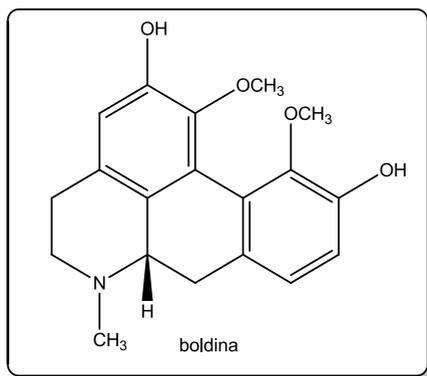


Figura 32. Alcaloide boldina extraído a partir da espécie *Peumus boldus*

Em se tratando de alcaloides indólicos, a literatura descreve o comportamento antioxidante do extrato alcaloídico indólico da espécie *Vinca herbaceae* (Boğa, Kolak et al. 2011). O extrato inibiu o radical livre DPPH, em uma concentração de EC_{50} de aproximadamente 20 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a espécie *E. leiocarpa* apresentou para o mesmo teste uma EC_{50} cerca de nove vezes maior do que o extrato da espécie *Vinca herbaceae*. Estes resultados indicam que os alcaloides presentes na espécie *E. leiocarpa*, embora sejam indólicos, se comportam de maneira diferente dos presentes no extrato da *Vinca*, o que pode ser explicado pelo fato dos alcaloides encontrados na espécie *Vinca herbaceae*, conterem em sua estrutura grupos capazes de promover a ação antioxidante.

11.3. Determinação do potencial redutor no extrato bruto e frações a partir da espécie *E. leiocarpa*

A oxidação de lipídios envolve reações radicalares, capazes de autopropagação, que dependem de ação catalítica, como temperatura, radicais livres, pH e ação de íons metálicos (Silva, Borges et al. 1999). A capacidade de reduzir íons metálicos ou intermediários do processo de peroxidação lipídica, através da doação de elétrons, é caracterizado como potencial redutor de uma amostra (Yen and Chen 1995).

A ação de reduzir íon férrico para os EB (378, 62 mgAA/g), FRA (733,63 mgAA/g), FrAcOET (400,02 mgAA/g) e FAQ (341,72 mgAA/g) foi considerada significativa quando comparada com os resultados obtidos nos testes para teor de compostos fenólicos e flavonoides, já que os principais responsáveis por essa atividade são compostos constituídos de hidroxilas fenólicas capazes de perder um próton formando íon fenolato estável (**Tabela 13**). Surpreendentemente, os testes realizados mostraram que os alcaloides presentes nos EB, FRA, Fr AcOEt, Fr Aq são capazes de se comportar como agentes redutores. Estes resultados vêm em contraste com os apresentados para o teste DPPH, onde podemos observar reduzida capacidade sequestradora de radical livre.

Tabela 13: Resultados obtidos para teste de poder redutor para EB e frações.

AMOSTRA	PODER REDUTOR (mgAA/g)
EB	378,62 ± 2,32
FRA	733,63 ± 0,48
FrAcOEt	400,02 ± 1,32
FrHEX	24,71 ± 0,71
FrAq	341,72 ± 0,50

12. AÇÃO INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A hipótese de utilização de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) tem sido bem sucedida e aplicada no tratamento profilático e terapêutico da doença de Alzheimer (DA), verificando-se assim uma grande melhoria de vida dos pacientes. A procura de substâncias com um grau de toxicidade baixo tem-se intensificado cada vez mais, investigando-se plantas utilizadas na medicina tradicional, como fonte

de obtenção de compostos inibidores da AChE, (Ingkaninan, Temkitthawon et al. 2003; Dinamarca, Arrazola et al. 2008) Esses inibidores de origem vegetal ligam-se à enzima de uma forma reversível por ligações fracas intermoleculares, permitindo, deste modo, a recuperação do centro ativo da enzima.

Um composto recentemente aprovado, de origem vegetal, é a galantamina (**Figura 33**) extraída da espécie *Gallanthus* (família Amarilidaceae), a qual tem sido utilizada no tratamento da DA, e tem mostrado grande melhoria na vida para os pacientes (Heinrich and Teoh 2004).

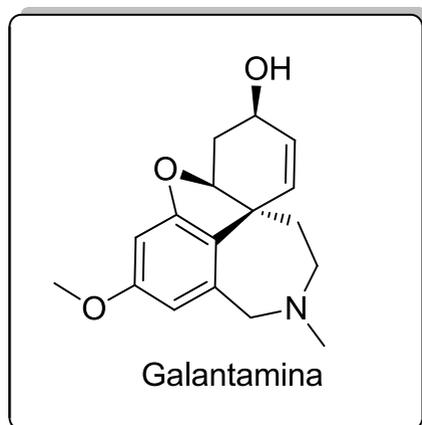


Figura 33: Alcaloide galantamina extraído da espécie *Gallanthus*

Neste trabalho, foi estudado a atividade inibidora da AChE para o extrato bruto, frações e compostos isolados a partir das cascas da espécie *Esenbeckia leiocarpa*.

A **Tabela14** apresenta os valores de porcentagem de inibição da AChE, onde se percebe que o extrato bruto e as frações não apresentaram resultados significativos, em relação ao controle, a galantamina. Apenas o extrato hexânico demonstrou uma atividade, ainda menor que o controle, de 68,4 %. No entanto, a **Tabela 15** mostra a atividade para os compostos isolados, onde o resultado foi excelente,

com apenas com 0,1 µg/mL de concentração, observou-se uma inibição de até 100% da enzima.

Tabela 14. Resultados de inibição da acetilcolinesterase para amostras complexas

Amostra	% inibição (100µg/mL)
Extrato bruto (EB)	33,50
Fração Hexânica (FrHex)	68,40
Fração rica em alcaloides (FRA).	34,40
Fração acetato de etila (FrAcOEt)	37,60
Fração Aquosa (Fr Aq)	27,40
galantamina	100,00

Tabela 15. Resultados de inibição da acetilcolinesterase para compostos isolados

Compostos. isolados	% inibição (0.1 µg/mL)
N-óxido isositsiriquina [2a-b]	98
acetildihidrocorinatenteol [3]	98
Dihidrocorinanteol [1]	69.2
desoxicordifolina [5]	100
Desoxicordifolina derivado [4]	73.6
Galantamina (50 µg/mL)	80

Observando o tipo de estrutura podemos sugerir que os compostos que possuem em seu esqueleto grupos carbonilas, irão apresentar ação, levando-se em conta que os valores de inibição foram na ordem de 69,2% para o composto [**1**], o alcaloide majoritário da FRA, o qual apresenta uma função álcool em sua estrutura. O segundo que apresentou menor porcentagem de inibição foi o composto [**4**], 73,6%, possuindo em sua estrutura duas carbonilas de ácido, no entanto, para os demais compostos [**2**, **3**] e [**5**] a inibição foi de 98 e 100%, respectivamente, estes apresentam em sua estrutura carbonilas de éster. Sendo assim, podemos supor que para os alcaloides isolados a partir das cascas da *E.leiocarpa*, a presença de grupos carbonílicos de éster agem fundamentalmente no sítio ativo da enzima, proporcionando uma redução na sua ação em promover a hidrólise da acetilcolina.

Segundo Viegas et al (Viegas Junior, Bolzani et al. 2004), o mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário

tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Este mesmo mecanismo pode vir a explicar os resultados obtidos para os alcaloides indólicos carbolínicos (VIEGAS JUNIOR, et al., 2004).

Uma observação importante a ser feita é o fato das frações não apresentarem inibição, entretanto, quando cromatografadas, os compostos isolados demonstrou ação inibidora. Isso pode estar relacionado ao efeito antagônico dos compostos, reduzindo o potencial destes alcaloides, quando em frações ou extrato.

13. CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas neste trabalho para a detecção, separação e caracterização dos compostos presentes no extrato bruto e frações de *E. leiocarpa*, se mostraram eficazes, visto que foram isolados e caracterizados sete compostos sendo 5 inéditos na espécie e um inédito na literatura.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que ofereceu vantagens em termos de alta eficiência, simplicidade, baixo consumo de solvente e com tempo de análise curto, equipado com detector de arranjo de diodo que aumenta consideravelmente a capacidade desta técnica. Neste trabalho o emprego da EC, aplicando condições específicas como pH baixo, foi determinante para traçar um perfil dos compostos presentes no extrato e frações, além disso foi capaz de quantificar o alcaloide DHC no extrato bruto e frações de forma rápida e eficiente.

A CLAE foi uma técnica útil para separar os compostos presentes nas misturas complexas das frações obtidas do extrato bruto FRA e FRAQ. Desenvolveu-se uma metodologia eficiente, não tão rápida quando comparado a eletroforese capilar, porém mais sensível. Utilizou-se o modo semipreparativo com o uso de colunas de fase reversa e solventes adequados para traçar um perfil cromatográfico, onde se obteve uma melhor separação dos compostos presente no extrato bruto, possibilitando o isolamento de dois glucoalcaloides β -carbolínicos, majoritários da fração aquosa.

Através das técnicas de espectroscopia de IV e espectrometria de massas ESI-MS, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT 135 e RMN 2D, foi possível indentificar sete compostos isolados das cascas de *E. leiocarpa*: Di-hidrocorinanteol [1], Acetildi-hidrocorinanteol [3], *N*-óxido isositsiriquina[2a –b], desoxicordifolina derivado ácido [4], desoxicordifolina [5], β -sitosterol glicosilado [6] e estigmasterol [7].

O fracionamento biomonitorado da fração rica em alcaloides FRA permitiu o isolamento de dois alcaloides, o DHC [1] e o *N*-óxido isositsiriquina [2a –b] e de dois esteróides β -sitosterol glicosilado [6] e estigmasterol [7], identificados através de técnicas de RMN e por comparação com dados da literatura.

O alcaloide *N*-óxido isositsiriquina [**2a-b**], foi identificado por método de RMN, mostrou inicialmente uma mistura de isômeros ou de um equilíbrio conformacional da molécula, porém para se obter maiores informações a esse respeito, será necessário aplicar outras técnicas como experimentos RMN ¹H/NOE e Raios X para se obter dados mais precisos.

A partir da fração aquosa (FrAq) foi possível isolar dois glucoalcaloides β -carbolínicos de caráter polar, a desoxicordifolina [**5**] e um derivado ácido da desoxicordifolina [**4**].

A espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray foi determinante para se obter as moléculas protonadas (íon quasi-molecular) dos alcaloides, principalmente na identificação do alcaloide *N*-óxido isositsiriquina [**2a-b**], no qual se evidenciou a diferença de 16 u (átomo de oxigênio) da massa molecular obtida através do método de caracterização por RMN, pois nas técnicas de RMN de rotina não se adotam os experimentos para se determinar o núcleo de oxigênio.

Os alcaloides isolados das frações rica em alcaloides e aquosa enquadram-se na classe de metabólitos secundários de núcleo indólico, e são os compostos majoritários nas cascas da espécie *E. leiocarpa*. A investigação da biossíntese dessa classe de compostos demonstra a origem do núcleo indólico através do aminoácido triptofano, que por reação de Mannich com secologanina obtêm-se como produtos núcleos coriantos ou β -carbolínicos.

Os testes de atividade antioxidantes empregados no laboratório foram determinantes para se obter a informação do teor de compostos fenólicos e flavonoides diminuta no extrato bruto e nas frações.

A capacidade do extrato bruto e das frações de promover a redução do ferro 3+ pode estar diretamente relacionado com a ação farmacológica, entretanto não foram capazes de sequestrar radical livre DPPH sugerindo que o mecanismo de oxidação dos constituintes presentes é diferente do observado para os compostos fenólicos.

Para o teste de inibição da acetilcolinesterase, os compostos [**1 a 5**] isolados a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa*, apresentaram excelentes resultados. Os alcaloides *N*-óxido-isositsiriquina [**2a-b**] e

acetil di-hidrocorinanteol [3] e o alcaloide β -carbolínico desoxicordifolina [5] apresentaram alta porcentagem de inibição entre 98 a 100% numa concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, quando comparados à galantamina que inibiu 80% numa concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados são bastante promissores e colocam os alcaloides [1 a 5] na posição de potenciais compostos a serem estudados para o tratamento da doença de Alzheimer.

Os resultados, embora excelentes, são apenas qualitativos, sendo necessário um estudo de estrutura-atividade (QSAR) para se determinar de fato o potencial destes como fármacos promissores para o tratamento da doença de Alzheimer (DA).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a importância da continuidade do estudo das frações das cascas da espécie *E. leiocarpa* e do isolamento dos seus constituintes, na determinação dos metabólitos responsáveis pelas atividades apresentadas.

14. MATERIAIS E MÉTODOS

14.1. Material botânico

As cascas de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foram coletadas em outubro de 2007 na cidade de Arenópolis, no estado de Mato Grosso. O material vegetal foi identificado pelo botânico Celice Alexandre da Universidade Estadual do Mato Grosso, localizada em Tangará da Serra, MT. Uma exsiccata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso e registrada com o número 38639.

14.2. Preparação do extrato e frações

A presença de alcaloides quinolinônicos supracitada na espécie *E. leiocarpa* conduziu ao planejamento de uma extração específica para este grupo de compostos (partição líquido-líquido com adição de ácido e base). Contudo, a separação tradicional (partição líquido-líquido com solventes de polaridade diferentes) foi realizada para efeitos de comparação, tanto química quanto das avaliações em ensaios farmacológicos.

14.3. Técnicas Cromatográficas

Visto o comportamento frente os testes anti-inflamatórios das frações FRA e FrAq, estas foram escolhidas para posterior separação via cromatografia em coluna CC por adsorção em sílica (sílica gel 60; 70-230 e flash 230-400 mesh), cromatografia por partição em fase reversa (C₁₈) e ou cromatografia por exclusão (sephadex). Os solventes para cromatografia foram de grau P.A. utilizados em ordem crescente de polaridade n-hexano, clorofórmio, diclorometano, acetona, acetato de etila, etanol, metanol, ácido acético, ácido fórmico, hidróxido de amônio e água.

A cromatografia em camada delgada (CCD) analítica teve por objetivo o monitoramento das frações eluídas na cromatografia em coluna (CC), bem como analisar a pureza relativa das frações coletadas

e a polaridade frente à mistura de eluentes, através do R_f ($R_f = d_{\text{composto}}/d_{\text{solvente}}$). Foram utilizadas cromatoplasas em sílica F254 marca Merck. Lâmpada de UV, munida com luz ultravioleta de comprimentos de ondas longo 355 nm e curto 254 nm. Foram utilizados como reveladores Dragendorff e sulfato cérico, colocando-se as placas cromatográficas sob a incidência de luz em câmaras escuras adequadas. As cromatoplasas foram mergulhadas em reagentes específicos, denominados reveladores, capazes de revelar classes distintas de compostos conforme a coloração formada, (**Tabela 16**).

Tabela 16. Determinação de classe de compostos através de reveladores cromatográficos

Reagente revelador	Classe de composto	Coloração
Dragendorff	Alcaloides	Laranja
Cloreto férrico (FeCl_3)	Flavonoides	Preto
Sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$)	Esteróis	Marrom

14.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE

Para análise qualitativa dos extratos e das frações foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de escala analítica e ou preparativa marca e modelo SHIMADZU LC 10AT. O cromatógrafo é constituído de conjunto de bombas binárias de solvente (SHIMADZU, modelo LC 10AT) para escala analítica e para escala semipreparativa detector SPD – M 10AVP, com "loop" de 20 μL escala analítica e "loop" de 1 mL escala semipreparativa e coletor de frações FRC – 10A . Os espectros de UV-Vis com detector arranjo de diodo (DAD) foram adquiridos entre 200 e 600 nm, os picos cromatográficos foram monitorados no comprimento de onda máximo (280 nm) dos constituintes da amostra. Para a análise qualitativa dos extratos e frações foi utilizada coluna cromatográfica Varian C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm), e sistema eluente de água 1% ácido fórmico (A) : acetonitrila 1% ácido fórmico (B); com programação de: tempo: 0 min B (10%), 15 min B (16%), 20 min B (17%), 23 min B (20), 35 min B (20%), 40 min B (25%), 50 min B (30), 60 min B (40), fluxo de 1 mL/min, detecção em 280 nm. Para a análise semipreparativa foi utilizada coluna C8 marca Beckman (250 mm x 10 mm; 5 μm), com o

mesmo sistema de eluente e a mesma programação, modificando apenas o fluxo (1.5 mL/min).

14.4. Eletroforese Capilar (EC)

As análises por eletroforese capilar do EB e frações foram realizadas no Laboratório de Eletroforese Capilar sob orientação do Professor Gustavo A. Micke e pela doutoranda Melina Heller. Foi utilizado um equipamento de EC modelo HP^{3D}CE da marca Agilent Technologies equipado com um detector de arranjo de diodos ajustado em 215 nm. A separação foi efetuada a 25°C em um capilar de sílica fundida (48,5 cm x 375 µm diâmetro externo x 50 µm diâmetro interno) adquirido da Polymicro Technologies. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar durante 3 segundos), pela extremidade mais afastada do detector. A voltagem utilizada para a separação foi 30 kV, com polaridade positiva no lado da injeção.

Todos os reagentes e solventes utilizados na preparação do eletrólito de corrida são de grau analítico. Água deionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) foi utilizada no preparo das soluções. Foi empregado metanol grau CLAE para dissolução das amostras e benzilamina (comercial Sigma Aldrich) como padrão interno nas análises. Os eletrólitos tris-hidroximetil-aminometano (Tris) e ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) são de origem comercial (Sigma Aldrich). A composição do eletrólito de corrida otimizado foi 50 mmol L⁻¹ HIBA e 40 mmol L⁻¹ Tris em pH 4.5.

O gênero *Esenbeckia* é rico em alcaloides, estes compostos apresentam estruturas nitrogenadas com características básicas capazes de serem protonadas, produzindo íons susceptíveis a influência de um campo elétrico. Neste contexto, a metodologia desenvolvida teve por finalidade obter um perfil da composição química presente no extrato bruto EB e frações da espécie *E. leiocarpa*, visto que testes preliminares (CCD) sugeriram a presença de alcaloides.

14.5. Fracionamento biomonitorado da Fração Rica Em Alcaloides a partir das cascas da espécie *E. leiocarpa*

A fração rica em alcaloides FRA das cascas de *E. leiocarpa* foi testada quanto a atividade anti-inflamatória em camundongos (albinos swiss) no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, no qual os parâmetros inflamatórios avaliados foram leucócitos e exsudação. Confirmada a atividade anti-inflamatória, procedeu-se ao fracionamento cromatográfico.

Para a separação cromatográfica por coluna em sílica gel foi utilizado uma alíquota de 10 g da FRA. A amostra foi previamente solubilizada em acetato de etila e homogeneizada em cerca de 15 g de sílica gel 60 para coluna. Após a evaporação do solvente, obteve-se a pastilha seca constituída da FRA adsorvida em sílica. A pastilha foi cuidadosamente aplicada sobre uma camada de sílica (300 g), fase estacionária, previamente empacotada em coluna de vidro (h: 40 cm FE Ø: 7 cm). Em seguida, realizou-se a eluição com os seguintes solventes: n-hexano e acetona saturados em hidróxido de amônio. A eluição ocorreu com aumento gradativo da força do solvente, iniciada com n-hexano 100%, elevando a força do eluente com adição escalonada de acetona de 5 em 5%. Foram coletadas 86 frações (FRA 1 – 86) de 300 mL, as quais foram concentradas, sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotatório. As frações obtidas da eluição foram analisadas por CCD empregando n-hexano:acetona:NH₄OH (60:40:1) como eluente. Este procedimento orientou a reunião das frações conforme sua semelhança do perfil cromatográfico.

14.6. Equipamentos utilizados

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C, de DEPT 135, uni e bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) foram obtidos utilizando-se espectrômetros Varian Oxford AS-400, que operam na frequência do hidrogênio-1 a 400 MHz e na frequência do carbono-13 a 100 MHz, respectivamente, e Bruker AC 200F para as análises preliminares de hidrogênio. Nas dissoluções das amostras foram utilizados solventes

conforme a solubilidade dos compostos como tal: clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (MeOD) e água deuterada (D_2O).

Os pontos de fusão foram obtidos em um aparelho Microquímica, com placa aquecedora modelo MQA PF – 301. A rotação óptica será medida com polarímetro da Schmidt-Haensch Polartronic. O espectro de massa com fonte de ionização electrospray (ESI-MS) foi empregado como ferramenta de auxílio para determinação da massa molecular, consistindo de um equipamento triplo quadrupolo íon trap QTrap 3200 da marca Applied Biosystems.

Para testes na região do UV-Vis foi empregado um espectrofotômetro da PerkinElmer com comprimento de onda fixo, em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

Para as análises de IV foi utilizado o equipamento FT-16PC, com amostras preparadas em pastilha de KBr.

14.7. Ação inibitória da acetilcolinesterase

O bioensaio de inibição da acetilcolinesterase foi realizado em nosso laboratório (LQNP) pelo doutorando Aldo Sena, sob a orientação da professora Dra. Inês Maria da Costa Brighente e os procedimentos empregados foram descritos por Mata e colaboradores (Mata, Proenca et al. 2007) com modificações. Em uma cubeta foram adicionados o tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH = 8, a amostra vegetal ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) e a enzima acetilcolinesterase. Após um período de 15 min, à temperatura ambiente, foi adicionado a esta cubeta iodeto de acetiltiocolina e o reagente de Ellman. O analito ficou em repouso por trinta minutos. Após esse período fez-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS a 405 nm. Como controle positivo foi utilizada a galantamina, do fármaco comercial Remynil ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$), e como controle negativo o mesmo solvente em que se dissolveu a amostra vegetal, onde a atividade enzimática foi considerada 100%. Na referência (ou branco) foram utilizados todos os reagentes exceto a enzima.

14.8.Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a migração celular e a exsudação

A avaliação da migração celular e exsudação foi realizado no laboratório de Imunofarmacologia da Farmácia pela doutoranda Patrícia Pozzatti, sob a orientação da professora Dra. Tânia Froude, os procedimentos empregados foram descritos (Saleh, Calixto et al. 1997) com modificações.

14.8.1. Avaliação de atividade anti-inflamatória

Animais

Nos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, 1 mês de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC.

Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente e luz natural, e os mesmos receberam alimentação e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - PP00343/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

14.8.2. Pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

A técnica foi realizada de acordo com os procedimentos descritos previamente conforme Saleh e colaboradores(Saleh, Calixto et al. 1997).

No dia do experimento, os animais receberam 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,95%) ou do agente flogístico carragenina (Cg 1%), administrados na cavidade pleural direita através do espaço intercostal utilizando-se uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno. De acordo com cada protocolo experimental, os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital 4 horas após a administração da carragenina ou da solução salina estéril. A seguir, os mesmos foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, e realizou-se uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Logo, o apêndice

xifóide foi pinçado e a cavidade pleural foi exposta através de duas incisões paralelas ao longo do esterno. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (pH 7,6, NaCl (130 mmolL^{-1}), Na_2HPO_4 (5 mmolL^{-1}), KH_2PO_4 (1 mmolL^{-1}) e heparina (20 UI/mL)). Alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de células. Conforme o protocolo experimental, 10 minutos antes da administração do EB e frações, alguns grupos de animais receberam a injeção com a solução azul de Evans (25 mg/kg , $0,2 \text{ mL/animal}$, i.v.) a qual permite a determinação indireta da concentração da exsudação no lavado da cavidade pleural.

A indometacina (5 mg/kg) e a dexametasona ($0,5 \text{ mg/kg}$) foram utilizadas como fármacos de referência e foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina.

Para o estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses de EB ($10\text{-}100 \text{ mg/kg}$), fração Hex ($10\text{-}50 \text{ mg/kg}$) fração AcOEt ($10\text{-}50 \text{ mg/kg}$), fração Aq ($2\text{-}10 \text{ mg/kg}$), FRA ($1\text{-}10 \text{ mg/kg}$), administrados por via intraperitoneal 0,5 h antes da administração da carragenina. Após 4 h, os animais foram sacrificados e a migração celular e a exsudação foram analisadas.

No estudo do perfil temporal, diferentes grupos de animais receberam a injeção de uma única dose do EB, ou seja, a melhor dose encontrada no estudo da curva dose-resposta (menor dose capaz de inibir o influxo de leucócitos e a exsudação) em diferentes períodos de tempo (0,5, 1 ou 2 h). A migração celular e a concentração da exsudação foram avaliadas 4 h após a administração da carragenina. A partir do estudo da curva tempo-resposta, os resultados obtidos para o EB foram aplicados para as frações.

14.8.3. TÉCNICAS UTILIZADAS

A) CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS

As Aliquotas do lavado da cavidade pleural (200 μL) foram reservadas para a contagem celular total, utilizando-se líquido de Türk (1:20) e câmara de Neübauer com auxílio de microscópio ótico comum (aumento de 400 vezes). Além disso, esfregaços celulares foram realizados para a contagem diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA), os mesmos foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada também em microscópio ótico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

B) COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS CELULARES

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa). As lâminas contendo o sedimento dos lavados da cavidade pleural foram centrifugadas em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) e secas em posição horizontal à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL de corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento por 2 min. A seguir, adicionou-se água deionizada (1 mL) sobre as lâminas com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e as lâminas foram cobertas com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. Por fim, as lâminas foram lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

C) DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO

Uma alíquota (200 μL) do lavado da cavidade pleural foi reservada para a determinação da concentração de azul de Evans. Para isto, a densidade ótica do lavado foi mensurada em leitora de microplacas de ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), em comprimento de onda de 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto e Medeiros(Saleh, Calixto et al. 1997). Para a quantificação das concentrações de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,1 - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tiveram suas densidades óticas determinadas em 620 nm, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$, com o auxílio da equação da reta.

14.9.Avaliação antioxidante do extrato bruto, frações e compostos isolados a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

A) Determinação da atividade antioxidante

Os testes para determinação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, sob a supervisão da Profa. Inês M.C. Brighente.

B) Determinação do teor de compostos fenólicos totais nas amostras

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin Ciocalteau, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores(Anagnostopoulou, Kefalas et al. 2006). A 0,5 mL de uma solução teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em etanol), foram adicionados 5,0

mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteau. Após 3 minutos, foi adicionado 1,0 mL da solução saturada de Na_2CO_3 , agitou-se e a solução descansou por 1 hora. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução teste. Foi construída uma curva analítica com soluções padrão de ácido gálico, nas concentrações de 25 a 500 mg/mL, diluídas em etanol, para comparação ($y = 5,64x + 7,79$ $r^2 = 0,997$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de extrato ou fração seco.

C) Determinação do teor de flavonoides nas amostras

A determinação do teor de flavonoides foi realizado conforme método descrito por Woisky e Salatino (WOISKY and SALATINO 1998). A 0,5 mL de uma solução teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em metanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 2 %. Após 1 hora, as absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco foi utilizado etanol. Foi construída uma curva analítica com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, diluídas em etanol, para comparação ($y = 10,36x - 9,63$ $r^2 = 0,999$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos flavonoides foi determinado em mg de quercetina/g de extrato ou fração seco.

D) Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH (2,2-Difenilpicril-hidrazil)

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH baseia-se no método descrito por Cavin e colaboradores, com algumas modificações (Cavin, Hostettmann et al. 1998). Uma solução de DPPH 0,004% foi adicionada à solução teste nas

concentrações de 5 a 200 ppm. A absorbância das soluções foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (517 nm) após 30 minutos. Através da leitura da absorbância de uma solução de DPPH (2 mL de solução 0,004%), acrescentado de 1 mL de MeOH, obteve-se a absorbância no tempo inicial (A_0). A cada uma das concentrações da solução teste em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorbância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorbância de uma solução teste (1 mL) em etanol (2 mL) foi descontada da absorbância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência do extrato nesse comprimento de onda. A análise foi feita em triplicata. Os valores obtidos foram graficados na forma de % de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde determinou-se a concentração necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50 % (IC50) nas soluções testadas.

E) Determinação do potencial redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole, com adaptações (Waterman and S. 1994). A 100 μL das soluções teste (extratos brutos e frações, diluídos em etanol, na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 1,0 mL da solução de FeCl_3 0,1 molL^{-1} , e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 molL^{-1} , e misturou-se. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. A análise foi feita em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Foi realizada uma curva analítica utilizando soluções padrões de ácido ascórbico nas concentrações de 100 a 1000 ppm ($y = 2,43x + 1,94$, $r^2 = 0,997$). O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico por g de amostra.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., O. Kunert, et al. (2004). "Inhibition of leukotriene biosynthesis by quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa*." Planta Med. **70**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 904-908.
- Adane, E. D., Z. Liu, et al. (2011). "Pharmacokinetic Modeling to Assess Factors Affecting the Oral Bioavailability of the Lactone and Carboxylate Forms of the Lipophilic Camptothecin Analogue AR-67 in Rats." Pharm. Res.(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): No pp. yet given.
- Aguiar-Guadarrama, A. B. and M. Y. Rios (2004). "Geranyl N-dimethylallylanthranilate, a new compound from *Esenbeckia yaaxhokob*." Planta Med. **70**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 85-86.
- Anagnostopoulou, M. A., P. Kefalas, et al. (2006). "Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*)." Food Chemistry **94**(1): 19-25.
- Atta ur, R., S. Malik, et al. (1986). "Rhazimanine, an indole alkaloid from fruits of *Rhazya stricta*." Phytochemistry **25**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1731-1733.
- Barros-Filho, B. A., F. M. Nunes, et al. (2004). "Volatile constituents from *Esenbeckia almawillia* (Rutaceae)." Biochem. Syst. Ecol. **32**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 817-821.
- Barros-Filho, B. A., F. M. Nunes, et al. (2007). "Secondary metabolites from *Esenbeckia almawillia* Kaastra (Rutaceae)." Quim. Nova **30**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1589-1591.
- Beltran, O. G. and L. E. C. Suarez (2003). "Non-polar constituents of *Esenbeckia alata* bark and antimicrobial activity." Rev. Colomb. Quim. **32**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 23-28.
- Bevalot, F., A. Fournet, et al. (1984). "Alkaloids from *Esenbeckia pilocarpoides*." Planta Medica **50**(Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine.): 522-523.
- Boğa, M., U. Kolak, et al. (2011). "Two new indole alkaloids from *Vinca herbacea* L." Phytochemistry Letters **4**(4): 399-403.
- Brandt, V., M. Tits, et al. (1999). " β -Carboline glucoalkaloids from *Strychnos mellodora*." Phytochemistry **51**(Copyright (C) 2012

- American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1171-1176.
- Brito, A. C., L. M. Conserva, et al. (2005). "Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*." Pharm. Biol. (Philadelphia, PA, U. S.) **43**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 53-57.
- Cano, A., M. Espinoza, et al. (2006). "New prenylated flavanones from *Esenbeckia berlandieri* ssp. *acapulcensis*." J. Mex. Chem. Soc. **50**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 71-75.
- Cardoso-Lopes, E. M., J. A. Maier, et al. (2010). "Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease." Molecules **15**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 9205-9213.
- Carvalho, L. H., M. G. Brandao, et al. (1991). "Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **24**(Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine.): 1113-1123.
- Carvalho, L. H. and A. U. Krettli (1991). "Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules." Mem Inst Oswaldo Cruz **86 Suppl 2**(Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine.): 181-184.
- Carvalho, P. L. d. (2009) "A proteção da biodiversidade brasileira: o caso das plantas medicinais."
- Cavin, A., K. Hostettmann, et al. (1998). "Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*." Planta Med. **64**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 393-396.
- Cazarolli, L. H., L. Zanatta, et al. (2006). "Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: their anti-hyperglycemic potential role in diabetes." Chem Biol Interact **163**(3): 177-191.
- Conserva, L. M., O. P. E. S., et al. (2004). "A pimpinellin monomer and dimer isolated from the roots of *Esenbeckia grandiflora*." Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun. **C60**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): o900-o902.
- Cuca-Suarez, L. E., E. D. C. Barrera, et al. (2011). "Quinoline alkaloids and friedelane-type triterpenes isolated from leaves and wood of *Esenbeckia alata* KUNT (Rutaceae)." Quim. Nova **34**(Copyright (C)

- 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 984-986.
- Cuca, S. L. E. and B. C. A. Coy (2007). "Metabolites isolated from *Esenbeckia alata* (Karst & Triana) (Rutaceae)." Biochem. Syst. Ecol. **35**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 386-388.
- Delle, M. F., M. G. Delle, et al. (1989). "Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*." Gazz. Chim. Ital. **119**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 435-439.
- Delle, M. F., B. R. Di, et al. (1990). "Esenbeckia leiocarpa. II. Further components." Gazz. Chim. Ital. **120**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 387-389.
- Delle, M. F., M. Trani, et al. (1995). "(-)-Lunacrinol from *Esenbeckia hieronimi*." Fitoterapia **66**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 474.
- Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products : a biosynthetic approach.
- Dinamarca, M. C., M. Arrazola, et al. (2008). "Release of acetylcholinesterase (AChE) from β -amyloid plaques assemblies improves the spatial memory impairments in APP-transgenic mice." Chem.-Biol. Interact. **175**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 142-149.
- Dolabela, M. F., S. G. Oliveira, et al. (2008). "In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon." Phytomedicine **15**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 367-372.
- Dreyer, D. L. (1980). "Chemotaxonomy of the Rutaceae. Part XIV. Alkaloids, limonoids, and furocoumarins from three Mexican *Esenbeckia* species." Phytochemistry **19**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 941-944.
- Du, H., J. Ren, et al. (2011). "Rapid determination of three alkaloids from *Lotus Plumule* in human serum using an HPLC-DAD method with a short monolithic column." Food Chemistry **129**(3): 1320-1324.
- Feng, H.-T. and S. F. Y. Li (2002). "Determination of five toxic alkaloids in two common herbal medicines with capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **973**(1-2): 243-247.
- Garcia-Beltran, O. J. and L. E. Cuca-Suarez (2005). "NMR spectroscopy as a tool in structural elucidation of substituted 3(1',1'-dimethylallyl)coumarins isolated from *Esenbeckia alata* (Karst & Triana) Tr. & Pl. (Rutaceae)." Actual. Biol. (Medellin, Colomb.) **27**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 71-74.

- Genovese, S., F. Epifano, et al. (2011). "In vitro effects of natural prenyloxycinnamic acids on human cytochrome P450 isozyme activity and expression." Phytomedicine **18**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 586-591.
- Giordani, R. B., L. B. Pagliosa, et al. (2008). "Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)." Química Nova **31**: 2042-2046.
- Giordani, R. B., L. B. Pagliosa, et al. (2008). "Antioxidant and anticholinesterasic effects of *Hippeastrum* species (Amaryllidaceae)." Quim. Nova **31**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2042-2046.
- Govindappa, M., N. Bharath, et al. (2011). "Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of *Crotalaria pallida* Aiton." Afr. J. Pharm. Pharmacol. **5**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2359-2371.
- Guilhon, G. M. S. P., C. S. Baetas, et al. (1994). "2-Alkyl-4-quinolone alkaloids and cinnamic acid derivatives from *Esenbeckia almawillia*." Phytochemistry **37**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1193-1195.
- Guo, A. J. Y., H. Q. Xie, et al. (2010). "Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro." Chem.-Biol. Interact. **187**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 246-248.
- Heinrich, M. and H. L. Teoh (2004). "Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge." J. Ethnopharmacol. **92**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 147-162.
- Hesse, M., H. Meier, et al. (1991). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Stuttgart.
- Ingkaninan, K., P. Temkitthawon, et al. (2003). "Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies." J Ethnopharmacol **89**(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 261-264.
- Itoh, A., T. Tanahashi, et al. (2003). "Two chromone-secoiridoid glycosides and three indole alkaloid glycosides from *Neonauclea sessilifolia*." Phytochemistry (Elsevier) **62**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 359-369.
- Jácome, R. L. R. P., A. B. d. Oliveira, et al. (2004). "Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira")." Química Nova **27**: 897-900.
- Januario, A. H., P. C. Vieira, et al. (2009). "Indolopyridoquinazoline alkaloids from *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae)." Quim. Nova

- 32(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2034-2038.
- Kalotka-Kreglewska, M. (2011). "Antimalarial medications from native remedy." Cent. Eur. J. Immunol. **36**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 100-103.
- Kam, T. S. and P. S. Tan (1990). "Plumeran alkaloids from *Kopsia profunda*." Phytochemistry **29**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2321-2322.
- Kubo, I. (1991). "Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products." J. Chromatogr. **538**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 187-191.
- Kubo, I., P. C. Vieira, et al. (1990). "Efficient isolation of the insect growth inhibitory flavone glycoside rutin from two tropical medicinal plants by rotation locular countercurrent chromatography (RLCC)." J. Liq. Chromatogr. **13**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2441-2448.
- Leena, S. (2002). "Capillary electrophoresis of phytochemical substances." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **27**(5): 679-698.
- Liz, R., D. F. Pereira, et al. (2011). "Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model." Int. Immunopharmacol. **11**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1991-1999.
- Lugasi, A., E. Dworschák, et al. (1998). "Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* l. var *niger*) root." Phytotherapy Research **12**(7): 502-506.
- MAGINA, M. D. A. (2008). Estudo Fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*. Florianópolis, UFSC: 150.
- Mata, A. T., C. Proenca, et al. (2007). "Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices." Food Chem. **103**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 778-786.
- Mata, R., M. L. Macias, et al. (1998). "Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*." Phytochemistry **49**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 441-449.
- Mbeunkui, F., M. H. Grace, et al. (2012). "In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*." Journal of Ethnopharmacology **139**(2): 471-477.
- Melo, M. d. F. F. and C. S. Zickel (2004). "Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil." Acta Botanica Brasilica **18**: 73-90.

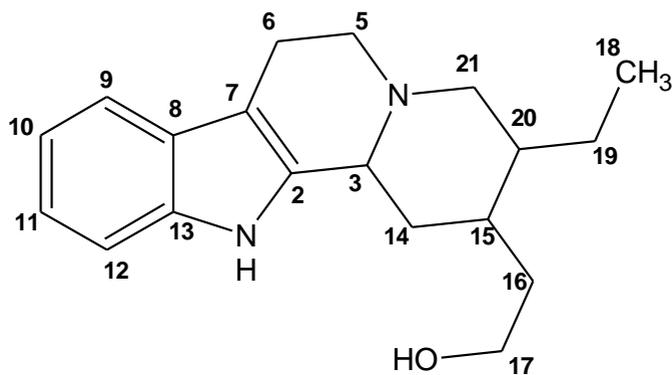
- Moghaddam, F. M., M. M. Farimani, et al. (2007). "Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja khuzistanica*." Evid Based Complement Alternat Med **4**(Copyright (C) 2012 U.S. National Library of Medicine.): 95-98.
- Nakatsu, T., T. Johns, et al. (1990). "Isolation, structure, and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*." J. Nat. Prod. **53**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1508-1513.
- Napolitano, H. B., M. Silva, et al. (2004). "Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes." Braz. J. Med. Biol. Res. **37**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1847-1852.
- Nunes, F. M., B. A. Barros-Filho, et al. (2005). "1H and 13C NMR spectra of 3,8-dimethoxyfuro[3,2-g]coumarin and maculine from *Esenbeckia grandiflora* Martius (Rutaceae)." Magn. Reson. Chem. **43**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 864-866.
- Nunes, F. M., B. A. Barros-Filho, et al. (2006). "3,3-Diisopentenyl-N-methyl-2,4-quinoldione from *Esenbeckia almawillia*: the antitumor activity of this alkaloid and its derivatives." Nat. Prod. Commun. **1**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 313-318.
- Oliveira, F. M., A. E. G. Santana, et al. (1996). "Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species." Phytochemistry **41**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 647-649.
- Pereira, M. A., L. M. Conserva, et al. (2004). "A pimpinellin monomer and dimer isolated from the roots of *Esenbeckia grandiflora*." Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun. **C60**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): o900-o902.
- Pozzatti, P., d. R. G. Oliveira, et al. (2011). "*Esenbeckia leiocarpa* Engl. inhibits inflammation in a carrageenan-induced murine model of pleurisy." J. Pharm. Pharmacol. **63**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1091-1102.
- Prior, R. L., X. Wu, et al. (2005). "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements." J. Agric. Food Chem. **53**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 4290-4302.
- Richard, A. D. (2001). "Natural products and plant disease resistance." Nature **411**(14): 843-847.
- Rios, M. Y., A. B. Aguilar-Guadarrama, et al. (2002). "Furoquinoline alkaloids, furocoumarins and terpenes from *Esenbeckia littoralis*

- (Rutaceae)." Biochem. Syst. Ecol. **30**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 977-979.
- Rios, M. Y. and G. Delgado (1992). "Polyprenols and acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*." Phytochemistry **31**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 3491-3494.
- Rios, M. Y. and G. Delgado (2002). "Furocoumarins, terpenes and sterols from *Esenbeckia ovata* Kunth." Biochem. Syst. Ecol. **30**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 697-699.
- Rios, M. Y., E. Rosas-Alonso, et al. (2002). "Alkaloids, coumarins and sesquiterpenes from *Esenbeckia conspecta* Kunt (Rutaceae)." Biochem. Syst. Ecol. **30**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 367-369.
- Robert, G. M. T., A. Ahond, et al. (1983). "Aspidosperma from Guiana: alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*." J. Nat. Prod. **46**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 694-707.
- Saleh, T. S. F., J. B. Calixto, et al. (1997). "Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy." Eur. J. Pharmacol. **331**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 43-52.
- Santos, C. A., A. M. P. R. Passos, et al. (2011). "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents." Revista Brasileira de Farmacognosia **21**: 1077-1083.
- Schmeda-Hirschmann, G., J. A. Rodriguez, et al. (2003). "Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo")." Free Radical Res. **37**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 447-452.
- Silva, F. A. M., M. F. M. Borges, et al. (1999). "Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante." Quimica Nova **22**: 94-103.
- Simões, C. M. O., E. P. Schenkel, et al. (2003). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis, Editora UFRGS e UFSC.
- Simpson, D. S. and H. Jacobs (2005). "Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia pentaphylla* (Rutaceae)." Biochem. Syst. Ecol. **33**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 841-844.
- Sousa, C. M. d. M., H. R. e. Silva, et al. (2007). "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais." Quimica Nova **30**: 351-355.
- Trani, M., A. Carbonetti, et al. (2004). "Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *brevipetiolata*." Fitoterapia

- 75(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 99-102.
- Trani, M., M. F. Delle, et al. (1997). "Chemistry of *Esenbeckia* genus. IV. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *grandiflora*." Gazz. Chim. Ital. **127**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 415-418.
- Valverde, J., G. Tamayo, et al. (1999). "β-Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*." Phytochemistry **52**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1485-1489.
- Verpoorte, R., C. L. M. Ruijgrok, et al. (1982). "Medicinal plants of Surinam. II. Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*." Planta Med. **46**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 149-152.
- Viegas Junior, C., V. d. S. Bolzani, et al. (2004). "Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer." Quimica Nova **27**: 655-660.
- Vitagliano, J. C. and J. Comin (1970). "Argentine plant studies. XXIX. Limonoids from *Esenbeckia febrifuga* and *Heliopsis Longifoliata*." An. Asoc. Quim. Argent. **58**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 273-275.
- Vitagliano, J. C. and J. Comin (1970). "Argentine plants studies. XXVIII. Alkaloids from *Esenbeckia febrifuga*." An. Asoc. Quim. Argent. **58**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 59-61.
- Waterman, P. G. and M. S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites.
- WOISKY, R. G. and A. SALATINO (1998). "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control." Journal of Apiculture Research **37**: 99-105.
- Worthley, E. G. and C. D. Schott (1969). "Biologically-active compounds in some flowering plants." Life Sci. **8**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 225-238.
- Yen, G.-C. and H.-Y. Chen (1995). "Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity." J. Agric. Food Chem. **43**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 27-32.

16. ANEXOS

Dihidrocoringanteol [1]



Nº	δ ppm	(HMQC) H-C 2J	DEPT - 135	(COSY) H-H	(HMBC) C-H 3J
C18	10,96	0,93 t	CH ₃	1,14 1,68	1,14 1,68
C6	21,60	2,75 3,00	CH ₂	2,75 – 3,00 3,00 – 2,58	2,58 3,09
C19	23,40	1,14 1,68	CH ₂	1,68 – 0,93 1,68 – 1,14	0,93
C14	35,23	1,33 2,19	CH ₂	1,33 – 2,19 1,33 – 3,09 2,19 – 3,09	2,00 3,09
C16	35,41	1,33 1,95	CH ₂	1,33 – 1,95 1,95 – 1,44	3,72
C15	37,21	1,44	CH	1,95	1,33 1,50 1,95 2,19 3,09 3,72 0,93
C20	41,57	1,50	CH	-	1,14 1,95 2,19 3,10
C5	53,04	2,58 3,09	CH ₂	2,58 – 2,75 2,58 – 3,00 2,58 – 3,09	2,19 3,00 3,10 1,33
C3	59,82	3,09	CH	1,95 2,19	2,19 2,58 3,09
C21	60,09	3,10 2,19	CH ₂	3,10 – 2,19	2,58 3,09

C17	60,33	3,72 3,72	CH ₂	1,33 1,95	1,95 3,00 3,09 2,58 2,75 7,50 7,96 (NH)
C7	107,66	-	C	-	7,14 7,50 7,14 7,31
C12	110,83	7,31 d	CH	-	7,31
C9	118,01	7,50 d	CH	-	7,31
C10	119,15	7,10 dd	CH	-	7,50
C11	121,07	7,14 dd	CH	-	7,10 7,31 7,50
C8	127,33	-	C	-	7,96 (NH) 2,75 3,00 7,14
C2	135,00	-	C	-	7,50 7,96 (NH)
C13	136,09	-	C	-	7,50 7,96 (NH)

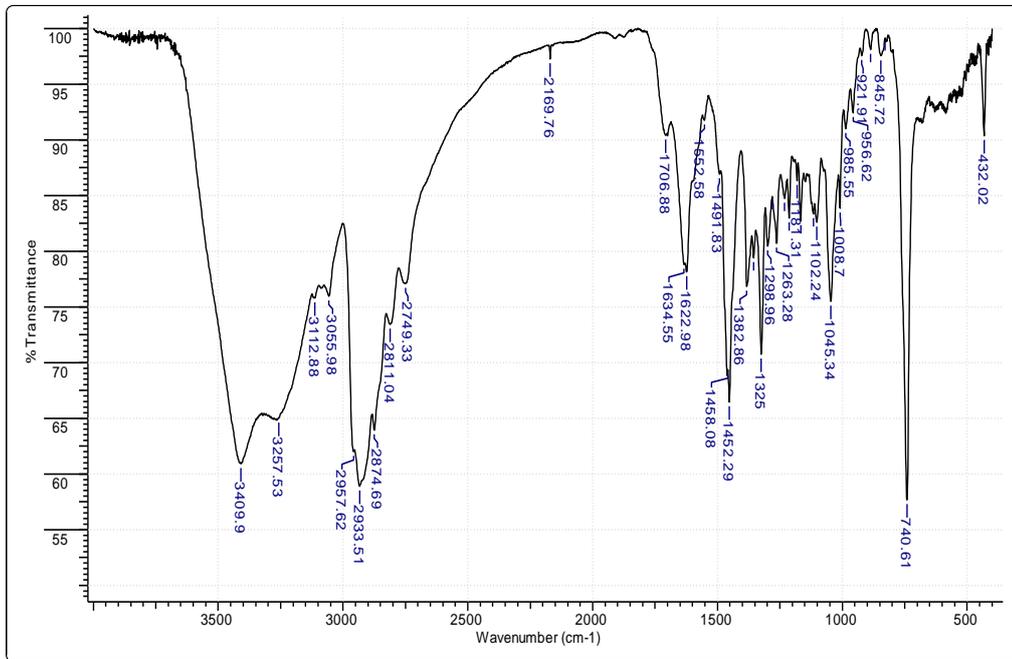


Figura 34. Espectro de infravermelho (KBr) do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

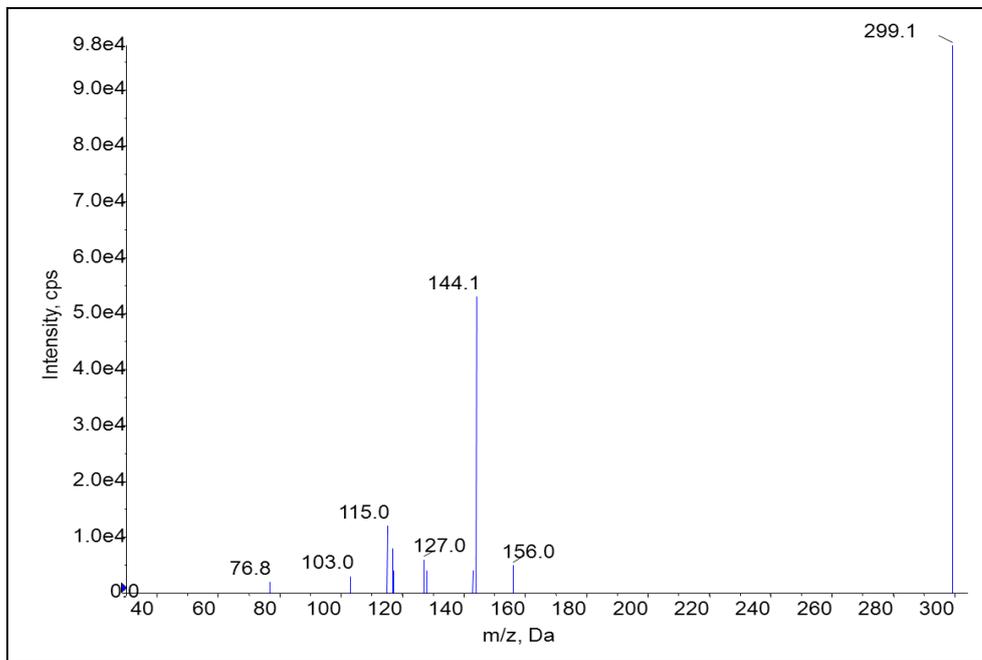


Figura 35. Espectro de ESI-MS do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	2.7329	Comment	carbono	Date	22 Dec 2011 17:07:44
Date Stamp	22 Dec 2011 17:07:44				
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\nmr1\Heros Fr6-12\2\fid			Frequency (MHz)	50.32
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	31290	Origin	spect
Owner	root	Points Count	32768	Pulse Sequence	zspg
SW(cyclical) (Hz)	11990.41	Solvent	CHLOROFORM-d	Receiver Gain	32768.00
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	11990.04	Temperature (degree C)	27.700
				Spectrum Offset (Hz)	5028.4072

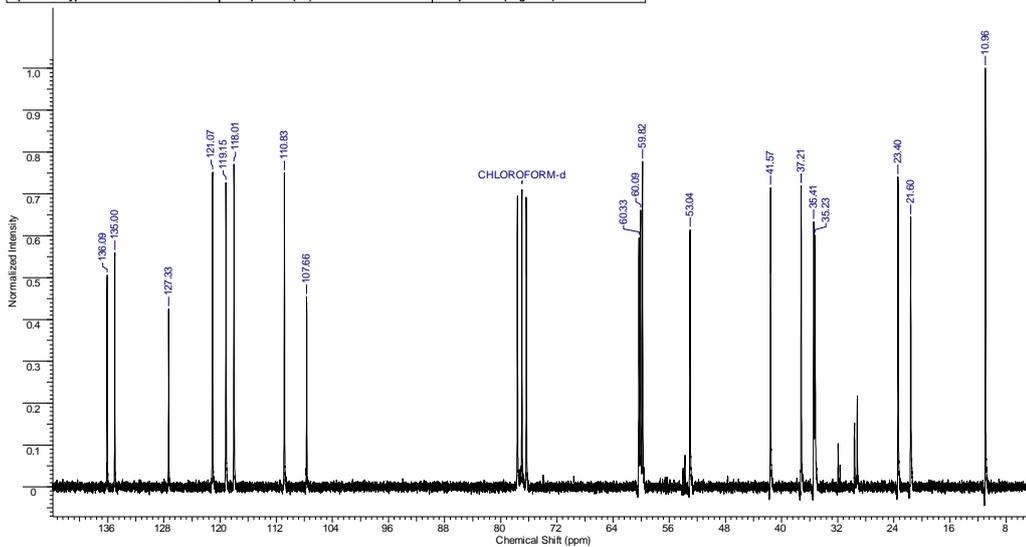


Figura 36. RMN de ¹³C do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

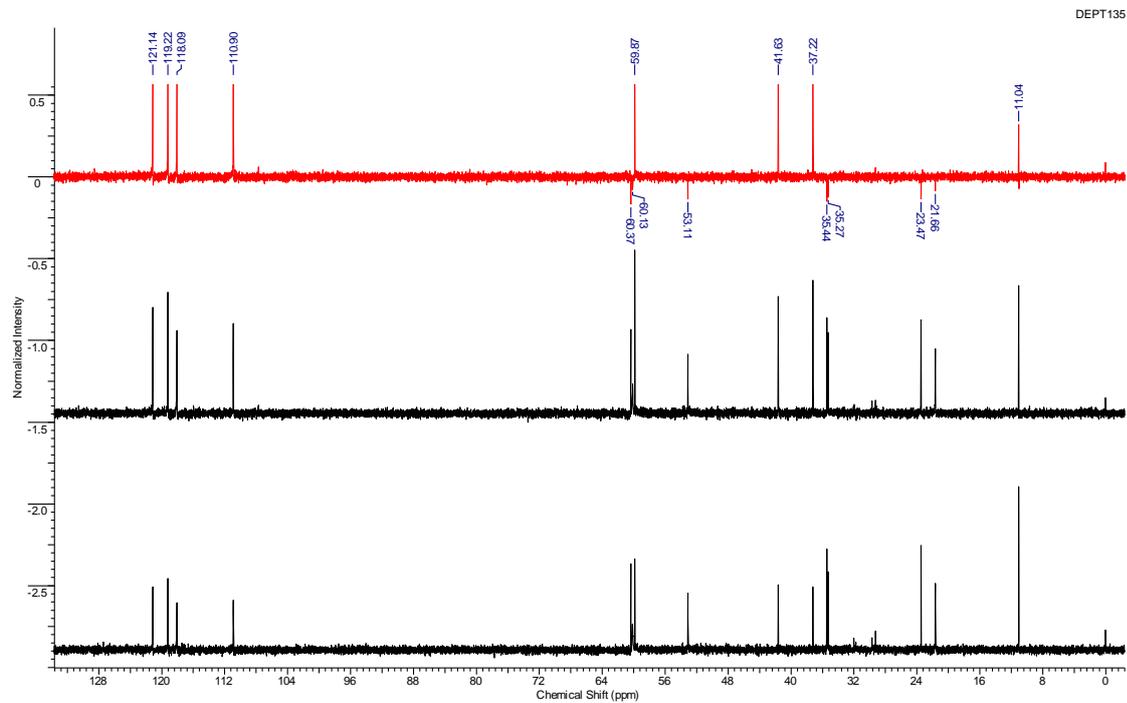


Figura 37. DEPT 135 do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

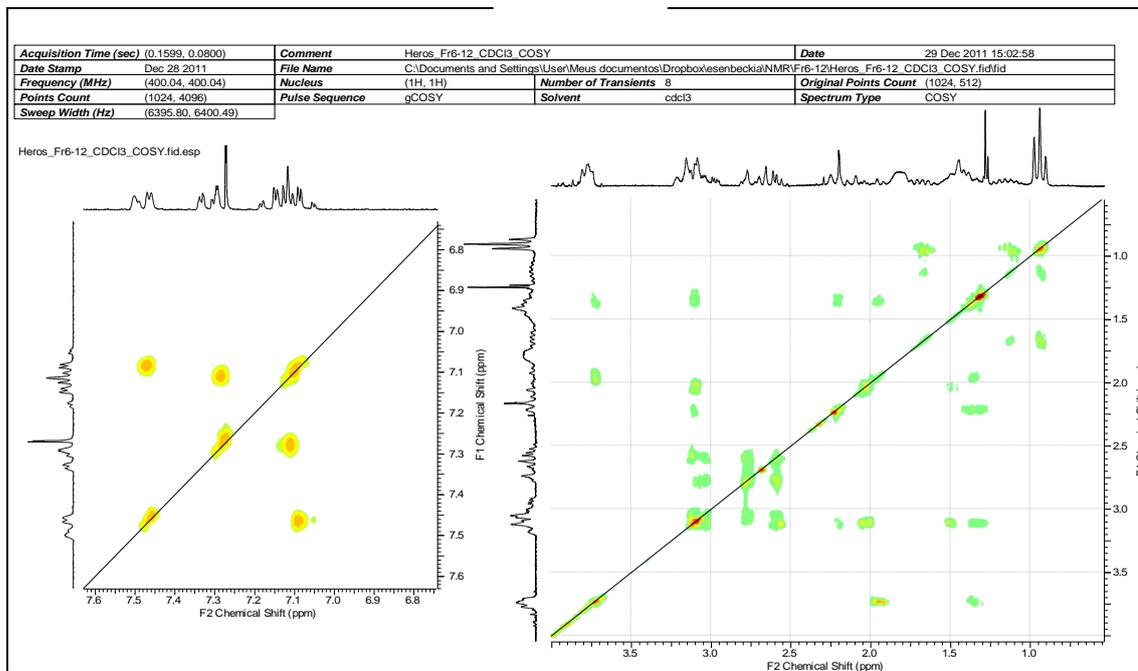


Figura 38. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1281, 0.0150)	Comment Heros_Fr6-12_CDCl3_HMQC	Date 29 Dec 2011 15:01:20
Date Stamp Dec 28 2011	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\Fr6-12\Heros_Fr6-12_CDCl3_HMQC.fid\fid	
Frequency (MHz) (400.04, 100.60)	Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 32
Points Count (1024, 1024)	Pulse Sequence gHMQC	Solvent cdcl3
Sweep Width (Hz) (6395.80, 17084.63)		Original Points Count (820, 256)
		Spectrum Type HMQC

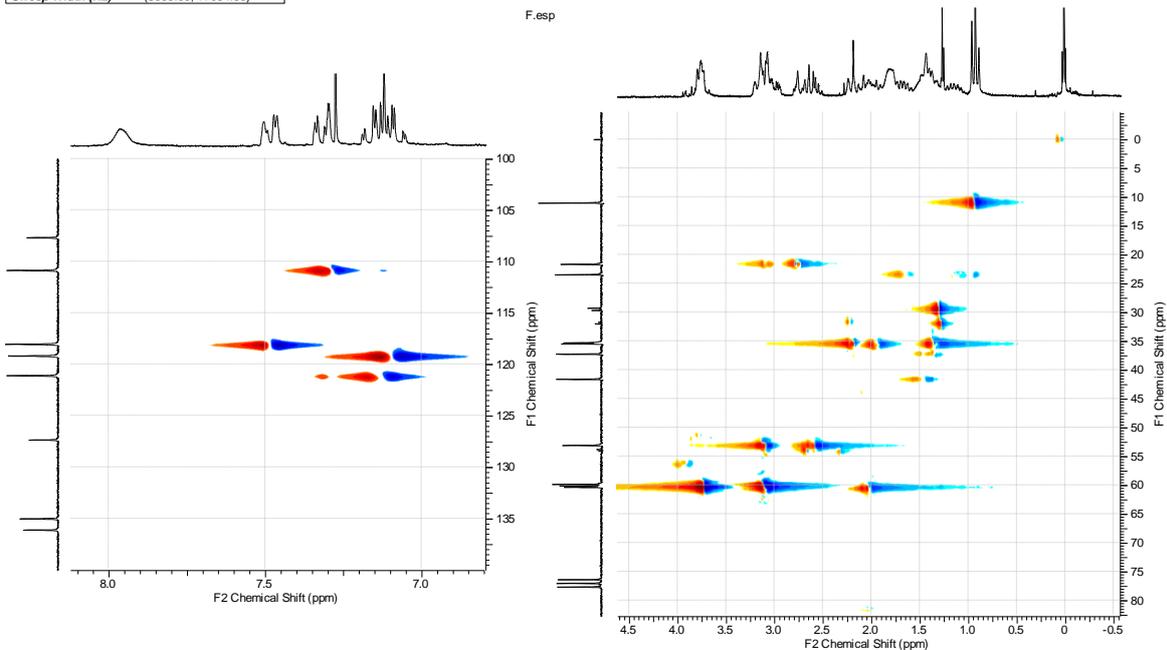


Figura 39. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1281, 0.0212)	Comment Heros Fr6-12_CDCI3 HMBC	Date 29 Dec 2011 15:00:18
Date Stamp Dec 28 2011	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\Fr6-12\Heros Fr6-12_CDCI3 HMBC.fid.fid	
Frequency (MHz) (400.04, 100.60)	Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 16
Points Count (1024, 2048)	Pulse Sequence gHMBC	Solvent cdcl3
Sweep Width (Hz) (6395.80, 24128.22)		Original Points Count (820, 512)
		Spectrum Type HMBC

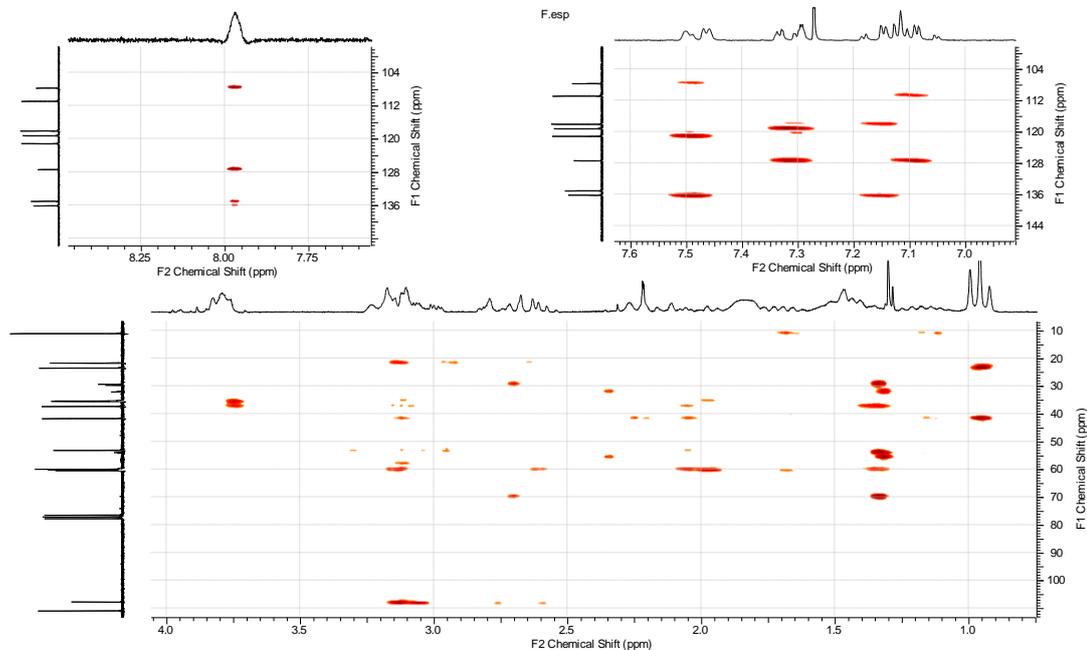
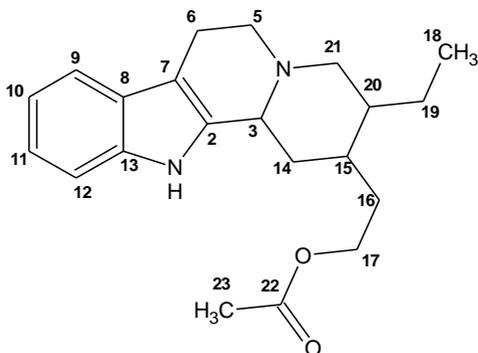


Figura 40. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto di-hidrocorinanteol [1] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acetil di-hidrocorinanteol [3]



Nº	δppm	(HMQC) H-C ² J	DEPT - 135	(COSY) H-H	(HMBC) C-H ³ J
C18	11,32	0,95	CH ₃	1,21 1,69	1,69
C23	21,07	2,06	CH ₃	4,20	-
C6	22,43	2,98 2,73	CH ₂	2,73 – 2,98	3,14
C19	24,54	1,69 1,21	CH ₂	1,69 – 1,21 0,95	0,95 (forte)
C16	32,68	1,43 2,07	CH ₂	1,44 – 1,44 1,29 2,16	-
C14	35,62	2,47 1,29	CH ₂	2,47 – 1,29 1,29 – 1,48	-
C15	38,29	1,45	CH	1,29 4,20	1,44 1,48 1,49 2,16 3,09 (forte) 4,20 (fraco) 0,95 (forte)
C20	42,73	1,48	CH	-	1,21 2,16 3,09
C5	54,51	3,14 2,63	CH ₂	3,14 – 2,63 2,63 – 3,09	-
C21	61,32	3,09 2,16	CH ₂	3,09 – 2,16 3,09 – 2,63 2,16 – 1,44	1,21 1,69(forte)
C3	61,69	3,26	CH	1,29	2,63 (forte) 3,14 (forte)
C17	63,68	4,20 4,20	CH ₂	1,48 2,06	-
C7	107,85	-	C	-	2,73(fraca) 3,14(forte) 7,38(fraca)

C12	112,12	7,29	CH	7,29 – 7,04	6,97(forte)
C9	118,74	7,38	CH	7,38 – 6,97	7,04(fraca)
C10	119,91	6,97	CH	7,04 7,38	7,29(forte)
C11	122,11	7,04	CH	7,29 6,97	7,38(forte)
C8	128,44	-	C	-	6,97(forte) 7,29(fraca)
C2	135,67	-	C	-	-
C13	138,22	-	C	-	7,04(fraca) 7,38(forte)
C22	173,23	-	C	-	2,06

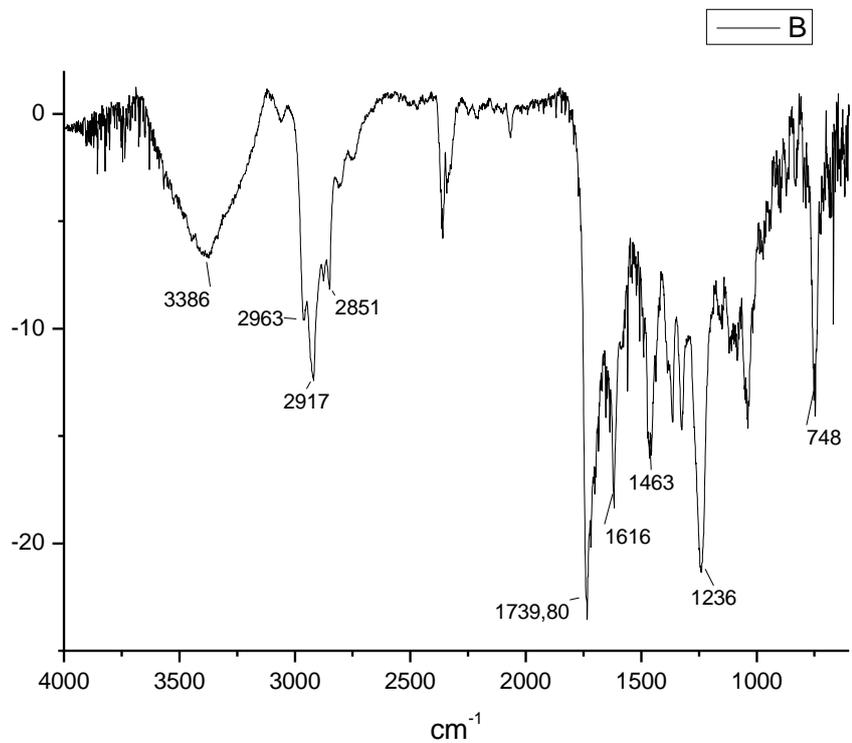


Figura 41. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

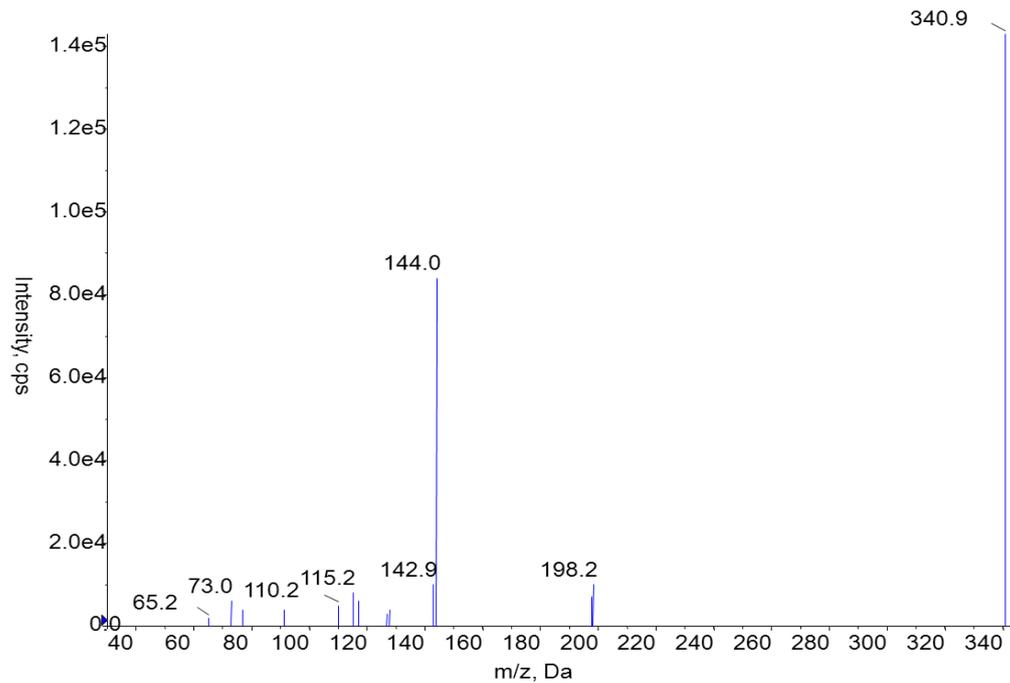


Figura 42. Espectro de ESI-MS do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	1.3005	Date	31 Dec 2011 11:08:04		
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\essenbeckia\NMR\fr20-23-7e8\Heros_FR20-23_7-8_MeOD_C13.fid.tif				
Frequency (MHz)	100.60	Nucleus	13C	Origin	Varian
Points Count	65536	Pulse Sequence	Unknown	Spectrum Offset (Hz)	10719.5264
				Original Points Count	31413
				Sweep Width (Hz)	24154.59

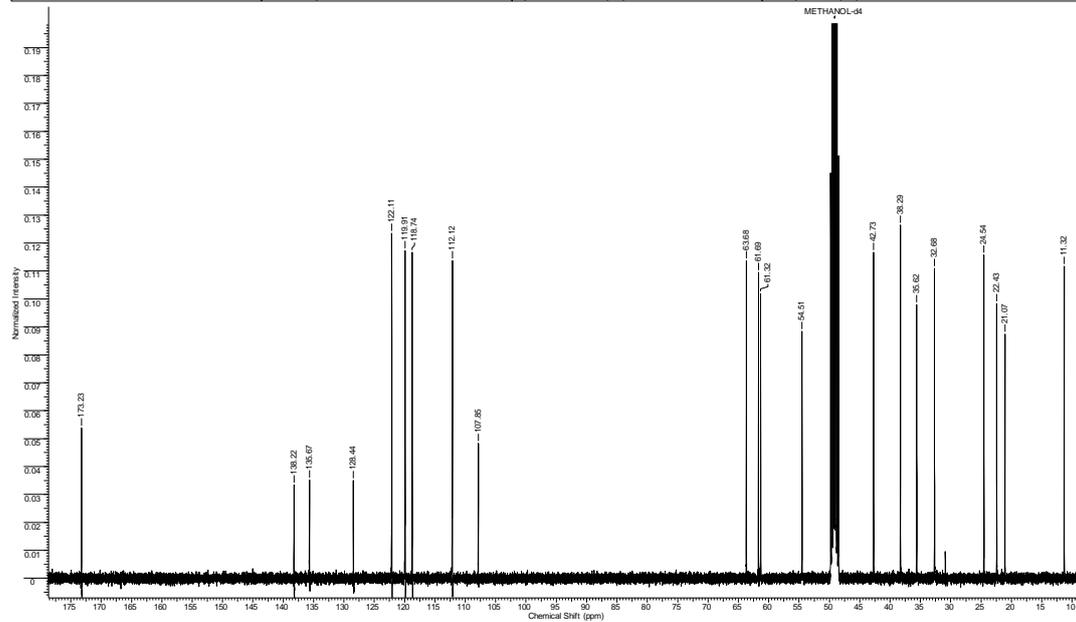


Figura 44. RMN de ^{13}C do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

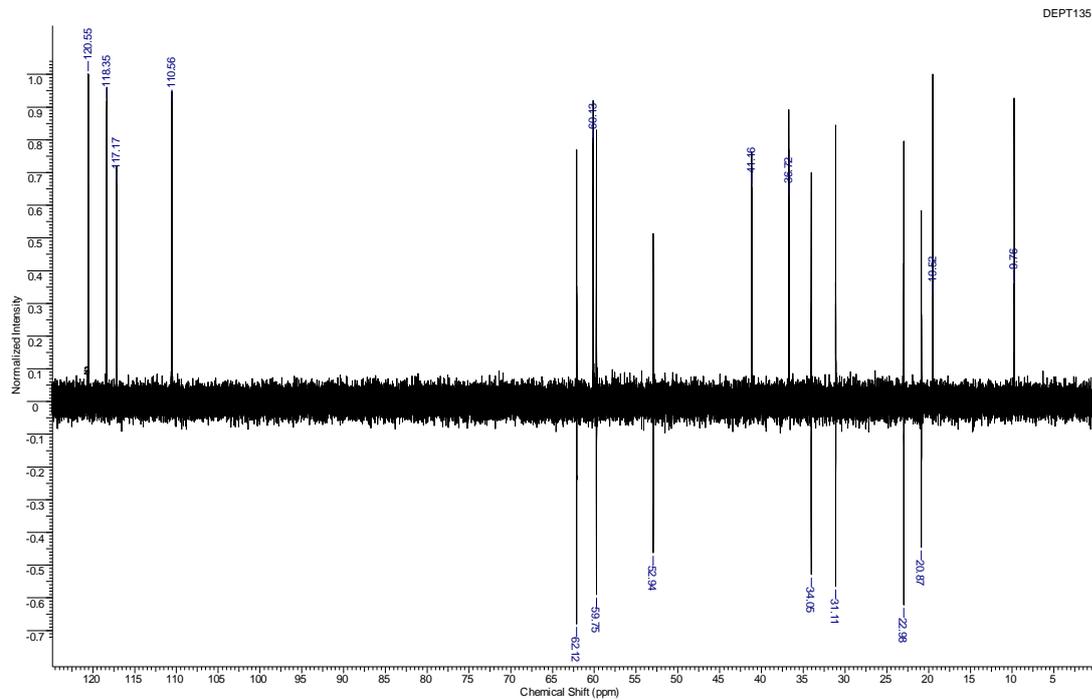


Figura 45. DEPT 135 do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	0.1599, 0.0312	Date	03-Jan-2012 10:33:52
File Name	C:\Documents and Settings\User1\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\Fr20-23-7e8\Heros_FR20-23_7-8_MeOD_gCOSY.fid.tif		
Frequency (MHz)	400.04, 400.04	Nucleus	¹ H, ¹ H
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	gCOSY
Title		Origin	Varian
		Spectrum Type	COSY
		Original Points Count	(1024, 200)
		Sweep Width (Hz)	(6395.80, 6395.80)

F.esp

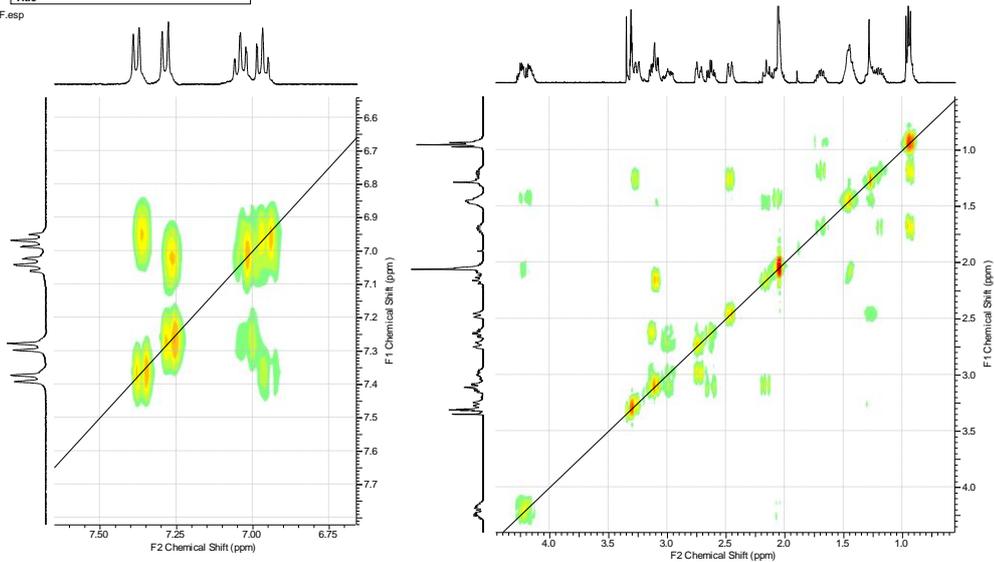


Figura 46. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	(0.1993, 0.0299)	Date	18 Jul 2011 09:24:48	Date Stamp	Jul 15 2011
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\fr20-23-7e8\Heros_FR20-23_7-8_MeOD_gHSQC.fid\fid				
Frequency (MHz)	(400.04, 100.60)	Nucleus	(1H, 13C)	Number of Transients	32
Points Count	(2048, 2048)	Pulse Sequence	gHSQC	Solvent	cd3od
Sweep Width (Hz)	(6398.92, 17092.98)	Original Points Count	(1276, 512)	Spectrum Type	HSQC

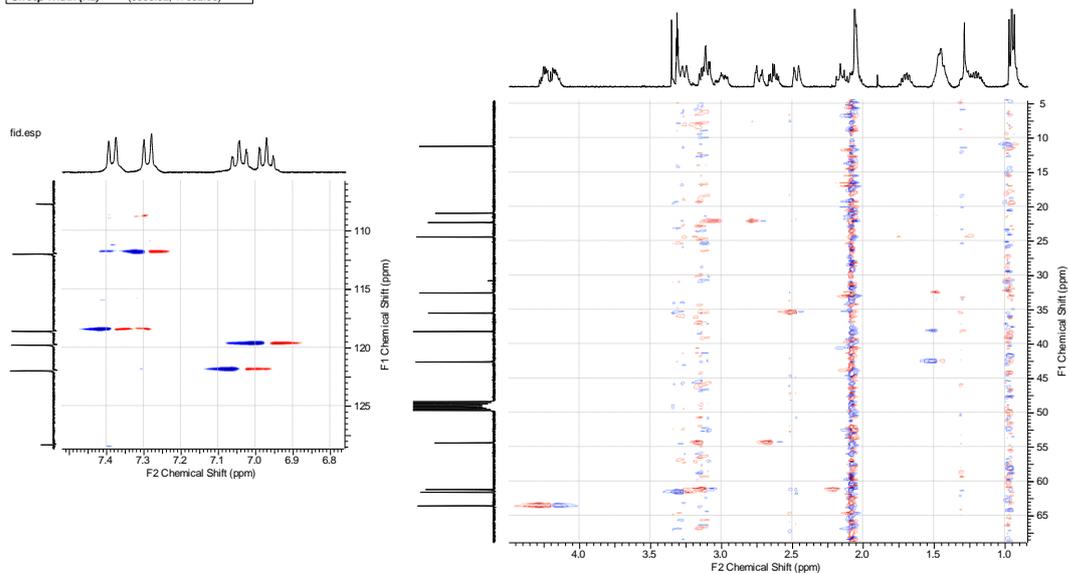


Figura 47. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HSQC do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1281, 0.0212)	Comment Heros_F16-12_CDCl3_HMBC	Date 29 Dec 2011 15:00:18
Date Stamp Dec 28 2011	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\F16-12\Heros_F16-12_CDCl3_HMBC.fid\fid	
Frequency (MHz) (400.04, 100.60)	Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 16
Points Count (1024, 2048)	Pulse Sequence ghMBC	Solvent cdcl3
Sweep Width (Hz) (6395.80, 24128.22)		Spectrum Type HMBC

F.esp

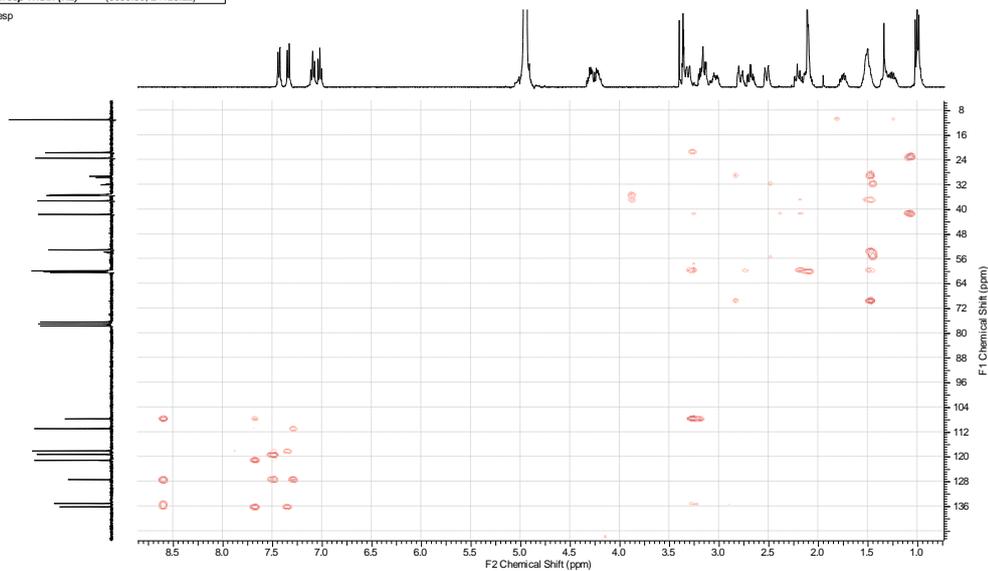
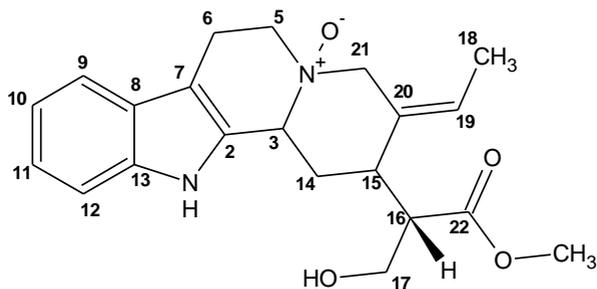


Figura 48. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto acetil-corinanteol [3] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

N-Óxido Isositsiriquina [2a-b]



N°	Composto 2a		Composto 2b		Literatura (CDCl ₃)
	¹³ C (MeOH)	¹ H (MeOH)	¹³ C (MeOH)	¹ H (MeOH)	
C18	13,98	1,69	14,20	1,79	13,48
C6	20,19	3,13	20,19	3,13	17,96
C14	28,78	2,33 2,75	28,00	2,33 2,71	29,73
C15	34,05	3,11	33,30	3,11	32,81
C16	51,22	2,34	50,40	2,20	53,23
OMe	52,09	3,49	52,54	3,76	52,18
C17	62,78	3,96 3,87	62,91	3,47 3,47	61,60
C5	67,62	3,74	67,62	3,74	50,21
C21	67,62	3,44 4,45	67,62	3,41 4,32	53,77
C3	71,10	4,52	71,24	4,52	49,63
C7	106,54	-	106,13	-	106,96
C12	112,77	7,37	112,64	7,34	111,50
C9	119,30	7,49	119,30	7,47	118,06
C10	120,81	7,06	120,70	7,05	119,60
C11	123,52	7,13	123,44	7,15	122,11
C8	127,72	-	127,72	-	126,90
C20	129,61	-	128,83	-	131,33
C2	131,10	-	131,20	-	131,40
C19	131,92	5,75	132,82	5,87	127,22
C13	138,84	-	138,78	-	136,56
C22	175,70	-	174,18	-	174,68

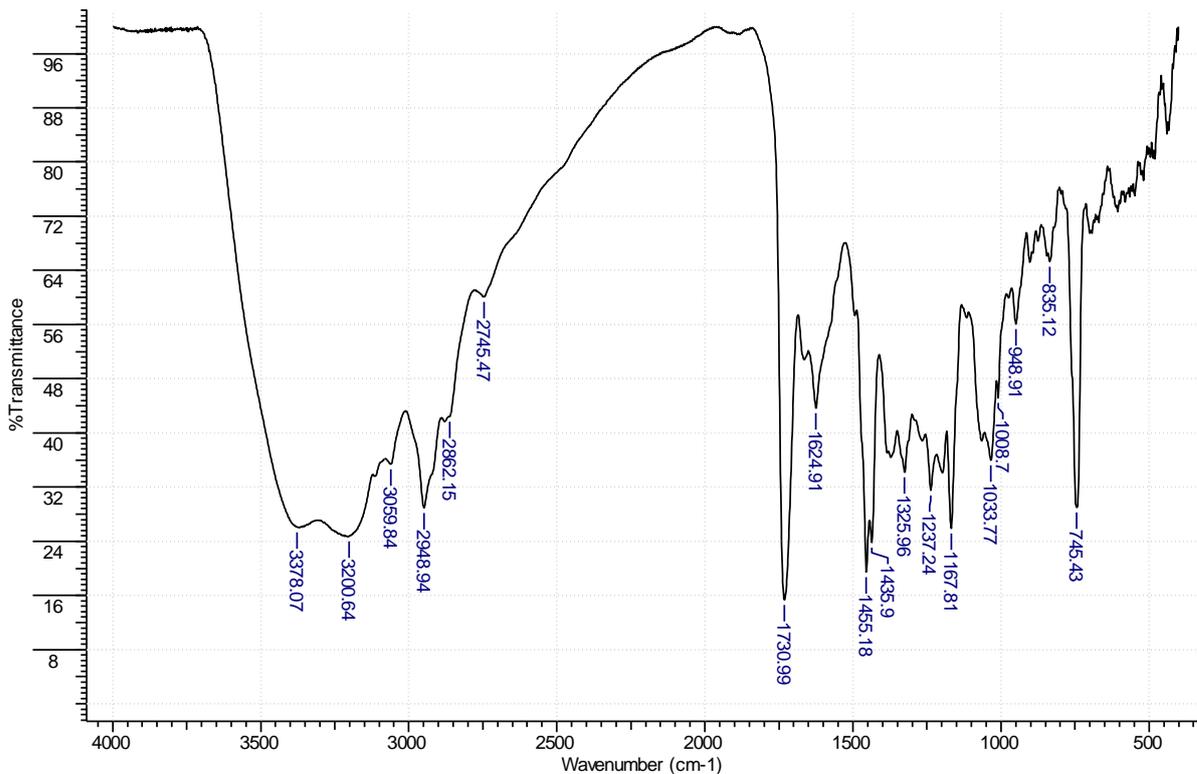


Figura 49. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto isositsiriquina N-Óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

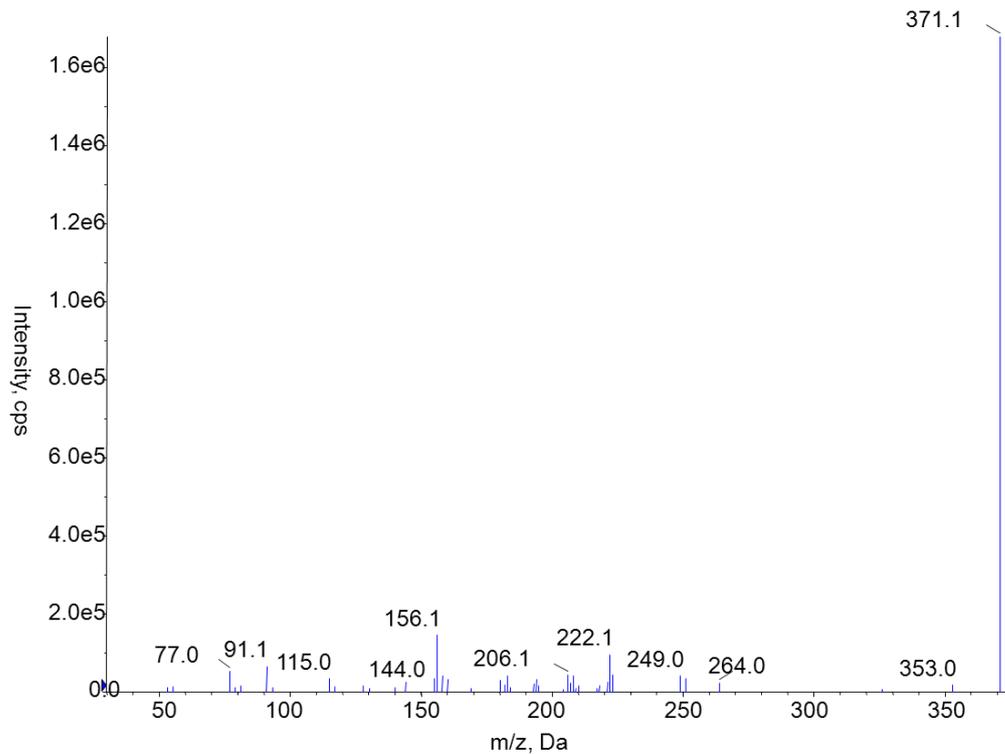


Figura 50. Espectro de ESI-MS do composto isositsiriquina *N*-óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	1.9980	Date	Mar 29 2011	Date Stamp	Mar 29 2011
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\DROPBOX\ESENBECKIA\NMR\FR26-30\HEROS_FR26-30_CD3OD_H1.FID\FID				
Frequency (MHz)	400.04	Nucleus	¹ H	Number of Transients	8
Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	20.00
Spectrum Offset (Hz)	2402.4749	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	6402.05
				Original Points Count	12791
				Solvent	METHANOL-d4
				Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

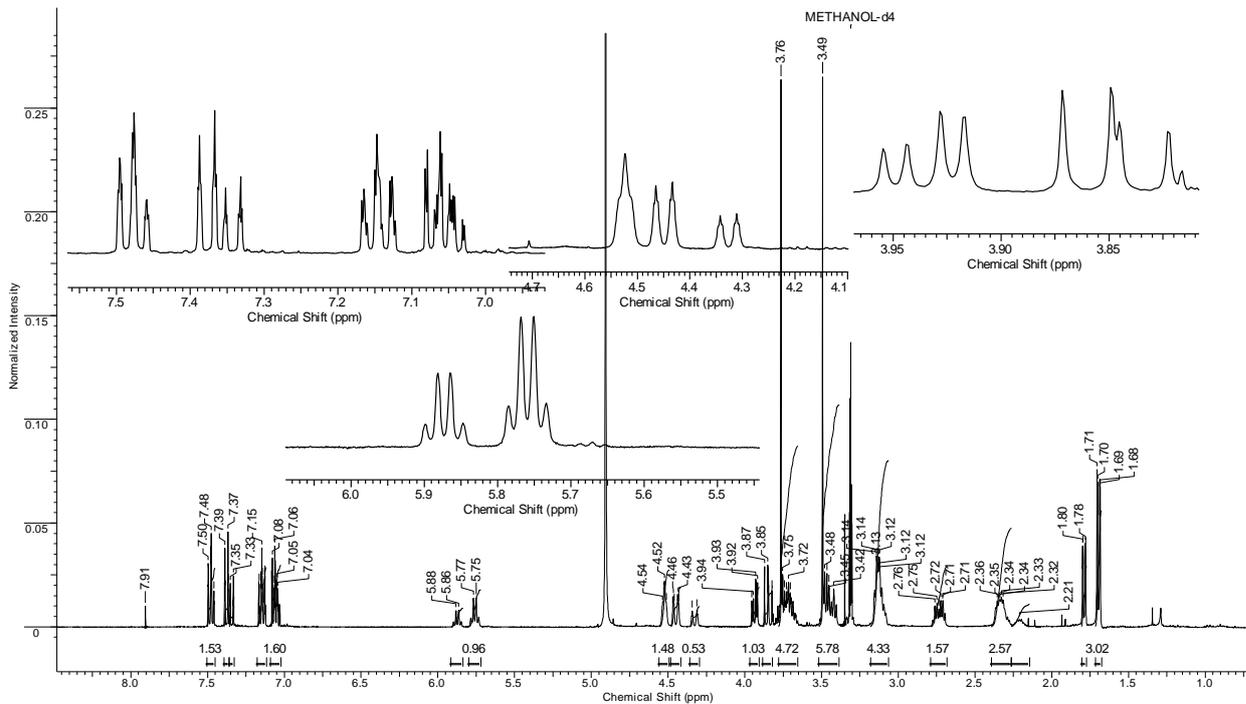


Figura 51. RMN de ¹H do composto isositsiriquina N-Óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	1.3005	Date	Mar 31 2011	Date Stamp	Mar 31 2011
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\lr26-30\Heros_FR26-30_CD3OD_C13.fid.tif				
Frequency (MHz)	100.60	Nucleus	¹³ C	Number of Transients	29376
Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	20.00
Spectrum Offset (Hz)	10719.7988	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	24154.59
				Original Points Count	31413
				Solvent	METHANOL-d4
				Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

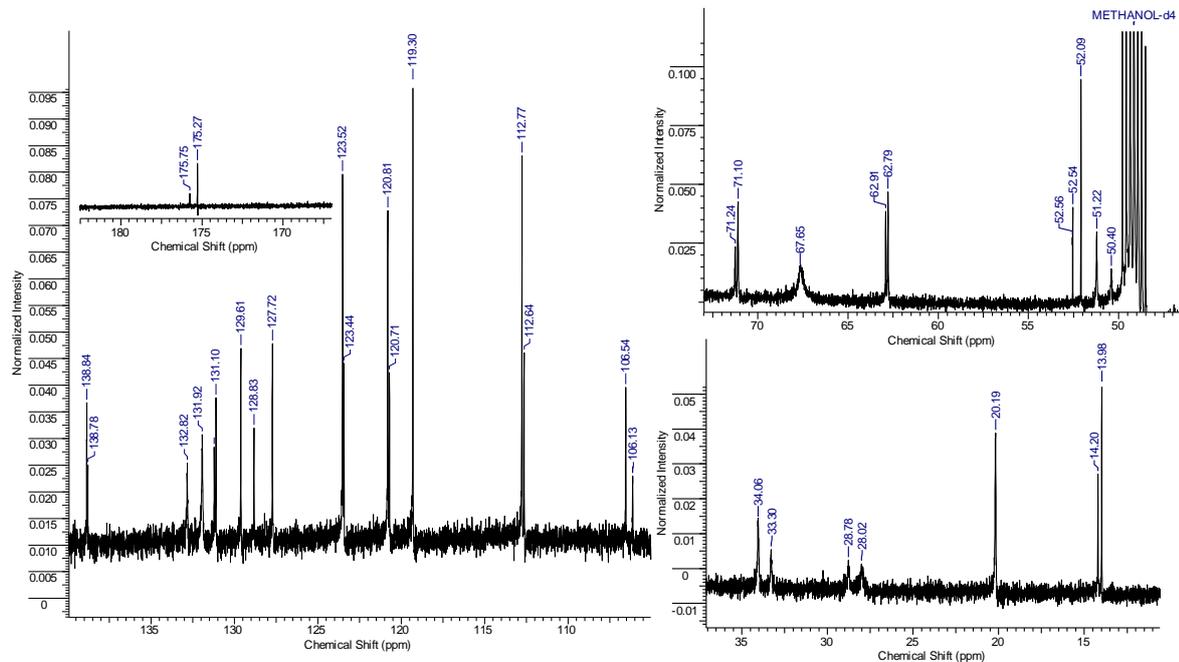


Figura 52. RMN de ¹³C do composto isotsiriquina *N*-Óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

DEPT135

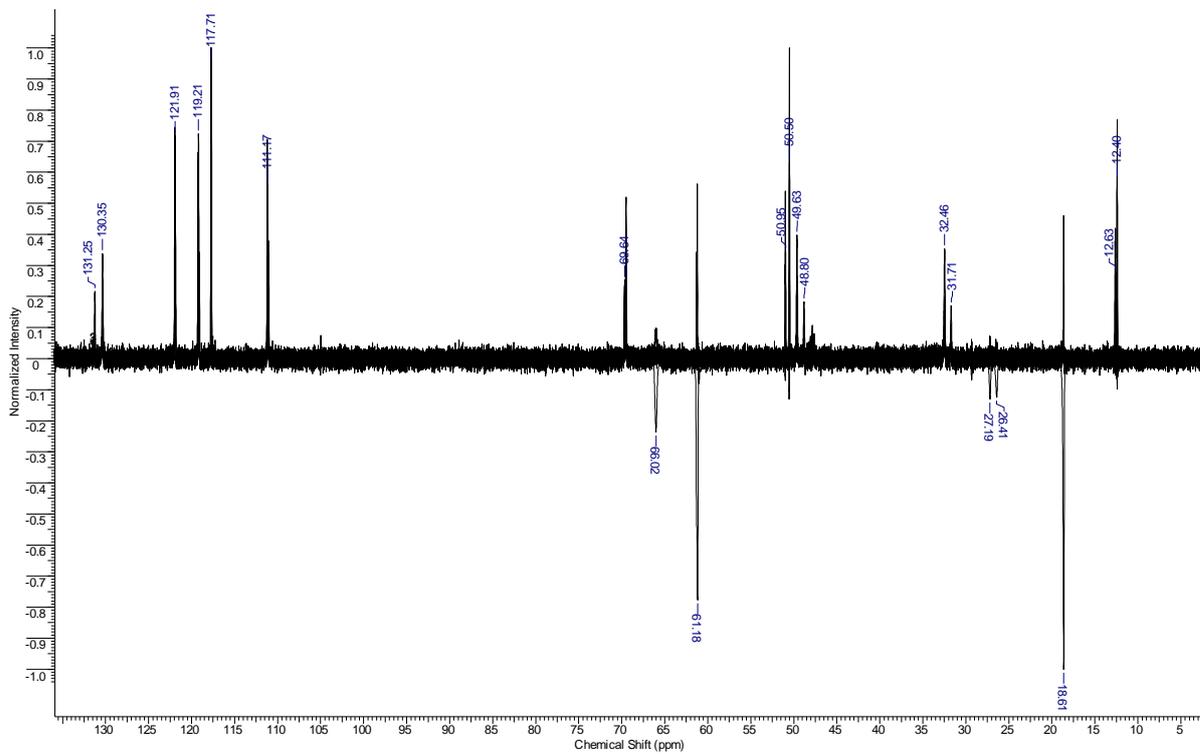


Figura 53. DEPT 135 do composto isositsiriquina *N*-óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	(0.1599, 0.0200)	Date	29 Mar 2011 15:03:40	Date Stamp	Mar 29 2011		
File Name	C:\Documents and Settings\User\meus documentos\esenbeckia\NMR\fr26-30\Heros_FR26-30_CD3OD_cosy.fid\fid	Frequency (MHz)	(400.04, 400.04)				
Nucleus	(1H, 1H)	Number of Transients	4	Original Points Count	(1024, 128)	Points Count	(1024, 1024)
Pulse Sequence	COSY	Solvent	cd3od	Spectrum Type	COSY	Sweep Width (Hz)	(6395.80, 6395.80)

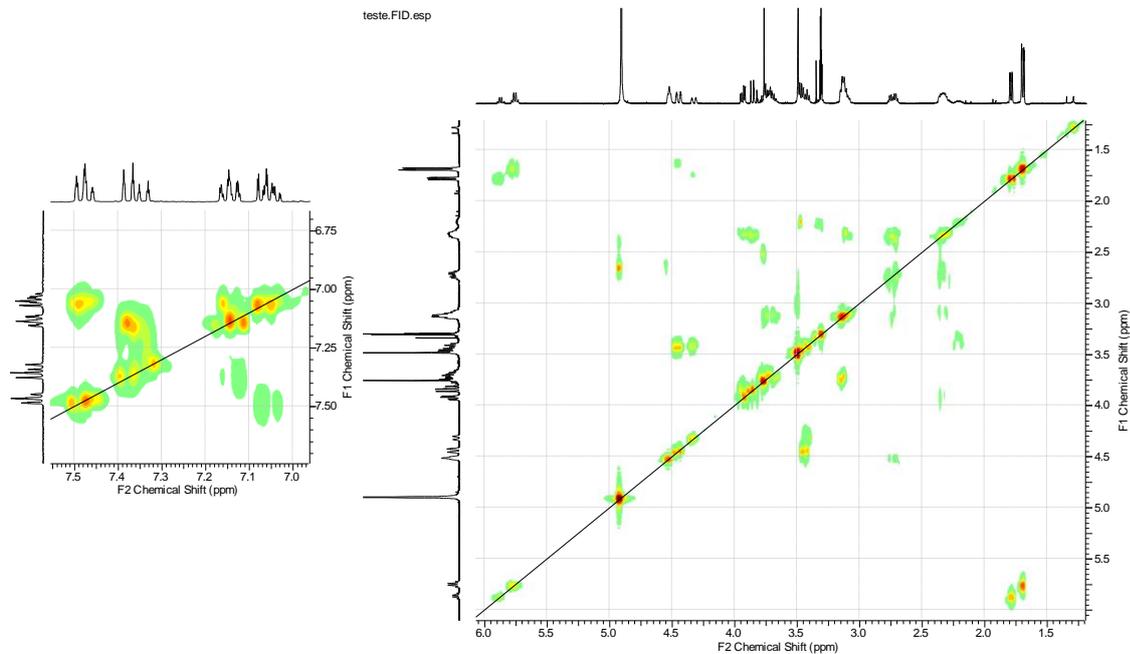


Figura 54. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto isositsiriquina *N*-óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1280, 0.0599)	Comment Imported from VNMR.	Date 04 Apr 2011 15:54:42	Date Stamp Apr 1 2011
File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\Heros FR 26-30\FR26-30_CD3OD_HMQC\fid			Frequency (MHz) (400.04, 100.60)
Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 32	Original Points Count (819, 1024)	Points Count (1024, 4096)
Pulse Sequence gHMOC	Solvent cd3od	Spectrum Type HMQC	Sweep Width (Hz) (6391.70, 17097.15)

teste.esp

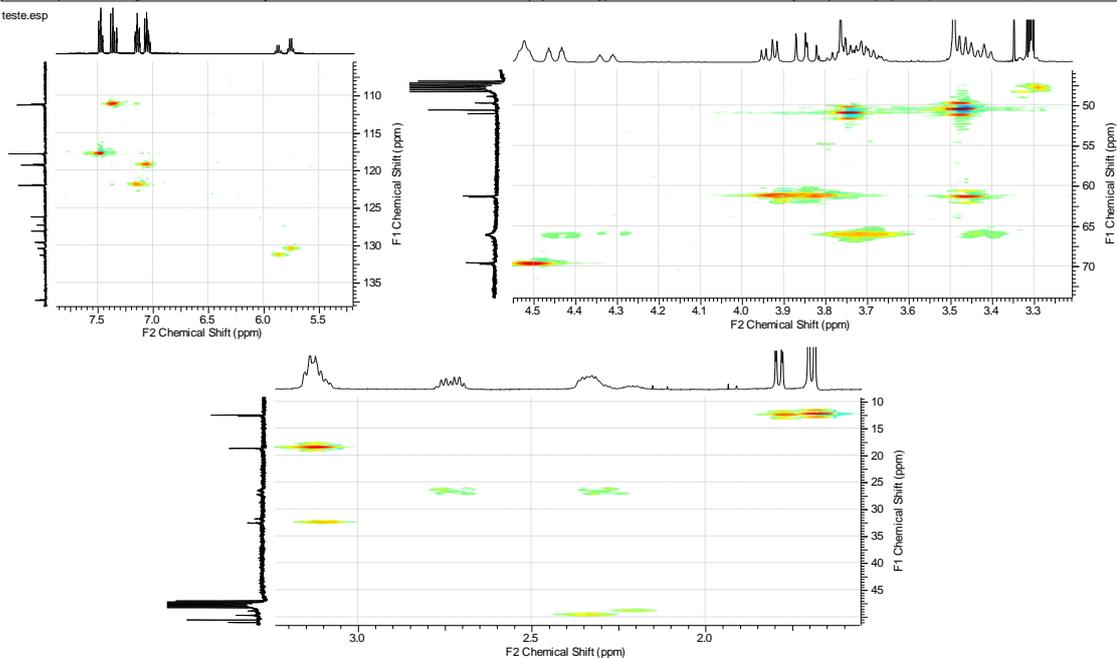


Figura 55. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto isositsiriquina N-óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1281, 0.0212)	Comment Heros_FR26-30_MeOD_HMBC	Date 10 Jan 2012 16:24:08
Date Stamp Jan 9 2012	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\esenbeckia\NMR\fr26-30\Heros_FR26-30_MeOD_HMBC.fid\fid	
Frequency (MHz) (400.04, 100.60)	Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 32
Points Count (1024, 2048)	Pulse Sequence gHMBC	Solvent cd3od
Sweep Width (Hz) (6395.80, 24128.22)		Original Points Count (820, 512)
		Spectrum Type HMBC

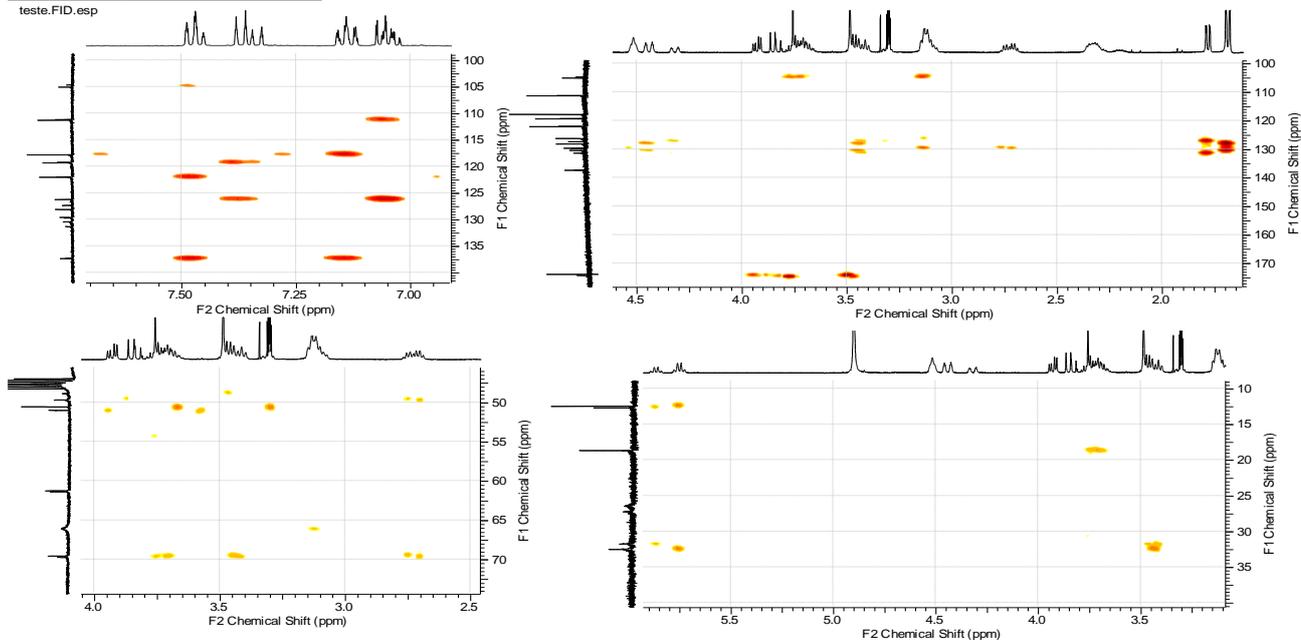
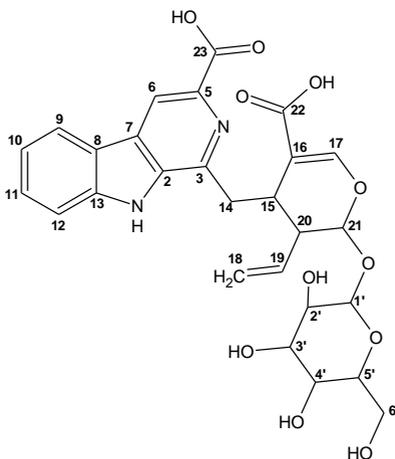


Figura 56. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto isosirsiquina N-óxido [2a-b] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Desoxicordifolina-derivado [4]



Nº	δ ppm	(HMQC) H-C 2J	DEPT - 135	(COSY) H-H	(HMBC) C-H 3J	(HMBC) H-C 3J
C15	30,98	3,70 (m)	CH	2,65 3,16	110,72	3,16
C14	33,46	3,18 3,63	CH ₂			
C20	43,76	2,65 (dt)	CH	5,70 5,57		4,78 4,88
C6'	61,49	3,46 3,66	CH ₂	3,46-3,66 3,66-3,16	3,46-77,13	
C2'	73,49	3,00(dd)	CH		77,77 98,86	4,59 3,06 3,16
C3'	77,77	3,16	77,39	78,78	3,38	78,7
C4'	70,42	3,06	70,02	74,80	3,23	74,7
C5'	77,13	3,18	76,72	78,13	3,41	78,1
C21	95,80	5,57(d)	CH	2,65		7,49
C1'	98,86	4,59(d)	CH		73,49 77,77 95,80	3,00
C16	110,72		C			3,70 3,16 7,49
C12	112,69	7,62(dd)	CH	7,58	119,02 120,45 121,74	7,29

C6	115,78	8,74(s)	CH		121,74(forte) 136,60(forte) 167,22(forte)	
C18	119,02	4,78 4,88(dd)	CH2	4,78-5,70 4,88-5,70	95,80	
C10	120,45	7,29(m)	CH	8,33 7,58	121,74	7,62 7,58 11,98
C8	121,74		C			8,74 7,62 7,29
C9	122,47	8,33	CH	7,29	127,62 141,17	
C7	127,62		C			8,74 8,33 11,98
C11	128,77	7,58(d)	CH	7,29 7,62	141,17	8,33
C19	134,85	5,70(dt)	CH	4,78 4,88		4,78
C2	136,74		C			8,74 3,18 11,98
C5	136,63	C	C	-	-	-
C13	141,17		C			11,98 8,33 8,74
C3	144,18		C			3,67 3,18
C17	151,90	7,49(s)	CH		95,80 110,72 168,57 30,98	
C23	167,22		C			8,74
C22	168,57		C			7,46

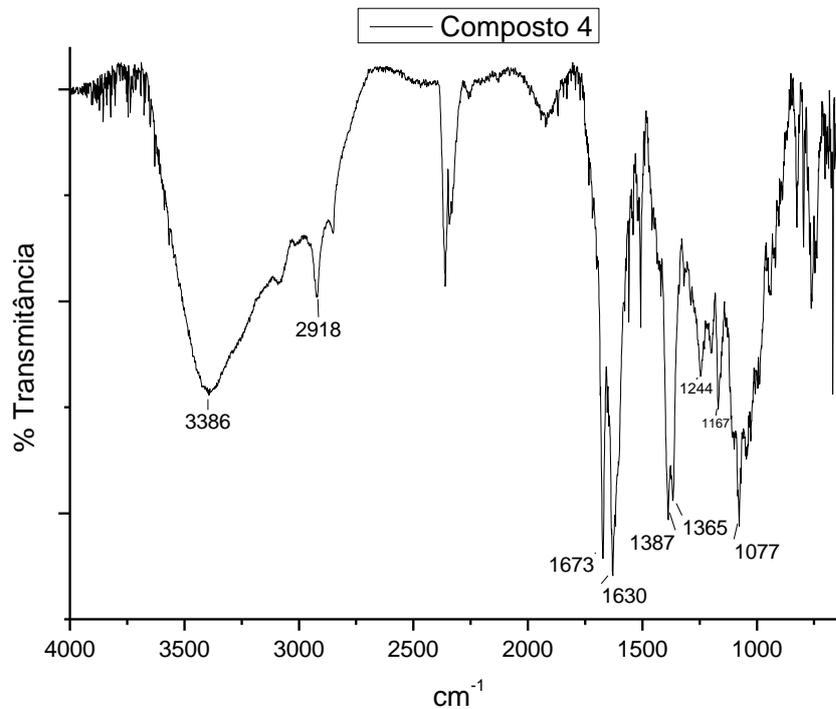


Figura 57. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

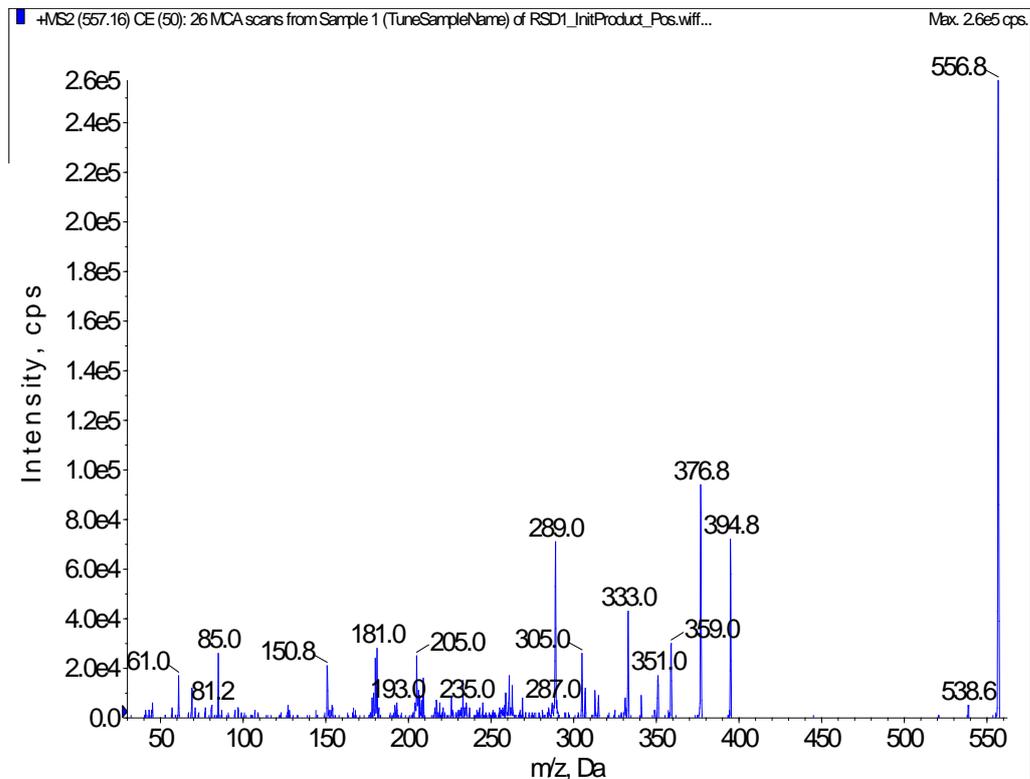


Figura 58. Espectro de ESI-MS do composto desoxycordifolina deriv.[4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

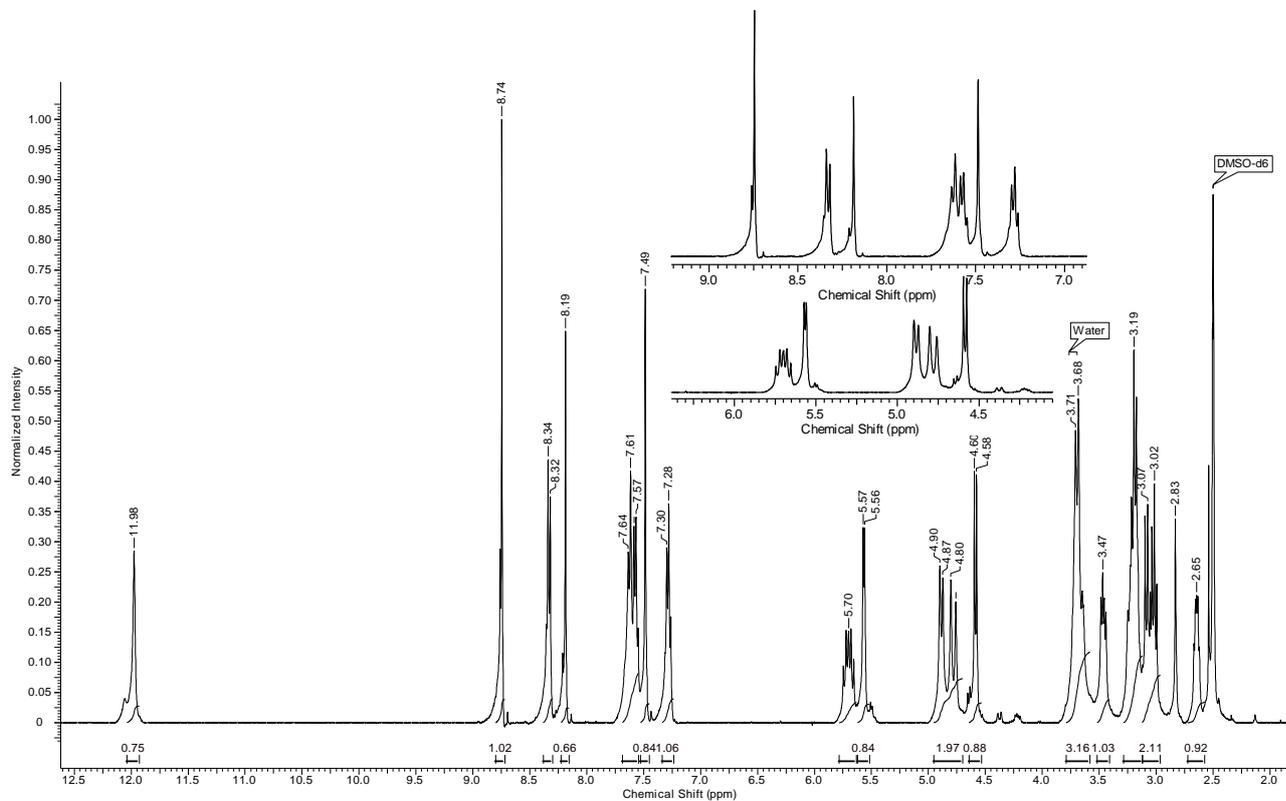


Figura 59. RMN de ^1H do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

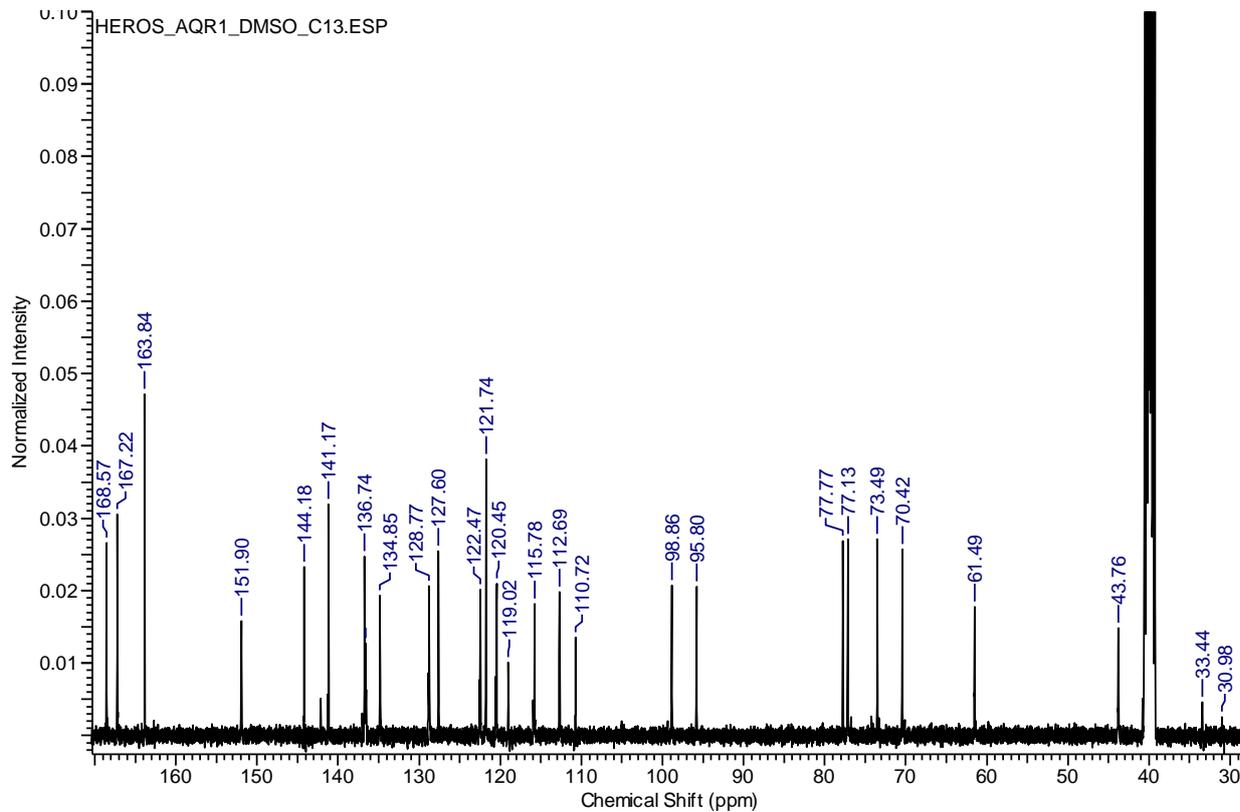


Figura 60. RMN de ^{13}C do composto desoxycordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

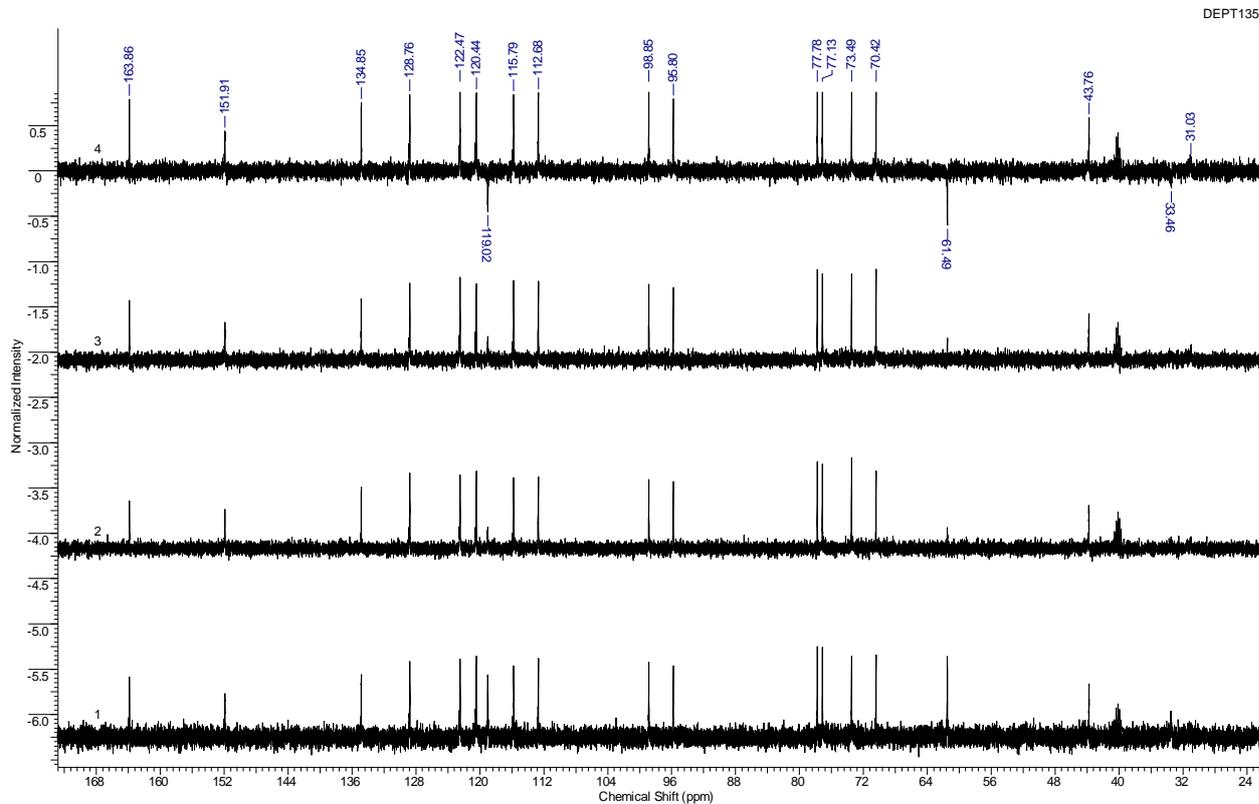


Figura 61. DEPT 135 do composto desoxycordifolina deriv.[4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1696, 0.0315)	Comment Heros_AqR1_DMSO_COSY	Date 16 Jan 2012 12:32:44
Date Stamp Jan 12 2012	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR1\Heros_AqR1_DMSO_COSY.fid\fid	
Frequency (MHz) (400.04, 400.04)	Nucleus (1H, 1H)	Number of Transients 8
Points Count (4096, 8192)	Pulse Sequence gCOSY	Solvent dmso
Sweep Width (Hz) (24148.69, 24151.64)		Spectrum Type COSY

HEROS_AQR1_DMSO_COSY.FID.ESP

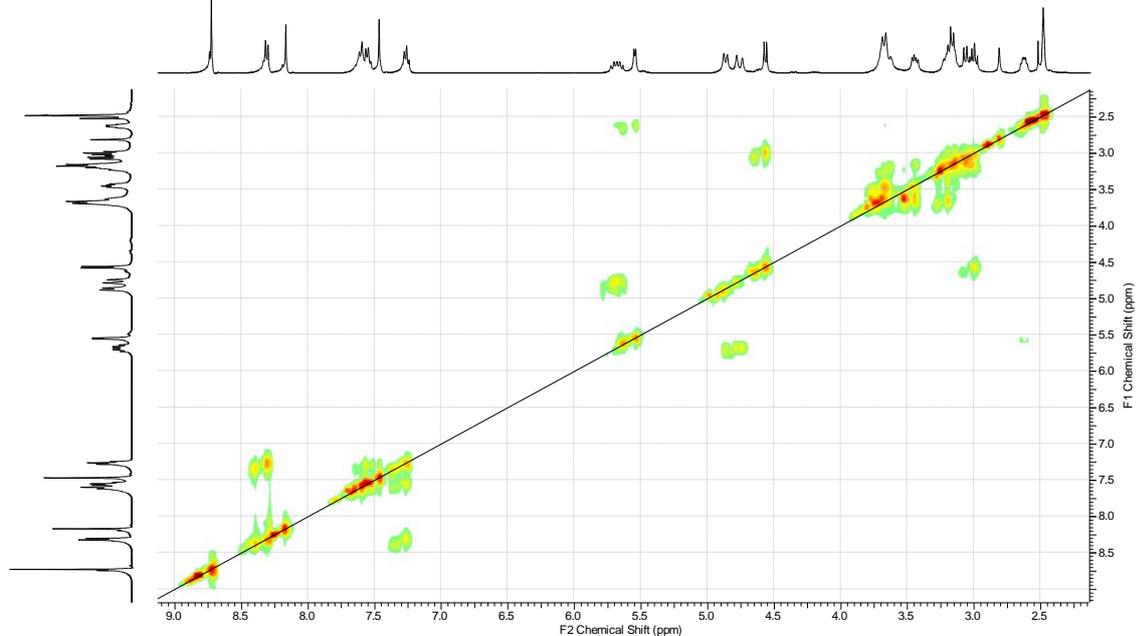


Figura 62. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1281, 0.0299)	Comment Heros_AqR1_DMSO_HMQC	Date 16 Jan 2012 12:29:54
Date Stamp Jan 12 2012	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR1\Heros_AqR1_DMSO_HMQC.fid\fid	
Frequency (MHz) (400.04, 100.60)	Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 32
Points Count (1024, 2048)	Pulse Sequence gHMOC	Solvent dmso
Sweep Width (Hz) (6395.80, 17092.98)		Original Points Count (820, 512)
		Spectrum Type HMOC

Heros_AqR1_DMSO_HMQC.fid.esp

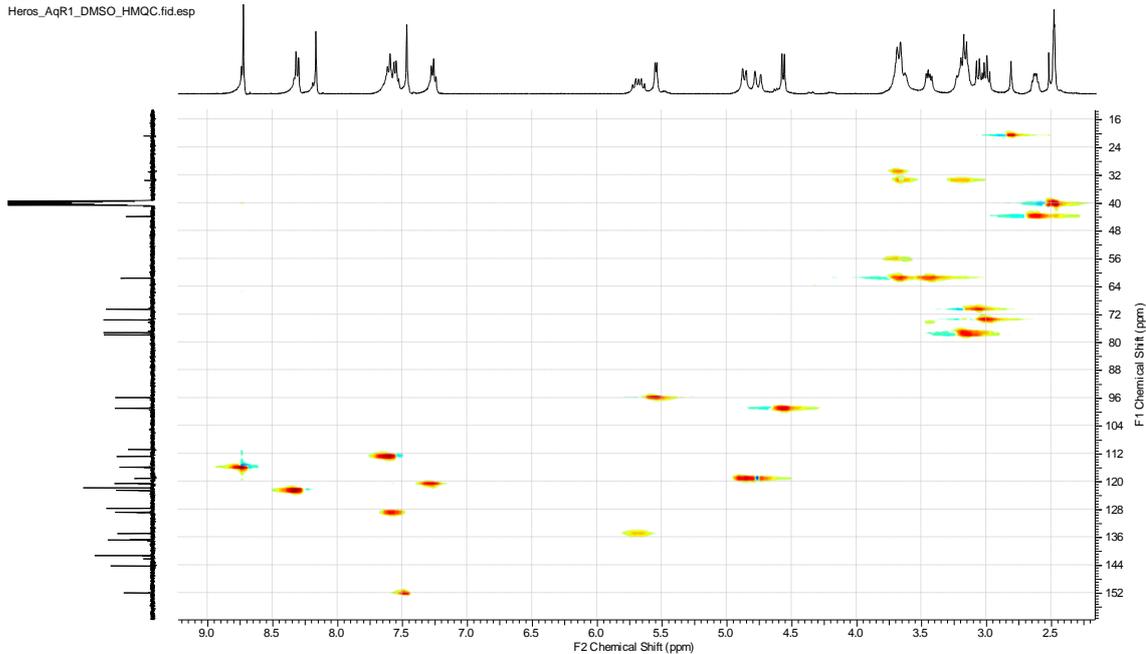


Figura 63. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMOC do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	(0.1280, 0.0348)	Date	18 Jan 2012 13:40:24	Date Stamp	Jan 17 2012	Frequency (MHz)	(400.04, 100.60)
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR1\Heros_AqR1a_DMSO_HMBC.fid.fid	Number of Transients	32	Original Points Count	(819, 840)	Points Count	(1024, 2048)
Nucleus	(1H, 13C)	Solvent	dms0	Spectrum Type	HMBC	Sweep Width (Hz)	(6391.70, 24128.22)
Pulse Sequence	gHMBC						

F.esp

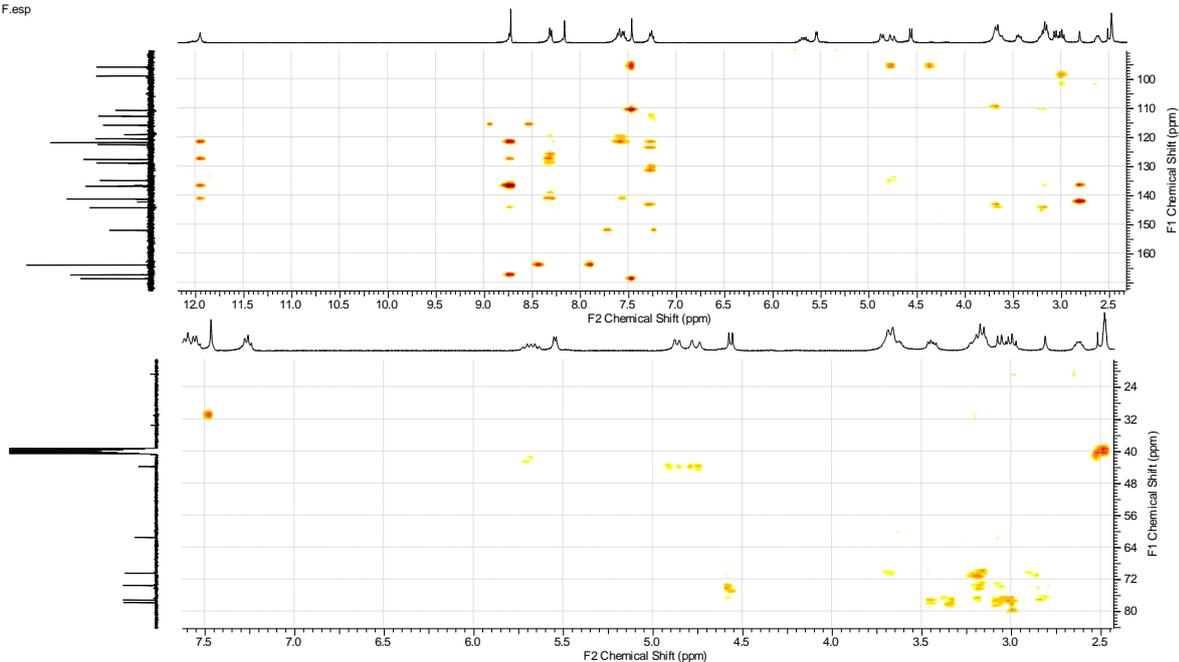
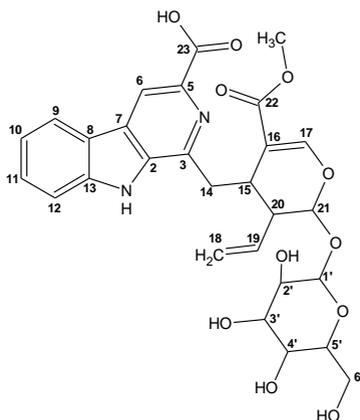


Figura 64. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto desoxicordifolina deriv. [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Desoxicordifolina [5]



N°	δ Cppm (DMSO)*	δ Cppm (MeOH)	DEPT - 135*	(HMQC) δ H-C*	(HMBC) δ C-H*	lit. ¹³ C.
C15	30,94	33,98	CH(m)	3,70 (m)	3,71	34,0
C14	33,03	35,17	CH ₂ (m)	3,24 3,51	7,68	34,9
C20	43,17	45,72	CH(td)	2,67 (dt) <i>J</i> = 7.82; 4.69Hz	5,21 5,25	45,7
MeO	50,74	51,97	CH ₃	3,22 3,47	-	51,9
C6'	61,11	63,04	CH ₂ (dd)	<i>J</i> =6.64;11.72Hz 3,68 <i>J</i> =1.95;11.72Hz	-	63,0
C2'	70,02	71,79	CH	3,09(dd) <i>J</i> =10 Hz	-	71,7
C3'	73,09	74,80	CH	3,02(dd) <i>J</i> =8.21;7.82Hz	-	74,7
C4'	76,72	78,13	CH	3,18(dd)	-	78,1
C5'	77,39	78,78	CH	3,18(m)	-	78,7
C21	95,59	97,47	CH	5,62(d) <i>J</i> =7.42 Hz	7,68	97,4
C1'	98,61	100,47	CH	4,59(d) <i>J</i> =7.82 Hz	3,36	100,4
C16	109,55	110,09	C	-	7,68	110,1
C12	112,29	113,71	CH	7,63(ddd)	-	113,5
C6	115,37	116,59	CH	8,74(s)	8,75	116,4
C18	118,96	120,10	CH ₂	4,91 5,02(dd)	-	119,9
C10	120,06	122,60	CH	7,28(m)	8,95	122,4
C8	121,30	122,64	C	-	7,82	122,6

C9	122,06	123,66	CH	8,33 J=7.82 Hz	7,82	123,4
C7	127,24	131,67	CH	7,58(dd)	8,44	131,3
C11	128,39	135,24	CH	5,74(dt)	-	135,2
C19	134,24	137,42	C	-	8,96	137,3
C2	136,37	137,54	C	-	8,96	137,8
C13	140,81	142,98	C	-	3,71	143,0
C3	143,48	144,34	C	-	8,44	144,0
C17	152,02	155,02	CH	7,48(s)	-	154,8
C23	166,59	167,19	C	-	8,86	167,4
C22	166,89	169,35	C		3,32	169,3
					7,57	

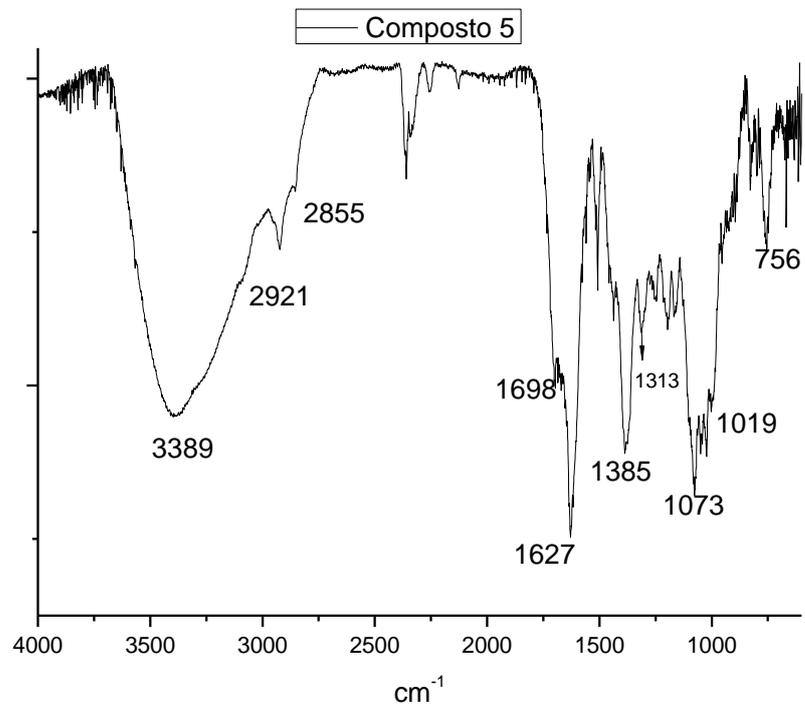


Figura 65. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

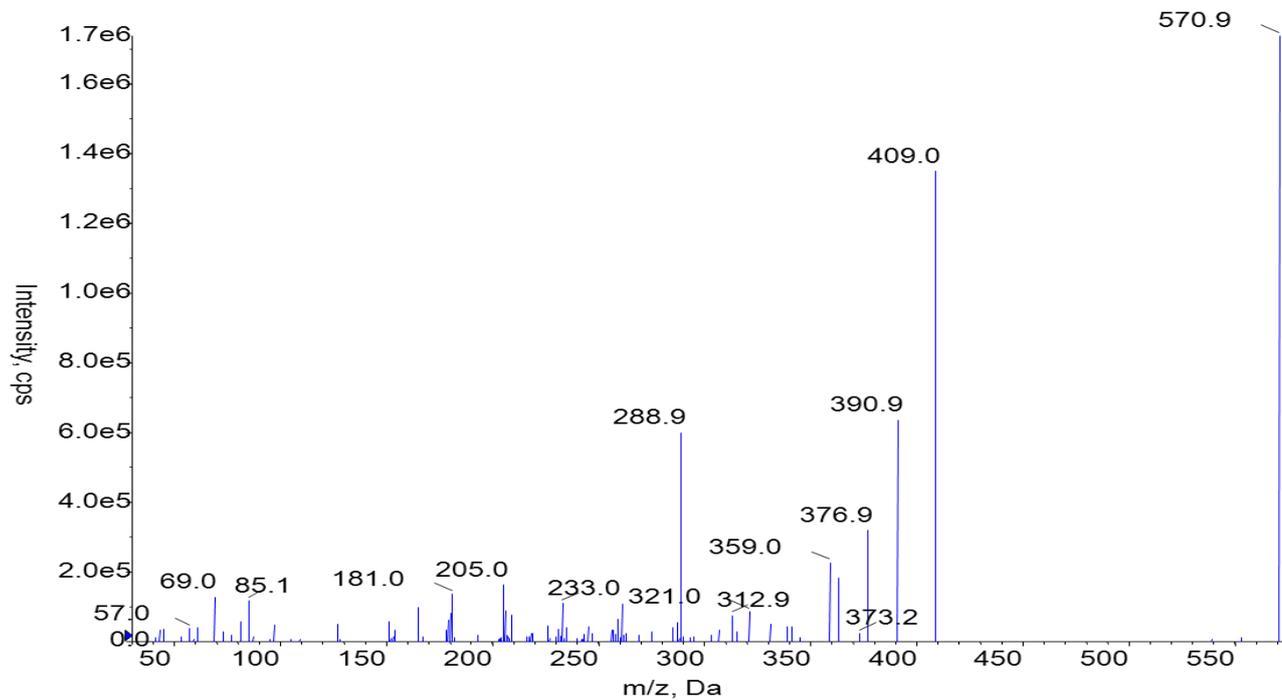


Figura 66. Espectro de ESI-MS do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	1.9980	Date	Jan 16 2012	Date Stamp	Jan 16 2012
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR2\Heros_AqR2_DMSO_H1.fid\fid			Frequency (MHz)	400.04
Nucleus	¹ H	Number of Transients	1	Original Points Count	12791
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	10.00	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	6402.05	Temperature (degree C)	22.000
				Points Count	16384
				Spectrum Offset (Hz)	2407.0837

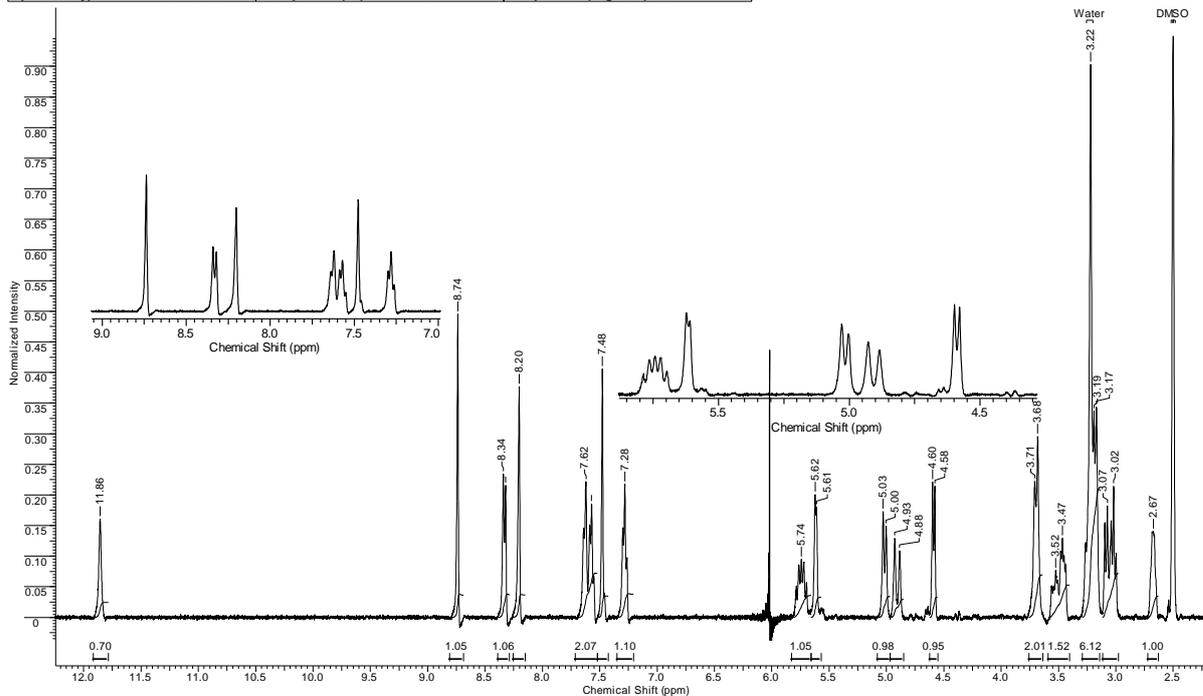


Figura 67. RMN de ¹H do composto desoxycordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	1.3005	Date	Jan 16 2012	Date Stamp	Jan 16 2012
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR2\Heros_AqR2_DMSO_C13.fid\fid	Frequency (MHz)	100.60		
Nucleus	13C	Number of Transients	12992	Original Points Count	31413
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	20.00	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	24154.59	Temperature (degree C)	22.000
		Points Count	32768		
		Spectrum Offset (Hz)	10523.2979		

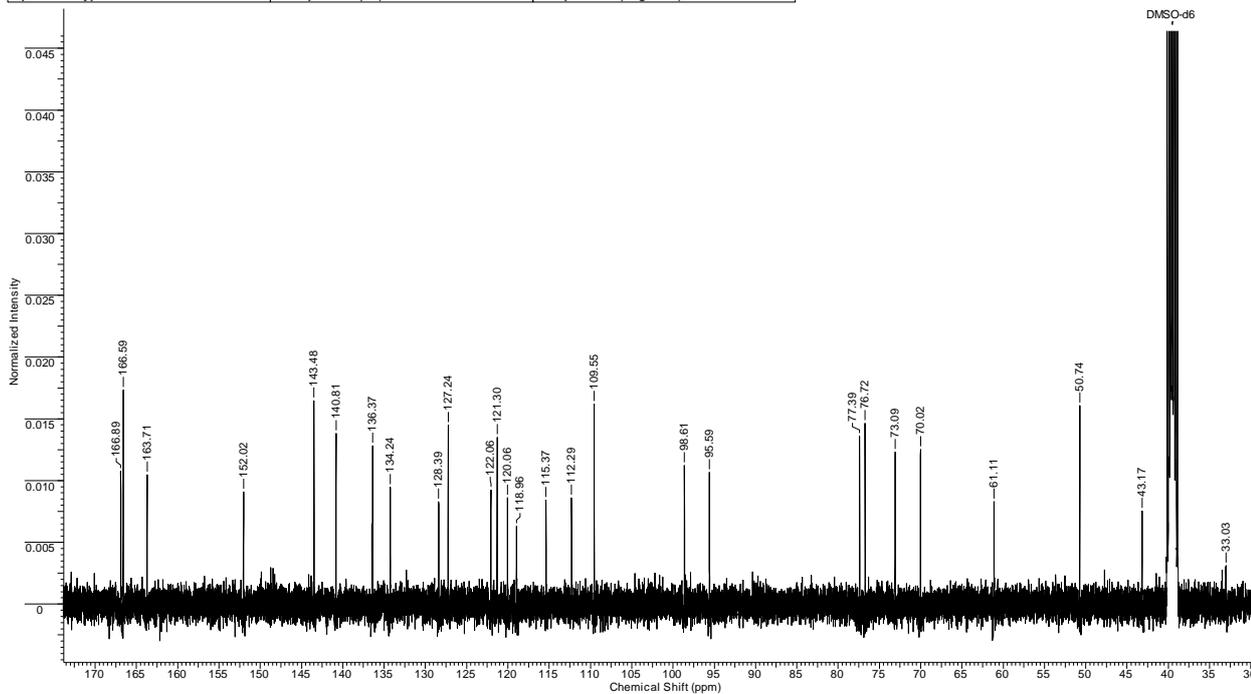


Figura 68. RMN de ^{13}C do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

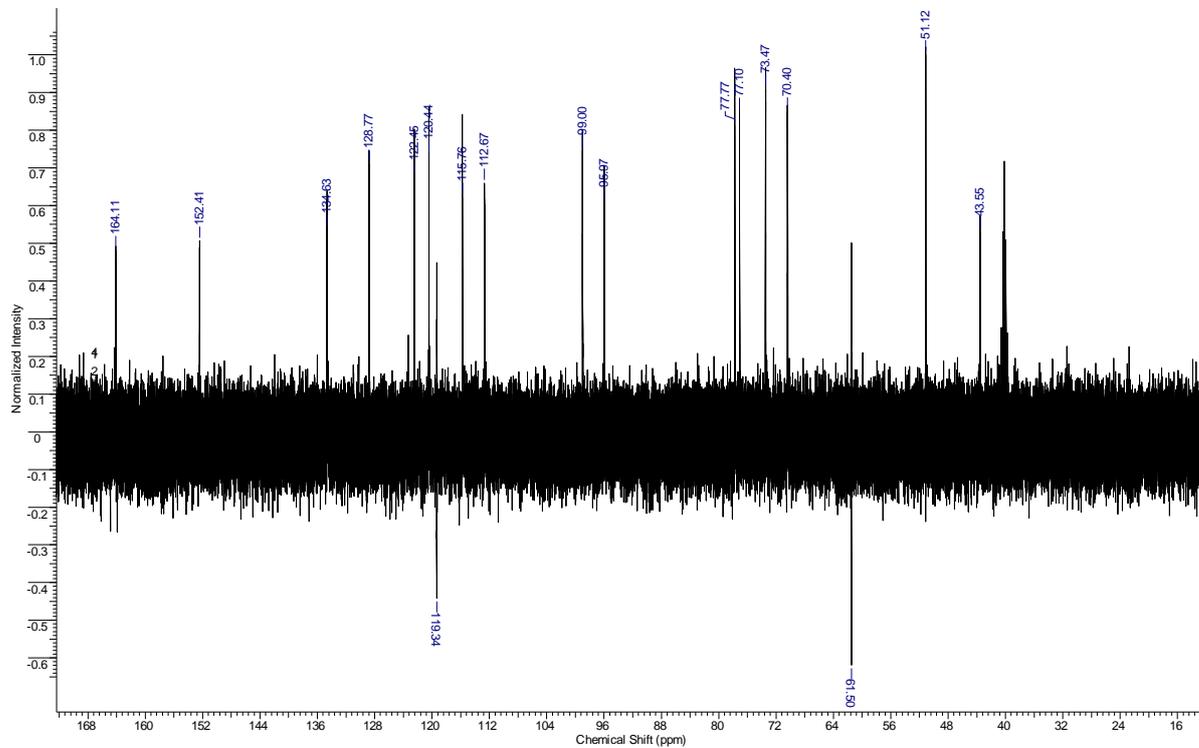


Figura 69. DEPT 135 do composto desoxicordifolin [4] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	(0.1696, 0.0166)	Date	17 Jan 2012 18:01:48	Date Stamp	Jan 16 2012	Frequency (MHz)	(400.04, 400.04)
File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR2\Heros_AqR2a_DMSO_COSY.fid\fid	Number of Transients	8	Original Points Count	(4096, 400)	Points Count	(4096, 8192)
Nucleus	(1H, 1H)	Solvent	dms0	Spectrum Type	COSY	Sweep Width (Hz)	(24148.69, 24151.64)
Pulse Sequence	gCOSY						

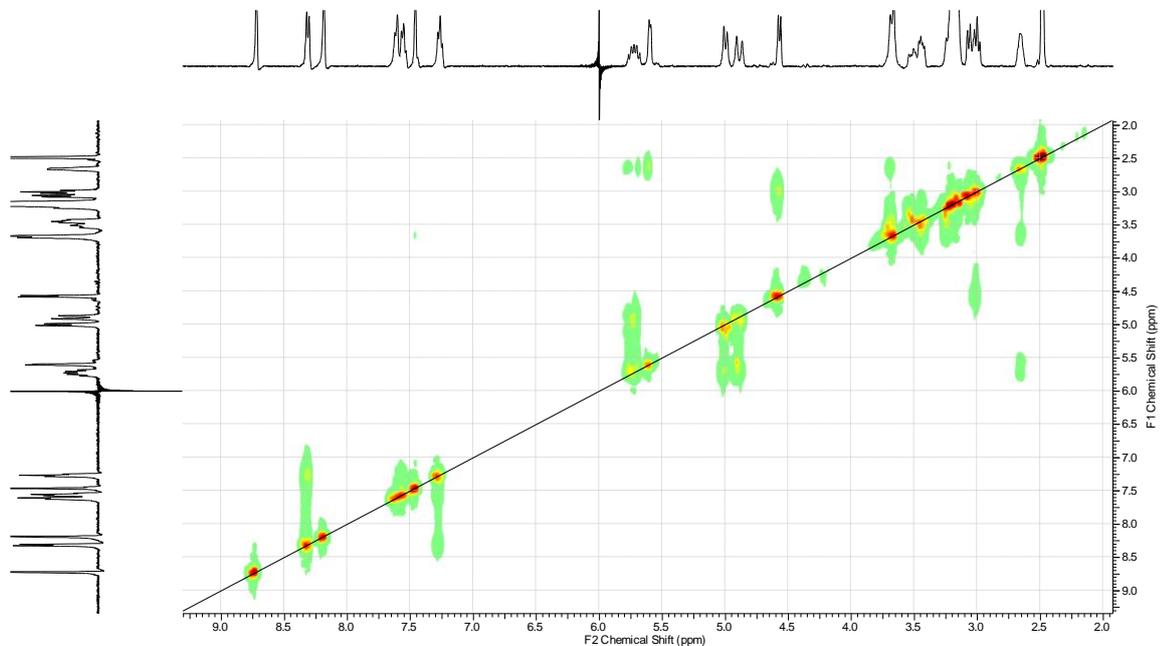


Figura 70. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec) (0.1281, 0.0117)	Comment Heros_AqR1_DMSO_HMQC	Date 17 Jan 2012 17:57:24
Date Stamp Jan 16 2012	File Name C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\Dropbox\nmr\AqR2\Heros_AqR2_DMSO_HMQC.fid\fid	
Frequency (MHz) (400.04, 100.60)	Nucleus (1H, 13C)	Number of Transients 32
Points Count (1024, 2048)	Pulse Sequence gHMQC	Solvent dms0
Sweep Width (Hz) (6395.80, 17092.98)		Spectrum Type HMQC

Heros_AqR2_DMSO_HMQC.fid.esp

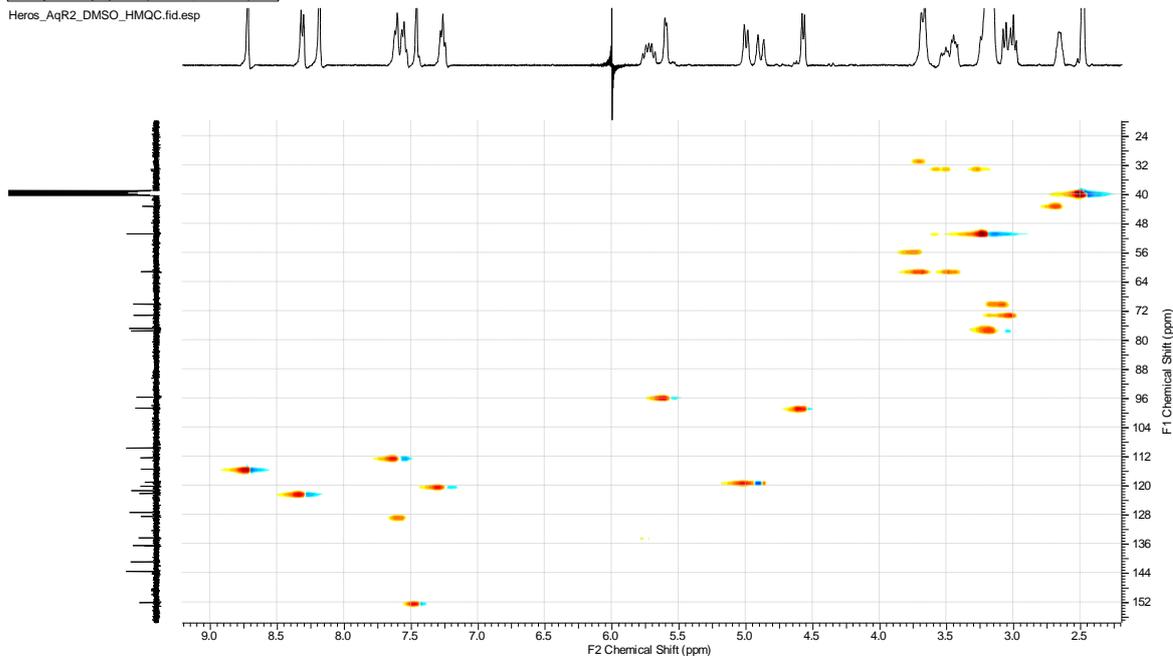


Figura 71. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

Acquisition Time (sec)	(0.1280, 0.0106)	Comment	Heros_AqR1_DMSO_HMBC	Date	17 Jan 2012 17:58:14
Date Stamp	Jan 16 2012	File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\esenbeckia\NMR\AqR2\Heros_AqR2_DMSO_HMBC.fid\fid		
Frequency (MHz)	(400.04, 100.60)	Nucleus	(1H, 13C)	Number of Transients	32
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	gHMBC	Solvent	dms0
Sweep Width (Hz)	(6391.70, 24128.22)			Original Points Count	(819, 256)
				Spectrum Type	HMBC

Heros_AqR2_DMSO_HMBC.fid.esp

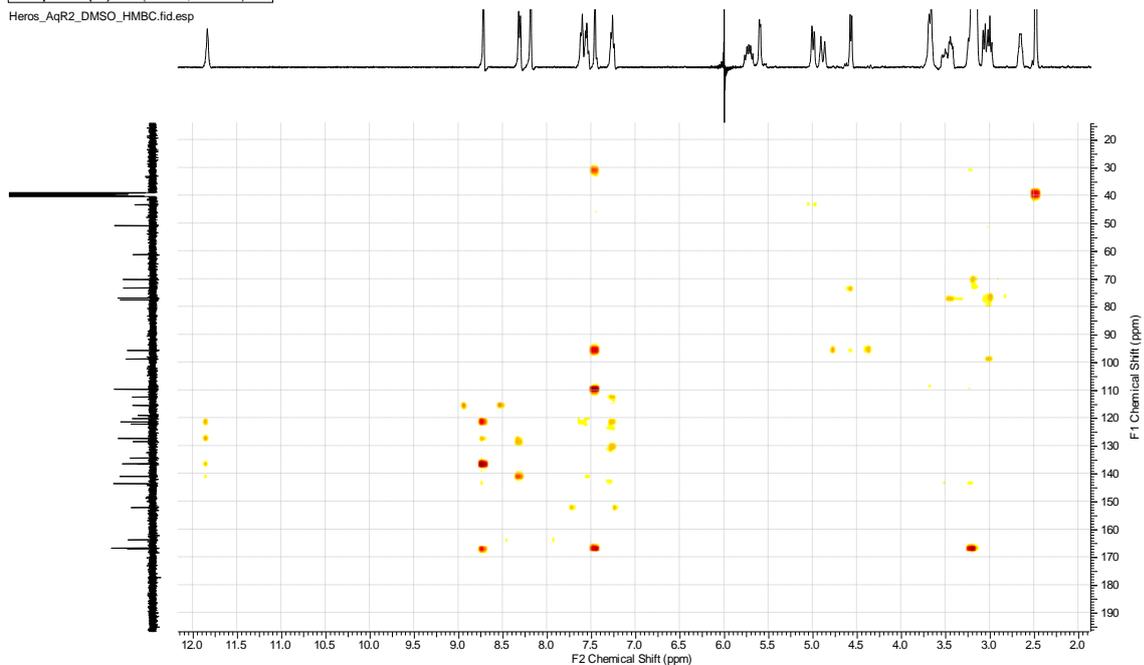
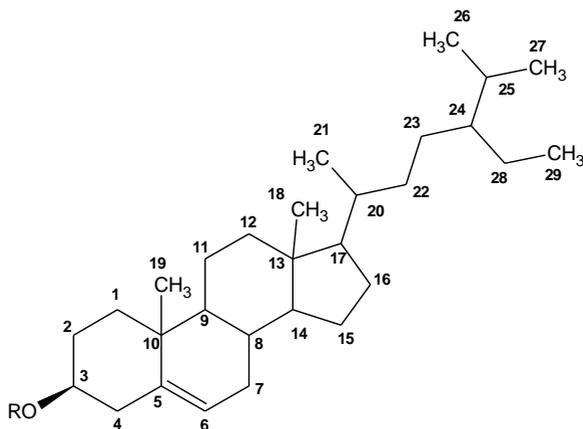


Figura 72. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC do composto desoxicordifolina [5] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

β -sitosterol glicosilado [6]



Nº	Composto 6	Literatura
	^{13}C (CDCl_3)	(Py)
C1	38,75	38,8
C2	33,45	33,5
C3	79,79	79,8
C4	41,21	41,3
C5	142,17	142,3
C6	123,20	123,2
C7	31,52	31,6
C8	33,32	33,4
C9	51,60	51,7
C10	38,19	38,2
C11	22,55	22,7
C12	40,60	40,7
C13	43,75	43,8
C14	58,09	58,1
C15	25,77	25,8
C16	29,82	29,9
C17	57,50	57,7
C18	13,43	13,5
C19	20,69	20,7
C20	37,66	37,7
C21	20,28	20,3
C22	35,47	35,5
C23	27,62	27,7
C24	47,30	47,4
C25	30,71	30,7
C26	21,25	21,3

C27	20,47	20,5
C28	24,65	24,7
C29	13,25	13,3
C1'	103,84	103,9
C2'	76,62	76,7
C3'	79,90	79,9
C4'	72,95	73,0
C5'	79,34	79,4
C6'	64,09	64,1

Acquisition Time (sec)	2.7329	Comment	carbono	Date	15 Apr 2011 17:26:40
Date Stamp	15 Apr 2011 17:26:40	File Name	C:\Documents and Settings\User\Meus documentos\lesenbeckia\Heros FR 56\Heros FR 5612\fid		
Frequency (MHz)	50.32	Nucleus	¹³ C	Origin	spect
Owner	root	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg
SW(cyclical) (Hz)	11990.41	Solvent	piridina d5	Receiver Gain	16384.00
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	11990.04	Spectrum Offset (Hz)	5031.7993

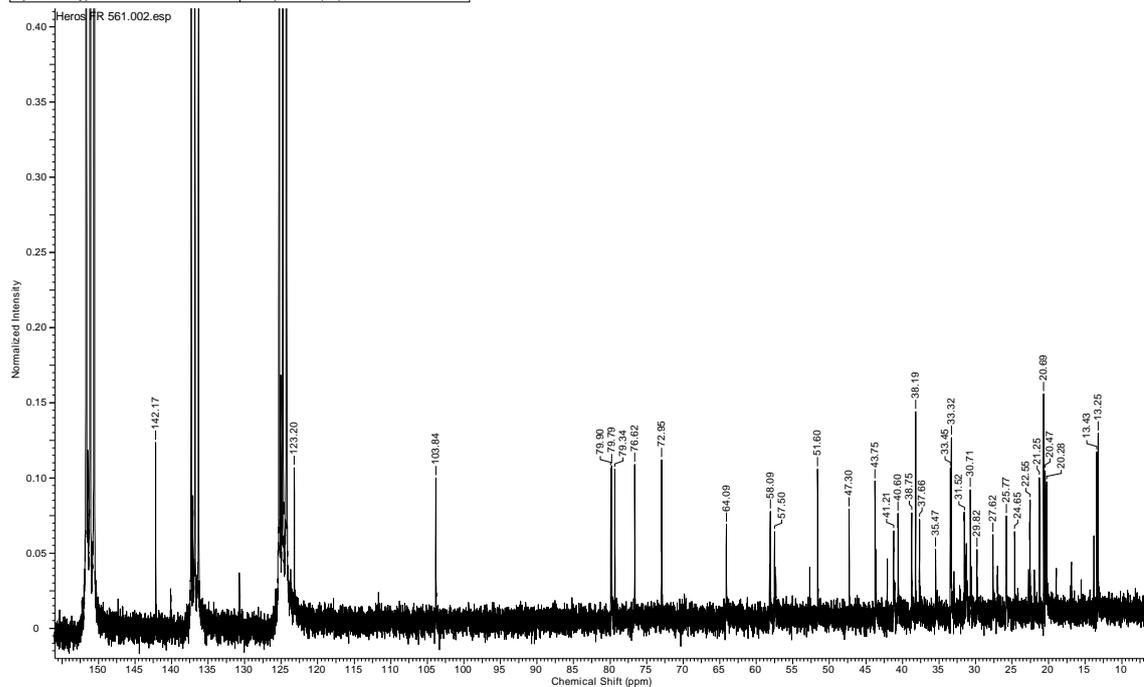


Figura 73. RMN de ¹³C para o composto [6] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*

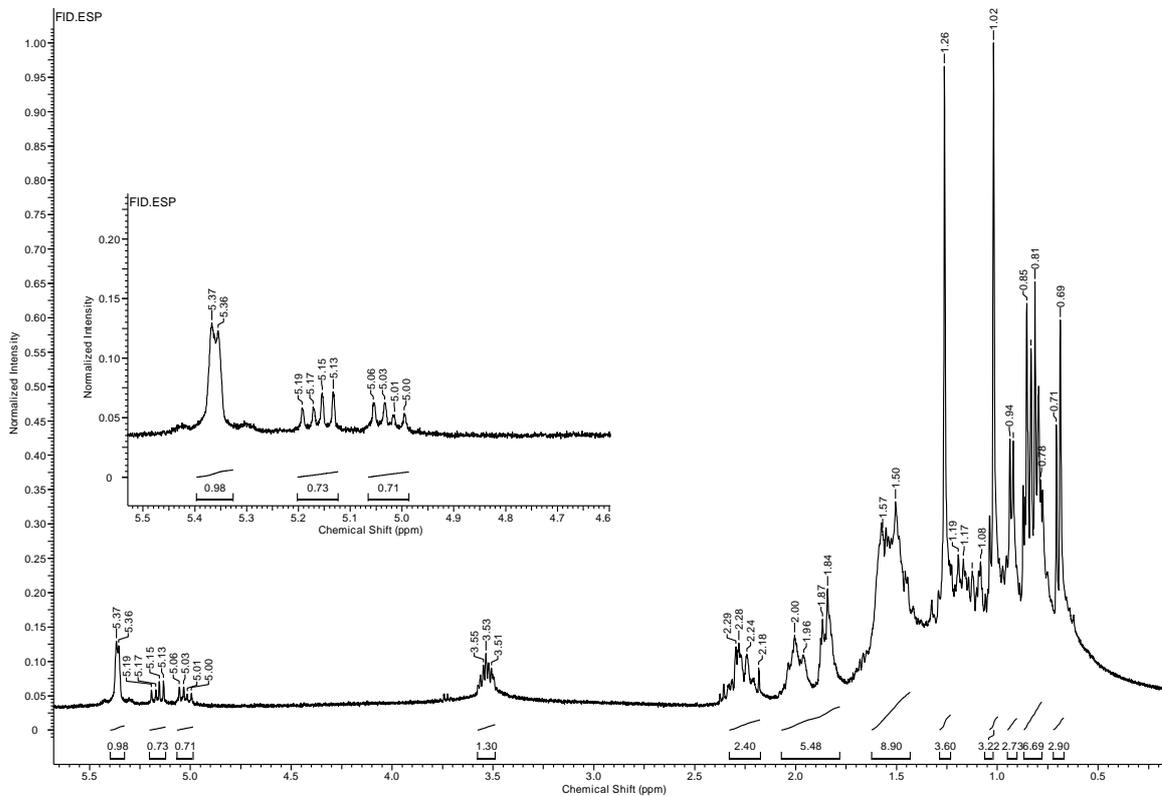


Figura 74. RMN de ^1H do composto [7] isolado a partir da espécie *Esenbeckia leiocarpa*