



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SANDRA VIRGÍNIA ALVES HOHLEMWERGER**

**METABÓLITOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES  
DE ZANTHOXYLUM DA BAHIA**

Salvador  
2010

**SANDRA VIRGÍNIA ALVES HOHLEMWERGER**

**METABÓLITOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE  
ESPÉCIES DE ZANTHOXYLUM DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisitos para obtenção do grau de Doutora em Química na área de concentração de Química Orgânica.

Orientadores: Profa. Dra. Nídia Franca Roque

Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Salvador  
2010

Sistema de Bibliotecas/IQ - UFBA

Hohlemwenger, Sandra Virgínia Alves.

Metabolismo e atividades biológicas de espécies de zanthoxylum do Brasil /  
Sandra Virgínia Alves Hohlemwenger. - 2010.  
246 f: il.

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nídia Franca Roque.  
Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo.

Tese (doutorado)-Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química,  
Salvador, 2010.

1. Rutácea. 2. Alcalóides. 3. Óleos essenciais. 4. Extração com fluido  
supercrítico. 5. Lipossomos. 6. Zanthoxylum. I. Roque, Nídia Franca. II. Velozo,  
Eudes da Silva. III Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD – 583.24

CDU – 547.9

***Dedico este trabalho,***

***A Swami, Sophia e Samara por nunca me deixarem esquecer qual o verdadeiro motivo de seguir em frente.***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela sua presença em todos os dias da minha vida.

Ao professor Dr. Eudes da Silva Velozo, pela orientação, incentivo constante e pelos ensinamentos.

A professora Nídia Franca Roque pela orientação, paciência e confiança.

Ao professor Dr. Frederico Guaré Cruz por trazer tatuado na alma o significado de ser professor.

Ao professor Paulo Cezar Vieira que mesmo estando longe sempre se mostrou perto nos momento difíceis.

As Professoras Elaine Cabral e Tânia Barros, por conseguir serem professoras e amigas.

Aos professores Sílvio do Desterro Cunha e Miguel Fascio, por toda ajuda prestada.

Ao professor Ramon El-Bachá e toda a sua equipe pela colaboração e por ter encontrado Diego Madureira uma pessoa especial.

Ao Professor Jorge David pela ajuda durante esta longa caminhada.

Ao Professor Lafaiete Cardoso e a Tadeu Antônio Nóbrega pela orientação e ajuda no aprendizado sobre extração de CO<sub>2</sub> super crítico.

Ao professor Dr. Antonio Salatino e a Adne Abbud Righi pelas análises realizadas e todo o carinho dispensado.

A todos os professores da pós-graduação que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos queridos companheiros do LAPEMM André Luis São Pedro, Cássia Detoni, Cínara Vasconcelos, Islane do Espírito Santo, João Rodrigues, Lourenço Botelho, Magnólia Fonseca e Rosemília Cunha, Jariane Brito e a Larissa por todos os momentos maravilhosos.

A querida amiga-irmã meu braço-direito neste trabalho Edijane Sales por ser um ser humano brilhante em, todos os sentidos, e que eu tive o privilégio de conviver.

A Railda Batista pela amizade carinho e ajuda constante.

A todas as pessoas que fizeram ou fazem parte do LAPEMM desde 1999, pelo companheirismo, ajuda e ensinamentos.

Aos queridos amigos do IQ-UFBA, que levarei por toda eternidade no meu coração: Caline Gomes, Edson de Jesus, Floricéa Magalhães, Josanaide Sant'Ana Teixeira, Isley Fehlberg, Luciana de Menezes, Marcus Bahia, Martins Cerqueira, Suzimone de Jesus Correia e Vanessa Rodrigues Guedes e Airam Santos.

A todas as pessoas que fizeram ou fazem parte dos laboratórios 104 e 110 do Instituto de Química desde 1996, pelos sorrisos e informações preciosas.

A toda equipe da biblioteca do Instituto de Química em Especial a Egídia, Ana e Alice, pela ajuda e carinho durante todos estes anos.

A Cristovão e Paulo da pós-graduação por toda ajuda prestada.

A Clayton Queiroz e a Fábio Villas Boas pelo desprendimento na hora de ajudar ao próximo.

Aos meus queridos e amados pais (Arlindo e Giselia) por não terem desistido de mim.

A toda a minha família por estar sempre presente na minha vida e por exercitarem com todo o coração o significado da palavra família: Nora Ney (Nilo e Érico), George

(e George), Giselinda (Wilson, Danilo e Duda), Ariadnes (Jaime, Thiago, Saulo e Lucas), Carmem, Clemerson, Fábio, Carla e Pedro.

A minha nova família que me adotou com muito carinho: Jesse, Jorge, Anahi, Cezar Jéssica, Flávia, Amasis, Amélia, Matheus, Bia, Lara e Calin.

A Mônica por ter me dado uma nova oportunidade de dizer, tenho amiga.

A Márcia pelo amor incondicional.

A Neide por ter cuidado com tanto carinho dos meus amores Swami, Samara e Sophia em todos os momentos em que estive ausente.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos.

**“No homem o poder é pouco e limitado, e o  
querer sempre insaciável e sem limites”**

Padre Antônio Vieira.



HOHLEMWERGER, Sandra Virgínia Alves. **Metabólitos e atividades biológicas de espécies de *Zanthoxylum* da Bahia**. 246 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

## RESUMO

Este trabalho tem como objetivo contribuir com o conhecimento fitoquímico das espécies do gênero *Zanthoxylum*. O presente estudo justifica-se devido ao escasso número de informações sobre a composição química de espécies deste gênero, endêmicas do Brasil, já que espécies pertencem a família Rutaceae vem sendo utilizadas na medicina popular em todo o mundo, inclusive no Brasil, e têm sido apontadas como potencial fonte para protótipos ou novos fármacos. A literatura correlaciona algumas atividades biológicas destas espécies com a presença de alcalóides, dentre eles os alcalóides benzilisoquinolínicos os quais além de serem relacionados com a atividade farmacológica são apontados como possíveis marcadores quimiosistemáticos. As espécies *Zanthoxylum rhoifolium*, *Z. stelligerum* e *Z. tingoassuiba* foram coletadas no semi-árido baiano e submetidas a procedimentos fitoquímicos convencionais os quais levaram a identificação dos alcalóides benzo[c]fenantridínicos (diidroqueleritina), (angolina), (arnotianamida) e (pseudo-norqueleritina), do alcalóide protoberberínico (cis-N-metilcanadina iodeto) e do alcalóide pseudoprotoberberínico (2,3-metilenodioxo 10,11-dimetoxi tetrahidroprotoberberina iodeto) além disso também foi isolado o alcalóide aporfínico (predicentrina-metil-iodeto) e o alcalóide (metil antranilato de N-metila); as furanocumarinas (imperatorina) (xantotoxina) (isopipinelina) sendo ainda revelada a presença da lignana (senamina) e dos triterpenos (lupeol), ( $\beta$ -amirina) e (amirinona), estes dois últimos encontrados apenas na cera epicuticular das folhas de *Z. tingoassuiba*. O óleo volátil das folhas de *Z. tingoassuiba* foi obtido pela extração com CO<sub>2</sub> super crítico e através da hidrodestilação de onde foram identificados 06 monoterpenos, 10 sesquiterpenos e o alcalóide (metil antranilato de N-metila) este óleo apresentou atividade antifúngica, antibacteriana e capacidade de associação com lipossomas. As identificações destas substâncias foram efetuadas com base nos seus espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C uni e bidimensionais, cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, espectrometria de massas por inserção direta e comparações com dados da literatura. Os metabólitos isolados e identificados nas espécies estudadas são condizentes com os já encontrados no gênero *Zanthoxylum*, como os alcalóides quaternários benzilisoquinolínicos e as furanocumarinas os quais estão associados ao caráter primitivo do gênero. Os resultados promissores das atividades biológicas, antifúngica, antibacteriana, antioxidante e antiparasitária, corroboram para a classificação deste gênero como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chave:** Rutaceae. Alcalóides. *Zanthoxylum*. Óleo essencial. Fluido supercrítico. Cera epicuticular

HOHLEMWERGER, Sandra Virgínia Alves. **Metabolites and biological activities of Zanthoxylum species from Bahia**. 246 f. Thesis (Ph.D. in Organic Chemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

## ABSTRACT

This work aims to improve the knowledge phytochemical for the species of the genus *Zanthoxylum*. This study is justified due to the scarcity of information about the chemical composition of species of this genus, endemic to Brazil. Species belonging to family Rutaceae has been used in folk medicine around the world, including Brazil, have been identified as a potential source for prototypes or new drugs. The literature correlates the biological activities of some of these species with the presence of alkaloids, among them alkaloids benzyloquinolines which besides being related to the pharmacological activity are considered possible chemical markers. Species *Zanthoxylum rhoifolium*, *Z. stelligerum* and *Z. tingoassuiba* were collected in semi-arid environments and subjected to conventional procedures phytochemicals which led to the identification of benzo [c] phenanthridine alkaloids (dihydrochelerythrine), (angoline), (arnottianamide) and (pseudo-norchelerythrine), and the protoberberinic alkaloid (cis-N-methylcanadine iodide) and pseudoprotoberberine alkaloid (2,3-methylenedioxy 10,11-dimethoxy tetrahydroprotoberberine iodide) was also isolated the aporphine alkaloid (predicentrine-methiodide) and alkaloid (methyl N-methyl anthranilate); the furocumarins (imperatorin) (xanthotoxin) (isopimpinellin) besides the furofuran lignan (sesamin) and the triterpenoids (lupeol), ( $\beta$ -amyrin) and (amyrinone) the latter two found only in the wax epicuticular on the leaves of *Z. tingoassuiba*. The volatile oil from leaves of *Z. tingoassuiba* was obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and by hydrodistillation of which were identified 06 monoterpenes, 10 sesquiterpenes and the alkaloid (methyl N-methyl anthranilate) this oil showed antifungal and antibacterial activity and ability to loaded into multilamellar liposomes. The identification of these substances was based on their IR spectra, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR single and two-dimensional, gas chromatography-mass spectrometry, mass spectrometry direct insertion, and comparison with literature data. The metabolites isolated and identified in the three species are consistent with those already found in the genus *Zanthoxylum*, such as quaternary benzyloquinolines alkaloids and furocumarinas which are associated with the primitive character of the genus. The promising results of biological activities, antifungal, antibacterial, antioxidant and anti-interference, collaborate with the classification of genus as a source for the development of new drugs.

**Keywords:** Rutaceae. Alkaloid. *Zanthoxylum*. Volatile Oil. Supercritical Fluid. Epicuticular Wax.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrometro de Massas
COSY	Correlation Spectroscopy $^1\text{H} \times ^1\text{H}$
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidilcolina
HETCOR	Heteronuclear Couplings $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento em Hz
m	Multipleteo
M <sup>+</sup>	Pico do íon molecular
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Relação massa / carga
p.	Página
q	Quarteto
RMN $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Simpleto
SCoA	Coenzima A
t	Tripleteo
ZRCRH	Zanthoxylum rhoifolium casca da raiz hexânico
$\delta$	Deslocamento químico

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1</b>	Obtenção dos extratos brutos da raiz de <i>Z. rhoifolium</i> .....	84
<b>ESQUEMA 2</b>	Purificação do extrato da casca da raiz de <i>Z. rhoifolium</i> .....	86
<b>ESQUEMA 3</b>	Purificação da fração ER 3/3 e isolamento de <b>S9</b> e <b>S1</b> .....	88
<b>ESQUEMA 4</b>	Purificação da fração ER 3/4 e isolamento das substâncias <b>S13</b> , <b>S2</b> , <b>S9</b> e <b>S4</b> .....	89
<b>ESQUEMA 5</b>	Obtenção dos extratos brutos da raiz de <i>Z. stelligerum</i> .....	90
<b>ESQUEMA 6</b>	Purificação do extrato da casca da raiz de <i>Z. stelligerum</i> e isolamento das substâncias <b>S13</b> e <b>S3</b> .....	92
<b>ESQUEMA 7</b>	Purificação da fração C4 e isolamento de <b>S1</b> e <b>S13</b> .....	93
<b>ESQUEMA 8</b>	Purificação do extrato ZSCRHo e isolamento das substâncias <b>S13</b> , <b>S13+S9</b> e <b>S12</b> .....	95
<b>ESQUEMA 9</b>	Obtenção dos extratos brutos da raiz de <i>Z. tingoassuiba</i> ....	96
<b>ESQUEMA 10</b>	Purificação do extrato ZTCRH e isolamento da substância <b>S13</b> .....	97
<b>ESQUEMA 11</b>	Purificação da fração 8 e isolamento da substância <b>S12</b> ....	98
<b>ESQUEMA 12</b>	Purificação da fração 8/4 e isolamento da substância <b>S3</b> ...	99
<b>ESQUEMA 13</b>	Purificação da fração 8/9 e isolamento das substâncias <b>S2</b> , <b>S13</b> e <b>S12</b> .....	101
<b>ESQUEMA 14</b>	Purificação do extrato ZTCRM e isolamento das substâncias <b>S3</b> e <b>S13</b> .....	103
<b>ESQUEMA 15</b>	Extração ácido-báse purificação da Fração E1 e isolamento da substância <b>S5</b> .....	105
<b>ESQUEMA 16</b>	Purificação da Fração E2 e isolamento das substâncias <b>S7</b> e <b>S5</b> .....	106
<b>ESQUEMA 17</b>	Purificação da Fração E2 e isolamento da substância <b>S6</b> .....	108
<b>ESQUEMA 18</b>	Purificação da Fração E3 e isolamento da substância <b>S5</b> .....	110

<b>ESQUEMA 19</b>	Obtenção dos óleos essenciais das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i> .....	113
<b>ESQUEMA 20</b>	Purificação do extrato ZTCFC e isolamento das substâncias <b>S8, S10 e S11</b> .....	115
<b>ESQUEMA 21</b>	Obtenção dos extratos de cera epicuticular.....	117
<b>ESQUEMA 22</b>	Purificação do extrato ZTCeJ, identificação dos n-alcenos e das substâncias <b>S10, S11 e S13</b> .....	118
<b>ESQUEMA 23</b>	Purificação do extrato ZTCeJ, identificação dos n-alcenos e das substâncias <b>S10, S11, S13,S14 e S15</b> .....	118

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Exemplos de metabólitos secundários da ordem Rutales .....	32
<b>FIGURA 2</b>	Posição taxonômica do gênero <i>Zanthoxylum</i> , segundo Engler e suas espécies nativas do Brasil .....	37
<b>FIGURA 3</b>	Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Zanthoxylum</i> nativas do Brasil .....	39
<b>FIGURA 4</b>	Alcalóides isolados de espécies de Rutaceae, com atividade antitumoral .....	45
<b>FIGURA 5</b>	Estruturas dos alcalóides benzofenantridínicos de espécies de <i>Zanthoxylum</i> .....	50
<b>FIGURA 6</b>	Núcleos básicos de algumas classes de alcalóides .....	53
<b>FIGURA 7</b>	Exemplos da diversidade estrutural dos alcalóides .....	54
<b>FIGURA 8</b>	Exemplos de alcalóides da família Rutaceae derivados da fenilalanina e/ou tirosina .....	57
<b>FIGURA 9</b>	Núcleos básicos dos alcalóides quinolínicos e isoquinolínicos ..	58
<b>FIGURA 10</b>	Exemplos de alcalóide isoquinolínico e benzilisoquinolínico .....	59
<b>FIGURA 11</b>	Biossíntese dos alcalóides isoquinolínicos e benzilisoquinolínicos .....	60
<b>FIGURA 12</b>	Obtenção da dopamina a partir da L-tirosina .....	61
<b>FIGURA 13</b>	Obtenção da porção benzílica a partir da L-tirosina .....	62
<b>FIGURA 14</b>	Biossíntese da reticulina .....	64
<b>FIGURA 15</b>	Exemplos de algumas classes de alcalóides formados a partir da reticulina .....	65
<b>FIGURA 16</b>	Formação dos alcalóides aporfínicos .....	66
<b>FIGURA 17</b>	Formação dos alcalóides protoberberínicos .....	68
<b>FIGURA 18</b>	Formação do alcalóide diidroqueleritrina .....	70
<b>FIGURA 19</b>	Exsicata de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .....	77
<b>FIGURA 20</b>	Exsicata de <i>Zanthoxylum stelligerum</i> .....	78
<b>FIGURA 21</b>	Exsicata de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> .....	79

<b>FIGURA 22</b>	Aparelho para Hidrodestilação .....	111
<b>FIGURA 23</b>	Esquema da planta piloto de extração por fluído supercrítico SFE-500 .....	113
<b>FIGURA 24</b>	Indicação do terceiro nó em um ramo de <i>Z. tingoassuiba</i> .....	116
<b>FIGURA 25</b>	Alcalóides isolados das cascas das raízes dos espécimes de <i>Zanthoxylum</i> estudados .....	119
<b>FIGURA 26</b>	Outros constituintes isolados dos espécimes de <i>Zanthoxylum</i> estudados .....	120
<b>FIGURA 27</b>	Constituintes químicos identificados no óleo volátil das folhas do espécime de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> estudado .....	121
<b>FIGURA 28</b>	Numeração do esqueleto básico dos alcalóides benzofenantridínicos .....	124
<b>FIGURA 29</b>	Padrões de substituições para os alcalóides benzofenantridínicos .....	125
<b>FIGURA 30</b>	Representação da obtenção da isoarnotianamida em laboratório .....	126
<b>FIGURA 31</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S1</b> .....	128
<b>FIGURA 32</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S1</b> ...	128
<b>FIGURA 33</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S1</b> .....	129
<b>FIGURA 34</b>	Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S1</b> .....	130
<b>FIGURA 35</b>	Espectro de HMQC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S1</b> .....	131
<b>FIGURA 36</b>	Espectro de HMQC expandido [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S1</b> .....	131
<b>FIGURA 37</b>	Espectro de Massas (70 eV) de <b>S1</b> .....	133
<b>FIGURA 38</b>	Estrutura da diidroqueleritrina <b>S1</b> .....	133
<b>FIGURA 39</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S2</b> .....	134
<b>FIGURA 40</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S2</b> .....	135
<b>FIGURA 41</b>	Estrutura da angolina <b>S2</b> .....	136
<b>FIGURA 42</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S3</b> .....	137
<b>FIGURA 43</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S3</b> .....	137
<b>FIGURA 44</b>	Estrutura da arnotianamida <b>S3</b> .....	140
<b>FIGURA 45</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S4</b> .....	141
<b>FIGURA 46</b>	Proposta de nova nomenclatura para <b>S4</b> .....	142
<b>FIGURA 47</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S4</b> ...	143

<b>FIGURA 48</b>	Espectro de HMQC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S4</b> .....	144
<b>FIGURA 49</b>	Expansão do espectro de HMQC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S4</b> .....	145
<b>FIGURA 50</b>	Formação de derivados 9,10 e 10,11 substituídos .....	148
<b>FIGURA 51</b>	Metilação em faces opostas da molécula .....	149
<b>FIGURA 52</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S5</b> .....	150
<b>FIGURA 53</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S5</b> .....	151
<b>FIGURA 54</b>	Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S5</b> .....	152
<b>FIGURA 55</b>	Espectro de HMQC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S5</b> .....	154
<b>FIGURA 56</b>	Espectro de HMBC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S5</b> .....	154
<b>FIGURA 57</b>	Estrutura da cis-N-metilcanadina iodeto <b>S5</b> .....	155
<b>FIGURA 58</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S6</b> .....	156
<b>FIGURA 59</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S6</b> .....	159
<b>FIGURA 60</b>	Estrutura da 2,3-metilenodioxo 10,11-dimetoxi tetraidroprotoberberina iodeto <b>S6</b> .....	159
<b>FIGURA 61</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S7</b> .....	160
<b>FIGURA 62</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> + D <sub>2</sub> O] de <b>S7</b> .....	161
<b>FIGURA 63</b>	Espectro de absorção a região do infravermelho de <b>S7</b> .....	161
<b>FIGURA 64</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S7</b> .....	162
<b>FIGURA 65</b>	Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S7</b> .....	163
<b>FIGURA 66</b>	Possibilidades estruturais para <b>S7</b> .....	163
<b>FIGURA 67</b>	Espectro de HMQC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S7</b> .....	165
<b>FIGURA 68</b>	Espectro de HMBC [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S7</b> .....	165
<b>FIGURA 69</b>	Estrutura da predicentina-metil-iodeto <b>S7</b> .....	167
<b>FIGURA 70</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S8</b> .....	168
<b>FIGURA 71</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S8</b> .....	170
<b>FIGURA 72</b>	Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S8</b> .....	170
<b>FIGURA 73</b>	Estrutura da metil antranilato de-N-metila <b>S8</b> .....	171
<b>FIGURA 74</b>	Representação esquemática da formação das furanocumarinas .....	172
<b>FIGURA 75</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S9</b> .....	174
<b>FIGURA 76</b>	Espectro de RMN <sup>17</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S9</b> .....	174
<b>FIGURA 77</b>	Estrutura da Imperatorim <b>S9</b> .....	175
<b>FIGURA 78</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S10</b> .....	176



<b>FIGURA 79</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S11</b> .....	176
<b>FIGURA 80</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S10</b> e <b>S11</b> .....	177
<b>FIGURA 81</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S10</b> e <b>S11</b> .....	178
<b>FIGURA 82</b>	Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S10</b> e <b>S11</b> .....	178
<b>FIGURA 83</b>	Estrutura da Xantotoxina <b>S10</b> e Isopipinelina <b>S11</b> .....	179
<b>FIGURA 84</b>	Exemplo da estrutura dimérica da lignana .....	179
<b>FIGURA 85</b>	Séries das lignanas furofurânicas .....	180
<b>FIGURA 86</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S12</b> .....	182
<b>FIGURA 87</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S12</b> .....	183
<b>FIGURA 88</b>	Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S12</b> .....	183
<b>FIGURA 89</b>	Estrutura da Sesamina <b>S12</b> .....	184
<b>FIGURA 90</b>	Unidades isoprênicas .....	185
<b>FIGURA 91</b>	Tipos de ciclizações do esqualeno .....	186
<b>FIGURA 92</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de <b>S13</b> .....	187
<b>FIGURA 93</b>	Estrutura do Lupeol <b>S13</b> .....	190
<b>FIGURA 94</b>	Cromatograma de CG/IC do óleo .....	192
<b>FIGURA 95</b>	Cromatograma de íons totais do óleo volátil obtido por CG/EM (70 eV) .....	193
<b>FIGURA 96</b>	Cromatograma de íons totais do óleo volátil obtido por CG/EM (70 eV) + padrão de n-alcenos .....	193
<b>FIGURA 97</b>	Espectro de Massas (70 eV) α-pineno .....	194
<b>FIGURA 98</b>	Espectro de Massas (70 eV) β-felandreno .....	194
<b>FIGURA 99</b>	Espectro de Massas (70 eV) do eucalipitol .....	195
<b>FIGURA 100</b>	Espectro de Massas (70 eV) do trans-ocimeno .....	195
<b>FIGURA 101</b>	Espectro de Massas (70 eV) do linalol .....	196
<b>FIGURA 102</b>	Espectro de Massas (70 eV) do N-metil antranilato de metila ...	196
<b>FIGURA 103</b>	Espectro de Massas (70 eV) do cariofileno .....	197
<b>FIGURA 104</b>	Espectro de Massas (70 eV) do α-humuleno .....	197
<b>FIGURA 105</b>	Espectro de Massas (70 eV) do γ-muroleno .....	198
<b>FIGURA 106</b>	Espectro de Massas (70 eV) do elemol .....	198
<b>FIGURA 107</b>	Espectro de Massas (70 eV) do neroliol .....	199
<b>FIGURA 108</b>	Espectro de Massas (70 eV) do oxi-cariofileno .....	199

<b>FIGURA 109</b>	Espectro de Massas (70 eV) do $\beta$ -eudesmol .....	200
<b>FIGURA 110</b>	Espectro de Massas (70 eV) do oxi- $\alpha$ -bisabolol .....	200
<b>FIGURA 111</b>	Espectro de Massas (70 eV) do $\alpha$ -bisabolol .....	201
<b>FIGURA 112</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFF .....	204
<b>FIGURA 113</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFS .....	205
<b>FIGURA 114</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFFSc ...	205
<b>FIGURA 115</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFSSc ..	206
<b>FIGURA 116</b>	Representação de um corte histológico de folha .....	207
<b>FIGURA 117</b>	Cromatograma de uma mistura padrão de n-alcenos C19 – C44 .....	209
<b>FIGURA 118</b>	Cromatograma da fração ZTCeJ1 .....	210
<b>FIGURA 119</b>	Cromatograma da fração ZTCeA1 .....	210
<b>FIGURA 120</b>	Cromatograma da fração ZTCeJ2 .....	211
<b>FIGURA 121</b>	Cromatograma da fração ZTCeA2 .....	212
<b>FIGURA 122</b>	Cromatograma (CG-EM) da fração ZTCeA2 .....	213
<b>FIGURA 123</b>	Espectro de Massas (70 eV) da substância em 18,310` .....	214
<b>FIGURA 124</b>	Espectro de Massas (70 eV) da substância em 18,734` .....	214
<b>FIGURA 125</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] da Fração ZTCeJ3 .....	215
<b>FIGURA 126</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] da Fração ZTCeJ4 .....	216
<b>FIGURA 127</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] da Fração ZTCeA4 .....	216

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero Zanthoxylum nativas do Brasil.....	38
<b>QUADRO 2</b>	Espécies de Zanthoxylum e sua utilização na medicina popular.....	42
<b>QUADRO 3</b>	Ocorrência de alcalóides benzofenantridínicos em espécies de Zanthoxylum.....	46
<b>QUADRO 4</b>	Alcalóides benzofenantridínicos e suas atividades biológicas.....	72
<b>QUADRO 5</b>	Local de isolamento dos metabólitos dos espécimes estudados.....	123

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Número de gêneros e espécies da família Rutaceae nativos do Brasil .....	34
<b>TABELA 2</b>	Dados de HMQC da Substância <b>S1</b> .....	132
<b>TABELA 3</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>S3</b> e da arnotianamida .....	138
<b>TABELA 4</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C da substância <b>S3</b> e da arnotianamida ....	139
<b>TABELA 5</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>S4</b> e da 7,9-dimetoxi-2,3-dioximetilenobenzofenantridina com atribuição relacionada a numeração individual .....	143
<b>TABELA 6</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C obtidos do HMQC e correlação com a literatura .....	145
<b>TABELA 7</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H de <b>S1</b> , <b>S2</b> , <b>S3</b> e <b>S4</b> .....	146
<b>TABELA 8</b>	Correlação de <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (HMQC) para <b>S5</b> .....	153
<b>TABELA 9</b>	Correlação de <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C a duas e três ligações (HMBC) para <b>S5</b> .....	155
<b>TABELA 10</b>	Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H de <b>S5</b> e <b>S6</b> .....	157
<b>TABELA 11</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C de <b>S5</b> e <b>S6</b> .....	158
<b>TABELA 12</b>	Apresentação dos dados espectrofotométricos de <b>S7</b> .....	166
<b>TABELA 13</b>	Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H de N-metil antranilato de metila e <b>S8</b> .....	169
<b>TABELA 14</b>	Correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C a uma ligação (HMQC) para <b>S8</b> .....	171
<b>TABELA 15</b>	Dados RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° de <b>S12</b> e dados da literatura de uma lignana furofurânica .....	184
<b>TABELA 16</b>	Apresentação dos dados de RMN <sup>1</sup> H de <b>S13</b> e triterpeno da literatura .....	188
<b>TABELA 17</b>	Dados de RMN <sup>13</sup> C do lupeol e de <b>S13</b> .....	189
<b>TABELA 18</b>	Composição do óleo volátil das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i> ....	202
<b>TABELA 19</b>	Composição dos óleos essenciais obtidos por Fluido Supercrítico .....	204

<b>TABELA 20</b>	Composição da Cera Epicuticular das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i> .....	217
<b>TABELA 21</b>	Resultados da Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> , frente a bactérias ATCC .....	219
<b>TABELA 22</b>	Resultados da Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> , frente a isolados clínicos .....	220
<b>TABELA 23</b>	Resultados da Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> , frente a fungos filamentosos .....	220
<b>TABELA 24</b>	Porcentagem de inibição das frações sobre o <i>P. serpens</i> .....	222

## SUMÁRIO

1	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	28
2	<b><u>REVISÃO DA LITERATURA</u></b> .....	31
2.1	<b><u>A ORDEM RUTALES</u></b> .....	31
2.2	<b><u>A FAMÍLIA RUTACEAE</u></b> .....	32
2.3	<b><u>O GÊNERO ZANTHOXYLUM</u></b> .....	34
2.4	<b><u>O GÊNERO ZANTHOXYLUM NO BRASIL</u></b> .....	35
2.5	<b><u>UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE ZANTHOXYLUM NA MEDICINA POPULAR</u></b> .....	41
2.6	<b><u>ALCALÓIDES BENZOFENANTRIDÍNICOS E O GÊNERO ZANTHOXYLUM</u></b> .....	45
2.7	<b><u>ALCALÓIDES</u></b> .....	53
2.8	<b><u>ALCALÓIDES BENZILISOQUINOLÍNICOS</u></b> .....	57
2.9.	<b><u>BIOSSÍNTESE DOS ALCALÓIDES BENZILISOQUINOLÍNICOS</u></b>	59
2.9.1	FORMAÇÃO DA DOPAMINA .....	61
2.9.2	FORMAÇÃO DA RETICULINA .....	63
2.9.3	FORMAÇÃO DOS ALCALÓIDES APORFINICOS .....	65
2.9.4	FORMAÇÃO DOS ALCALÓIDES PROTOBERBERÍNICOS .....	67
2.9.5	FORMAÇÃO DOS ALCALÓIDES BENZO[c]FENANTRIDINICOS .....	69
2.10	<b><u>ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALÓIDES BENZO[c]FENANTRIDINICOS</u></b> .....	71
2.11	<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	75
2.11.1	OBJETIVO GERA .....	75
2.11.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	75
3	<b><u>EXPERIMENTAL</u></b> .....	76
3.1	<b><u>MATERIAL BOTÂNICO</u></b> .....	76
3.2	<b><u>MATERIAIS DE LABORATÓRIO</u></b> .....	80
3.2.1	SOLVENTES .....	80

3.2.2	SÍLICA .....	80
3.2.3	EQUIPAMENTOS .....	81
3.3	<b><u>MÉTODOLOGIA</u></b> .....	83
3.3.1.	<b>OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE <i>Z. rhoifolium</i></b> .....	84
3.3.2	<b>PURIFICAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAÍZ DE <i>Z. rhoifolium</i></b> .....	85
3.3.2.1	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZRCRH 3 .....	85
3.3.2.2	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZRCRH 3/3 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S9</b> .....	86
3.3.2.3	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZRCRH 33/5 .....	87
3.3.2.4	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZRCRH 335/4 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S1</b> .....	87
3.3.2.5	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZRCRH 3/4 E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS <b>S13, S2 E S9</b> .....	88
3.3.2.6	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZRCRH ER34/7 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S4</b> .....	89
3.3.3	<b>OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE <i>Z. stelliregum</i></b> .....	89
3.3.4	<b>PURIFICAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>Z. stelligegum</i></b> .....	90
3.3.4.1	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZSCRHS 3 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S13</b> .....	91
3.3.4.2	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZSCRHS 5 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S3</b> .....	91
3.3.4.3	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZSCRHS 4 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S1</b> .....	92
3.3.4.4	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZSCRHS 4/5 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S13</b> .....	93

3.3.4.5	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO OLEOSA DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>Z. STELLIGERUM</i> .....	93
3.3.4.6	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZSCRHO 2 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS <b>S13</b> E <b>S9</b> .....	94
3.3.4.7	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZSCRHO 4 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S12</b> .....	94
<b>3.3.5</b>	<b>OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE <i>Z. tingoassuiba</i></b> .....	<b>95</b>
<b>3.3.6</b>	<b>PURIFICAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>Z. tingoassuiba</i></b> .....	<b>96</b>
3.3.6.1	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>Z. tingoassuiba</i> E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S1</b> .....	96
3.3.6.2	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 7 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS <b>S13</b> .....	97
3.3.6.3	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 8 E ISOLAMENTO DE <b>S12</b> .....	98
3.3.6.4	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 8/4 .....	98
3.3.6.5	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 84/8 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S3</b> .....	99
3.3.6.6	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 8/9 .....	99
3.3.6.7	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 89/1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S3</b> .....	100
3.3.6.8	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRH 891/1 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS <b>S13</b> E <b>S12</b> .....	100
<b>3.3.7</b>	<b>PURIFICAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>Z. tingoassuiba</i></b> .....	<b>101</b>
3.3.7.1	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 2 .....	102
3.3.7.2	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 2/1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S3</b> .....	102
3.3.7.3	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 2/2 .....	102
3.3.7.4	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 2.2/1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S12</b> .....	102
3.3.7.5	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4 .....	104



3.3.7.6	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5 .....	104
3.3.7.7	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5-E1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S5</b> .....	104
3.3.7.8	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5-E2 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S7</b> .....	105
3.3.7.9	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5-E2/3 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S5</b> .....	106
3.3.7.10	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5 - E2/4 .....	106
3.3.7.11	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5 - E24/3 .....	107
3.3.7.12	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5 E243/2 .....	107
3.3.7.13	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5-E2432/2 .....	107
3.3.7.14	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5-E24322/2 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S6</b> .....	107
3.3.7.15	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5 E3 .....	109
3.3.7.16	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTCRM 4/5 E3/2 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA <b>S5</b> .....	109
<b>3.3.8</b>	<b>OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE Z. TINGOASSUIBA POR HIDRODISTILAÇÃO</b> .....	<b>110</b>
<b>3.3.9</b>	<b>OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE Z. <i>tingoassuiba</i> POR CO<sub>2</sub> SUPER CRÍTICO</b> .....	<b>112</b>
<b>3.3.10</b>	<b>OBTENÇÃO DO EXTRATO PROVENIENTE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE Z. <i>tingoassuiba</i></b> .....	<b>114</b>
3.3.10.1	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S8</b> .....	114
3.3.10.2	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ZTFC 4 E ISOLAMENTO DE <b>S10</b> E <b>S11</b> .....	115
3.3.10.3	ANÁLISE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS <b>S10</b> E <b>S11</b> .....	115

<b>3.3.11</b>	<b>OBTENÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE <i>Z. tingoassuiba</i></b> .....	<b>116</b>
3.3.11.1	PURIFICAÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE <i>Z. tingoassuiba</i> E IDENTIFICAÇÃO DOS N-ALCANOS E DAS SUBSTÂNCIAS <b>S10, S11, S13, S14 E S15</b> .....	117
<b>4</b>	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>119</b>
<b>4.1</b>	<b><u>CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS/ DETERMINADOS NOS ESPÉCIMES DE ZANTHOXYLUM</u></b> .....	<b>119</b>
<b>4.2</b>	<b><u>IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS DOS ESPÉCIMES DE ZANTHOXYLUM ESTUDADOS</u></b> .....	<b>122</b>
<b>4.2.1</b>	<b>ALCALÓIDES BENZOFENANTRIDINICOS</b> .....	<b>123</b>
4.2.1.1	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S1</b> .....	127
4.2.1.2	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S2</b> .....	134
4.2.1.3	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S3</b> .....	136
4.2.1.4	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S4</b> .....	140
<b>4.2.2</b>	<b>ALCALÓIDES PROTOBERBERÍNICOS</b> .....	<b>147</b>
4.2.2.1	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S5</b> .....	149
4.2.2.2	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S6</b> .....	156
<b>4.2.3</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA S7</b> .....	<b>160</b>
<b>4.2.4</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA S8</b> .....	<b>167</b>
<b>4.2.5</b>	<b>FURANOCUMARINAS</b> .....	<b>172</b>
4.2.5.1	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S9</b> .....	173
4.2.5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS <b>S10 E S11</b> .....	175
<b>4.2.6</b>	<b>LIGNANA</b> .....	<b>179</b>
4.2.6.1	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA <b>S12</b> .....	181
<b>4.2.7</b>	<b>TERPENÓIDES</b> .....	<b>185</b>
4.2.7.1	TRITERPENÓIDES .....	186
4.2.7.1.1	Identificação da Substância <b>S13</b> .....	187
4.2.7.2	MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS .....	190
4.2.7.2.1	Identificação dos Metabólitos Presentes nos Óleos Essenciais das Folhas de <i>Z. tingoassuiba</i> .....	191
4.2.7.2.2	Composição do Óleo Volátil Extraído por CO <sub>2</sub> Super Crítico .....	203

4.2.8	IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES NA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE <i>Z. tingoassuiba</i> .....	206
4.3	<u>ATIVIDADES BIOLÓGICAS</u> .....	218
4.3.1	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO .....	219
4.3.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO .....	220
4.3.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPARASITÁRIO .....	221
4.3.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE .....	223
4.3.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO ÓLEO VOLÁTIL EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA .....	225
5	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u> .....	229
6	<u>DADOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS</u> .....	231
	REFERÊNCIAS .....	234

## **1 INTRODUÇÃO**

As espécies da família Rutaceae têm sido amplamente estudadas devido à diversidade química de seus metabólitos e também devido à ocorrência de metabólitos restritos, levando a realização de vários estudos quimiosistemáticos. Um exemplo é o isolamento de alcalóides benzo[c]fenantridínicos em apenas cinco gêneros dentro desta família. A presença de alcalóides dessa classe pode ser interpretada como um indicativo da proximidade entre Rutaceae e grupos mais primitivos de angiospermas, sendo assim, o grupo onde ocorre este alcalóide pode ser considerado como a parte mais “primitiva” desta família. Tornando esta classe de alcalóides marcadores evolutivos e levando estes gêneros a formar um grupo classificado como “proto-Rutaceae”, de onde os demais grupos teriam sido derivados; um dos gêneros que compõe este grupo é o gênero *Zanthoxylum*.

Este gênero é também conhecido como o segundo mais rico em número de espécies, sendo que 10% destas são classificadas como nativas do Brasil. Um grande número de espécies de *Zanthoxylum* possui uma larga importância na medicina popular, sendo utilizadas em vários países, de inúmeras formas, contra inúmeras enfermidades (Quadro 1). A literatura aponta que os alcalóides benzofenantridínicos estão presentes nos extratos de várias plantas utilizadas na medicina popular.

Das vinte e cinco espécies de *Zanthoxylum*, consideradas nativas do Brasil, apenas 40% possui alguma descrição da sua composição química.

No intuito de contribuir com o conhecimento da química das espécies de *Zanthoxylum*, foram coletadas três espécies *Z. rhoifolium*, *Z. stelligerum* e *Z. tingoassuiba* todas nativas do Brasil, coletadas na Bahia.

Para justificar a importância deste estudo, inicialmente será apresentada a classificação botânica destas espécies, como pertencentes a ordem Rutales, família Rutaceae e o gênero *Zanthoxylum*. Neste levantamento serão apresentadas as espécies utilizadas na medicina popular, as partes das plantas e as aplicações farmacológicas.

Além disso, também foi organizado um quadro relacionando espécies de *Zanthoxylum* e presença de alcalóide benzofenantridínico, contando também com as indicações dos locais de coleta, os órgãos estudados e a estrutura do alcalóide isolado, visto que os alcalóides benzilisoquinolínicos têm sido relacionados com a atividade farmacológica e com possíveis marcadores quimiosistemáticos para este gênero.

Este trabalho também mostra que os estudos fitoquímicos realizados em espécies de *Zanthoxylum* brasileiras ainda são escassos, embora haja relatos na literatura que os alcalóides benzofenantridínicos tenham sido isolados.

Neste capítulo também é apresentada, resumidamente, a biossíntese dos alcalóides aporfínicos, protoberberínicos e benzofenantridínicos, com o intuito de informar a origem destes metabólitos e ajudar na discussão da identificação de algumas substâncias isolada neste trabalho.

No capítulo Experimental são relatados os procedimentos efetuados para o estudo fitoquímico das três espécies de *Zanthoxylum* e os reagentes e equipamentos utilizados. Os estudos fitoquímicos foram divididos em: estudo da casca da raiz das três espécies de *Zanthoxylum*, da composição do óleo essencial das folhas de *Z. tingoassuiba* obtido por hidrodestilação e por fluido supercrítico, dos constituintes da água do decocto e da composição da cera epicuticular das folhas de *Z. tingoassuiba*.

Ainda no capítulo quatro, são relatados também os resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, antioxidante e o potencial do óleo volátil em sistema de liberação controlada.

Finalmente as considerações finais do estudo são apresentadas assim como as perspectivas para futuros projetos os quais poderão contribuir para o progresso científico.

Com o objetivo de contribuir com futuro pesquisadores que necessitem de uma confirmação estrutural rápida no Capítulo Seis são dispostos os dados espectroscópicos das substâncias isoladas.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

Este capítulo tem como objetivo apresentar a classificação botânica das espécies investigadas, a utilização deste gênero na medicina popular e a relevância do estudo químico destas espécies.

### **2.1 A ORDEM RUTALES**

Segundo o botânico e sistemata Dahlgren, a ordem Rutales possui entre 3.000 e 3.500 espécies distribuídas nas famílias: Rutaceae, Meliaceae, Surianaceae, Kirkiaceae, Simaroubaceae, Cneoraceae e Burseraceae (MESTER, 1983; PIRANI, 1999).

Devido a diversidade de compostos químicos produzidos pelas espécies pertencentes a esta ordem, a mesma, tem sido objeto de estudo para um grande número de pesquisadores ao redor do mundo, tanto no que diz respeito a busca de novos metabólitos secundários quanto no entendimento da biossíntese e avaliação da atividades biológica destes compostos (WATERMAN e GRUNDON, 1983).

Além da diversidade química, esta ordem apresenta algumas classes de metabólitos que ocorrem unicamente dentro de um determinado grupo, onde se pode citar: limonóides (1) (Figura 1, p. 30), encontrados principalmente em Cneoraceae; quassinóides (2) encontrados principalmente em Simaroubaceae; e alguns grupos de alcalóides como os acridônicos (3), os carbazólicos (4) e as quinolinas hemiterpenóidicas (5), os quais são descritos nas famílias Meliaceae,

Simaroubaceae e Rutaceae, sendo esta última, a família mais examinada, dentre as três, para esta classe de constituinte (MESTER, 1983).

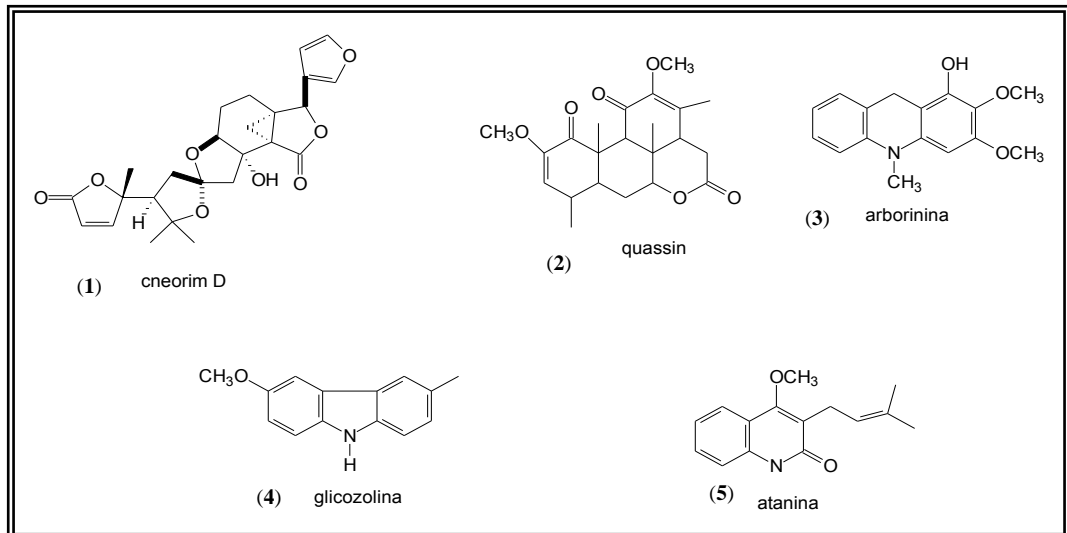


Figura 1 - Exemplos de metabólitos secundários da ordem Rutales

## 2.2 A FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae é composta de aproximadamente 150 gêneros e cerca de 1600 espécies, largamente distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, sul da África e Austrália.

Esta família possui como característica mais marcante a presença de pontuações translúcidas nas folhas, que correspondem a cavidades glandulares multicelulares produtoras de óleos voláteis também denominados de essenciais aromáticos. Essas glândulas estão espalhadas em tecidos parenquimáticos, como o córtex caulinar e no mesófilo, sendo ausente nas raízes. Segundo Pirani (1999), as substâncias produzidas por essas glândulas têm o papel ecológico de atração ou repulsão de polinizadores e herbívoro.



Como citado, a família Rutaceae tem sido amplamente estudada devido a presença de metabólitos de ocorrência restrita (Figura 1 p. 30), o que tem levado a possibilidade da realização de estudos quimiotaxonômicos.

O levantamento e ordenação dos dados disponíveis é um dos passos para a realização de um estudo quimiosistemático, e neste sentido, a contribuição de Waterman & Grundon (1983a) no levantamento de dados químicos para as famílias da ordem Rurales foi uma das mais relevantes. Pois, os autores neste trabalho, além do levantamento de dados químicos também são apresentadas implicações filogenéticas devido à distribuição das diversas classes de metabólitos secundários dentro da ordem e da família.

Um exemplo de contribuição filogenética no levantamento destes dados foi a possibilidade de verificar que o isolamento de algumas subclasses de alcalóides com esqueleto benzilisoquinolínicos somente eram relatados para cinco gêneros dentro da família Rutaceae: *Zanthoxylum*, *Phellodendron*, *Toddalia*, *Tetradium* e *Fagaropsis* (WATERMAN, 1983).

Segundo Waterman (1983), a presença de alcalóides dessa classe, pode ser interpretada como um indicativo da proximidade entre Rutaceae e grupos mais primitivos de angiospermas, justificado pelo paralelismo biossintético evolutivo (WATERMAN, 1983).

Sendo assim, o grupo onde ocorre esta classe alcalóide pode ser considerado com a parte mais “primitiva” desta família. Tornando esta classe de alcalóides marcadores evolutivos e levando estes gêneros a formarem um grupo classificado como “proto-Rutaceae”, de onde os demais grupos teriam sido derivados (PIRANI, 1999; WATERMAN, 1983).

Segundo a classificação de Engler, a família Rutaceae está subdividida em 7 subfamílias, 10 tribos e 25 subtribos. No Brasil 4 subfamílias são consideradas nativas e nestas são descritos 32 gêneros com 154 espécies como demonstrado no Tabela 1.

Tabela 1 - Número de gêneros e espécies da família Rutaceae nativos do Brasil

Subfamílias	Nº de gêneros	Nº de espécies
Rutoideae	27	139
Dictyolomatoideae	1	2
Spathelioideae	1	1
Toddaliinae	3	12

PIRANI 1999

### **2.3 O GÊNERO ZANTHOXYLUM**

O gênero *Zanthoxylum* pertence a subfamília Rutoideae e esta, encontra-se subdividida em 5 tribos, 5 subtribos e 86 gêneros. Sendo que das 5 tribos apenas *Zanthoxyleae* e *Galipeae* (antiga *Cusparieae*) têm representantes nativos do Brasil (Figura 2).

A subtribo *Evodiinae*, pertencente a tribo *Zanthoxyleae*, a qual, possui 19 gêneros, dentre eles, o gênero *Zanthoxylum*, conhecido como o segundo mais rico em número de espécies, com aproximadamente 250 espécies que ocorrem como árvores e arbustos distribuídos primariamente nos trópicos.

O posicionamento taxonômico do gênero *Zanthoxylum* foi alvo de muita controvérsia, devido à sua proximidade com o gênero *Fagara*, que muitas vezes levou à duplicidade de nomenclatura de uma mesma espécie.

Em 1962 o botânico Brizicky propões que o gênero *Fagara* passasse a ser um subgênero de *Zanthoxylum*. Através de re-estudos Rhder (1945), declarou que os dois gêneros eram muito próximos e não havia característica forte o suficiente para a separação (*apud* WATERMAN, 1975).

Baseado em evidências morfológicas e fitoquímicas Waterman (1975), defendeu consistentemente a fusão de *Fagara* em *Zanthoxylum* e esclareceu que *Xanthoxylum*, *Xanthoxylon* e *Zanthoxylon* são sinônimas de *Zanthoxylum*.

## 2.4 O GÊNERO ZANTHOXYLUM NO BRASIL

A pesar do conhecimento limitado da composição química das espécies de *Zanthoxylum* nativas do Brasil, os alcalóides benzofenantridínicos já foram isolados em diversas espécies de *Zanthoxylum* o que vem a confirmar o seu caráter como marcador taxonômico.

O Quadro 1, página 36 e a Figura 3 das páginas 37 e 38 apresentam os constituintes fixos das espécies brasileiras de *Zanthoxylum* e os órgãos estudados.

Além do estudo da composição dos constituintes fixos das espécies apresentadas, também foram realizados estudos da composição dos óleos essenciais das seguintes espécies: *Z. syncarpum* - óleo volátil da raiz (DE MORAIS et al., 2002); *Z. ekmanii* (Facundo et al. 2003) e *Z. rhoifolium* (GONZAGA et al., 2003a), óleo essencial das folhas.

Também são relatados, na literatura, estudos fitoquímicos de espécies classificadas por Pirani (1999), como *Zanthoxylum* do Brasil as quais não foram coletadas em solo brasileiro por exemplo: *Z. fagara*, coletadas no México (SNYDER e NAKANISHI, 1981), Venezuela (AMARO-LUIS et al., 1988) e Estados Unidos (STERMITZ et al., 1980). *Z. syncarpum* (ROSS et al., 2004), e *Z. caribaeum* (CASA e SOJO, 1967) ambas coletadas na Venezuela, onde foram realizados os estudos químicos dos caules, e *Z. riedelianum* (GUY et al., 2001), coletada no Paraguai onde foi realizada a análise dos constituintes voláteis das partes aéreas.

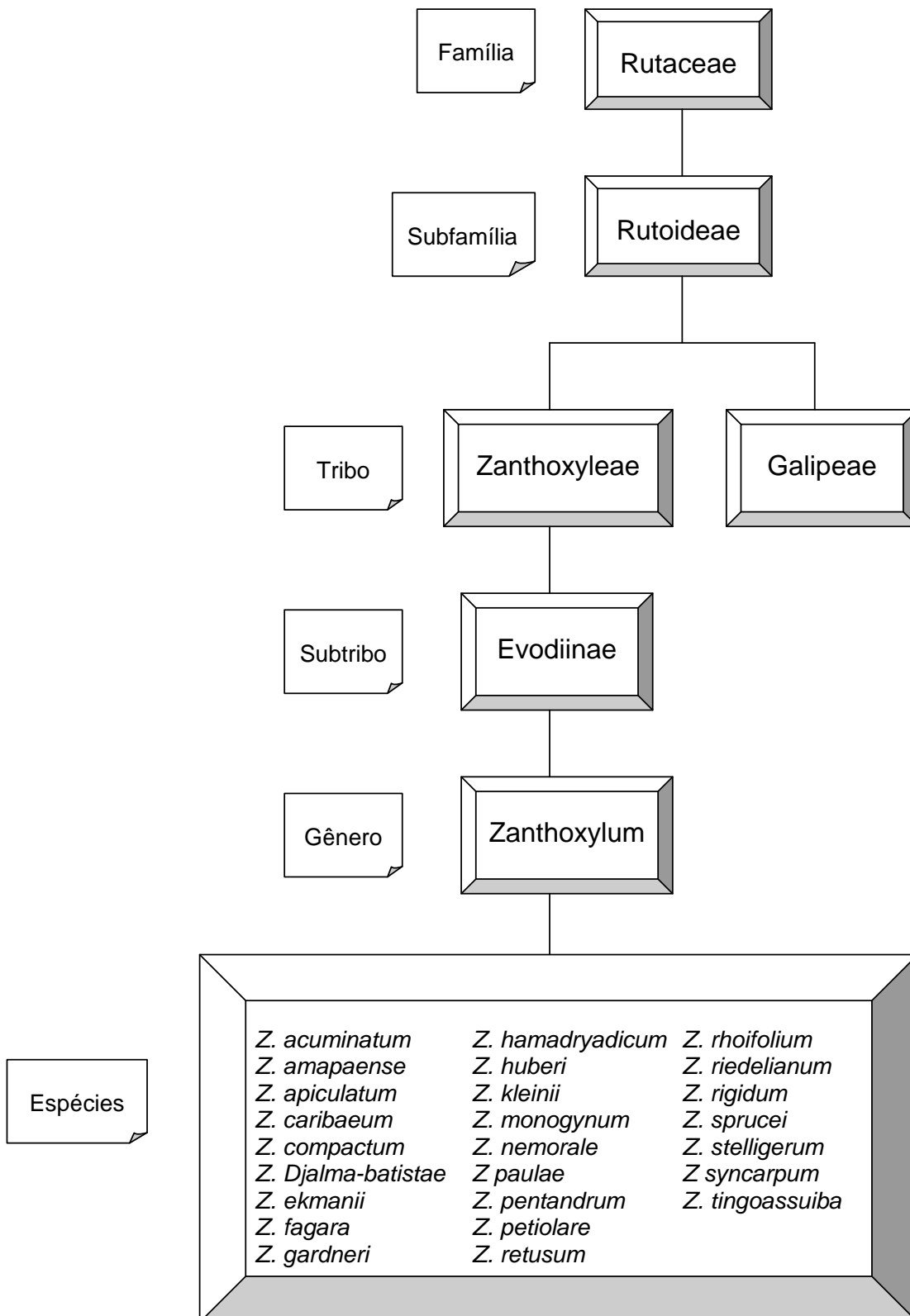


FIGURA 2 - Posição taxonômica do gênero *Zanthoxylum*, segundo Engler e suas espécies nativas do Brasil.

Espécie	Parte estudada	Metabólito secundário	Referência
<i>Z. ekmanii</i>	Raiz e folhas.	<b>6, 8, 10, 11, 15 e 16.</b>	FACUNDO et al., 2005.
<i>Z. petiolare</i>	Folhas e caule.	<b>11, 12, 13, 14, 15, 16 e 18.</b>	ARRUDA et al., 1994.
<i>Z. rhoifolium</i>	Casca do caule.	<b>54, 55, 75, 8.</b>	MOURA et al., 1997.
<i>Z. rhoifolium</i>	—	<b>41, 56, 68, 71, 72 e 75.</b>	GONZAGA et al., 2003b.
<i>Z. sprucei</i>	—	<b>11, 15, 16 e 20.</b>	BINUTU e CORDELL, 2000.
<i>Z. stelligerum</i>	Raiz.	<b>52, 16 e 19.</b>	OLIVEIRA et al., 2002.
	Raiz.	<b>6, 7, 8, 11 e 15.</b>	SILVA et al., 2002
<b>Z. tingoassuiba</b>	Caule e folhas.	<b>9, 10 e 15.</b>	BERNHARD e THIELE, 1978.

Quadro 1 – Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Zanthoxylum* nativas do Brasil

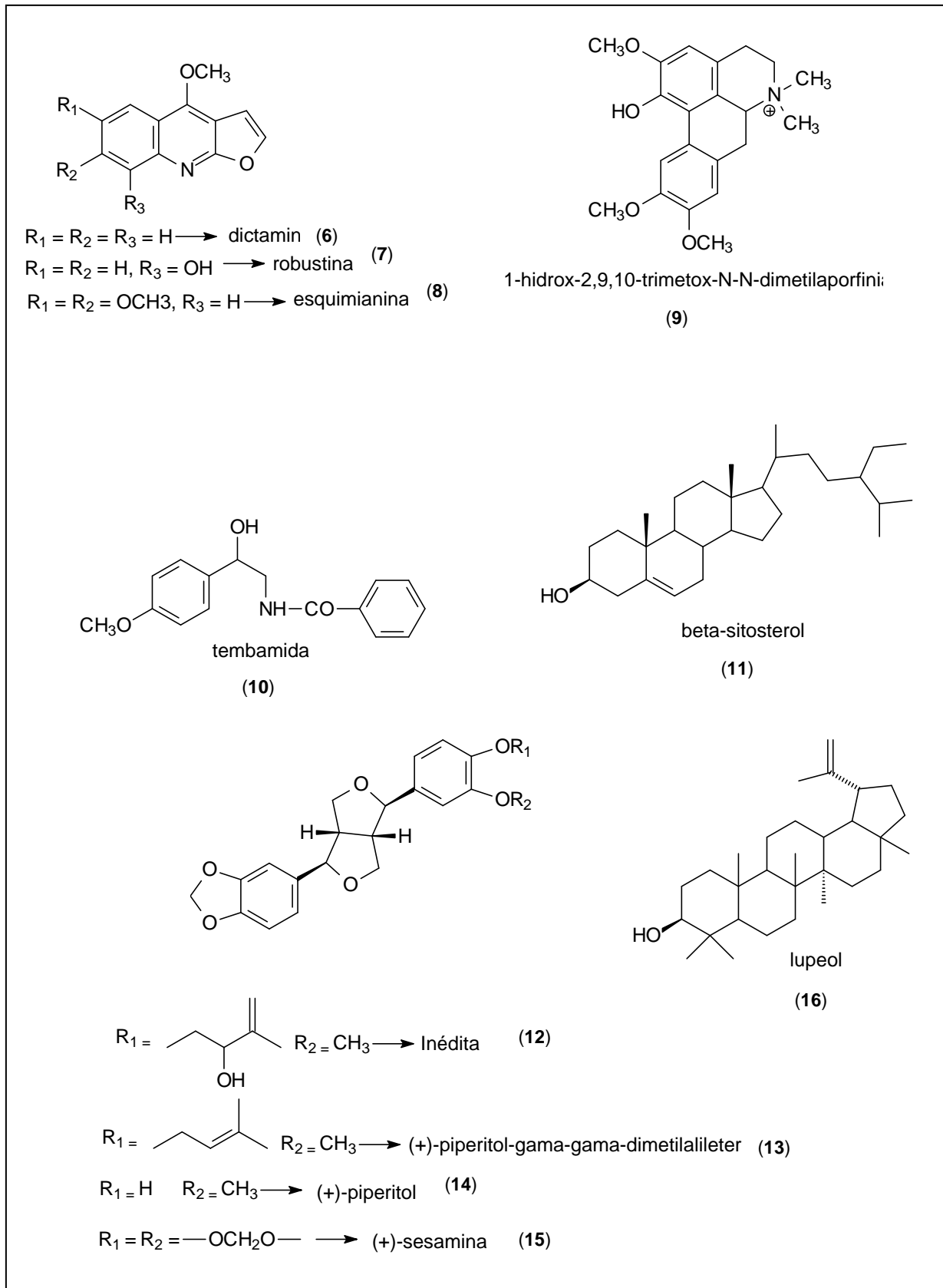


Figura 3 – Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Zanthoxylum* nativas do Brasil

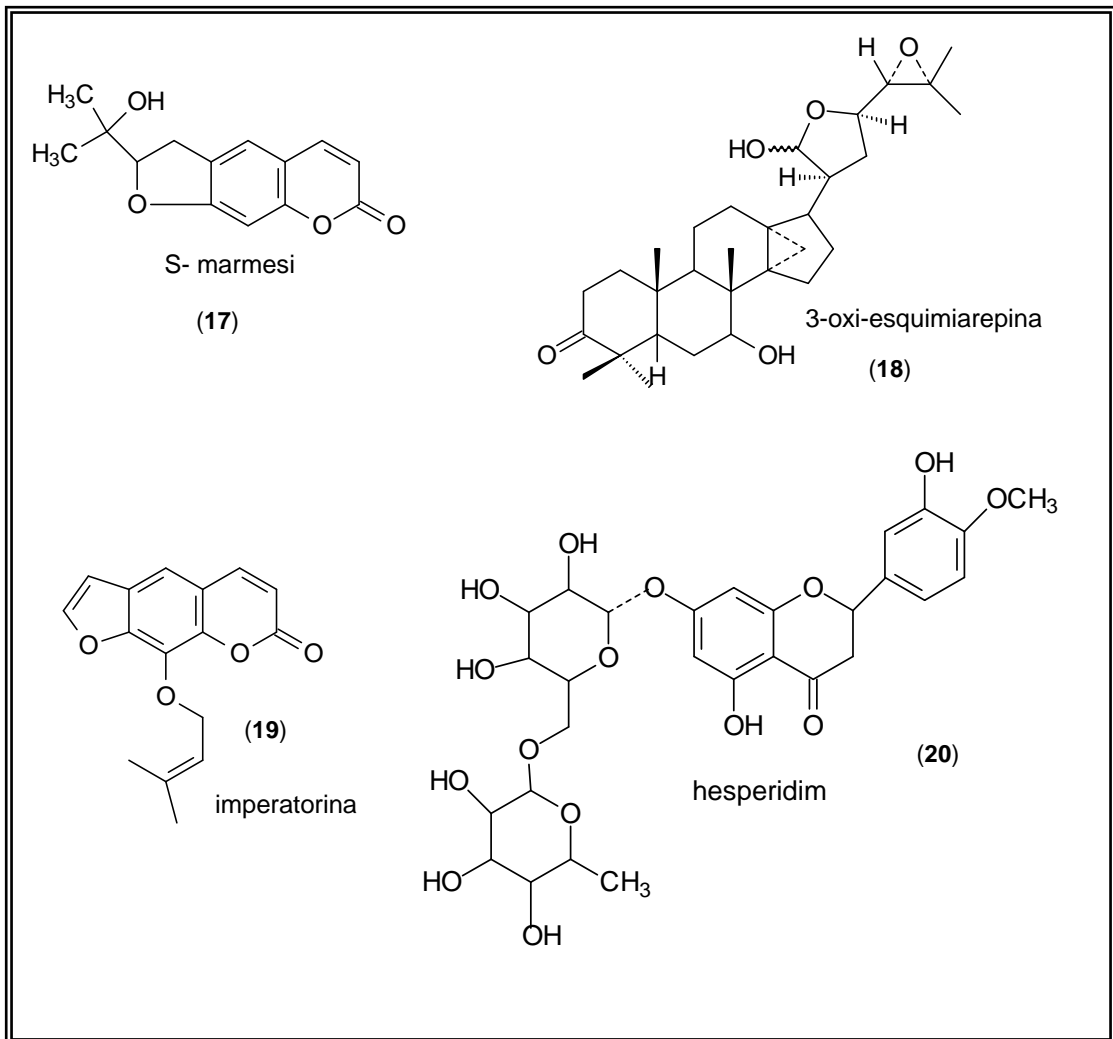


Figura 3 – Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Zanthoxylum* nativas do Brasil



## **2.5 UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE ZANTHOXYLUM NA MEDICINA POPULAR**

Um grande número de espécie de *Zanthoxylum* possui uma larga importância na medicina popular, sendo utilizadas em vários países de inúmeras formas contra inúmeras enfermidades (Quadro 2, p. 40 - 42).

Muitos extratos já foram testados e a sua ação biológica determinada e comprovada. Por exemplo, o extrato de *Zanthoxylum nitidium* foi incorporado a creme dental devido a sua forte atividade bactericida a qual esta ligada a presença de alcalóides benzofenantridínicos (MORIYASU et al., 1997).

Espécie	Parte utilizada	Indicação popular	Referências
<b>Z. ailanthoides</b>	folhas	Gripe.	SHEEN et al., 1994.
	casca	Picada de cobra.	
<b>Z. avicennae</b>	flores	Dor de garganta e icterícia.	ARTHUR et al., 1959. FISH et al., 1975b.
<i>Z. budrunga</i>	fruto	Asma, bronquite e hemorróidas.	AHMAD et al., 2003.
<i>Z. bungeanum</i>	folhas	Diarréia.	ISLAM et al., 2001.
	casca	Tosse, dor de cabeça e vomito.	
<i>Z. bungeanum</i>	pericarpo	Vomito, dor de dente e dor de estomago.	XIONG et al., 1995.
<i>Z. chalybeum</i>		Anti-malárico.	GESSLER et al., 1994.
<i>Z. chalybeum</i>	Casca e folhas	Gripe, dor de dente e dor de estomago.	KATO et al., 1996.
<i>Z. chalybeum</i>	Caule e raiz	Anti-malárico, Gripe, tosse, dor de dente.	MATU e STADEN, 2003.
	fruto	Tosse.	
	folhas	Pneumonia.	
<i>Z. coriaceum</i>	raiz	Diarréia e anti-hemorrágico.	SWINEHART e STERMITZ 1980.

QUADRO 2 – Espécies de *Zanthoxylum* e sua utilização na medicina popular

<i>Z. fagara</i>	folhas	Sudoríficos e calmante.	DOMÍNGUEZ et al. 1974.
<i>Z. heitzii</i>		Antireumática.	BONGUI et al., 2005.
<i>Z. integrifoliolum</i>	casca	Picada de cobra.	Chen et al., 1999b.
<i>Z. leprieurii</i>		Gonorréia e doenças de pele.	TATSADJIEU et al., 2003.
<i>Z. liebmanniaum</i>		Dor de dente, parasitose e anestésico local.	ARRIETA et al., 2001.
<i>Z. nitidum</i>		Antiinflamatório e analgésico.	MORIYASU et al., 1997.
<i>Z. rhetsa</i>	Casca do caule	Diarréia, reumatismo, infecções urinárias.	RAHMAN et al., 2002.
	fruto	Cólera, bronquites e asma.	
<i>Z. rhoifolium</i>		Dor de dente.	FACUNDO et al., 1997.
<i>Z. simulans</i>	raiz	Picada de cobra e problemas gástricos.	CHEN et al., 1994b.
<i>Z. syncarpum</i>	casca	Picada de cobra, dispepsia e contra febre.	ROSS et al., 2004.

QUADRO 2 – Espécies de *Zanthoxylum* e sua utilização na medicina popular

<i>Z. tetraspermum</i>		Reumatismo e algumas formas de diarreia.	ROSS et al., 2004. NISSANKA et al., 2001.
<i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	Casca do caule	Antiespasmódico, antifúngico, diurético antiparasitário, analgésico	SILVA et al., 2008.
<i>Z. usambarenses</i>	Casca e folhas	Gripe, dor de dente e dor de estômago.	KATO et al., 1996.
<i>Z. usambarenses</i>	casca	Reumatismo.	MATU e STADEN, 2003.
	Caule jovem	Escovar os dentes.	
<i>Z. xanthoxyloides</i>		Enterites, diarreia, disenteria.	TATSADJIEU et al., 2003.

Quadro 2 – Espécies de *Zanthoxylum* e sua utilização na medicina popular

Baseado nos conhecimentos, científico e popular, em meados dos anos 70, o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, elegeu as famílias Burseraceae, Meliaceae, Melianthaceae, Rutaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae como famílias de grande interesse, para investigações de substâncias com atividade antitumoral.

O resultado deste trabalho revelou que muitos dos metabólitos secundários com atividade antitumoral foram isolados de plantas da família Rutaceae, dentre estes, os alcalóides berberina (21), fagaronina, (22), nitidina (23), 5-metoxicantín-6-ona (24), 4-metoxitiocantín-6-ona (27) e acronicina (26) (Figura 2, p. 37) (LEWIS, 1983).

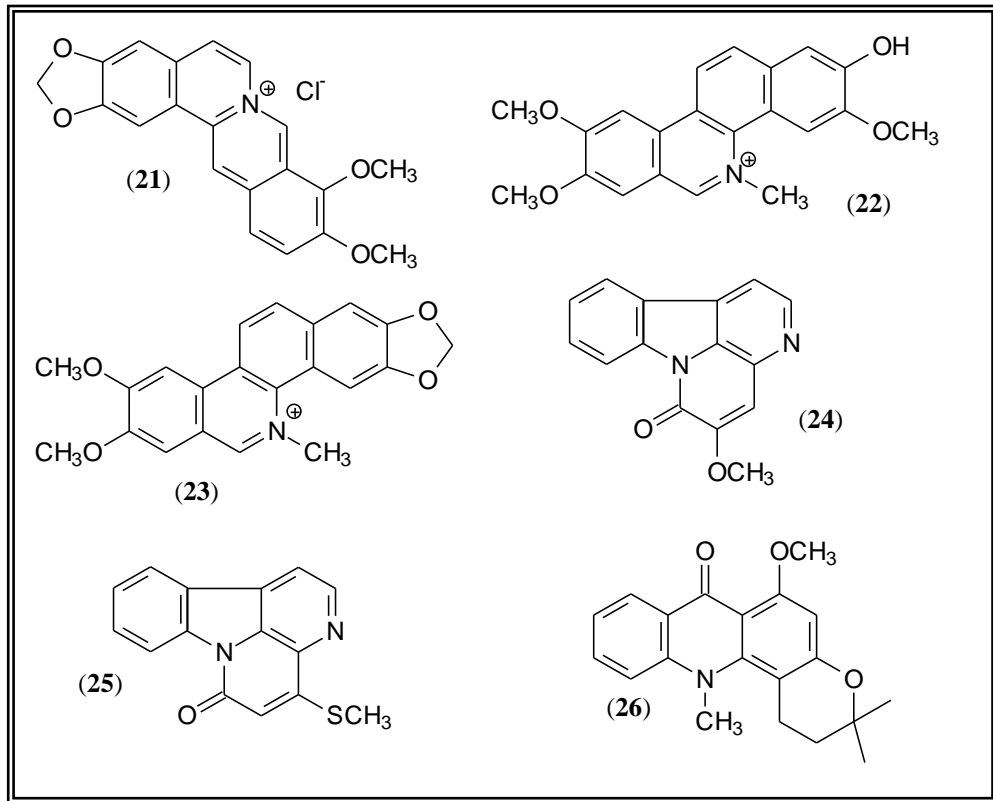


Figura 4 - Alcalóides isolados de espécies de Rutaceae, com atividade antitumoral.

## 2.6 ALCALÓIDES BENZOFENANTRIDÍNICOS E O GÊNERO ZANTHOXYLUM

Como apresentado na Figura 4 dos alcalóides com atividade antitumoral promissora 50% possuem esqueleto benzilisoquinolínico, sendo dois destes benzo[c]fenantridinico.

Tendo em vista a importância quimiotaxonômica e farmacológica deste grupo de alcalóides, o Quadro 3 (p. 44-47) procura demonstrar a ocorrência destas substâncias, em espécies de *Zanthoxylum* coletadas em vários países, sua diversidade estrutural e órgão de onde foram isoladas. A numeração que aparece na coluna de Substâncias Isoladas corresponde as estruturas apresentadas na Figura 3 página 48-50.

Espécie	Local de Coleta	Parte Estudada	Substâncias Isoladas	Referência
<i>Z. ailanthoides</i>	Taiwan	caule	<b>31, 32, 47 e 59.</b>	SHEEN et al., 1994.
<i>Z. avicennae</i>	China	Casca da raiz	<b>27, 28 e 29.</b>	ARTHUR et al., 1959.
<i>Z. avicennae</i>	China	Casca da raiz	<b>28, 42 e 50.</b>	FISH et al., 1975b.
<i>Z. bungeaum</i>	China	raiz	<b>31 e 60.</b>	REN e XIE, 1982
<i>Z. chalybeum</i>	Quênia	raiz	<b>42 e 50.</b>	KATO et al., 1996.
<i>Z. coriaceum</i>	Bahamas	Raiz	<b>53</b>	SWINEHART e STERMITZ, 1980.
<i>Z. decaryi</i>	Madagascar	Casca do caule	<b>36</b>	VAQUETTE et al., 1973.
<i>Z. diptalum</i>	EUA	Casca da raiz	<b>42 e 50.</b>	FISH et al., 1975c.
<i>Z. flavum</i>	República Dominicana	Casca da raiz	<b>42 e 50.</b>	WATERMAN, 1976.
<i>Z. gillettii</i>	Nigéria	raiz	<b>31, 42, 50 e 53.</b>	ADESINA, 1988.
<i>Z. heitzii</i>	Camarões	Casca do caule	<b>42</b>	NGOUELA et al., 1994.

Quadro 3 – Ocorrência de alcalóides benzofenantridínicos em espécies de *Zanthoxylum*

<i>Z. heitzii</i>	Gabão	raiz	<b>43</b>	BONGUI et al., 2005.
<i>Z. intrgrifoliolum</i>	Taiwan	Casca do caule	<b>56</b>	JEN et al., 1993.
<i>Z. intrgrifoliolum</i>	Taiwan	fruto	<b>36, 44 e 60.</b>	CHEN et al., 1999a.
<i>Z. leprieurii</i>	Gana		<b>53</b>	WATERMAN et al., 1976.
<i>Z. nitidum</i>	China	Raiz  Casca de raiz	<b>42, 45 e 46</b>	ARTHUR et al., 1959.
<i>Z. nitidum</i>	China		<b>42, 45, 46, 54 e 60.</b>	WANG e HSING, 1981.
<i>Z. nitidum</i>		raiz	<b>39, 40, 42, e 50.</b>	FANG et al., 1993.
<i>Z. nitidum</i>	China	raiz	<b>42 e 50.</b>	MORIYASU et al., 1997.
<i>Z. nitidum</i>	Austrália		<b>36, 38, 42, 53 e 60.</b>	DEYUN et al., 1996.
<i>Z. microcarpum</i>	Costa Rica	Casca do caule	<b>36 e 44.</b>	BOULWARE e STERMITZ, 1981.
<i>Z. microcarpum</i>	Costa Rica	caule	<b>34 e 41.</b>	BOULWARE e STERMITZ, 1981.
<i>Z. myriacanthum</i>	Malásia	Casca de raiz	<b>44 e 52.</b>	SUKARI et al., 1999.

Quadro 3 – Ocorrência de alcalóides benzofenantridínicos em espécies de *Zanthoxylum*

<i>Z. myriacanthum</i>	Malásia	Casca de raiz	<b>46</b>	WATERMAN, 1975b.
<i>Z. ocumarensense</i>	Venezuela	Casca do caule	<b>50.</b>	MARCANO et al., 1972.
<i>Z. simulans</i>	Taiwan	Casca da raiz	<b>27, 34, 36, 50, 51, 54, 57, 59, 60 e 61.</b>	CHEN et al., 1994.
<i>Z. parvifolium</i>	Gana	Casca de raiz	<b>42, 54, 57, 59, 60 e 61.</b>	FISH et al., 1975 <sup>a</sup> .
<i>Z. punctatum</i>	Porto Rico	Caule e ramos	<b>48.</b>	STERMITZ e SHARIFI 1977.
<i>Z. rhoifolium</i>	Brasil	raiz	<b>45, 46 e 65.</b>	MOURA et al., 1997.
<i>Z. rhoifolium</i>	Brasil	Casca do caule	<b>30, 47, 59, 62, 63, e 65.</b>	GONZAGA et al., 2003b.
<i>Z. rugosum</i>	Brasil	raiz	<b>50.</b>	DIEHL et al., 2000.
<i>Z. scandens</i>	Vietnã	Casca do caule	<b>60.</b>	NGUYEN et al., 2002.
<i>Z. schinifolium</i>	Taiwan	Casca do caule	<b>60</b>	CHEN et al., 1995.
<i>Z. schinifolium</i>	Taiwan	Casca do caule	<b>45</b>	CHANG et al., 1997.
<i>Z. simulans</i>	China	Casca da raiz	<b>50, 53 e 54.</b>	GRAY e O'SULLIVAN, 1980.

Quadro 3 – Ocorrência de alcalóides benzofenantridínicos em espécies de *Zanthoxylum*



<i>Z. simulans</i>	Taiwan	Casca da raiz	<b>34, 36, 50, 60 e 64</b>	WU e CHEN, 1993.
<i>Z. simulans</i>	Taiwan	caule	<b>34</b>	YANG et al., 2002.
<i>Z. spinosum</i>	Caribe	Casca do caule	<b>34, 35, 36, 38, 49, 50, 53, 54, 55, 59 e 60</b>	NG et al., 1987.
<i>Z. syncarpum</i>	Venezuela	caule	<b>36</b>	ROSS et al., 2004.
<i>Z. tetraspermum</i>	Sri Lanka	Casca do caule	<b>30 e 47</b>	NISSANKA et al., 2001.
<i>Z. thomense</i>		Casca do caule	<b>33, 36 e 60</b>	SIMERAY et al., 1985.
<i>Z. tsihanimposa</i>	Madagascar	Casca do caule	<b>53, 73 e 59.</b>	DECAUDAIN et al., 1974.
<i>Z. usambarensense</i>	Quênia	caule	<b>37, 42 e 50</b>	KATO et al., 1996.
<i>Z. viride</i>	Nigéria	Casca da raiz	<b>42 e 50</b>	FISH e WATERMAN, 1971.
<i>Z. viride</i>	Nigéria	Casca do caule	<b>36</b>	WATERMAN, 1975a.
<i>Z. williamsii</i>	Honduras	Raiz	<b>42 e 50</b>	STERMITZ et al., 1980.
<i>X. arnottianum</i>	Japão	casca	<b>31, 36, 50, 54 e 60</b>	ISHII et al., 1977.
<i>X. inerme</i>	Japão	raiz	<b>42 e 44</b>	ISHII et al., 1981.

Quadro 3 – Ocorrência de alcalóides benzofenantridínicos em espécies de *Zanthoxylum*

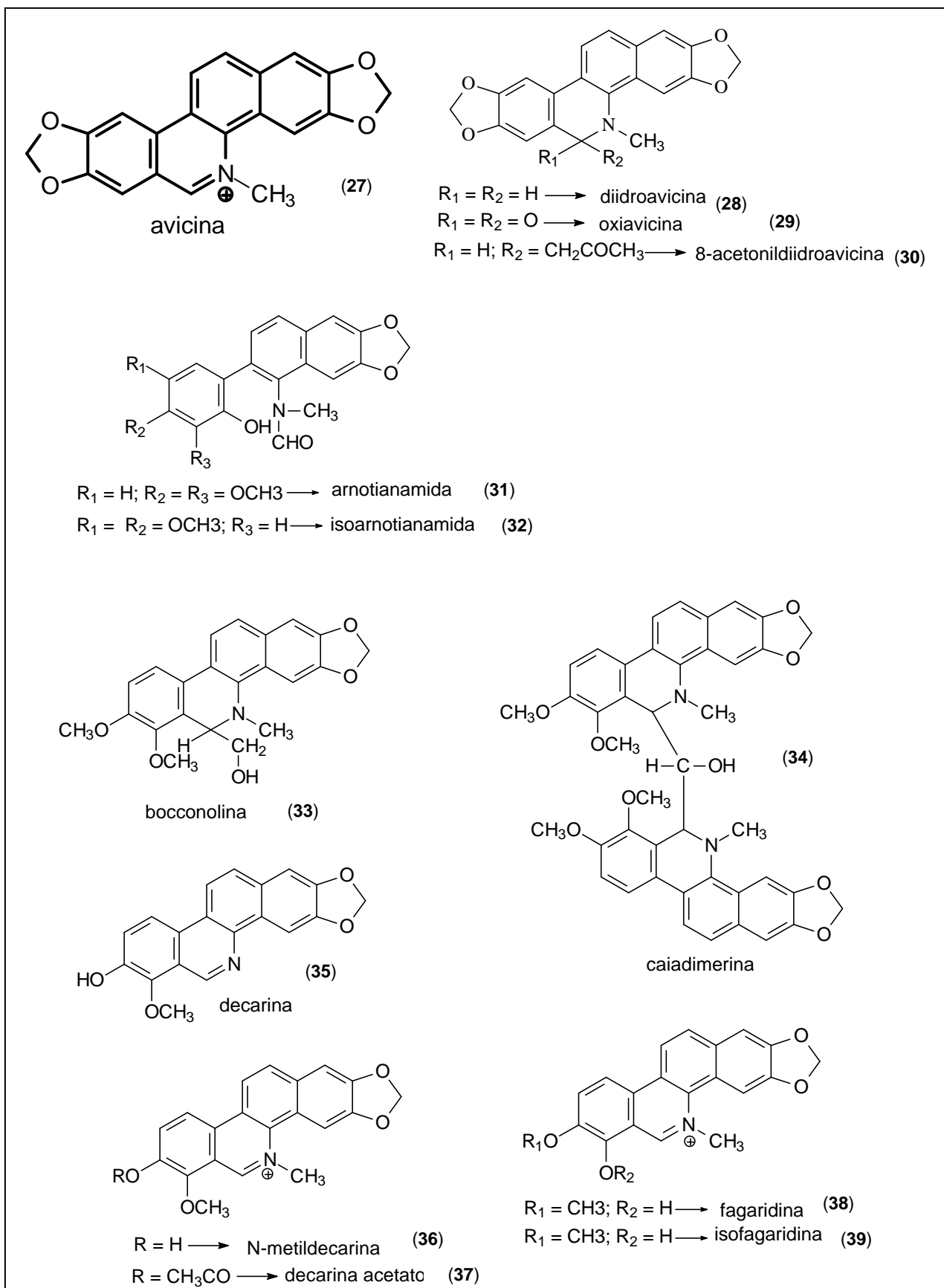


Figura 5 – Estruturas dos alcalóides benzofenantridínicos de espécies de *Zanthoxylum*

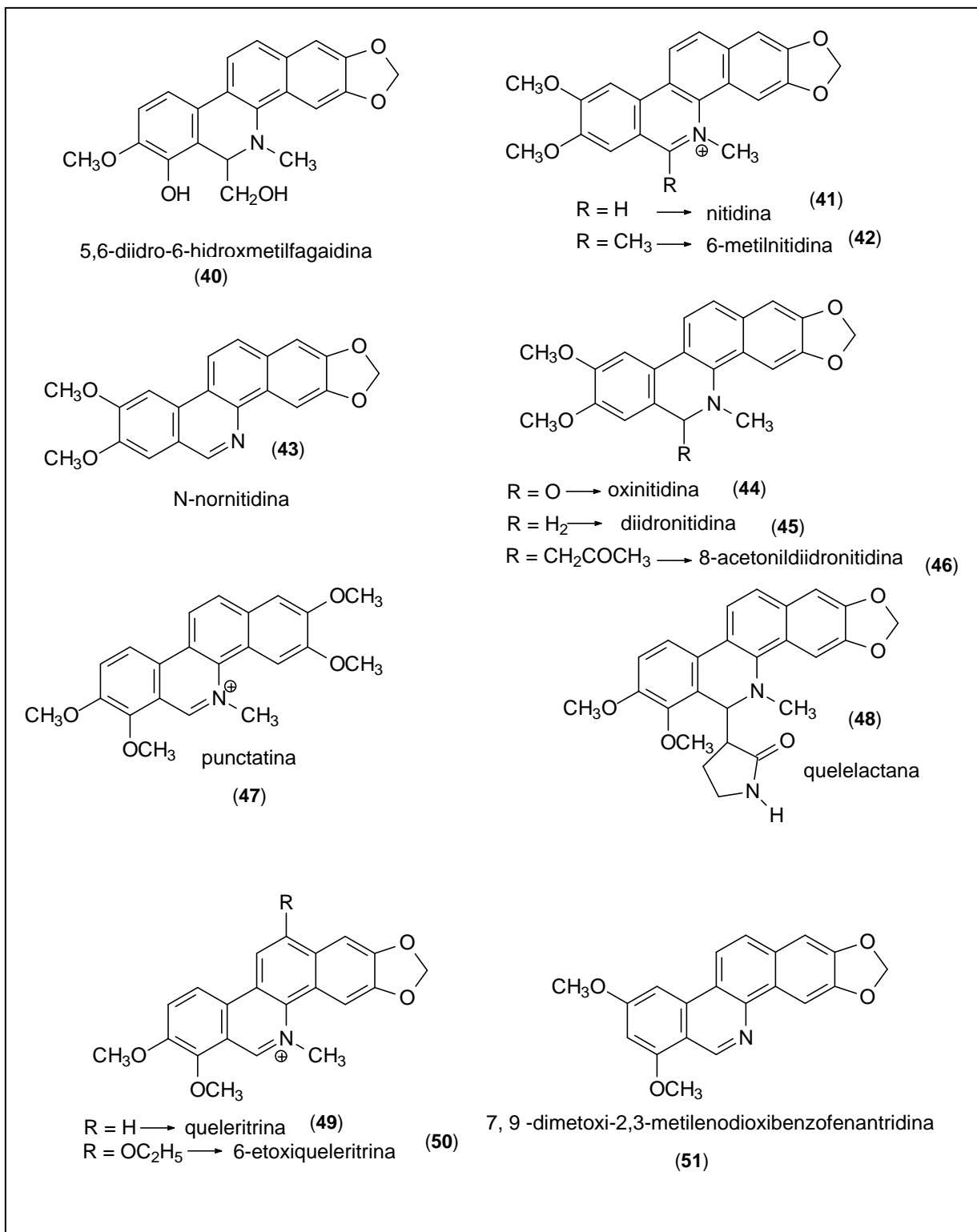


Figura 5 – Estruturas dos alcalóides benzofenantridínicos de espécies de *Zanthoxylum*

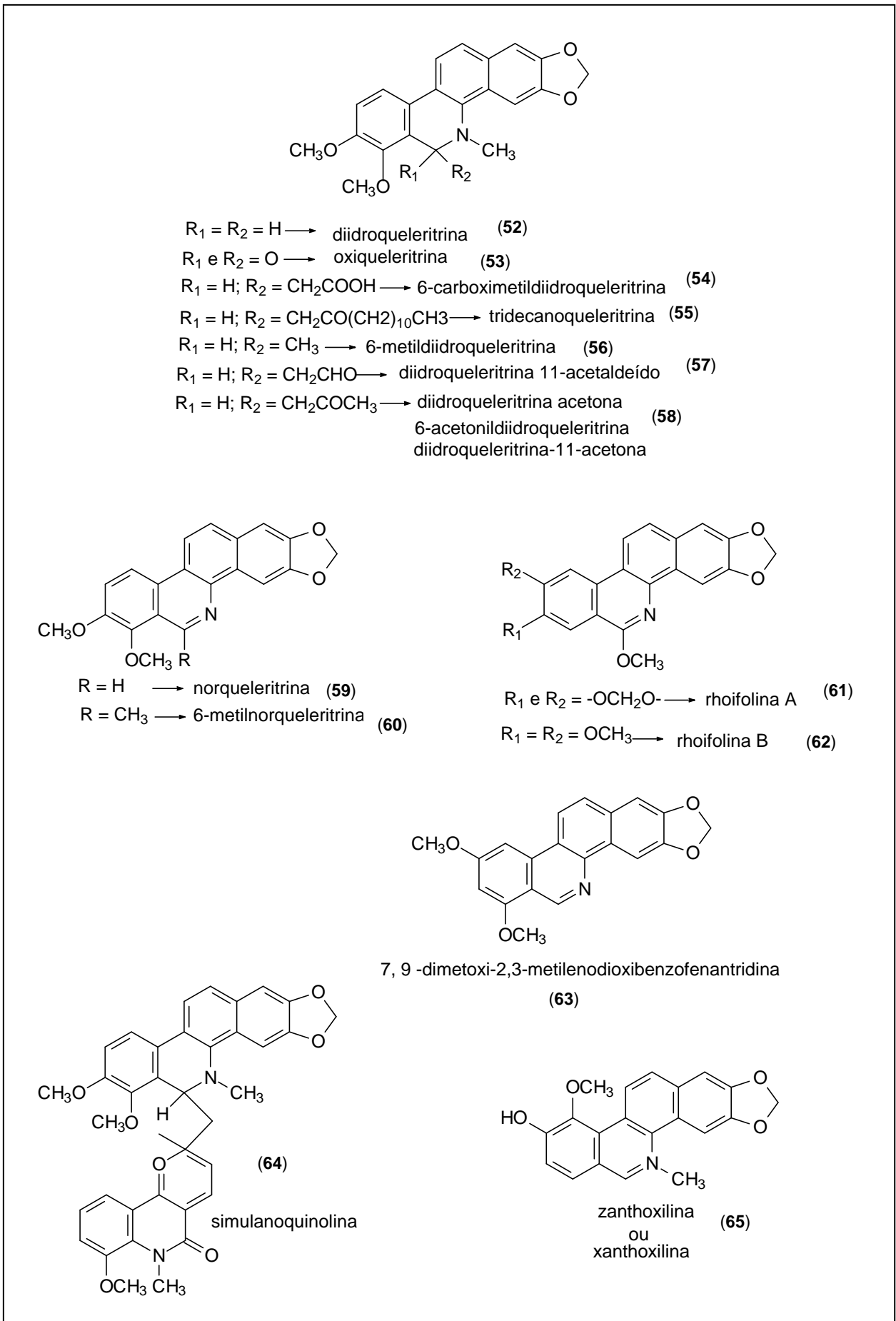


Figura 5 – Estruturas dos alcalóides benzofenantridínicos de espécies de *Zanthoxylum*

## 2.7 ALCALÓIDES

Como apresentado anteriormente este grupo de metabólitos secundários possui uma variedade farmacológica e estrutural que o torna um importante alvo para a pesquisa. Este capítulo busca fazer um apanhado geral sobre alcalóides finalizando com a biossíntese dos alcalóides aporfínicos, protoberberínicos e benzofenantridínicos.

Os alcalóides constituem um dos grupos mais diversos de produtos naturais a serem classificados sob um título comum. A Figura 6 exemplifica esta diversidade estrutural, mostrando alguns núcleos desta classe de metabólitos secundários.

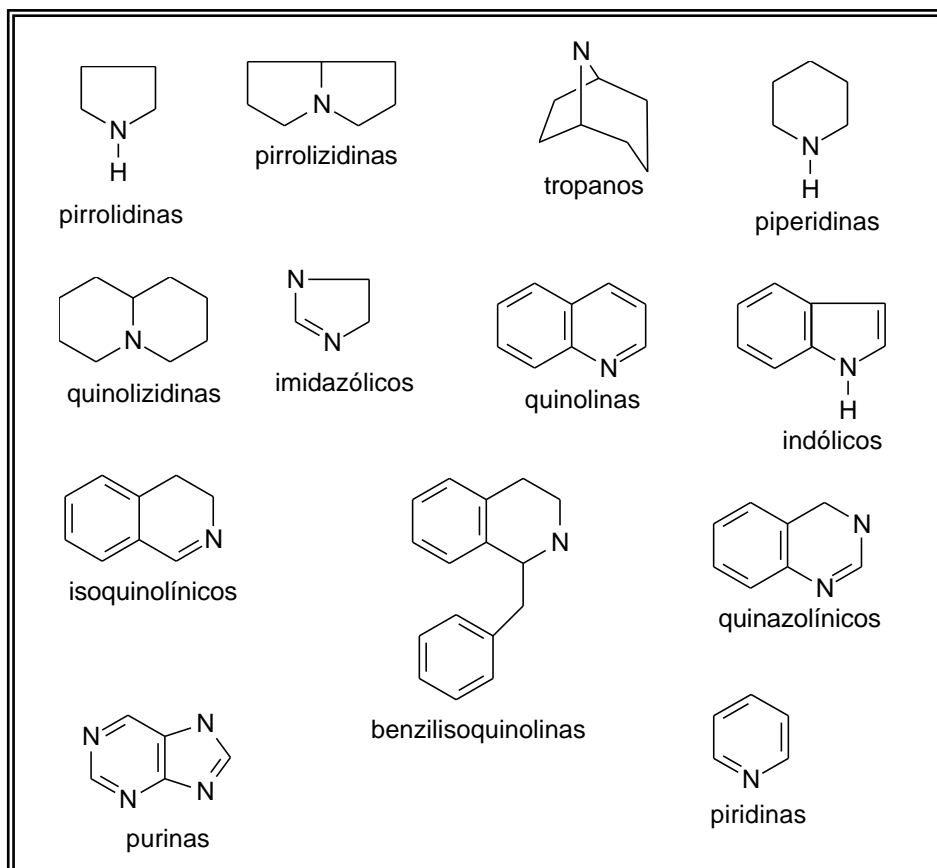


Figura 6 – Núcleos básicos de algumas classes de alcalóides

Além da diversidade estrutural, os alcalóides também possuem um amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo: quinina (66) com atividade antimalárica; atropina (67) antiespasmódica; mescalina (68) alucinógena; protoveratrina A (69) anti-hipertensiva e a pilocarpina (70) utilizada no tratamento do glaucoma (Figura 7).

Essa diversidade estrutural dificulta a definição e classificação desta classe de metabólitos secundários seja do ponto de vista químico ou fisiológico (HENRIQUES et al., 1999; CHIESA e MOYNA, 1999).

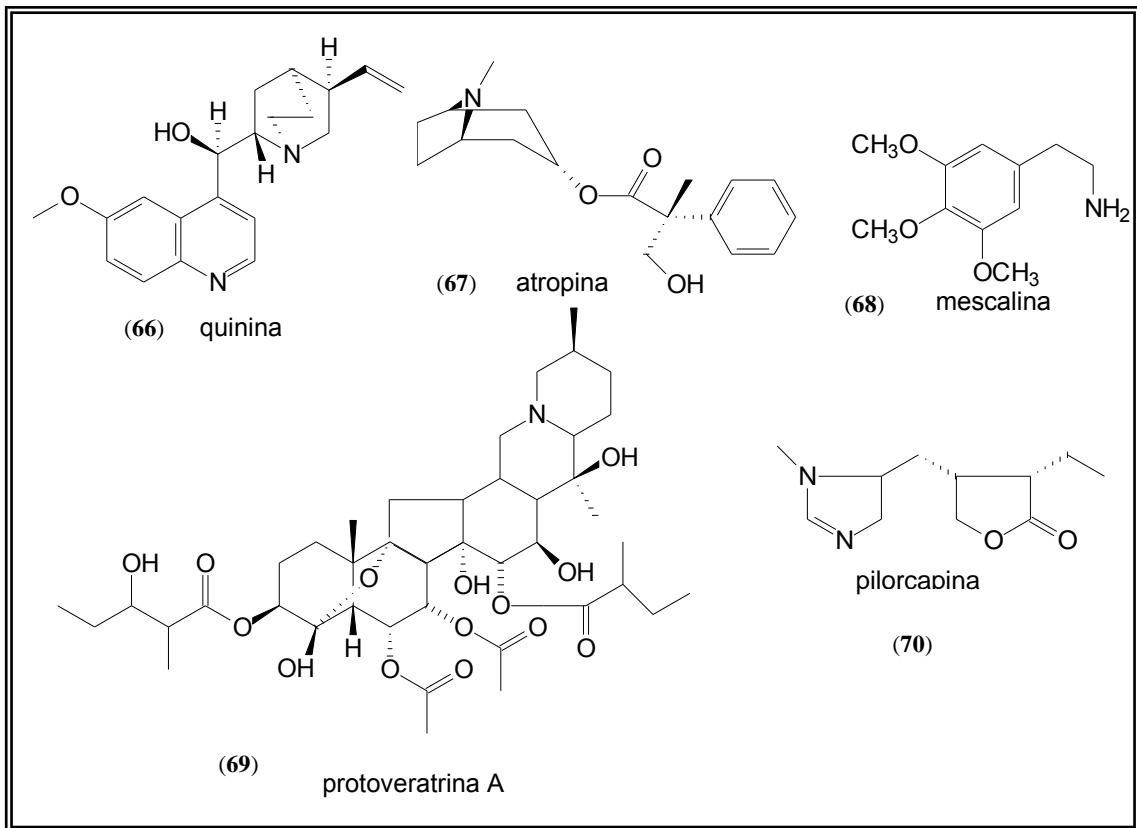


Figura 7 – Exemplos da diversidade estrutural dos alcalóides

Tentando organização este tema, Euler (1908 apud HEGNAUER, 1988), definiu os alcalóides como “metabólitos básicos com anel N-heterocíclico”.

No entanto, esta definição não engloba estruturas como a da mescalina (68) que não possui o seu nitrogênio em um anel.

Assim em 1988, Hegnauer propõe a classificação dos alcalóides segundo a sua biossíntese, os dividindo em três grandes grupos:

a) alcalóides verdadeiros – substâncias derivadas de aminoácido que contêm pelo menos um átomo de nitrogênio em anel heterocíclico como representado pelas estruturas (66) e (67), Figura 7, p. 51.

b) protoalcalóides - substâncias derivadas de aminoácido com o átomo de nitrogênio não-pertencente a um sistema heterocíclico como representado pela estrutura (68), Figura 7, p. 51.

c) pseudoalcalóides – compostos nitrogenados com ou sem anéis N-heterocíclicos, cujo núcleo básico não é derivado de aminoácido, estrutura (69) na Figura 7, p. 51.

A classificação dos alcalóides através da sua via biossintética proposta por Euler, também pode ser utilizada com o propósito taxonômico. A distribuição dos alcalóides nos diversos taxa revelam uma coerência entre classe de metabólitos e a evolução dos grupos vegetais que os produzem, esta correlação foi essencial para a utilização destas substâncias como marcadores quimiotaxonômicos (HEGNAUER, 1988; WATERMAN, 1999).

Evidências desta natureza levaram o botânico e sistemata Cronquist em 1968, a re-classificar as famílias Papaveraceae e Fumariaceae em uma subclasse das Magnoliidae. Pois somente estas famílias, dentro da ordem Rhodiales,

produziam alcalóides como esqueletos benzilisoquinolínicos (1968 *apud* WATERMAN, 1999; SEILER, 1998).

A literatura descreve vários exemplos, onde a análise dos metabólitos secundários e o esclarecimento de suas vias biossintéticas contribuem para a classificação taxonômica. Por exemplo, dentro da ordem Rurales, foram descritos alcalóides apenas nas famílias Rutaceae, Simaroubaceae e Meliaceae, sendo típicos desta ordem os alcalóides derivados do ácido antranílico, do triptofano, da fenilalanina e/ou tirosina, histidina, lisina, ornitina e do ácido nicotínico (MESTER, 1983; WATERMAN, 1999).

Dentro desta classificação Waterman (1983), subdivide os alcalóides típicos de Rurales derivados da fenilalanina e/ou tirosina da seguinte forma: 1 – Feniletilaminas simples (71) e oxazoles (72) 2 – Isoquinolinas (73), Aporfinas (74), Protoberberinas (75) e Protopinas (76) e 3 – Benzo[c]fenantridíνας (77). Conforme Figura 8 da página 54 (MESTER, 1983).



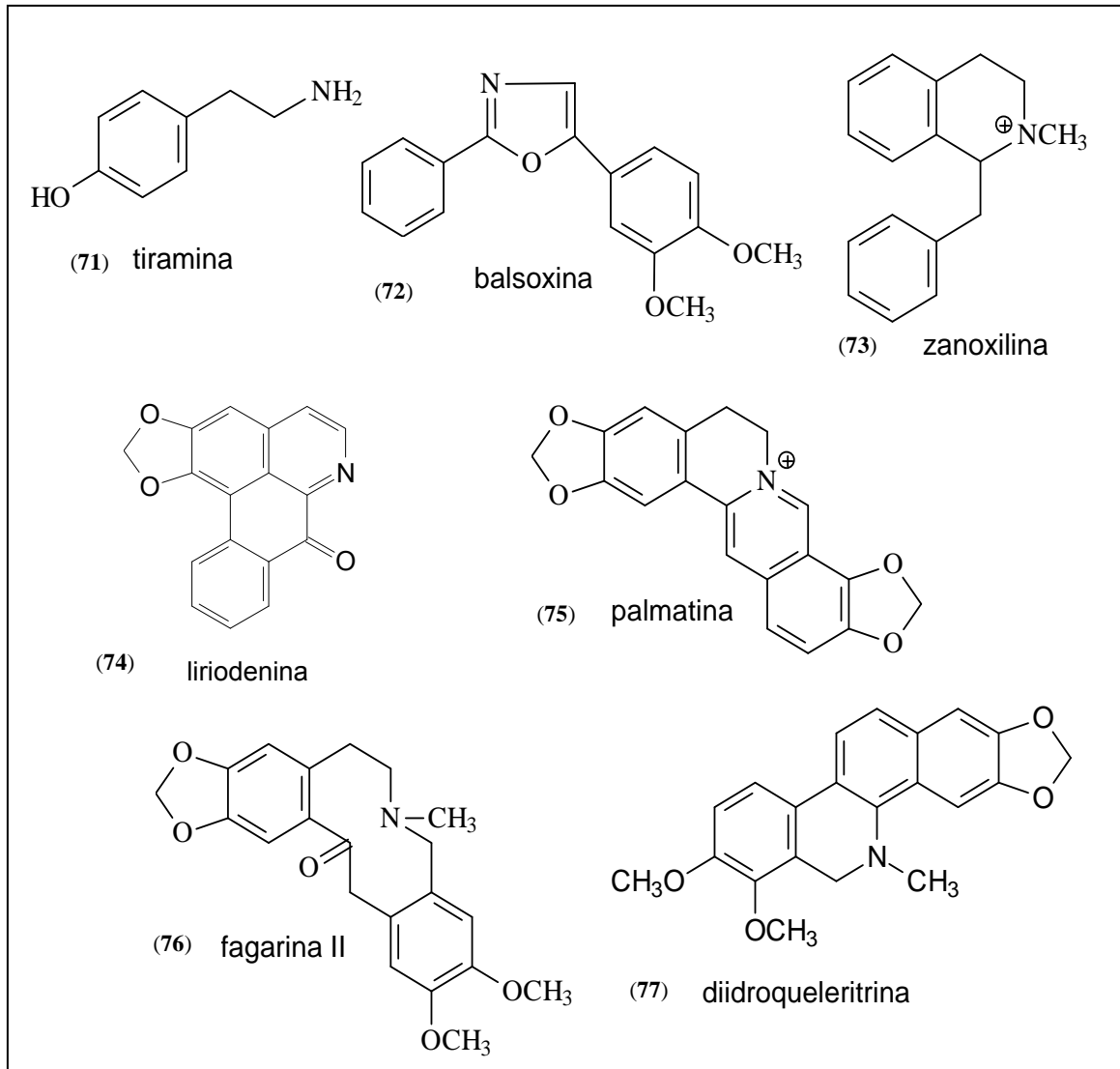


Figura 8 – Exemplos de alcalóides da família Rutaceae derivados da fenilalanina e/ou tirosina.

## 2.8 ALCALÓIDES BENZILISOQUINOLÍNICOS

Os sistemas quinolínico e isoquinolínico (Figura 9 (78) e (79)), respectivamente são formados por um anel benzênico e um anel de piridina fundido um ao outro (MORRISON & BOYD, 1973).

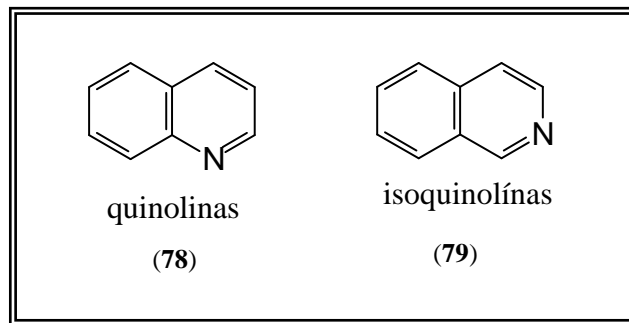


Figura 9 – Núcleos básicos dos alcalóides quinolínicos e isoquinolínicos

A literatura tem revelado um grande número de alcalóides que possuem o sistema isoquinolínico podendo este sistema apresentar substituinte no nitrogênio (80) ou ser somente reduzido (81) (Figura 10, p. 56).

A substituição de um hidrogênio do carbono 1 (C1) por um grupol benzílico (81) levou a divisão desta classe de alcalóide em dois grandes grupos: 1 - alcalóides isoquinolínicos representado pela analidina (80) e 2 - alcalóides benzilisoquinolínicos representado pela (-) (S)-norlaudanosina (81), (Figura 10, p.56).

Há ainda um subgrupo dentro do grupo dos alcalóides benzilisoquinolínicos onde a aromaticidade do sistema isoquinolínico é perdida e onde as bases quaternárias (83) também, são enquadradas, são os alcalóides benziltetraidroquinolínicos (82), (Figura 10), também conhecidos como tetraidrobenzilisoquinolínicos ou 1-benziltetraizoquinolínicos (1-btiq) (SEIGLER, 1998; DEWICK, 1997; WATERMAN, 1999).

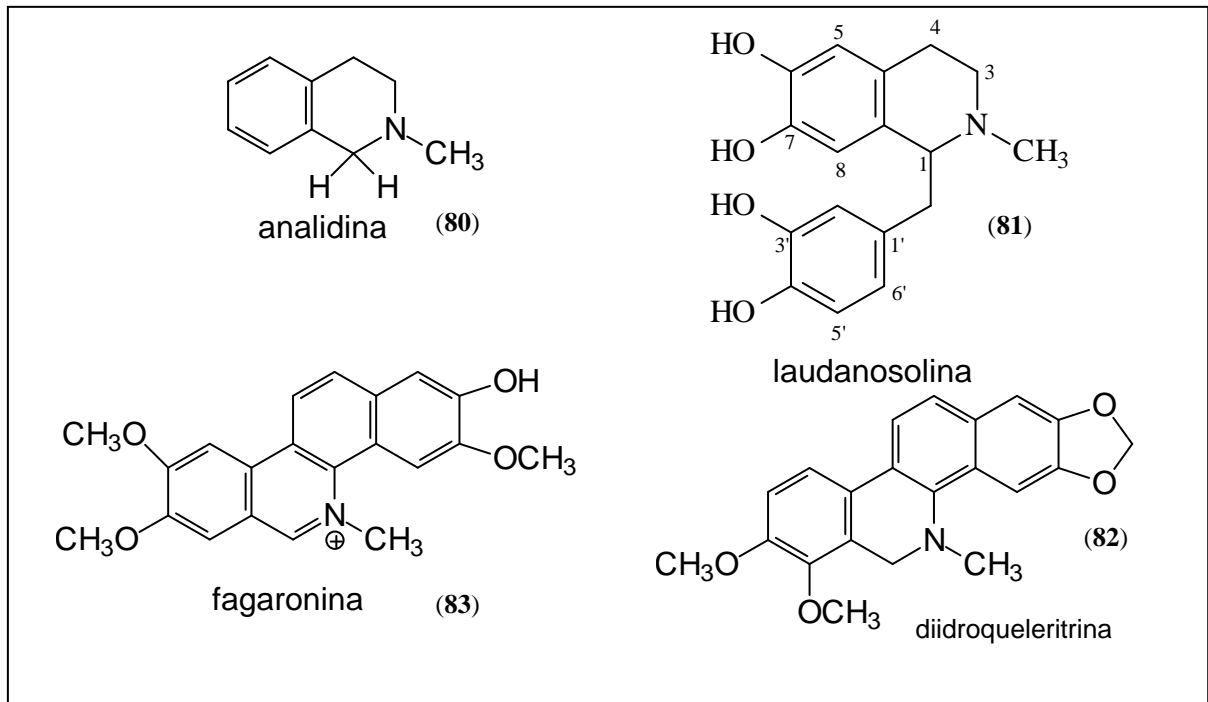


Figura 10 – Exemplos de alcalóide isoquinolínico e benzilisoquinolínico

## 2.9 BIOSSÍNTESE DOS ALCALÓIDES BENZILISOQUINOLÍNICOS

O estudo biossintético desta classe de alcalóide derivados do aminoácido L-tirosina (84) que contem uma porção isoquinolinica revelou que tanto os alcalóides quinolínicos como os isoquinolinicos possuem os mesmos precursores que são: 3,4-dihidroxitiramina (dopamina) (86), condensada a um composto carbonílico (Figura 11).

A diferença entre os dois grupos é dada pelo tipo de aldeído ou cetona que se condensará com a dopamina (86) (SEIGLER, 1998).

Na formação dos alcalóides isoquinolínicos os compostos carbonílicos possuem diversas origens como: ácido glioxílico, ácido pirúvico e  $\alpha$ -cetoácidos derivados da leucina. Já para a formação da maioria, se não de todos os alcalóides

benzilisquinolínicos, a molécula que se condensa com a dopamina é a 4-hidroxfenilacetaldeído (**87**), como representado na Figura 11.

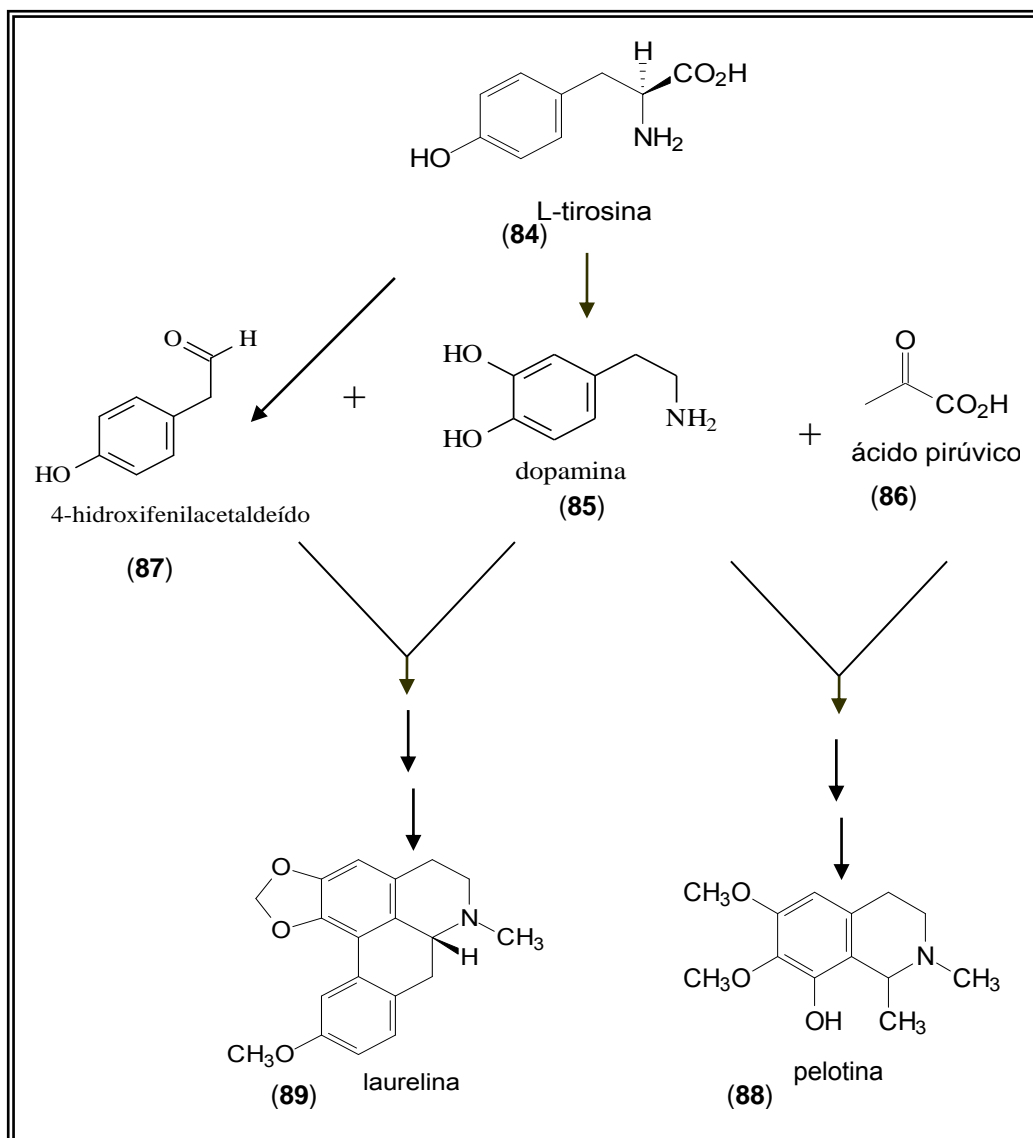


Figura 11 – Biossíntese dos alcalóides isoquinolínicos e benzilisquinolínicos

### 2.9.1 FORMAÇÃO DA DOPAMINA

Como apresentado anteriormente (Figura 11, p. 57); a formação dos alcalóides benzilisoquinolínicos ocorre, através de duas moléculas de L-tirosina. Uma a partir da qual é formada a dopamina (85) e outra que é utilizada para a formação da 4-hidroxifenilacetaldeído (87).

Experimentos com culturas de células, utilizando incorporação das substâncias L-tirosina, tiramina, L-DOPA e dopamina marcadas com  $^{14}\text{C}$  (ENK et al., 1985) e incorporação de dopamina em espécie da família Cactaceae, para a formação do alcalóide mescalina (SEIGLER, 1998), estabeleceram, inequivocamente, que para a formação da porção isoquinolínica, a dopamina (85) pode ser obtida por duas vias biossintéticas (Figura 12). A primeira via com formação da dopamina a partir da L-DOPA pela ação da enzima Dopa-decarboxilase, e a segunda através da oxidação da tiramina pela ação da fenolase (DEWICK, 1997; SEIGLER, 1998; ZENK, 1985).

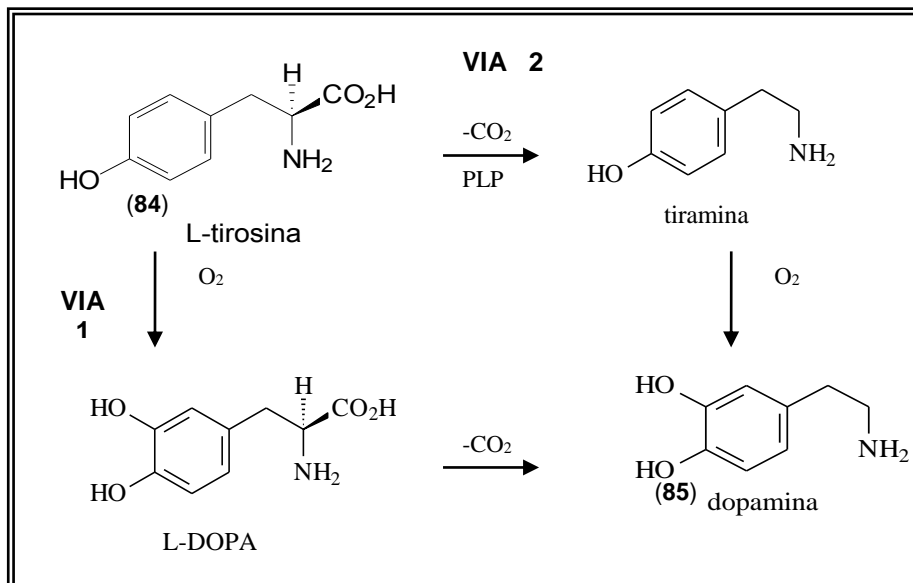


Figura 12 – Obtenção da dopamina a partir da L-tirosina.

Já para a formação da porção benzílica, a L-tirosina sofrerá um processo de descarboxilação seguido por uma desaminação, dando origem ao 4-hidroxifenilacetaldeído (87) Figura 13 (DEWICK, 1997; SEIGLER, 1998).

Zenk e colaboradores (1985), afirmam que o derivado dihidroxilado formado a partir da oxidação do 4-hidroxifenilacetaldeído ou da dopamina proveniente exclusivamente da tiramina também poderá ser utilizado para a formação da porção benzílica.

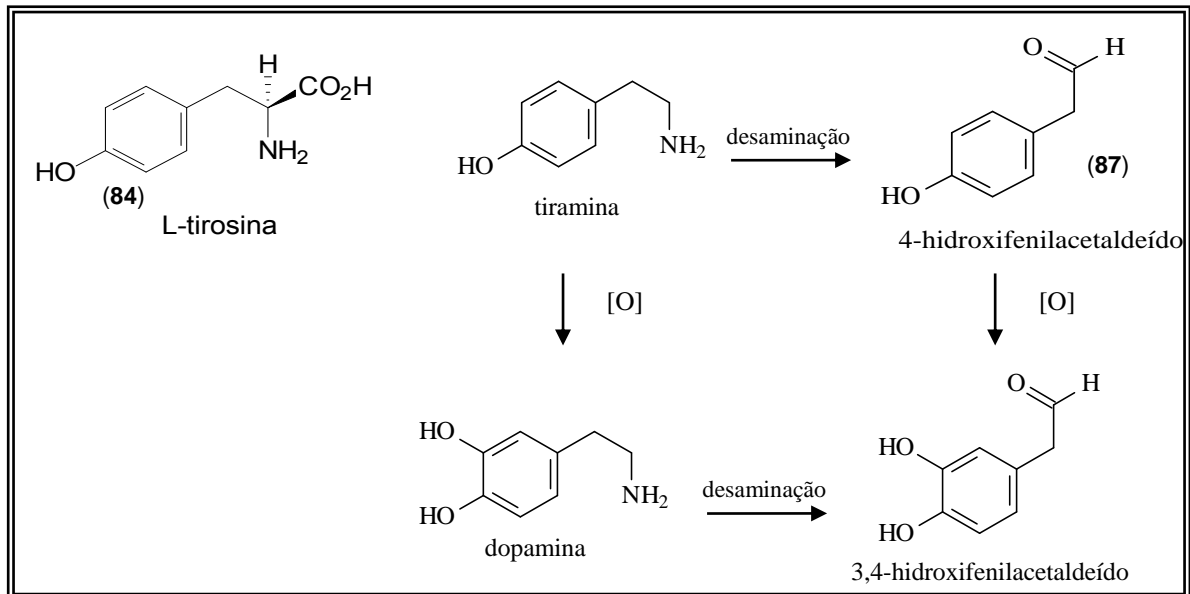


Figura 13 – Obtenção da porção benzílica a partir da L-tirosina

### 2.9.2 FORMAÇÃO DA RETICULINA

A etapa seguinte é a formação do alcalóide benzilisoquinolínico (+)-(S)-reticulina (Figura 14, p. 62).

Novamente os experimentos realizados por Zenk e colaboradores (1985) deram uma grande contribuição para a elucidação desta via biossintética quando, utilizando extrato de células-livres, isolaram e caracterizaram as oito enzimas que estão envolvidas na conversão da dopamina para o alcalóide berberina.

A primeira enzima desta via biossintética é a (S)-norlaudanosolona sintetase que condensa a dopamina com o 3,4-diidroxifenilacetaldeído com formação de uma base de Schiff seguida por fechamento do anel através de uma reação tipo Mannich para a formação da (S)-norlaudanosolona (**90**). Este intermediário é predominantemente O-metilado na posição C-6, tendo como doador do grupo metila a enzima S-adenosil-L-metionina (SAM). O alcalóide (S)-6-metilnorlaudanosolona (**91**) é então modificado pela enzima 4'-O-metiltransferase, a qual introduz uma metila, especificamente, no grupo 4'-OH, dando origem a (S)-norreticulina (**92**). Esta através da ação da N-metiltransferase dará origem a (S)-reticulina (**93**) (SEIGLER, 1998; Zenk et al., 1985).

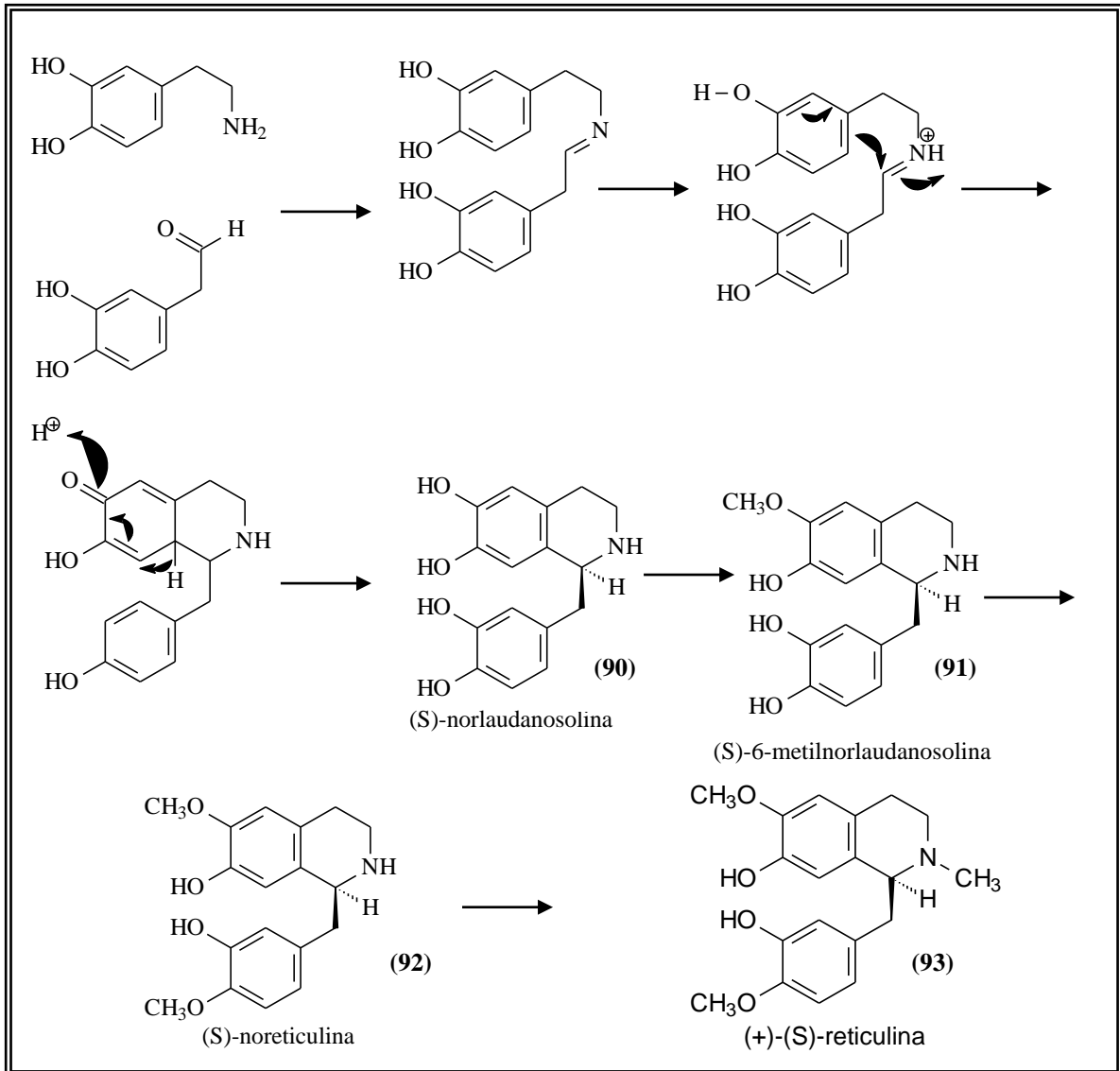


Figura 14– Biossíntese da reticulina.

Do ponto de vista biogénico o alcalóide benziltetraisoquinólico mais importante é a reticulina (**93**), pois é dele que se originam diversos outros grupos de alcalóides (Figura 15, p. 63). Sendo alguns grupos derivados diretamente da S-reticulina como o grupo dos alcalóides aporfínicos, protoberberínicos e benzofenantridínicos, e outros do seu estereoisômero (R) como o grupo dos alcalóides opióides como a morfina, codeína e tebaina (SEIGLER, 1998; Zenk et al., 1985).



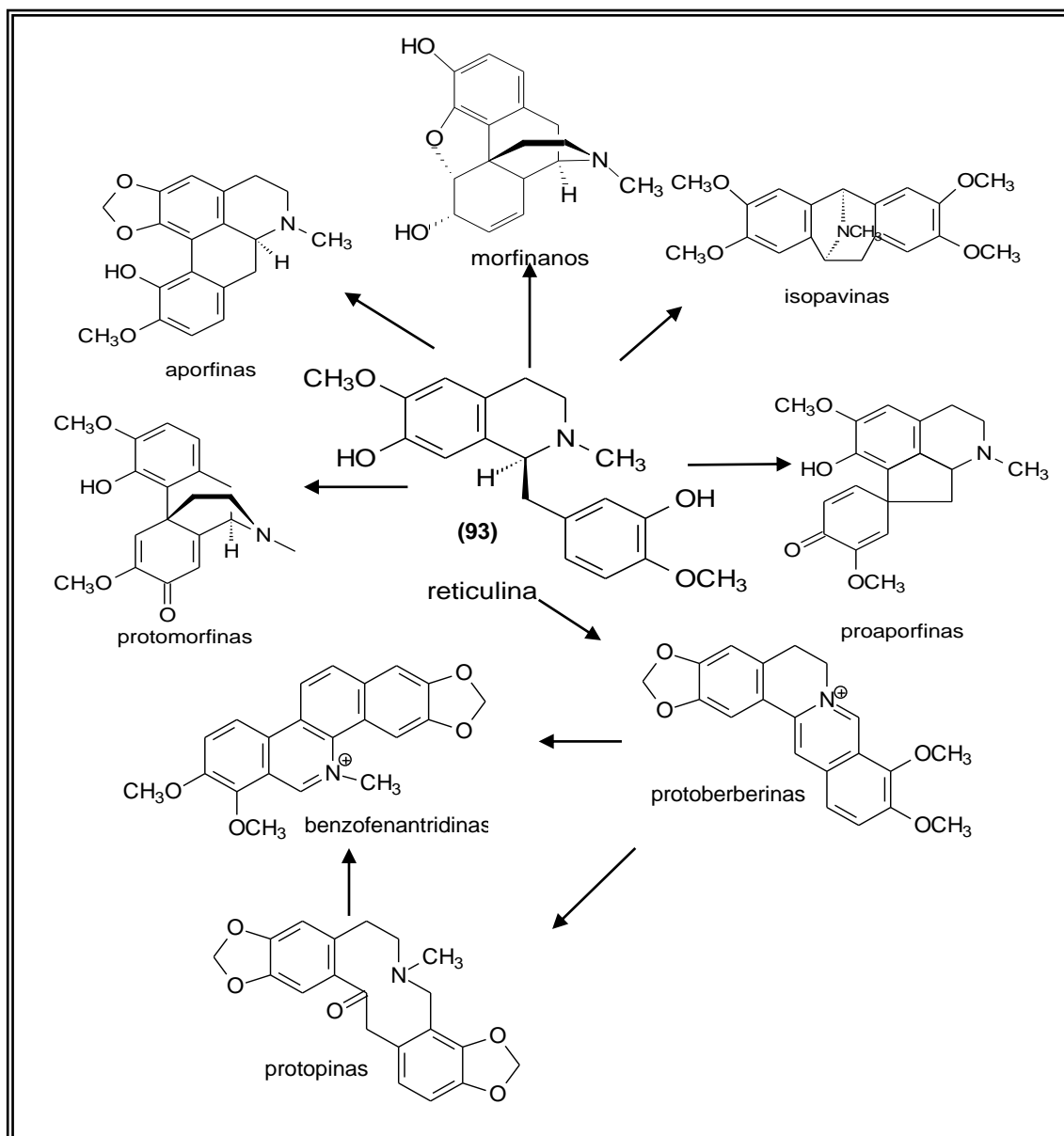


Figura 15 – Exemplos de algumas classes de alcalóides formados a partir da reticulina.

### 2.9.3 FORMAÇÃO DOS ALCALÓIDES APORFINICOS

Os alcalóides aporfinicos são formados a partir de um acoplamento oxidativo que pode ocorrer na posição *orto* ou *para* ao grupamento fenólico do anel C da reticulina (**93**), ou seja, é necessário uma rotação da ligação simples do anel

benzílico da reticulina para dar origem a duas séries de compostos representados pela (+)-glaucina (**94**) e a (+)-bulbocapnina (**95**) como apresentado na Figura 16 (SEIGLER, 1998).

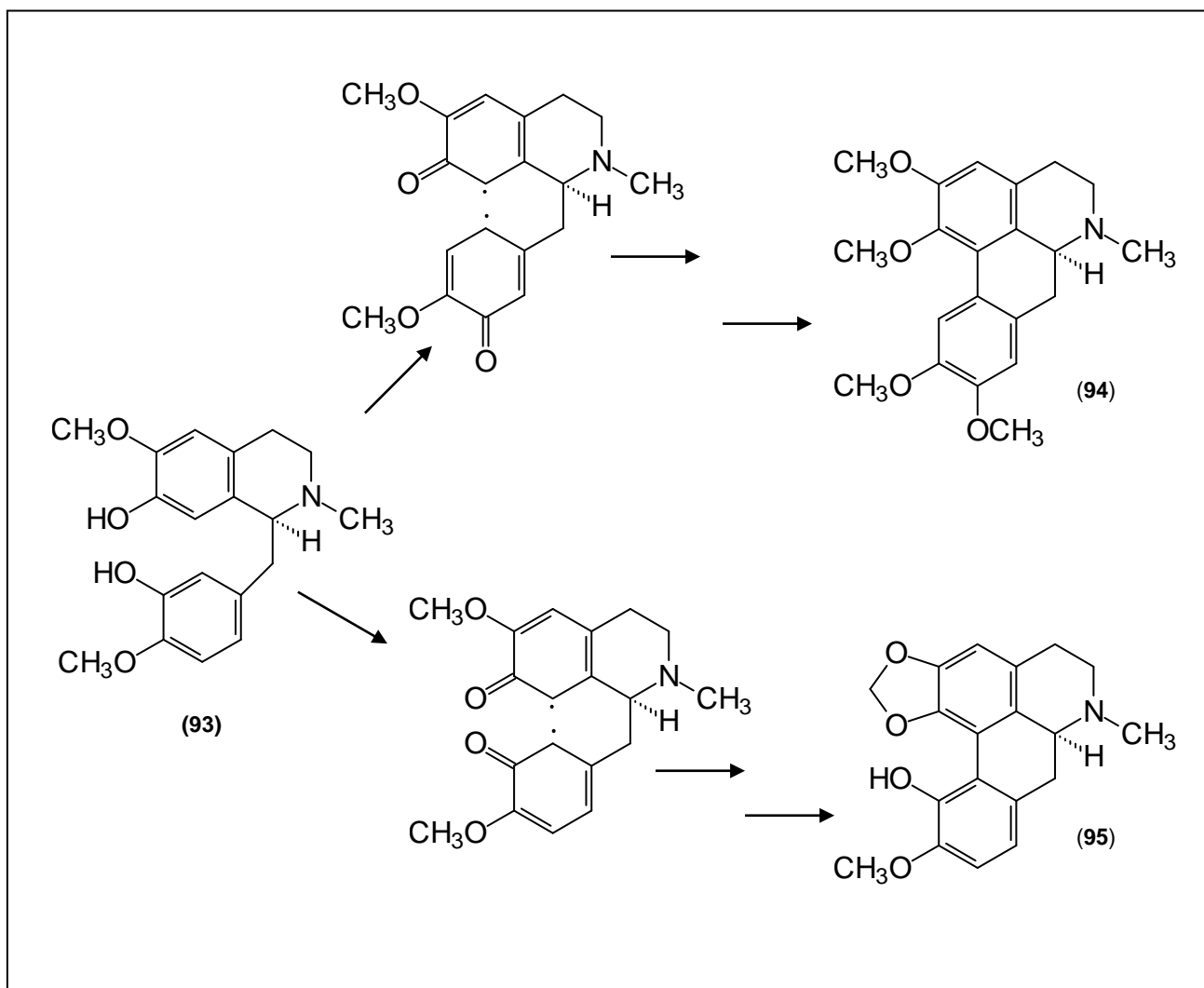


Figura 16 – Formação dos alcalóides aporfínicos

#### 2.9.4 FORMAÇÃO DOS ALCALÓIDES PROTOBERBERÍNICOS

A biossíntese dos alcalóides protoberberínicos tem sido resolvida baseada em trabalhos enzimológicos e com extrato de células livres (SEIGLER, 1998).

Como apresentado na Figura 15 (p. 63) a reticulina (**93**) também é a precursora dos alcalóides protoberberínicos. Aqui será apresentada a formação do alcalóide berberina (**99**) a partir da reticulina (**93**). A principal diferença entre a formação deste e os outros tipos de alcalóides é a transformação do grupamento N-metila em uma função imina através da oxidação, seguida pela formação de um anel.

Segundo Segler (1998), a reticulina (**93**) sofre a ação de uma enzima conhecida na literatura como “ponte de berberina” (berberine bridge) que a converte a (S)-scoulerine (**96**), este composto é reconhecido como o primeiro alcalóide tetrahydroberberínico formado, o qual é subsequentelemente metilado na posição 9 pela S-adenosil metionina (SAM) dando origem a (S)-tetrahydrocolumbamina (**97**) que em seguida é aromatizada formando a columbamina (**98**) através da ação da enzima (S)-tetrahydroprotoberberina oxidase.

A conversão da columbamina (**98**) em seu derivado metilenodioxo origina o alcalóide berberina (**99**).

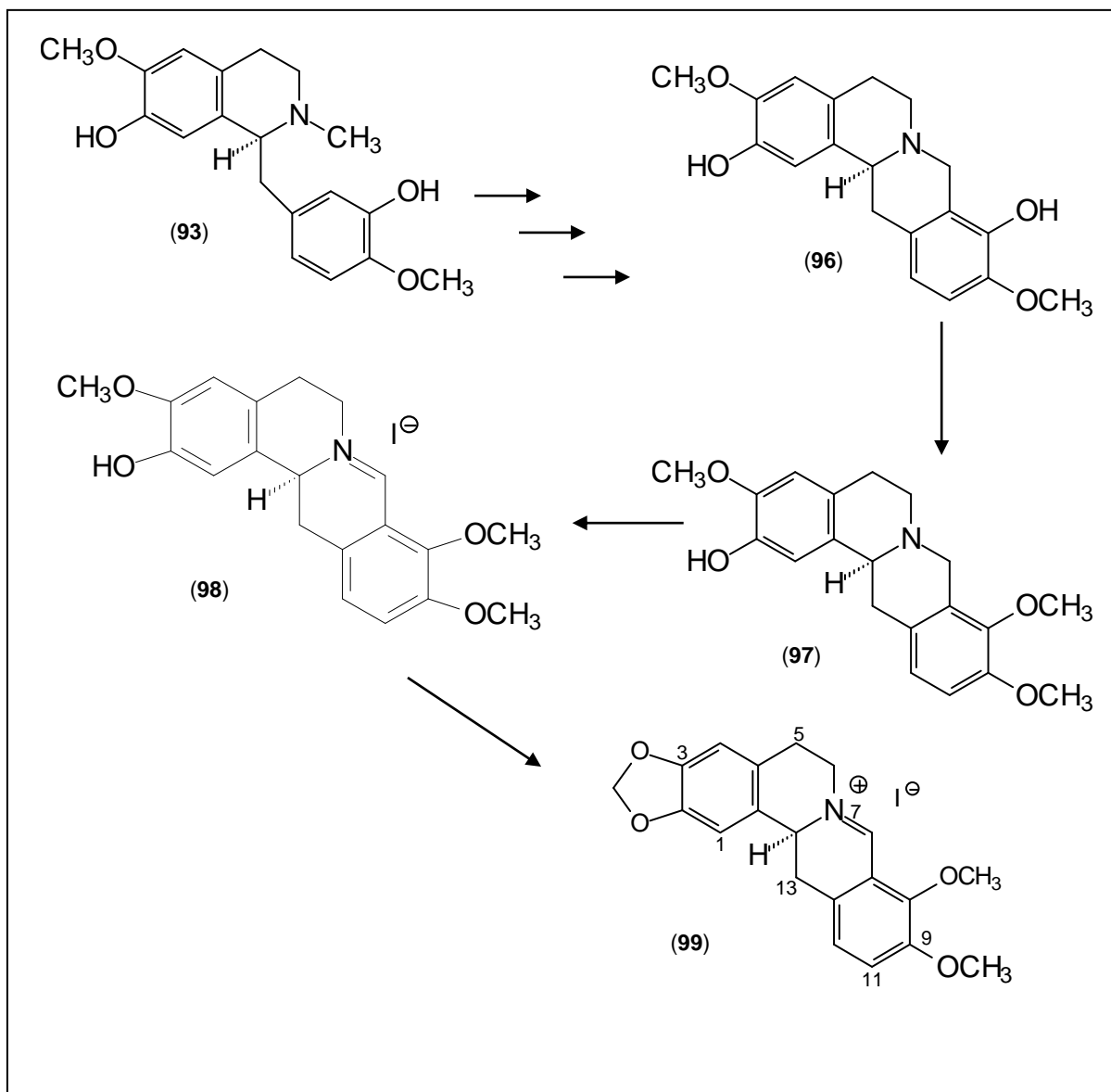


Figura 17 – Formação dos alcalóides protoberberínicos

### 2.9.5 FORMAÇÃO DOS ALCALÓIDES BENZO[c]FENANTRIDINICOS

A biossíntese dos alcalóides benzofenantridínicos tem sido investigada através de experimentos de incorporação de precursores em plantas intactas. Estes experimentos têm demonstrado que o alcalóide protopínico (Figura 15, p. 62) é um intermediário desta via biossintética (TANAHASHI e ZENK, 1988).

O sistema benzofenantridínico tem origem após o rompimento da ligação do C6 com o nitrogênio do precursor protoberberínico hidroxilado (**102**), em seguida ocorre rotação da molécula e a formação da ligação do carbono seis com o carbono treze, com formação de um outro anel (Figura 18) (SEIGAN, 1998).

A hidroxilação do carbono seis do alcalóide (**101**) é catalisada pela protopina-6-hidroxilase, e as etapas seguintes para a formação do esqueleto benzofenantridínico, seguem um rearranjo espontâneo até a formação do alcalóide benzo[c]fenantridínico, diidrosanguinarina (SEIGAN, 1998; TANAHASHI e ZENK, 1988).

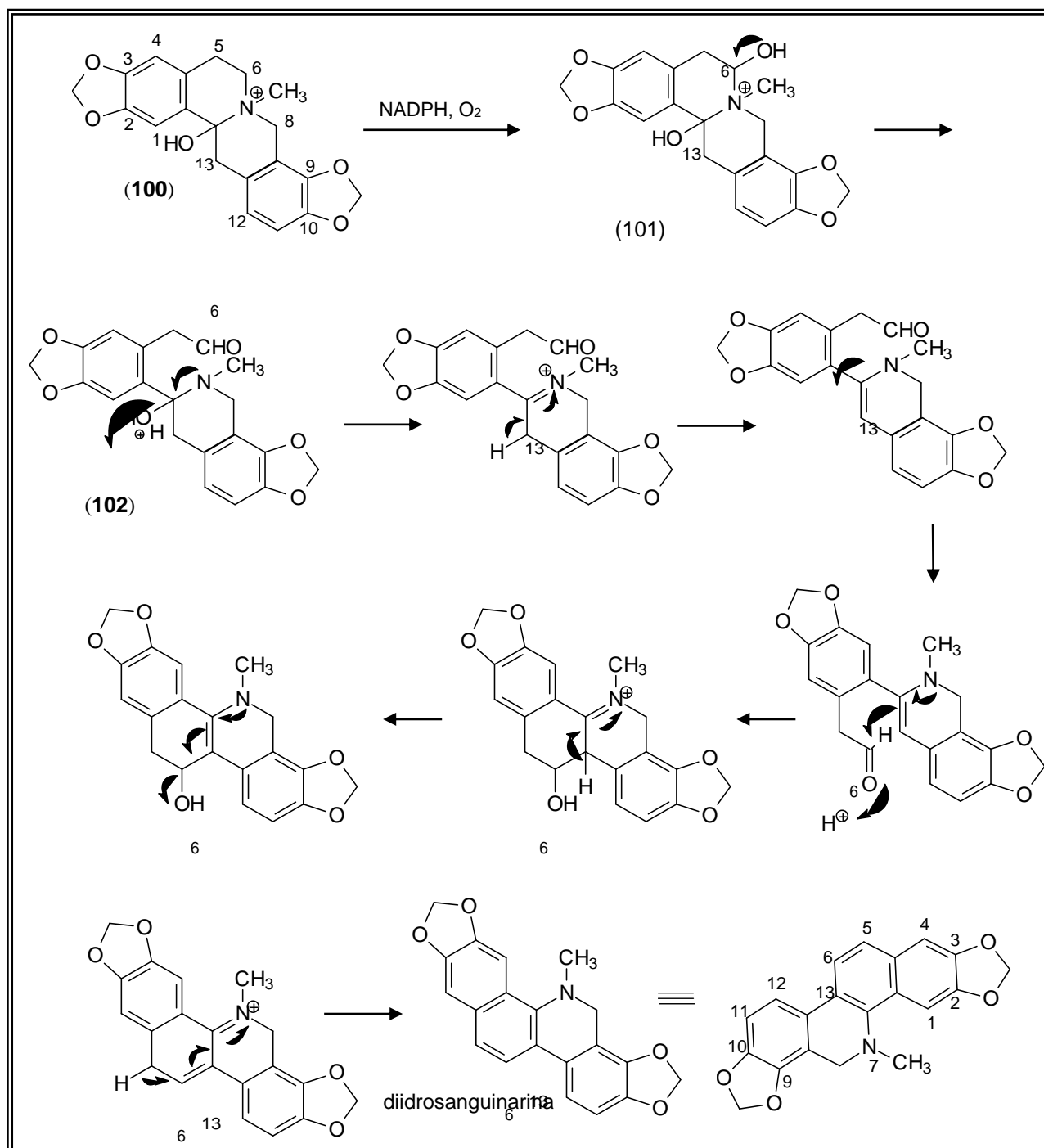
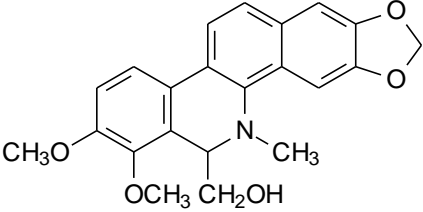
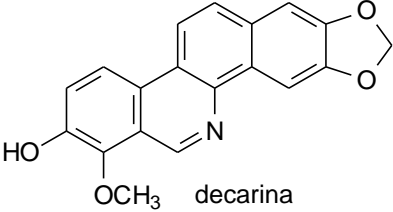
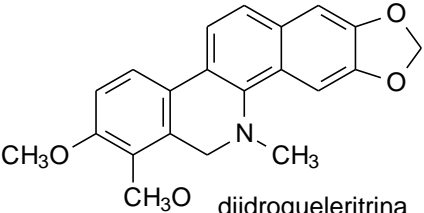
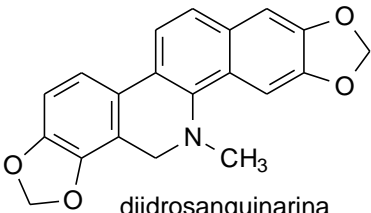
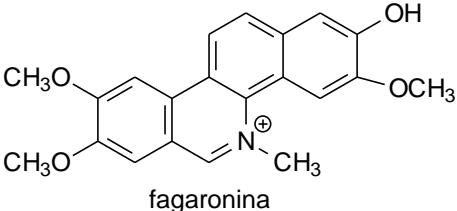
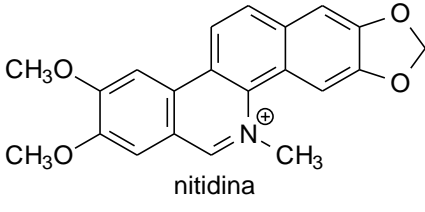
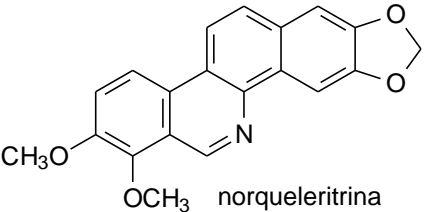
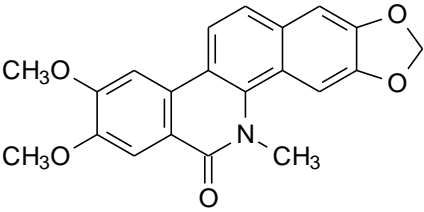


Figura 18 – Formação do alcalóide diidroqueleritina

## **2.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALÓIDES BENZO[c]FENANTRIDINICOS**

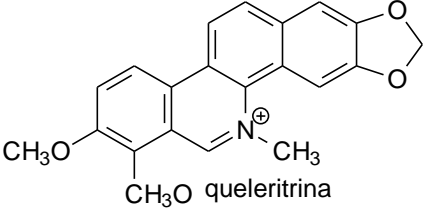
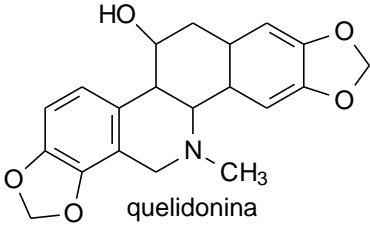
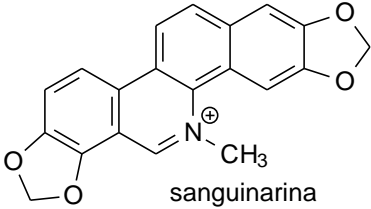
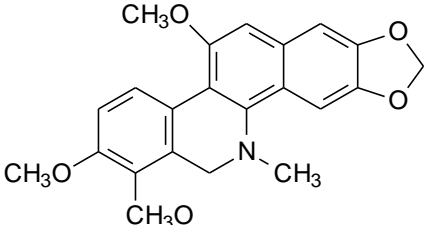
Como dito anteriormente, muitas espécies de *Zanthoxylum* possuem atividades biológicas comprovadas. E estas atividades em vários casos encontram-se relacionadas com a presença dos alcalóides benzofenantridínicos, já que os mesmos possuem uma ampla atividade biológica descrita na literatura incluindo antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória e antineoplásica.

Esta seção tem como objetivo apresentar (Quadro 4, p. 70 -72) as atividades biológicas e as respectivas estruturas dos alcalóides benzofenantridínicos descritos na literatura.

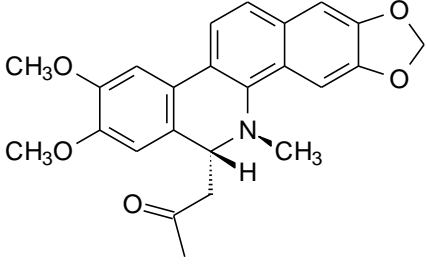
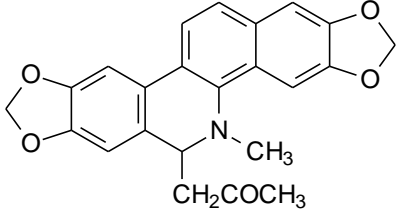
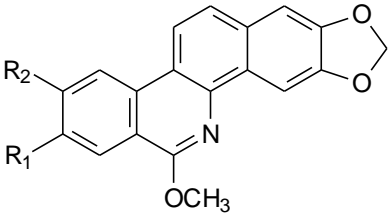
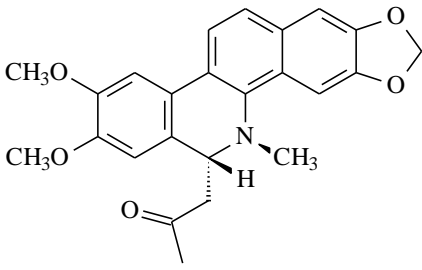
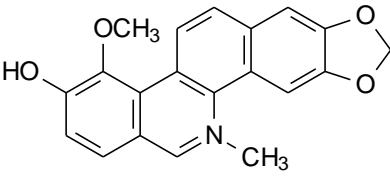
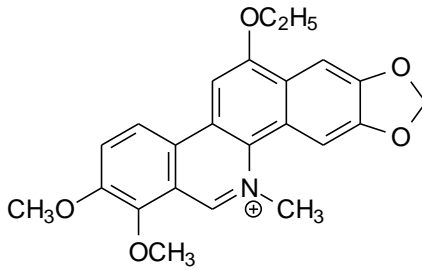
 <p>boconolina</p> <p><b>Antiagregação plaquetária</b> <b>CHEN et al., 1994b</b></p>	 <p>decarina</p> <p><b>Antimalárica</b> <b>ROSS et al., 2004.</b></p>
 <p>diidroqueleritrina</p> <p><b>Antiagregação plaquetária</b> <b>CHEN, et al., 1994b</b></p> <p><b>Antimicrobiana</b> <b>NAVARRO e DELGADO, 1999.</b></p>	 <p>diidrosanguinarina</p> <p><b>Antimicrobiana</b> <b>NAVARRO e DELGADO, 1999.</b></p> <p><b>Inibição da transcriptase reversa</b> <b>SEIGLER, 1998</b></p>
 <p>fagaronina</p> <p><b>Inibição da topoisomerase I</b> <b>WANG, et al., 1993.</b></p> <p><b>Inibição da transcriptase reversa.</b> <b>SETHI e SETHI 2004.</b></p>	 <p>nitidina</p> <p><b>Inibição da topoisomerase I</b> <b>WANG et al., 1993.</b></p> <p><b>Inibição da transcriptase reversa</b> <b>SEIGLER, 1998</b></p>
 <p>norqueleritrina</p> <p><b>Antiagregação plaquetaria</b> <b>CHEN et al., 1994b</b></p>	 <p>oxinitidina</p> <p><b>Anti-HBV</b> <b>CHANG et al., 1997.</b></p>

Quadro 4 - Alcalóides benzofenantridínicos e suas atividades biológicas



 <p>queleritrina</p> <p>Anti-tumoral HERBERT et al.,1990. CHEN et al., 1994b.</p> <p>Antiagregação plaquetária KO et al., 2003</p> <p>Antimicrobioma LEWIS, 1983.</p> <p>Inibição da proteína quinase C (PKC) CHAO et al., 1998.</p> <p>Inibição da topoisomeras I FANG et al., 1993</p>	 <p>quelidonina</p> <p>Inibição da acetilcolinesterase. LEE et al., 2001.</p> <p>Inibição da MAO KUZNETSOVA et al., 2002.</p>
 <p>sanguinarina</p> <p>Inibição da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase SEIFEN et al., 1978.</p> <p>Inibição da acetilcolinesterase. KUZNETSOVA et al., 2002.</p> <p>Inibição da monoamino oxidase LEE et al., 2001.</p> <p>Vasorelaxante. HU et al., 2001.</p> <p>Inibidor da proteína quinase C (PKC) WANG e al., 1997.</p>	 <p>6-metoxiqueleritrina</p> <p>Antibacteriana ISLAM e AHSAN 1997.</p>

Quadro 4 - Alcalóides benzofenantridínicos e suas atividades biológicas

 <p>8-acetonildiidronitidina</p> <p>Antimicrobiana e antifúngica NISSANKA et al., 2001.</p>	 <p>8-acetonildiidroavicina</p> <p>Antimicrobiana NISSANKA et al., 2001. GONZAGA et al., 2003b</p>
 <p>R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = -OCH<sub>2</sub>O- → rhoifolina A R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> → rhoifolina B</p> <p>Antibacteriana GONZAGA et al., 2003b</p>	 <p>8-acetonildiidronitidina</p> <p>Antibacteriana GONZAGA et al., 2003b</p>
 <p>zanthoxilina ou xanthoxilina</p> <p>Antibacteriana GONZAGA et al., 2003b</p>	 <p>6-etoxiqueleritrina</p> <p>Antitumoral WANG e HSING, 1981</p>

Quadro 4 - Alcalóides benzofenantridínicos e suas atividades biológicas

Os resultados das avaliações das atividades biológicas dos alcalóides benzofenantridínicos (Quadro 4), tem levado diversos cientistas a elegerem as moléculas desta classe como protótipos, utilizando o estudo da relação estrutura-

atividade (REA), para o desenvolvimento de novos fármacos (NAKANISHI et al., 1999; CHO et al., 2002).

## 2.11 OBJETIVOS

### 2.11.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo visa investigar a composição de metabólitos secundários presentes nas folhas de *Z. tingoassuiba* e raízes de *Z. rhoifolium*, *Z. stelligerum* e *Z. tingoassuiba*. Além de Avaliar a atividade biológica de estratos e/ou frações de um espécime de *Z. tingoassuiba*.

### 2.11.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Conhecer a composição do óleo volátil das folhas de *Z. tingoassuiba* utilizando a hidrodestilação e fluido supercrítico.

Utilizando a água da hidrodestilação avaliar os principais constituintes deste material utilizando partições com solventes orgânicos.

Estudar a composição da cera epicuticular das folhas de *Z. tingoassuiba* baseado no procedimento descrito por Furlan (2006).

Descobri a composição química das raízes das três espécies de *Zanthoxylum* utilizando técnicas fitoquímicas convencionais.

Avaliar o potencial biológico quanto à atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antioxidante. Além de avaliar o potencial do óleo volátil em sistema de liberação controlada.

### **3 EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIAL BOTÂNICO**

Os espécimes *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Figura 19, p. 74) e *Zanthoxylum stelligerum* Turcz. (Figura 20, p. 75) foram coletados em março de 2003 na Chapada Diamantina – Bahia e o espécime de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil (Figura 21, p. 76) foi coletado na fazenda Capão no município de Jaíba em Feira de Santana – Bahia em abril de 2004.

As identificações foram realizadas pela Professora Maria Lenise da Silva Guedes, curadora do Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia. As exsicatas destas espécies encontram-se depositadas neste herbário e catalogadas sob os números 60507 para o *Z. rhoifolium*, 60508 para o *Z. stelligerum* e 66983 para o *Zanthoxylum tingoassuiba*.

As folhas de *Z. tingoassuiba* e as raízes dos três espécimes foram os órgãos estudados.



Figura 19 – Exsicata de *Zanthoxylum rhoifolium*

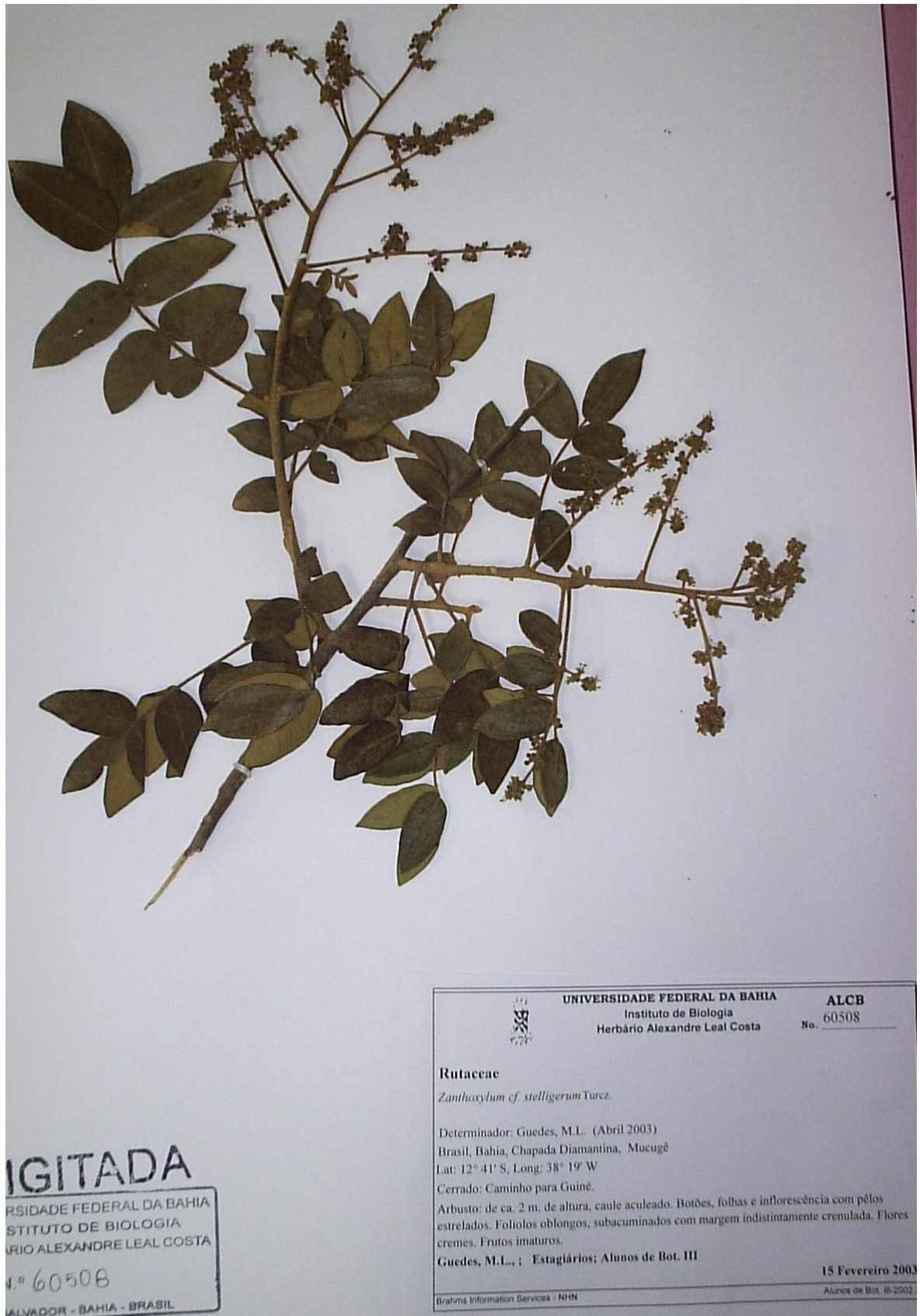


Figura 20 – Exsicata de *Zanthoxylum stelligerum*



Figura 21 – Exsicata de *Zanthoxylum tingoassuiba*

## **3.2 MATERIAIS DE LABORATÓRIO**

### **3.2.1 SOLVENTES**

Os solventes utilizados foram de grau analítico das marcas MERCK, GRUPO QUÍMICA, VETEC e QUIMEX.

Para a obtenção dos espectros de RMN foi utilizado como solvente cloróformio deuterado, MERCK e CIL, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

Os tubos utilizados para obtenção dos espectros de RMN foram do tipo GOLD LABEL (5 mm) ALDRICH.

### **3.2.2 SÍLICA**

Nas separações através de cromatografia em coluna foram utilizadas: sílica gel 70 - 230 mesh (MERCK e VETEC); e óxido e alumínio (Neutro - 90) da marca VETEC.

As placas utilizadas para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram MERCK e MACHEREY-NAGEL WHATMAN, além das placas preparadas manualmente utilizando sílica gel PF254 em suspensão aquosa.

Para a revelação das placas de CCDC, além da luz ultravioleta, utilizou-se vapores de iodo e reagentes de revelação como Dragendorff e vanilina ácido sulfúrico.

As placas utilizadas para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram adquiridas da MERCK, MACHEREY-NAGEL e WHATMAN ou preparadas por espalhamento da suspensão da sílica em água destilada com espalhador HEIDELBERG para obtenção de placas de 1 mm de espessura.

As placas de CCDP foram reveladas com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e as substâncias separadas foram extraídas da sílica com cloróformio e metanol, e em seguida filtradas a vácuo.



### 3.2.3 EQUIPAMENTOS

- ❖ Para moer o material vegetal a ser estudado foi utilizado moinho THOMAS WILY LABORATORY MILL-MODEL 4.
- ❖ As evaporações dos solventes contidos em extratos e frações foram realizadas sob pressão reduzida utilizando evaporadores rotativos das marcas BÜCHI 461 e FISATOM.
- ❖ A hidrodestilação foi realizada numa aparelhagem de hidrodestilação para óleo volátil (Figura 22 p. 108), como preconiza a Farmacopéia Brasileira Terceira Edição.
- ❖ A extração do óleo volátil utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico foi realizada em uma planta piloto SFE 500 produzida pela empresa Separex (Figura 23, p. 110).
- ❖ Para avaliar a proporção das substâncias contidas no óleo volátil foi utilizado um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard HP 5890, com integrador HP 3396 SERIES II, equipado com uma coluna capilar tipo DB-17 (OV-17), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Sendo utilizado o hidrogênio como gás de arraste com uma vazão de 1 mL/min e detetor de ionização de chama.
- ❖ Para obtenção dos espectros de massas das substâncias contidas nos óleos voláteis foi utilizado um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard HP 6890, equipado com uma coluna capilar tipo ZB-5, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Este equipamento está acoplado a um detector seletivo de massas (MSD 5873 HP); e com energia do feixe de elétrons de 70 elétrons-volts. Sendo utilizado o hélio como gás de arraste com uma vazão de 1 mL/min.

- ❖ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em um aparelho da marca VARIAN MODELO GEMINI 2000 operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ .
- ❖ Os espectros obtidos na região do Infravermelho ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) foram registrados no aparelho da marca Bomem modelo MB-100 e número de série – SZM4305M, em filme e em pastilha de KBr.
- ❖ Os espectros obtidos na região do ultravioleta foram registrados no aparelho da marca FEMTO modelo 800XI, em metanol ou clorofórmio.
- ❖ Para a identificação dos constituintes da cera epicuticular foi utilizado o cromatógrafo do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) da marca HP 5890 ser. II Plus, equipado com uma coluna Phenomenex Zebron ZB-5HT com (30 m x 0,32 mm x 0,10  $\mu\text{m}$ ). Sendo utilizado como gás de arraste He em um fluxo de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , e detetor de ionização de chama (FID)
- ❖ Para a identificação dos triterpenóides presentes na cera epicuticular foi utilizado o cromatógrafo a gás 17A do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) da marca Shimadzu, coluna capilar DB5 (30 m X 0,32 mm e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura) operando no modo split, acoplado ao espectrômetro de massas QP 50 50A Shimadzu, com voltagem de ionização de 70 eV e ionização por impacto de elétrons, temperatura do injetor e do detector de  $300^\circ\text{C}$ , empregado hélio como gás de arraste com fluxo de 1,5  $\text{mL}/\text{min}$ . A coluna foi mantida a  $100^\circ\text{C}$  por 1 min e então aquecida até  $300^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}/\text{min}$  e mantida por 10 min. Espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica.

### **3.3 METODOLOGIA**

A metodologia desenvolvida na execução deste trabalho terá a seguinte ordem de apresentação:

#### **3.3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE *Z. rhoifolium***

#### **3.3.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAÍZ DE *Z. rhoifolium***

#### **3.3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA CASCA DA RAIZ DE *Z. stelliregum***

#### **3.3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAÍZ DE *Z. stelliregum***

#### **3.3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA CASCA DA RAIZ DE *Z. tingoassuiba***

#### **3.3.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAÍZ DE *Z. tingoassuiba***

#### **3.3.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DA CASCA DA RAÍZ DE *Z. tingoassuiba***

#### **3.3.8 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba* POR HIDRODESTILAÇÃO**

#### **3.3.9 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba* POR CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO**

#### **3.3.10 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROVENIENTE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba***

#### **3.3.11 OBTENÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba***

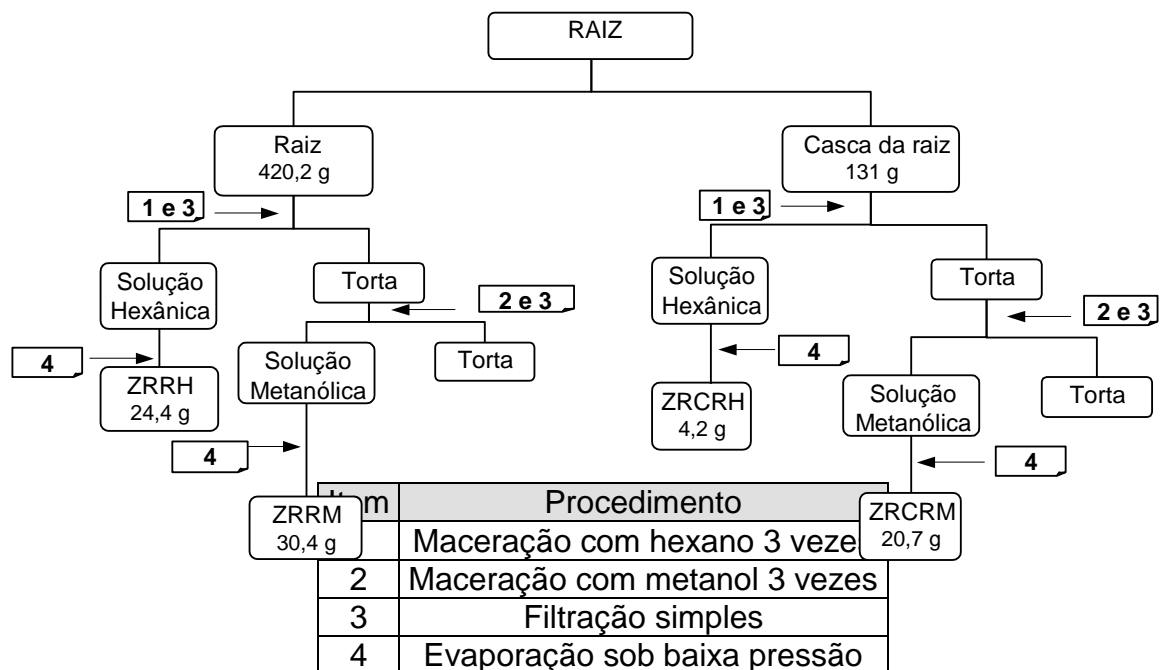
### 3.3.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE *Z. rhoifolium*

A raiz, após secagem a temperatura ambiente teve a parte cortical (casca) separada da parte medular da raiz (Esquema 1).

Ambas as partes foram trituradas, separadamente, e as serragens foram submetidas a maceração por três vezes com hexano, tendo como tempo de contato, uma semana cada. A solução obtida após a filtração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato de *Zanthoxylum rhoifolium* casca da raiz hexânico (ZRCRH).

Em seguida, a torta foi submetida a uma nova extração também por três vezes, desta vez com metanol, com período de maceração de uma semana cada. A solução obtida, do mesmo modo que a anterior, foi concentrada com o auxílio de um rota-evaporador, resultando no extrato de *Zanthoxylum rhoifolium* casca da raiz metanólico (ZRCRM).

A parte medular da raiz foi submetida ao mesmo procedimento, e passará a ser tratada simplesmente como raiz. Sendo assim, os extratos hexânico e metanólico, obtidos deste material foram denominados de *Zanthoxylum rhoifolium* raiz hexânico ZRRH e *Zanthoxylum rhoifolium* raiz metanólico ZRRM.



Esquema 1 – Obtenção dos extratos brutos da raiz de *Z. rhoifolium*

### **3.3.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAÍZ DE *Z. rhoifolium***

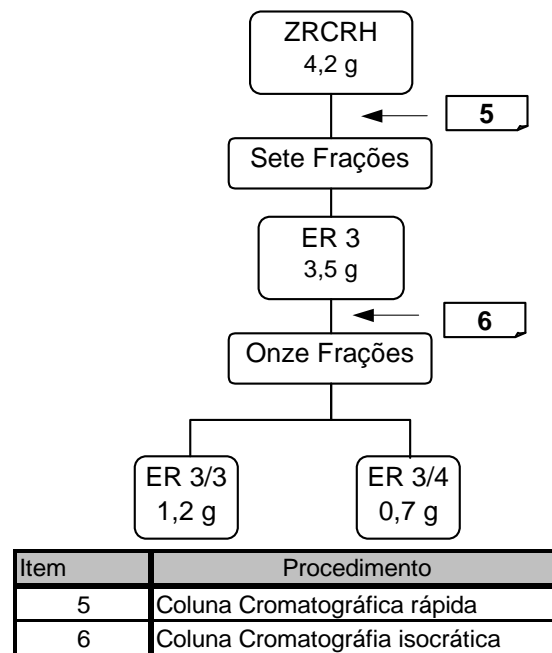
O extrato hexânico da casca da raiz de *Z. rhoifolium* foi submetido a uma cromatografia em coluna rápida.

Para a execução deste procedimento foi utilizando sílica gel (71 – 230 mesh) em uma proporção extrato/sílica de 1:5. E os seguintes solventes foram utilizados como fases móveis: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Para auxiliar na sucção dos solventes foi utilizada uma bomba de baixa pressão e o resultado foi a obtenção de sete frações (Esquema 2, p. 86).

#### **3.3.2.1 FRACIONAMENTO DE ZRCRH 3**

A fração ZRCRH 3 foi submetida a uma outra cromatografia em coluna em sílica gel 60G com diclorometano/metanol 95:5 (Esquema 2). Desta coluna foram recolhidas 28 frações, as quais, depois de analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram agrupadas em onze frações. As frações 3 e 4, ou seja, ZRCRH 3/3 e ZRCRH 3/4 obtidas desta purificação apresentaram, no espectro de RMN <sup>1</sup>H, sinais na região aromática, mencionados anteriormente, com padrões diferenciados sugerindo duas substâncias diferentes, por isso, as duas foram escolhidas para uma nova purificação.



Esquema 2 – Purificação do extrato da casca da raiz de *Z. rhoifolium*

### 3.3.2.2 FRACIONAMENTO DE ZRCRH 3/3 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S9**

A fração ZRCRH 3/3 de *Z. rhoifolium* foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica gel 60G e como eluente diclorometano/metanol em gradiente de polaridade. Nesta operação foram recolhidas treze frações que após análise por CCDC foram agrupadas dando origem a seis frações. Como apresentado no Esquema 3 (p. 85).

Na quarta fração desta coluna, ZRCRH 3.3/4, foi isolada a substância **S9** e a fração cinco ZRCRH 3.3/5 foi submetida a novos processos de purificações, pois a integração dos sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H, sugeriam a presença de mais de uma substância.

Para melhor entendimento faz-se importante esclarecer que as frações são numeradas utilizando-se a ordem de eluição na coluna cromatográfica. O ponto é utilizado para separar cada fração que já foi submetida a purificação e a barra vertical indica a localização da última fração, ou seja, para o isolamento da substância **S9** a terceira fração obtida da purificação do extrato foi novamente

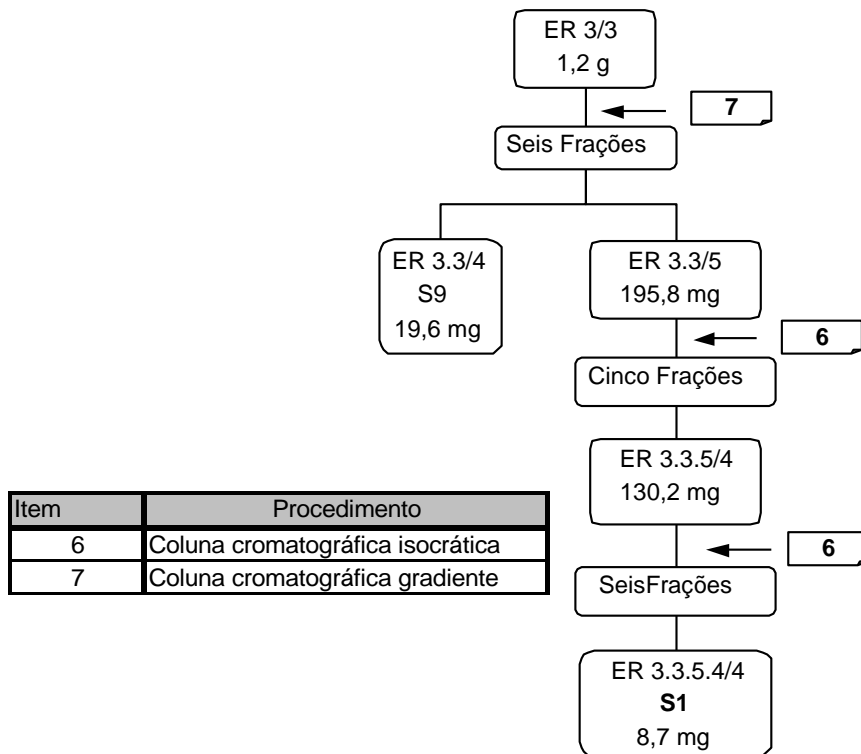
purificada e a terceira fração desta segunda purificação foi submetida a uma outra purificação e então na quarta fração desta coluna foi isolada **S9**, sendo assim esta fração receberá a seguinte denominação: ZRCRH 3.3/4.

### 3.3.2.3 FRACIONAMENTO DE ZRCRH 3.3/5

A fração 3.3/5 de *Z. rhoifolium* foi submetida a uma CC em sílica gel 60G com diclorometano/hexano 70:30 (Esquema 3). Desta coluna foram recolhidas treze frações, as quais, depois de analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram agrupadas em cinco frações. A fração ZRCRH 3.3.5/4 foi submetida a outro processo de fracionamento, pois este não se mostrou suficientemente eficiente para a separação das substâncias.

### 3.3.2.4 FRACIONAMENTO DE ZRCRH 3.3.5/4 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S1**

A fração ZRCRH 3.3.5/4 foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC) em sílica gel 60G e eluída com hexano/acetato de etila 60:40. Desta coluna foram recolhidas 8 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas, e este procedimento originou seis frações. Na fração ZRCRH 3.3.5.4/4, conforme apresentado no Esquema 3, foi isolada a substância **S1**.



Esquema 3 – Purificação da fração ER 3/3 e isolamento de **S9** e **S1**

### 3.3.2.5 FRACIONAMENTO DE ZRCRH 3/4 E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS **S13**, **S2** E **S9**

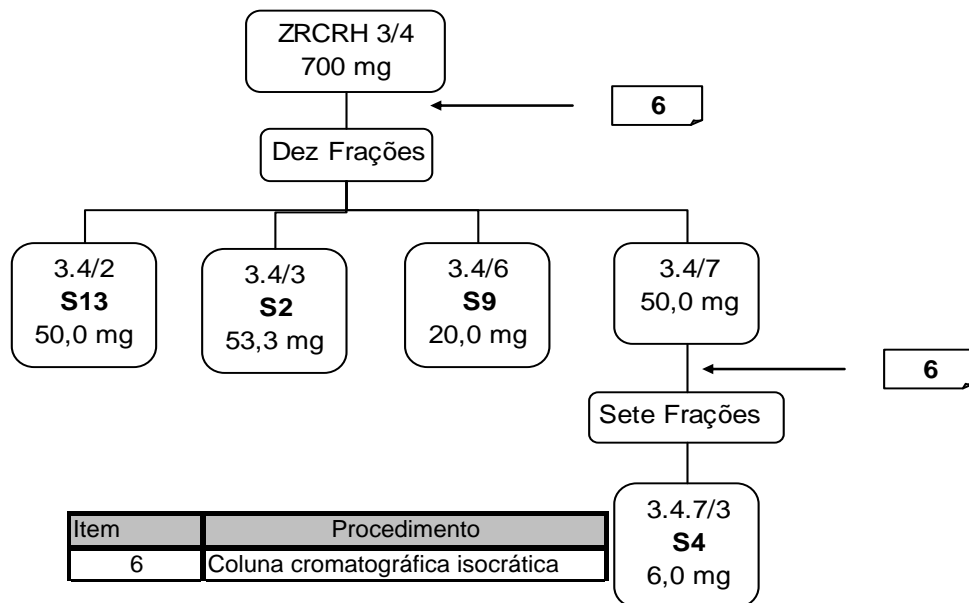
A fração ZRCRH 3/4 (Esquema 4) foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G e eluída com hexano/acetato de etila 80:20. Desta coluna foram recolhidas 66 frações, as quais, depois de analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram agrupadas dando origem a dez frações.

Na fração ZRCRH 3.4/2 foi isolada a substância **S13**, na fração ZRCRH 3.4/3 foi isolada a substância **S2** e na fração ZRCRH 3.4/6 foi identificada a substância **S9**. A fração ZRCRH 3.4/7 apresentou sinais sugestivos da presença de alcalóide, mas não claros o suficiente para a identificação da substância, e por isso, foi submetida a uma nova purificação.



### 3.3.2.6 FRACIONAMENTO DE ZRCRH ER 3.4/7 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S4**

A fração ER 3.4/7 de *Z. rhoifolium* foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G com diclorometano/metanol 95:5. Desta coluna foram recolhidas 11 frações, as quais, depois de analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram agrupadas dando origem a sete frações. Na fração 3 foi isolada a substância **S4** (Esquema 4).



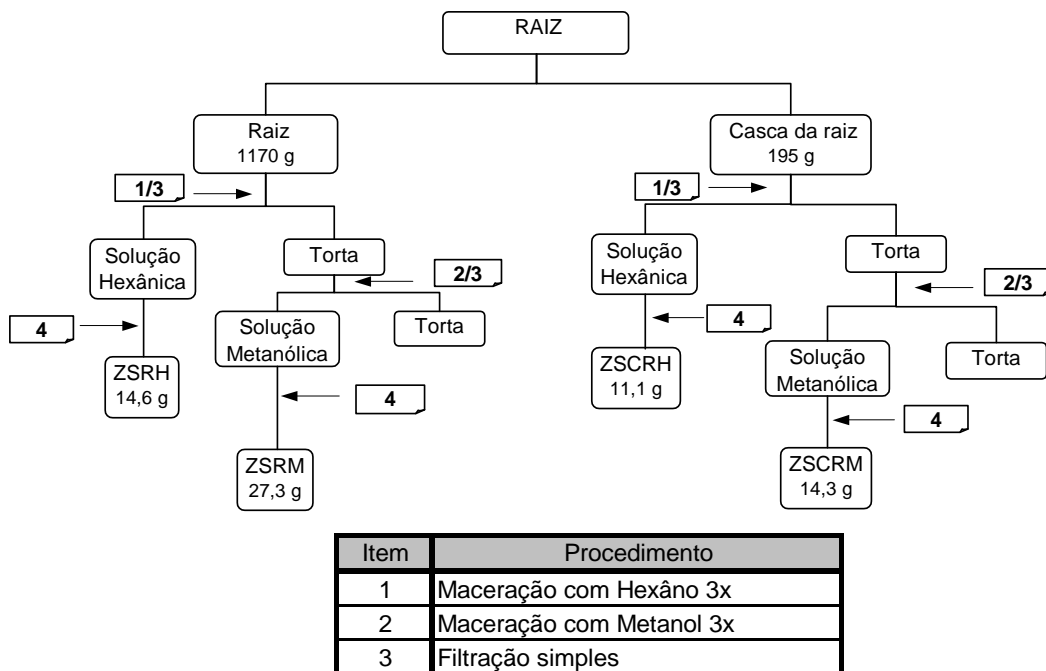
Esquema 4 – Purificação da fração ER 3/4 e isolamento das substâncias **S13**, **S2**, **S9** e **S4**

### 3.3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE *Z. stelliregum*

A raiz, após secagem a temperatura ambiente também teve a parte cortical (casca), separada da parte medular da raiz. Ambas as partes foram trituradas e as serragens obtidas foram submetidas a maceração por três vezes com hexano, tendo como tempo de maceração uma semana cada. A solução obtida após a filtração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato hexânico (ZSCRH).

Em seguida, a torta foi submetida a uma nova extração, como representado no Esquema 5, também por três vezes, desta vez com metanol, com período de maceração também de uma semana cada. A solução obtida, do mesmo modo que a anterior, foi concentrada com o auxílio de um rota-evaporador, resultando no extrato metanólico (ZSCRM).

A parte medular da raiz foi submetida ao mesmo procedimento sendo, de agora em diante chamada simplesmente de raiz e a parte cortical chamada de casca. Os extratos hexânico e metanólico, obtidos, foram denominados de ZSRH e ZSRM respectivamente.



Esquema 5 – Obtenção dos extratos brutos da raiz de *Z. stelligerum*

### 3.3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE *Z. stelligerum*

No extrato hexânico da casca da raiz (ZSCRH) durante o processo de evaporação ocorreu a formação de um precipitado o qual foi separado do sobrenadante.

Este procedimento originou dois sub extratos: o oleoso (ZSCRHo) e o sólido (ZSCRHs) (Esquema 6).

A parte sólida do extrato hexânico foi submetida a uma cromatografia em coluna de evolução rápida, onde foi utilizada como fase estacionária, sílica gel 60G e como fase móvel, foram utilizados os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

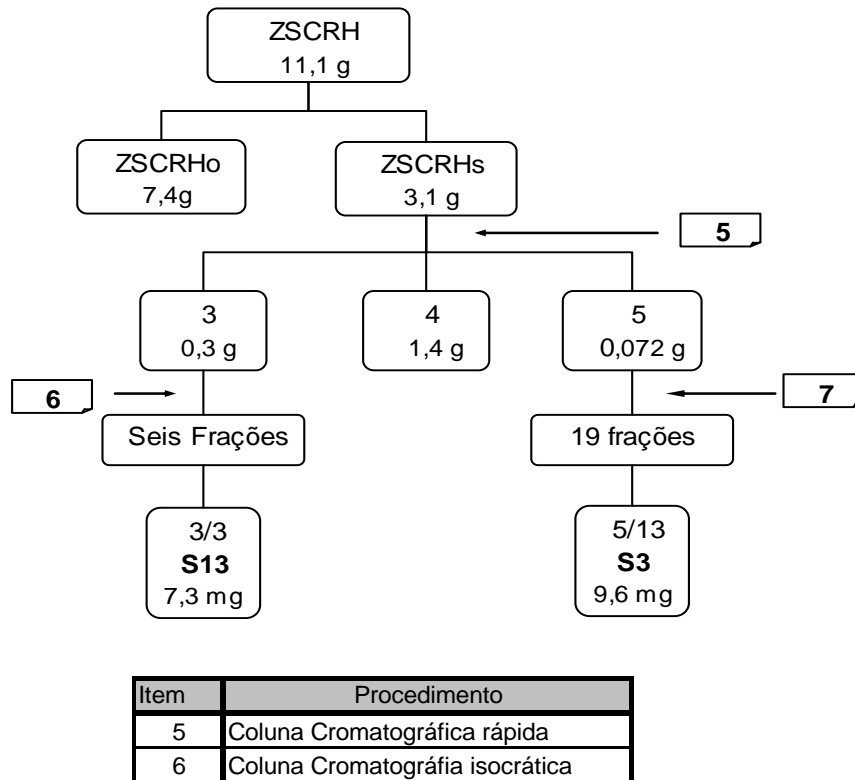
Para a sucção dos solventes foi utilizada uma bomba de baixa pressão e o resultado foi a obtenção de seis frações (Esquema 6). As frações ZSCRHs 3, 4 e 5 foram escolhidas para serem submetidas a novas purificações através da análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H os quais apresentavam a sinais em campo alto sugestivos da presença de terpenos, para a fração 3, e sinais em campo baixo sugerindo a presença de alcalóides para as frações 4 e 5.

#### 3.3.4.1 FRACIONAMENTO DE ZSCRHS 3 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S13**

A fração 3 foi submetida a uma CC em sílica gel 60G com diclorometano/hexano 1:1 (Esquema 6). Desta coluna foram recolhidas 125 frações, as quais, depois de analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram agrupadas dando origem a seis frações. Na terceira fração desta coluna ZSCRHs 3/3 foi isolada a substância **S13**.

#### 3.3.4.2 FRACIONAMENTO DE ZSCRHS 5 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S3**

A fração 5 foi submetida a uma CC em sílica gel 60G com diclorometano/metanol em gradiente de polaridade (Esquema 6). Desta coluna foram recolhidas 47 frações, as quais, depois de analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram agrupadas dando origem a dezenove frações. Na terceira fração desta coluna ZSCRHs 5/13 foi isolada a substância **S3**.



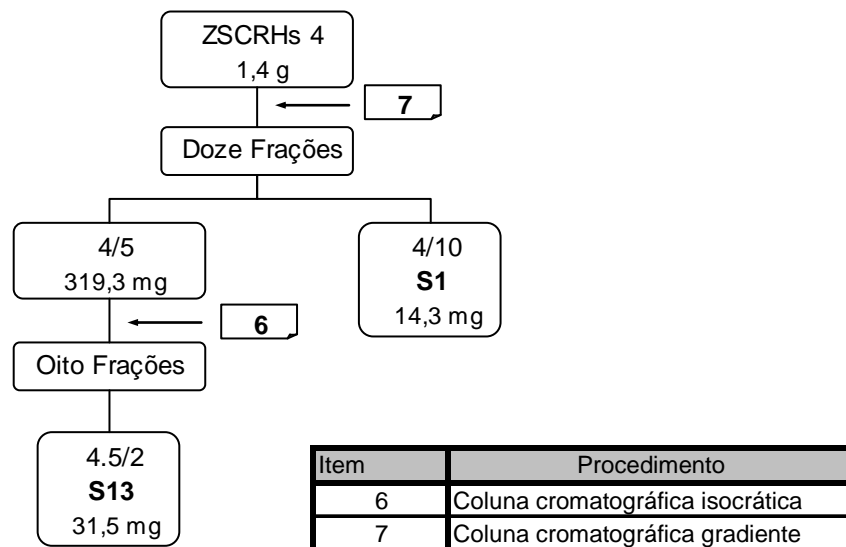
Esquema 6 – Purificação do extrato da casca da raiz de *Z. stelligerum* e isolamento das substâncias **S13** e **S3**

### 3.3.4.3 FRACIONAMENTO DE ZSCRHS 4 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S1**

A fração ZSCRHs 4 obtida conforme procedimento descrito no Esquema 6, foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G com clorofórmio/metanol em ordem crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 55 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a doze frações. Na décima fração, foi isolada a substância **S1**. E a fração 4/5 foi selecionada para ser submetida a novas purificações conforme Esquema 7 p. 90.

### 3.3.4.4 FRACIONAMENTO DE ZSCRHS 4/5 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S13**

A fração ZSCRHs 4/5 (Esquema 7), foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G com hexano/metanol 99:1. Desta coluna foram recolhidas 20 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a cinco frações. Na fração 4.5/2 foi isolada a substância **S13**.



Esquema 7– Purificação da fração C4 e isolamento de **S1** e **S13**

### 3.3.4.5 FRACIONAMENTO DE OLEOSA DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE *Z. stelligerum*

O extrato obtido conforme procedimentos descritos nos Esquema 5 e 6 das páginas 87 e 89 respectivamente, foi submetido a uma cromatografia em coluna de evolução rápida, onde foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60G, e como fase móvel foram utilizados os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Este procedimento originou sete frações. As frações ZSCRHo 2 e 4 foram as escolhidas para dar continuidade às purificações.

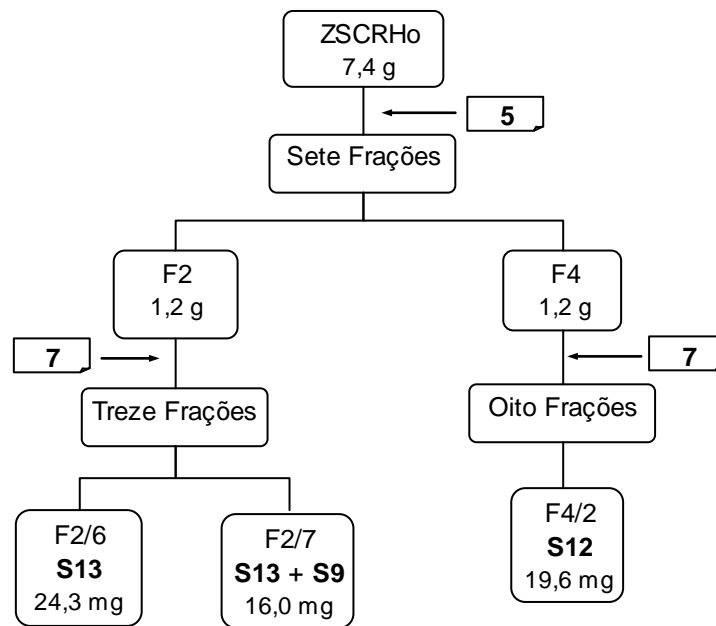
#### 3.3.4.6 FRACIONAMENTO DE ZSCRHO 2 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS **S13** E **S9**

A fração ZSCRHo 2 foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G com diclorometano/metanol em gradiente de polaridade (Esquema 8).

Desta coluna foram recolhidas 38 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a treze frações. Na sexta fração (ZSCRHo 2/6) foi isolada a substância **S13**, na fração ZSCRHo 2/7 foi identificado em mistura as substâncias **S13** e **S9**.

#### 3.3.4.7 FRACIONAMENTO DE ZSCRHO 4 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S12**

A fração ZSCRHo 4 foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G com diclorometano/metanol em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 20 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a oito frações. Na fração ZSCRHo 4/2 foi isolada a substância **S12**.



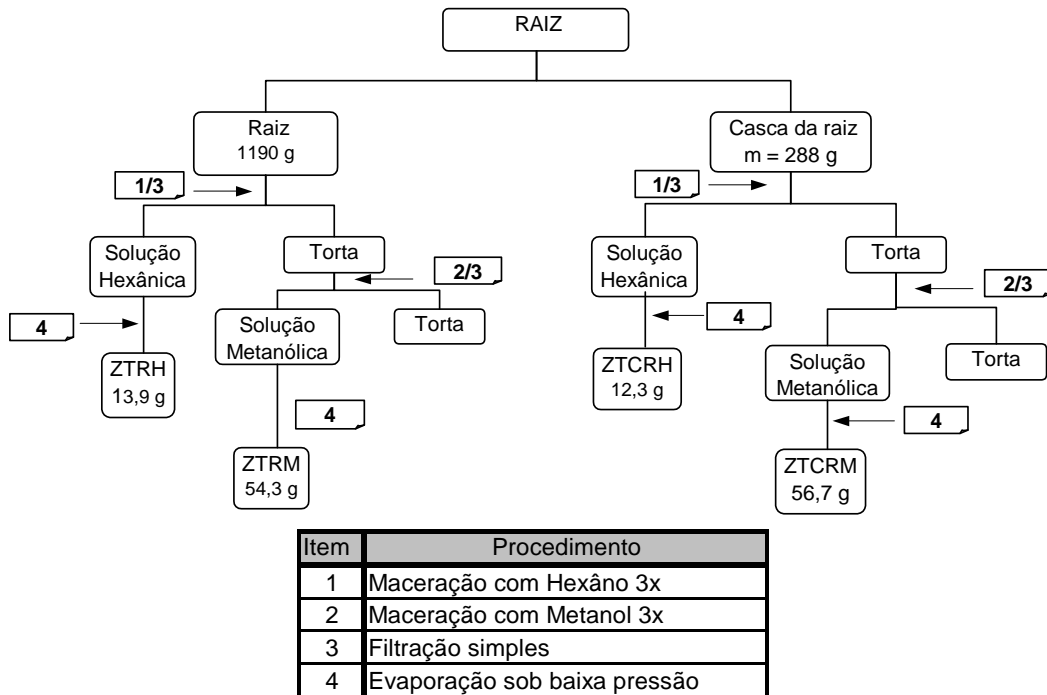
Item	Procedimento
5	Coluna Cromatográfica rápida
7	Coluna Cromatografia gradiente

Esquema 8 – Purificação do extrato ZSCRHo e isolamento das substâncias **S13**, **S13+S9** e **S12**

### 3.3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA RAIZ DE *Z. tingoassuiba*

A raiz de um espécime de *Z. tingoassuiba* também passou pelos mesmos procedimentos: secagem, separação, trituração e maceração, realizados nas raízes das espécies anteriormente descritas, como mostrado no Esquema 9.

Os extratos brutos hexânico e metanólico da casca da raiz e da raiz foram denominados ZTCRH e ZTCRM e ZTRH e ZTRM respectivamente.



Esquema 9 – Obtenção dos extratos brutos da raiz de *Z. tingoassuiba*

### 3.3.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE *Z. tingoassuiba*

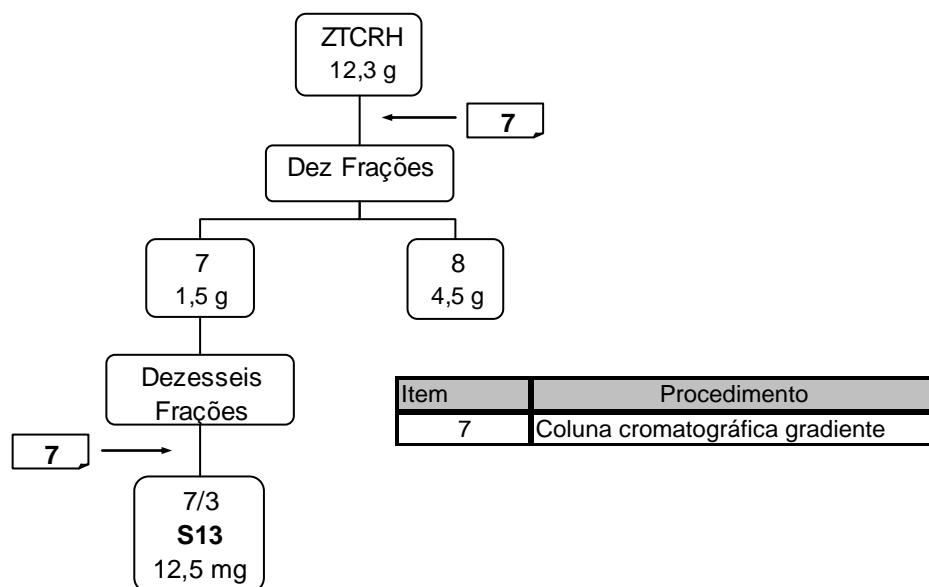
#### 3.3.6.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DA CASCA DA RAIZ DE *Z. tingoassuiba* E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S1**

Após maceração da casca da raiz, o extrato proveniente deste material, ZTCRH (Esquema 9), foi submetido a uma coluna cromatografia utilizando hexano/diclorometano em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 19 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a dez frações (Esquema 10). Após análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  as frações ZTCRH 7 e 8 foram escolhidas para dar continuidade as purificações e na fração 9 foi isolado a substância **S1**.



### 3.3.6.2 FRACIONAMENTO DE ZTCRH 7 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S13**

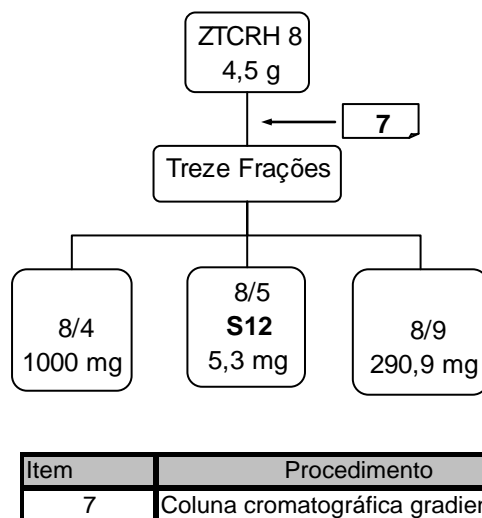
A fração ZTCRH 7 foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando diclorometano/metanol em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 23 frações (Esquema 10), as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a dezessete frações. Na terceira fração desta coluna (ZTCRH 7/3), foi identificada a substância **S13**.



Esquema 10 – Purificação do extrato ZTCRH e isolamento da substância **S13**

### 3.3.6.3 FRACIONAMENTO D E ZTCRH 8 E ISOLAMENTO DE S12

A fração ZTCRH 8 foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando diclorometano/metanol em gradiente de polaridade (Esquema 11). Desta coluna foram recolhidas 21 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a treze frações. Na fração 8/5 foi isolada a substância **S12** e as frações ZTCRH 8/4 a qual possuía a maior massa e a fração 8/9 a qual apresentou teste positivo para Dragendorff, foram escolhidas para dar prosseguimento ao trabalho.



Esquema 11 – Purificação da fração 8 e isolamento da substância **S12**

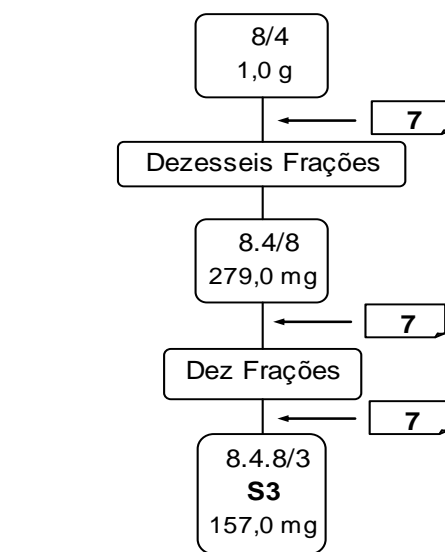
### 3.3.6.4 FRACIONAMENTO D E ZTCRH 8/4

A fração ZTCRH 8/4 (Esquema 11), foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando diclorometano/metanol em gradiente de polaridade (Esquema 12).

Desta coluna foram recolhidas cinquenta e sete frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a dezesseis frações. A oitava fração (ZTCRH 8.4/8) foi submetida a novas purificações, pois este procedimento não foi satisfatório.

### 3.3.6.5 FRACIONAMENTO DE ZTCRH 8.4/8 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S3**

A fração ZTCRH 8.4/8 (Esquema 12) foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando clorofórmio/metanol em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas trinta e cinco frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a dez frações. A fração ZTCRH 8.4.8/4 foi isolada a substância **S3**.



Item	Procedimento
7	Coluna cromatográfica gradiente

Esquema 12 – Purificação da fração 8/4 e isolamento da substância **S3**

### 3.3.6.6 FRACIONAMENTO DE ZTCRH 8/9

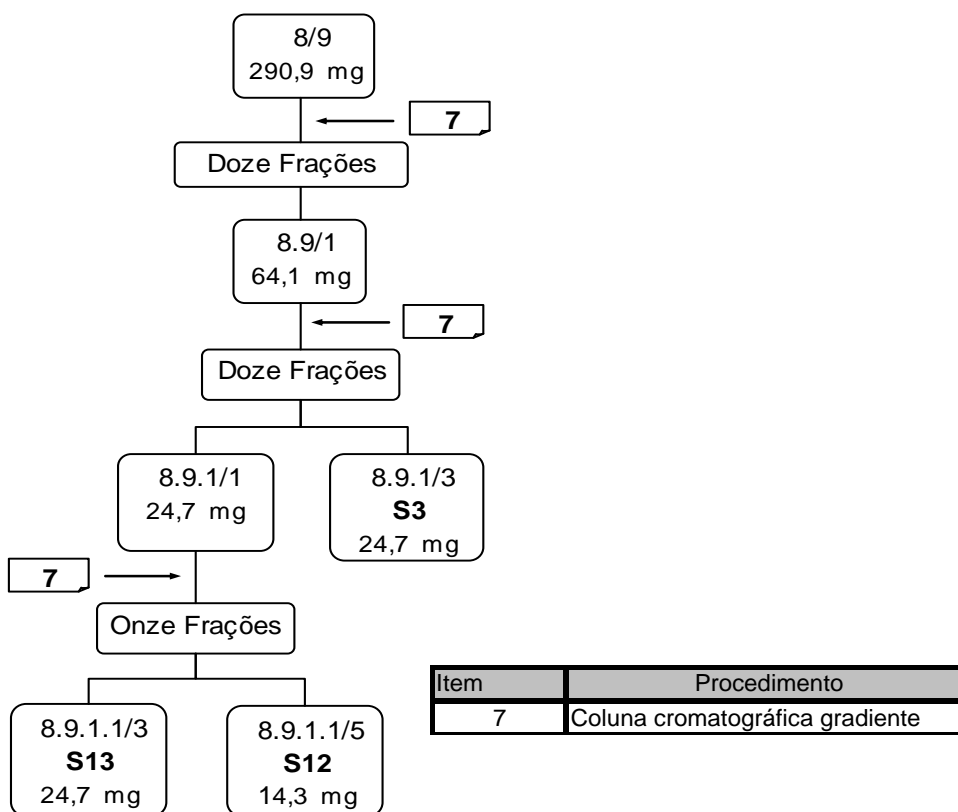
A fração ZTCRH 8/9 (Esquema 11), foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando diclorometano/acetato de etila 90:10 em gradiente de polaridade (Esquema 13 p. 98). Este procedimento levou a separação da amostra em doze frações. A primeira fração desta coluna (ZTCRH 8.9/1) foi escolhida para ser purificada.

### 3.3.6.7 FRACIONAMENTO DE ZTCRH 8.9/1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S3**

A fração ZTCRH 8.9/1 foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando diclorometano/metano 98:20 em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas quarenta e uma frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a doze frações. A fração 8.9.1/1 ainda apresentou sinais indicativos da presença de alcalóide, por isso, foi escolhida para dar prosseguimento aos trabalhos de purificação já na fração 8.9.1/3 foi isolada a substância **S3** (Esquema 13).

### 3.3.6.8 FRACIONAMENTO DE ZTCRH 8.9.1/1 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS **S13** E **S12**

A fração ZTCRH 8.9.1/1 foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando diclorometano/hexano 1:1 em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas trinta e três frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a onze frações. Nas frações 8.9.1.1/3 e 8.9.1.1/5 foram isoladas as substâncias **S13** e **S12** respectivamente, como apresentado no Esquema 13.



Esquema 13 – Purificação da fração 8/9 e isolamento das substâncias **S3**, **S13** e **S12**

### 3.3.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DA CASCA DA RAIZ DE *Z. tingoassuiba*

O extrato bruto metanólico da casca da raiz de *Z. tingoassuiba* (ZTCRM) foi submetido a uma cromatografia em coluna rápida. Para a execução deste procedimento foi utilizando sílica gel (71 – 230 mesh) com proporção extrato/sílica de 1:5. E com fase móvel foram utilizados os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Para auxiliar na sucção dos solventes foi utilizada uma bomba de baixa pressão e o resultado foi a obtenção de quatro frações (Esquema 14). As frações 2 e 4 foram as selecionadas para dar continuidade a purificação, baseado nos resultados dos testes de atividade antiparasitária.

### 3.3.7.1 FRACIONAMENTO DE 2

A fração ZTCRM 2 foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando o sistema hexano/acetato de etila, em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas oito frações. As frações 2/1 e 2/2 foram utilizadas para dar continuidade às purificações, como mostrado no Esquema 14, tendo como base os seus espectros de RMN <sup>1</sup>H.

### 3.3.7.2 FRACIONAMENTO DE 2/1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S3**

A fração ZTCRM 2/1, obtida da coluna anterior, foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como sistema para eluição hexano/acetato de etila 1:1. Deste procedimento foram obtidas cinco frações. Na fração 2.1/3 foi isolada a substância **S3** (Esquema 14).

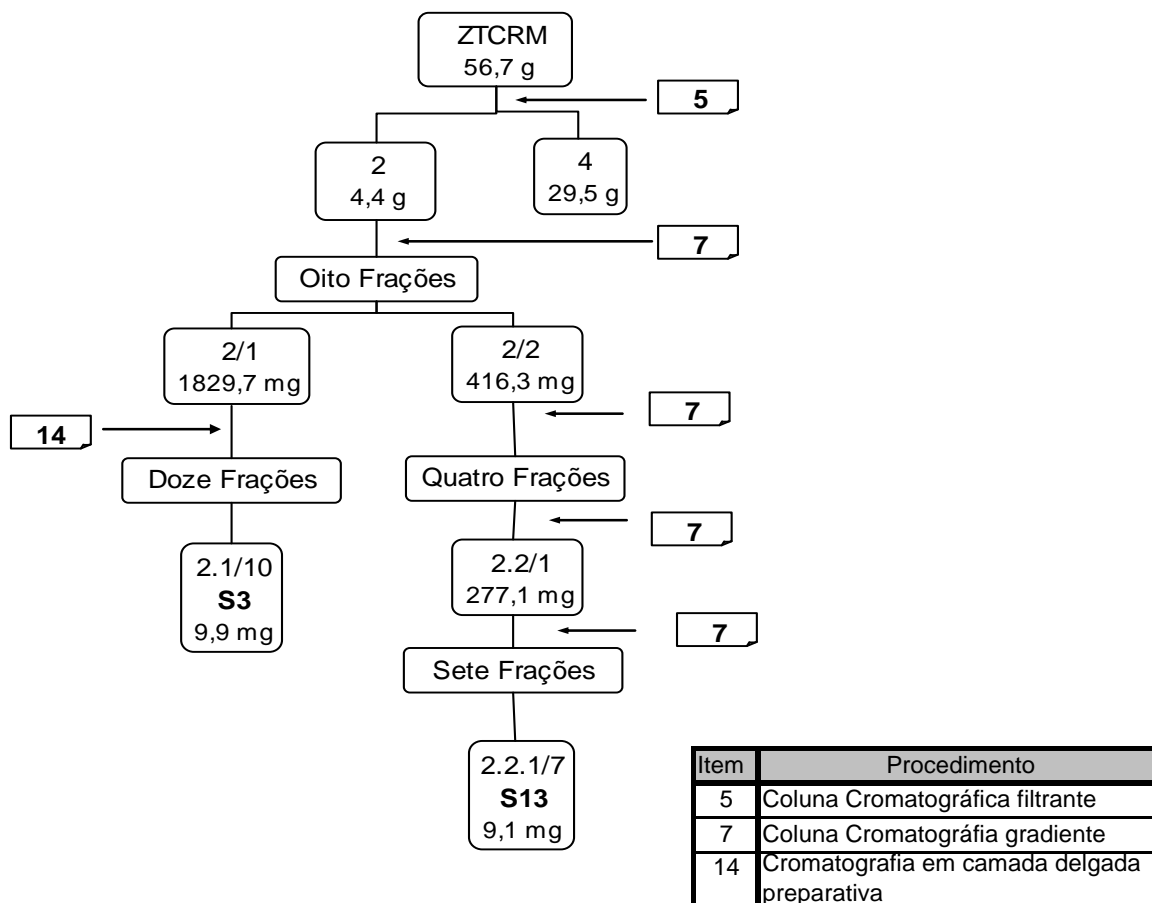
### 3.3.7.3 FRACIONAMENTO DE 2/2

A fração ZTCRM 2/2, obtida da coluna anterior, foi submetida a uma coluna cromatografia utilizando o sistema, clorofórmio éter etílico em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas oito frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a quatro frações. A fração 2.2/1 necessitou ser repurificada, pois, seu espectro de RMN <sup>1</sup>H ainda apresentava sinais de mistura (Esquema 14).

### 3.3.7.4 FRACIONAMENTO DE 2.2/1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S13**

A fração ZTCRM 2.2/1 (Esquema 14) foi submetida a uma coluna cromatografica utilizando o sistema hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas quarenta frações, as quais, depois de

analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a vinte frações. Na fração 2.2.1/9 foi isolada a substância **S13**.



Esquema 14 – Purificação do extrato ZTCRM e isolamento das substâncias **S3** e **S13**

### 3.3.7.5 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4

A fração 4 foi submetida a uma coluna cromatográfica em gradiente de polaridade iniciando com clorofórmio/metanol 99:1. Desta coluna foram recolhidas 22 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a cinco outras frações. A fração 5, fração de maior massa, foi escolhida para dar continuidade ao estudo fitoquímico. (Esquema 15 p. 102)

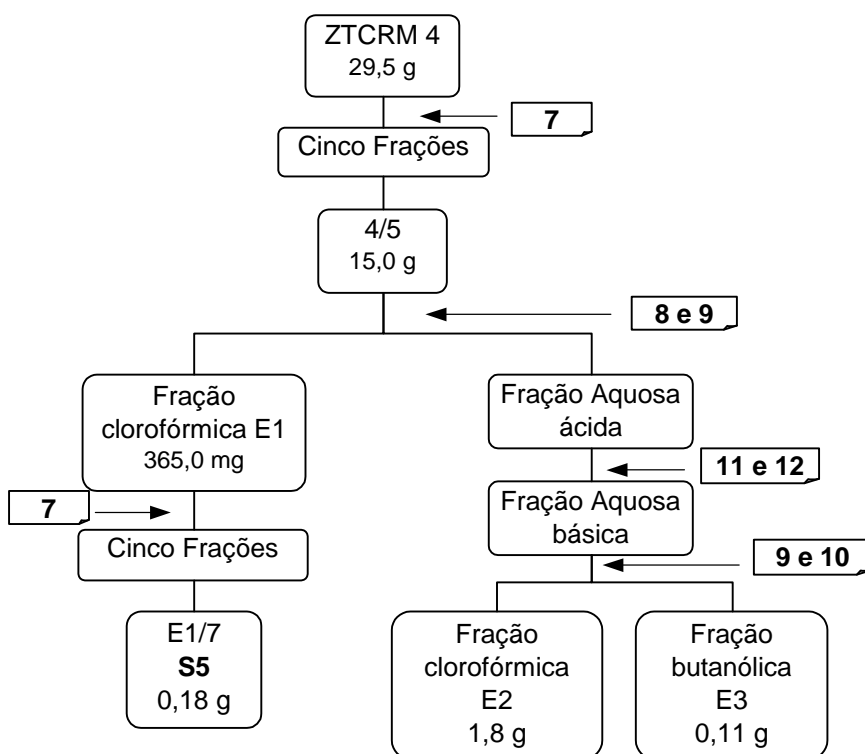
### 3.3.7.6 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5

A quinta fração da coluna anterior foi submetida a uma extração de alcalóides quaternários. A metodologia utilizada para esta extração (Esquema 15) foi uma adaptação do procedimento descrito em Stermitz e Swinehart (1980), onde ao final do procedimento foram obtidas três frações que foram denominadas ZTCRM4/5-E1, E2 e E3 respectivamente.

### 3.3.7.7 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5-E1 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S5**

A fração E1 foi submetida a uma cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel hexano/clorofórmio em gradientes de polaridade (Esquema 15). Desta coluna foram recolhidas 37 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a dez frações. Na fração E1/7 foi isolada a substância **S5**.





Item	Procedimento
7	Coluna cromatográfica gradiente
8	Extração com HCl 5%
9	Partição clorofórmio/água
10	Partição butanol/água
11	Basificação
12	Adição de iodeto de potássio

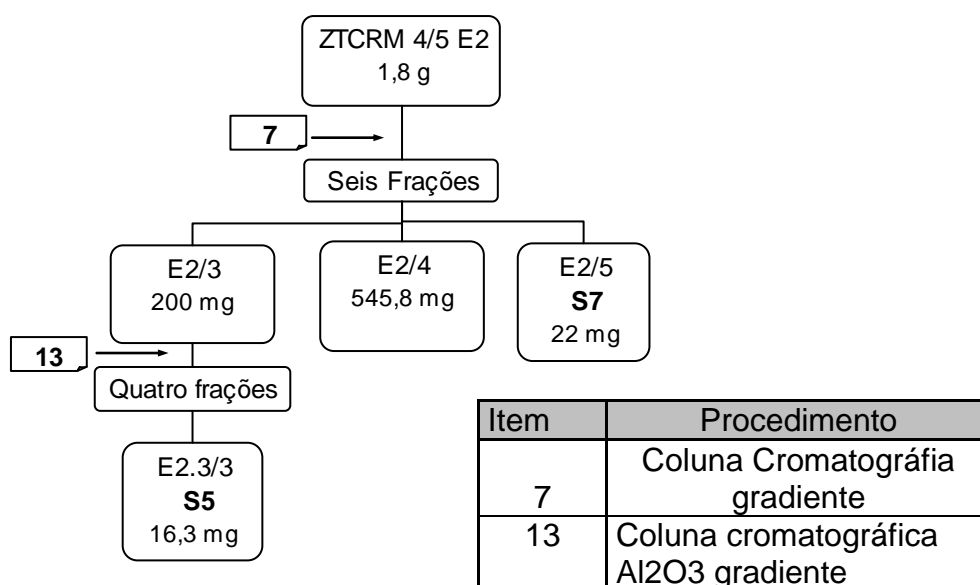
Esquema 15 – Extração ácido-básica purificação da Fração E1 e isolamento da substância **S5**

### 3.3.7.8 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5-E2 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S7**

A fração E2 foi submetida a uma cromatografia em coluna em sílica gel 60G com gradiente de polaridade com clorofórmio/metanol (Esquema 16). Desta coluna foram recolhidas 17 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a seis frações. Na fração E2/5 foi isolada a substância **S7**. As frações E2/3 e E2/4 foram utilizadas para dar continuidade as purificações.

### 3.3.7.9 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5-E2/3 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA S5

Para a purificação, parte da fração E2/3 (Esquema 16) foi submetida a uma cromatografia em coluna com óxido de alumínio utilizando como eluentes hexano/clorofórmio em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas setenta e nove frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a quatro frações. Na fração E2.3/3 foi isolada a substância S5.



Esquema 16 – Purificação da Fração E2 e isolamento da substância S7 e S5

### 3.3.7.10 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5 - E2/4

A fração E2/4 obtida, através do procedimento demonstrado no Esquema 16, foi submetida a uma cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60G e como eluentes clorofórmio/metanol em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas sessenta frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a cinco frações (Esquema 17 p. 105). A fração E2.4/3 foi submetida a novas purificações.

### 3.3.7.11 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5 - E2.4/3

A fração E2.4/3 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa que foi eluída por 3 vezes com clorofórmio puro. Este procedimento levou a obtenção de 4 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a duas frações (Esquema 17). A fração E2.4.3/2 foi submetida a um novo processo de purificação.

### 3.3.7.12 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5-E2.4.3/2

A fração E2.4.3/2 foi submetida a uma cromatografia em coluna isocrática utilizando como fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel diclorometano/metanol 90:10. Desta coluna foram recolhidas 23 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a três frações. A fração E2.4.3.2/2 foi novamente purificada (Esquema 17).

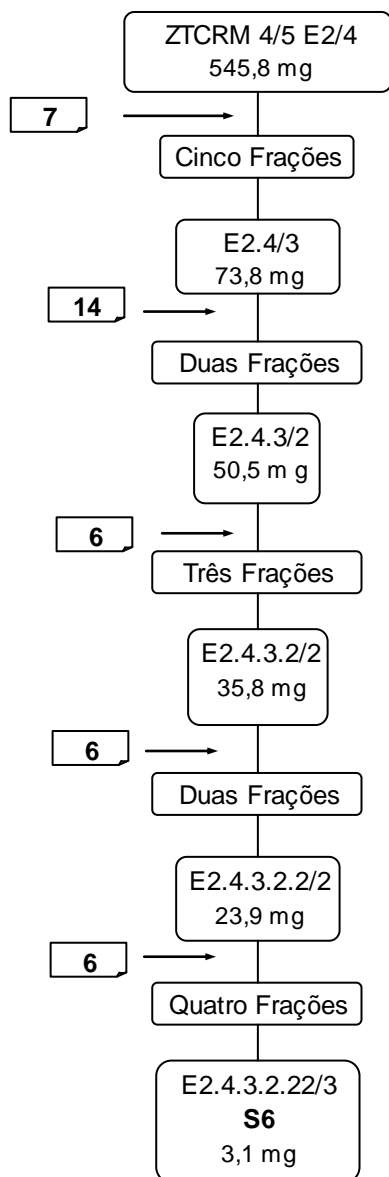
### 3.3.7.13 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5-E2.4.3.2/2

A fração E2.4.3.2/2 foi submetida a uma cromatografia em coluna isocrática utilizando como fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel clorofórmio/metanol 95:5. Desta coluna foram recolhidas 15 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a duas frações (Esquema 17). A fração E2.4.3.2.2/2 foi submetida a um novo processo de purificação, pois as anteriores não foram eficientes.

### 3.3.7.14 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5-E2.4.3.2.2/2 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S6**

A fração E2.4.3.2.2/2 foi submetida a uma cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel clorofórmio/metanol 95:5. Desta coluna foram recolhidas 14 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram

agrupadas dando origem a quatro frações. Na fração E2.4.3.2.2/3 foi isolada a substância S6.



Item	Procedimento
6	Coluna cromatográfica isocrática
7	Coluna cromatográfica gradiente
14	Cromatográfica em camada delgada preparativa

Esquema 17 – Purificação da Fração E2 e isolamento da substância S6

### 3.3.7.15 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5 E3

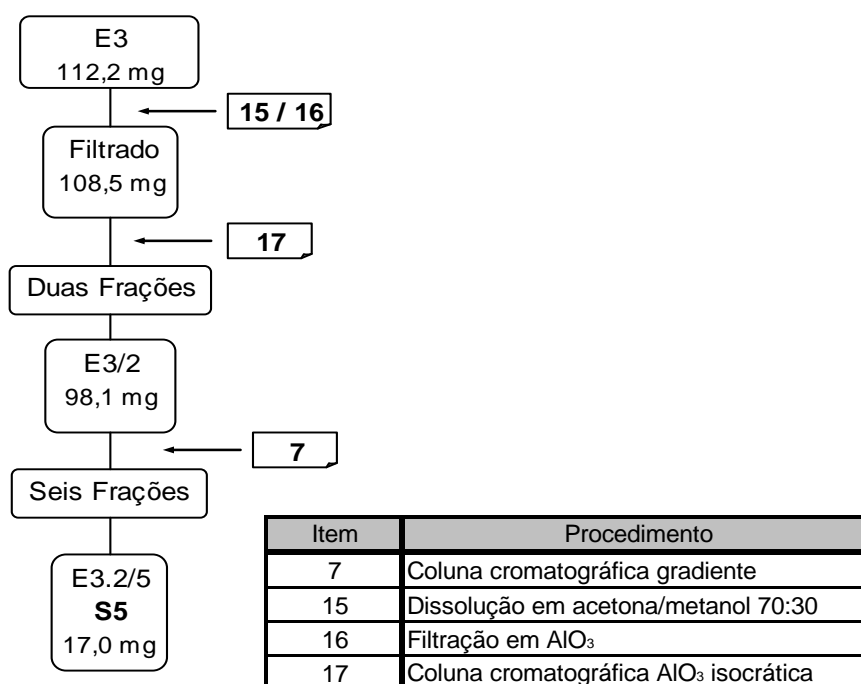
A fração E3 foi dissolvida em uma solução de acetona/metanol 70:30, e passada por uma coluna de óxido de alumínio conforme procedimento descrito no Esquema 18. Este procedimento foi uma adaptação do trabalho realizado por Stermitz e Swinehart (1980).

O filtrado foi submetido a uma coluna cromatográfica tendo como fase estacionária o óxido de alumínio e fase móvel acetona/metanol 90:10.

Desta coluna foram recolhidas 11 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a duas frações. Em seguida a fração E3/2 foi submetida a novas purificações.

### 3.3.7.16 FRACIONAMENTO DE ZTCRM 4/5 E3/2 E ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **S5**

A fração E3/2 foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel diclorometano/metanol em gradientes de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 35 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a seis frações. Onde na fração E3.2/5 foi isolada a substância **S5**.



Esquema 18 -Purificação da Fração E3 e isolamento da substância **S5**

### 3.3.8 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba* POR HIDRODESTILAÇÃO

As folhas frescas e secas, ambas intactas, foram submetidas a hidrodestilação (Esquema 19 p. 112), por um período de quatro horas utilizando-se um aparelho doseador de óleos essenciais como preconizado, pela Farmacopéia Brasileira Terceira Edição (Figura 22).



Figura 22 – Aparelho para Hidrodestilação

Em seguida os óleos obtidos das folhas frescas (ZTOFF) e das folhas secas (ZTOFS) foram desidratados em sulfato de sódio anidro e acondicionado a aproximadamente - 4°C.

Os óleos obtidos das folhas frescas tiveram suas composições analisadas através de cromatografia a gás com detetor de ionização de chama (CG/IC), utilizando as seguintes condições: a temperatura da coluna foi inicialmente de 60 °C por 1 minuto, e então gradualmente levada em 3 °C/min até 240 °C permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e finalmente com uma taxa de 10 °C/min, a temperatura da coluna foi elevada até 280 °C permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. A amostra foi diluída (1/100, v/v em diclorometano) e 2,0 µl foram injetados. A temperatura do injetor foi de 220 °C e o detetor de ionização de chama operava a uma temperatura de 300°C. Como padrão interno foi utilizado uma mistura de N-alcanos C9 – C19.

Ao final deste procedimento notou-se que a composição das duas amostras eram iguais. As outras análises foram realizadas apenas com a amostra proveniente das folhas frescas.

O extrato da folhas frescas foi também submetido a análise utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM) nas seguintes condições: a temperatura da coluna foi inicialmente de 60 °C por 1 minuto, e então

gradualmente levada em 3 °C/min até 240 °C permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e finalmente com uma taxa de 10 °C/min elevada até 280 °C permanecendo nesta temperatura por mais 10 minutos. A amostra foi diluída (1/100, v/v em diclorometano) e 2,0 µl foram injetados a 250 °C. Como padrão interno foi utilizada uma mistura de N-alcanos C9 – C19.

Para a identificação dos constituintes presentes nos óleos voláteis foram realizadas:

A) comparações dos espectros de massas obtidos, com os espectros padrões contidos no banco de dados da biblioteca de espectros, NIST Mass Spectral Library 1.6, utilizando um programa de busca instalado no equipamento.

B) comparações dos espectros de massas obtidos, com os espectros registrados na literatura (ADAMS, 2001).

C) determinação dos índices de retenção ou índice de Kovats (IK) e comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

D) análise e comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o constituinte majoritário.

Todos estes procedimentos estão detalhados no capítulo 4 – Resultados e Discussões.

### **3.3.9 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba* POR CO<sub>2</sub> SUPER CRÍTICO**

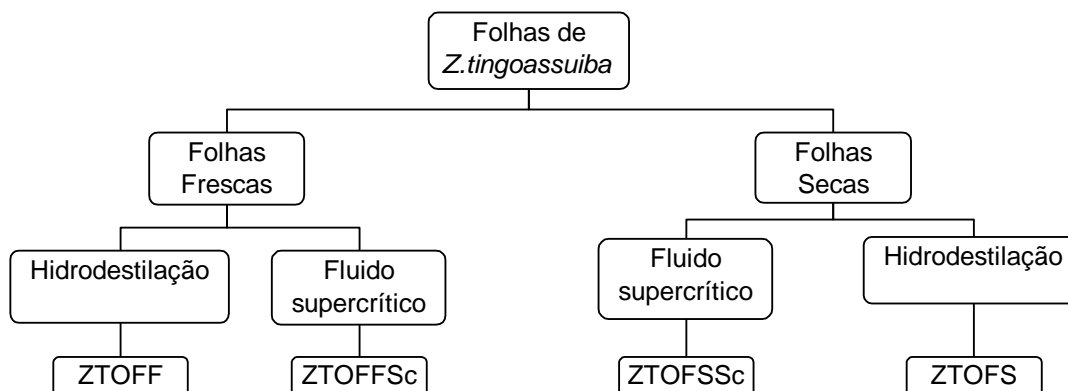
Uma parte das folhas frescas (40g peso úmido) e das folhas secas (40g peso úmido) foram submetidas a uma extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, obtendo-se assim os extratos (ZTOFFSc) e (ZTOFSSc) respectivamente (Esquema 19 p. 112).

A unidade de extração utilizada é constituída de um cilindro contendo CO<sub>2</sub> (a), uma bomba (P) para o transporte do CO<sub>2</sub>, um módulo externo para aplicação de co-solvente, se necessário, três trocadores de calor (GC), um cilindro extrator (E) de 400 mL e três separadores (S1, S2, S3) de 16 mL cada (Figura 23).

Para este procedimento foram utilizados: pressão de 2000 Psi e temperatura de 35°C, a amostra ficou em contato com o solvente na unidade de extração por 40 minutos, e em seguida coletada em um dos separadores. Neste procedimento não foi utilizado co-solvente.



O óleo volátil assim obtido também foi analisado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze.



Esquema 19 – Obtenção dos óleos essenciais das folhas de *Z. tingoassuiba*

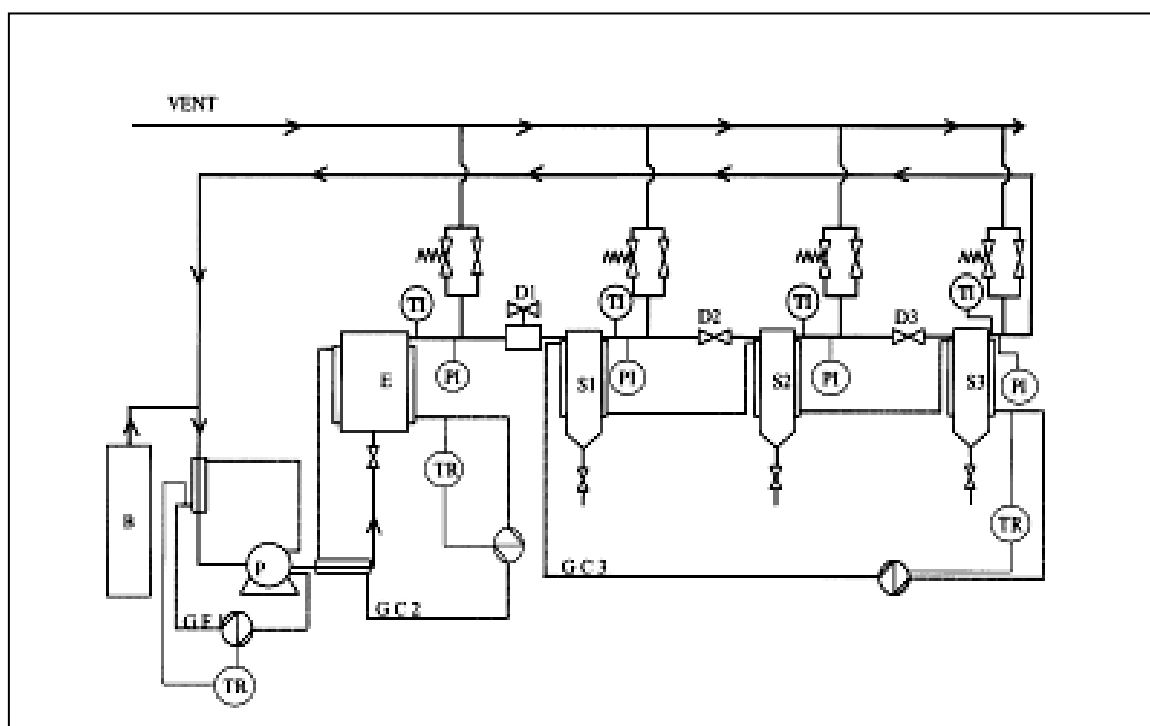


Figura 23 - Esquema da planta piloto de extração por fluido supercrítico SFE-500

### 3.3.10 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROVENIENTE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE *Z. tinguassuiba*

A expressão chá é freqüentemente usada para designar infusões ou decocções feitas com partes de um vegetal. Esta bebida conhecida mundialmente é usualmente ingerida por prazer ou com fins medicinais.

As folhas e cascas de espécies de *Zanthoxylum* vêm sendo bastante utilizadas como chá na medicina popular em vários países contra inúmeras enfermidades, utilizando-se na maioria das vezes as informações provenientes do conhecimento popular (SHEEN et al., 1994; ARTHUR et al., 1959; FISH et al., 1975b).

Com o intuito de determinar a composição da decocção (chá), proveniente das folhas de *Z. tinguassuiba*, a água utilizada na hidrodestilação (Figura 22) foi analisada, conforme procedimento descrito no Esquema 20.

O estudo químico deste material geralmente não é realizado, pois a alta temperatura a qual é submetido pode levar a formação de artefato.

No entanto a água obtida após o processo de hidrodestilação das folhas (Esquema 20) foi filtrada e submetida a partições com clorofórmio e acetato de etila, estas soluções depois de evaporadas utilizando um evaporador rotatório deram origem aos extratos clorofórmico (ZTFC) e acetato de etila (ZTFA).

#### 3.3.10.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S8**

O extrato clorofórmico (ZTFC) foi submetido a uma cromatografia em coluna, utilizando com fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel hexano/diclorometano 1:1. Desta coluna foram recolhidas 14 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a cinco frações (Esquema 20).

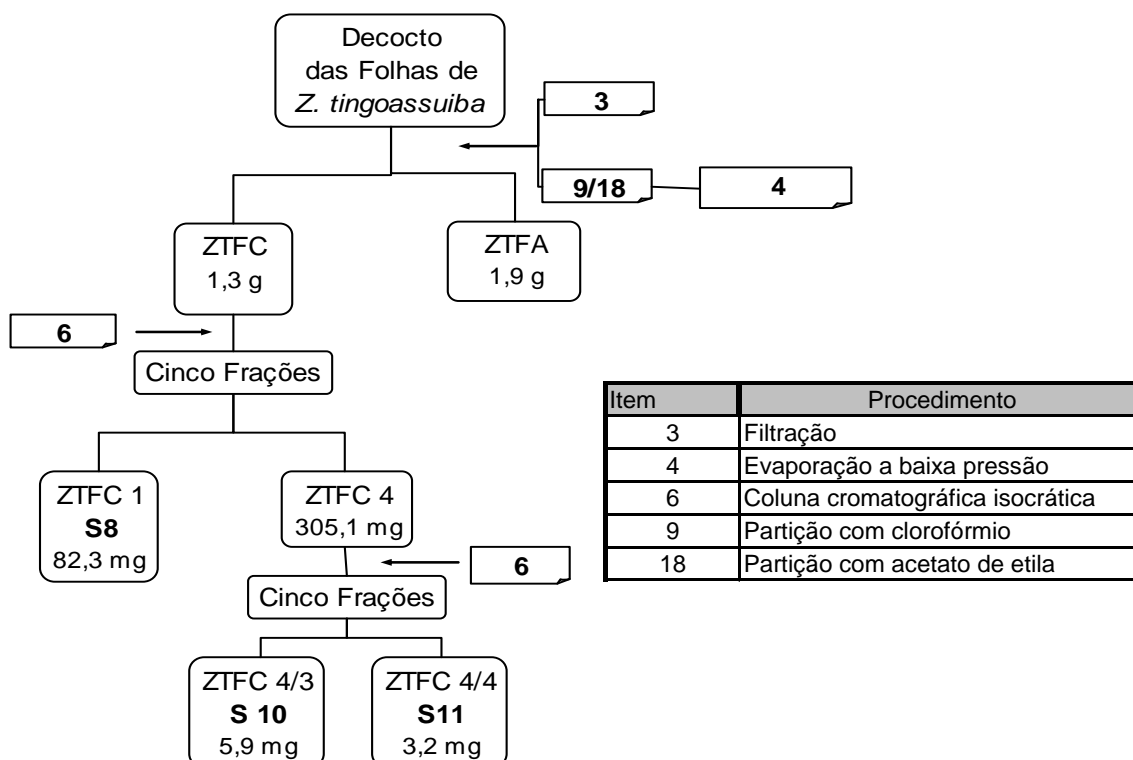
Na fração 1 foi identificada a substância **S8**. A fração 4 foi escolhida para ser purificada.

### 3.3.10.2 FRACIONAMENTO DE ZTFC 4 E ISOLAMENTO DE **S10** E **S11**

Com a fração 4 foi realizada uma cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel 60G e fase móvel hexano/diclorometano/acetato de etila 70:20:10 em gradiente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 35 frações, as quais, depois de analisadas por CCDC foram agrupadas dando origem a cinco frações. Na fração ZTFC 4/3, foi isolado a substância **S10** e na fração 4/4 foi isolada a substância **S11** (Esquema 20).

### 3.3.10.3 ANÁLISE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA (ZTFA) E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS **S10** E **S11**

A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 do extrato acetato de etila revelou que os constituintes majoritários deste extrato eram as substâncias **S10** e **S11**.



Esquema 20 – Purificação do extrato ZTCFC e isolamento das substâncias **S8**, **S10** e **S11**

### 3.3.11 OBTENÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE *Z. tinguassuiba*

As folhas de *Z. tinguassuiba* coletadas de um único indivíduo foram separadas em folhas jovens (a cima do terceiro nó) e folhas adultas (a baixo do terceiro nó), como apresentado na Figura 26.

Após secagem ambos os grupos foram submetidos ao procedimento descrito no Esquema 21 (p. 114) com o objetivo de extrair a cera epicuticular das folhas de *Z. tinguassuiba*.

Cada grupo foi colocado em contato como o clorofórmio por dois minutos e em seguida procedeu-se a filtração do material. A solução resultante foi evaporada a baixa pressão dando origem aos extratos da cera epicuticular ZTCeJ e ZTCeA.

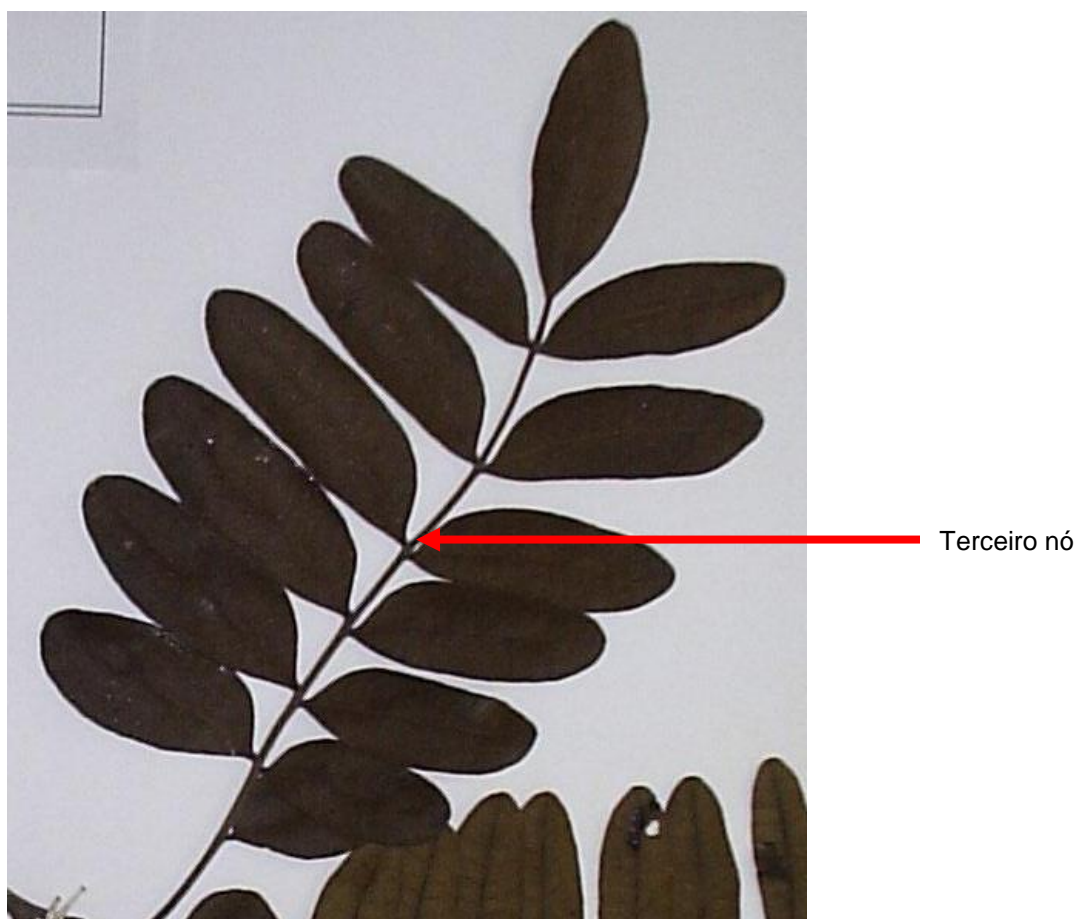
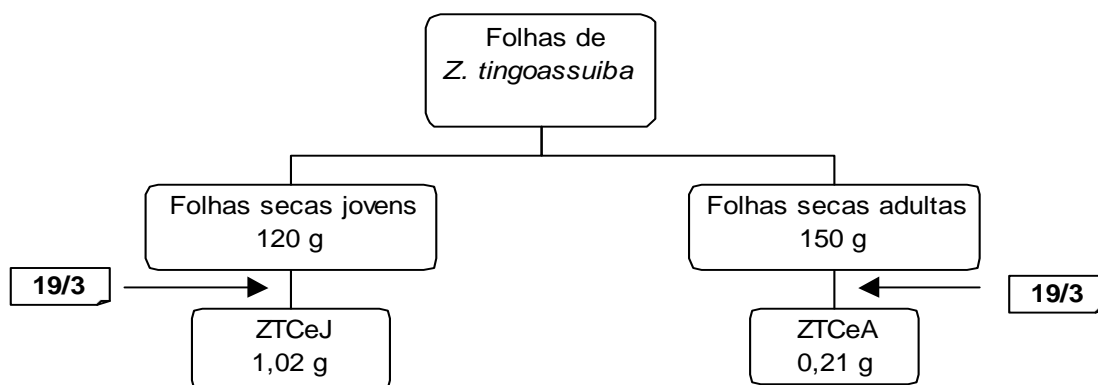


Figura 24 – Indicação do terceiro nó em um ramo de *Z. tinguassuiba*



Item	Procedimento
19	Maceração com clorofórmio
3	Filtração simples

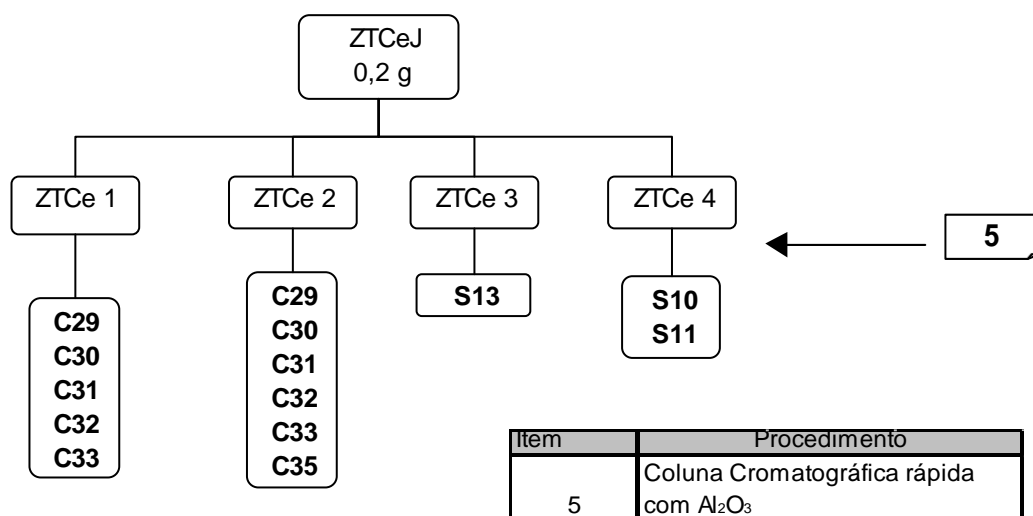
Esquema 21 – Obtenção dos extratos de cera epicuticular

### 3.3.11.1 FRACIONAMENTO DA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba* E IDENTIFICAÇÃO DOS n-ALCANOS E DAS SUBSTÂNCIAS **S10**, **S11**, **S13**, **S14** E **S15**

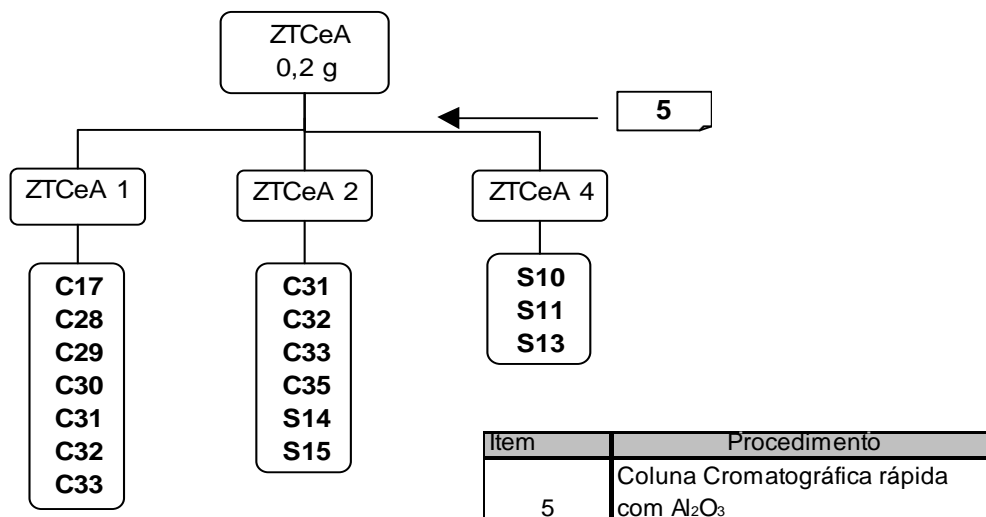
Os extratos obtidos, após secagem, foram submetidos a um procedimento baseado em um procedimento baseado no trabalho de Furlan (2006).

As amostras foram submetidas a uma cromatografia em coluna (CC) rápida, utilizando como fase estacionária óxido de alumínio e fase móvel hexano, diclorometano, clorofórmio acetato de etila (Esquemas 22 e 23). Cada coluna originou cinco frações. As frações hexânica e diclorometânica de cada extrato: ZTCeJ1, ZTCeJ2 e ZTCeA1 ZTCeA2, foram enviadas para o Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) aos cuidados do Professor Doutor Antonio Salatino para determinar a composição dos n-alcenos que constituem a cera epicuticular das folhas de *Z. tingoassuiba*. Para tanto foram utilizados os cromatógrafos especificados na página 79.

As frações 3, 4 e 5 obtidas da CC dos extratos ZTCeJ e ZTCeA foram analisadas por RMN 1H de onde foram identificadas as substâncias S10, S11 e S13, as substâncias S14 e S15 foram determinadas via CG/EM (Esquemas 22 e 23).



Esquema 22 – Purificação do extrato ZTCeJ, identificação dos n-alcenos e das substâncias **S10**, **S11** e **S13**



Esquema 23 – Purificação do extrato ZTCeJ, identificação dos n-alcenos e das substâncias **S10**, **S11**, **S13**, **S14** e **S15**

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS DOS ESPÉCIMES DE ZANTHOXYLUM**

As Figuras 25 a 27 apresentam as fórmulas estruturais das substâncias isoladas das três espécies de Zanthoxylum estudadas.

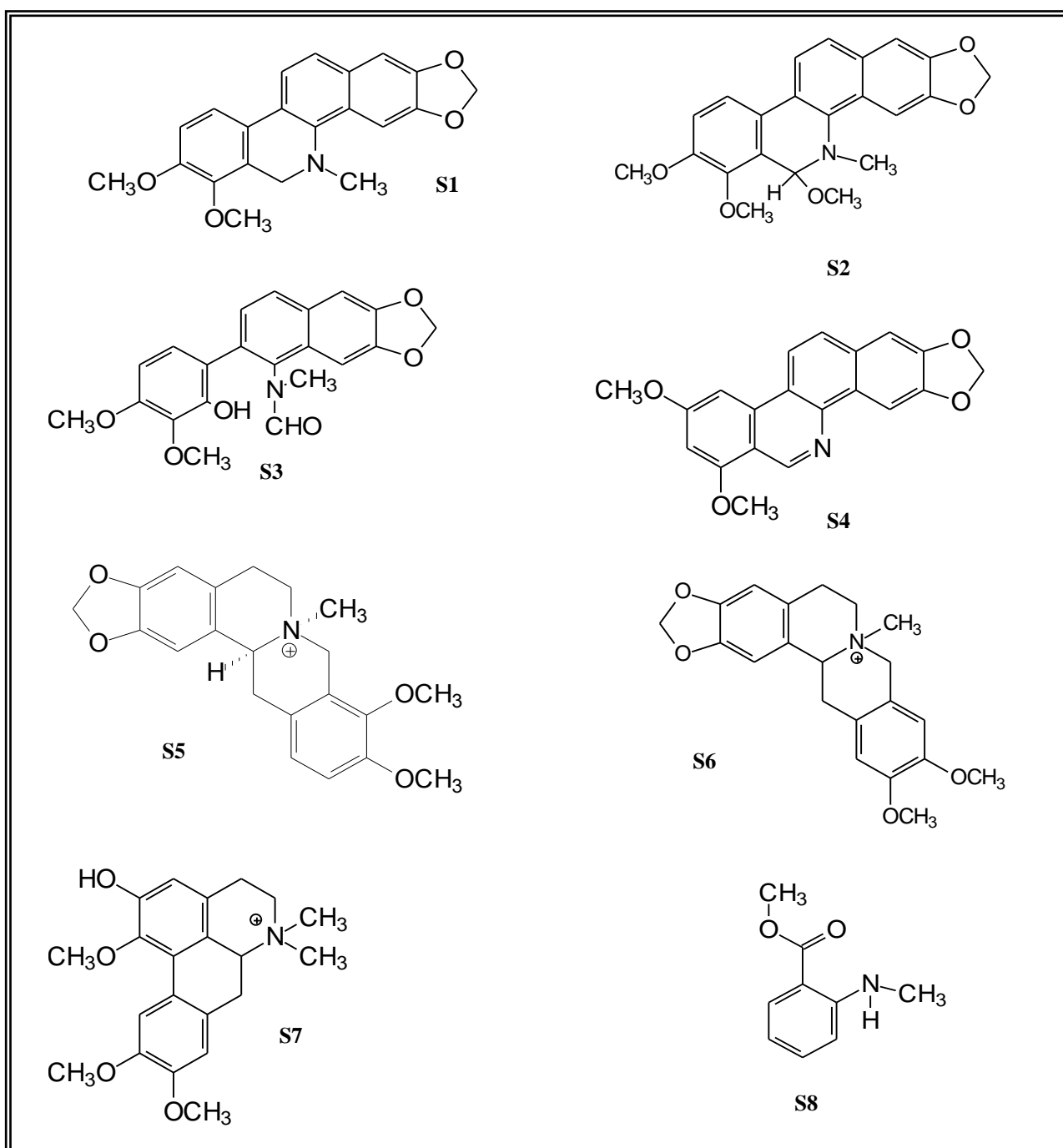


Figura 25 – Alcalóides isolados das cascas das raízes dos espécimes de Zanthoxylum estudados

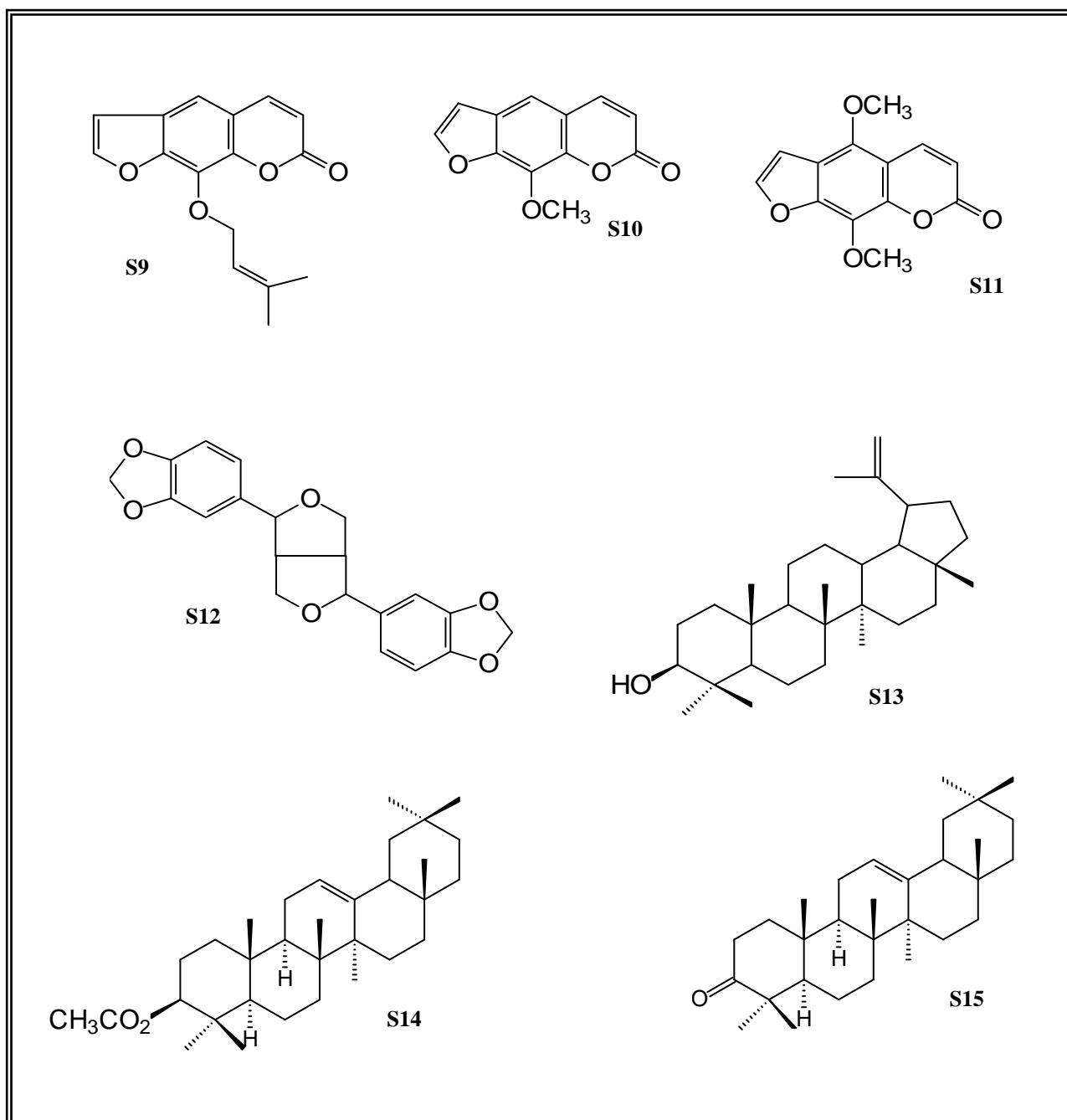
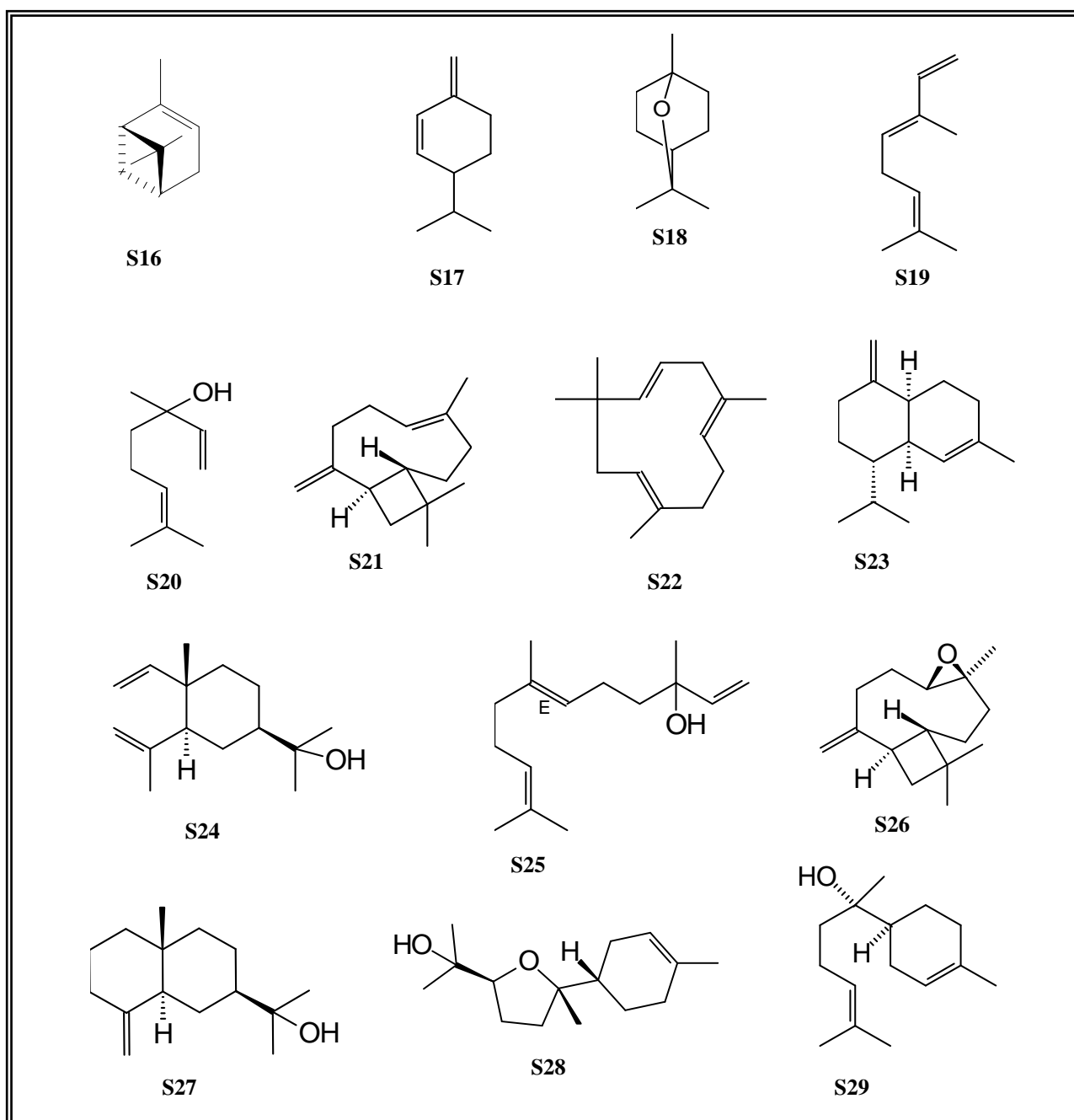


Figura 26 – Outros constituintes isolados dos espécimes de *Zanthoxylum* estudados





Figuras 27 - Constituintes químicos identificados no óleo volátil das folhas do espécime de *Zanthoxylum tingoassuiba* estudado

## **4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS DOS ESPÉCIMES DE ZANTHOXYLUM ESTUDADOS**

As identificações ou determinações das estruturas das substâncias isoladas das espécies de *Zanthoxylum* estudadas foram fundamentadas nas análises dos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais, Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (CG-IC), Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e análise dos dados de Infravermelho (IV). As comparações com os dados disponíveis na literatura também contribuíram enormemente para a determinação estrutural das substâncias isoladas.

Os dados físicos característicos ou relevantes, para a determinação estrutural das diversas substâncias, são apresentados no texto ao longo das identificações e proposições estruturais, os dados completos e a nomenclatura IUPAC das substâncias, obtidas através do programa SciFinder Scholar 2007 disponibilizado pela Faculdade Federal da Bahia serão apresentados no capítulo denominado ***Dados Espectroscópicos***.

O Quadro 5 mostra, resumidamente, a procedência das substâncias isoladas e identificadas a partir do estudo fitoquímico dos espécimes de *Zanthoxylum*. Os códigos das substâncias isoladas referem-se as estruturas das Figuras 25, 26 e 27 das páginas 116, 117 e 118 respectivamente.

Para tornar a discussão da determinação estrutural mais didática, as substâncias foram reunidas em grupos de acordo com as suas respectivas classes, independente da parte vegetal ou espécie das quais foram isoladas.

Espécie	Parte/Extrato	Substâncias isoladas
<b>Z. rhoifolium</b>	Casca da raiz / Hexânico	<b>S1, S2, S4, S9, S13</b>
<b>Z. stelligerum</b>	Casca da raiz / Hexânico	<b>S1, S3, S9, S12, S13</b>
<b>Z. tingoassuiba</b>	Casca da raiz / Hexânico	<b>S1, S3, S12, S13</b>
	Casca da raiz / Metanólico	<b>S3, S5, S6, S7, S13</b>
<i>Z. tingoassuiba</i>	Folhas Decocto	<b>S8, S10, S11</b>
	Folhas óleo volátil (hidrodestilação)	<b>S8, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31</b>
	Folhas óleo volátil (Fluido supercrítico)	<b>S8, S10</b>
	Cera Epicuticular	<b>S10, S11, S13, S14, S15 C29, C30, C31, C32, C33</b>

Quadro 5 – Local de isolamento dos metabólitos dos espécimes estudados

#### 4.2.1 ALCALÓIDES BENZOFENANTRIDINICOS

Estruturalmente os alcalóides benzo[c]fenantridínicos derivam do anel fenantrênico o qual é composto por três anéis aromáticos fundidos formando uma molécula angular.

Segundo Solomons (2000), este e outros compostos que possuem átomos de carbono geminados em anéis aromáticos pode ser classificados como hidrocarbonetos aromáticos benzenóides policíclicos.

Estes benzenóides policíclicos podem ter um de seus carbonos substituído por um heteroátomo, por exemplo, a substituição de um dos carbonos no anel fenantrênico por nitrogênio. Neste caso a International Union of Pure Applied Chemistry Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (IUPAC 1998)

recomenda que este anel seja chamado de fenantridina, e no caso de uma substituição em uma das faces da molécula a nomenclatura incluirá a letra que simboliza aquela face. Por exemplo, se um anel benzênico foi adicionado na face “c” da fenandridina o novo composto será chamado de benzo[c]fenantridinico e assim sucessivamente (Figura 28).

Os alcalóides benzo[c]fenantridínicos são estruturalmente definidos como sais metílicos quaternários **(a)** ou 7,8-diidroderivados **(b)** como apresentado na Figura 28.

O sistema de numeração da estrutura destes alcalóides não é consensual, como pode ser notado nas estruturas listadas no Quadro 4 das páginas 69 -71, onde a nomenclatura apresentada pelo autor é respeitada.

No presente trabalho o sistema de numeração baseado em considerações biogénéticas **(b)**, sugeridas por Krane e colaboradores (1984) e Seigler, (1998), foi o adotado. Outros padrões de numerações, os quais, também são muito utilizados estão representados na estruturas **(c)** (DECAUDAIN et al., 1974) e **(d)** (NG et al., 1987).

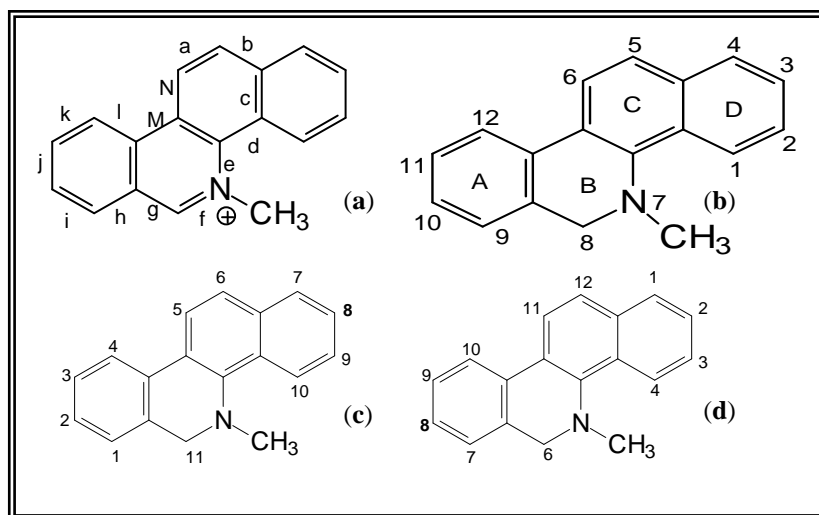


Figura 28 – Numeração do esqueleto básico dos alcalóides benzofenanthridínicos

Os alcalóides benzo[c]fenantridínicos apresentam um padrão de substituição comum. Em geral, nas posições 2, 3 para o anel D e 9, 10 ou 10, 11 no anel A (Figura 29). Os substituintes podem ser: hidroxila, metoxila ou dioximetileno (MESTER, 1983).

Este padrão de substituição para o anel A leva a formação de pares isoméricos (Figura 30) que são comuns nos alcalóides benzilisoquinolínicos e que contribuem para a sua determinação estrutural (ISHII & ISHIKAWA, 1976).

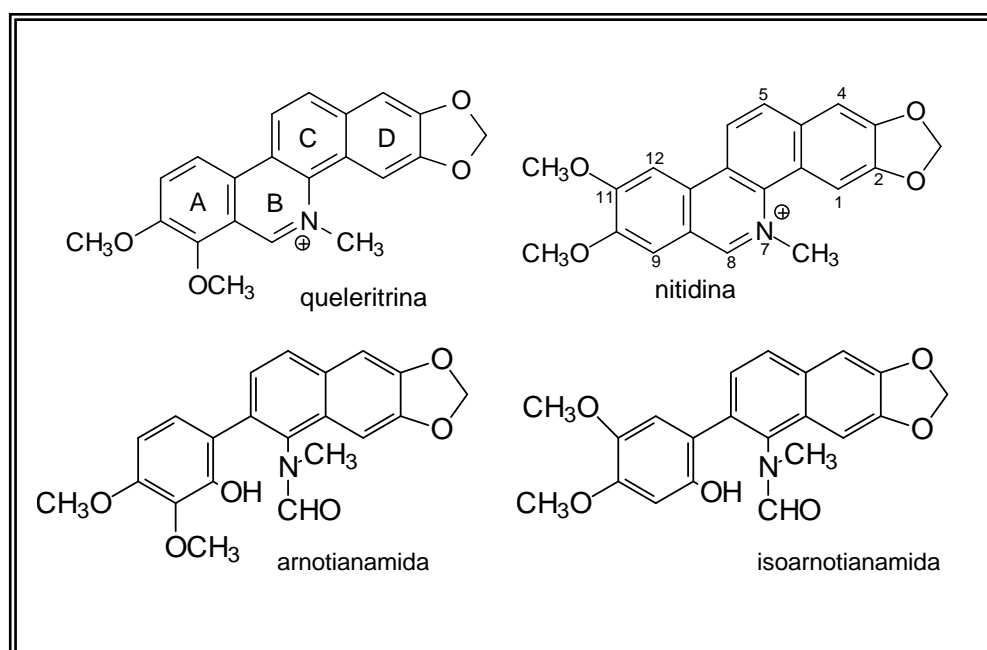


Figura 29 – Padrões de substituições para os alcalóides benzofenanthridínicos

Os dados de RMN <sup>1</sup>H encontrados na literatura apresentam dois padrões característicos, que são: 1 – quando as moléculas são substituídas no anel D nas posições 2, 3 e para o anel A nas posições 9, 10, os espectros de RMN <sup>1</sup>H apresentam três simpletos e quatro dupletos com constante de acoplamento orto - e para os 2, 3 (anel D) e 10, 11 (anel A) - dois dupletos com constante de acoplamento orto e cinco simpletos - indicando que há quatro prótons aromáticos todos em posição para em dois anéis tetra substituídos, considerando a posição 8 não substituída.

Alcalóides com substituintes em 12 e 5, derivados 8-alkilados e alcalóides benzofenantridínicos diméricos também já tem sido reportados na literatura (MESTER, 1983; KRANE et al., 1984; SHARMA et al., 1981).

Muitos diidroderivados (Figura 28, b) são adicionalmente oxigenados na posição 8 devido a reatividade do grupamento iminium, o que levou alguns autores a considerarem que moléculas destes tipo não seriam produtos naturais autênticos e sim artefatos (KRANE et al., 1984).

Para Ishii & Ishikawa (1976) os alcalóides oxigenados na posição 8 arnotianamida e isoarnotianamida apresentados na Figura 29 os quais foram isolados por eles das cascas de *Xanthoxylum cuspidatum* Champ. (Rutaceae) são autênticos produtos naturais, e estes pesquisadores sustentam esta teoria baseado na reação química realizada pela mesma equipe, onde, há conversão química dos alcalóides benzo[c]fenantridínicos queleritrina e nitidina através da nova reação de oxidação tipo Baeyer-Villiger do grupamento iminium com formação dos respectivos alcalóides, arnotianamida e isoarnotianamida .

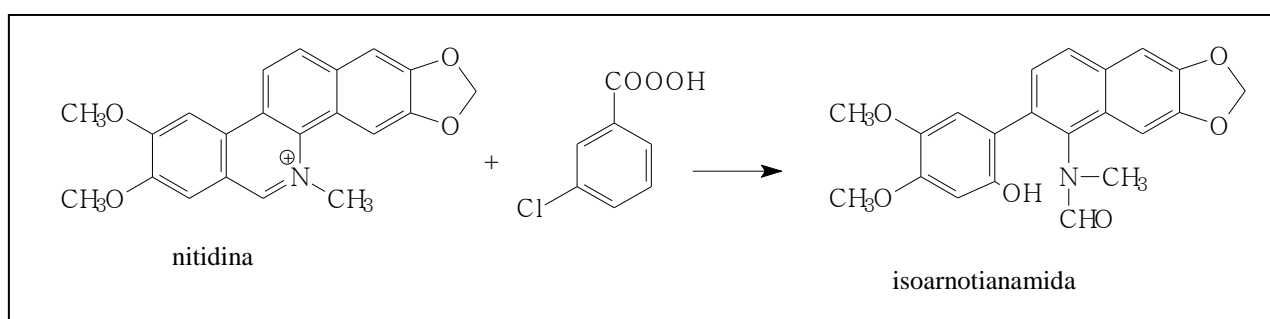


Figura 30 – Representação da obtenção da isoarnotianamida em laboratório

O conhecimento da existência das enzimas Baeyer-Villiger monooxigenase, produzidas por diversos microorganismos, as quais utilizando NADPH e oxigênio molecular catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em uma ligação carbono-carbono, ajudam na sustentabilidade da teoria de que produtos como a arnotiamina (Figura 29) podem ser sintetizados pelas plantas (MALIATO et al., 2004).

#### 4.2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S1**

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 31 e 32) da substância **S1** isolada da casca da raiz de todas as espécies estudadas, apresentou na região de campo baixo, dois simpletos ambos referentes a um hidrogênio e quatro dupletos referentes a hidrogênios aromáticos tipo AB, todos com constante de acoplamento  $J = 8,4$  Hz, indicando a presença de hidrogênios em posição *orto*, condizente com o padrão de substituição 2,3 e 9,10 dos alcalóides benzo[c]fenantridínicos, como apresentado anteriormente.

O simpleto em  $\delta 6,05$  (Figura 31) que integra para dois hidrogênios sugere a presença de um dioximetileno e os sinais em  $\delta 3,93$  e  $\delta 3,88$  indicam a presença de dois grupamentos metoxílicos ligados a um anel aromático.

O simpleto em  $\delta 2,63$  que integra para três hidrogênios juntamente com o resultado positivo do teste com o reativo de Dragendorff, indicam, a presença de um grupamento metílico ligado a nitrogênio.

A presença de um simpleto em  $\delta 4,33$  que integra para dois hidrogênios sugere a existência de um grupamento metilênico.

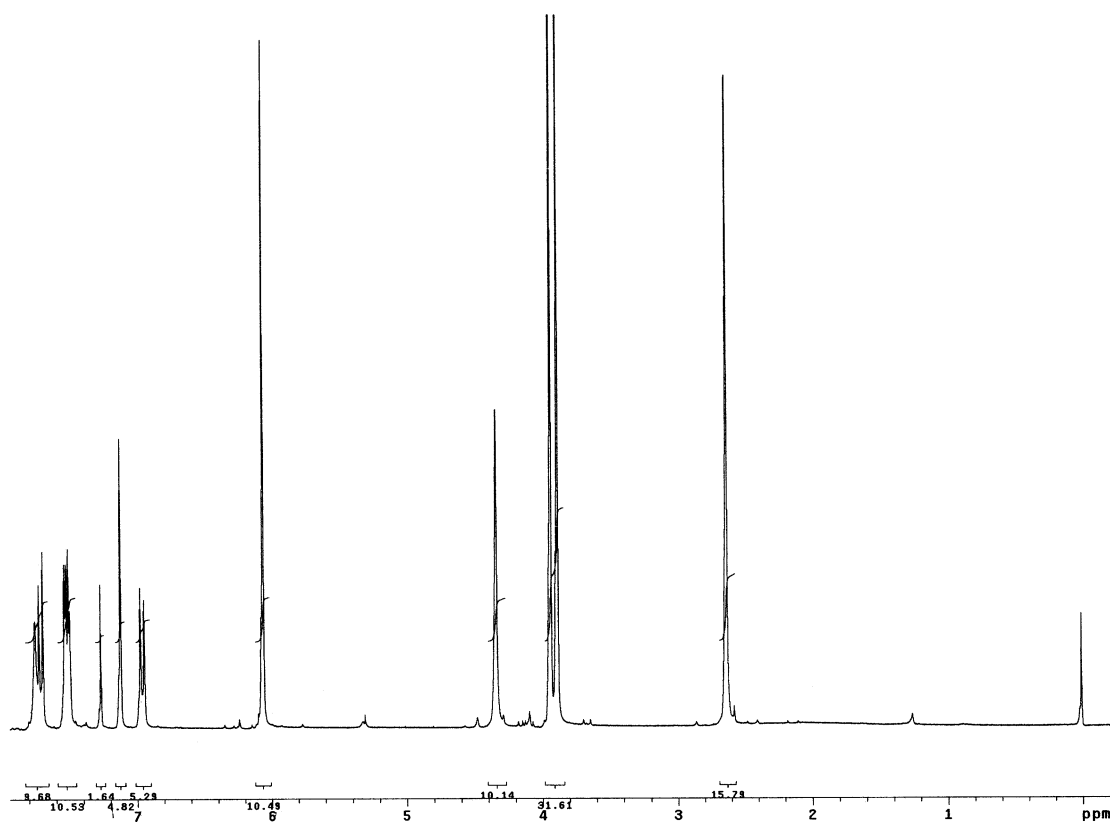


Figura 31 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S1**

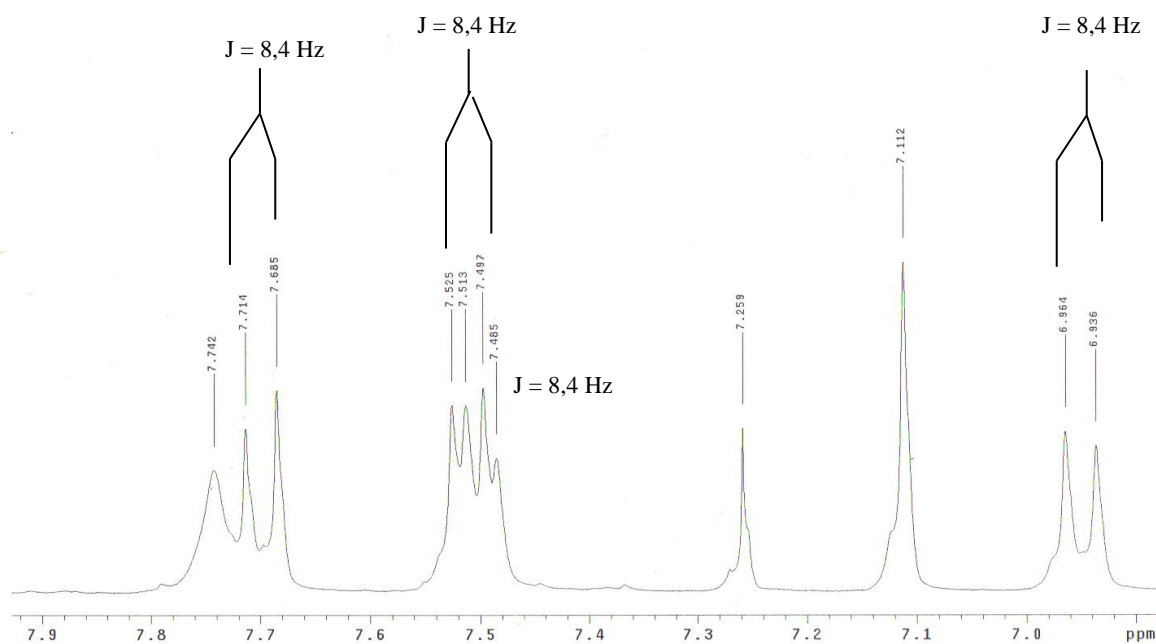


Figura 32 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S1**



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 33) apresentou dezessete sinais a cima de 100 ppm e quatro sinais entre 60 e 40 ppm.

A confirmação da presença de um grupamento dioximetilênico sugerida pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 31, p. 125) para a estrutura de S1 é feita através da presença de um sinal em torno de 100 (+/-) 5 ppm (KRANE et al., 1984).

Neste espectro, a presença dos sinais em 101,0 e 100,6 ppm dificultou a atribuição.

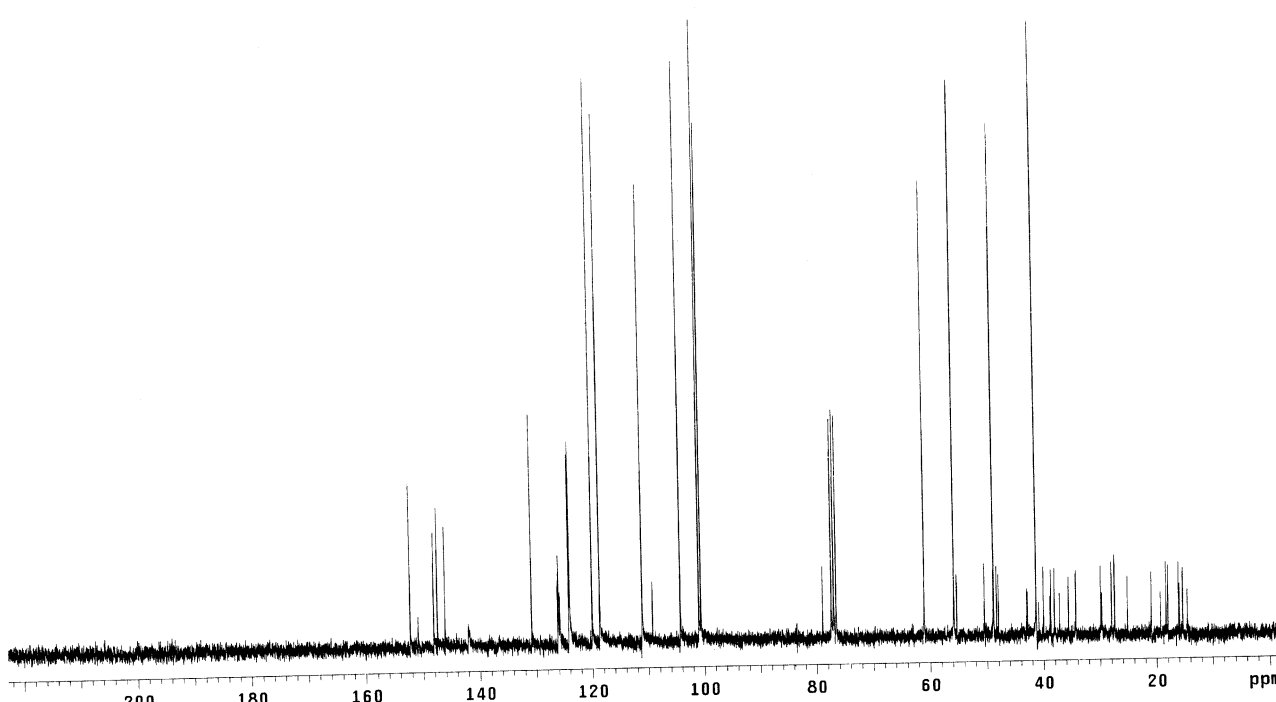


Figura 33 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S1**

Este problema foi solucionado através da análise do espectro de DEPT  $135^\circ$  (Figura 34) o qual indica somente a presença de dois grupamentos metilênicos na estrutura um em  $\delta$  101,0, o qual contribui para a confirmação de um grupamento dioximetilênico e o outro em  $\delta$  48,8 o qual sugere que este grupamento esteja ligado ao átomo de nitrogênio.

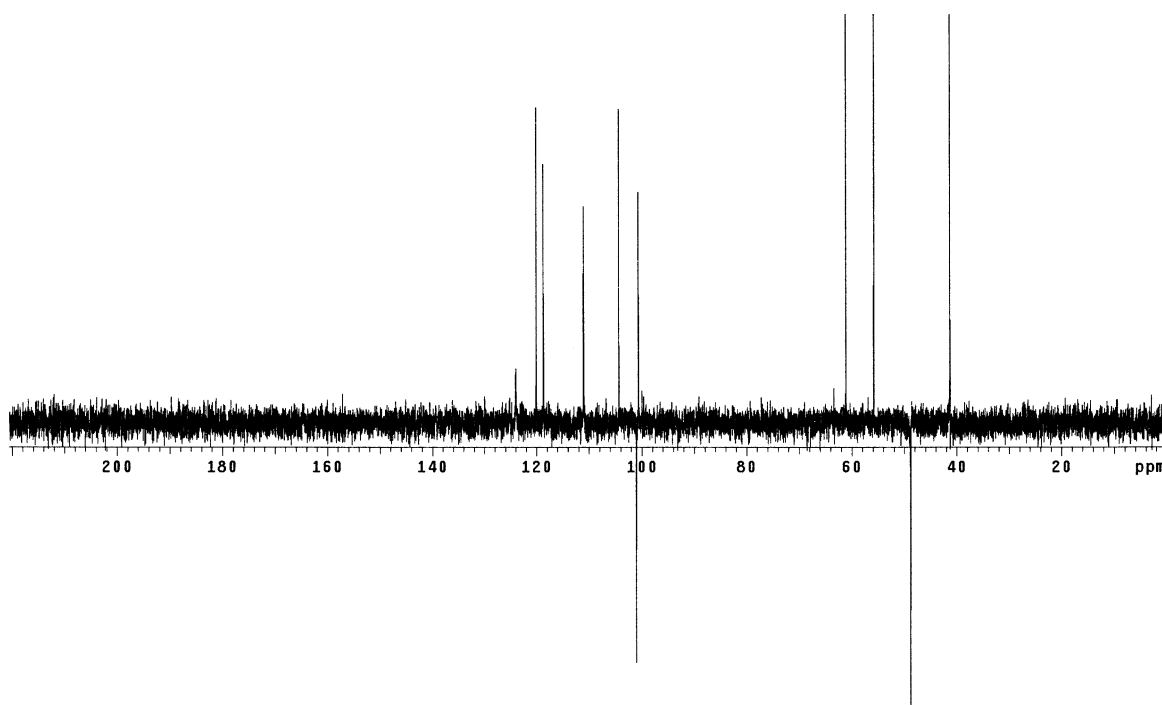


Figura 34 – Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S1**

Além dos experimentos descritos, também foi realizado com esta amostra o experimento de duas dimensões “Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quântica” HMQC (Figuras 35 e 36) o qual apresenta uma correlação entre os experimentos de <sup>13</sup>C (Figura 33) e <sup>1</sup>H (Figura 31) permitindo uma associação entre os carbonos e os prótons ligados a estes. Este experimento também foi de grande ajuda para a identificação de S1.

Considerando S1 como um alcalóide benzofenantridínico, a Tabela 2, página 129, apresenta as correlações heteronucleares que puderam ser feitas com segurança, a correlação completa foi feita com a ajuda da literatura e está apresentada no Capítulo 6.

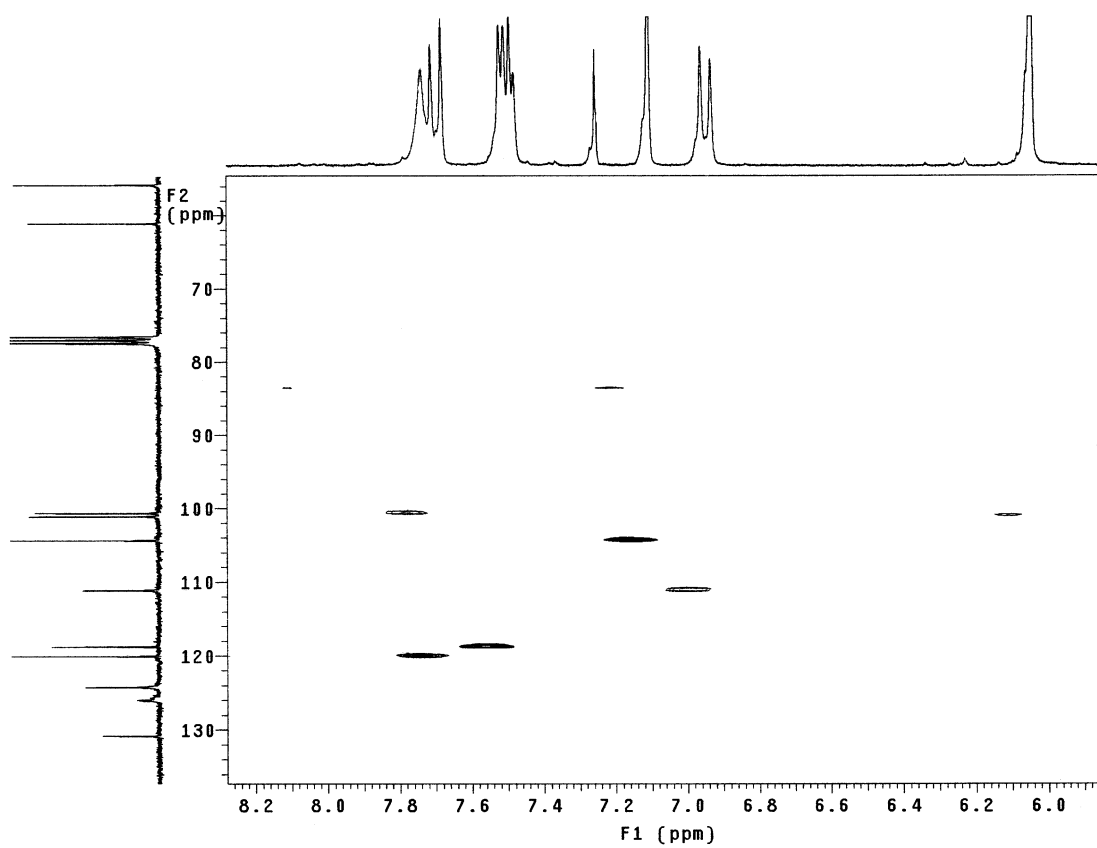


Figura 35 – Espectro de HMQC [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S1**

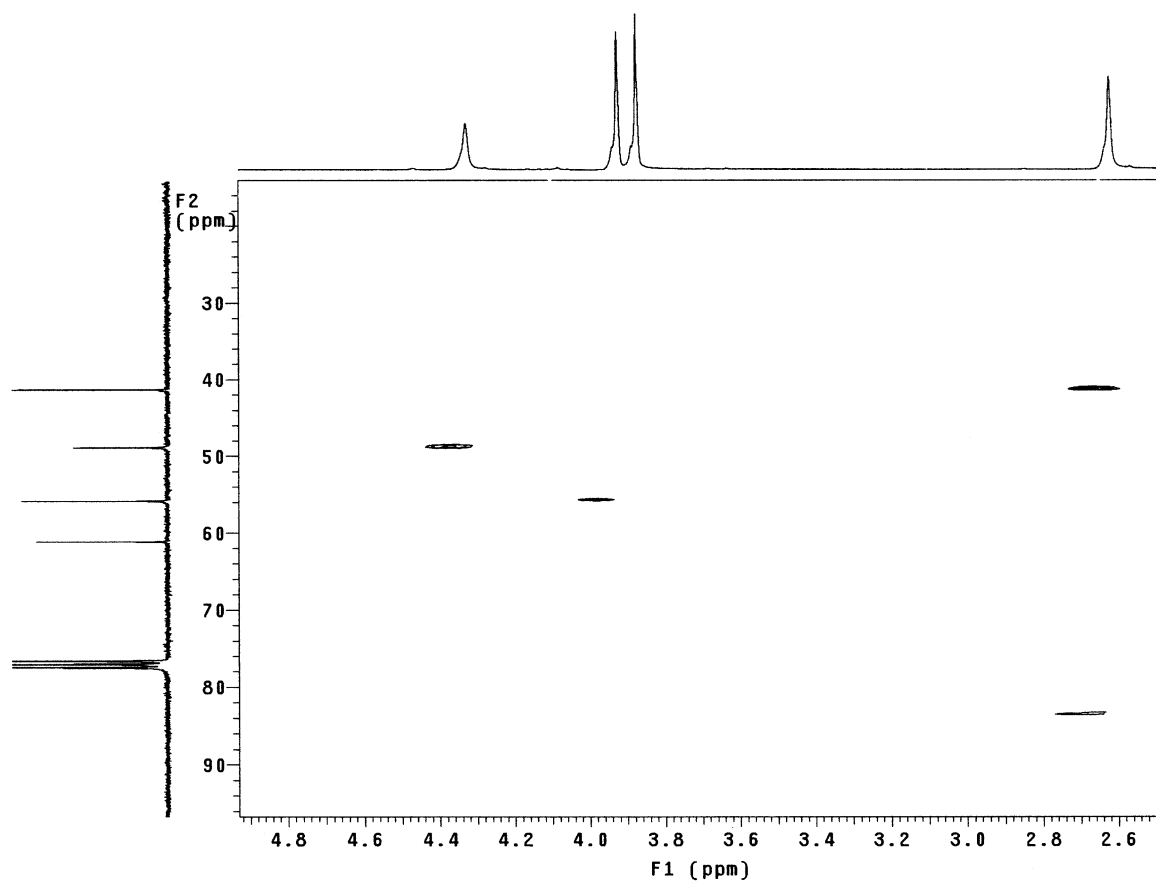


Figura 36 – Espectro de HMQC expandido [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S1**

Tabela 2 – Dados de HMQC da Substância S1

Deslocamento Químico do Hidrogênio correlacionado	Deslocamento Químico do Carbono	Carbono
6,94 (d, J=8,4 Hz, 1H)	111,1	C5 ou C6 ou C11 ou C12
7,10 (s, 1H)	104,3	C1 ou C4
7,69(d, J=8,4 Hz, 1H)	120,0	C5 ou C6 ou C11 ou C12
7,73 (s, 1H)	100,6	C1 ou C4
4,33 (s, 2H)	48,8	C8
3,94 (s, 3H)	55,8	OCH <sub>3</sub>
2,68 (s, 3H)	41,2	N-CH <sub>3</sub>
6,05 (s, 2H)	101,0	-OCH <sub>2</sub> O-

O espectro de massas de baixa resolução (Figura 37), da substância S1 apresentou o pico relativo ao íon molecular e pico base  $m/z$  349 compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, a biblioteca de espectros “Mass Spectral Library 1.6”, sugere com um índice de 97,3% de confiança que S1 é um alcalóide benzofenantridínico.

A análise dos dados obtidos, e a comparação com dados descritos na literatura (KRANE et al., 1984; NG et al., 1987) levam a propor que a substância S1 seja o alcalóide benzofenantridínico conhecido como diidroquelitrina Figura 38.

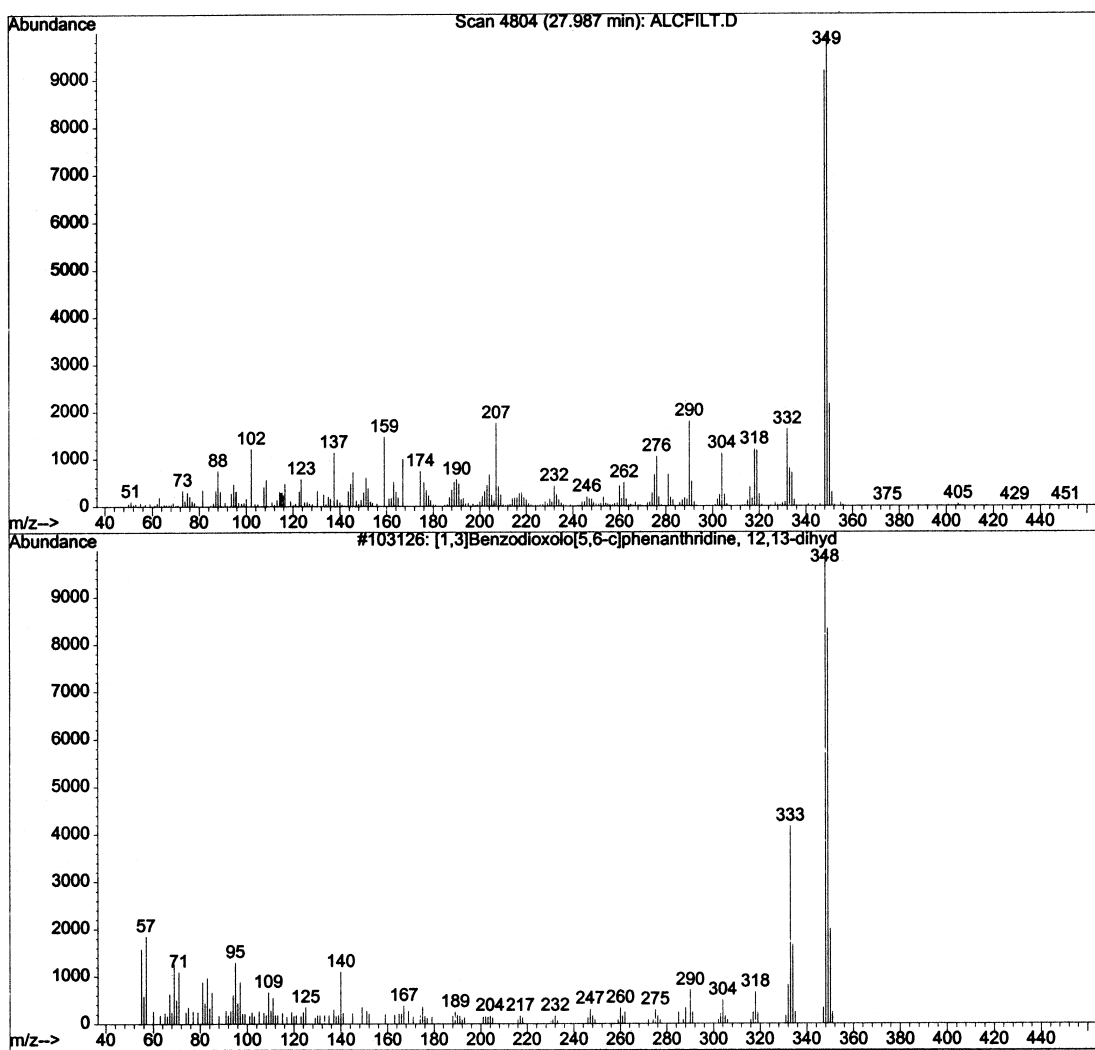


Figura 37 – Espectro de Massas (70 eV) de **S1**

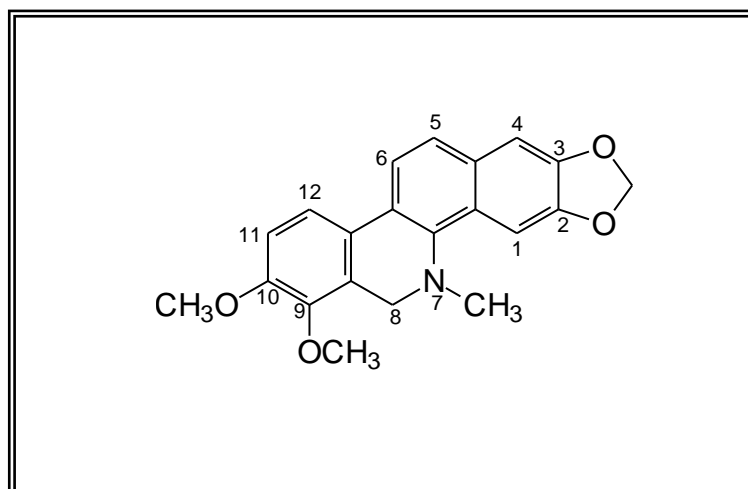


Figura 38 – Estrutura da diidroqueleritina **S1**

#### 4.2.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S2**

A substância **S2** foi isolada apenas da casca da raiz de *Z. rhoifolium* como descrito no Esquema 4 da página 61.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39), desta substância apresentou um padrão bastante parecido com o da substância anterior, no que diz respeito aos sinais em campo baixo, dois pares de dupletos  $\delta$  7,46;  $\delta$  7,75 e  $\delta$  7,03;  $\delta$  7,60 todos com integração para um hidrogênio e com constante de acoplamento *orto*. Dois simpletos que integram para um hidrogênio cada, localizados em  $\delta$  7,71 e  $\delta$  7,13 os quais podem ser relacionados aos hidrogênios do anel D (Figura 28, p. 121) e um simpleto em 6,07 ppm que integra para dois hidrogênios o qual sugere a presença de um dioximetileno também nesta substância.

Neste espectro a falta do sinal em 4,34 ppm o qual foi relacionado ao  $\text{CH}_2$  em C8 e o surgimento do sinal em  $\delta$  5,56 que integra para um hidrogênio e o aparecimento de mais um simpleto totalizando quatro simpletos que integram para três hidrogênios na região entre 4 –2 ppm, releva que a diferença entre as duas moléculas é a substituição de um dos hidrogênios do carbono 8 por uma metoxila.

Os outros sinais de menor intensidade que podem ser visto neste espectro podem ser relacionados com substâncias de natureza lipídica representada principalmente pelo sinal em 1,2 ppm.

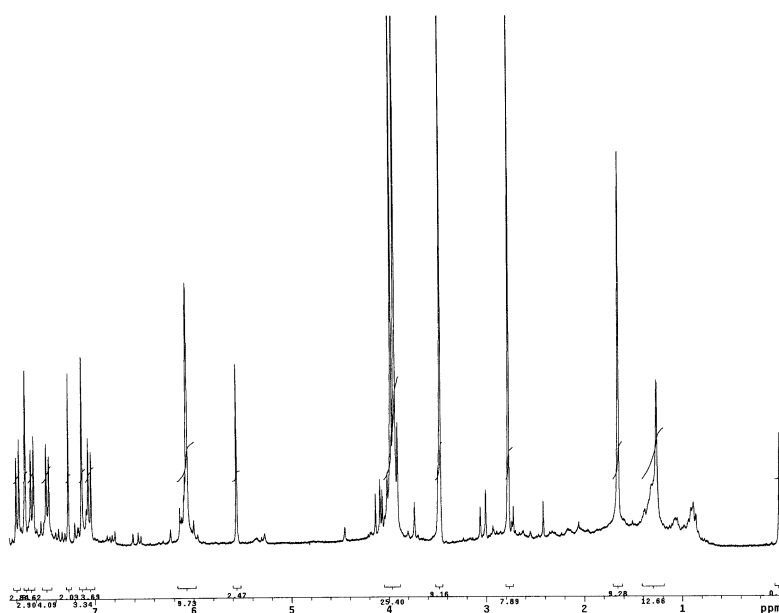


Figura 39 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S2** substância

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 40) apresentou vinte e dois sinais condizentes com a estrutura pentacíclica dos alcalóides benzofenantridínicos, um a mais que a estrutura anterior e apenas dois sinais significativamente diferentes, um sinal em  $\delta$  86,0 o qual pode ser atribuído ao carbono 8, que nesta estrutura encontra-se mais desprotegido devido a presença da metoxila e o outro sinal em  $\delta$  53,9 atribuível a uma metoxila.

A análise deste espectro corrobora com os dados levantados através da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39), o qual sugere a substituição de um dos hidrogênios metilênicos em C8 por uma metoxila.

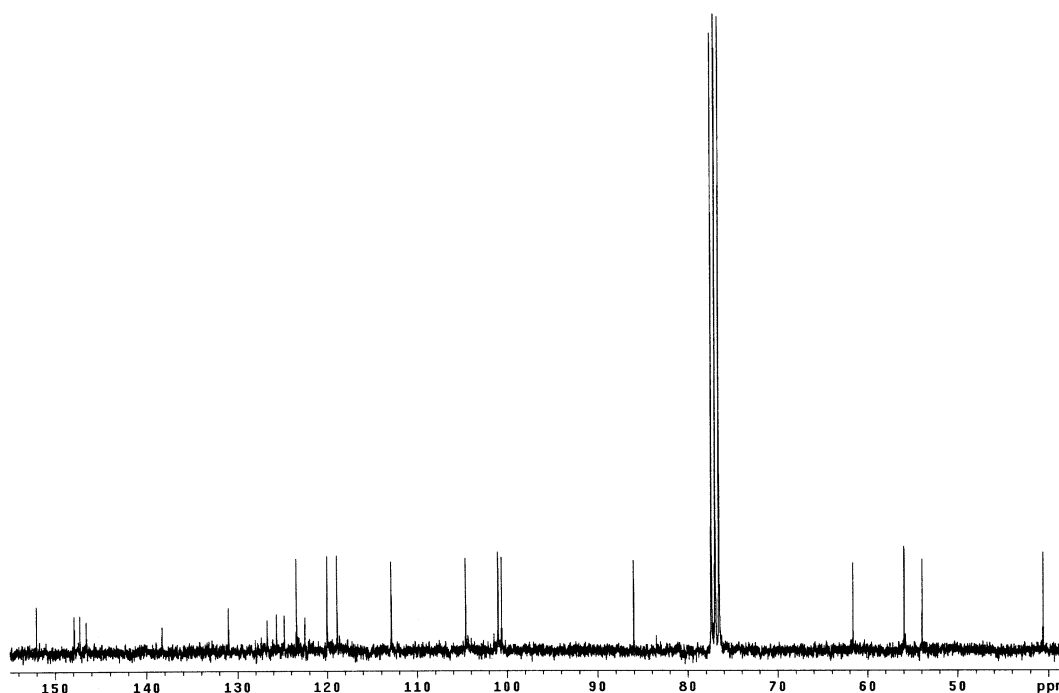


Figura 40 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S2**

A análise dos dados obtidos, a comparação com a literatura (KRANE et al., 1984), indicam que a substância **S2** seja o alcalóide natural conhecido como angolina (Figura 41).

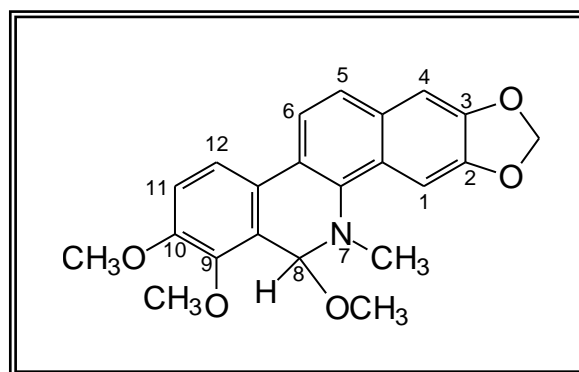


Figura 41 – Estrutura da angolina **S2**

#### 4.2.1.3 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S3**

A substância **S3** foi isolada do extrato hexânico da casca da raiz de *Z. stelligerum* (Esquema 6, p. 89) e dos extratos hexânico e metanólico da casca da raiz de *Z. tingoassuiba* (Esquema 12, p. 92 e Esquema 14, p. 100) mas sempre em pouca quantidade.

Esta substância foi submetida a uma análise de RMN <sup>1</sup>H e seu espectro (Figura 42) apresentou, assim como as substâncias anteriores, dois pares de dupletos 7,32; 7,74 e 6,81; 6,55 também com constante de acoplamento que indica acoplamento *orto* e dois simpletos (Figura 43) os quais sugerem tratar-se também de um alcalóide benzofenantridínico 9,10-disubstituído, assim como as substâncias **S1** e **S2**.

A diferença deste espectro em relação aos anteriores é a presença de um simpleto em  $\delta$  8,10 integrando para um hidrogênio e um simpleto com integral equivalente a três hidrogênios em  $\delta$  2,99 mais protegida que os N-CH<sub>3</sub> anteriormente apresentados, indicando mais uma vez uma alteração da molécula na posição 8.



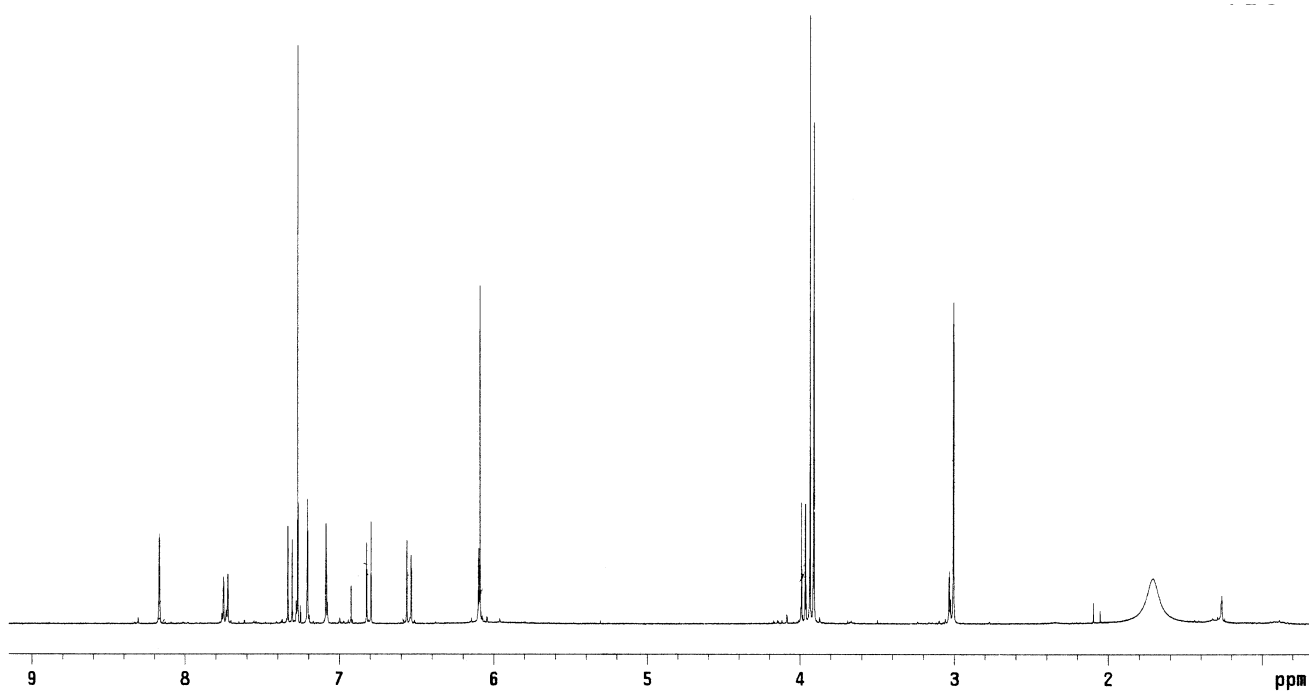


Figura 42 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S3**

O espectro expandido da região aromática (Figura 42) revela a multiplicidade e a integração dos sinais para esta estrutura.

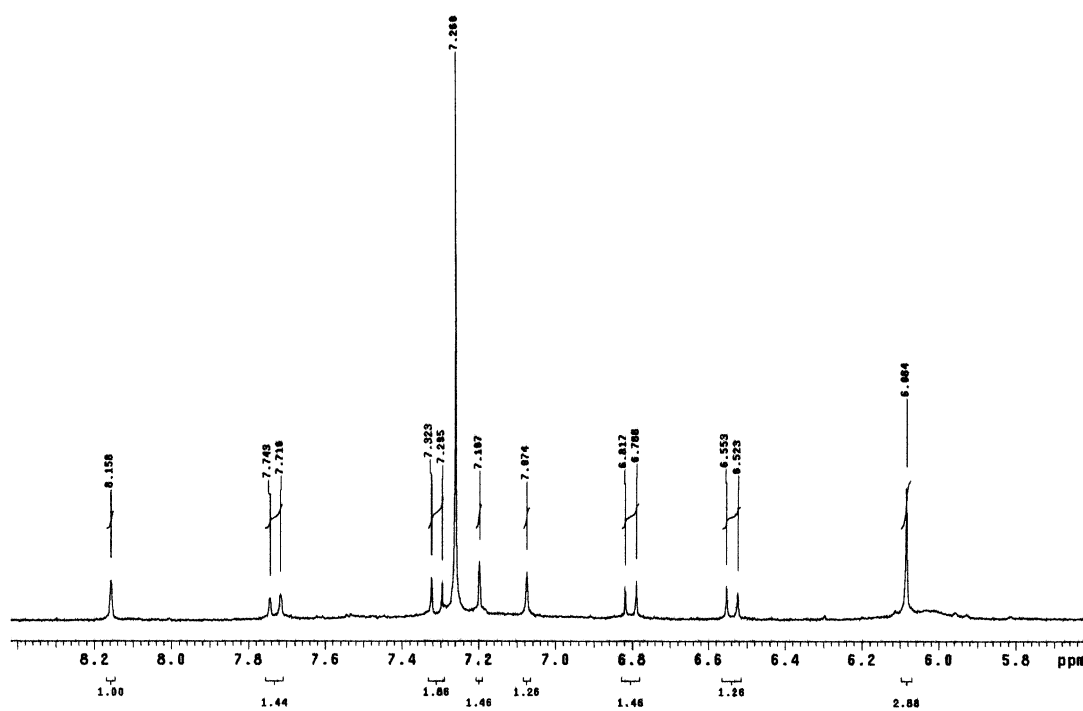


Figura 43 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S3**

Para entender a modificação desta parte da estrutura a análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi importante. A pesar da pouca quantidade de amostra ter levado ao não aparecimento dos sinais dos carbonos totalmente substituídos os outros sinais estão condizentes com a literatura como apresentado na Tabela 4.

Tabela 3 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância **S3** e da arnotianamida

Carbonos	<b>S3</b>	KRANE et al., 1984
1	7,20 (s, 1H)	7,28 (s, 1H)
4	7,07 (s, 1H)	7,03 (s, 1H)
5	7,32 (d, J=8,1 Hz, 1H)	7,36 (d, J=8,5 Hz, 1H)
6	7,74 (d, J=8,1 Hz, 1H)	7,87 (d, J=8,5 Hz, 1H)
8	8,16 (s, 1H)	8,50 (s, 1H)
11	6,81 (d, J=8,1 Hz, 1H)	6,81 (d, J=8,5 Hz, 1H)
12	6,55 (d, J=8,1 Hz, 1H)	6,55 (d, J=8,1 Hz, 1H)
-OCH <sub>2</sub> O- (2,3)	6,08 (s, 2H)	6,09 (s, 2H)
OCH <sub>3</sub> (9 e 10)	3,90 e 3,92 (s, 6H)	4,04 e 4,09 (s, 6H)
N-CH <sub>3</sub>	2,99	3,27 (s, 3H)

Tabela 4 – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **S3** e da arnotianamida

Carbono	<b>S3</b>	HSIAO & CHIANG, 1995
1	99,5	98,6
2	-	148,9
3	-	147,8
4	104,6	104,1
5	125,3	126,9
6	127,6	127,6
8	164,8	163,2
8a	-	147,6
9	-	136,2
10	-	152,4
11	104,2	103,1
12	-	124,7
12a	-	119,8
13	-	134,3
14	-	135,3
14a	127,7	128,0
-OCH <sub>2</sub> O- (2,3)	101,7	101,6
OCH <sub>3</sub> (3')	61,4	60,3
OCH <sub>3</sub> (4')	56,1	55,6
N-CH <sub>3</sub>	32,2	32,7

A análise dos dados e comparação com a literatura (ISHII & ISHIKAWA, 1976; KRANE et al, 1984; HSIAO & CHIANG, 1995), e a comprovação da existência de enzimas Baeyer-Villiger monooxigenase, produzidas por diversos microorganismos indicam que a substância **S3** seja o alcalóide benzofenantridínico arnotianamida (Figura 44).

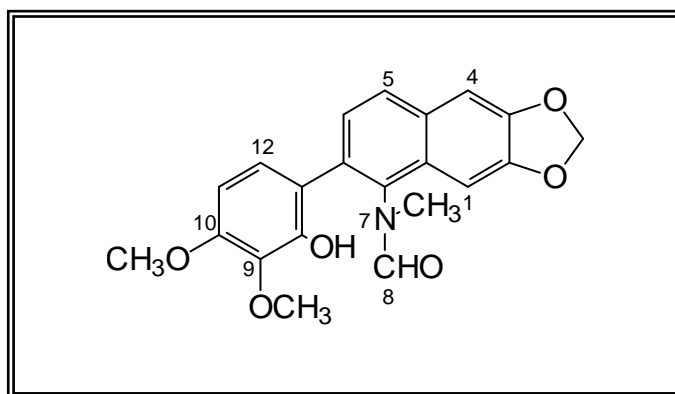


Figura 44 – Estrutura da arnotianamida **S3**

#### 4.2.1.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S4**

A substância **S4** foi isolada apenas da casca da raiz de *Z. rhoifolium* como descrito no Esquema 4 da página 86.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  desta substância (Figura 45) também é composto por dois pares de dupletos, só que neste caso um dos pares possui constante *orto* e o outro constante em *meta* (Tabela 4), sugerindo que os dois simpletos 4,14 e 4,07 ppm que integram para três hidrogênios cada, os quais podem ser atribuídos a duas metoxilas, estejam nas posições 9 e 11.

Estes dados levam a classificar esta substância como um alcalóide benzofenantridínico 9,11-disubstituído

Outro sinal muito importante é um simpleto que integra para um hidrogênio em  $\delta$  9,77 o qual pode ser atribuído ao hidrogênio em C8 que se desloca para campo baixo, quando esta posição (C8), encontra-se insaturada (KRANE et al., 1984).

A completa aromatização da molécula e a presença do nitrogênio inícnico influenciam no deslocamento de todos os hidrogênios da molécula levando-os para campo baixo como pode ser notada na Tabela 3 da página 130.

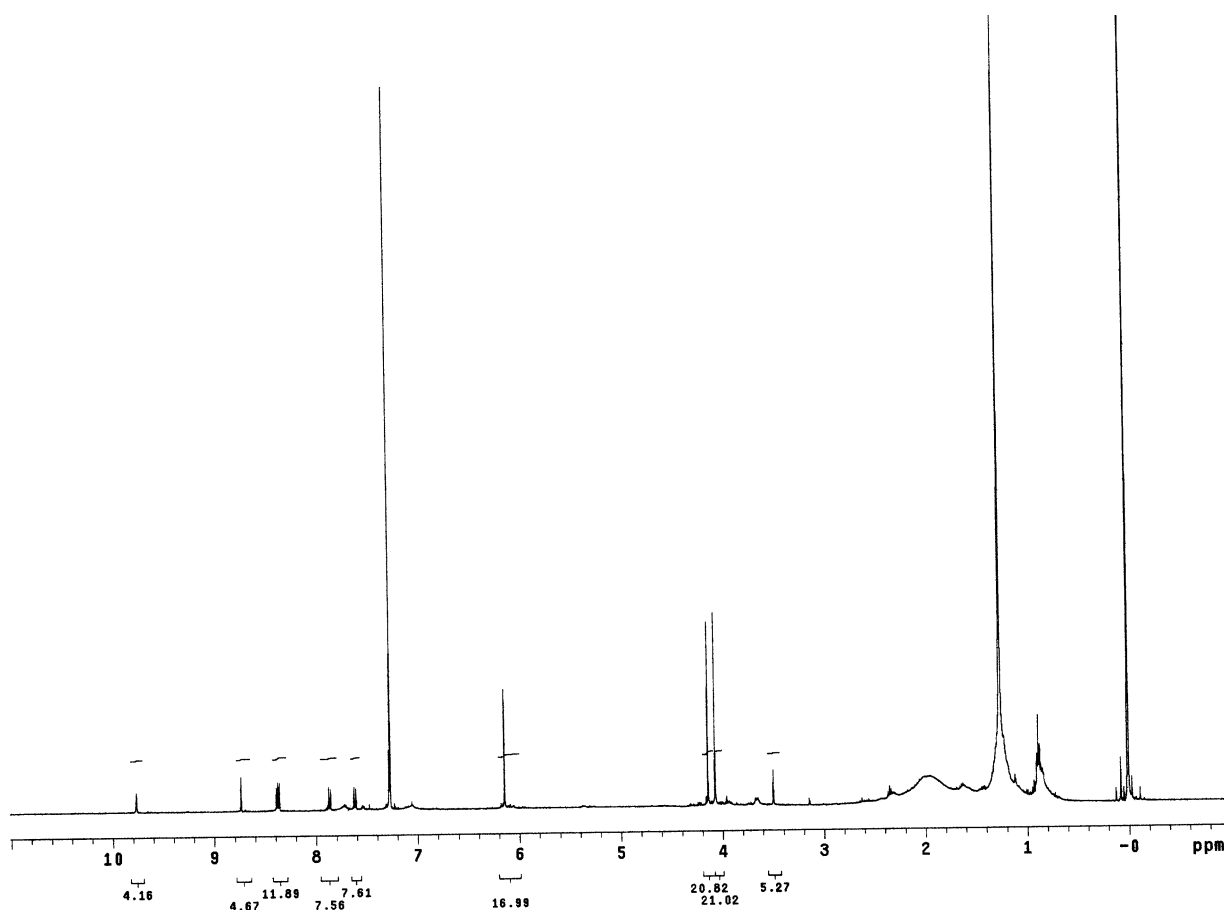


Figura 45 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S4**

Como dito anteriormente os padrões de substituição mais freqüente são o 9,10 e o 10,11-disubstituído, sendo raro o alcalóide 9,11-disubstituído (SUKARI et al., 1999).

Sukari e colaboradores (1999) relataram pela primeira vez o isolamento do alcalóide benzofenantridínico denominados por eles de 7,9-dimetoxi-2,3-metilenodioxibenzofenantridina, a análise deste artigo demonstra que o sistema de numeração não foi o mesmo adotado para a apresentação do presente trabalho (Figura 46).

Esta substância foi isolada da casca do caule de *Zanthoxylum myriacanthum* Wall, coletada na Malásia, e possui valores de deslocamento químico de RMN  $^1\text{H}$  compatíveis com os apresentados para a substância S4 (Tabela 4).

Fazendo-se a nomenclatura utilizando uma numeração biogenética, esta substância pode ser chamada de 9,11-dimetoxi-2,3-dioximetilenobenzofenantridina ou simplesmente pseudo-norqueleritrina, dada a semelhança com a norqueleritrina (Figura 46).

É importante relatar que até o momento, nenhum outro registro foi encontrado quando realizadas pesquisas nas bases de dados utilizando como palavra chave a nomenclatura sugerida por Sukari e colaboradores (1999), e a adotada neste trabalho.

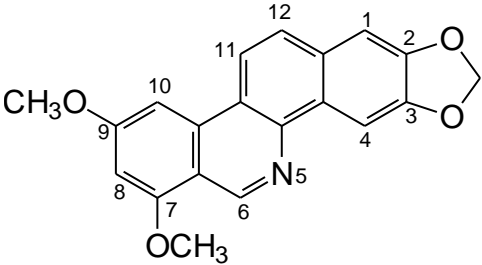
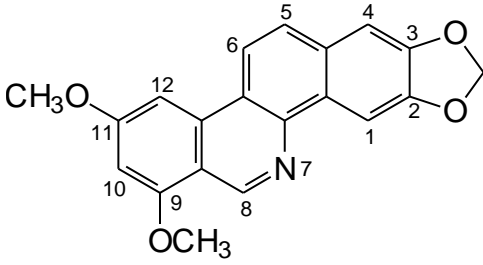
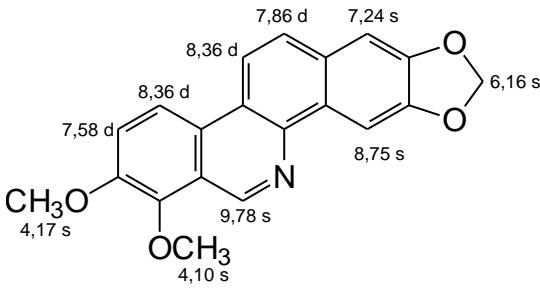
SUKARI et. all., 1999	Nova Proposta de Nomenclatura
<p data-bbox="220 819 852 853">7,9-dimetoxi-2,3-metilenodioxibenzofenantridina</p> 	<p data-bbox="970 819 1241 853"><b>Pseudo-norqueleritrina</b></p> 
<p data-bbox="655 1290 954 1323">KRANE et. all.. 1984</p>	
<p data-bbox="727 1384 906 1417">Norqueleritrina</p> 	
<p data-bbox="411 1850 1166 1883">Figura 46 – Proposta de nova nomenclatura para <b>S4</b></p>	

Tabela 5 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância **S4** e da 7,9-dimetoxi-2,3-dioximetilenobenzofenantridina com atribuição relacionada a numeração individual (Figura 46)

Carbono	SUKARI, 1999	Carbono	S4
1	7,27 (s, 1H)	1	8,74(s, 1H)
4	8,73 (s, 1H)	4	7,28(s, 1H)
6	9,75 (s, 1H)	5	7,62(d, J = 5,4 Hz, 1H)
8	8,39 (d, J = 2,9 Hz, 1H)	6	7,87(d, J = 5,4 Hz, 1H)
10	8,35 (d, J = 3,4 Hz, 1H)	8	9,77(s, 1H)
11	7,86 (d, J = 8,8 Hz, 1H)	10	8,38(d, J = 3,6 Hz, 1H)
12	7,60 (d, J = 8,8 Hz, 1H)	12	8,37(d, J = 3,6 Hz, 1H)
-OCH <sub>2</sub> O-	6,14 (s, 2H)	-OCH <sub>2</sub> O-	6,15 (s, 2H)
OCH <sub>3</sub>	4,13 (s, 3H)	OCH <sub>3</sub>	4,14 (s, 3H)
OCH <sub>3</sub>	4,06 (s, 3H)	OCH <sub>3</sub>	4,07 (s, 3H)

É importante salientar que os valores apresentados na Tabela5 obedecem a numeração apresentada na Figura 46.

A expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 47), tem o objetivo principal de demonstrar a presença do sinal em 7,28 ppm que na Figura 45. página 138 não é notada.

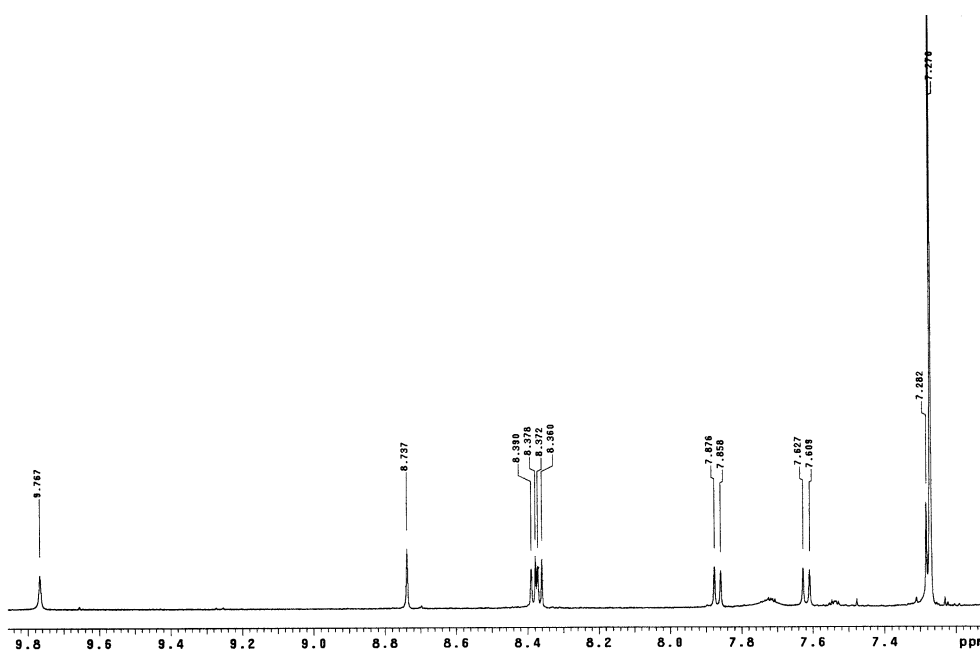


Figura 47 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S4**

Apesar da substância 7,9-dimetoxi-2,3-metilenodioxibenzofenantridina ser relatada por Sukari e colaboradores (1999), como uma nova substância os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  são apresentados com poucas atribuições aos respectivos carbonos.

Neste trabalho, apesar da pouca quantidade de amostra, os espectros RMN 2D (Figura 48 e 49) contribuem para a atribuição de alguns sinais e estão apresentados na Tabela 6.

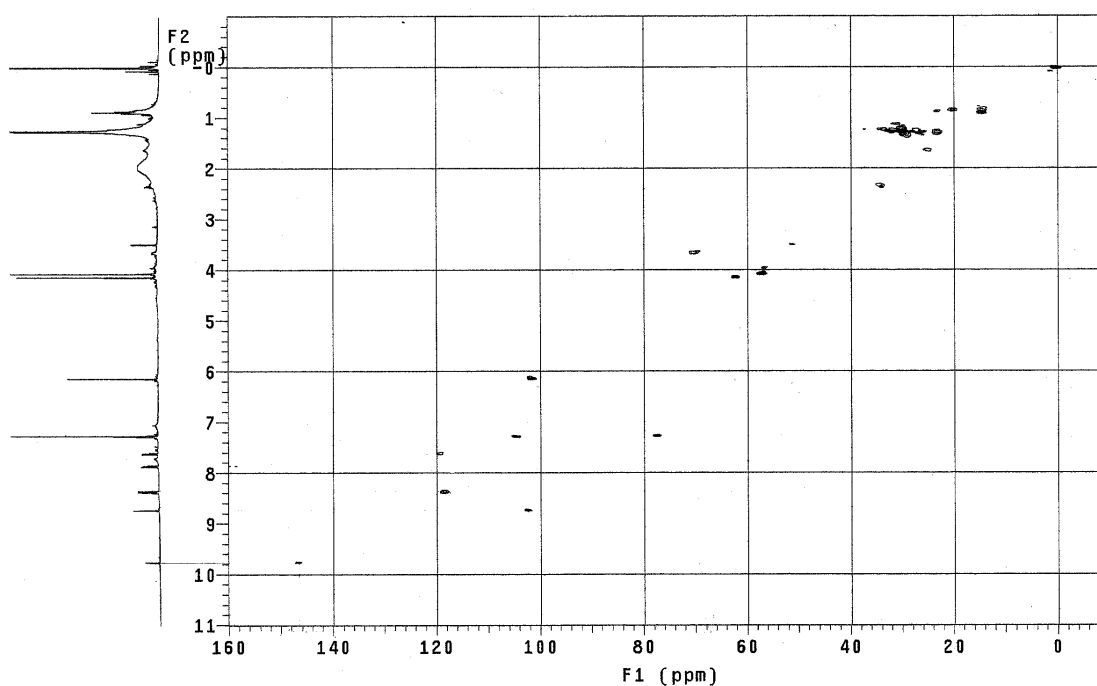


Figura 48 – Espectro de HMQC [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S4**



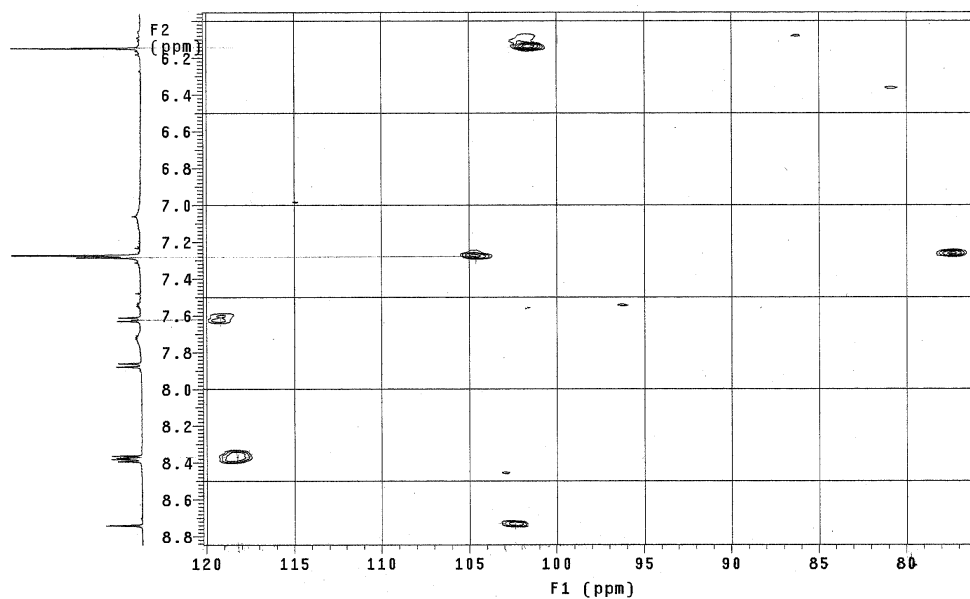


Figura 49 – Expansão Espectro de HMQC [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S4**

Tabela 6 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  obtidos do HMQC e correlação com a literatura.

Átomo	<b>S4</b>		SUKARI, 1999
	$^1\text{H}$	HMQC C	$^{13}\text{C}$
1	8,74(s, 1H)	102	102,2
4	7,28(s, 1H)	104	104,4
6	7,62(d, J = 5,4 Hz, 1H)	119	118,7
8	7,87(d, J = 5,4 Hz, 1H)		-
10	9,77(s, 1H)	146	146,5
11	8,38(d, J = 3,6 Hz, 1H)	118	118,2
12	8,37(d, J = 3,6 Hz, 1H)		-
-OCH <sub>2</sub> O-	6,15 (s, 2H)	101	101,3
OCH <sub>3</sub>	4,14 (s, 3H)	62	61,9
OCH <sub>3</sub>	4,07 (s, 3H)	56	56,8
Outros valores relatados			149,4 / 148,4 / 148,3 / 146,5 / 129,7 / 129,1 / 128,1 / 127,0 / 125,2 / 122,0 / 120,8 / 120,1 / 118,3

Tabela 7 - Dados de RMN <sup>1</sup>H de **S1**, **S2**, **S3** e **S4**

<b>Átomo</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>
<b>1</b>	<b>7,74 (s, 1H)</b>	<b>7,70 (s, 1H)</b>	<b>7,21 (s, 1H)</b>	<b>8,74(s, 1H)</b>
<b>4</b>	<b>7,10 (s, 1H)</b>	<b>7,13 (s, 1H)</b>	<b>7,09 (s, 1H)</b>	<b>7,28(s, 1H)</b>
<b>5</b>	<b>7,49 (d, J = 9,1 Hz, 1H)</b>	<b>7,48 (d, J=8,7Hz, 1H)</b>	<b>7,32 (d, J=8,4Hz, 1H)</b>	<b>7,62(d, J = 5,4 Hz, 1H)</b>
<b>6</b>	<b>7,69 (d, J = 8,4 Hz, 1H)</b>	<b>7,79 (d, J=8,7Hz, 1H)</b>	<b>7,74 (d, J=8,4Hz, 1H)</b>	<b>7,87(d, J = 5,4 Hz, 1H)</b>
<b>8</b>	<b>4,33 (s, 2H)</b>	<b>5,56 (s, 1H)</b>	<b>8,17 (s, 1H)</b>	<b>9,77(s, 1H)</b>
<b>10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8,38(d, J = 3,6 Hz, 1H)</b>
<b>11</b>	<b>6,94 (d, J = 8,4 Hz, 1H)</b>	<b>7,05 (d, J=8,7Hz, 1H)</b>	<b>6,81 (d, J=8,4Hz, 1H)</b>	<b>-</b>
<b>12</b>	<b>7,50 (d, J = 8,4 Hz, 1H)</b>	<b>7,64 (d, J=8,7Hz, 1H)</b>	<b>6,55 (d, J=8,4Hz, 1H)</b>	<b>8,37(d, J = 3,6 Hz, 1H)</b>
<b>-OCH<sub>2</sub>O- (2,3)</b>	<b>6,05 (s, 2H)</b>	<b>6,07 (s, 2H)</b>	<b>6,09 (s, 2H)</b>	<b>6,15 (s, 2H)</b>
<b>OCH<sub>3</sub> (8)</b>	<b>-</b>	<b>3,47 (s, 3H)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>OCH<sub>3</sub> (9)</b>	<b>3,88 (s, 3H)</b>	<b>3,97 (s, 3H)</b>	<b>3,93 (s, 3H)</b>	<b>4,14 (s, 3H)</b>
<b>OCH<sub>3</sub> (10)</b>	<b>3,92 (s, 3H)</b>	<b>3,94(s, 3H)</b>	<b>3,91 (s, 3H)</b>	<b>4,07 (s, 3H)</b>
<b>N-CH<sub>3</sub></b>	<b>2,63 (s, 3H)</b>	<b>2,77(s, 3H)</b>	<b>2,99 (s, 3H)</b>	



#### 4.2.2 ALCALÓIDES PROTOBERBERÍNICOS

Os alcalóides protoberberínicos são os mais largamente distribuídos dentre os alcalóides benzilisoquinolínicos e, diferente dos alcalóides benzofenantridínicos são encontrados em 10 famílias de plantas: Alangiaceae, Annonaceae, Berberidaceae, Fabaceae, Fumariaceae, Lauraceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae e Rutaceae (SEIGLER, 1998).

Esta classe de alcalóides é caracterizada pelo sistema de anel dibenzo[a,g]quinolizidínico o qual normalmente é encontrado com substituintes oxigenados nos anéis A e D (Figura 50). Compostos com substituintes alquílicos, no anel C também já foram isolados (SUAU, et al., 2000).

Como apresentado na seção 2.9.4, a rotação da ligação do anel benzílico é acompanhada pela oxidação do grupamento N-metila da reticulina (**90**) e formação de uma imina, levando a formação dos alcalóides protoberberínicos 2,3,9,10 substituídos (Figura 50) os quais são comumente isolados de plantas (ARRUDA, et al. 1992, HUSSAIN, et al. 1983).

Mas a rotação deste anel também pode levar a formação de alcalóides 2,3,10,11 substituídos (Figura 50), alcalóides com este tipo de substituição vem se apresentando com uma ocorrência mais restrita podendo também ser chamado de pseudoprotoberberinas (IWASA et al., 2003).

Estes compostos além de serem mais raros, vêm apresentado uma atividade biológica superior aos 2,3,9,10 oxigenados, em testes como antimaláricos. (DESCHAMPS et al., 2004; IWASA et al., 2003).

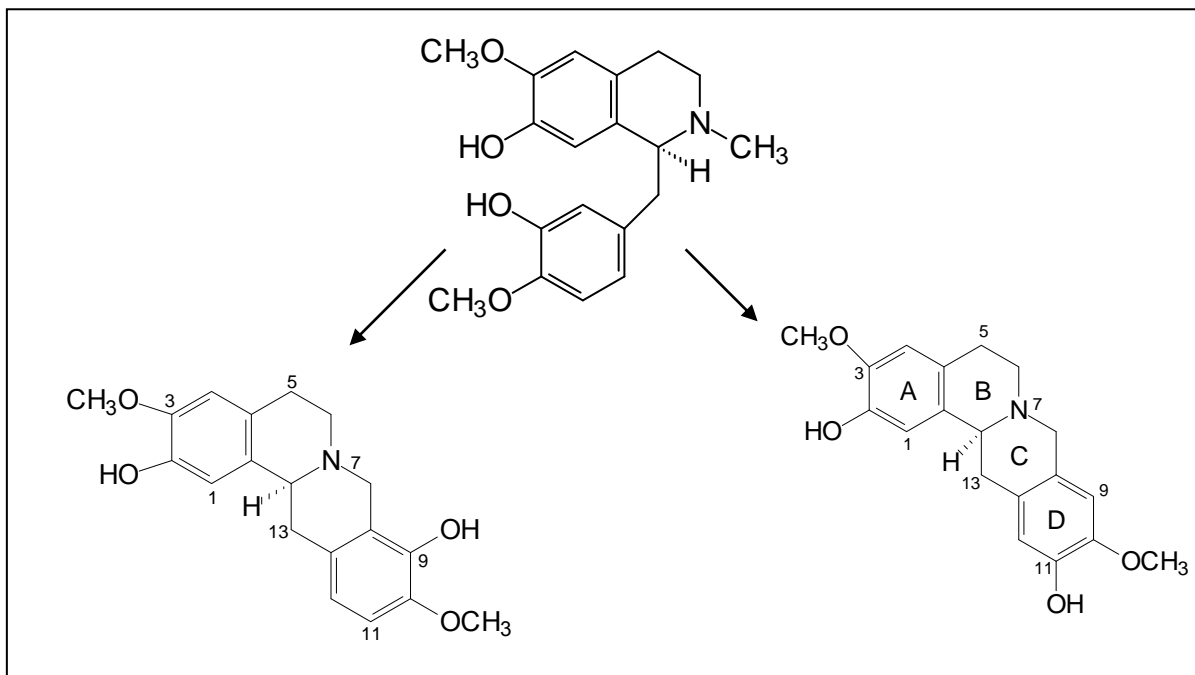


Figura 50 – Formação de derivados 9,10 e 10,11 substituídos

O estudo realizado por Yoshikawa e Morishima (1975), revela que na formação dos alcalóides quaternários tetraidroberberínicos a inserção do grupamento N-metila pode levar a formação dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ , onde o grupamento N-metila pode estar em *cis* ou em *trans* respectivamente, em relação ao hidrogênio (Figura 51).

Este fato leva os estereoisômeros a apresentarem alguns valores distintos de deslocamento no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Por exemplo, os valores dos deslocamentos dos carbonos C13 e N-metilicos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o isômero *cis* apareçam em campo mais baixo em relação ao isômero *trans*. Contrariamente o deslocamento do C6 do isômero *cis* encontra-se deslocado para campo mais alto em relação ao valor encontrado para seu isômero (YOSHIKAWA e MORISHIMA 1975).

Com isso o autor utiliza o mesmo argumento e deslocamentos dos C6 e  $\text{NCH}_3$  para propor a conformação dos outros alcalóides estudados.

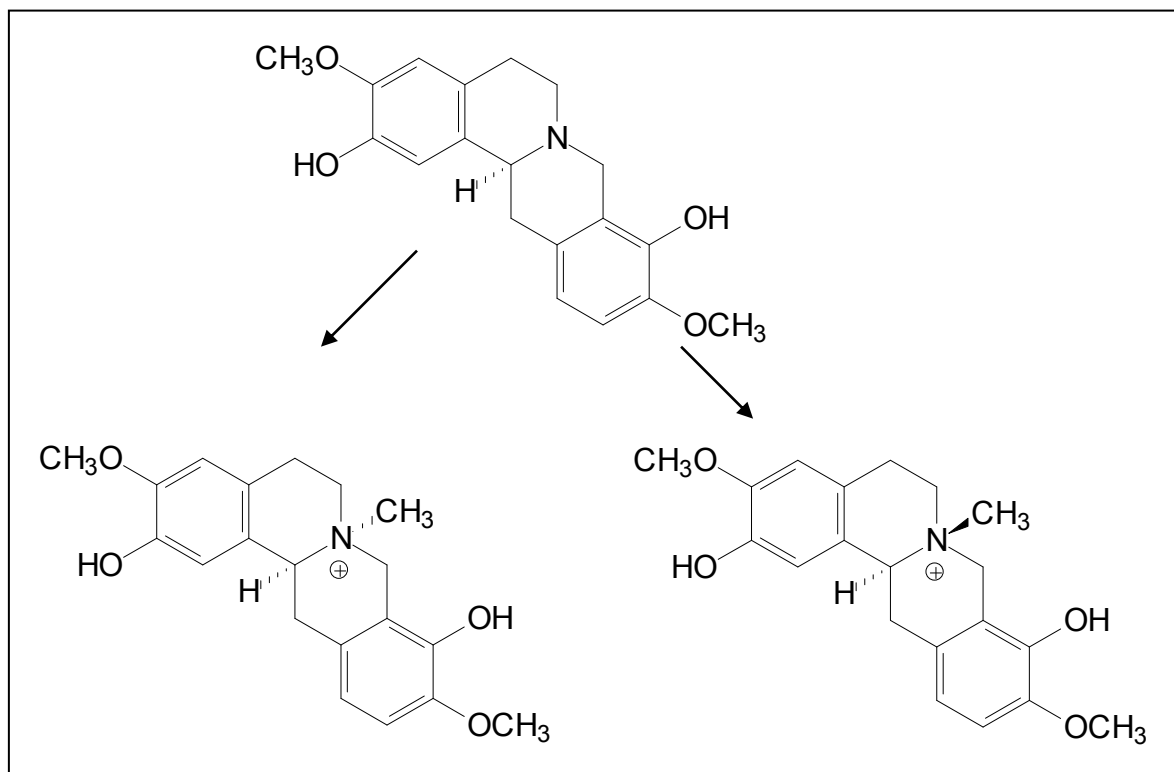


Figura 51 – Metilação em faces opostas da molécula

#### 4.2.2.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S5**

A substância **S5** foi isolada do extrato metanólico da casca da raiz de *Z. tingoassuiba*, conforme procedimento apresentado no Esquema 16 na página 103.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 52) apresentou sinais equivalentes a quatro hidrogênios aromáticos  $\delta$  6,87,  $\delta$  6,85,  $\delta$  6,77 e  $\delta$  6,67, sendo que, os dois dupletos em  $\delta$  6,87 e  $\delta$  6,85 apresentaram constantes de acoplamento de 8,4 Hz indicando um acoplamento em *orto*.

Neste espectro também pode ser notada (Figura 52), a presença de um simpleto o qual integra para dois hidrogênios em  $\delta$  5,99 característico de um grupamento dioximetilênico.

A presença de três simpletos integrando cada um para três hidrogênios, revela a presença de grupamentos metoxilas ou N-metilas na molécula, já que o procedimento utilizado para a extração (Esquema 15), foi específico para alcalóides.

Além dos sinais mencionados, podemos também verificar a presença de dois dupletos em  $\delta$  5,23 e  $\delta$  5,04 ambos integrando para um hidrogênio e constante de acoplamento de 15,9 Hz.

Os duplos dupletos em 5,37, 3,47 e 3,05 com constante de 9,3 e 6,3Hz; 18,5 e 6,3Hz e 18,5 e 9,3Hz respectivamente e os multipletos em 4,11 e 3,20 ppm, podem indicar a presença de uma porção alifática na molécula.

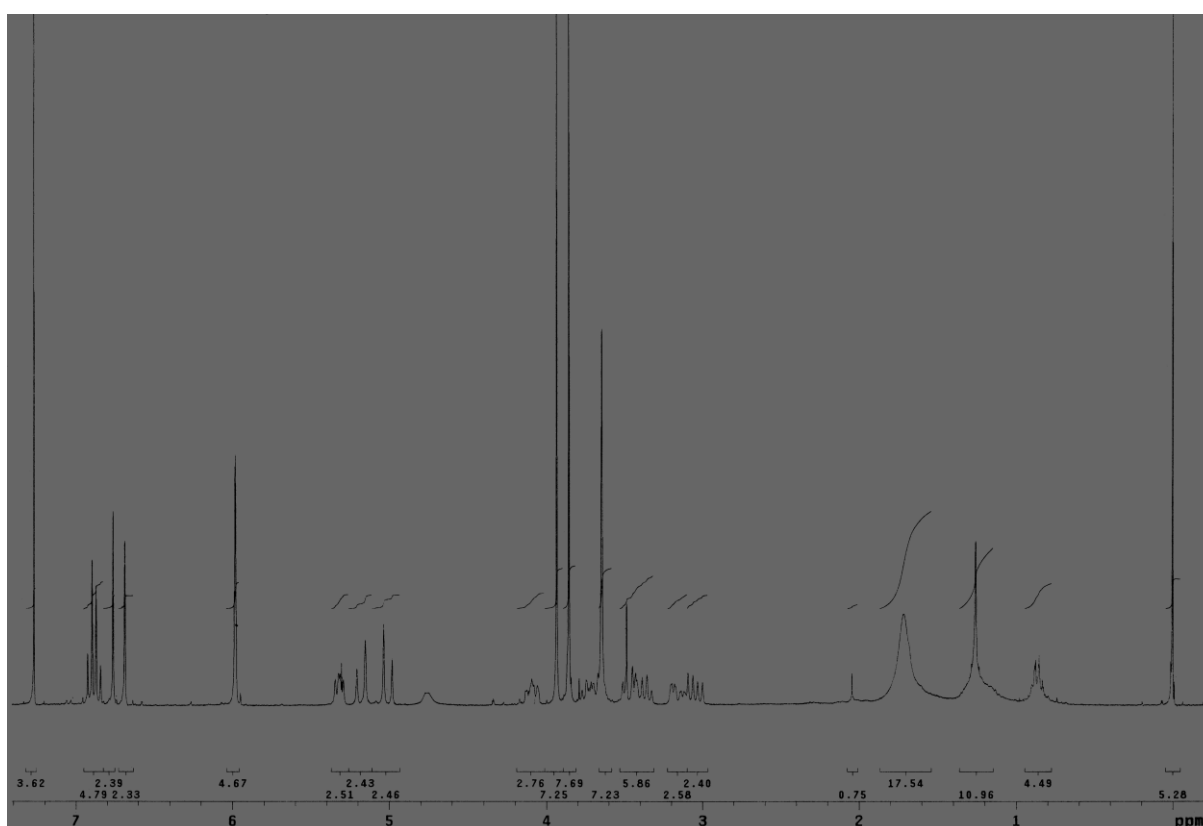


Figura 52 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S5**

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **S5** (Figura 53) apresentou 21 sinais, onde treze sinais apresentaram-se acima de 100 ppm.

Nesta mesma região o espectro de DEPT  $135^\circ$  (Figura 54) apresentou cinco sinais, revelando a presença de oito carbonos totalmente substituídos. O sinal em 101,4 ppm se apresentou invertido, confirmando o já sugerido pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  com o sinal em  $\delta$  5,99 que é a presença de um grupamento dioximetilênico.

Os outros oito sinais a baixo de 70 ppm, indicaram no espectro de DEPT 135° (Figura 54), que a estrutura é composta por quatro carbonos os quais podem ser metínicos ou metílicos e quatro metilênicos corroborando, com a proposta da amostra conter uma porção alifática.

Como o espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugere a presença de duas metoxilas e um N- $\text{CH}_3$ , levando em consideração a extração de alcalóides e o resultado positivo para Dragendorff, podemos inferir que há na estrutura apenas um carbono metínico e este seria em 64,8 ppm.

É importante lembrar que o sinal em 29,5 ppm é característico da presença de material graxo contaminante comum neste tipo de amostra.

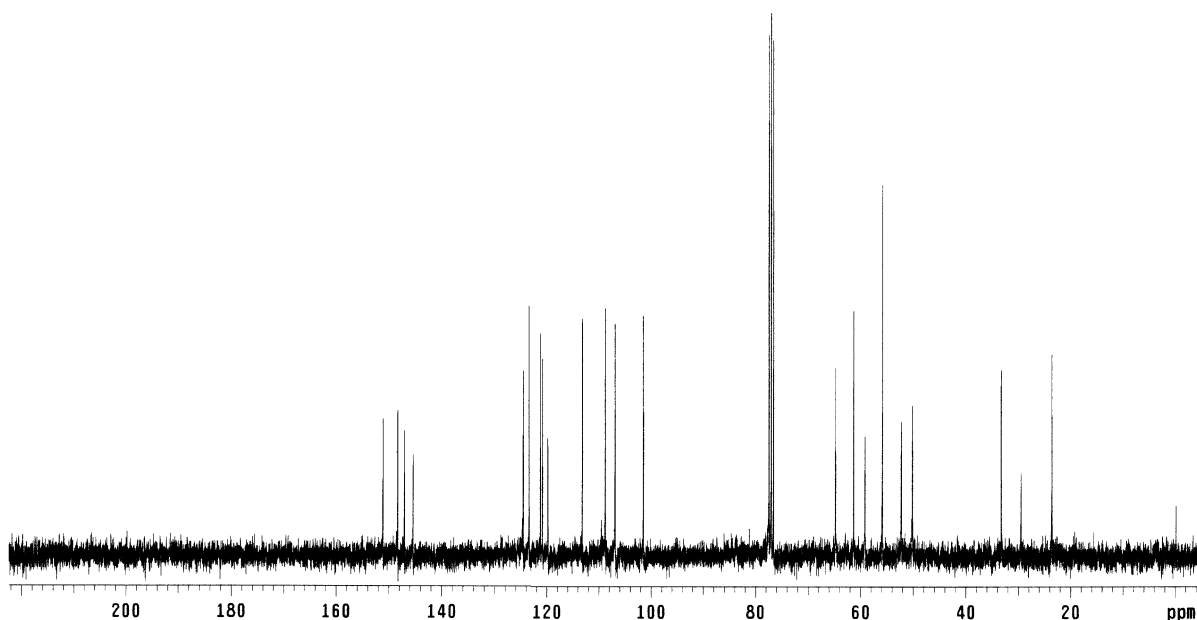


Figura 53 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S5**



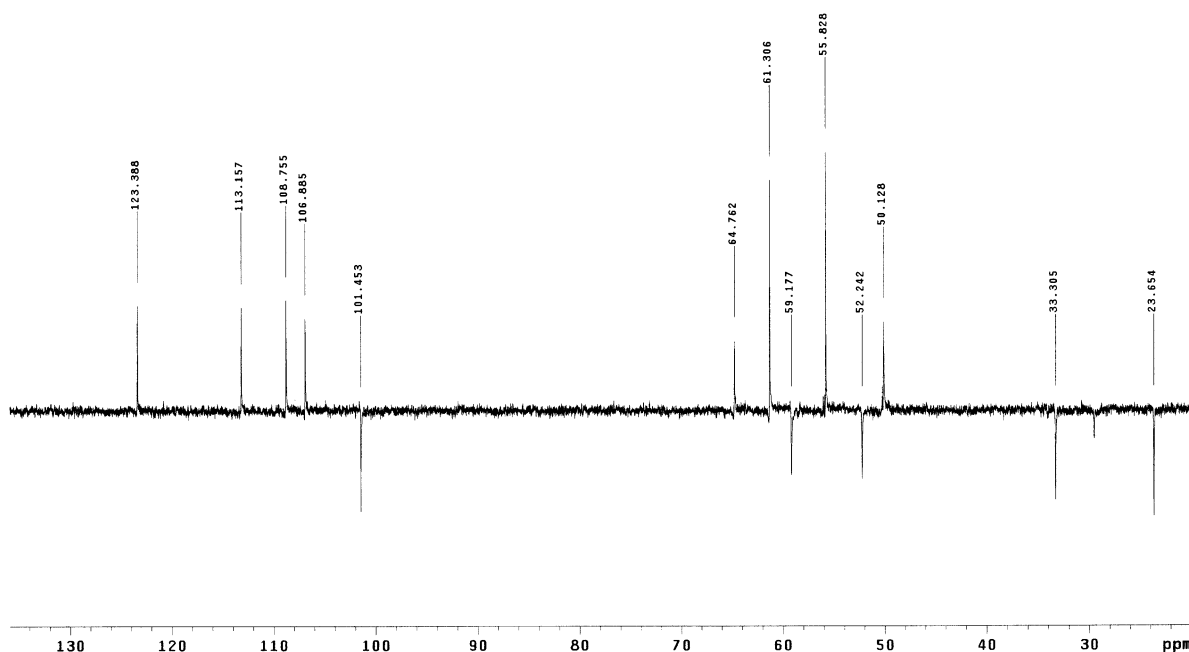
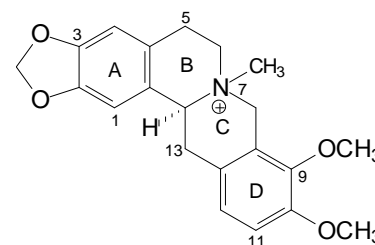


Figura 54 – Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S5**

Os resultados espectrométricos e dados da literatura levam a propor que **S5** seja um alcalóide protoberberínico. O qual tem sua estrutura básica representada ao lado, o dioximetileno foi colocado no anel A somente por ser esta a posição mais comumente encontrada na literatura e com isso os dupletos só podem estar no anel D. A proposta desta substância ser um alcalóide quaternário vem do método de extração e da presença de um terceiro simpleto que integra para três hidrogênios.

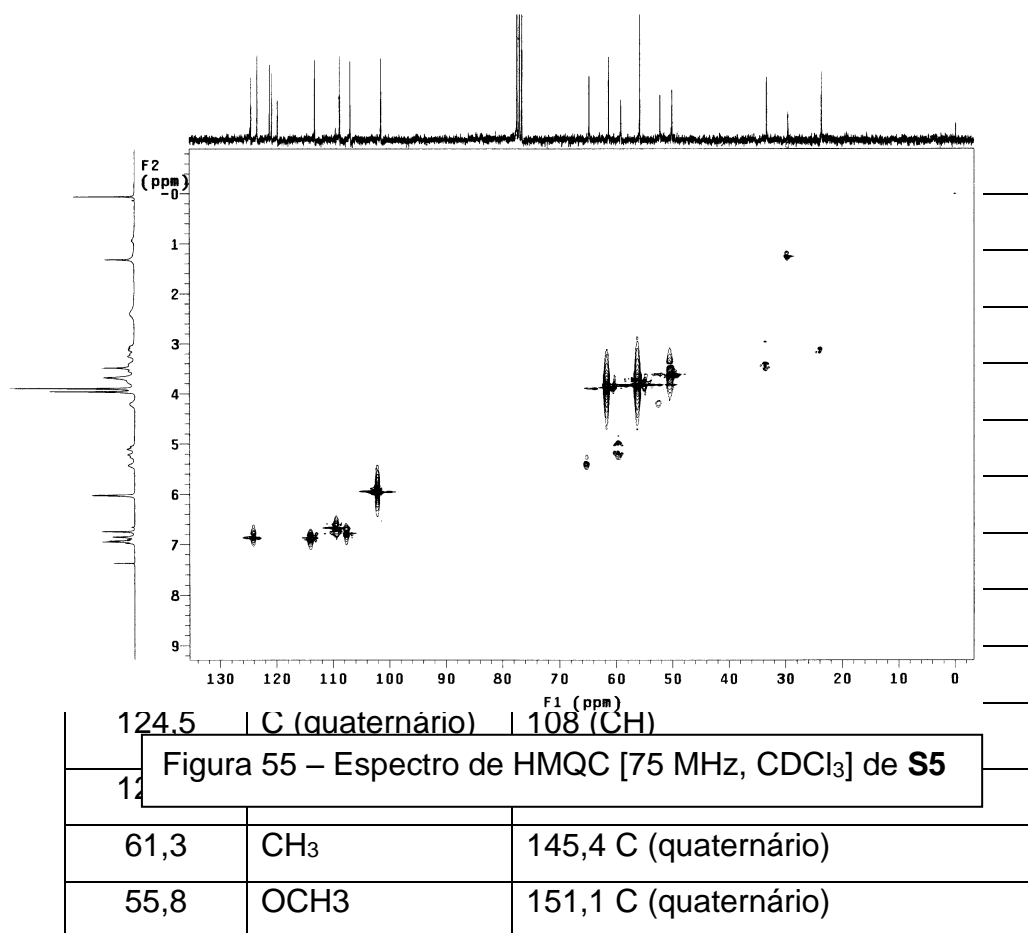


Através da análise dos dados do espectro de HMQC (Figura 55) pode-se fazer algumas correlações entre os hidrogênios e os seus respectivos carbonos, estes dados mais as correlações obtidas pela análise do espectro de DEPT 135° (Figura 54) estão apresentados na Tabela 8.

Os dados em **negrito** representam as correlações inequívocas obtidas pela análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C DEPT 135° e HMQC.

Tabela 8 - Correlação de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (HMQC) pra **S5**

13C	DEPT 135°	1H	átomo
106,9	CH	6,77 (s, 1H)	C1 ou C4
108,8	CH	6,67 (s, 1H)	C1 ou C4
123,4	CH	6,85 (d, J= 8,4, 1H)	C11 ou C12
113,2	CH	6,87 (d, J= 8,4, 1H)	C11 ou C12
61,3	CH <sub>3</sub>	3,95 (s, 3H)	OCH <sub>3</sub> em C9, C10 ou NCH <sub>3</sub>
55,8	CH <sub>3</sub>	3,86 (s, 3H)	OCH <sub>3</sub> em C9, C10 ou NCH <sub>3</sub>
50,0	CH <sub>3</sub>	3,68	OCH <sub>3</sub> em C9, C10 ou NCH <sub>3</sub>
<b>101,5</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>5,9 s (2H)</b>	<b>-OCH<sub>2</sub>O-</b>
<b>59,2</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>5,23 (d, J= 16,2 Hz, 1H, eq) 5,04 (d, J= 16,2 Hz, 1H, ax)</b>	<b>C8</b>
<b>33,3</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>3,47 (dd, J= 18,5 e 6,3 Hz 1H, eq) 3,05 (dd, J= 18,5 e 9,6 Hz 1H, ax)</b>	<b>C13</b>
52,2	CH <sub>2</sub>	4,11 (m, 1H )	C5 ou C6
23,7	CH <sub>2</sub>	3,9-3,20 (m, 2H)	C5 ou C6
<b>64,8</b>	<b>CH</b>	<b>5,37 (dd, J= 9,6 e 6,3 Hz 1H)</b>	<b>C14</b>



O espectro bidimensional a duas e três ligações HMBC (Figura 56) colaborou na atribuição dos outros carbonos da estrutura.

A Tabela 9 mostra as correlações observadas.

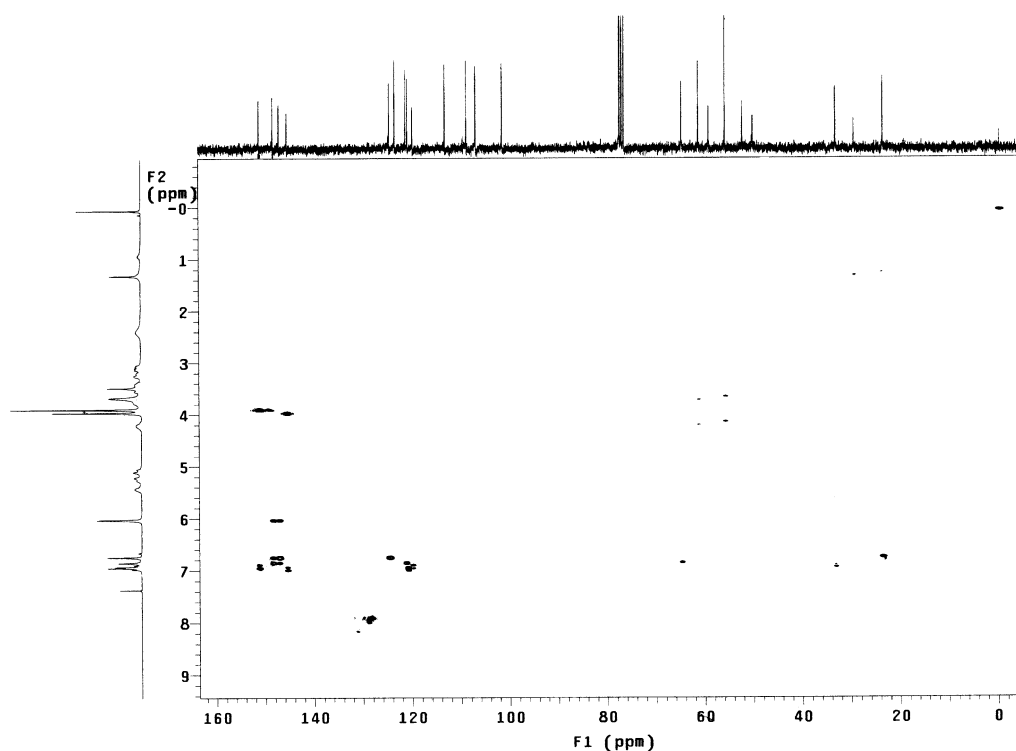
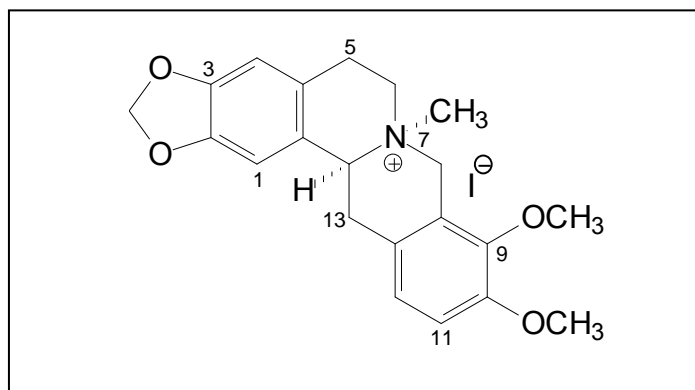


Figura 56 – Espectro de HMBC [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S5**

Tabela 9 - Correlação de  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  a duas e três ligações (HMBC) pra **S5**

As informações que não puderam ser confirmadas através das análises espectroscópicas como, por exemplo, deslocamento químico de C2 e C3 e dos carbonos C9 e C10 foram propostos através da comparação com os resultados descritos na literatura (FACUNDO et al., 1997; HUSSAIN, et al., 1983).

A junção desses dados leva a propor que **S5** seja o alcalóide protoberberínio conhecido como *cis*-N-metilcanadina (Figura 57).

Figura 57 – Estrutura da *cis*-N-metilcanadina **S5**

#### 4.2.2.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S6**

A substância **S6** foi isolada da raiz de *Z. tingoassuiba*, como apresentado no Esquema 17, página 105.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  desta substância (Figura 58) revelou a sua semelhança com a substância **S5** em relação as multiplicidade dos sinais.

A Tabela 9 apresenta os dados de RMN  $^1\text{H}$  das duas substâncias e em negrito as principais diferenças entre as mesmas.

Por exemplo, em **S5** há, na região aromática, dois simpletos e dois dupletos em *orto*, em **S6** só há simpletos.

O deslocamento químico de um dos hidrogênios em C8 encontra-se em **S6** mais desprotegido o que pode ser atribuído a presença de uma metoxila.

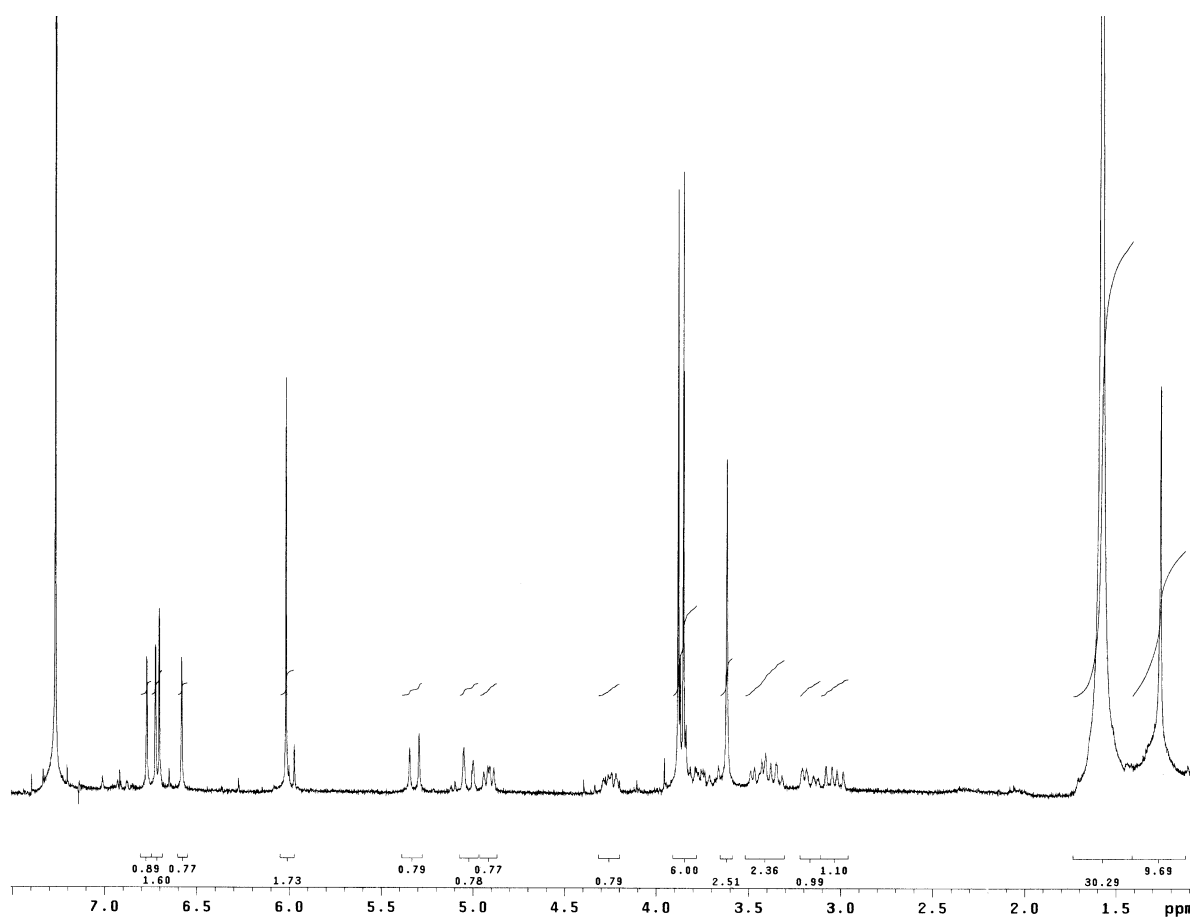


Figura 58 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S6**

Tabela 10 – Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de **S5** e **S6**

átomo	<b>S5</b>	<b>S6</b>
1	6,77 (s, 1H)	6,70 (s, 1H)
4	6,67 (s, 1H)	6,58 (s, 1H)
5	3,9-3,20 (m, 2H)	3,4-3,20 (m, 2H)
6	4,11 (m, 1H ) 3,75 (m, 1H)	4,24 (m, 1H ) 3,79 (m, 1H)
8	<b>5,23 (d, J= 16,2 Hz, 1H, eq)</b> 5,04 (d, J= 16,2 Hz, 1H, ax)	<b>5,32 (d, J= 15,3 Hz, 1H, eq)</b> 5,03 (d, J= 15,3 Hz, 1H, ax)
9	<b>6,85 (d, J = 8,5 Hz, 1H)</b>	<b>6,72 (s, 1H)</b>
12	<b>6,87 (d, J= 8,5 Hz1H)</b>	<b>6,77 (s, 1H)</b>
13	3,47 (dd,J= 18,5 e 6,3 Hz 1H, eq) 3,05 (dd, J= 18,5 e 9,6 Hz 1H, ax)	3,40 (dd,J= 18,5 e 6,3 Hz 1H, eq) 3,07 (dd, J= 18,5 e 9,6 Hz 1H, ax)
14	5,37 (dd, J= 9,6 e 6,3 Hz 1H)	4,90 (dd, J= 9,6 e 6,3 Hz 1H)
NCH <sub>3</sub>	3,68(s, 3H)	3,62 (s, 3H)
OCH <sub>3</sub>	3,95 (s, 3H)	3,88 (s, 3H)
OCH <sub>3</sub>	3,86 (s, 3H)	3,85 (s, 3H)
-OCH <sub>2</sub> O-	5,95 (s, 2H)	6,02 (s, 2H)

Por causa da pequena quantidade de substância isolada o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 59) não apresentou todos os 21 sinais esperados, devido a sua semelhança com a substância anterior.

A tabela 11 tem o objetivo de apresentar a comparação entre os sinais que puderam ser vistos com segurança.

Tabela 11 – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **S5** e **S6**

átomo	<b>S5</b>	<b>S6</b>
1	106,9	106,9
2	148,3	-
3	147,0	-
4	108,8	109,3
4a	121,2	121,2
5	23,7	24,0
6	52,2	51,9
8	59,2	66,5
8a	119,8	119,8
9	148,3	-
10	147,0	-
11	123,4	-
12	113,2	109,7
12a	120,8	-
13	33,3	34,8
13a	64,8	64,0
13b	124,5	124,5
NCH <sub>3</sub>	50,0	50,5
OCH <sub>3</sub>	61,3	56,5
OCH <sub>3</sub>	55,8	56,3
-OCH <sub>2</sub> O-	101,5	102,0

De acordo com os dados obtidos e informações relatadas na literatura a substância **S6** é o alcalóide protoberberínico 2,3,10,11substituído também chamado de pseudoprotoberberina cuja estrutura proposta esta representada na Figura 60. (IWASA et al. 2003, SUAUI et al., 2000).

Esta substância foi sintetizada por Giacomello e colaboradores (1964) como um intermediário da síntese da fargarine II. Até o momento não foi encontrado registro da substância **S6** como produto natural.

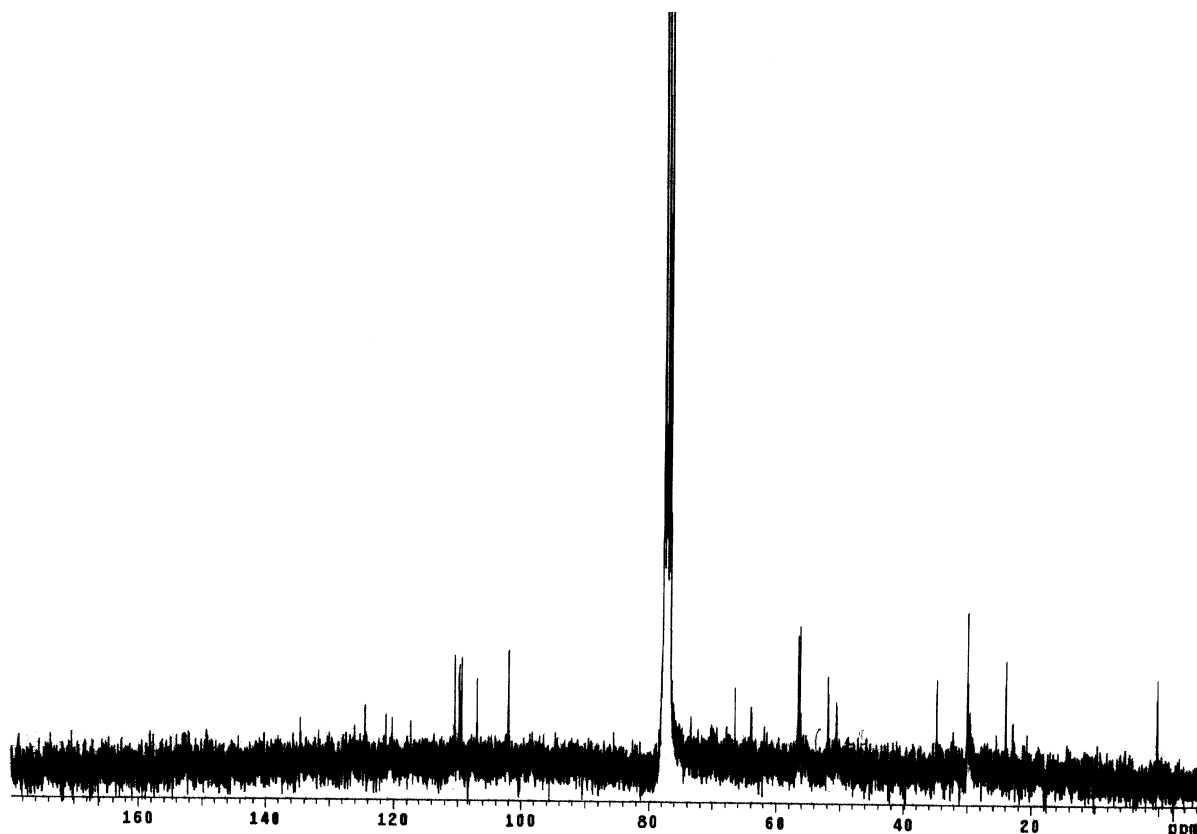


Figura 59 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S6**

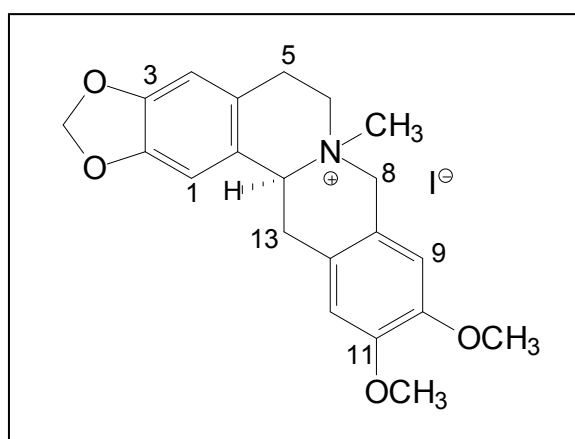


Figura 60 – Estrutura da 2,3-metilenodioxí 10,11-dimetoxi tetraidroprotoberberina iodeto (**S6**)



### 4.2.3 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA S7

A substância **S7** foi isolada após um procedimento para a extração de alcalóides como apresentado no Esquema 16 p. 103.

Além do procedimento específico, **S7** também foi submetida ao teste com o reativo, de Dragendorff , apresentando resultado positivo.

Para a identificação desta substância, foram analisados os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 61); RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 64) DEPT  $135^\circ$

(Figura 65); HMQC (Figura 66) e HMBC (Figura 67) e Infravermelho (Figura 63).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 61) apresentou quatro simpletos na região de campo baixo  $\delta$  7,98;  $\delta$  6,99;  $\delta$  6,66 e  $\delta$  6,35 todos integrando para um hidrogênio, sendo que o sinal em  $\delta$  6,35 diminuiu de intensidade quando a amostra foi analisada em água deuterada (Figura 62), indicando a presença de uma hidroxila a qual também foi confirmada através da análise do espectro de infravermelho (Figura 63), que apresentou uma banda larga em aproximadamente  $3400\text{ cm}^{-1}$ .

Nas Figuras 61 e 62 também podem ser visto a presença de cinco simpletos todos com integração para três hidrogênios. Os quatro sinais entre 4,57 – 2,88 ppm os quais integram para um hidrogênio cada sugerem a presença de uma parte alifática na molécula, assim como ocorreu para as substâncias **S5** e **S6**.

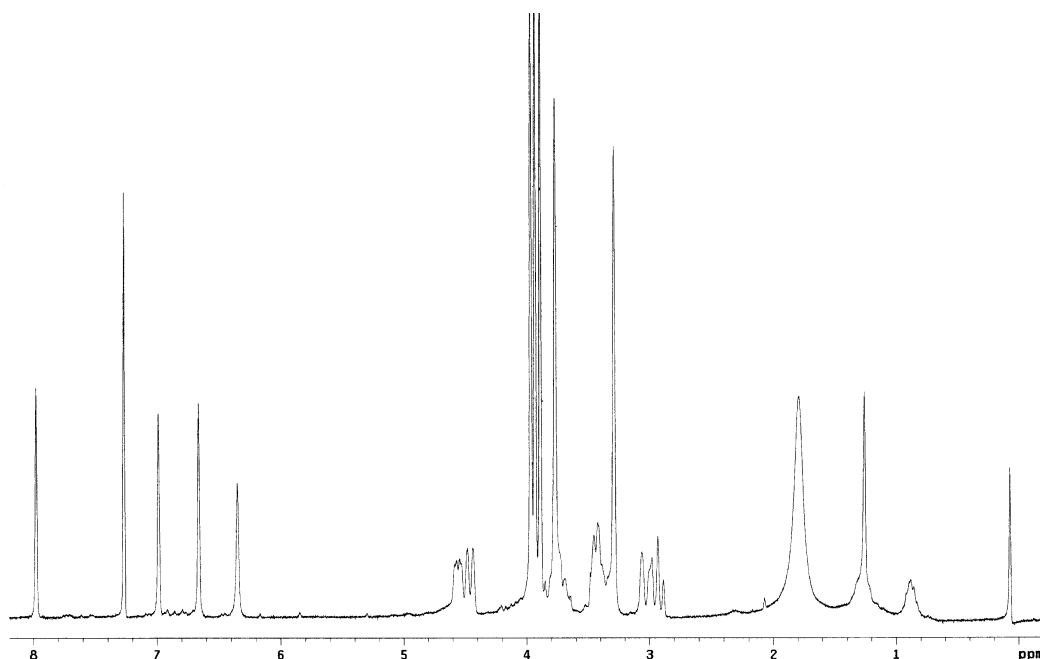


Figura 61 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S7**

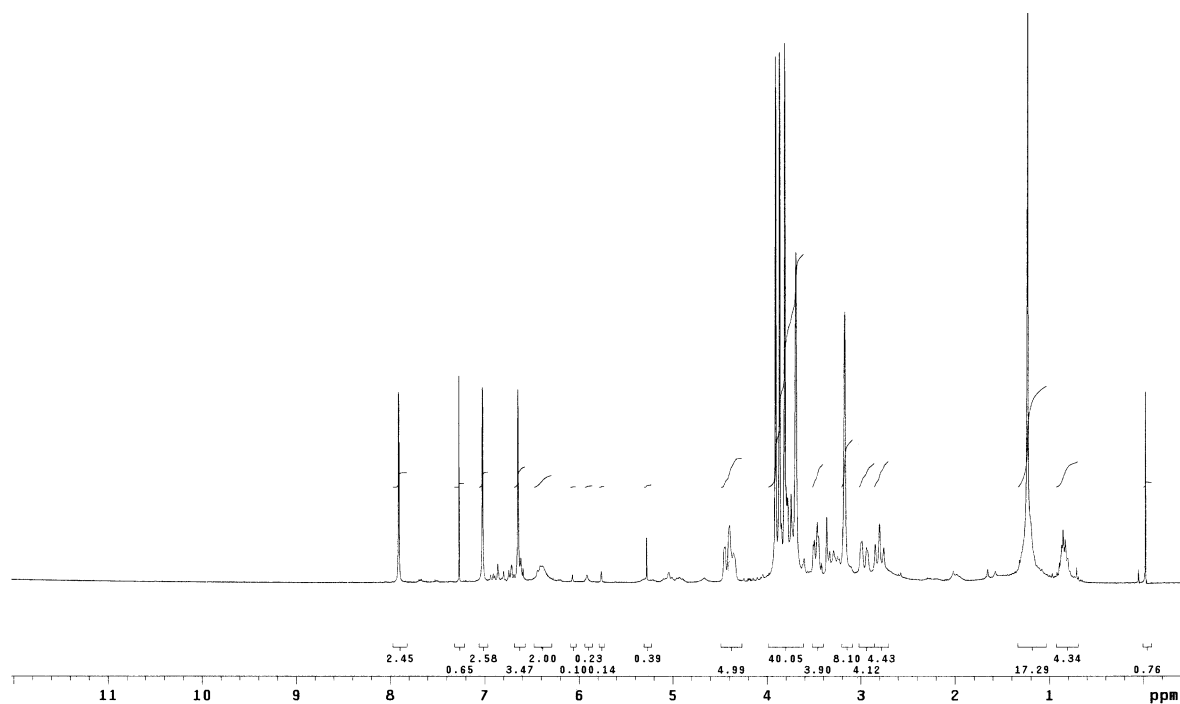


Figura 62 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ] de S7

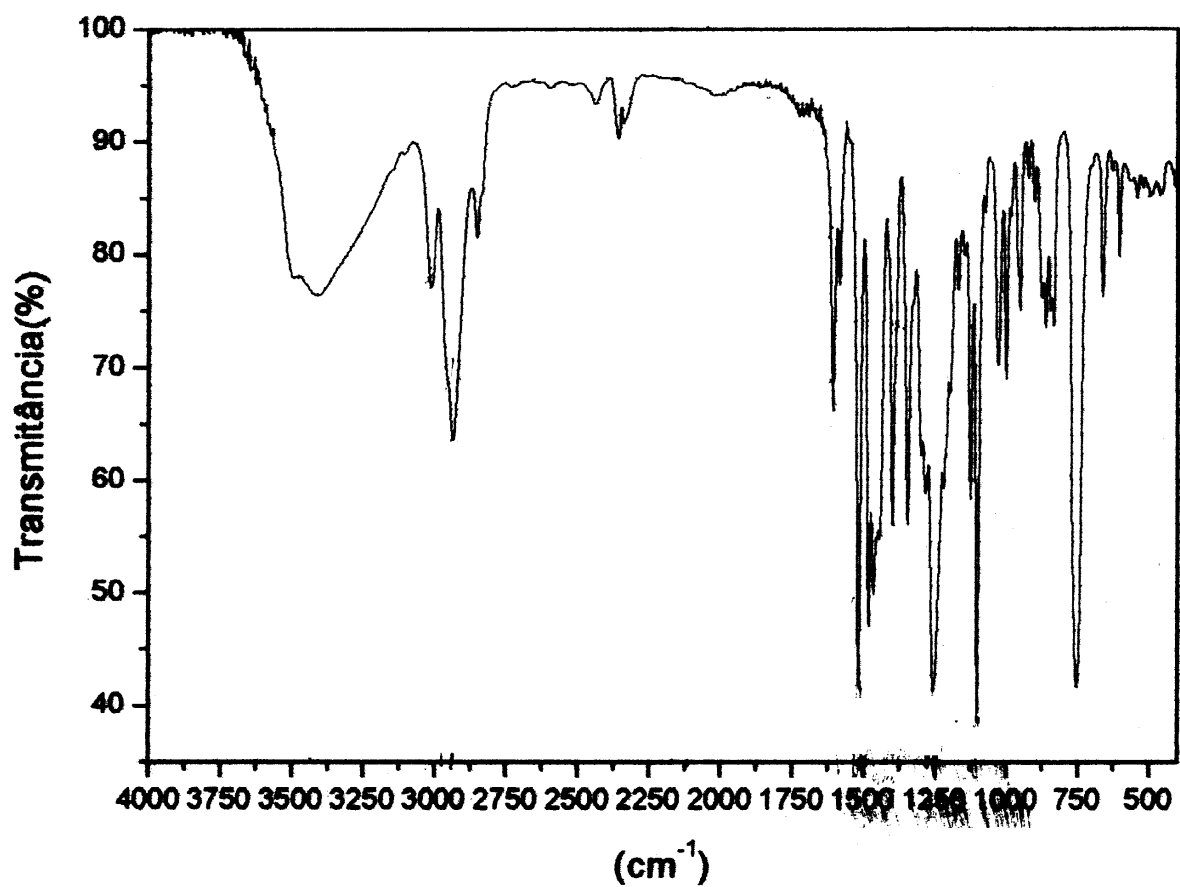


Figura 63 - Espectro de absorção a região do infravermelho de S7

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 64) apresentou doze sinais a cima de 100 ppm e 9 sinais em campo alto, excluindo-se o sinal em  $\delta = 29,2$  característico de substâncias contaminantes comumente designada como graxa.

Totalizando assim, 21 carbonos, mesmo número de átomos de carbono encontrado para as duas últimas substâncias apresentadas.

Dos nove sinais encontrados, cinco podem ser atribuídos a carbonos metílicos como sugere o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 61, p. 157) e três sinais, apresentaram-se no espectro de DEPT  $135^\circ$  (Figura 65) invertidos revelando a presença de três  $\text{CH}_2$  e um sinal característico de  $\text{CH}$  não aromático em  $\delta = 70,2$ . A maior desproteção deste sinal em relação aos já descrito na Tabela 11 p. 155, e a falta de um quarto  $\text{CH}_2$  como apresentaram as duas substâncias comentadas anteriormente **S5** e **S6** sugere que **S7** pertença a classe dos alcalóides aporfínicos.

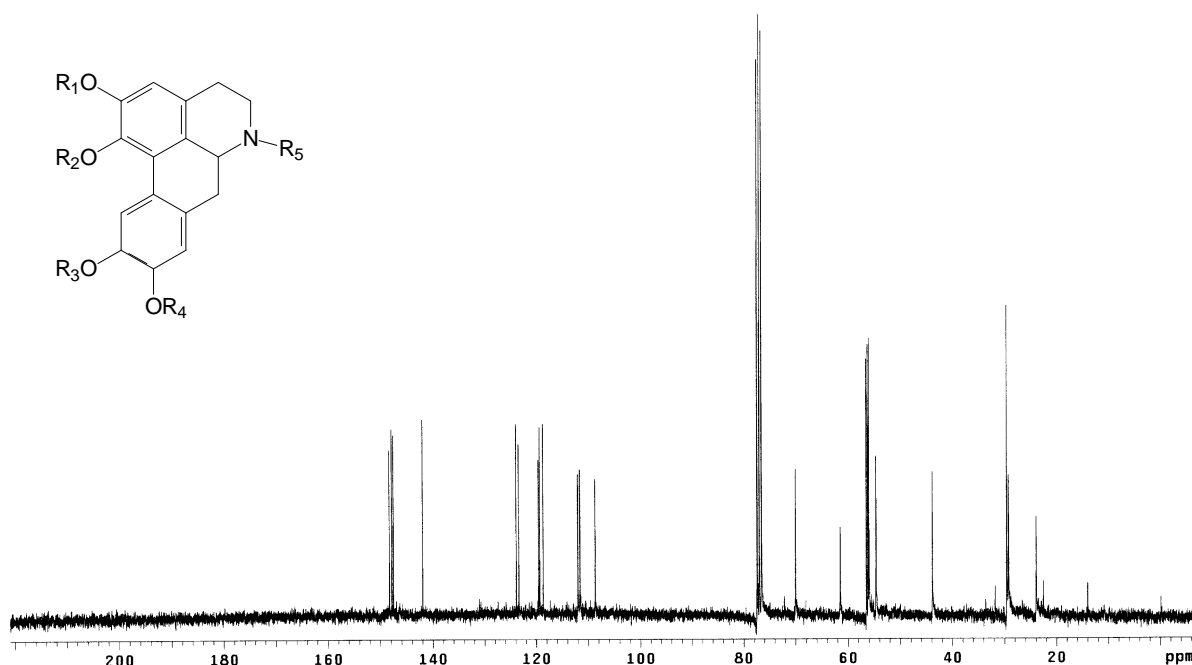


Figura 64 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S7**

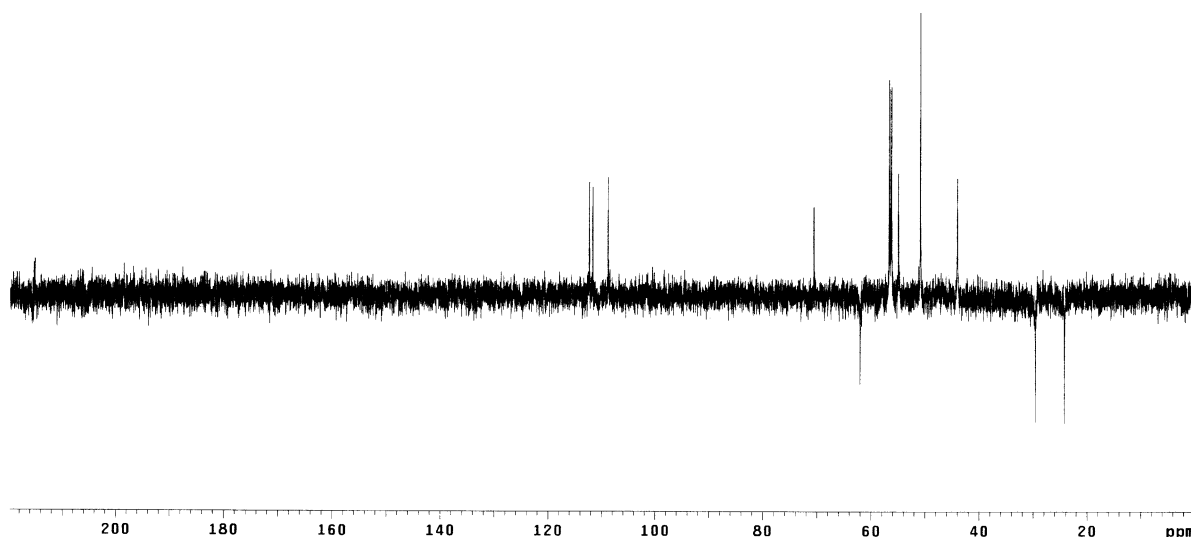


Figura 65 – Espectro de DEPT 135° [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S7**

A análise do espectro de HMQC de **S7** (Figura 66) estabeleceu a correlação entre os hidrogênios e os carbonos a uma ligação.

Como esperado o sinal em 6,3 ppm não apresentou correlação com nenhum carbono confirmando a presença de uma hidroxila nesta estrutura.

A presença dos três simpletos na região aromática sugere como podem estar dispostos os substituintes oxigenados, mas não é o suficiente para propor a posição da hidroxila.

Na literatura podemos encontrar quatro substâncias que são compatíveis com a estrutura proposta (Figura 66).

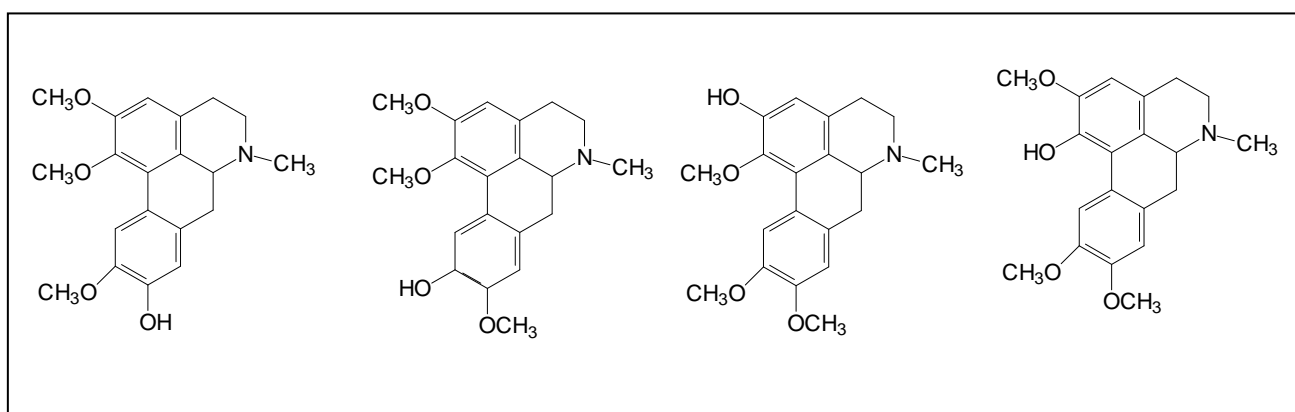


Figura 66 – Possibilidades estruturais para **S7**

O espectro de HMBC (Figura 68) o qual apresenta uma relação hidrogênio x carbono a duas e três ligações contribuiu para a finalização da proposta estrutural para a substância **S7** como apresentado na Tabela 12.

Dos cinco simpletos que integram para três hidrogênos (Figura 68, p. 162) somente dois deles  $\delta$  3,29 e  $\delta$  3,77 não apresentaram correlação com seus respectivos carbonos sugerindo que **S7** seja um sal quaternário.

A análise das correlações (Figuras 67 e 68) indica que o sinal em 108,7 está no C3 sendo uma das evidências a sua proximidade com o carbono em 23,9 ppm atribuído ao C4.

Como apresentado na Tabela 11 este sinal ( $\delta$  108,7) também se correlaciona com um sinal em  $\delta$  141,9 este não aparece no espectro de DEPT 135° (Figura 65) indicando que está totalmente substituído, mas não apresenta correlação com nenhuma das metoxilas. Assim pode-se propor que a hidroxila esteja no C2.

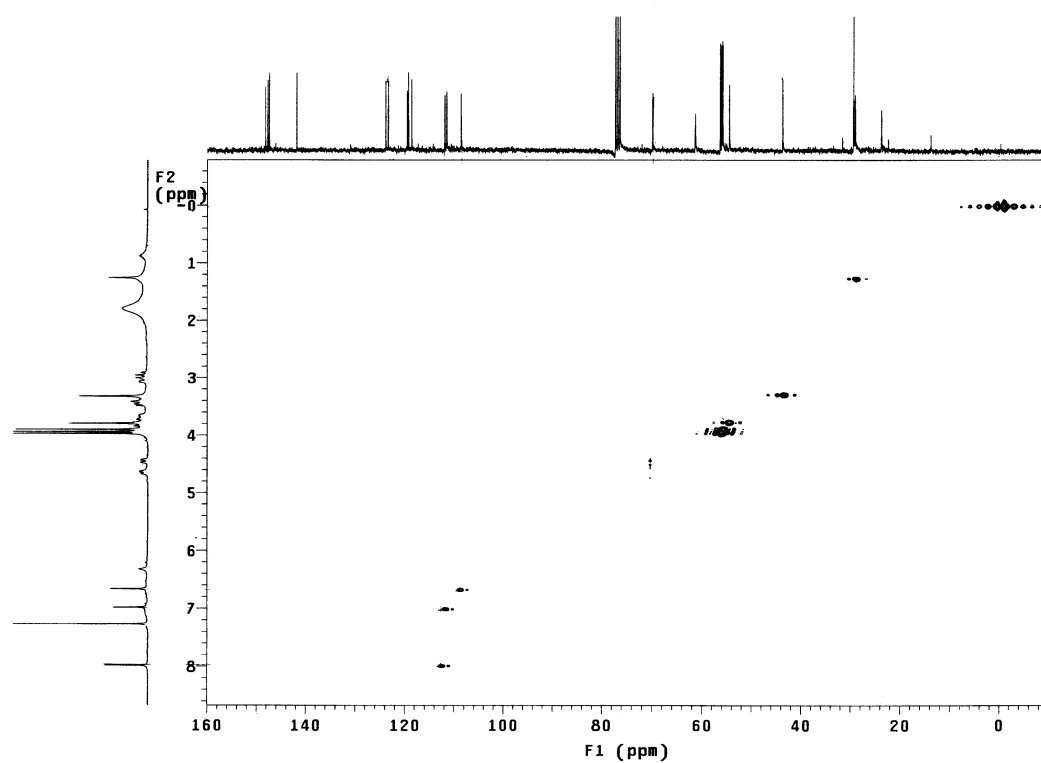


Figura 67 – Espectro de HMQC [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S7**

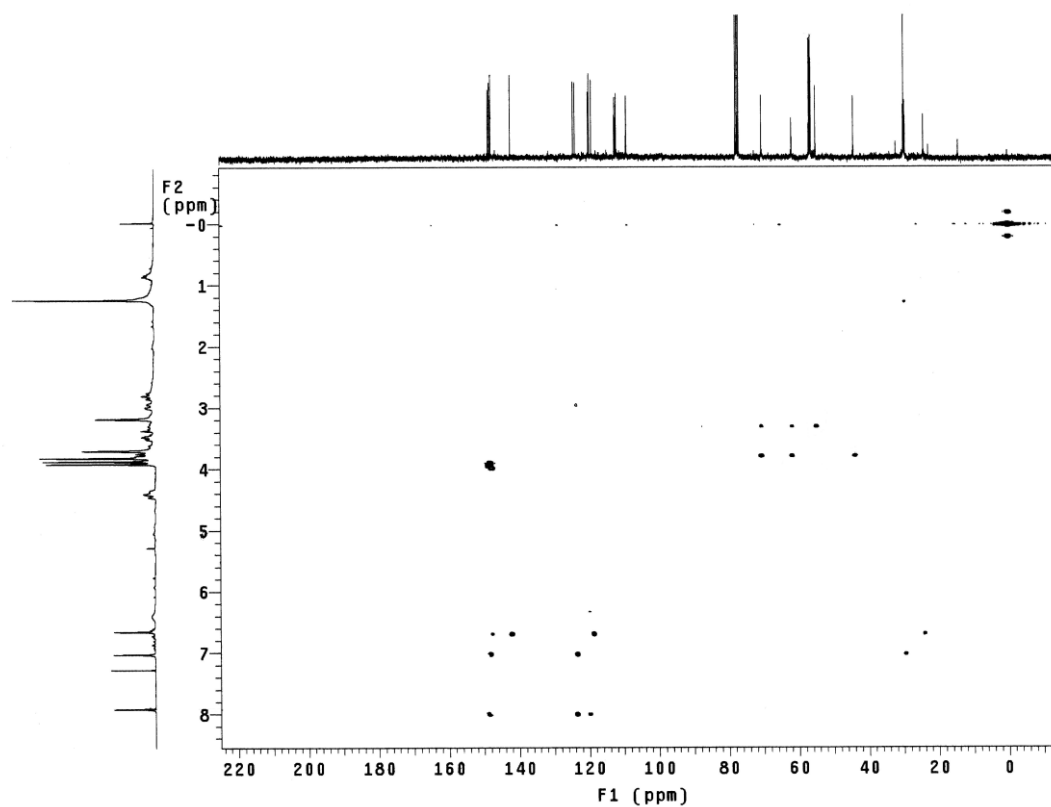


Figura 68 – Espectro de HMBC [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S7**

Tabela 12 – Apresentação dos dados espectrofotométricos de **S7**

Átomo	<b>S7</b>			
	HMQC		DEPT	HMBC
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C		
1	-	147,5	C	108,7
2	-	141,9	C	108,7
3	6,66	108,7	CH	147,5 - 141,9 - 118,7 - 23,9
3a	-	118,7	C	108,7
4	3,0	23,9	CH <sub>2</sub>	108,7
5	3,4	61,5	CH <sub>2</sub>	-
6a	4,61	70,0	CH	-
7	4,46	29,6	CH <sub>2</sub>	111,6
7a	-	123,4	C	111,6
8	6,99	111,6	CH	147,8 - 123,4 - 29,2
9	-	147,8	C	111,6
10	-	148,3	C	112,0
11	7,98	112,0	CH	148,3 - 123,9 - 119,6
11a	-	123,9	C	112,0
11b	-	119,3	C	-
11c	-	119,6	C	-
NCH <sub>3</sub>	3,77	54,7	-	70,0 – 61,5 – 43,9
NCH <sub>3</sub>	3,29	43,9	-	70,0 – 61,5
OCH <sub>3</sub> (C1)	3,97	56,5	OCH <sub>3</sub>	147,5
OCH <sub>3</sub> (C10)	3,93	56,2	OCH <sub>3</sub>	148,3
OCH <sub>3</sub> (C9)	3,89	56,0	OCH <sub>3</sub>	147,8
OH (C2)	6,35	-	-	-

Algumas correlações não se apresentaram de maneira clara, como por exemplo, a atribuição inequívoca para os CH<sub>2</sub> em 29,6 e 23,9.

Neste caso a comparação com estruturas já descrita na literatura, para as bases livres (MARSAIOLI, 1978; JACKMAN, 1979), e as propostas para as

substâncias **S5** e **S6** foram utilizadas como modelos. Já que até o momento não há registro na literatura de dados de  $^{13}\text{C}$  para a estrutura proposta.

Estes dados indicam que **S7** é um alcalóide aporfínico o qual foi também isolado por Vasquez e colaboradores (2007), denominado predicientina-metil-iodeto, publicado apenas com os dados de RMN  $^1\text{H}$ , os quais são condizentes com os dados de **S7** (Figura 69).

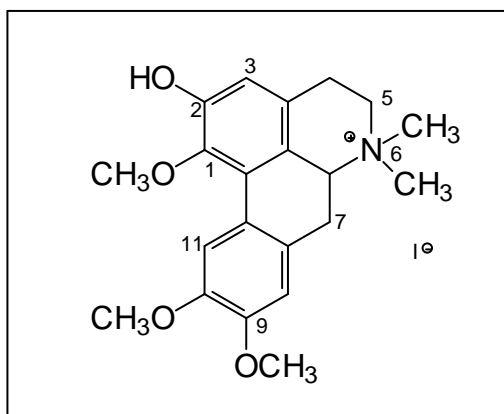


Figura 69 – Estrutura da predicientina-metil-iodeto (**S7**)

#### 4.2.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S8**

A substância **S8** além de ser encontrada na água da hidrodestilação foi também identificada como o constituinte majoritário do óleo volátil extraído por hidrodestilação e um dos principais constituinte da extração por fluido supercrítico como apresentado no Quadro 5.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **S8** (Figura 70) apresentou na região aromática quatro conjuntos de sinais, todos integrando para um hidrogênio, característicos de um anel aromático orto-substituído. Também pode ser visto neste espectro a presença de um simpleto largo em 7,60 ppm, o qual em outros espectros de RMN  $^1\text{H}$  pode não ser visto, como por exemplo, no espectro do óleo essencial (Figura 111), sugerindo a presença de um hidrogênio lábil.

Além disso, pode ser notada também a presença de dois simpletos  $\delta$  3,86 e  $\delta$  2,92 que integram para três hidrogênios cada. O simpleto em  $\delta$  2,92 pode ser



atribuído a uma metila amínica onde o nitrogênio pode estar ligado a um anel aromático. Já o segundo simpleto  $\delta$  3,86 é característico de metila ligada a oxigênio.

A Tabela 13 apresenta a comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de **S8** com dados publicados por YUANZHENG e colaboradores (1993) para o N-metil antranilato de metila.

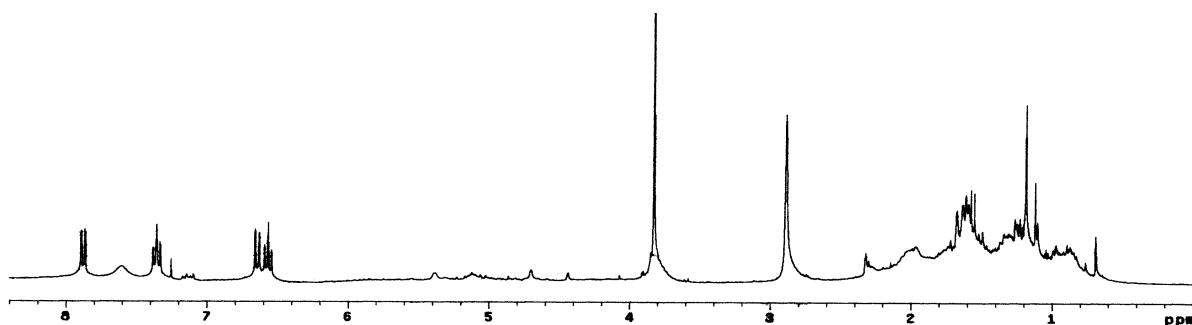


Figura 70 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S8**

Tabela 13 – Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de N-metil antranilato de metila e **S8**

Carbono	YUANZHENG et al., 1993	<b>S8</b>
1	6,60 (1H, d)	6,69 (dd, J= 8,0 e 1,8 Hz, 1H)
2	7,33 (1H, m)	7,39 (triplo duplete?? J= 7,0 e 1,5 Hz, 1H)
3	6,56 (1H, t)	6,61 (triplo duplete ??, J= 7,0 e 1,5 Hz, 1H)
4	7,88 (1H, dd)	7,92 (dd, J= 8,0 e 1,8 Hz, 1H)
OCH <sub>3</sub>	3,81 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)
NCH <sub>3</sub>	2,86 (s, 3H)	2,92 (s, 3H)
N-H	7,68 (1H, simpleto largo)	7,68 (1H, simpleto largo)

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 71) de **S8** revelou que a amostra é composta por nove carbonos.

O sinal em  $\delta$  168,9 o qual pode ser atribuído a uma carbonila de éster e o sinal em  $\delta$  51,3 característico de metoxila, juntamente com os sinais de carbonos aromáticos confirmados pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugerem a presença de um éster aril-metílico.

O sinal em 29,5 ppm o qual é geralmente vinculado aos CH<sub>2</sub> da graxa, neste caso se apresenta no espectro de DEPT 135 como um CH<sub>3</sub> podendo, assim, ser atribuído ao N-CH<sub>3</sub>.

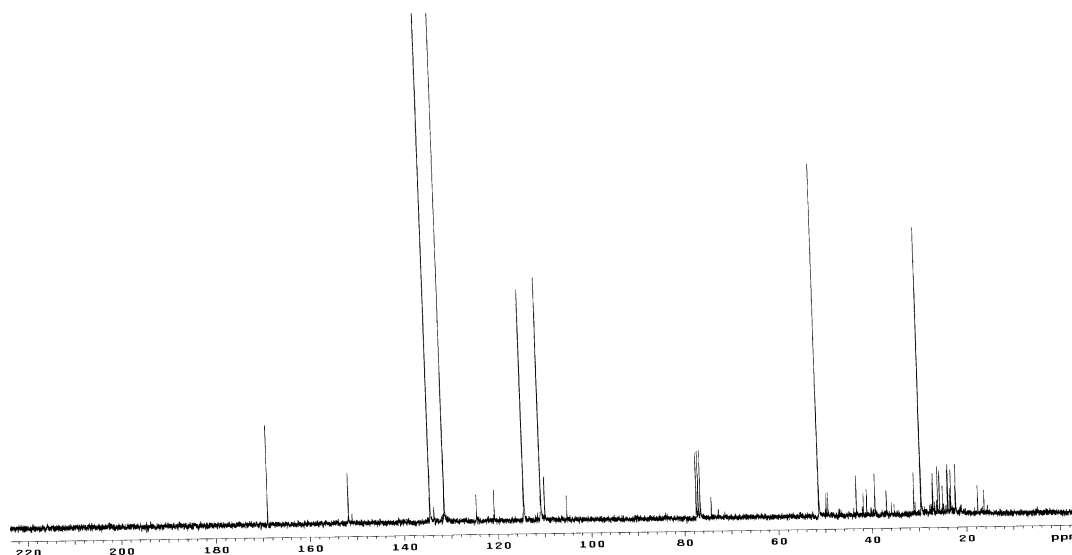


Figura 71 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S8**

O espectro de DEPT 135 (Figura 72) revelou que dos nove carbonos de **S8** apenas, três são completamente substituídos e não há carbono metilênicos nesta estrutura.

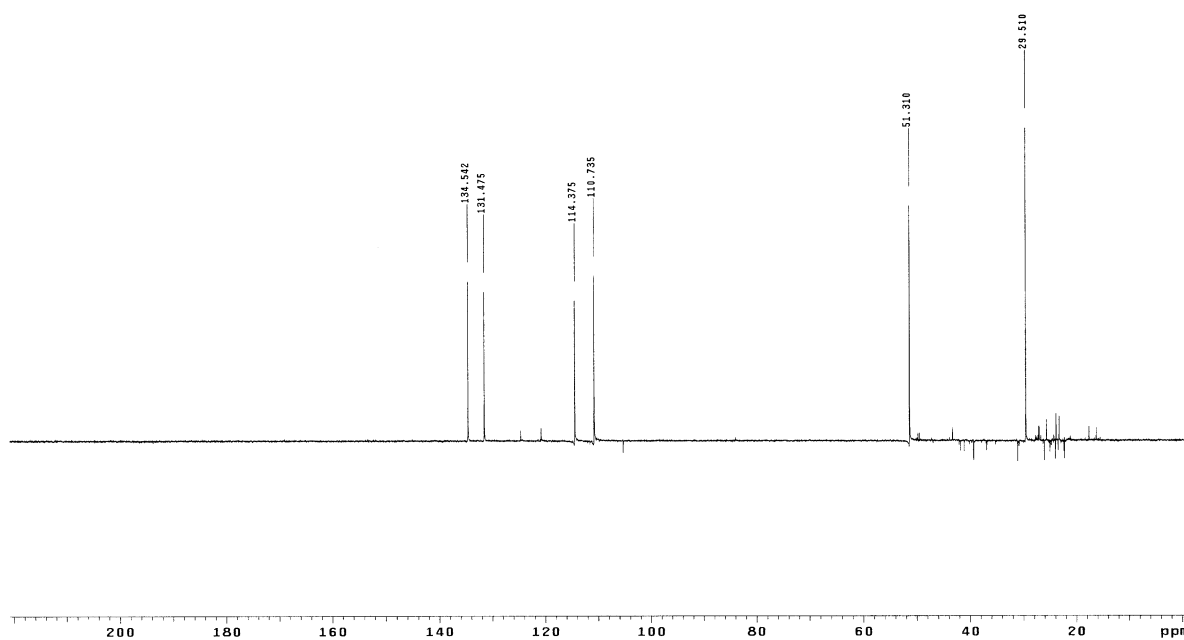


Figura 72 – Espectro de DEPT 135° [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **s8**

O espectro de HMQC revelou as relações entre os hidrogênios e os carbonos da estrutura colaborando para uma melhor atribuição. As correlações encontradas estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Correlação  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HMQC) para **S8**

Átomos	HMQC	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	6,69 (dd, J= 8,0 e 1,8 Hz, 1H)	110,8
2	7,39 (triplo duplete J= 7,0 e 1,5 Hz, 1H)	134,5
3	6,61 (triplo duplete, J= 7,0 e 1,5 Hz, 1H)	114,4
4	7,92 (dd, J= 8,0 e 1,8 Hz, 1H)	131,5
OCH <sub>3</sub>	3,86 (s, 3H)	51,3
NCH <sub>3</sub>	2,92 (s, 3H)	29,5
N-H	7,68 (1H, simpleto largo)	7,60

Como apresentado anteriormente, a presença da substância **S8** foi observada também no óleo essencial das folhas e este, foi submetido a análise de CG-EM. A relação massa-carga de  $m/z = 165$  para a substância com índice de retenção de 24,6 minutos, apresenta-se condizente com a estrutura proposta para **S8**.

De acordo com estes dados e comparações com a literatura pode-se propor que a substância **S8** seja o metil antranilato de-N-metila (YUANZHENG et al., 1993).

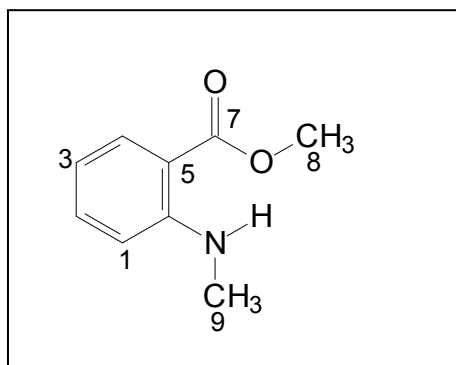


Figura 73 – Estrutura da N-metil antranilato de metila (**S8**)

#### 4.2.5 FURANOCUMARINAS

Segundo Robbers et al. (2007), “A palavra cumarina origina-se do caribenho CUMARU, nome popular da planta *Amburana cearensis* A. C. Smith”. Esta planta conhecida no norte do Brasil como fava-tonka, possui em suas sementes uma grande quantidade de cumarina.

Estas cumarinas quando sofrem prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8 do derivado 7-hidróxi-cumarina (Figura 74, 107), seguida pelo ataque nucleofílico do grupamento hidroxila em C7, ao epóxido formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isoprenila (108,109) levam a formação das FURANOCUMARINAS.

Dependendo da orientação do ataque nucleofílico e da posição da prenila, haverá a formação de pirano ou furanocumarinas angulares (110 e 111) ou lineares (112 e 113) (KUSTER e ROCHA, 2001).

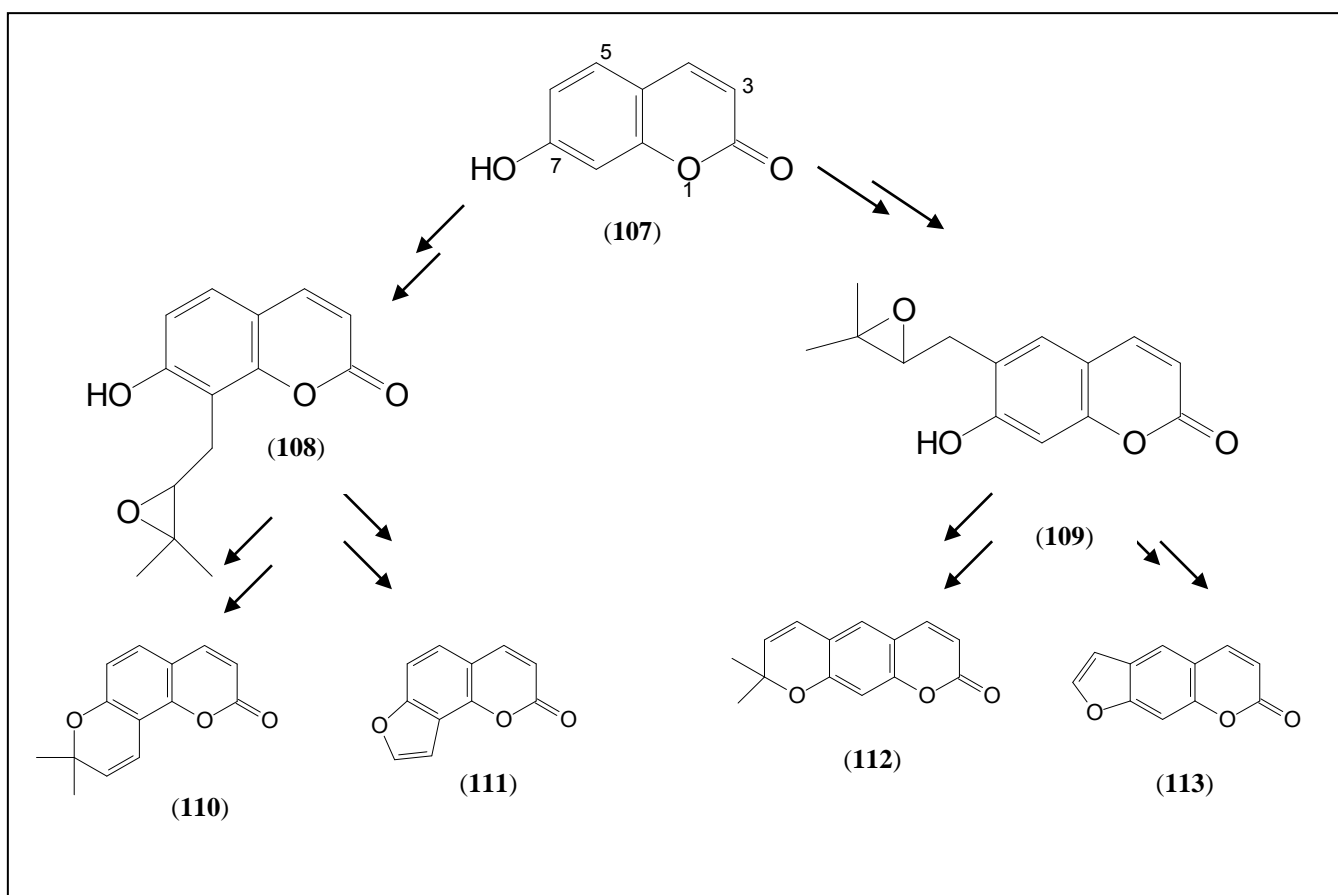


Figura 74 – Representação esquemática da formação das furanocumarinas

Apesar das cumarinas ocorrerem amplamente na natureza, predominantemente em angiospermas, as furanocumarinas, piranocumarinas lineares e angulares, lignocumarinas, cumarinas diméricas e triméricas são encontradas somente em algumas famílias, notadamente as mais primitivas (KUSTER e ROCHA, 2001).

A literatura relata várias atividades para as furanocumarinas também chamadas de psoralenos. Onde podemos citar o 8-metoxipsoraleno ou xantotoxina, a qual tem sido utilizada para facilitar a repigmentação no vitiligo idiopático e para o controle sintomático da psoríases grave (ROBBERS et al., 1997).

#### 4.2.5.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S9**

A substância **S9** foi isolada dos extratos hexânicos da casca da raiz de *Z. rhoifolium* e *Z. stelligeruvum*, seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 75), apresentou dois pares de duplete  $\delta$  7,77 e  $\delta$  6,37 com constante de acoplamento de 9,6 Hz característico de acoplamento *orto* o outro par em  $\delta$  7,70 e  $\delta$  6,82 com  $J = 2,4$  Hz característico do acoplamento dos prótons de anel furânico (STECK e MAZUREK, 1972).

Os dois simpletos em 1,75 e 1,73 ppm os quais integram para três hidrogênios, podem ser referentes a duas metilas ligadas a um carbono insaturado, encontrado geralmente em grupamentos prenílicos.

Os sinais indicativos da presença de uma O-prenila nesta estrutura é um duplete em 5,01 com  $J = 7,2$  Hz o qual integra para dois hidrogênios e um multiplete em 5,63 ppm o qual integra para um hidrogênio.

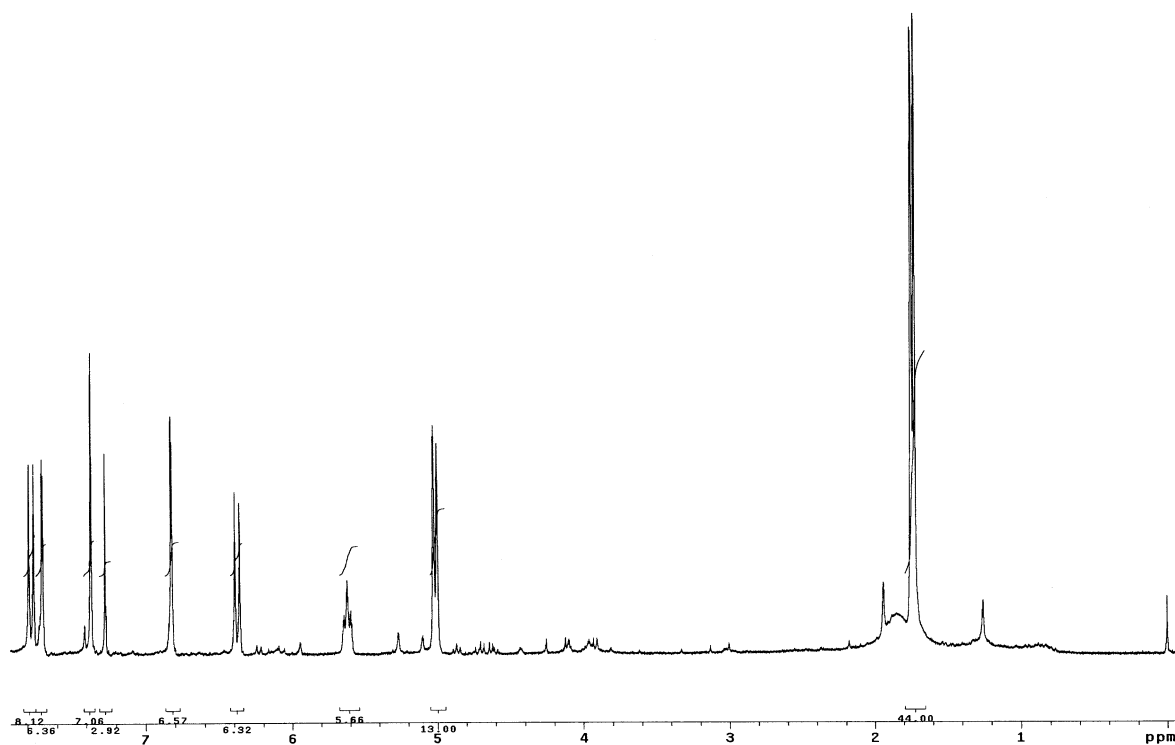


Figura 75 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S9**

Os dados fornecidos pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 76) revelaram os sinais em 160,5 ppm o qual pode ser atribuído a carbonila de uma lactona insaturada, 70 ppm carbono de éster e os sinais em 18,1 e 25,7 ppm das metilas de uma prenila.

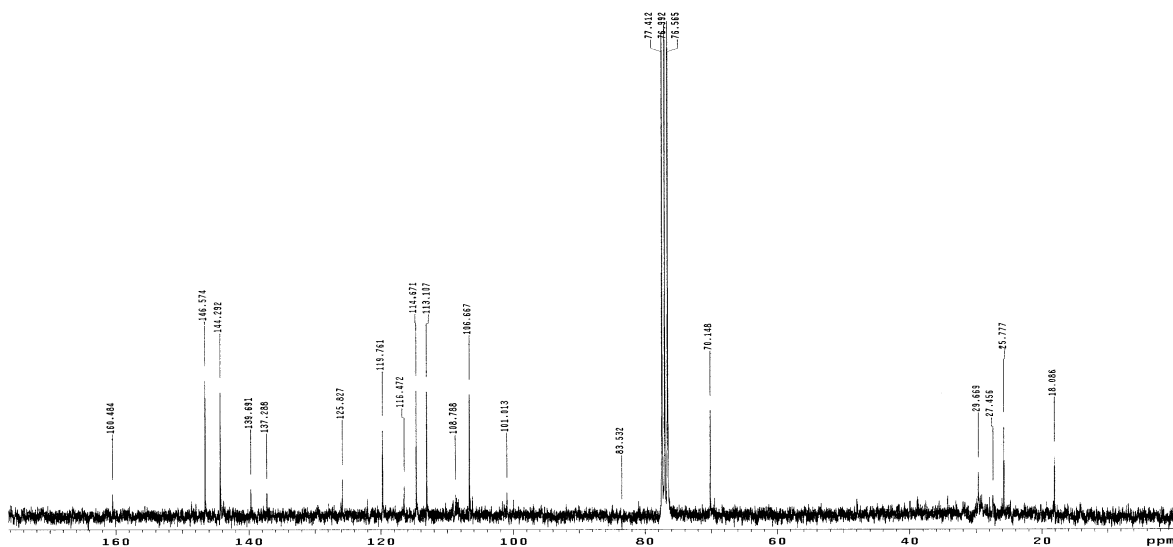


Figura 76 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S9**

Os dados obtidos e comparação com a literatura indicaram que a substância S9 (Figura 77) é a furanocumarina conhecida como imperatorim (WEI e ITO, 2006; MASUDA, 1997).

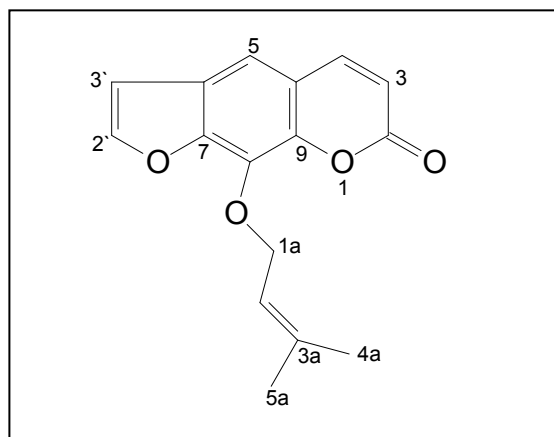


Figura 77 – Estrutura do Imperatorim S9

#### 4.2.5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS S10 E S11

Uma das fontes das substâncias S10 e S11 foi a água da hidrodestilação (Esquema 20 p. 112) como apresentado no Quadro 5 página 120.

Devido a semelhança estrutural as substâncias S10 e S11 serão discutidas simultaneamente.

Esta semelhança pode ser notada a partir da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de S10 (Figura 78) e S11 (Figura 79), ambos possuem dois pares de dupletos, um par com constante característica de acoplamento em *orto* e, o outro, com  $J = 2,4$  Hz característico de prótons de um anel furânico.

A diferença entre estas estruturas, é para S10 um simpleto em 7,36 ppm que integra para um hidrogênio, substituído em S11 por um simpleto em  $\delta = 4,18$  o qual integra para seis hidrogênios.



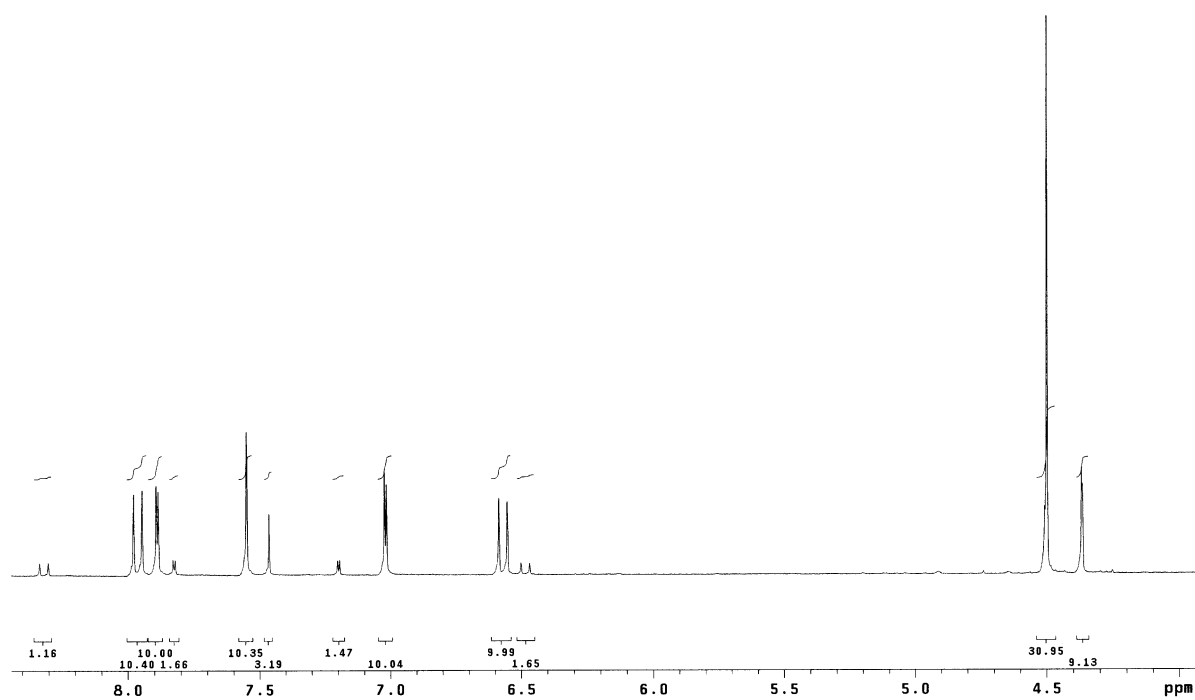


Figura 78 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S10**

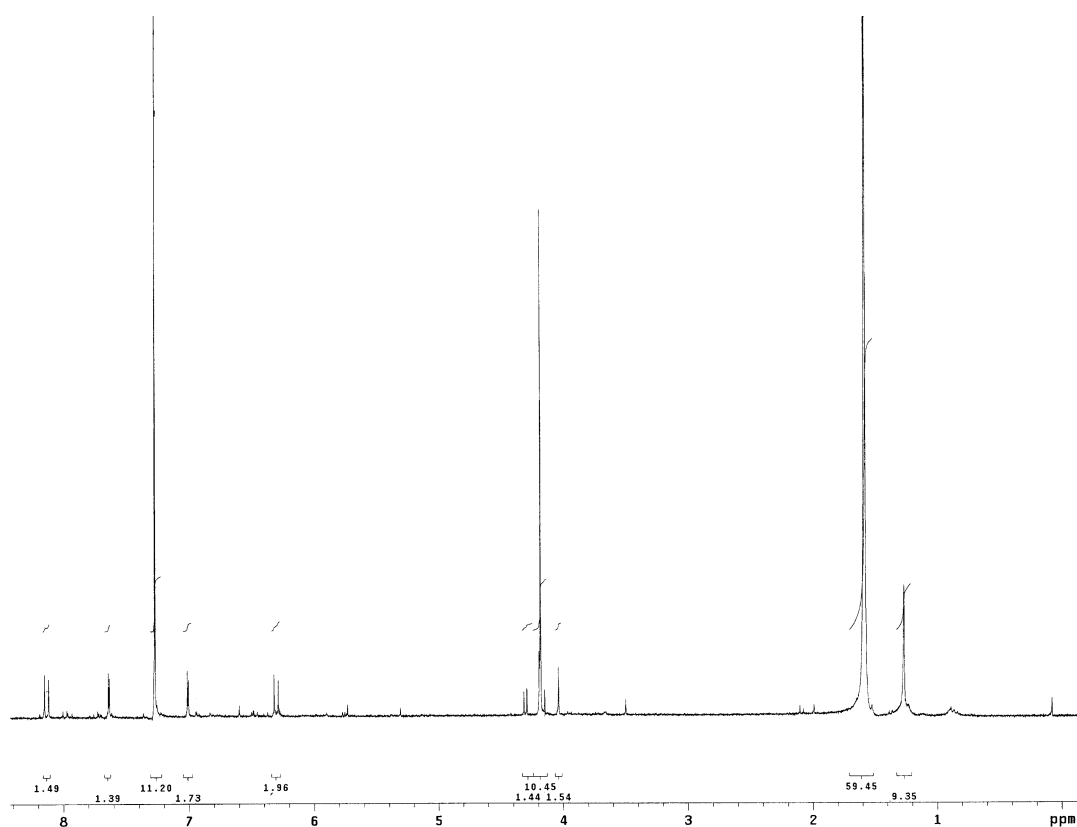


Figura 79 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S11**

Como pode se notado através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 78), a substância S10 está sendo impurificada pela substância S11, este problema pode ser resolvido pelo isolamento, desta última, praticamente pura, mas a pequena quantidade de substância isolada levou a analisar-se o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em mistura.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 80 e 81) da mistura, as duas substâncias foram diferenciadas como o sinal ( $\blacklozenge$ ) para S10 e ( $\blacklozenge$ ) para S11. Esta atribuição pode ser feita graças as informações fornecidas pelos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e os dados disponíveis na literatura Elgamal et al. (1979) e Liu et al (2004).

Assim, para S10 foram atribuídos 12 átomos de carbonos e para S11 13 átomos de carbono (Figuras 80 e 81).

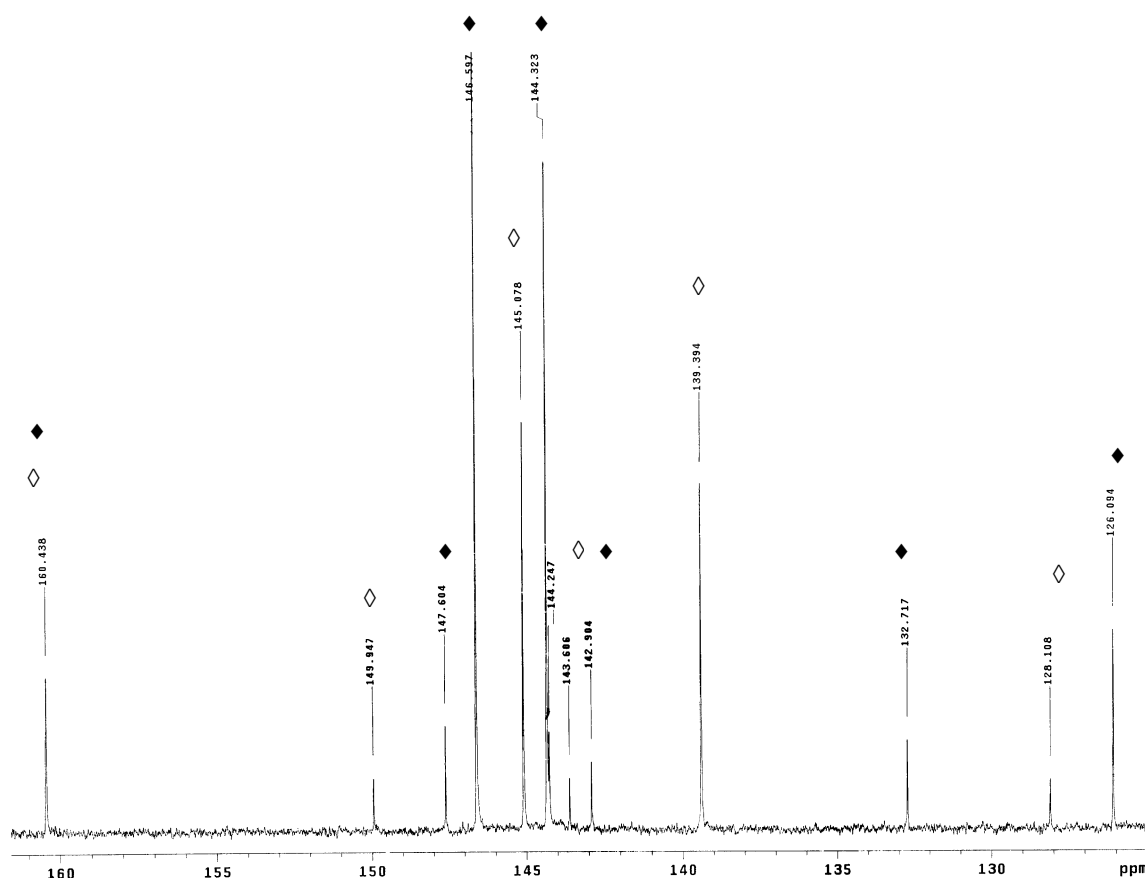


Figura 80 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de S10 e S11

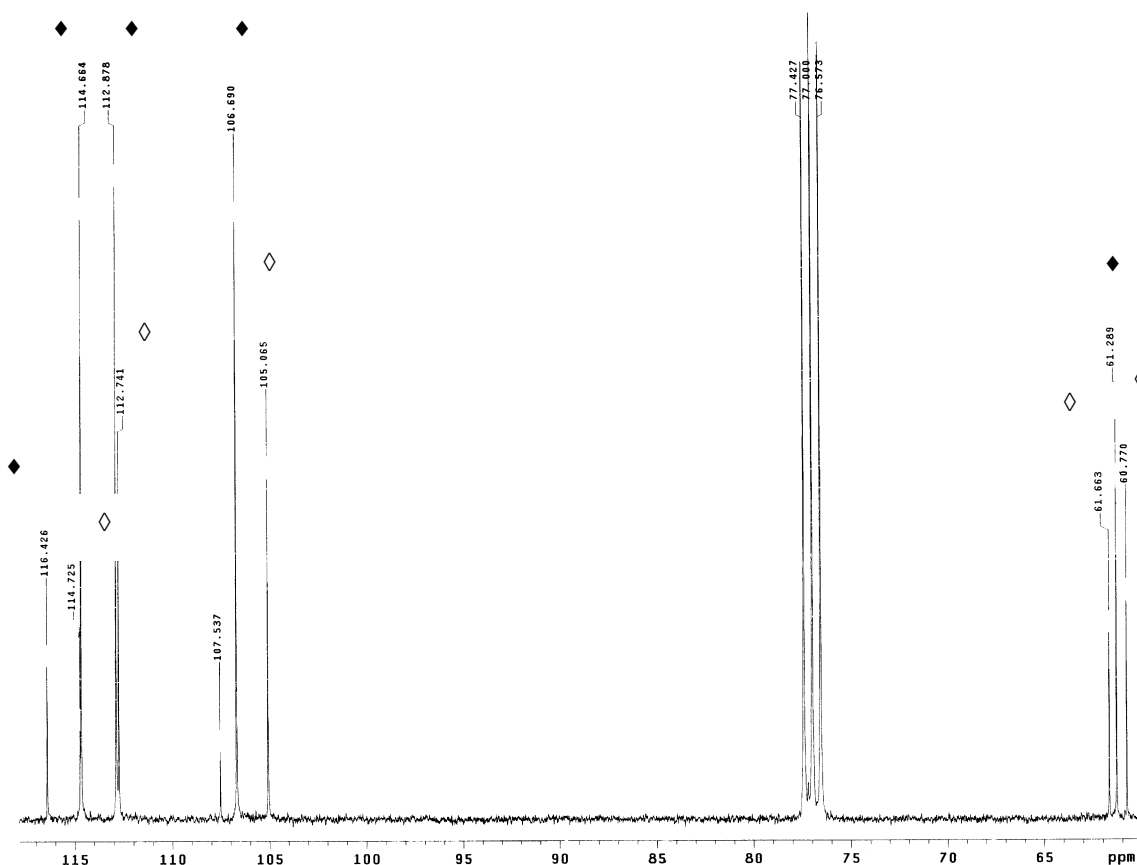


Figura 81 – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S10** e

O espectro de DEPT 138 de S10 (Figura 82) revelou que nenhuma das substâncias apresenta grupamentos  $\text{CH}_2$  e os sinais são condizentes com a estrutura proposta.

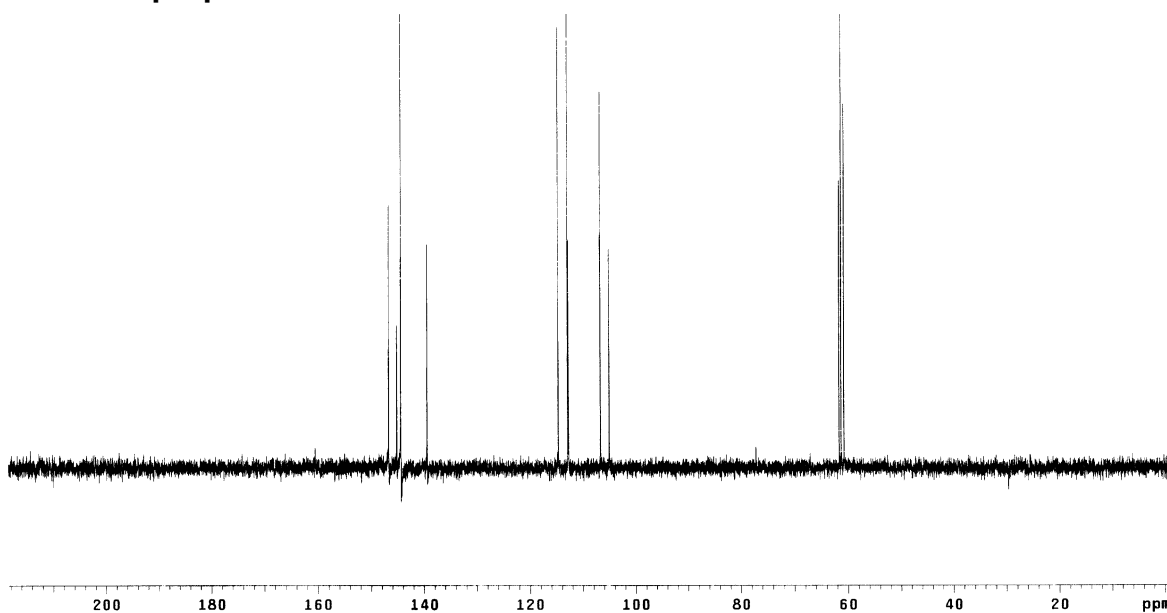


Figura 82 – Espectro de DEPT  $135^\circ$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S10** e **S11**

A análise dos dados leva a propor que S10 e S11 são as furanocumarinas conhecidas como xantotoxina e isopipinelina (Figura 83).

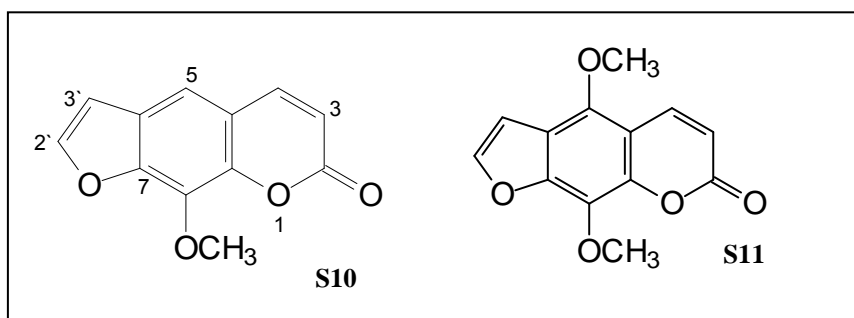


Figura 83 – Estrutura da Xantotoxina **S10** e Isopipinelina **S11**

#### 4.2.6 LIGNANA

O termo lignana foi introduzido por Haworth em 1936 para designar uma classe de produtos naturais cujos esqueletos carbônicos apresentam em comum duas unidades fenilpropanoídicas  $C_6C_3$  (Figura 84) ligadas através dos carbonos centrais do grupamento propila (C8) (UMEZAWA, 2003).

Este grupo de metabólitos secundários está subdividido em subgrupos baseados na sua estrutura básica e no nível de oxidação dos carbonos C9 e C9' (UMEZAWA, 2003).

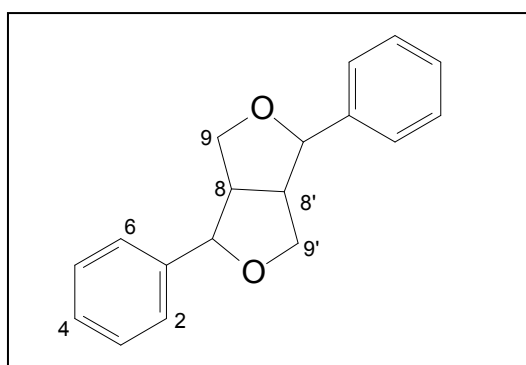


Figura 84 – Exemplo da estrutura dimérica da lignana

Um dos subgrupos é o das lignanas furofurânicas (Figura 84) as quais estão subdivididas em três séries de acordo com a posição dos substituintes nos anéis alifáticos: série pseudodiaxiais (Figura 85A), pseudoequatorial/ pseudoaxial também conhecida como série epi (Figura 85B) e a série pseudodiequatoriais (Figura 85C) (KATO, 1989).

Os anéis heterociclicos desta classe de lignanas apresentam sempre junção *cis* devido a menor tensão envolvida em relação a possibilidade alternativa. Como consequência desta restrição (KATO, 1989).

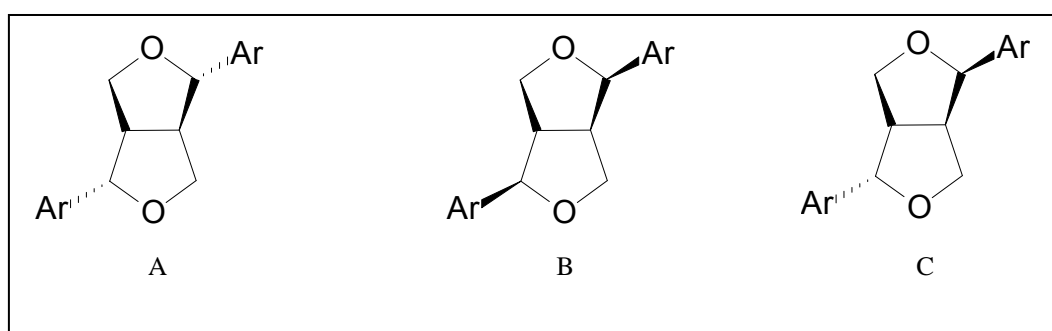


Figura 85 – Séries das lignanas furofurânicas

O principal método para o diagnóstico da estereoquímica, e com isso a determinação da série do composto em estudo, se baseia na análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  que fornece a grande maioria das informações sobre os detalhes estruturais (KATO, 1989).

As estruturas dos esqueletos furofurânicos, simetricamente substituídos, podem ser facilmente determinados a partir dos deslocamentos dos prótons oxibenzílicos 7 e 7'.

A série pseudodiequatorial (Figura 85a) é reconhecida pela absorção dos prótons oxibenzílico em aproximadamente  $\delta$  4,75 apresentando-se como um duplete com constante de acoplamento que pode variar de 4-6 Hz.

A série pseudodiaxial, por sua vez caracteriza-se pela absorção destes prótons em  $\delta$  4,90. A quebra da simetria na série epi provoca um desdobramento nos sinais dos prótons oxibenzílicos, e também nos outros prótons dos anéis furânicos, o que resulta num aumento da complexidade dos espectros (KATO, 1989).

A espectrometria de RMN  $^1\text{H}$  pode fornecer ainda informações a respeito do grau de substituição nos anéis aromáticos e sobre a natureza destes substituintes (KATO, 1989).

Esta classe, também, possui atividades biológicas importantes tais como antitumoral, antimicótica e antiviral (UMEZAWA, 2003)

#### 4.2.6.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **S12**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 86) da substância **S12** isolada de acordo com o procedimento apresentado no Esquema 8 p. 92, apresentou um multiplete em 6,79 ppm o qual ao ser relacionado com os outros sinais apresentou integração para três hidrogênios, outro sinal que pode ser notado neste espectro é um simpleto em  $\delta$  5,96 integrando para dois hidrogênios, característico do grupamento dioximetilênico.

O duplete em 4,72 ppm com constante de acoplamento de 4,2 Hz e o multiplete em  $\delta$  3,05 ambos característicos das lignanas furofurânicas, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios oxibenzílicos e os hidrogênios da junção dos anéis furânicos, respectivamente, foram fundamentais para a proposta estrutural da substância **S12**.

Os sinais em  $\delta$  4,24 e  $\delta$  3,87 são condizentes com os deslocamentos dos hidrogênios metilênicos do anel heterocíclico em equatorial e axial (ARRUDA et al., 1994).

É importante notar que para as lignanas simétricas os valores das integrais devem ser multiplicados por dois para que o número de hidrogênios seja condizente com as estruturas propostas.

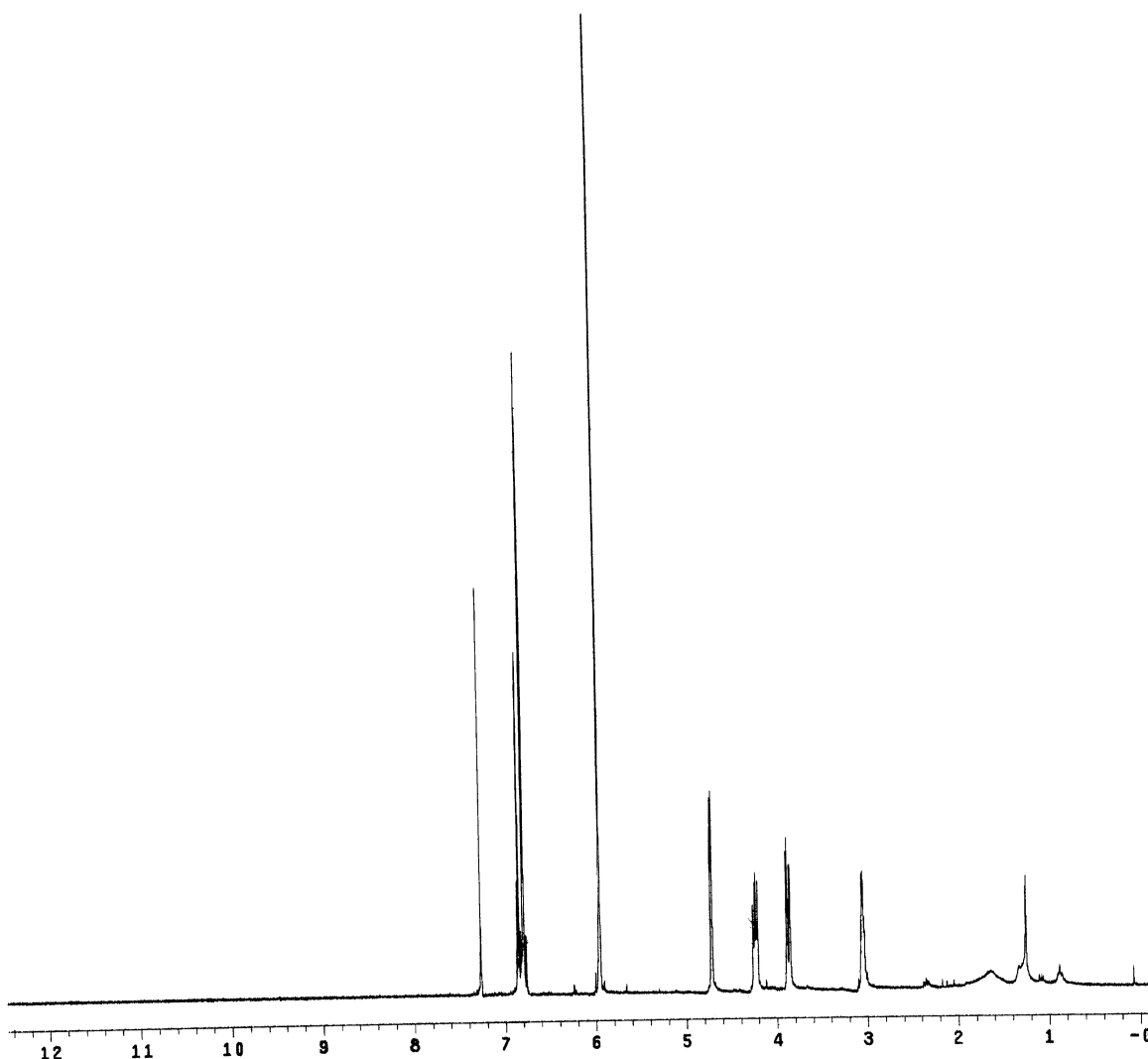


Figura 86 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S12**

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 87) e o de DEPT 138 (Figura 88) corroboraram para a determinação estrutural de **S12**, indicando a presença de um grupamento dioximetilênico com um sinal em  $\delta$  101,3 o qual se apresentou invertido no espectro de DEPT 138.

Os CH em 119,6; 108,4 e 106,7 ajudam a determinar o grau de substituição do anel aromático e o sinal em 86,0 revela o carbono oxibenzílico desta estrutura.

A Tabela 15 apresenta todos os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 138 de **S12**.

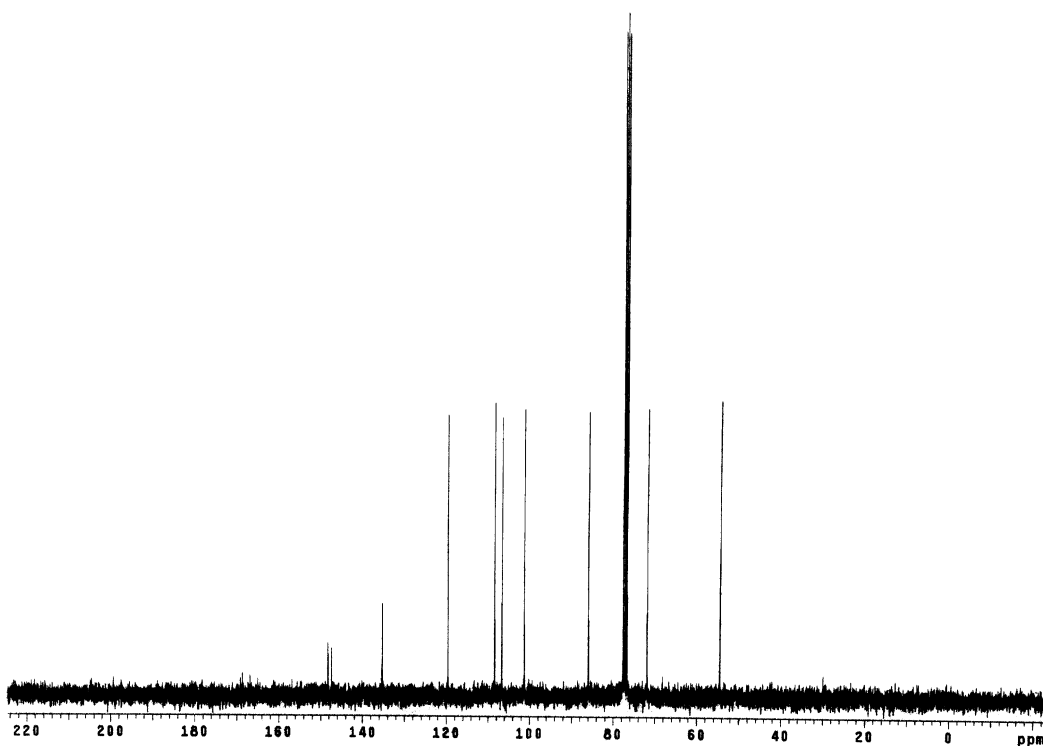


Figura 87 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S12**

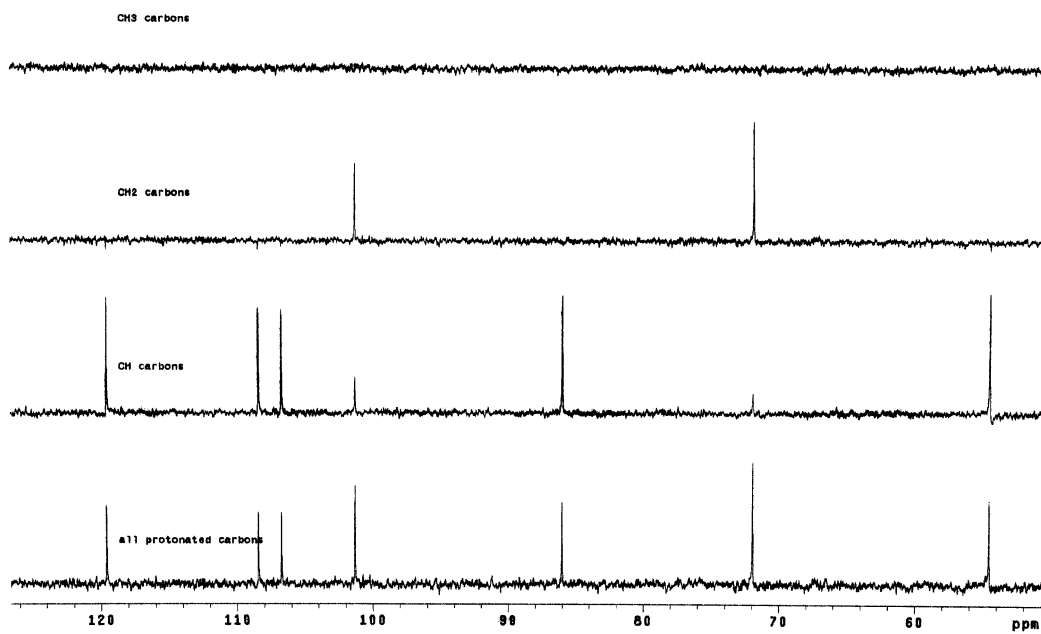


Figura 88 – Espectro de DEPT 135 $^\circ$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de **S12**



Tabela 15 – Dados RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 138 de **S12** e dados da literatura de uma lignana furofurânica.

Carbonos	KATO, 1989	<b>S12</b>	DEPT
1e1'	134,9	135,3	C
2 e 2'	106,3	106,7	CH
3 e 3'	147,7	148,2	C
4 e 4'	146,8	147,3	C
5 e 5'	107,9	108,4	CH
6 e 6'	119,1	119,6	CH
7 e 7'	85,6	86,0	CH
8 e 8'	54,2	54,5	CH
9 e 9'	71,5	71,9	CH <sub>2</sub>
-OCH <sub>2</sub> -	100,9	101,3	CH <sub>2</sub>

A análise dos resultados espectroscópicos e as informações disponíveis na literatura levaram a propor que a substância **S12** (Figura 89) é a lignana furofurânica conhecida com sesamina (HSIEH et al., 2005).

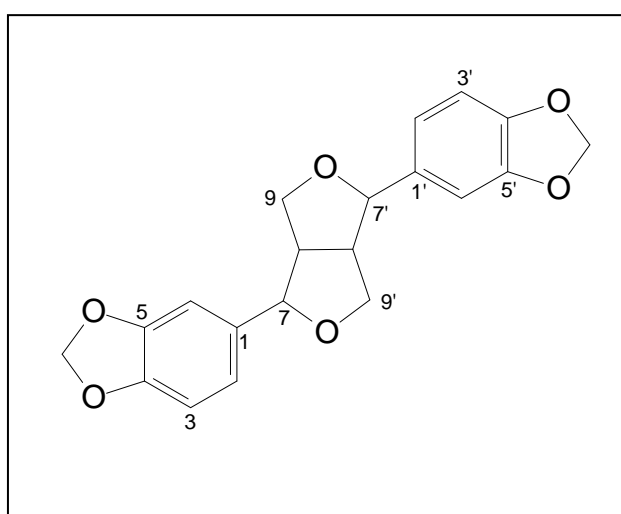


Figura 89 – Estrutura da Sesamina **S12**

#### 4.2.7 TERPENÓIDES

Os terpenóides constituem uma das maiores classes de produtos naturais distribuindo-se amplamente na natureza, sua presença já foi detectada em alguns fungos, organismos marinhos, feromônios de insetos e em suas secreções de defesa além de serem encontrados em abundância nas plantas superiores (ROBBERS, 1997).

Segundo Robbers (1997), nas discussões sobre ecologia química os terpenóides vegetais têm papel muito importante, pois desempenham funções como fitoalexina, repelentes de insetos, agente de atração polínica, agente de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais e moléculas de sinalização.

O termo TERPENÓIDE é empregado para designar todas as substâncias cuja estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno, 2-metil-1,3-butadieno, (Figura 90A).

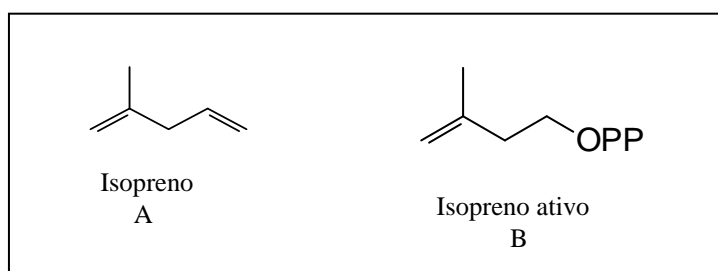


Figura 90 – Unidades isoprênicas

A unidade formadora dos terpenóides é o pirofosfato de isopentenila (IPP), também chamada de ISOPRENO ATIVO (Figura 90B). Estas unidades são originadas biogeneticamente do acetato por via do ácido mevalônico. (ROBBERS, 1997; SIMÕES, 1999).

As condensações das unidades de isopreno ativas irão formar moléculas de cadeias carbônicas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono, através da ação das preniltransferases correspondentes, dando origem assim às diversas classes terpênicas.

#### 4.2.7.1 TRITERPENÓIDES

Os triterpenóides são formados a partir de seis unidades de isopreno e têm como precursor o esqualeno que é um composto acíclico formado por trinta átomos de carbono (Figura 91). A formação dos diferentes esqueletos triterpenicos se dá através dos diversos tipos de ciclização que ocorrem no esqualeno (SIMÕES, 1999).

Apesar de já terem sido isoladas substância com vários esqueletos diferentes, os triterpenóides podem ser divididos em duas grandes classes: os compostos tetracíclicos e os pentacíclicos (SILVA, et al, 1992).

Nos triterpenos pentacíclicos são possíveis distinguir dois sistemas anelares. Os triterpenos do tipo I, oleanano (Figura 91) que são encontrados amplamente nos vegetais, especialmente nas dicotiledoneas. Neste tipo o carbono 3, corresponde ao anel A, se encontra geralmente substituído por um grupo hidroxila ou acetato.

Os do tipo II, lupânico, (Figura 3) são encontrados em bactérias, samambaias, líquenes e plantas superiores. Este esqueleto básico apresenta, geralmente, uma cadeia isopropílica no átomo de carbono-19 ou no carbono-21 ambos no anel E (Silva, 1992)

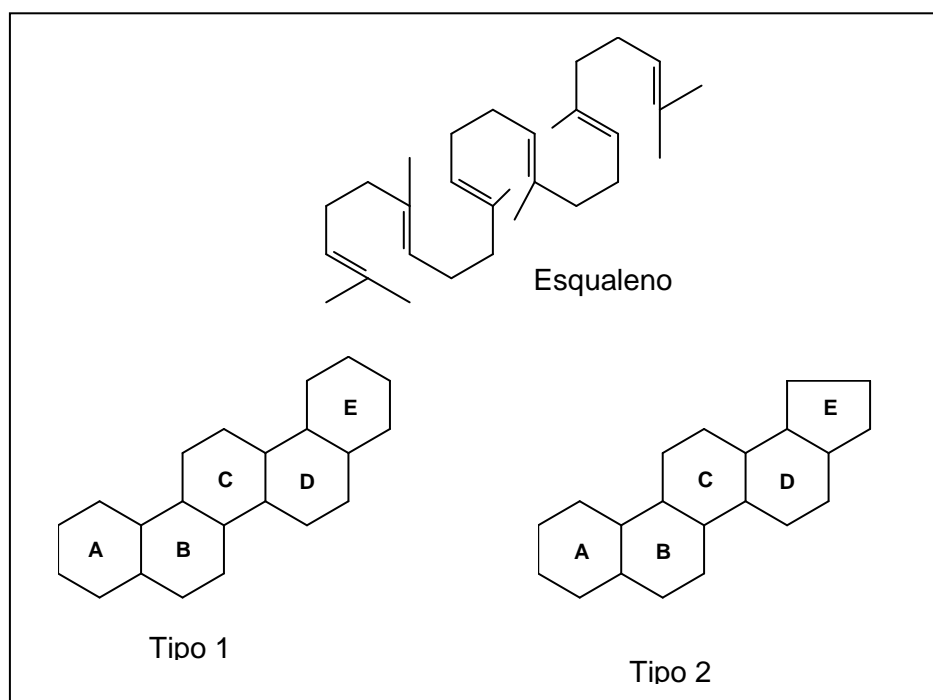


Figura 91 – Tipos de ciclizações do esqualeno

#### 4.2.7.1.1 Identificação da Substância **S13**

Como demonstrado no Quadro 5 (p. 112) a substância **S13** foi isolada em todas as espécies estudadas.

Seu espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figura 92) apresentou sete singletos, na região entre 0,7 e 1,8 ppm, sinais estes, atribuídos a grupos metílicos de um esqueleto triterpênico. Sendo o sinal em  $\delta$  1.68, indicativo de uma metila em posição alílica.

Ainda neste espectro foi observada a presença de dois dupletos em  $\delta$  4,69 e 4,57 ppm ambos integrando para um hidrogênio e com  $J = 2,4$ Hz, sinais estes característicos de prótons olefínicos geminais.

Outro sinal presente neste espectro é um duplo duplo em  $\delta$  3,20 com  $J=10,5$  e  $5,7$ Hz. Este sinal é indicativo da presença de um hidrogênio carbinólico e a multiplicidade do sinal sugere que este hidrogênio esteja acoplado com os hidrogênios diastereotópicos em C2. A Tabela 14 apresenta todos os dados de RMN<sup>1</sup>H e suas respectivas comparações com a literatura.

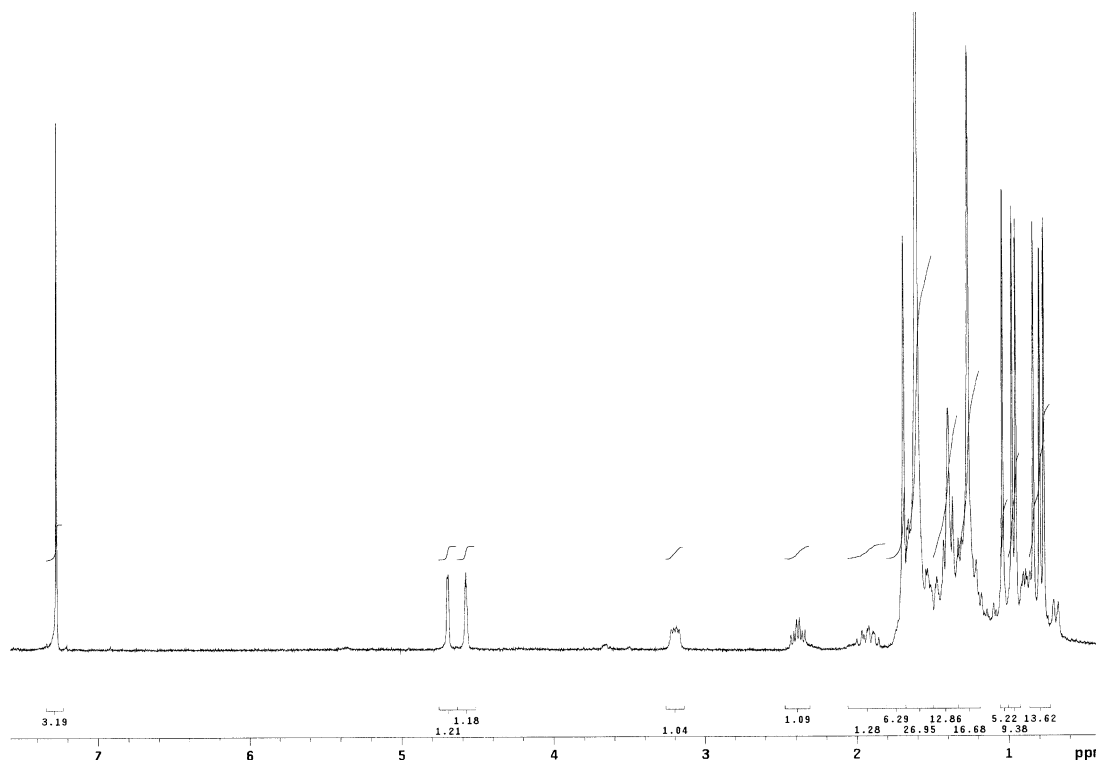
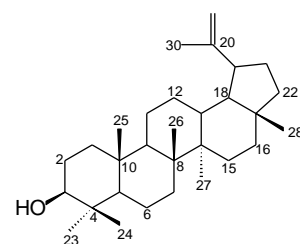


Figura 92 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de **S13**

Tabela 16 – Apresentação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de **S13** e triterpeno da literatura

	S13	WEBER, 2005; SEGER, 1997
C29	4,69 (d) J = 2,4Hz 1H	4,68 (d, 1H)
C29	4,57 (d) J = 2,4Hz 1H	4,5 (d, 1H)
C3	3,20 (dd) J=10,5 e 5,7Hz 1H	3,18 (dd, 1H J=12 e 8 Hz)
CH <sub>3</sub> -23	0,97	0,96
CH <sub>3</sub> -24	0,77	0,76
CH <sub>3</sub> -25	0,83	0,83
CH <sub>3</sub> -26	0,95	0,94
CH <sub>3</sub> -27	1,03	1,03
CH <sub>3</sub> -28	0,79	0,79
CH <sub>3</sub> -30	1,68	1,67

O espectro de  $^{13}\text{C}$  apresentou 30 sinais os quais encontram-se listados na Tabela 15. Os sinais em  $\delta$  150 e  $\delta$  109 sugeriram um esqueleto lupano e o sinal em  $\delta$ 78,9, sugeriu a presença de uma hidroxila em C3 na face beta (OLEA & ROQUE 1990).

É importante salientar que por convenção a face beta é aquela onde se encontram grupos metila angulares (SOLOMONS, 2000 p. 379).

Tabela 17 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do lupeol e de **S13**

Carbono	REYNOLDS et al, 1986	<b>13</b>
C1	38,67	38,7
C2	27,35	27,3
C3	78,94	78,9
C4	38,81	38,8
C5	55,25	55,2
C6	18,28	18,3
C7	34,23	34,2
C8	40,78	40,8
C9	50,38	50,4
C10	37,11	37,1
C11	20,89	20,9
C12	25,08	25,1
C13	38,00	38,0
C14	42,78	42,8
C15	27,41	27,4
C16	35,54	35,5
C17	42,95	42,9
C18	48,24	48,2
C19	47,94	47,9
C20	150,88	150,8
C21	29,80	29,9
C22	39,96	39,9
C23	27,95	27,9
C24	15,35	15,3
C25	16,09	16,1
C26	15,94	15,9
C27	14,51	14,5
C28	17,97	17,9
C29	109,31	109,3
C30	19,28	19,3

Desta forma, a análise dos dados e a comparação dos mesmos com a literatura indicaram que a substância denominada de S13 tratava-se do triterpeno lupeol (REYNOLDS et al, 1986)

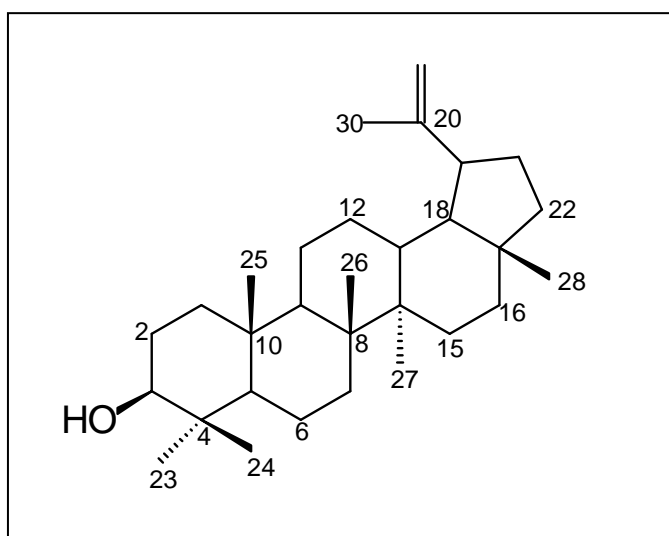


Figura 93 – Estrutura do Lupeol **S13**

#### 4.2.7.2 MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS

Monoterpenóides e sesquiterpenóides são terpenóides com dez e quinze átomos de carbonos, respectivamente. Estas substâncias podem ser extraídas de plantas, e juntamente com os fenilpropanóides, formam os principais constituintes de misturas odoríferas conhecidas como óleo essencial ou óleo volátil (SOLOMONS, 2000 p. 374).

Plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae entre outras (SIMÕES 1999).

Embora a maior utilização dos óleos voláteis ocorra nas áreas de alimento (condimentos e aromatizante de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene), também na medicina, drogas vegetais ricas em óleo volátil são

empregadas in natura para a preparação de infusões e/ou sob a forma de preparações galênicas simples (SIMÕES 1999).

Muitos óleos voláteis já tiveram seu potencial farmacológico avaliado e demonstraram que possuem diversas ações, como por exemplo: ação carminativa, antiespasmódica, estimulante sobre secreções do aparelho digestivo, cardiovascular, revulsivante, secretolítica, ação sobre o sistema nervoso central, anestésica local, antiinflamatória e anti-séptica (SIMÕES 1999).

Os estudos sobre esta matéria-prima têm se intensificado e vem se mostrando bastante promissores. Por exemplo, os óleos de folhas e dos frutos de *Z. rhoifolium* mostraram-se ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella setúbal* (Gonzaga et al 2003a). Aliado a isso, o pouco conhecimento sobre a composição dos óleos essenciais das espécies de *Zanthoxylum*, nativos do Brasil, nos levaram a esta investigação.

#### 4.2.7.2.1 Identificação dos Metabólitos Presentes nos Óleos Essenciais das Folhas de *Z. tingoassuiba*

O procedimento utilizado para a obtenção do óleo essencial das folhas de *Z. tingoassuiba* está descrito nas páginas 101-103.

A composição da mistura foi avaliada inicialmente utilizando-se um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-IC) de acordo com as condições descritas na página 73. Este procedimento teve como objetivo o conhecimento prévio da amostra, ajudando a estabelecer as melhores condições de análise a ser utilizada na cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), tanto da amostra como da mistura amostra e padrão interno, este, formado por uma mistura de N-alcanos (C9 – C19), a qual foi adicionada à amostra.

Além disso, a análise da amostra por CG-IC (Figura 95) também contribuiu com a identificação dos compostos individuais através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra e do padrão, utilizando o algoritmo proposto por Kováts.



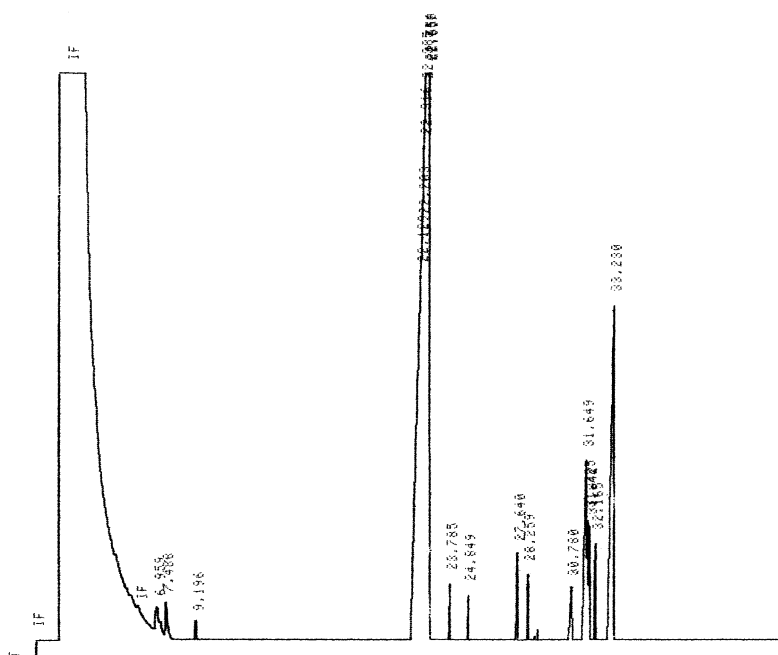


Figura 94 – Cromatograma de CG/IC do óleo

A determinação da composição de óleos voláteis utilizando um padrão interno foi desenvolvida pelo Dr. Ervin Kováts em 1958, onde o cientista propõe um sistema de índice de retenção (The Retention Index System) ou Índice de Kovats (IK) que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, ambos analisados em idênticas condições (SIMÕES, 1999).

Robert P. Adams (2001), na sua publicação intitulada “Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy” além de dar uma grande contribuição para o entendimento da cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas, traz também uma lista de informações, como por exemplo: tempo de retenção; índice de Kovats; fórmula estrutural e espectro de fragmentação de massas de diversas substâncias encontradas em óleos voláteis. Este trabalho vem sendo utilizado correntemente pela comunidade científica e também foi utilizado neste trabalho.

Após a análise da amostra através da CG-IC, a mesma foi analisada utilizando-se a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (Figura 96), cujas especificações estão descritas na página 73, o padrão interno também foi utilizado neste procedimento (Figura 97).

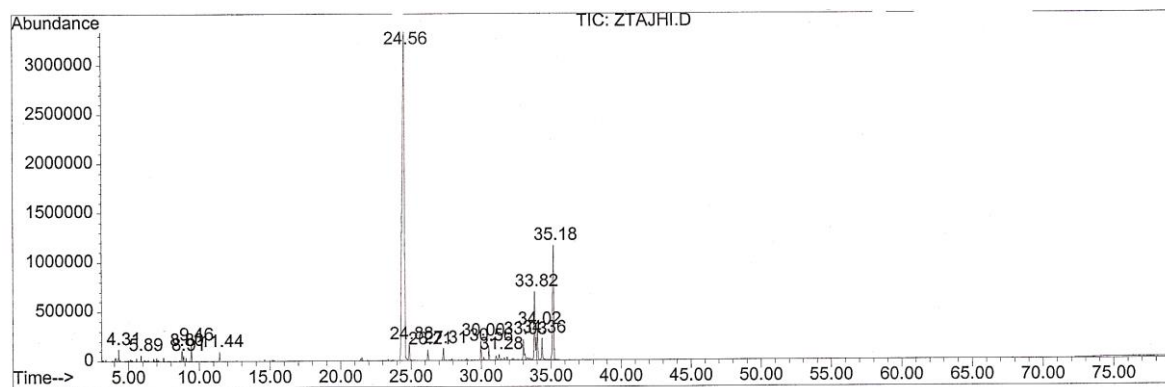


Figura 95 – Cromatograma de íons totais do óleo volátil obtido por CG/EM (70 eV)

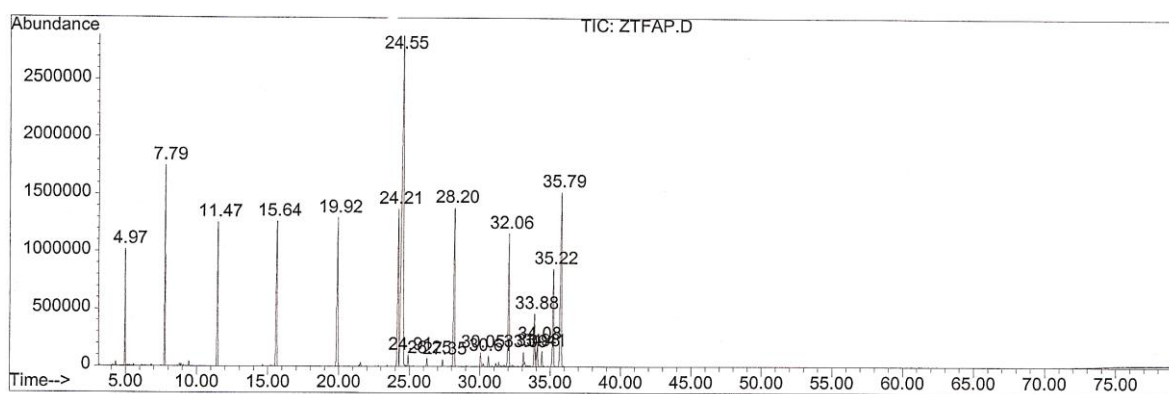


Figura 96 - Cromatograma de íons totais do óleo volátil obtido por CG/EM (70 eV) + padrão de n-alcenos

O CG/EM está equipado com uma biblioteca de espectros, denominada Mass Spectral Library 1.6, onde, através de comparações entre as informações contidas no seu banco de dados e os dados provenientes das fragmentações das amostras, sugere a identificação da substância com o maior índice de confiança possível. As Figuras 98 - 112 apresentam os espectros de massas obtidos.

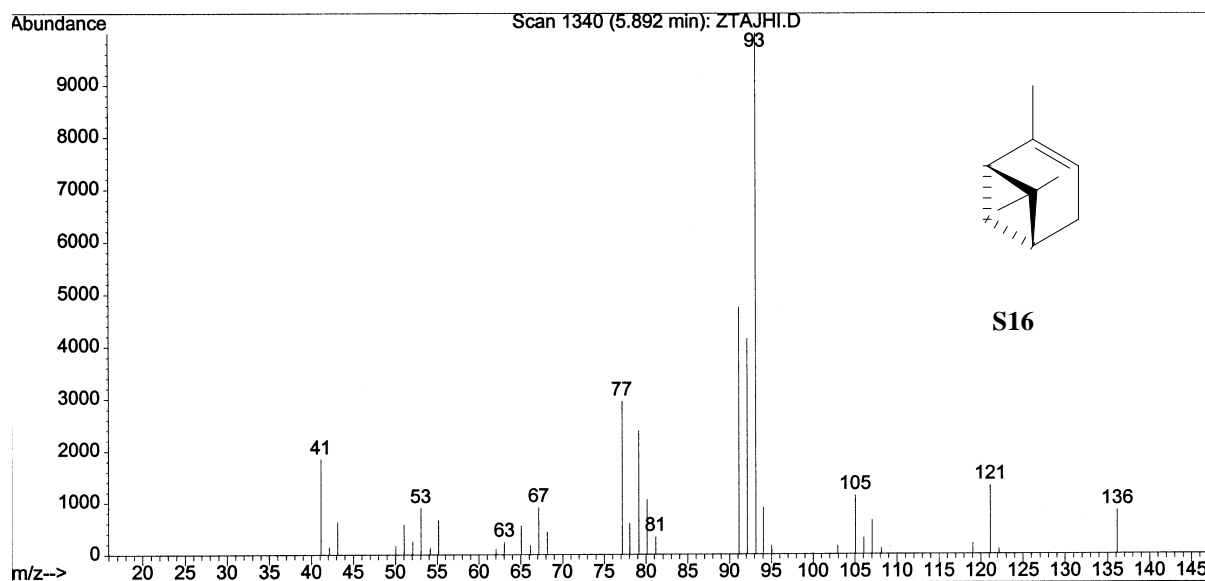


Figura 97 - Espectro de Massas (70 eV)  $\alpha$ -pineno

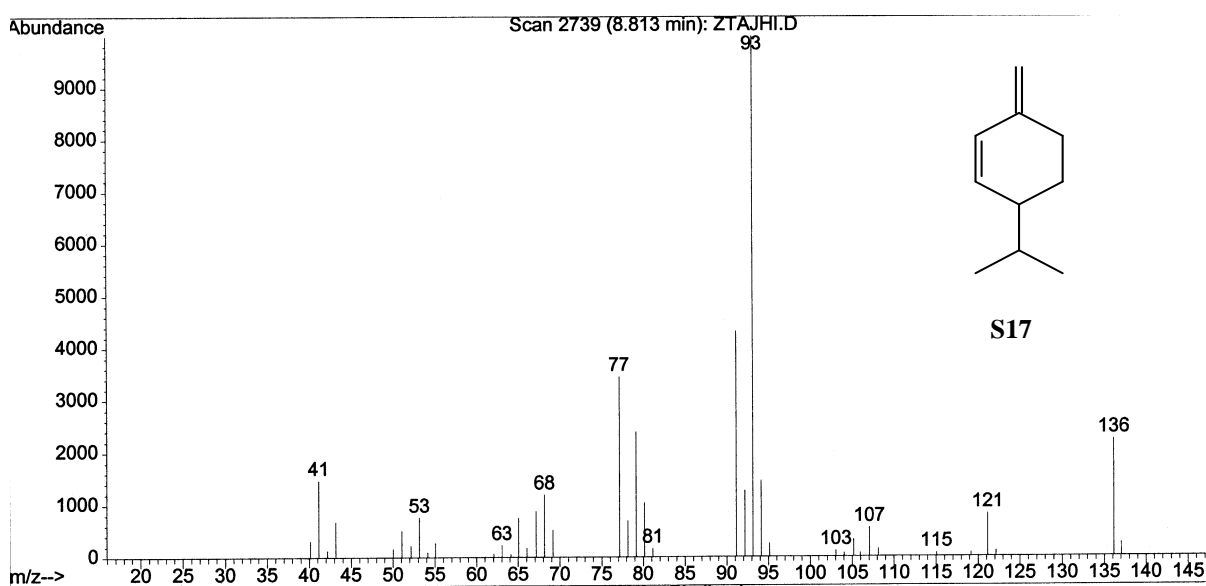


Figura 98 - Espectro de Massas (70 eV)  $\beta$ -felandreno

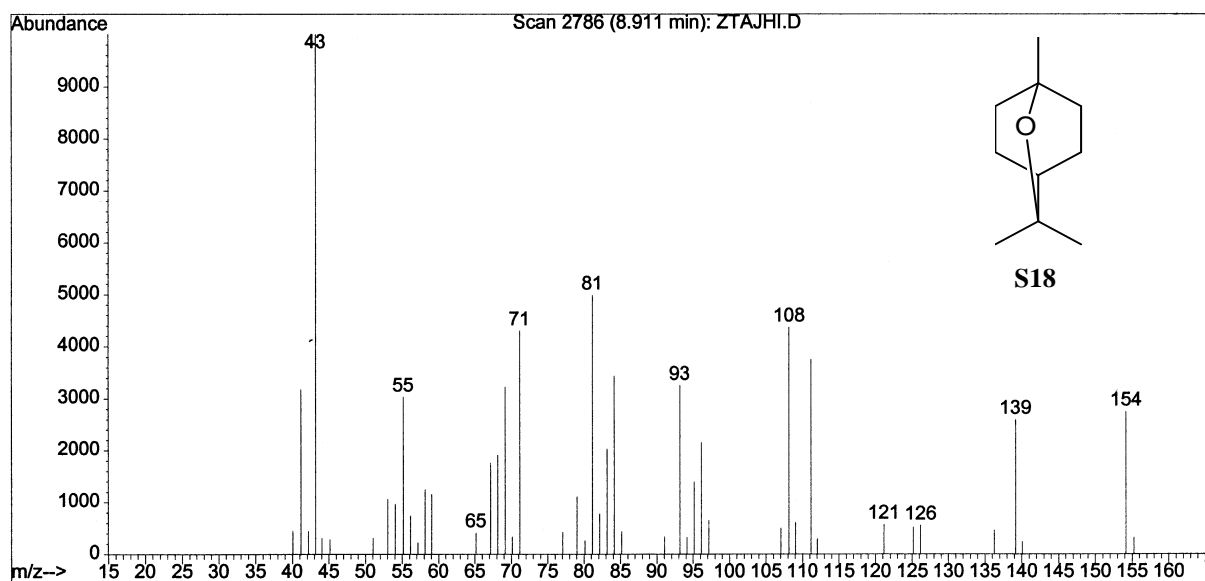


Figura 99 - Espectro de Massas (70 eV) do eucalipitol

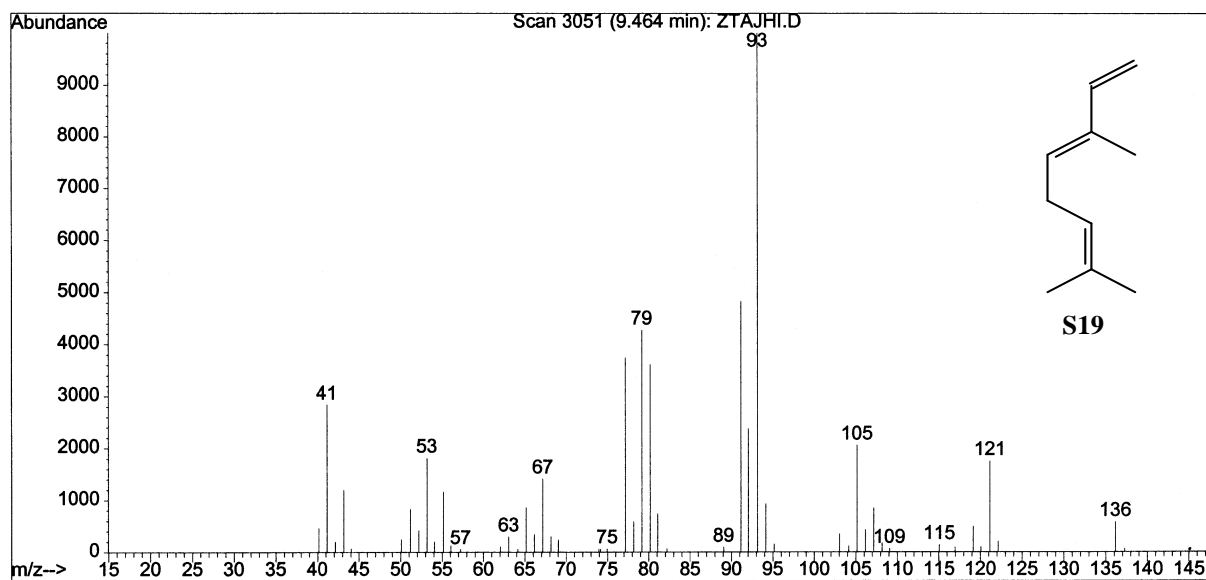


Figura 100 - Espectro de Massas (70 eV) do trans-ocimeno

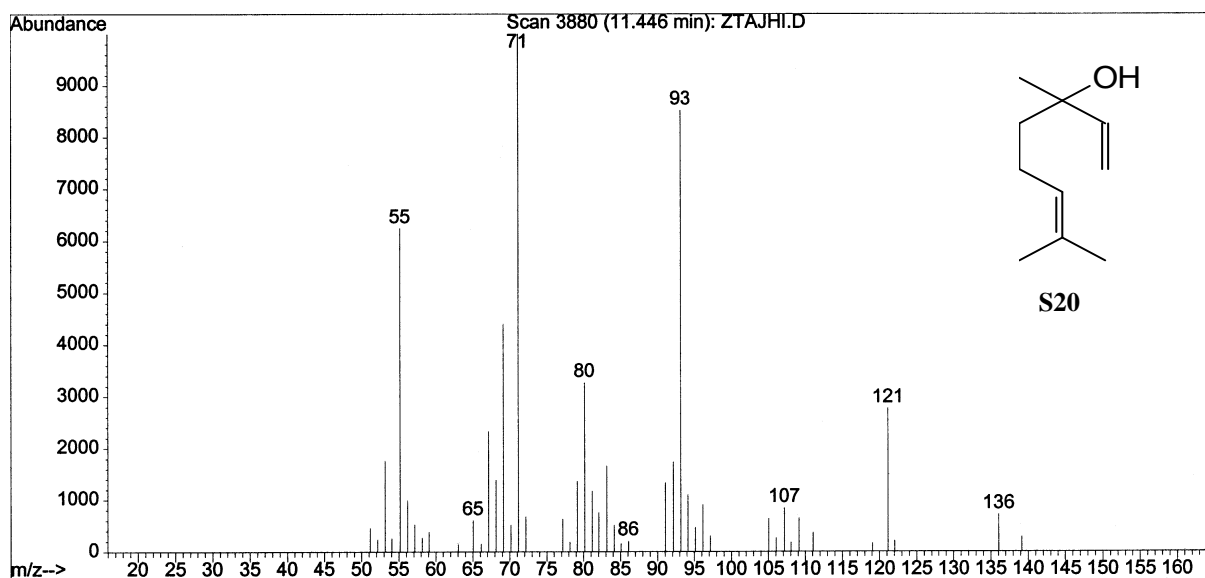


Figura 101 - Espectro de Massas (70 eV) do linalol

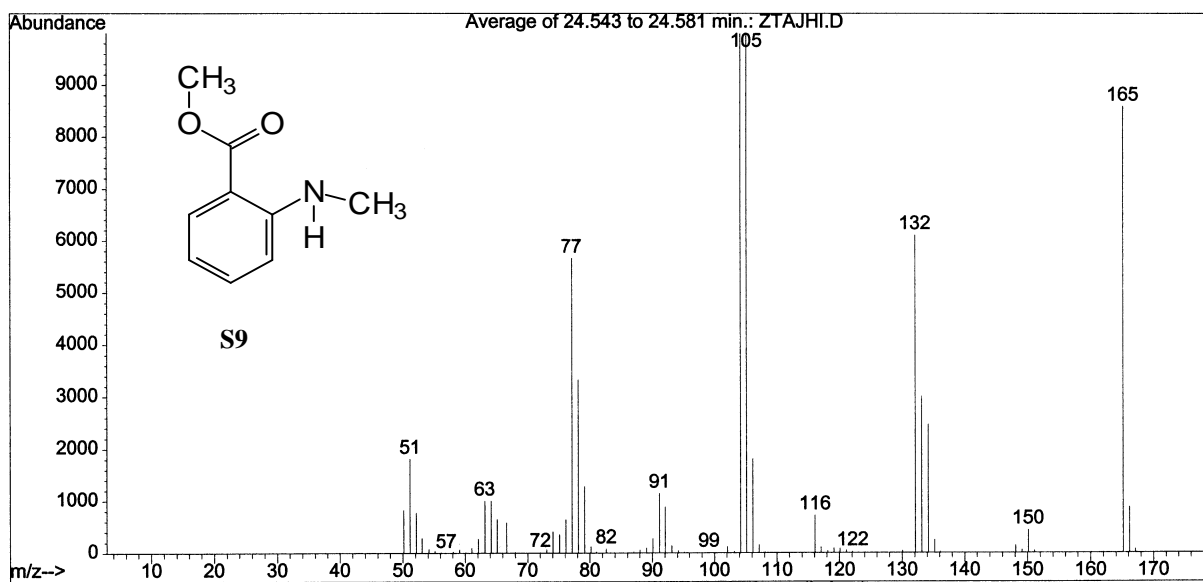


Figura 102 - Espectro de Massas (70 eV) do N-metil antranilato de metila

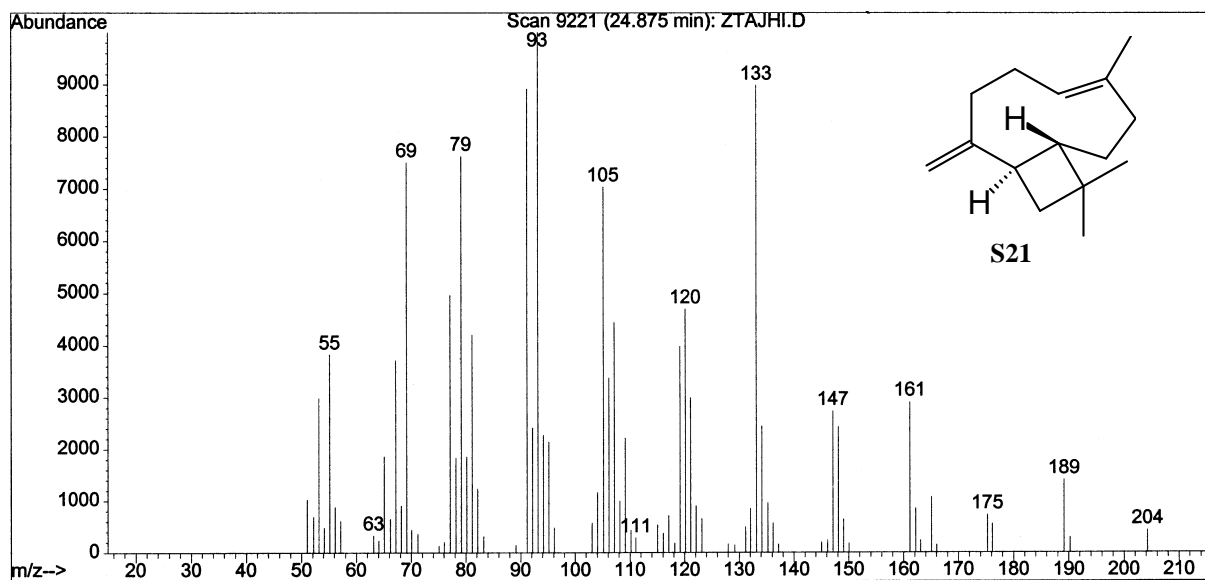


Figura 103 - Espectro de Massas (70 eV) do cariofileno

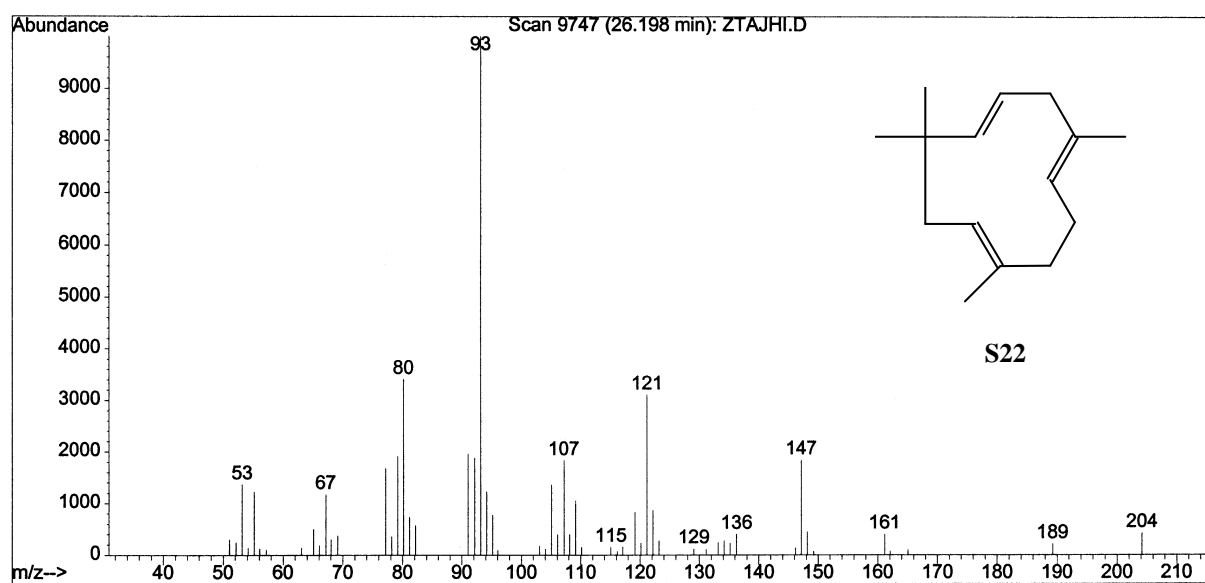


Figura 104 - Espectro de Massas (70 eV) do  $\alpha$ -humuleno

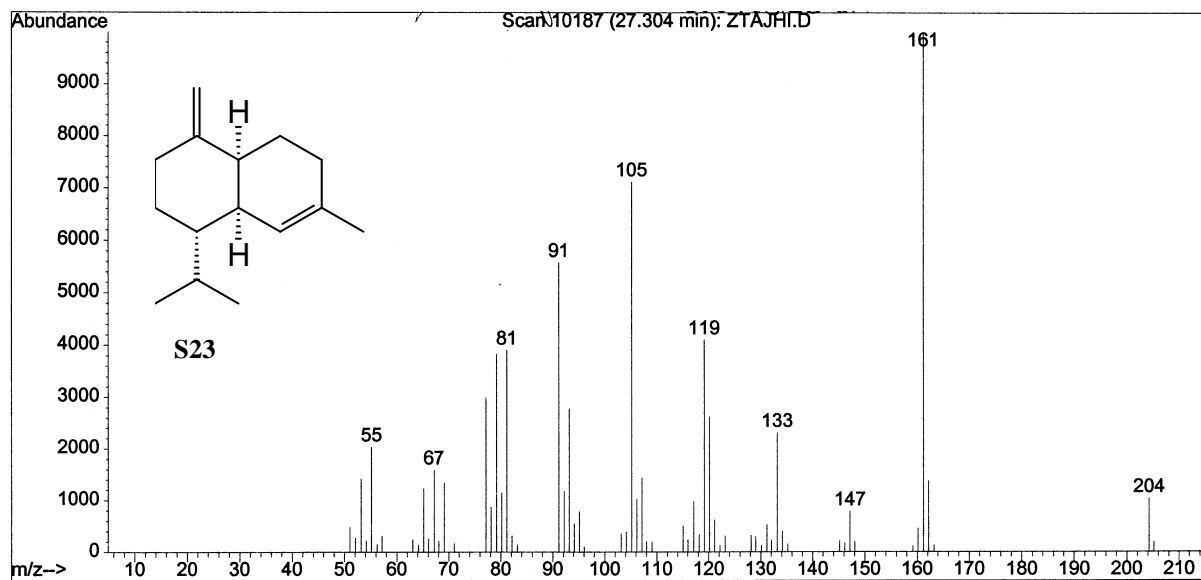
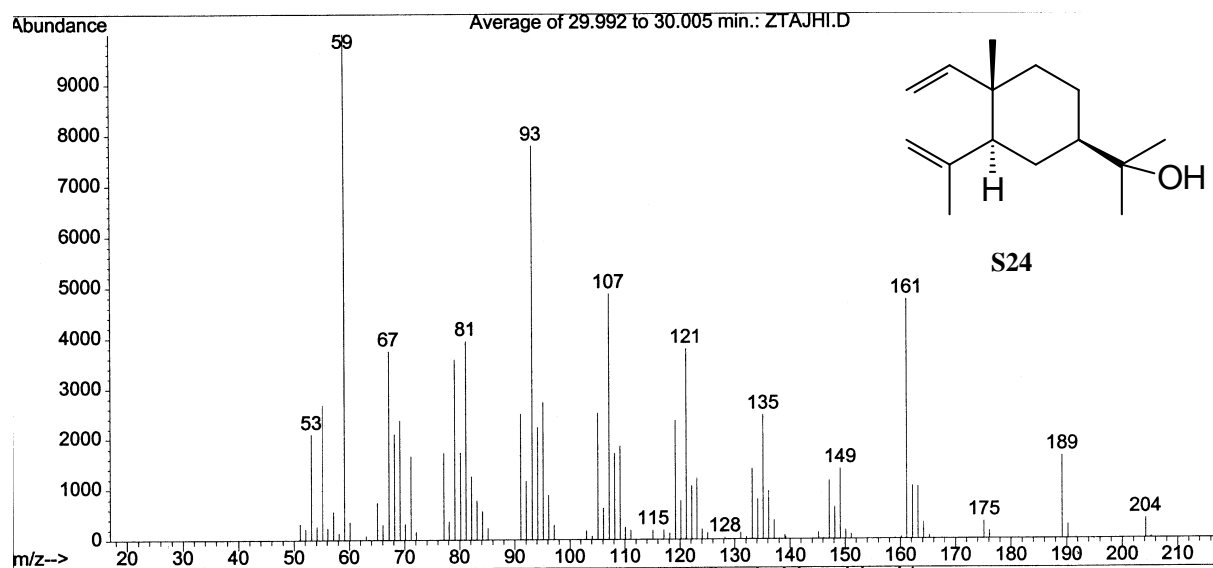
Figura 105 - Espectro de Massas (70 eV) do  $\gamma$ -muroloeno

Figura 106 - Espectro de Massas (70 eV) do elemol

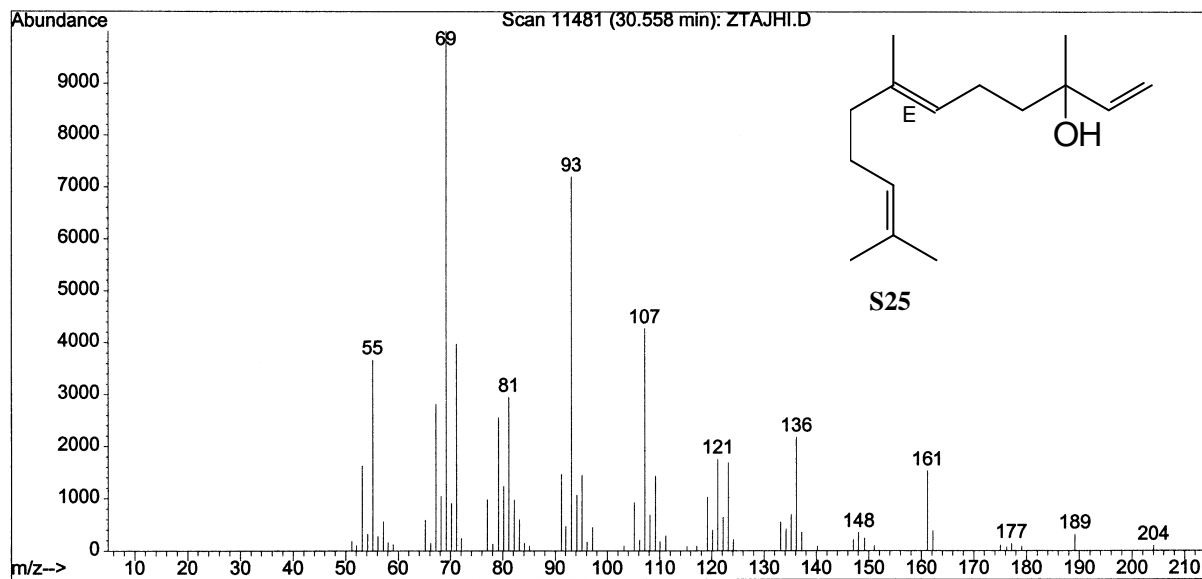


Figura 107 - Espectro de Massas (70 eV) do neroliol

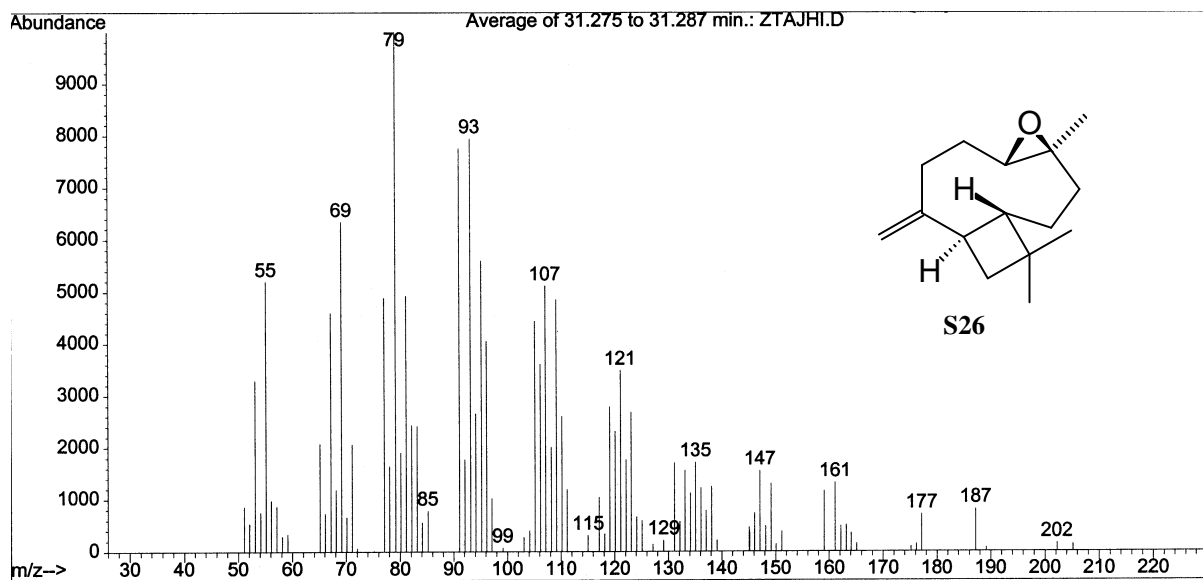


Figura 108 - Espectro de Massas (70 eV) do oxi-cariofileno



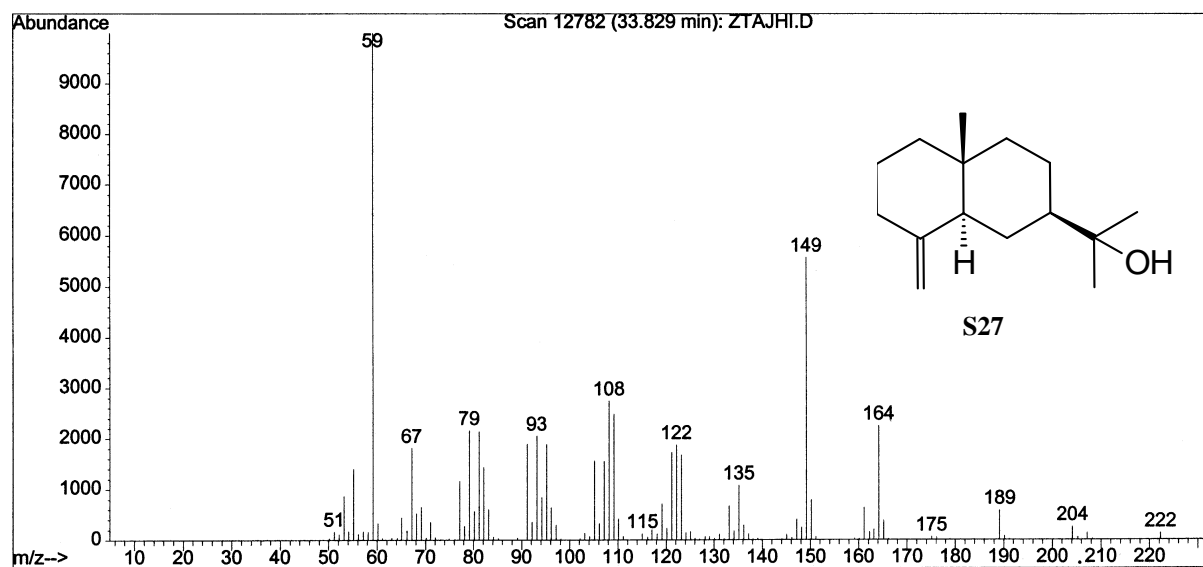


Figura 109 - Espectro de Massas (70 eV) do  $\beta$ -eudesmol

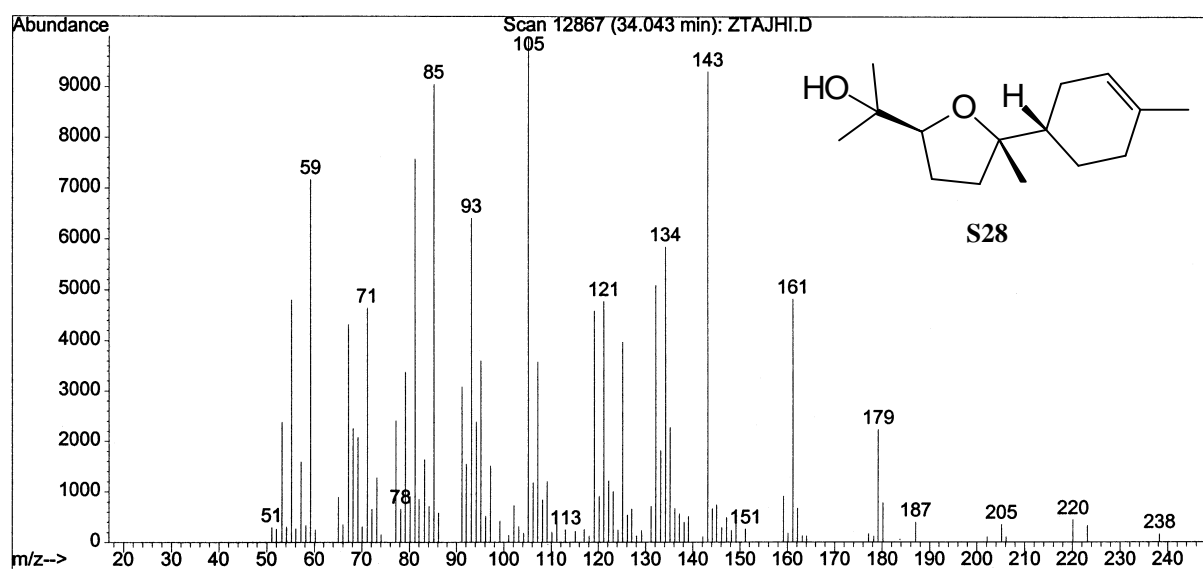


Figura 110 - Espectro de Massas (70 eV) do oxi- $\alpha$ -bisabolol

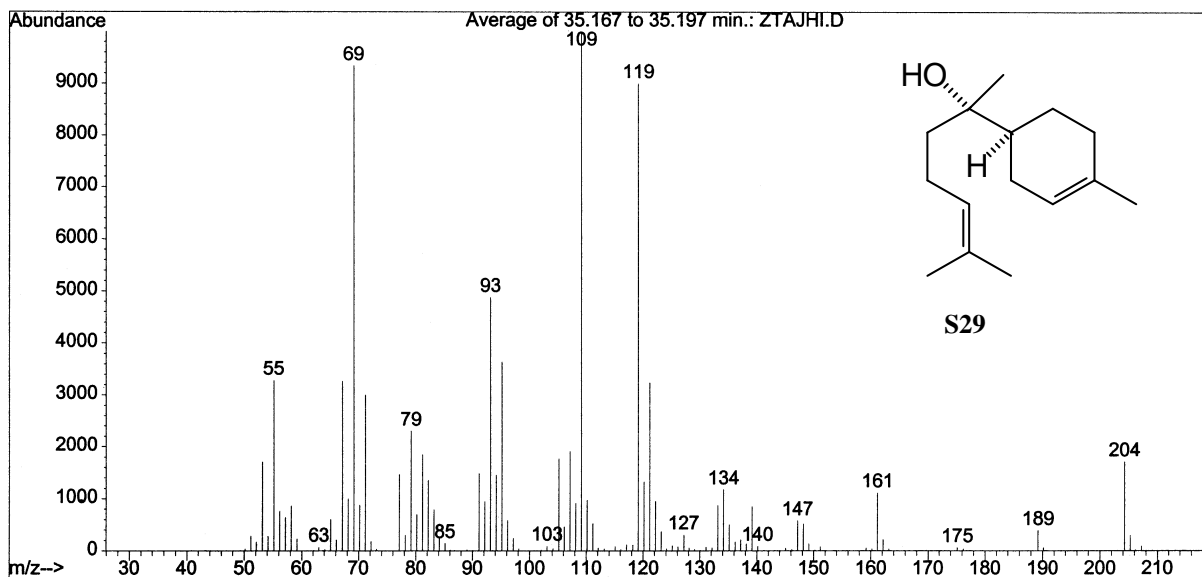


Figura 111 - Espectro de Massas (70 eV) do  $\alpha$ -bisabolol

A união destas informações revelou a composição do óleo essencial das folhas de *Z. tingoassuiba*. A qual esta mostrada na Tabela 15.

Onde também estão listados os índices de Kovats da amostra (IK<sub>S</sub>) e os encontrados na literatura (IK<sub>L</sub>). Além disso, também estão presentes o tempo retenção (Tr) de cada substância e a quantidade de cada componente na amostra representada pelo percentual de área (%A) fornecido pelo equipamento. É importante salientar que as substâncias com %A inferiores a 0,2% não foram identificadas.

Tabela 18 – Composição do óleo volátil das folhas de *Z. tingoassuiba*.

Amostras	Componentes	IK <sub>L</sub>	IK <sub>S</sub>	Tr (min)	%A
<b>S16</b>	$\alpha$ -pineno	939	938	5,89	0,27
<b>S17</b>	$\beta$ -felandreno	1030	1032	8,81	0,63
<b>S18</b>	eucaliptol	1031	1035	8,91	0,30
<b>S19</b>	trans-ocimeno	1050	1050	9,45	0,81
<b>S20</b>	linalol	1097	1099	11,45	0,50
<b>S8</b>	N-metil antralitato de metila	1406	1408	24,56	66,38
<b>S21</b>	cariofileno	1419	1419	24,88	1,15
<b>S22</b>	$\alpha$ -humuleno	1455	1453	26,20	0,74
<b>S23</b>	$\gamma$ -muroleno	1480	1480	27,30	0,83
<b>S24</b>	elemol	1550	1548	29,30	1,33
<b>S25</b>	neroliol	1563	1563	30,56	0,97
<b>S26</b>	oxide cariofileno	1583	1581	31,28	0,42
<b>S27</b>	$\beta$ -eudesmol	1651	1651	33,83	7,11
<b>S28</b>	oxi- $\alpha$ bisabolol	1658	1657	34,04	2,38
<b>S29</b>	$\alpha$ -bisabolol	1686	1686	35,17	11,60

Analisando, simultaneamente, a Tabela 15 e a Figura 96 podemos notar que o cromatograma apresenta uma divisão entre os sinais em dois blocos. No primeiro bloco as substâncias possuem tempo de retenção entre 6 e 9 minutos, e no segundo bloco entre 22 e 33 minutos, ao verificarmos no quadro a composição dos blocos podemos notar que o primeiro bloco é constituído por monoterpenos e o segundo bloco é constituído basicamente por sesquiterpenos com exceção de **S8**.

Podemos também observar que as substâncias **S8** e **S29** são os compostos majoritários da mistura, com 66,38 e 11,60% da mistura respectivamente.

A análise de RMN <sup>1</sup>H da mistura confirma a presença majoritária da substância **S8** (Figura 72). Como esta substância foi isolada no decocto das folhas sua discussão estrutural foi realizada nas páginas 155 a 157.

#### 4.2.7.2.2 Composição do Óleo Volátil Extraído por CO<sub>2</sub> Super Crítico

A extração por dióxido de carbono supercrítico utiliza esta substância sob extrema pressão (200 atmosferas) e temperatura mínima de 33 °C para extrair óleos essenciais. As partes da planta a serem empregadas na extração são postas no tanque onde é injetado dióxido de carbono super crítico (em estado entre o líquido e o gasoso) que age como solvente. Quando a pressão diminui, o dióxido de carbono retorna a seu estado gasoso, não deixando qualquer resíduo no produto.

Muitas das extrações por CO<sub>2</sub> possuem um fresco, claro e característico aroma de óleos destilados a vapor, e eles cheiram de forma muito similar à planta viva. Estudos já demonstraram que os óleos essenciais extraídos por este método mantêm em completa integridade seus compostos ativos.

Consideramos este método como sendo o que permite se obter os óleos essenciais de melhor qualidade possível e de maior potência terapêutica (COSTA et al.; 2006).

A extração com fluido supercrítico tem sido considerada uma alternativa dentro dos métodos de extração convencionais. Além disso, vem se tornando o método de escolha para a extração industrial de óleo volátil (SANTANA et. al., 2006).

As principais vantagens deste método são: minimização dos tratamentos químicos e térmicos empregados durante um estudo fitoquímico, além de ser considerado um método ecologicamente correto (SANTANA et. al., 2006).

Neste método nenhum traço de solvente permanece no produto, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. A extração seletiva pode ser desenvolvida bastando encontrar condições metodológicas adequadas para o produto de interesse (SIMÕES, 1999; COSTA et al.; 2006).

As condições experimentais (Figura 23 p. 103 e Esquema 19 p.103) do presente estudo foram selecionadas de trabalhos anteriores os quais estavam baseados em extração de óleo volátil e/ou enriquecimento de um extrato através da extração seletiva, sempre, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico (SANTANA et. all., 2006; COSTA et al., 2006; ROSATO et al., 2006).

Como descrito no Esquema 19 as folhas frescas e secas de *Z tingoassuiga* além de serem submetidas a uma hidrodestilação originando os extratos (ZTOFF) e (ZTOFS) também foram submetidas a extração com fluido supercrítico dando origem ao extrato (ZTOFFSc) e (ZTOFSSc) respectivamente.

A Tabela 16 apresenta dos rendimentos e o componente majoritário de cada fração de acordo com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 113 a 116).

Tabela 19 – Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e Fluido Supercrítico

	ZTOFF	ZTOFS	ZTOFFSc	ZTOFSSc
Componente majoritário	N-metil antralilato de metila	N-metil antralilato de metila	Xantotoxina e N-metil antralilato de metila	Xantotoxina e N-metil antralilato de metila
Rendimento do óleo essencial	0,7%	0,2%	0,1%	0,3%

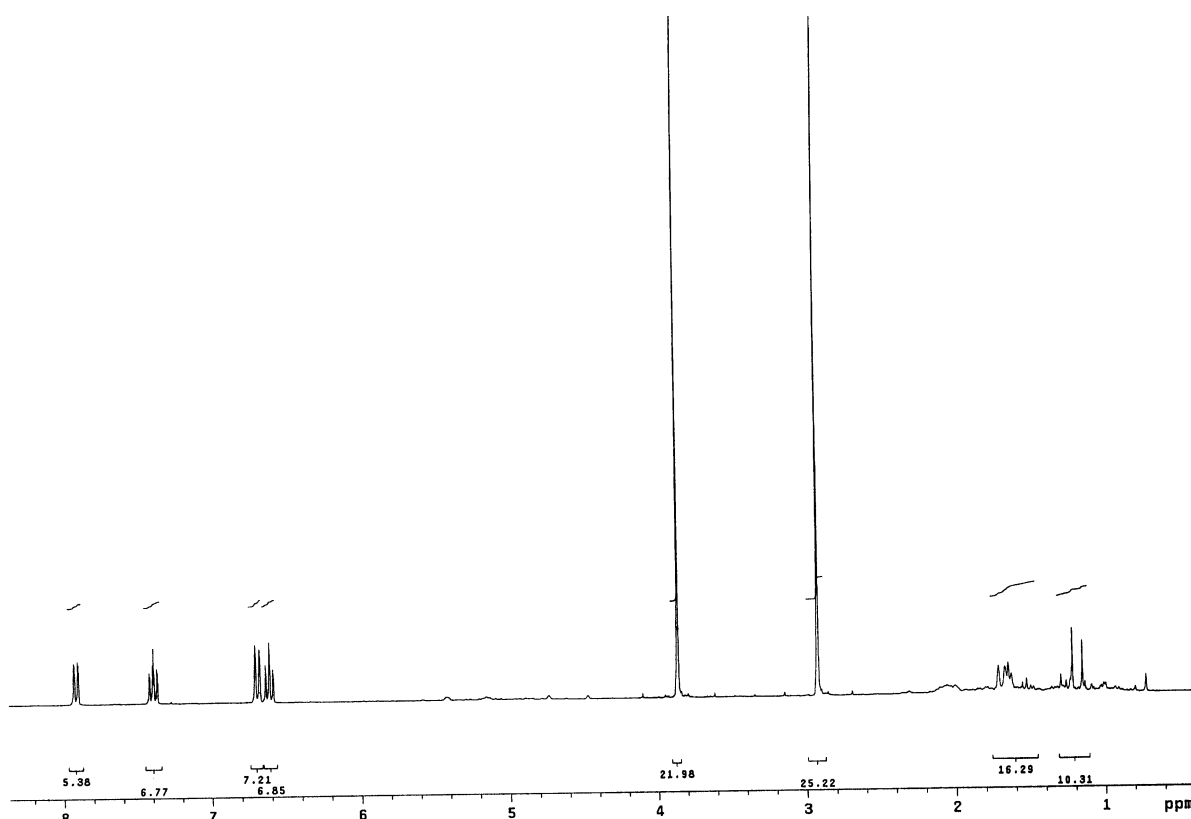


Figura 112 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFF

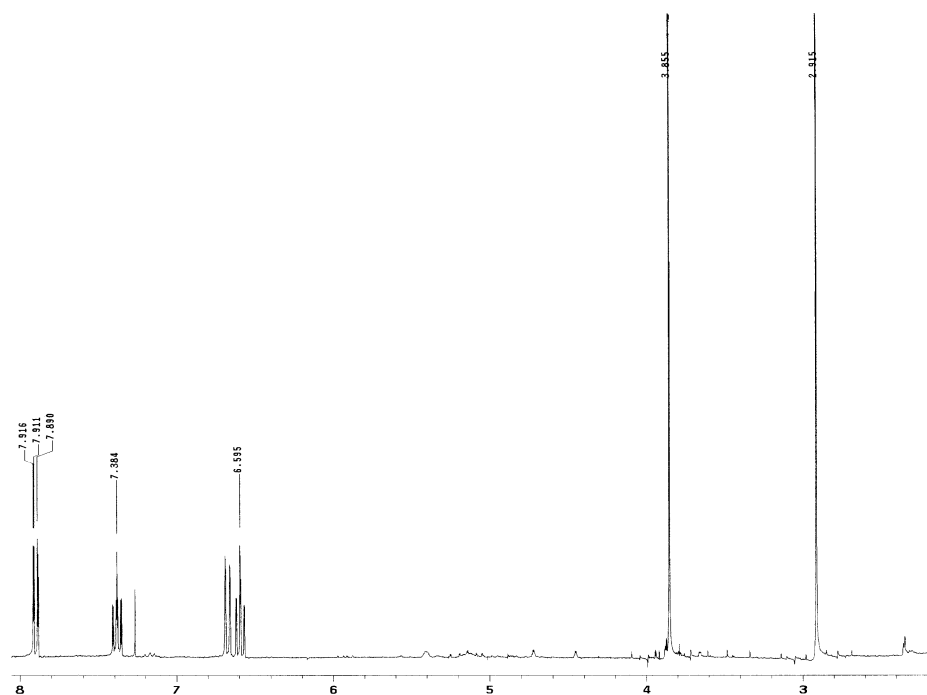


Figura 113 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFS

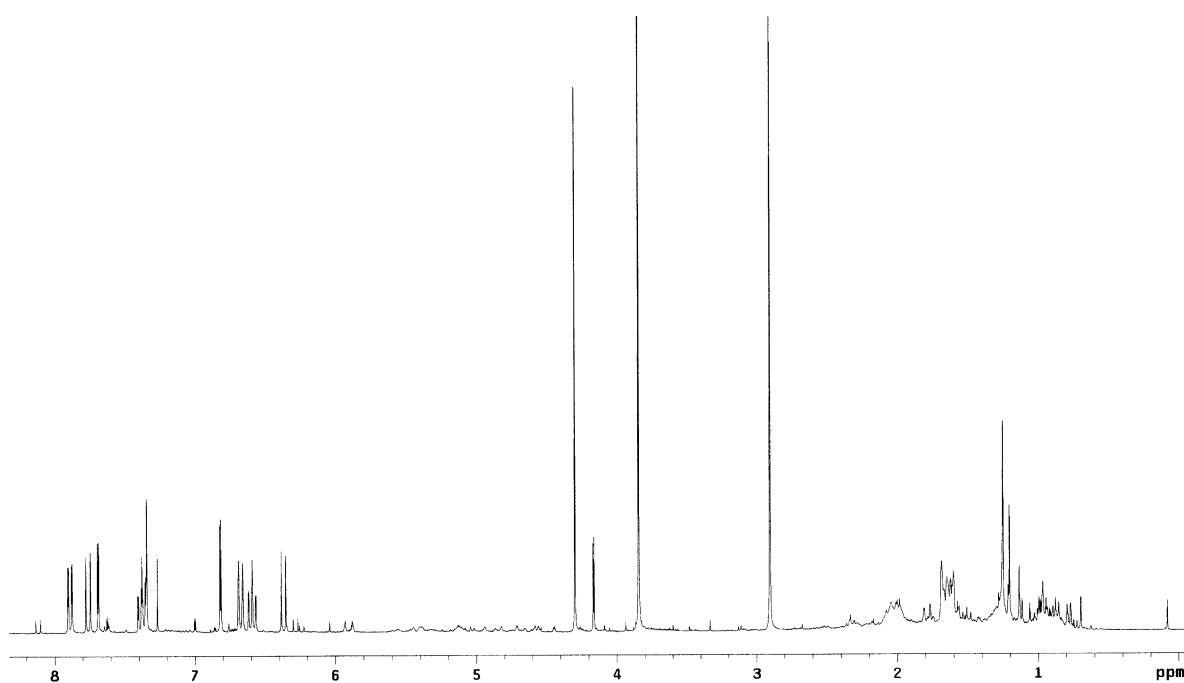


Figura 114 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFFSc

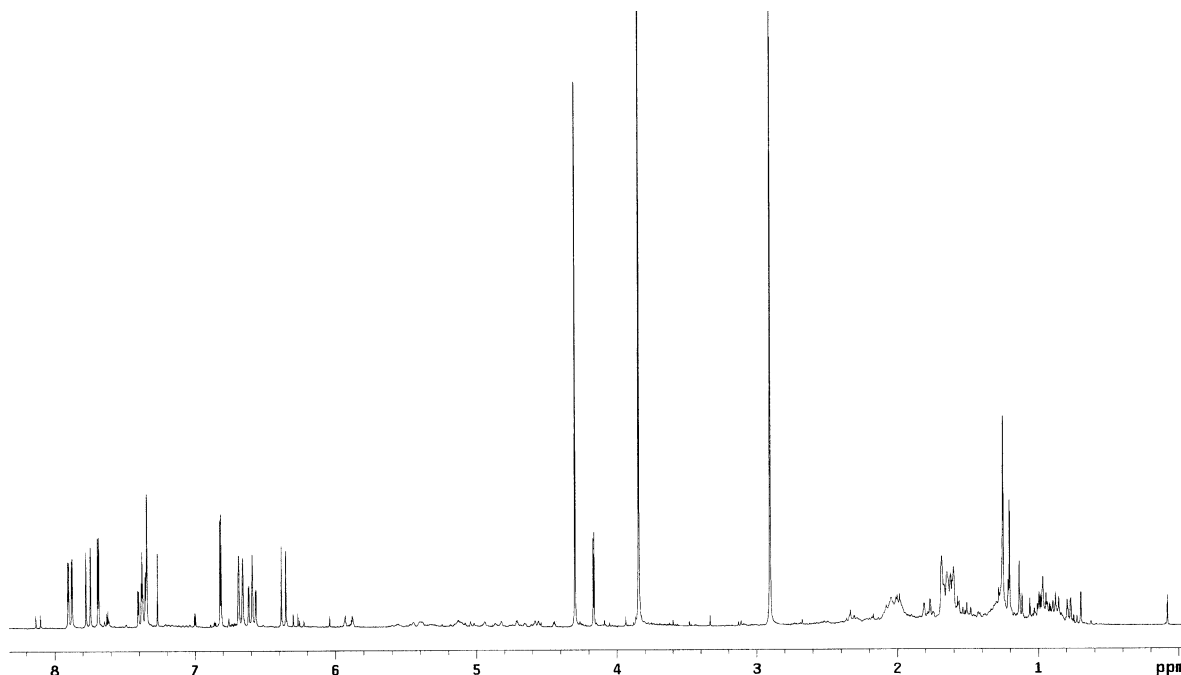


Figura 115 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do Extrato ZTOFSSc

#### 4.2.8 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES NA CERA EPICUTICULAR DAS FOLHAS DE *Z. tingoassuiba*

A evolução química e biológica tem levado os organismos vivos a desenvolverem estratégias para a sua proteção. Uma destas estratégias é a formação de cera (EGLINTON et al., 1962).

A cera é uma mistura de substância de natureza lipídica e polimérica que encontra-se distribuída sobre a superfície dos seres vivos de habitat terrestre formando uma delgada camada que os isolam e os protegem do meio externo (MOYNA e HEINZEN, 1999).

Este material pode ser extraído de várias fontes naturais e tem sido utilizado pelo homem desde os tempos remotos (MOYNA e HEINZEN, 1999).

Pode-se citar como exemplo a cera de carnaúba e a cera de carandá que são ceras de origem vegetal e são utilizadas largamente na indústria para manufatura de velas e cera para sapatos. A laca e a cera de abelha são exemplos de ceras produzidas por insetos e utilizadas na indústria farmacêutica como ingrediente de pomadas e cremes de beleza (ROBBERS, 1997; MOYNA e HEINZEN, 1999).

No que diz respeito às plantas superiores o alto grau de isolamento do meio externo dar-se graças a cutícula vegetal ou membrana cuticular (Figura 117), a qual tem como componentes mais importantes a cutina e a cera. A cima da cutícula pode-se encontrar outra camada de cera chamada de cera epicuticular e esta confere um aspecto brilhante e lustroso a folhas e frutos caracterizando-se como a última barreira entre o organismo e o meio externo (ESAÚ, 1974).

A cera, nas plantas superiores é formada por uma complexa mistura de n-alcanos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos de cadeia longa, flavonóides, diterpenos e triterpenos (EGLINTON e HAMILTON, 1967).

Tendo como função a proteção do vegetal contra: perda excessiva de água por transpiração; ação de patógenos; incidência de radiação solar; insetos; contaminantes atmosféricos e atrito na superfície da folha pela ação dos ventos (SEIGLER, 1998).

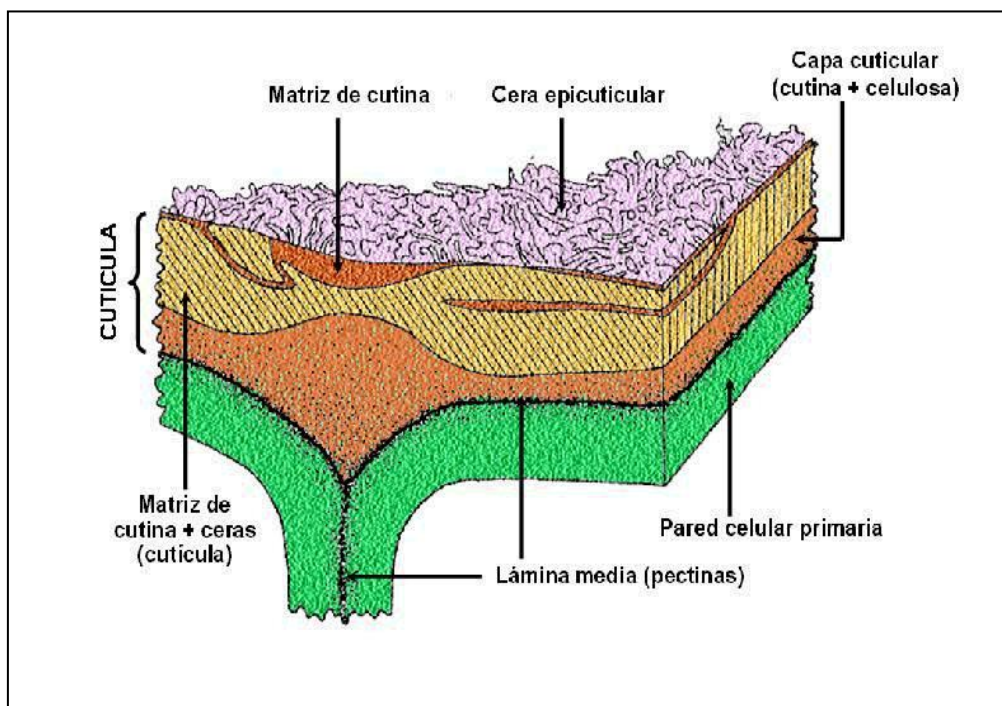


Figura 116 – Representação de um corte histológico de folha

A composição e quantidade da cera epicuticular variam largamente entre os distintos grupos filogenéticos, dentro de um mesmo grupo, espécie, indivíduo ou entre os diferentes estágios de crescimento de um mesmo indivíduo (PRASAD et al.



1990). Podendo variar também com a região, havendo inclusive, uma estreita relação entre a temperatura e a quantidade de cera. (EGLINTON et al., 1962).

Os hidrocarbonetos que compõem a cera epicuticular são, na maioria das espécies, n-alcenos, e estes têm sido encontrados regularmente em uma faixa de 15 a 38 átomos de carbonos (C15 – C38) (SKORUPA et al., 1998; FURLAN et al., 2006).

Eglinton e colaboradores, em 1962 estudaram a constituição das ceras epicuticulares de gêneros da subfamília, Sempervivoideae, das Ilhas Canárias, concentrando-se nos hidrocarbonetos, e, ao final do artigo, propõem a existência de um paralelismo entre os hidrocarbonetos que formam a cera epicuticular e a classificação botânica, ou seja, estes compostos poderiam ser utilizados como uma impressão digital.

Neste mesmo artigo os autores também procuram esclarecer que, um dos motivos para estas variações, são as diferentes rotas biossintéticas tomadas pelas células epidérmicas, fruto das modificações decorrente da evolução química e biológica (EGLINTON et al., 1962).

Sendo assim, este trabalho, que tem como objetivo a investigação da composição da cera epicuticular de um espécime de *Z. tingoassuiba* coletada em uma região limítrofe entre mata atlântica e a caatinga, buscou também:

- verificar a abundancia relativa de n-alcenos com o intuito de obter evidências químicas que ajudem na classificação taxonômica do gênero;
- identificar possíveis metabólitos secundários que compõem a cera epicuticular das folhas esta espécie;
- comparar a composição da cera de um mesmo indivíduo, variando apenas a idade da folha. O que poderá contribuir para uma melhor compreensão do papel destas substâncias nas ceras foliares.

Para alcançar estes objetivos as folhas de um espécime de *Z. tingoassuiba* foram submetidas aos procedimentos descritos nos Esquemas 21, 22 e 23 das páginas 106-108.

Como dito, anteriormente, a quantidade de cera, assim como, a sua composição pode variar grandemente de espécie para espécie. Segundo Eglinton &

Hamilton (1967), a variação da quantidade de cera pode atingir entre 4% do peso fresco e 15% do peso seco. Onde estes valores representam uma camada de cera da ordem  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de superfície foliar.

No estudo da cera epicuticular de um espécime de *Z. tingoassuiba*, o primeiro grupo ZTCeJ (Esquema 21) formado por folhas que se encontravam a cima do terceiro nó (Figura 24, p. 106), teve um rendimento de 0,85% do peso seco, já o grupo ZTCeA formado por folhas que se encontravam a baixo do terceiro nó teve um rendimento de 0,14% do peso seco.

Como descrito no esquema 22 da página 108, os estratos ZTCeJ e ZTCeA foram submetidos a uma cromatografia em coluna de onde foram obtidas quatro frações, as frações 1 e 2 de cada extrato foram analisadas por CG/IC para determinação da distribuição dos n-alcanos. Para isso uma mistura padrão (Figura 118) foi analisada nas mesmas condições das amostras.

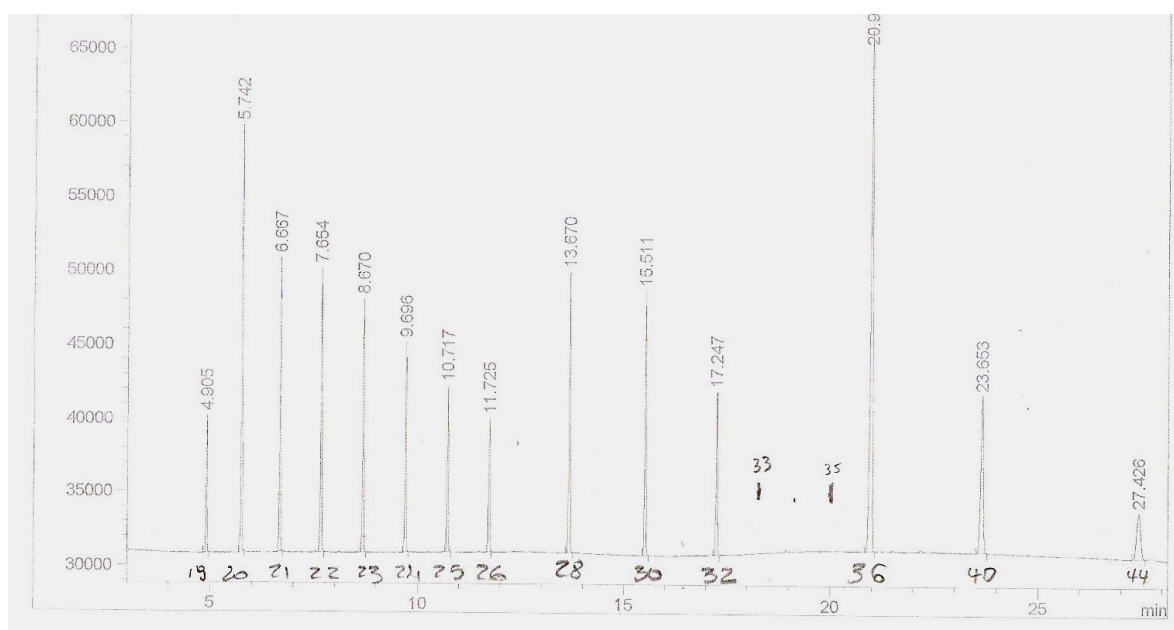


Figura 117 – Cromatograma de uma mistura padrão de n-alcanos C19 – C44

Ao analisar-se dos cromatogramas das frações ZTCeJ1 (Figura 119) e da fração ZTCeA1 (Figura 120), lembrando que ambas foram obtidas pela eluição com hexano; pode-se notar que não há diferença entre as composições e nem diferença

significativa no que diz respeito a proporção de cada constituinte, onde os componentes principais são **C31** e **C29**.

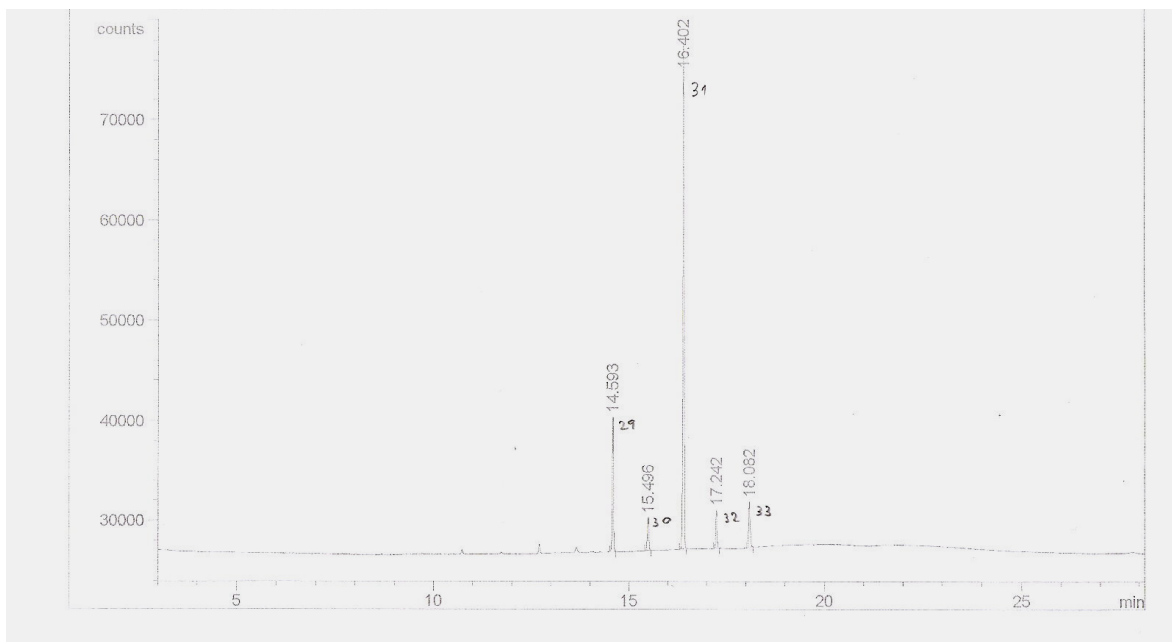


Figura 118 – Cromatograma da fração ZTCeJ1

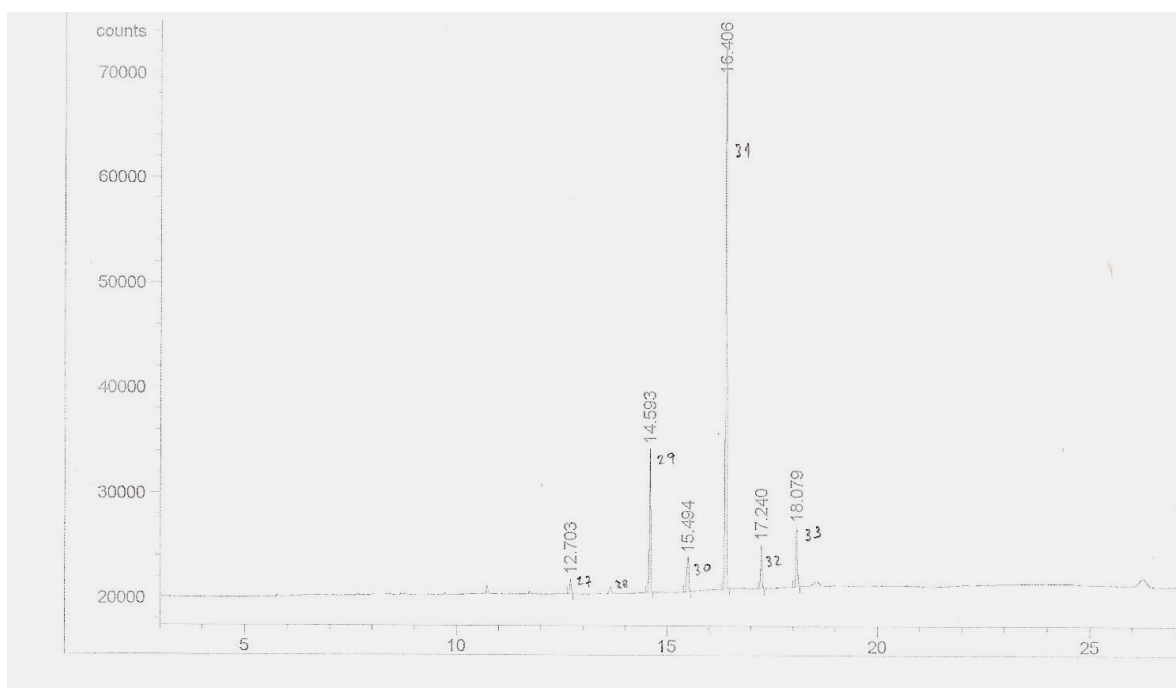


Figura 119 – Cromatograma da fração ZTCeA1

No entanto ao analisarmos os cromatogramas das frações ZTCeJ2 (Figura 121) e da fração ZTCeA2 (Figura 122), lembrando que ambas foram obtidas pela eluição com diclorometano; podemos notar que a amostra ZTCeJ2 ainda é constituída por 94% de n-alcenos e a fração ZTCeA2 é composta por aproximadamente 60% de n-alceno e 40% de outros compostos.

Esta proporção foi encontrada através da eliminação do sinal em 11,248 minutos, o qual foi identificado como um contaminante que pode ser encontrado na maioria dos solventes conhecido como ftalato (Figura 124).

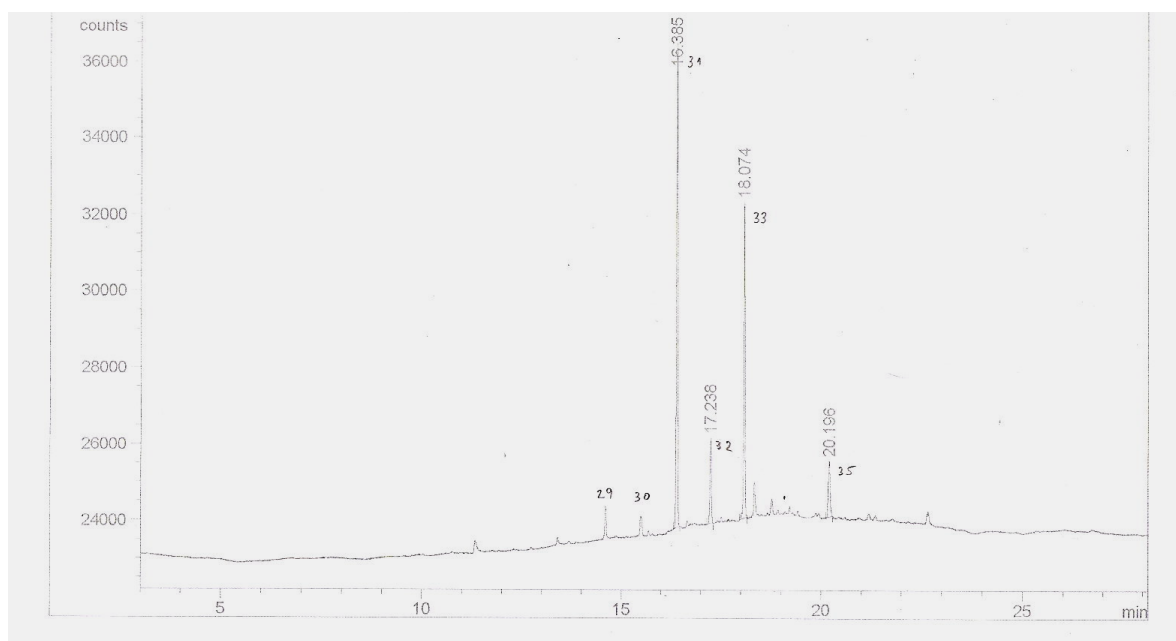


Figura 120 – Cromatograma da fração ZTCeJ2

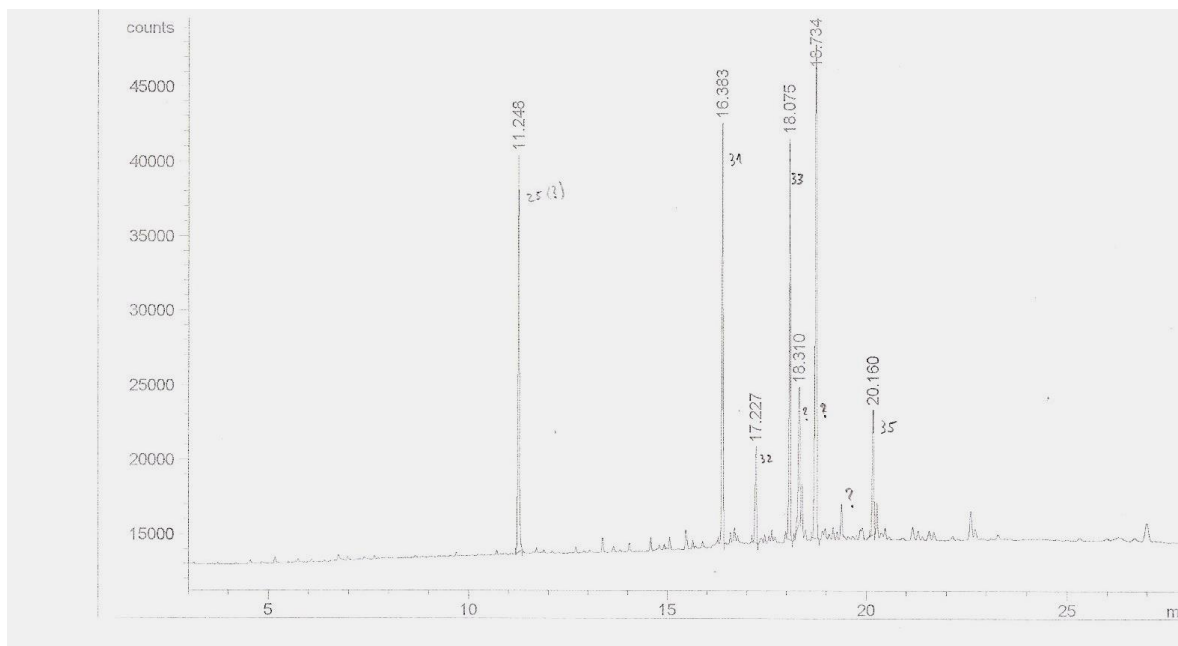


Figura 121 – Cromatograma da fração ZTCeA2

Para a identificação dos compostos que não são n-alcenos presentes na fração ZTCeA2 foi utilizado o CG/EM (Figuras 123), cujas especificações do aparelho e de análise estão na página 74.

A análise dos espectros de massas (Figuras 124 e 125) e comparação com os dados da literatura (VIEIRA JÚNIOR et al., 2005) revelaram que as substâncias com índice de retenção de 18,310 e 18,734 minutos (Figuras 123), são os triterpenos acetato de beta-amirina **S14** e amirinona **S15** respectivamente, pertencentes a uma classe normalmente presente nas ceras epicuticulares.

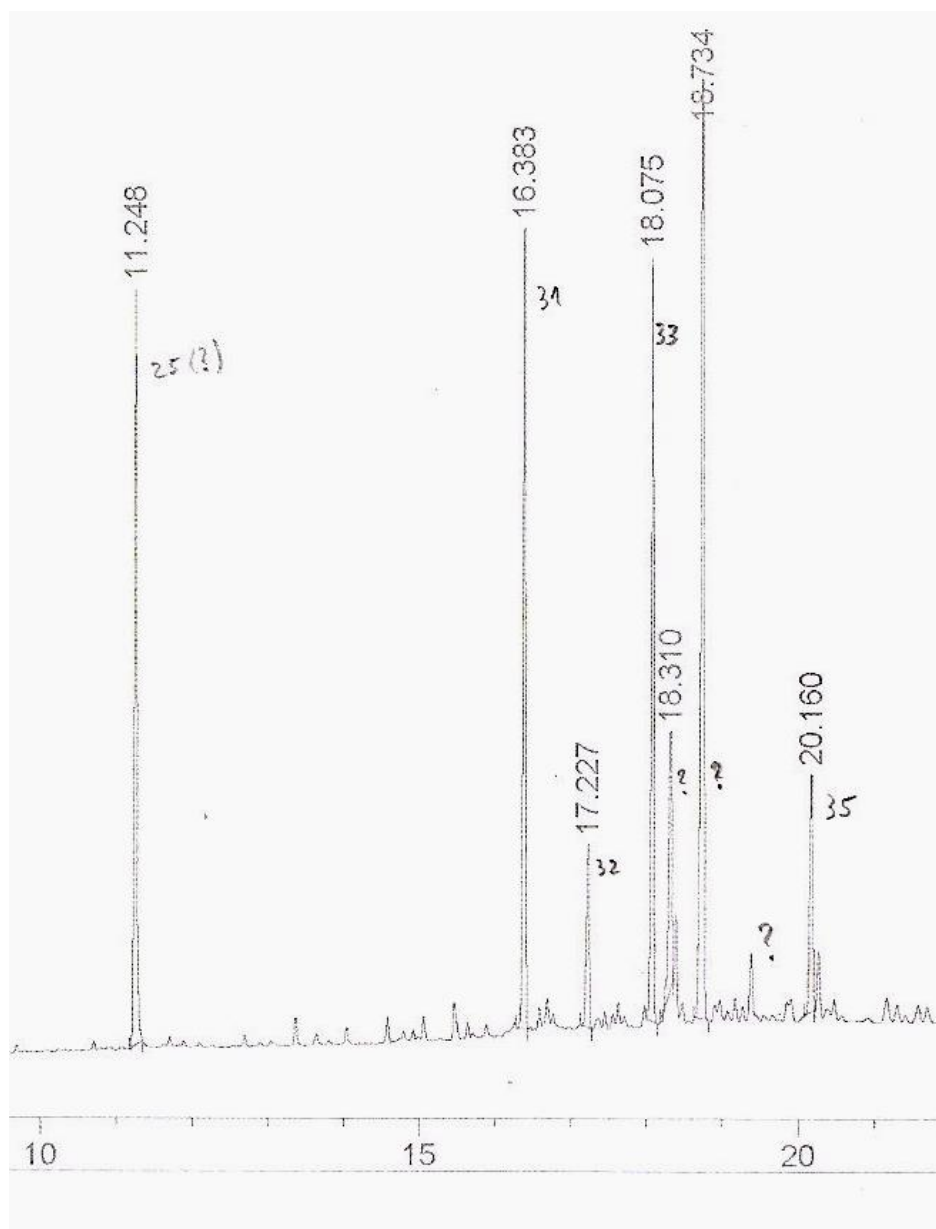


Figura 122 – Cromatograma (CG-EM) da fração ZTCeA2

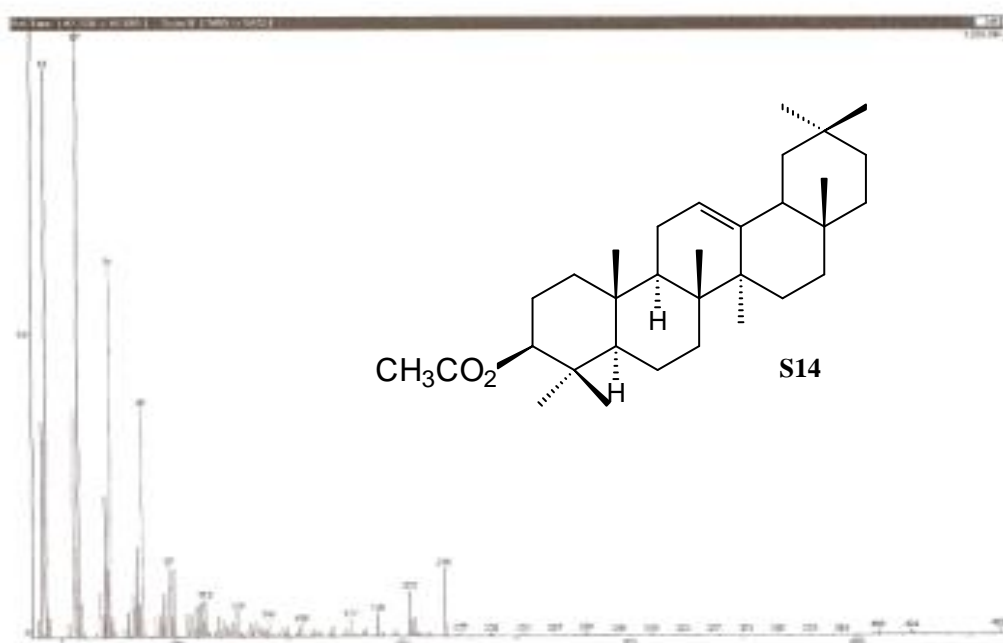


Figura 123 Espectro de Massas (70 eV) da substância em 18,310`

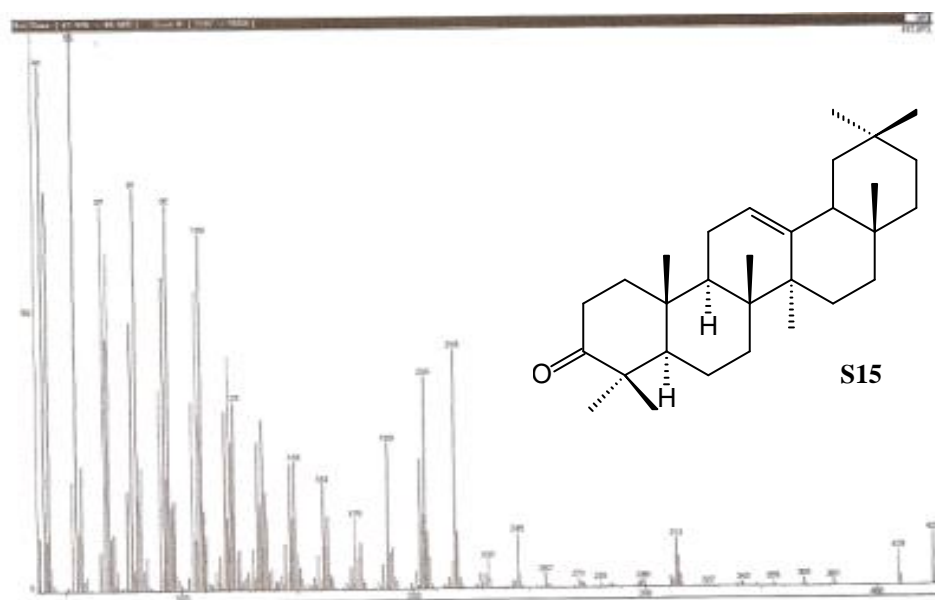


Figura 124 – Espectro de Massas (70 eV) da substância em 18,734`

As frações 3, 4 e 5 obtidas pelo fracionamento de ambos os extratos ZTCeJ e ZTCeA foram analisadas utilizando-se o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ .

Os espectros das frações 3 e 4 (Figuras 126 e 127) de ZTCeJ e o espectro da frações 4 (Figuras 127) de ZTCeA revelaram a presença das substâncias **S10**, **S11** e **S13** as quais também foram isoladas em outras frações e encontram-se descritas com detalhes nas páginas 161- 165 e 173-175 respectivamente.

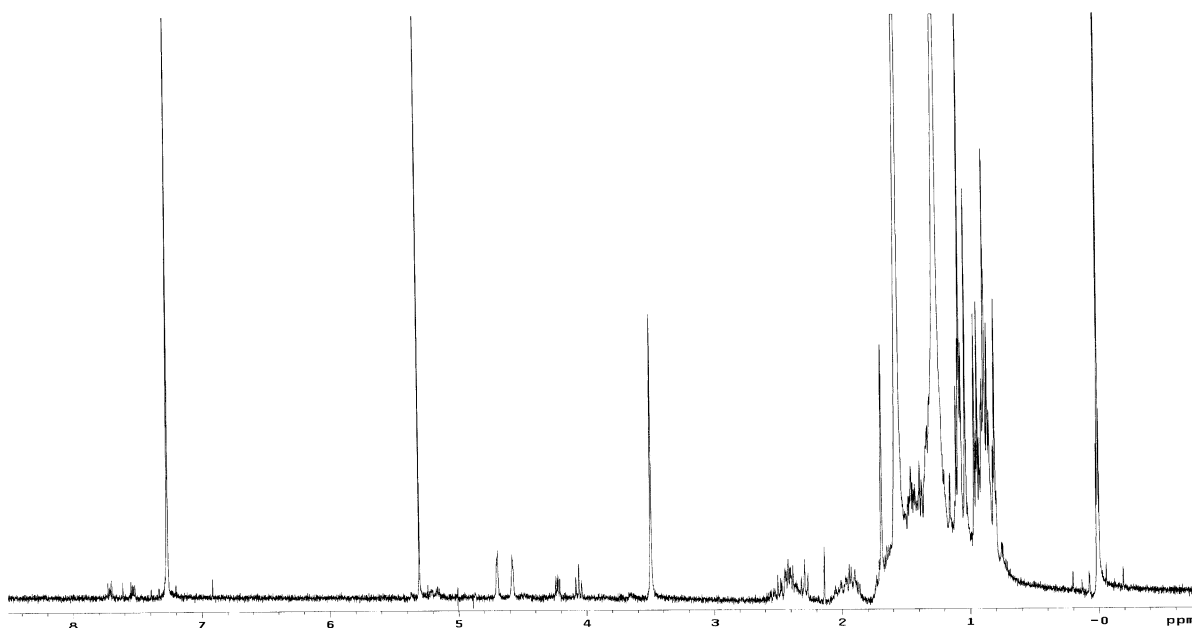


Figura 125 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] da Fração ZTCeJ3



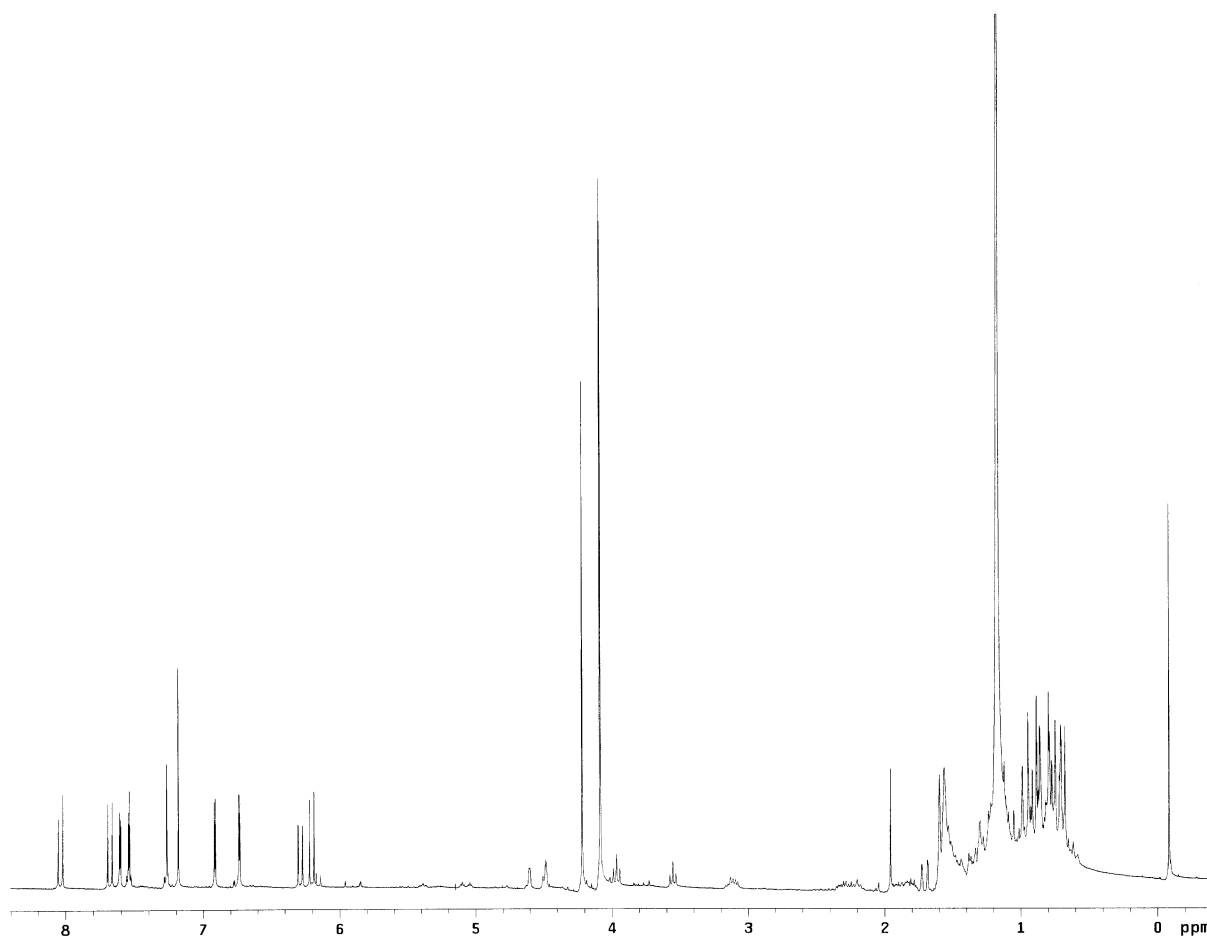


Figura 126 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>] da Fração ZTCeJ4

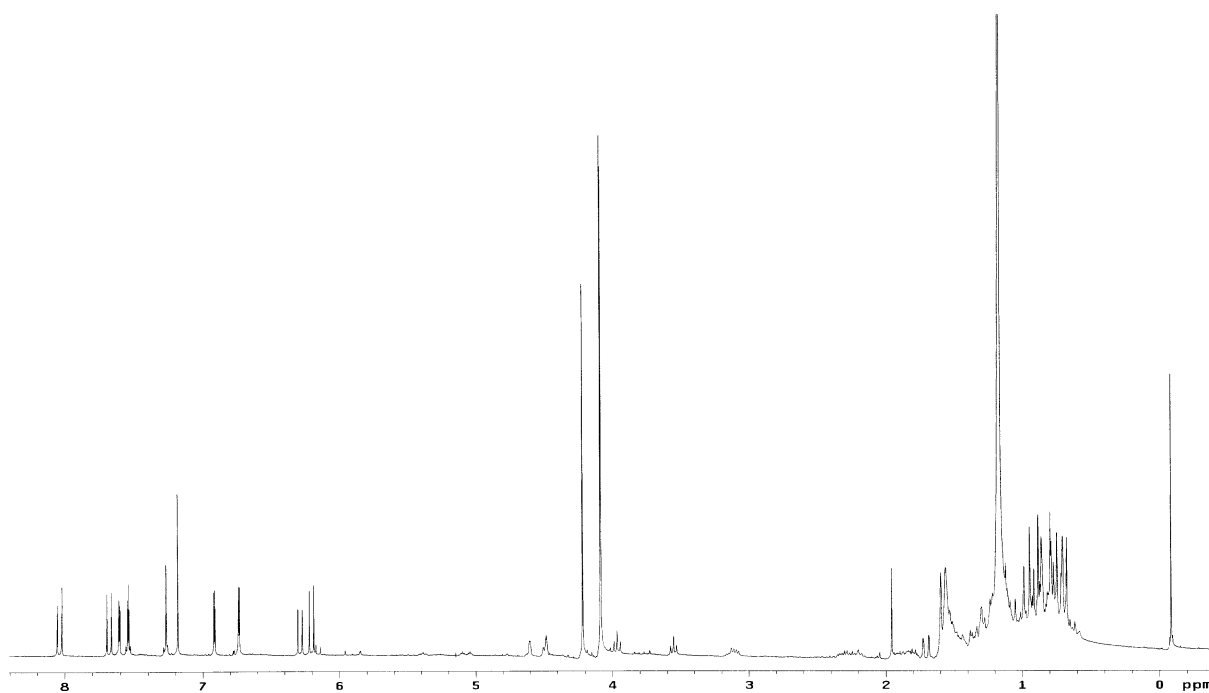


Figura 127 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>] da Fração ZTCeA4

A Tabela 17, procura demonstrar de uma forma esquemática a composição da cera epicuticular das folhas de *Z. tingoassuiba*, apresentando as substâncias identificadas em cada fração e a distribuição de n-alcenos indicando a percentagem de cada componente nas frações analisada.

Tabela 20 – Composição da Cera Epicuticular das folhas de *Z. tingoassuiba*

	ZTCeJ1	ZTCeJ2	ZTCeJ3	ZTCeJ4	ZTCeA1	ZTCeA2	ZTCeA4
C27	1%	-	-	-	3%	-	-
C28	-	-	-	-	1%	-	-
C29	18%	3%	-	-	17%	-	-
C30	4%	2%	-	-	4%	-	-
C31	67%	49%	-	-	64%	18%	-
C32	4%	8%	-	-	5%	5%	-
C33	6%	32%	-	-	6%	20%	-
C34	-	-	-	-	-	-	-
C35	-	6%	-	-	-	6%	-
S14	-	-	-	-	-	8%	-
S15	-	-	-	-	-	24%	-
NI	-	-	-	-	-	1%	-
S10	-	-	-	+	-	-	+
S11	-	-	-	+	-	-	+
S13	-	-	+	-	-	-	+

**NI:** Substância não identificada

**-:** Substância não detectada ou com quantidade relativa inferiores a 1%

**+:** Substância presente na cera epicuticular.

### **4.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Historicamente as plantas tem sido uma importante fonte no descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos. Muitos fármacos comercializados nos dias atuais foram obtidos ou inspirados em metabólitos de plantas utilizadas na medicina popular.

Na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1926), foram descritas mais de 710 monografias de plantas medicinais nativas do Brasil. Este número foi drasticamente diminuído ao passar destes 83 anos, passando a constar somente 11 monografias de plantas medicinais nativas do Brasil na Farmacopeia Brasileira Quarta Edição (1988-1996).

Uma das plantas descrita na primeira edição da Farmacopéia Brasileira era *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil a qual era conhecida como casca preciosa, tinguaciba, tinguaciba-da-restinga, limão-bravo, laranjeira-do-mato manica-de-porca ou limãozinho (SILVA, 2008).

A esta planta era atribuída atividade antiespasmódica, relaxante muscular, analgésica, sudorífera, antifúngica, diurética, anti-hipertensiva, antiagregação plaquetária e antiinflamatória. Além de ser também utilizada como antiparasitária para combater *Ascaris lumbricoides*, *Taenia* sp, *Trichiuris trichiura* e *Shistosoma* sp.

Em 1923 a casca desta planta começou a ser utilizada na composição de um fitoterápico sendo prescrito para cólicas, espasmos da musculatura estriada e mialgias.

A utilização terapêutica do óleo essencial das folhas desta espécie, nunca foi relatada, a pesar, da família Rutacea ser conhecidamente uma excelente produtora de óleo essencial.

Os óleos voláteis são constituídos por mistura de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanois e têm sido apontados como uma potente fonte de substâncias biologicamente ativas.

Todas estas informações lavaram ao desenvolvimento de testes para a avaliação de atividades biológicas do óleo essencial obtido das folhas e do extrato metanólico da casca da raiz de um espécime de *Z. tingoassuiba*.

### 4.3.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

O óleo essencial obtido das folhas de *Z. tingoassuiba* através da hidrodestilação (Esquema 19), foi submetido a avaliação do seu potencial antibacteriano.

Estes ensaios foram realizados de acordo com a técnica padrão para testes de sensibilidade antimicrobiana, descrita mundialmente pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004).

E como controle positivo foi utilizado o antibiótico ampicilina, para as bactérias Gram positivas e a tetraciclina, para as bactérias Gram negativas.

Os microrganismos utilizados foram cepas-padrão ATCC (“American Type Culture Collection”) e isolados clínicos.

Os testes foram feitos em duplicata e a avaliação da atividade antimicrobiana deste óleo revelou ação contra bactérias Gram positivas, tanto para cepas padrão (Tabela 12) como para isolados clínicos multi-resistentes (Tabela 13).

Tabela 21 - Resultados da Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Z. tingoassuiba*, frente a bactérias ATCC.

	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cholerausi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Quantidade de óleo essencial					
5 µL	+	+	-	-	-
10 µL	+	+	+	+	-

(-) ausência de atividade antibacteriana; (+) presença de atividade antibacteriana.

Tabela 22 - Resultados da Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Z. tingoassuiba*, frente a isolados clínicos.

	<i>S. mutans</i>	<i>S.aureus</i> <sup>1</sup>	<i>S.aureus</i> <sup>2</sup>	<i>S.aureus</i> <sup>3</sup>
Quantidade de óleo essencial				
5 µL	+	+	+	+
10 µL	+	+	+	+

(-) ausência de atividade antibacteriana; (+) presença de atividade antibacteriana.

#### 4.3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO

Os ensaios antifúngicos utilizando o óleo essencial de *Z. tingoassuiba* foram realizados de acordo com técnica descrita por Lima e colaboradores (1993), modificada. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas, e com controle de crescimento fúngico.

Os resultados descritos na Tabela 14 revelam um resultado promissor para a utilização deste óleo contra fungos de crescimento rápido.

Tabela 23 – Resultados da Atividade antifúngica do óleo essencial de *Z. tingoassuiba*, frente a fungos filamentosos.

Quantidade de óleo essencial	<i>T.mentagrophytes</i>	<i>M.gypseum</i>	<i>E.floccosum</i>	<i>A.niger</i>	<i>Fusarium sp.</i>
5 µL	+	+	+	-	-
10 µL	+	+	+	-	-

(-) ausência de atividade antifúngica; (+) presença de atividade antifúngica

Os experimentos antibacterianos e antifúngios foram realizados na Universidade Federal da Bahia (UFBA), Faculdade de Farmácia no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica pelos alunos de Iniciação Científica Corine Silva Sampaio e Joilton Oliveira Matos ambos coordenados pela Professora Doutora Tânia Fraga Barros.

#### 4.3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPARASITÁRIO

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana é uma infecção que causa lesões teciduais graves, principalmente no coração e nos órgãos do sistema digestivo e que tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (BRENAN et al., 2007).

A doença de Chagas apresenta-se como uma endemia de grande relevância em alguns países da América do Sul e Central. No início da década de 90, foi colocada pelo World Bank como a doença parasitária mais grave da América Latina (MENEZES et al., 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 20 milhões de pessoas são infectadas com esse parasito e cerca de 25% da população da América Latina tem o risco de ser infectada. Na Amazônia Brasileira essa doença é considerada como de caráter emergente (AMBROZIN, 2004).

Apesar da alta prevalência, as drogas disponíveis comercialmente ainda não são eficazes o bastante para o tratamento dessa doença. Além disso, os sérios efeitos colaterais freqüentemente levam a suspensão do tratamento (DIAS et al., 2002).

A leishmaniose é uma outra parasitoses endêmica em 88 países das regiões tropicais e sub-tropicais, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade nestes locais. Nenhuma vacina é utilizada para esta doença e a quimioterapia ainda é inadequada e dispendiosa. Em tempos recentes, vêm aumentando o interesse em terapias alternativas assim como o uso de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, como fontes de compostos quimioterápicos com melhores atividades e poucos efeitos colaterais. (BRENAN et al., 2007; MACHADO et al., 2007).

A atual situação insatisfatória no tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose torna o estudo de novas moléculas obtidas de plantas altamente conveniente.

O extrato metanólico da casca da raiz de *Z. tingoassuiba* foi purificado conforme o procedimento descrito no Esquema 14.

As frações ZTCRM 2 e 4 obtidas pelo fracionamento do deste extrato, tiveram sua atividade antiparasitárias avaliada, inicialmente sobre o protozoário da espécie *Phytomonas serpens*, fitoparasita que podem infectar frutos, látex, seiva, floema e flores de muitas espécies vegetais, provocando patogenia.

Ainda que esta espécie não apresente patogenia humana, possui vias metabólicas semelhantes a dos outros gêneros pertencentes a família Trypanossomatidae, bem como os gêneros Leishmania e Trypanossoma, que são responsáveis por enfermidades humanas relevantes, como citado anteriormente.

A percentagem de inibição de crescimento, em relação às células controle, em um tempo de 72 horas foram analisadas e estão demonstradas na Tabela 23.

A inibição de crescimento de 50% das células ( $IC_{50}$ ) calculada para ZTCRM 2 é de 4,0  $\mu\text{g/mL}$  e para ZTCRM 4 é de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , estes resultados são considerados satisfatória em relação aos dados apresentados na literatura. Tornando o estudo desta espécie promissoras na busca de novos fármacos com atividade tripanomicida e leishmanicida.

Tabela 24 – Percentagem de inibição das frações sobre o *P. serpens*.

Concentração	ZTCRM 2	ZTCRM 4
25 $\mu\text{g/mL}$	98,9%	60%
10 $\mu\text{g/mL}$	97,7%	26%
5 $\mu\text{g/mL}$	86,0%	23,4%
1 $\mu\text{g/mL}$	54,1%	14,4%

Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Biomorfologia Parasitária (LBP) e Unidade de Microscopia Eletrônica (UME) do Centro de Pesquisa

Gonçalo Moniz (Fiocruz). Esta unidade vem desenvolvendo projetos na busca de produtos naturais com atividade antiparasitária.

O LBP esta sob a coordenação do Professor Dr. Marcos André Vannier dos Santos o qual orientou a aluna de Iniciação Científica Fernanda Carolina Cardoso Bomfim da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

#### 4.3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O processo oxidativo é um importante fator no desenvolvimento de diversas patologias inclusive doenças degenerativas como mal de Parkinson e Alzheimer. Por isso a busca de novos compostos com potencial antioxidante tem sido o foco de inúmeras pesquisas (DAVIES, 1995).

Estudos recentes têm demonstrado que a toxicidade do 1,2-diidroxibenzeno (catecol) um metabólito do benzeno, deve-se a promoção de estresse oxidativo celular por inibição da cadeia respiratória (BARRETO et al., 2005), assim como geração de quinonas reativas e íon radical superóxido, em células de glioblastoma (GL-15) (PEREIRA et al., 2004).

O laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) do Instituto de Ciências e Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) vem utilizando um modelo experimental que tem o propósito de encontrar compostos que possuam habilidade em proteger as células contra a toxicidade induzida pelo catecol. Com isso a busca de substâncias naturais bioativas torna-se uma estratégia interessante em um país como o Brasil que possui uma das maiores biodiversidade do mundo.

As cumarinas presentes nas folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba* foram submetidas a estudos com o modelo o qual utiliza o catecol como substância citotóxica em células GL-15, com o objetivo de demonstrar atividade citoprotetora.

Estes metabólitos secundários foram extraídos da água da hidrodestilação com descrito no Esquema 20 da página 105 e a discussão da determinação estrutural encontra-se nas páginas 161 a 165.

Antes de se avaliar a capacidade citoprotetora das cumarinas um teste de citotoxicidade foi realizado.



Neste bioensaio determinou-se a concentração necessária para matar 50% das células ( $DL_{50}$ ) depois de 48h de tratamento, para o catecol e para a mistura das cumarinas.

Em seguida a amostra, em concentrações subtóxicas, foi submetida ao bioensaio utilizando (MTT) com indicador da viabilidade celular.

Este teste revelou que as cumarinas reverteram parcialmente a toxicidade induzida por catecol em células GL-15 aumentando em 15.27%, 14.36% e 13.36% essa viabilidade nas concentrações de 1, 2 e 3  $\mu\text{g/mL}$ .

Para confirmar este resultado outros testes foram realizados os quais demonstraram que estas cumarinas, nas concentrações citadas, reverteram a liberação de (LDH), diminuem a condensação nuclear, diminuem as alterações morfológicas e reduzem a depleção de glutatona reduzida nas células. Estes parâmetros indicam respectivamente: aumento da integridade de membrana; diminuição da apoptose; diminuição dos danos causados ao citoesqueleto e revelou aspectos importantes no perfil metabólico que ainda não foram citados na literatura.

A recuperação da integridade de membrana e morfologia celular normal promovida pelas cumarinas reforça sua atividade citoprotetora, além disso, a redução da condensação nuclear indica um potencial antiapoptótico destas substâncias.

Apesar da estrutura das cumarinas não serem sugestivas de substância antioxidantes a reversão da depleção da glutatona promovida pelo catecol indica uma atividade antioxidante indireta a qual pode ser atribuída a inibição da Glutathione S-transferase, esta hipótese ainda está em processo de comprovação pela equipe do LabNq.

Os experimentos descritos acima foram realizados pelo aluno de iniciação científica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia Diêgo Madureira Oliveira, orientado pelo Professor Doutor Ramon Santos El-Bachá Coordenador do LabNq.

#### 4.3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO ÓLEO VOLÁTIL EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Uma das estratégias atualmente disponível para solucionar o problema de baixa solubilidade de um fármaco é a sua associação reversível a um sistema transportador. Entre os sistemas transportadores de medicamentos atualmente disponíveis, os lipossomas, ocupam uma posição de destaque (FRÉZARD et al., 2005).

Lipossomas ou vesículas de fosfolípidios são estruturas concêntricas, de natureza externa polar, constituídas de um compartimento aquoso central circundado por uma ou várias bicamadas lipídicas apolares separadas por fases aquosas, formando partículas unilamelares ou multilamelares. Uma das grandes vantagens dos lipossomas, com relação aos outros sistemas transportadores de medicamentos, é a sua elevada biocompatibilidade acompanhada, em geral, pela biodegradabilidade e baixa imunogenicidade (FRÉZARD et al., 2005).

Esses sistemas proporcionam também proteção às moléculas encapsuladas, evitando oxidação e volatilização, aumentando sua estabilidade na formulação. Portanto, a associação do óleo essencial com lipossomas, além de facilitar as análises microbiológicas, devido ao aumento da solubilidade do óleo em meio aquoso, potencializa sua atividade biológica, uma vez que a absorção e metabolização dos constituintes do óleo são melhoradas (SINICO et al., 2005).

Sabe-se que a atividade de drogas encapsuladas em lipossomas pode variar dependendo do tamanho da vesícula, carga superficial e composição lipídica e que a incorporação de moléculas à membrana dos lipossomas altera suas características, portanto, inicialmente, é necessário realizar a caracterização do sistema de vesículas utilizado a fim de comprovar que realmente houve a formação de estruturas organizadas, estáveis, aproximadamente esféricas e que houve de fato encapsulação de óleo essencial (SINICO et al., 2005).

Para que o produto farmacêutico elaborado seja o mais eficaz e seguro possível, todas as variáveis físico-químicas do veículo transportador devem ser determinadas e devem se aproximar ao máximo do ideal, pois estas, influenciam na resposta farmacológica das moléculas incorporadas. Para isso, depois de idealizar, preparar e caracterizar um sistema vesicular simples deve-se modificar as suas

características a fim de obter-las o mais próximo do ideal. (GONÇALVES et al., 2006).

Como demonstrado nas seções 4.2.6.1 e 4.2.6.2 o óleo essencial de *Z. tinguassuiba* possui marcantes propriedades biológicas, mas sua natureza lipofílica torna difícil a administração in vivo e a realização de testes in vitro em meio aquoso. Como dito anteriormente uma das estratégias é a associação reversível do fármaco a lipossomas, para tornar o produto farmacêutico elaborado o mais eficaz e seguro possível.

O laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (LAPEMM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) vem desenvolvendo um projeto de pesquisa financiado pela Bolsa de Pró-doc na área de biotecnologia com os seguintes objetivos: produzir, caracterizar e comparar tipos de sistemas lipossomais, incorporando óleo essencial de *Z. tinguassuiba* obtidos por métodos diferentes, e iniciar a fase relativa ao ensaio microbiológico das preparações a fim de determinar o sistema mais adequado para o uso em uma formulação antimicrobiana.

Este importante projeto vem sendo desenvolvido pela Doutora Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque e a estudante de iniciação científica Cássia Britto Detoni da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Nesta etapa do trabalho os lipossomas foram preparados utilizando Dipalmitoil Fosfatidilcolina (DPPC) utilizando o método da hidratação do filme seco de lipídeos. Este procedimento leva a formação de vesículas lipossomais multilamelares – MLV (Multilamellar Liposomes Vesicle).

Os lipossomas unilamelares nanométricos foram preparados a partir dos MLV, utilizando dois métodos diferentes de homogeneização de tamanhos: extrusão conhecido como LUVET (Large Unilamellar Vesicle by Extrusion Technique) e sonicação, o qual originou o - SUV (Small unilamellar vesicals).

Os MLV são partículas de tamanhos micrométricos variando de 2 – 30  $\mu\text{m}$ , os LUVET são partículas com aproximadamente 500 nm de diâmetro e os SUV possui diâmetro menor que 100 nm

Os dois tipos de lipossomas unilamelares foram preparados no Laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto – Porto/Portugal.

Antes da incorporação do óleo essencial as características físico-químicas, como: Morfologia, Tamanho, Índice de polidispersão e Potencial  $\zeta$  inerentes a formação dos veículos foram desenvolvidas e comprovadas. A avaliação da eficiência de incorporação do óleo volátil de *Z. tinguassuiba* para fins terapêuticos também foi realizada.

Análise morfológica dos lipossomas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão no Laboratório de Microscopia do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz – Salvador/Bahia e no Instituto de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Porto – Porto/Portugal.

O diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das vesículas foram determinados por difratometria a laser. As análises foram realizadas na Indústria Monsanto Nordeste no Pólo Petroquímico de Camaçari.

Além das características físico-químicas, as características biológicas também precisaram ser confirmadas, para atestar a potencialidade terapêutica do óleo essencial.

Para isso, aos três tipos de sistemas lipossomais MLV, LUVET e SUV foram incorporando óleo essencial de *Z. tinguassuiba*. Seguida de ensaio microbiológico das três preparações a fim de determinar o sistema mais adequado para o uso em uma formulação antimicrobiana.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando-se as mesmas metodologias e microorganismos utilizados nos itens 4.2.6.1 e 4.2.6.2.

Os testes realizados nos veículos demonstraram que o diâmetro médio dos lipossomas unilamelares foi aproximadamente o mesmo, mas a moda da população de lipossomas extrudados (LUVET) foi menor. A eficiência de incorporação é maior para os lipossomas multilamelares (MUV), seguido dos LUVET e por último os SUV.

No entanto o sistema de LUVET, de acordo com as análises feitas até o momento, é o mais adequado para uma formulação antimicrobiana. Em relação a atividade antimicrobiana do óleo encapsulados os testes ainda estão sendo realizados e ainda não foi obtido nenhum resultado conclusivo.

Esse plano de trabalho iniciou uma nova linha de pesquisa na Faculdade de Farmácia, sendo um trabalho pioneiro no norte-nordeste Brasileiro.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho descreve a investigação química de três espécies de *Zanthoxylum* nativas do Brasil, coletadas na região semi-árida da Bahia.

O resultado desta investigação foi a identificação de oito alcalóides, três cumarinas, uma lignana, quatro monoterpenos, doze sesquiterpenos e três triterpenos, todas estas classes são condizentes com os já encontrados no gênero *Zanthoxylum*.

Todas as três espécies tiveram suas raízes investigadas, onde se pode constatar a existência de alcalóides benzilisoquinolínicos, das subclasses, protoberberínicos, aporfínicos e benzofenantridínicos. A ocorrência desta última classe em todas as espécies estudadas contribui na conceituação dos alcalóides benzofenantridínicos como marcadores quimiosistemáticos e reitera para o gênero *Zanthoxylum* como um dos gêneros que compõem o grupo denominado “Proto-Rutaceae”.

O alcalóide benzo[c]fenantridínico S4 possui um raro padrão de substituição, posição 9 e 11 do anel A, sendo esta a segunda vez que este tipo de alcalóide é registrado na literatura, no presente trabalho as atribuições dos deslocamentos dos carbonos desta molécula é ampliado.

O alcalóide S6 classificado como pseudoprotoberberina devido ao seu padrão de substituição é relatado neste trabalho como alcalóide natural inédito. Já que o relato anterior para esta substância foi como um intermediário da síntese da fagarina em 1964.

As cumarinas encontradas são da classe das furocumarinas, este metabólito também contribui para a classificação do gênero *Zanthoxylum* como uma “Proto-Rutaceae” já que esta classe está vinculada a espécies taxonomicamente classificadas como primitivas.

Os monos e sesquiterpenos foram identificados através da avaliação do óleo volátil extraído por hidrodestilação das folhas de um espécime de *Zanthoxylum tingoassuba*, o qual tem como componentes majoritários o alcalóide metil antranilato de N-metila e o sesquiterpeno bisabolol. Objetivando-se uma extração seletiva deste componente, utilizou-se a extração via CO<sub>2</sub> super crítico, mas esta metodologia além da extração do alcalóide também carregou as furocumarinas, metabólitos estes

que não foram identificados no óleo extraído via hidrodestilação, indicando que as condições de temperatura e pressão devem ser reavaliadas, sendo assim objeto de pesquisas futuras.

O estudo da composição da cera epicuticular foi motivado pela teoria da impressão digital dos n-alcenos de Eglinton (1962) e da variabilidade quali e quantitativa da cera em um mesmo indivíduo descrita por Prasad e colaboradores (1990).

A avaliação da cera epicuticular das folhas de um espécime de *Zanthoxylum tingoassuiba* diferenciadas em duas amostras separadas pelo terceiro nó, não apresentou variação na composição dos n-alcenos com a maturidade, no entanto, os triterpenos parecem acumular-se com o avanço da idade das folhas deste vegetal no ecossistema estudado.

A análise dos dados demonstra que há uma predominância de n-alcenos com cadeia carbônica com número ímpar em uma faixa entre C27-C33, fato este, característico das angiospermas.

Baseado na utilização de espécies de *Zanthoxylum* na medicina popular algumas atividades biológicas foram testadas.

O óleo volátil obtido por hidrodestilação das folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba* foi avaliado quanto ao seu potencial antifúngico e antibacteriano. Como antifúngico este mostrou atividade contra fungos de crescimento rápido e apresentou-se ativo contra bactérias Gram-positivas. Este resultado levou ao estudo da avaliação do potencial deste óleo em sistema de liberação controlada.

Após a etapa de preparação e caracterização do sistema vesicular, foram preparados e testados os potenciais antimicrobianos em três tipos de sistemas lipossomais MLV, LUVET e SUV, sendo, o que o tipo LUVET foi até o momento o mais promissor.

A presença das atividades, antioxidante e antiparasitária, apresentadas pelo extrato proveniente do decocto das folhas, e das frações provenientes do extrato metanólico da casca da raiz de *Zanthoxylum tingoassuiba* respectivamente, indicaram que esta espécie pode ser uma fonte de compostos com potencial farmacológico.

## **6 DADOS ESPECTROSCÓPICOS**

**S1** – Diidroqueleritina ([1,3]Dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2-c]phenanthridine, 12,13-dihydro-1,2-dimethoxy-12-methyl): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,73 (s, 1H, H1); 7,69 (d, 1H, J =8,4 Hz, H6); 7,50 (d, 1H, J =8,4 Hz, H12); 7,49 (d, 1H, J =8,4 Hz, H5); 7,10 (s, 1H, H4); 6,94 (d, 1H, J =8,4 Hz, H11); 6,05 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); 4,33 (s, 2H, H8); 3,93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,63 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 152,3 (C10); 148,2 (C3); 147,5 (C2); 146,2 (C9); 142,0 (C6b); 130,8 (C4a); 126,1 (C4b); 126,0 (C8a); 125,8 (C12a); 124,2 (C6a); 124,1 (C5); 120,0 (C6); 118,7 (C12); 111,1 (C11); 104,3 (C4); 101,0 (OCH<sub>2</sub>O); 100,6 (C1); 61,0 (OCH<sub>3</sub>); 55,8 (OCH<sub>3</sub>); 48,8 (C8); 41,3 (NCH<sub>3</sub>). HMQC: 120,1 (7,69); 118,7 (7,50); 111,0 (6,94); 104,3 (7,10); 100,6 (7,73); 61,0 (3,88); 55,8 (3,93); 48,8 (4,33); 41,3 (2,63). EM m/z (intensidades relativas %) 349 (100); 332 (20).

**S2** – Angolina ([1,3]Benzodioxolo[5,6-c]phenanthridine,12,13-dihydro-1,2,13-trimethoxy-12-methyl): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 7, p. 143. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 152,0 (C10); 147,9 (C2); 147,3 (C3); 146,6 (C9); 138,3 (C14); 131,0 (C4a); 126,7 (C14a); 125,6 (C8a); 124,8 (C12a); 123,4 (C5); 122,5 (C13); 119,9 (C); 118,9 (C12); 112,9 (C11); 104,6 (C4); 100,9 (OCH<sub>2</sub>O); 100,6 (C1), 86,0 (C8); 61,6 (OCH<sub>3</sub> em C9); 55,9 (OCH<sub>3</sub> em C10); 53,9 (OCH<sub>3</sub> em C8); 40,6 (NCH<sub>3</sub>).

**S3** – Arnotianamida (Formamide, N-[6-(2-hydroxy-3,4dimethoxyphenyl)naphtho[2,3d]-1,3-dioxol-5-yl]-N-methyl): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 4, p. 139 RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164,8 (C8); 127,7 (C14a); 127,6 (C6); 125,3 (C5); 104,6 (C4); 104,2 (C11); 101,7 (OCH<sub>2</sub>O); 99,5 (C1); 61,4 (OCH<sub>3</sub> (C3')); 56,1 (OCH<sub>3</sub> (C3')); 32,2 (NCH<sub>3</sub>).

**S4** – Pseudo-noqueleritina ([1,3]Dioxolo[4,5]benzo[1,2-c]phenanthridine, 1,3-dimethoxy): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 4, p. 139. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 5, p. 141.

**S5** – cis-N-metilcanadina (6H-Benzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium, 5,8,13,13a-tetrahydro-9,10-dimethoxy-7-methyl-, iodide): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 9, p. 153. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz): 151,1 (C10); 148,3 (C2); 147,0 (C3); 145,4 (C9); 124,5 (C13b); 123,4 (C11); 121,2 (C4a); 120,8 (C12a); 119,8 (C8a); 113,2 (C12); 108,8 (C4); 106,9 (C1); 101,5 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 64,8 (C13a); 61,3 ( $\text{OCH}_3$ ); 59,2 (C8); 55,8 ( $\text{OCH}_3$ ); 52,2 (C6); 50,1 ( $\text{NCH}_3$ ); 33,3 (C13); 23,7 (C5). HMQC – Tabela 8, p. 151.

**S6** – 2,3-metilenodioxo 10,11-dimetoxi tetrahidroprotoberberina iodeto (-Benzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium,5,8,13,13a-tetrahydro-9,10-dimethoxy-7-methyl): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 9, p. 153. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz): Tabela 10, p. 154.

**S7** – predicientina-metil-iodato (4H-Dibenzo[de,g]quinolinium, 5,6,6a,7-tetrahydro-2-hydroxy-1,9,10-trimethoxy-6,6-dimethyl): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7,98 (s, 1H, H11); 6,99 (s, 1H, H8); 6,66 (s, 1H, H3); 6,35 (s, 1H, OH em C2); 4,61 (m, 1H, H6a); 4,46 (m, 2H, H7); 3,97 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$  (C1)); 3,93 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$  (C10)); 3,89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$  (C9)); 3,77 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ); 3,40 (m, 2H, H5); 3,29 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ); 3,00 (m, 2H, H4). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz): Tabela 11, p. 162. HMBC, HMQC e DEPT 135 - Tabela 11 p. 162.

**S8** – metil antranilato de-N-metila (Benzoic acid, 2-methylamino): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,92 (1H, dd,  $J=6,8, 1,8$  Hz, H-6); 7,66 (1H, br s, N-H); 7,39 (1H, dt na dissertação tem m,  $J=1,5, 1,8, 1,5$  Hz, H-4); 6,68 (1H, d,  $J=8,4$  Hz, H-3); 6,61 (1H, t,  $J=7,2$  Hz, H-5); 3,86 (3H, s, H-8); 2,93 (3H, s, H-9). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  168,9 (C7); 151,85(C2); 109,9 (C1); 110,7 (C3); 131,5 (C4); 114,3 (C5) e 134,5 (C6); 51,3(C8); 29, 5(C9). HMQC – Tabela 13, p. 167.

**S9** – Imperatorina (7H-Furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, 4-methoxy-9-[(3-methyl-2-buten-1-yl)oxy]): RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,77 (1H, d,  $J=9,6$ Hz, H-4); 7,70 (1H, d,  $J=2,4$ Hz, H-2'); 7,36 (1H, s, H-5); 6,82 (1H, d,  $J=2,4$ Hz, H-3'); 6,37 (1H, d,  $J=9,6$ Hz, H-3); 5,01 (1H, s,8- $\text{OCH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  160,5 (C2); 146,6(C2'); 116,5 (C10); 144,5 (C8a); 144,3 (C4); 137,3 (C8); 125,8(C6); 25,8(C4a);



114,7 (C3); 116,67 (C3'); 113,1 (C5); 106,7 (C3'); 70,1 (C1a); 119,7 (C2a); 139,7 (C3a); 25,8 (C4a); 18,1 (C5a).

**S10** – Xantotoxina (7H-Furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, 9-methoxy): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,78 (1H, d, J=9,6Hz, H-4), 7,70(1H, d, J=2,1Hz, H-2'), 7,36(1H, s, H-5), 6,83 (1H, d, J=2,4Hz, H-3'), 6,38 (1H, d, J=9,6Hz, H-3) 4,31(1H, s,8-OCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 160,5 (C2), 148,8(C7), 146,6(C2'), 144,5(C8a), 144,3(C4), 132,0 (C8), 126,1(C6), 116,5(C4a), 114,8 (C3) 112,9(C5), 106,7(C3'),61,3(8-OCH<sub>3</sub>); ESIMS m/z: 216 [M]<sup>+</sup> (100%), 201 (28%), 173 (53%) 145 (22%), 89 (42%), 63 (39%), 44 (15%)<sup>13</sup>.

**S11** – Isopipinelina (7H-Furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, 4,9-dimethoxy): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,13 (1H, d, J=9,9Hz, H-4); 7,64 (1H, d, J=2,4Hz,H-2'); 7,01 (1H,d, J=2,1Hz,H-3'); 6,38 (1H, d, J=9,6Hz,H-3); 4,18 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>); 4,13 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 160,4 (C2); 149,9 (C7); 146,6 (C5); 145,1 (C2'); 144,3 (C8a); 139,4 (C4); 128,1 (8); 114,6 (C6); 112,9 (C3); 106,7 (C4a); 105,1 (C3'); 61,3 (8-OCH<sub>3</sub>); ESIMS m/z: 231 [M]<sup>+</sup> (100%), 246 (98%), 188 (22%), 175 (30%), 160 (23%), 147 (22%), 132 (10%), 104 (11%)<sup>13</sup>.

**S12** – Sesamina (1,3-Benzodioxole, 5,5'-(tetrahydro-4-t-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diyl-1-t)bis): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6,79 (m, 6H, H aromáticos); 5,96 (s, 4H, (OCH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>); 4,72 (d, 2H, J = 4,2 Hz, H7e H7'); 4,24 (m, 2H, H9 e H9`em equatorial); 3,86 (dd, 2H, J = 9,3 e 4,2Hz, H9 e H9`em axial); 3,05 (m, 2H, H8 e H8'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 135,3 (C1 e C1'); 101,3 (OCH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>; 119,6 (C2 e C2'); 108,4 (C3 e C3'); 147,3 (C4 e C4'); 106,7 (C6 e C6'); 148,2 (C5 e C5'); 86,7 (C7 e C7')

**S13** – Lupeol (Lup-20(29)-ene, 3-methoxy): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Tabela 14 p. 183. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Tabela 15 p. 184.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, Roberr P. **Identification os essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured,2001.
- ADESINA, S.K. Arnottianamide and other constituents of *Zanthoxylum gillettii* root. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 601-602, 1988.
- AHMAD, M.U.; RAHMAN, M.A.; HUQ, E.; CHOWDHURY, R. Alkaloids of *zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, v.74, p. 191-193, 2003.
- AMARO-LUIS, J.M.; RRONCZEK, F.R.; MASSANET, G.M.; PANDO, E.; LUIS, F.R.; WATKINS, S.F.; ZUBÍA, E. Meridinol, a lignan from *Zanthoxylum fagara*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p. 3933-3935, 1988.
- AMBROZIN, A.R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.;DA SILVA, M.F.G.F.;ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity os Meliaceae and Rutaceae plant extracts. **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n. 2, p. 227-231, 2004.
- ARRIETA, J.; REYES, B.; CALZADA, F.; RIVERA, R.C.; NAVARRETE, A. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianun*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 295-297, 2001.
- ARRUDA, M.S.P., FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; PIRANI, J.R. Protolimonoid and lignans from *Zanthoxylum petiolare*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1303-1306, 1994.
- ARRUDA, M.S.P., FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; PIRANI, J.R. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A new secofuroquinoline alkaloid. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 2, p. 173 -178, 1992.
- ARTHUR, H.R.; HUI, W.H.; NG, Y.L. An Examination of Rutaceae of Hong Kong. Part II. The alkaloids, nitidine and oxynitidine from *Zanthoxylum nitidum*. **Journal of the Chemical Society**, p.4007-4009, 1959.
- ARTHUR, H.R.; HUI, W.H.; NG, Y.L. An Examination of the Rutaceae of Hong Kong. Part III. The alkaloid, avicine, from *Zanthoxylum avicennae*. **Journal of the Chemical Society**, p.1840-1845, 1959.
- BARBOSA FILHO, J.M. Lignanas neo-lignanas e seus análogos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** : da Planta ao Medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: Florianópolis SC: Ed. da Universidade/UFRS e Ed. da UFSC, 2001. Cap. 22, p. 397-425.
- BARRETO G. E. S. et al., **Acta Cir. Bras.**, 20, 40-45, 2005.

BERNHARD, H.O. e THIELE, K. Isolierung von (+/-) tembamid aus *Zanthoxylum tingoassuiba* L. (Rutaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 61, n. 6, p. 2269-2272, 1978.

BINUTU, O.A.; CORDELL, G.A. Constituents of *Zanthoxylum spucei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 3, p. 210-213, 2000.

BONGUI, J.B.; BLANCKAERT, A.; ELOMRI, A.; SEGUIN, E. CONSTITUENTS OF *Zanthoxylum heitzii* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, (in press), 2005.

BOULWARE, R.T. e STERMITZ, F.R. Some alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum microcarpum* and *Z. procerum*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 2, p.200-205, 1981.

BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, P.B., NAKAMURA, UT.U.; YOUNG, M.C.M.; CORTEZ, D.A.G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 715-722, 2007.

CASA, D.D. e SOJO, M. Alkaloids of *Zanthoxylum caribaeum* Lam. **Journal of the Chemical Society (C)**, p. 2155-2156, 1967.

CHANG, C.T.; DOONG, S.L.; TSI, I.L.; CHEN, I.S. Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p.1419-1422, 1997.

CHAO, M.D.; CHEN, I.S.; CHENG, J.T. Inhibition of protein kinase C translocation from cytosol to membrane by chelerithrine. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 662-663, 1998.

CHEN, I.S.; CHEN, T.L., CHANG, Y.L.; TENG, C.M.; LIN, W.Y. Chemical constituents and biological activities of the fruit of *Zanthoxylum integrifoliolum*. **Journal of Natural Products**, n. 62, p. 833-837, 1999a.

CHEN, I.S.; CHEN, T.L., LIN, W.Y. TSAI, I.L.; CHEN, Y.C. Isobutylamides from the fruit of *Zanthoxylum integrifoliolum*. **Phytochemistry**, n. 52, p. 357-360, 1999b.

CHEN, I.S.; LIN, Y.C.; TSAI, I.W.; TENG, C.M.; KO, F.N.; ISHIKAWA, T.; ISHII, H. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1091-1097, 1995.

CHEN, I.S.; WU, S.J.; LEU, Y.L.; TSAI, I.W.; WU, T.S. Alkaloids from root bark of *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 217-219, 1996.

CHEN, I.S.; WU, S.J.; TSAI, I.L. Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. **Journal of Natural Products**, n. 9, p. 1206-1211, 1994a.

CHEN, I.S.; WU, S.J.; LIN, Y.C.; TSAI, I.L.; SEKI, H.; KO, F.N.; TENG, C.M. Dimeric 2-quinolone alkaloid and antiplatelet aggregation constituents of *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v.36, n. 1, p. 237-239, 1994b.

CHIESA, F.A.F.; MOYNA, P. Alcalóides esteroidales. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** : da Planta ao Medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: Florianópolis SC: Ed. da Universidade/UFRS e Ed. da UFSC, 1999. Cap. 32, p. 717-731.

CHO, W.J.; KIM, E.K.; PARK, I.Y.; JEONG, E.Y.; KIM, T.S.; LE, T.N.; KIM, D.D.; LEE, E.S. Molecular modeling of 3-arylisoquinoline antitumoral agents active against A-549. A comparative molecular field analysis study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2953-2961, 2002.

COSTA, S.T.; PELAIS, A.C.A.; CORRÊA, N.C.F.; FRANÇA, L.F.; MARQUES, M.O.M. Avaliação da extração de óleo essencial de Vetiver (*Vetiveria zizanioides*) com CO<sub>2</sub> supercrítico. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.*, Botucatu, v.8, n.4, p.100-103, 2006.

DAVIES K. J., **Biochem. Soc. Symp.**, 61, 1-31 1995

DE MORAIS, S.M.; FACUNDO, V.A.; BRAZ, R. **New volatile sesquiterpene alcohols of *Zanthoxylum syncarpum* Tull root oil.** *Journal of Essential Oil Research*, v. 14, n. 4, p. 274-275, 2002.

DECAUDAIN, N.; KUNESCH, N.; POISSON, J. Alkaloids de *Zanthoxylum tsihanimposa*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 505-507, 1974.

DESCHAMPS, M.B.; HERRENKNECHT, C.; AKENDENGUE, B.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of *Enantia chlorantha* by centrifugal partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 143-152, 2004.

DEWICK, P.M. Alkaloids. In: DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach.** John Wiley & Sons Ltda. 1997. cap. 6, p. 270-371.

DEYUN, K.; GRAY, A.I.; HARTLEY, T.G.; WATERMAN, P.G. Alkaloids from an Australian accession of *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 87-88, 1996.

DIAS, JCP et al. The impact of Chagas disease Control in Latin America - a review. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 603-612, July 2002.

DIHL, E.E.; POSER, G.L.V.; HENRIQUES, A.T. Constituents of *Zanthoxylum rugisum* St.-Hil & Tul. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p.275-277, 2000.

DOMÍNGUEZ X.A.; BENAVIDES, L.; BUTRUILLE, D. Les bases quaternaires de la racine de *Zanthoxylum fagara*. **Phytochemistry Reports**, v. 13, p. 680, 1974.

EGLINTON, G. and HAMILTON, R.J. Leaf Epicuticular Waxes. **Science**, vol.156 p.1322-1335 1967.

ELGAMAL, M.H.A.; ELEWA, N.H.; ELKHRISY, E.A.M.; DUDDECK, H.  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones. **Phytochemistry**, v. 18, p. 139-143, 1979.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Editora Edgard Blücher 1974.

FACUNDO, V.A.; DA SILVEIRA, A.S.P.; BRAZ, R.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Chemical constituents of *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN. **Química Nova** v. 28, n. 2, p. 224-225, 2005.

FACUNDO, V.A.; MORAIS, S.M.; BRAZ FILHO, R.; MATOS, F.J.A.; SOUZA, R.T. Estudo químico de plantas potencialmente bioativas do nordeste brasileiro: *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 78, n. 3, p. 57-59, 1997.

FACUNDO, V.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. DE MORAIS, S.M. Essential oil of *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain. leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, n. 6, p. 402-403, 2003.

FANG, S.D.; WANG, L.K.; HECHT, S.M. Inibitors of DNA Topoisomerase I isolated from roots of *Zanthoxylum nitidum*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 5025-5027, 1993.

**FISH, F.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Alkaloids and triterpenes from *Zanthoxylum Pavifoliolum*. *Phytochemistry*, v. 14, p. 310-311, 1975a.**

**FISH, F.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Cumarin, alkaloid and flavonoid constituents from the root and stem barks of *Zanthoxylum avicennae*. *Phytochemistry*, v. 14, p. 841-842, 1975b.**

**FISH, F.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Alkaloid, cumarins, triterpenes and a flavonoid from the root of *Zanthoxylum dipetalum*. *Phytochemistry*, v. 14, p. 2073-2076, 1975c.**

**FISH, F.; WATERMAN, P.G. Chloroform-soluble alkaloids of the root bark of *Fagara viridis*. *Phytochemistry*, v. 10, p. 3325-3327, 1971.**

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F.; DEMECHELI, C. Lipossomas: Propriedades Físico-químicas e Farmacológicas, Aplicações na quimioterapia à Base de Antimônio. **Química Nova**, v.28, n. 3, p.511-518, 2005.

FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, A. DOMINGOS, M. n-alkane distribution of leaves of *psidium guajava* exposed to industrial air pollutants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 57, p. 100-105, 2006

GESSLER, M.C.; NKUNYA, M.H.H.; MWASUMBI, L.B.; HEINRICH, M.; TANNER, M. Screening tanzanian medicinal-plants for antimalarial activity. *Acta Tropica*, v. 56, n. 1, p. 65-77, 1994.

GIACOPELLO, D.; DEULOFEU, V.; COMIN, J. Studies on Argentine plants – XX The syntheses of fargarine II. *Tetrahedron*, v. 20, p. 2971-2975, 1964.

GONÇALVES, J. C. R; DONATO, M. F. ;ALVES, A. M. H. ;SOUSA, D. P. ;ALMEIDA, R. N. ; ARAÚJO, D. A. M.; Efeito do (-)-Alfa-Bisabolol no Sistema Nervoso Periférico de Roedores. *Produtos Naturais*, 44.109, 2006.

GONZAGA, W.D.; WEBER, A.D.; GIACOMELLI, S.R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I.I.; DESSOY, E.C.M.; MOREL, A.F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Medica*, v. 69, n. 8, p. 773-775, 2003a.

GONZAGA, W.A.; WEBER, A.D.; GIACOMELLI, S.R.; DALCOL, I.I.; HOELZEL, S.C.S.; MOREL, A.F. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Medica*, v. 69, p. 371-374, 2003b.

GRAY, A.I.; O´SULLIVAN, J.J. Alkaloid, lignan and sterol constituents of *Zanthoxylum simulans*. *Planta Medica*, v. 39, p. 209, 1980.

GUY, I.; CHARLES, B. GUINAUDEAU, H.; FERREIRA, M.E.; DE ARIAS, A.R.; FOUNET, A. Essential oil from *Zanthoxylum chiloperone* and *Z. Riedelianum* growing in paraguay. *Pharmaceutical Biology*, v. 39, n. 2, p. 152-154, 2001.

HEGNAUER, R. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*, v. 27, N° 8, p.2423-2427, 1988.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** : da Planta ao Medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: Florianópolis SC: Ed. da Universidade/UFRS e Ed. da UFSC, 1999. Cap. 29, p. 651-666.

HERBERT, J.M.; AUGEREAU, J.M.; GLEYE, J.; MAFFRAND, J.P. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 172, n. 3, p. 993-999, 1990.

HSIAO, J.J. & CHIANG, H.C. Lignans from the wood of *Aralia bipinnata*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p.899-902, 1995.

HSIEH, T.J.; LU, L.H.; SU, C.C. NMR spectroscopic, mass spectroscopic, X-ray crystallographic, and theoretical studies of molecular mechanics of natural products farformolide B and sesamin. **Biophysical Chemistry**, v. 114, p. 13-20, 2005.

HSSAIN, S.F.; GÖZLER, B.; FAJARDO, V.; FREYER, A.J.; SHAMMA, M. The stereochemistry and <sup>13</sup>C NMR spectra of protopine salts. **Journal of Natural Products**. v. 46, n. 2, p. 251-255, 1983.

HU, C.M.; CHENG, H.W.; CHENG, Y.W.; KANG, J.J. Mechanisms induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2001.

HUSSAIN, S.F.; GOZLER, B.; FAJARDO, V.; FREYER, A. J.; SHAMMA. The stereochemistry and <sup>13</sup>C NMR spectra of protopinium salts. *Journal of Natural Products*, v. 46, n. 2, p. 251-255, 1983.

International Union of Purê Applied Chemistry Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (IUPAC) 1998. disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/fusedring/FR22.html#22>> acessado em: 10/11/2008.

ISHII, H.; ISHIKAWA, T. Arnottianamide and isoarnottianamide: the structural establishment due to chemical conversion from the known benzo[c]phenanthridine alkaloids by the novel Bayer-Villiger like oxidation of an immonium group. **Tetrahedron Letters**, n. 15, p. 1203-1206, 1976.

ISHII, H.; ISHIKAWA, T.; HAGINIWA, J. The chemical constituents of *Xanthoxylum arnottianum* Maxim. **Chemical Abstracts** v. 87, 87: 197250g, 1977.

ISHII, H.; MURAKAMI, K.; TAKEISHI, K.; ISHIKAWA, T.; HAGINIWA, J. The chemical constituents of *Xanthoxylum inerme* Koidz. **Chemical Abstracts** v. 95, 95: 111726x, 1981.

ISLAM, A.; SAYEED, A.; BHUIYAN, M.S.A.; MOSADDIK, M.A.; ISLAM, M.A.U.; KHAN, G.R.M.A.M. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 428-430, 2001.

ISLAM, S.K.N. e AHSAN, M. Biological activities of the secondary metabolites isolated from *Zieria smithii* and *Zanthoxylum elephantiasis* on microorganisms and brine shrimps. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 1, p. 64-66, 1997.

IWASA, K.; KURIBAYASHI, A.; SUGIURA, M.; MORIYASU, M.; LEE, D.U.; WIEGREBE, W. LC-NMR and LC-MS analysis of 2,3,10,11-oxygenated protoberberine metabolites in *Corydalis* cell cultures. *Phytochemistry*, v. 64, p. 1229-1238, 2003.

JACKMAN, L. M.; TREWELLA, J. C.; MONIOT, J. L.; SHAMMA, M. The carbon-13 NMR spectra of aporphine alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 5, p. 437-449, 1979.

JEN, C.M.; TSAI, I.L.; HORNG, D.J.; CHEN, I.S. Isolation and structure determination of two new compounds from *Zanthoxylum integrifoliolum*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 11, p. 2019-2021, 1993.

KATO, A.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; NISHIYAMA, Y. Isolation of alkaloidal constituents of *Zanthoxylum usambarensis* and *Zanthoxylum chalybeum* using ion-pair HPLC. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 316-318, 1996.

KATO, M.J. **A distribuição de lignóides e policetídeos nos frutos de *Virola elongata* (Benth.) Warb. (Myristicaceae)**. 1989, 343f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KO, F.N.; CHEN, I.S.; WU, S.J.; LEE, L.G.; HAUNG, T.F.; TENG, C.M. Antiplatelet effects of chelerythrine chloride isolated from *Zanthoxylum simulans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1052, n.3, p. 360-365, 1990.

KRANE, B.D.; FAGBULE, M.O.; SHAMMA, M. The benzophenanthridine alkaloids. **Journal of natural Products**. v. 47, n. 1, p. 1-43, 1984.

KUMAR, G.S.; DAS, A.; MAITI, M. Photochemical conversion of sanguinarine to oxysanguinarine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**. v. 111, p. 51-56, 1997.

KUSTER, R.M. e ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia : da Planta ao Medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre: Florianópolis SC: Ed. da Universidade/UFRS e Ed. da UFSC, 2001. Cap. 21, p. 461-479.

KUZNETSOVA, L.P.; NIKOL'SKAYA, E.B.; SOCHILINA, E.E.; FADDEEVA, M.D. Inhibition of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by some alkaloids. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**. v.38, n. 1, p. 35-39, 2002.

LEE, S.S.; KI, M.; LEE, M.K. Inhibitory effects of sanguinarine on monoamine oxidase activity in mouse brain. **Phytotherapy Research**. v. 12, n. 2, p. 167-169, 2001.

LEWIS, J.R. Biological activity of some Rutaceous compounds. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. Academic Press, London, 1983. cap. 11, p. 31-96.

LIU, R.; FENG, L.; SUN, A.; KONG, L. Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) Cusson by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**. V. 1055, p. 71-76, 2004.

MACHADO, Gêrzia Maria de Carvalho et al. Activity of brazilian and bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n.1, p. 73-77, 2007.

MALIATO, E.; ALFIERI, A.; FRAAIJE, M.W.; MATTEVI, A. Cristal structure of a Baeyer-Villiger monooxygenase. **Biochemistry**, v. 101, n. 36, 2004.

MARCANO, D.D.C.; HASEGAWA, M.; CASTALDI, A. Neutral compounds and alkaloids of *Zanthoxylum ocumarensis*. **Phytochemistry**, v. 11, p.1531-1532, 1972.



MARSAIOLI, A.J.; REIS, F.A.M.; MAGALHÃES, A.F.; RÚVEDA, E. A.  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of aporphine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 18, p. 165-169, 1979.

MARTIN, M.T.; RASOANAIVO, L.H.; RAHARISOLOLALAO, A. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum madagascariense*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 590-593, 2005.

MASUDA, T.; TAKASUGI, M. ANETAI, M. Psoralen and other linear furanocoumarin as phytoalexin in *Glehnia littoralis*. **Phytochemistry**, v.47, n. 1, p. 13-16, 1998.

**MATU, E.N.; STADEN, J.V. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants use for medicinal purpose in Kenya.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. **87**, p. 35-41, 2003.

MESTER, I. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. Academic Press, London, 1983. cap. 3, p. 31-96.

MIMURA, M.R.M.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A. BAUMGRATZ, J.F.A. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: Taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 581-588, 1998.

MONQUEIRO, P.A.; CHRISTOFFOLRTI, P.J.; MATAS, J.A.; HEREDIA, A. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelia benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, v. 22, n.2, p.203-210, 2004.

MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; NISHIYAMA, Y.; KATO, A. (R)-(+)-Isotembetarine, a quaternary alkaloid from *Zanthoxylum nitidum*. **Journal of Natural Products**. v. 60, p. 299-301, 1997.

MORRISON, Robert T.; BOYD, Robert N. **Química orgânica**. 7ª Edição Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1973.

MOURA, N.F.; RIBEIRO, H.B.; MACHADO, E.C.S.; ETHUR, E.M.; ZANATTA, N.; MOREL, A. Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p.1443-1446, 1997.

MOYNA, P. e HEINZEN, H. Lípidos: química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** : da Planta ao Medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: Florianópolis SC: Ed. da Universidade/UFRS e Ed. da UFSC, 1999. Cap. 17, p. 365-396.

NAKANISHI, T.; SUZUKI, M.; SAIMOTO, A.; KABASAWA, T. Structural considerations of NK109, an antitumoral benzo[c]phenanthridine alkaloid. **Journal of Natural Products**. v. 62, n. 6, p. 864-867, 1999.

NAVARRO, V. e DELGADO, G. Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 223-226, 1999.

NG, K.M.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P.G. Benzophenanthridine alkaloids from the stem bark of a *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3251-3254, 1987.

NGOUELA, S.; TSAMO, E.; CONNOLLY, J.D. Lignans and other constituents of *Zanthoxylum heitzii*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 3, p. 867-869, 1994.

NGUYEN, Q.A.; VAN-DUFAT, H.T.; TILLEQUIN, F.; DUMONTET, V.; SEVENET, T. A new phenylpropanoid ester from the bark of *Zanthoxylum scandens* (Rutaceae). *Zeitschrift für naturforschung C-A Journal of Biosciences*, v. 57, n.11-12, p. 986-989, 2002.

NISSANKA, A.P.K.; KARUNARATNE, V.; BANDARA, B.M.R.; KUMAR, V.; NAKANISHI, T.; NISHI, M.; INADA, A.; TILLEKERATNE, L.M.V.; WIJESUNDARA, D.S.A.; GUNATILAKA, A.A.L. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 857-861, 2001.

OLEA, Roberto S. G. & ROQUE, Nidia F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de <sup>13</sup>C. *Química Nova*, 13(4), 278281, 1990.

OLIVEIRA, E.L.; FREITAS, P.C.; GUEDES, M.L.S.; VELOZO, E.S. Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum stelligerum* (Turcz). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 29-30, 2002.

PEREIRA M. R. G. et al., **J. Bras. Patol. Clínica**, 40, 281-286, 2004.

PIRANI, J. R. **Estudo Taxonômico de Rutaceae**. 1999, 191f. Tese (Livre Docência) - Departamento de Biociência da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PRASAD, R. B. N. ; MÜLER, E. & GÜLZ, P. G. ; Epicuticular waxes from leaves of *Quercus robur* , **Phytochemistry**, Vol. 29, Nº 7, p. 2101-2103, 1990.

**RAHMAN, M.T.; ALIMUZZAMAN, M.; AHMAD, S.; CHOWDHURY, A.A.** Antinociceptive and antidiarrhoeal activity os *Zanthoxylum rhetsa*. *Fitoterapia*, v. 73, p. 340-342, 2002.

REN, L. e XIE, F. Alkaloids from *Zanthoxylum bungeaum* Maxim. **Chemical Abstracts** v. 96, 96: 4897e, 1982.

REYNOLDS, William F.; McLEAN, Stewart; POPLAWASKI, Jenusz; ENRIQUEZ, Raul G.; ESCOBAR, Lura I.; LEON, Ismael. Total assignment of 1H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: na investigation of the potetial utility of 1H chemical shifts in structural investigation of complex natural products. **Tetrahedron**, V. 42, N. 13, p. 3419-3428, 1986.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia biotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. Cap. 9, p. 163-208.

ROSSATO, M.; SANTOS, A.C.; SERSFINI, L.A.; AGOSTINI, F.; PENSERA, M.R.; WASUM, R.; BARBIERI, R.L. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii*

(Briquet) mondenke (verbenaceae) do sul do Brasil. **Química Nova**, v.29, n.2, p. 200-202, 2006.

ROSS, S.A.; SULTANA, G.N.N.; BURANDT, C.L.; ELSOHLY, M.A.; MARAIS, J.P.J., FERREIRA, D. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 88-90, 2004.

SANTANA, L.L.B.; CARDOSO, L.<sup>a</sup>; DRUZIAN, J.I.; SOUZA, V.F.; COSTA, T.<sup>a</sup>C.; NÓBREGA, D.A.; HOHLEMWERGER, S.V.A.; VELOZO, E.S. Selectivity in the extraction of 2-quinolone alkaloids with supercritical CO<sub>2</sub>. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 04, p. 525-530, 2006.

SEIFEN, E.; ADAMS, R.J.; RIEMER, R.K. Sanguinarine: A positive inotropic alkaloid which inhibits cardiac Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **European Journal of Pharmacology**. V. 6, n. 4, p. 251-258, 1978.

SEGER, C.; JANDL, B.; BRADER, G.; ROBIEN, W.; HOFER, O.; GEGER, H. Case studies of CSEARCH supported structure elucidation strategies: lupeol and a new gemacrene derivative. *Fresenius Journal Anal Chem*, V. 359, p. 42-45, 1997.

SEIGLER, D. S. **Plant Secondary Metabolism**. Kluwer Academic Publishers, Boston / Dordrecht / London, 1998.

SETHI, V.S.; SETHI, M.L. Inhibition of reverse transcriptase activity of RNA-tumor virus by fagaronine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 63, n. 4, p. 1070-1076, 1975.

SHARMA, P.N.; SHOEB, A.; KAPIL, R.S.; POPLI, S.P. Toddalidimerine, a dimeric benzophenanthridine alkaloid from *Toddalia asiatica*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2781-2783, 1981.

SHEEN, W.S.; TSAI, I.L.; TENG, C.M.; CHEN, I.S. Nor-neolignan and phenyl propanoid from *Zanthoxylum ailanthoides*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 1, p. 213-215, 1994.

**SILVA, C.V.; DETONI, C.B.; VELOZO, E.S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba*A. *ST.Hil*. Química Nova, v. 31, n. 8, p. 2052-2055, 2008.**

SILVA, C.V.; OLIVEIRA, E.L.; GUEDES, M.L.S.; VELOZO, E.S. Micromoléculas de raízes de *Zanthoxylum stelligerum* (Turcz). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n. 1, p. 75-78, 2002.

SILVA, M.; BITTNER, M.; HOENEISEN, M.; BECERRA, J.; CAMPOS, V.; GONZALES, F.; CESPEDES, C.; MARAMBIO, O. Química de los triterpenos. **Washington: D.C. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1992.**

SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P.; BEVALOT, F.; VAQUETTE, J. Z. Thomamide: An aromatic amide from *Zanthoxylum thomense*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2720-2721, 1985.

- SIMÕES, Claudia Maria Oliveira; SPITZER, Volker. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** : da Planta ao Medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: Florianópolis SC: Ed. da Universidade/UFRS e Ed. da UFSC, 2001. Cap. 18, p. 397-425.
- SINICO, C.; DE LOGU, A.; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A.M.; Liposomal incorporation of *Artemisia aborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. **European Journal of Pharmaceutics a Biopharmaceutics**, v. 59, p. 161-168, 2005.
- SNYDER, J.; NAKANISHI, K, The structure of castanaguyone a bisocoumarin plant product. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 50, p. 5015-5018, 1981.
- SOLOMONS, Graham & FRYHLE, Craig. **Química Orgânica**. 7ª. Edição. Rio de Janeiro: LTC. 2000 645f.
- STECK, W e MAZUREK, M. Identificação of natural coumarins by NMR spectroscopy. **Loydia**, v.35, n. 4, p. 418-439, 1972.
- STERMITZ, F.R.; CAOLO, M.A.; SWINEHART, J.A. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1469-1472, 1980.
- STERMITZ, F.R. e SHARIFI, I.A. Alkaloids of *Zanthoxylum monophyllum* and *Z. punctatum*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 2003-2006, 1977.
- SUAU, R.; NÀJERA, F.; RICO, R. The Polonovski-Poier reaction of berbine N-oxides. Synthesis os 8-hydroxymethyl and 8-methylberbines. **Tetrahedron**, v. 56, p. 9713-9723, 2000.
- SUKARI, M.A.; SALIM, W.S.W.; IBRAHIM, N.H.; RAHMANI, M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 197-199, 1999.
- SWINEHART, J.A. e STERMITZ, F.R. Bishordeninyl terpene alkaloids and constituents of *Zanthoxylum culantrillo* and *Z. coriaceum*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1219-1223, 1980.
- TANAHASHI, T. E ZENK, M.H. One step enzymatic synthesis of dihydrosanguinarine from protopine. **Tetrahedron Letters**, v. 29, n. 44, p. 5625-5628, 1988.
- TATSADJIEU, L.N.; ESSIA NGANG, J.J.; NGASSOUM, M.B.; ETOA, F.X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Camaroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 469-472, 2003.

UMEZAWA, T. Diversity in lignan biosynthesis. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, p. 371-390, 2003.

VAQUETTE, J.; POUSSET, J.L.; PARIS, R.R.; CAVÉ, A. Alcaloïdes de *Zanthoxylum decaryi*: La decarine, novel alcalóide derive de la benzophénanthridine. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1257-1259, 1974.

VÁSQUEZ, P.I.; PÉREZ, E.G.; SLATER, E.Y.; BERMÚDEZ, I.; CASSELS, B.K. Aporphine metho salts as neuronal nicotinic acetylcholine receptor blockers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3368-3372, 2007.

VIEIRA JÚNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de Protium heptaphyllum: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v.28, n.2, p.183-187, 2005.

WANG, B.H.; LU, Z.X.; POLYA, G.M. Inibition of eukaryote protein kinases by isoquinoline alkaloids. **Planta Medica**. v. 63, n. 6, p.494-498, 1997.

**WANG, C. e HSING, M. Isolation of antitumor alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* and structural study of its alkaloid.** Chemical Abstracts v. 95, 95: 192260r, 1981.

WANG, L.K.; JOHNSON R.K.; HECHT, S.M. Inhibition of topoisomerase-I function by nitidine and fagaromine. **Chemical Reserch Toxicology**. v. 6, n. 6, p. 813-818, 1993.

WATERMAN, P.G. The chemical systematics of alkaloids: A review emphasising the contribution of Robert Hegnauer. **Biochemical Systematis and Ecology**, v. 27, p. 395-406, 1999.

WATERMAN, P.G. Phylogenetic implications of the distribution of secondary metabolites within the Rutales. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. Academic Press, London, 1983. cap. 15, p. 377-399.

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

WATERMAN, P.G. Alkaloids and cumarins from *Zanthoxylum flavum*: dihydrorutaecarpine a novel  $\beta$ -indoloquinazoline alkaloid. **Phytochemistry**, v. 15, p. 578-579, 1996.

WATERMAN, P.G.; GRAY, A.I.; CRICHTON, E. G. Acomparative on the alkaloids of *Zanthoxylum leprieurii*, *Z. Lemairei* and *Z. rubescens* from Ghana. **Biochemical Systematis and Ecology**, v. 4, n. 4, p. 259-262, 1976.

WATERMAN, P.G. New combination in *Zanthoxylum* L. (1753)\*. **Taxon**, v. 24, p. 361-366, 1975.

WATERMAN, P.G. Decarine from the *Zanthoxylum viride*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 843-844, 1975a.

WATERMAN, P.G. Alkaloids from the root bark of *Zanthoxylum myriacanthum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2530, 1975b.

WEBER, Andréia Denise. Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica de *Zanthoxylum rhoifolium*. 2005, 137f. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

WEI, Y e ITO, Y. Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb “bai zhi” *Angelica dahurica* (Fisch. Ex Hoffm) Benth. Et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, p. 112-117, 2006.

WU, S.J. e CHEN, I.S. Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1659-1661, 1993.

XIONG, Q.; SHI, D.; MIZUNO, M. Flavonol glucosides in pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 723-725, 1975.

YANG, Y.P.; CHENG, M.J.; TENG, C.M.; CHANG, Y.L.; TSAI, I.L.; CHEN, I.S. Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 567-572, 2002.

YOSHIKAWA, K.; MORISHIMA, I. Conformational analysis of quaternary protoberberine alkaloids by carbon-13 NMR spectroscopy. **Chemistry Letters**, p. 961-964, 1975.

YUANZHENG, H.; QUANYOU, C. Studies on the chemical components of the essential oil from the leaves of *Citrus junos*. **National Agricultural Library** v. 13, n. 2, p. 165-168, 1993.

ZENK, M.H.; RUEFFER, M.; AMANN, M.; NEUMANN, B.D. Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cell and isolated enzymes. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 5, p. 725-738, 1985.