

RODRIGO SANT'ANA CABRAL

**Diversidade química e potencial biológico de
Conchocarpus fontanesianus (A. St.-Hil.)
Kallunki & Pirani (Rutaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de DOUTOR em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área
de Concentração de Plantas Vasculares em
Análises Ambientais.

São Paulo

2015

RODRIGO SANT'ANA CABRAL

**Diversidade química e potencial biológico de
Conchocarpus fontanesianus (A. St.-Hil.)
Kallunki & Pirani (Rutaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de DOUTOR em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área
de Concentração de Plantas Vasculares em
Análises Ambientais.

ORIENTADORA: Dra. Maria Cláudia Marx Young

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Cabral, Rodrigo Sant'Ana

C117d Diversidade química e potencial biológico de *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.– Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae) / Rodrigo Sant'Ana Cabral -- São Paulo, 2015.
283p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015.

Bibliografia.

1. Fitoquímica. 2. Alcaloides. 3. Atividades biológicas. I. Título.

CDU: 581.19

A minha família querida

dedico este trabalho, sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Genésio Sant'Ana Cabral e Cleusa Alves de Souza Cabral, que sempre me apoiaram, acreditaram e incentivaram meus estudos.

Aos meus irmãos, Renato e Fernanda, são grandes amigos e companheiros.

Aos meus primos e primas, tios e tias, pelos bons momentos em família.

A minha grande pequena mulher Helena Chamma, pelo apoio e carinho, e por ser minha grande parceria.

À Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente e ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo suporte.

À Dra. Maria Claudia Marx Young por ter me aceitado como aluno desde a iniciação científica, pelo carinho e respeito com que sempre me tratou, por sua orientação e por todos os ensinamentos, pelas divertidíssimas coletas com churrascos e principalmente por confiar em meu potencial sempre.

Aos professores Jean-Luc Wolfender e Emerson Ferreira Queiroz, pela grandiosa experiência de trabalhar por 10 meses em seu laboratório, proporcionando valiosos conhecimentos durante meu estagio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra, Suíça. Obrigado por todo o companheirismo e ensinamentos.

A Luce Maria Brandão, uma grande amiga, por todo o incentivo, carinho e conversas na hora do café.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio ao projeto, concedendo as bolsas de estudo para desenvolvimento do doutorado e de meu doutorado sanduíche na Suíça (Processos 2011/12515-0 e 2013/05480-0).

A todos os amigos e amigas que fiz na Universidade de Genebra, em especial Pierre-Maria, Quentin, Laurence, Marian, Natalie, Assane, Antonio, Soura, Sarah e Davide, pela ajuda, convivência e conversas nas horas de café.

A todos os pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica por todo auxílio durante o doutorado.

Aos funcionários e técnicos do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Ana, Mari, Cida e Pedro, por todo o auxílio durante o doutorado.

Aos amigos e amigas, brothers and sisters de Lavras que estão longe, em Minas Gerais, mais que tenho grande carinho e que fazem parte da minha vida.

Aos grandes amigos que fiz durante esta caminhada, e que fazem parte de tudo isso: Danilo, Rodrigo Sanches, Anderson, Manú, Maura, Kassinha, Van Fuentes, Thiara, Juzinha, Rose, Ludmila, Dai, Fernada, Glaucia, Marina, Anderson, Glauco, James, Joãozinho, Flávio, Leila, Cynthia, Roseli, Van Oliveira, Michele, Levi, Talita, Ferdz, Celso, Marco, eu sei que tem mais gente, mas não consigo lembrar (risos).

A todos os amigos do Instituto de Botânica, pela convivência, conversas, risadas e cafés nos finais de dia.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Conchocarpus fontesianus (Rutaceae), conhecida popularmente como pitaguará, é uma espécie endêmica de Floresta Ombrófila Densa de Encosta, em áreas de Mata Atlântica, mais precisamente em regiões de restinga do estado de São Paulo e Rio de Janeiro. Na literatura, foi encontrado somente um registro sobre estudo químico realizado com a espécie, e em espécies do mesmo gênero já foram encontrados diversos metabólitos como alcalóides (furoquinolínicos, acridônicos) e cumarinas (furanocumarinas). O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico de *C. fontesianus* com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a química da espécie, analisando a composição química de seus extratos (compostos fixos, ramos e folhas) e dos componentes voláteis (óleos voláteis, folhas) de duas regiões de Mata Atlântica (Jureia e Caraguatatuba), além de avaliar o potencial biológico destes. Os óleos foram extraídos de folhas frescas por hidrodestilação (3 horas) e analisados por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas. A identificação foi feita através da comparação dos padrões de fragmentação obtidos com os das bibliotecas de referências (NIST08, WILEY e ADAMS) e os Índices de Kovats. Os extratos foram obtidos a partir de ramos caulinares e folhas secas, que foram moídos e extraídos com etanol, sob pressão e temperatura. O extrato etanólico bruto (EEB) sofreu partição líquido/líquido para fornecer extratos hexânicos (HEX), extratos diclorometânicos (DCM) e extratos em acetato de etila (AcOEt). Os extratos diclorometânico dos ramos e folhas demonstraram significativa atividade antifúngica em cromatografia de camada delgada. Utilizando a técnica de fracionamento guiado por bioensaios seguido de microfracionamento por PREP-HPLC-UV foi possível localizar os compostos ativos. Diferentes zonas dos cromatogramas foram relacionadas com a atividade. Em paralelo com a abordagem da atividade do perfil cromatográfico baseado no HPLC, HPLC-DAD-ESI-MS e UPLC-TOF-MS foram utilizados para a identificação precoce de alguns dos compostos presentes na zona ativa. O isolamento das substâncias alvo foi realizado por cromatografia líquida de média pressão (MPLC-UV) e por HPLC preparativo. Usando essa abordagem, 23 compostos foram identificados; 21 foram efetivamente isolados e 2 identificados por desreplicação. Destes isolados, 7 são compostos naturais ainda não descritos; 5 alcalóides com núcleo indolopiridoquinazolinico e 2 triterpenos do tipo limonoide. A elucidação estrutural dos compostos isolados foram feitas através de métodos espectroscópicos clássicos, incluindo NMR 2D e espectrometria de massas de alta resolução. Além da atividade antifúngica, foram avaliados ainda o potencial antioxidante dos extratos, frações e compostos puros. Os compostos que apresentaram maior potencial antifúngico foram os alcalóides flindersina (**18**) (*C. albicans*, LD = 10 µg; *C.*

cladosporioides, LD = 5 µg), 7-metoxiflindersina (**19**) (*Candida albicans* e *C. sphaerospermum*, LD = 10 µg; *C. cladosporioides*, LD = 5 µg), γ-fagarina (**10**) e haplopina (**7**) (*C. sphaerospermum*, LD = 2,5 µg; *C. cladosporioides*, LD = 1 µg, ambos). Na avaliação da atividade antioxidante (DPPH) os compostos que apresentaram forte potencial foram a amida moupinamida (**4**) (IC₅₀ = 10,53 µg/mL) e o alcaloide haplopina (**7**) (IC₅₀ = 12,64 µg/mL). Os óleos voláteis não apresentaram atividade antioxidante e apresentaram fraca atividade antifúngica.

Palavras-chave: Rutaceae, *Conchocarpus fontanesianus*, atividades biológicas, óleos voláteis, alcaloides e técnicas hifenadas.

ABSTRACT

Conchocarpus fontanesianus (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae), popularly known as pitaguará, is a Brazilian native and endemic species distributed in the Atlantic Rainforest. In the literature, only one record was found on chemical study of this specie, and in the same genus have been found various metabolites such as alkaloids (furoquinoline, acridone) and coumarins (furanocoumarins). This study aimed to carry out the chemical study of *C. fontanesianus* in order to increase chemical knowledge of this specie by analyzing the chemical composition of its extracts (fixed metabolites from branches and leaves) and volatile components (volatile oils from leaves) of two regions of the Atlantic Rain Forest (Juréia e Caraguatatuba), and evaluate its biological potential. The oils were extracted from fresh leaves by hydrodistillation (3 hours) and analyzed by GC-MS. The identification was made by comparasion of fragmentation patterns obtained with the reference libraries (NIST08, Wiley and Adams) and Kovats index. The extracts were obtained starting from dried stem branches and leaves, which were ground and extracted with ethanol, under pressure and temperature (ASE300). The crude ethanolic extract suffered liquid/liquid partition to give hexane extracts (HEX), dichloromethanic extracts (DCM) and ethyl acetate extracts (AcOEt). The dichloromethane extract of the stem barks and leaves of this plant showed significant antifungal activity on thin layer chromatography bioautographic assays. Active compounds were isolated by bioassay-guided fractionation followed by HPLC-microfractionation to localize the active compounds. Different zones of the HPLC-UV chromatograms were linked to antifungal activities. In parallel to this HPLC-based activity profiling, HPLC-PDA-ESI-MS and UPLC-TOF-HRMS were used for the early identification of some of the compounds present in this active zone. The targeted isolation of the active compounds was performed by medium pressure liquid chromatography (MPLC-UV) and preparative HPLC. Using this approach, 23 compounds were identified, 21 have been effectively isolated and 2 identified by dereplication. Of these, 7 are natural compounds not described, 5 alkaloids with indolopiridoquinazoline nucleus and 2 triterpenes of the limonoid type. The structures of the isolated compounds were elucidated by classical spectroscopic methods including 2D NMR and HR-MS. In addition to the antifungal activity were also evaluated the antioxidant potential of extracts, fractions and pure compounds. The compounds that showed greater potential antifungal were the alkaloids flindersine (**18**) (*C. albicans*, DL = 10 µg; *C. cladosporioides*, DL = 5 µg), 7-metoxiflindersine (**19**) (*Candia albicans* e *C. sphaerospermum*, DL = 10 µg; *C. cladosporioides*, DL = 5 µg), γ-fagarine (**10**) and haplopine (**7**) (*C. sphaerospermum*, DL = 2,5 µg; *C. cladosporioides*, DL = 1 µg, both). In the

evaluating of the antioxidant activity (DPPH), the compounds that showed strong potential were the amide moupinamide (**4**) ($IC_{50} = 10,53 \mu\text{g/mL}$) and the alkaloid haplopine (**7**) ($IC_{50} = 12,64 \mu\text{g/mL}$). The volatile oils showed weak antifungal activity and didn't show antioxidant activity.

Key-words: Rutaceae, *Conchocarpus fontanesianus*, biological activity, volatile oils, alkaloids and hyphenated techniques.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	xxvii
LISTA DE ABREVIACÕES E SILGAS	xxxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os Produtos Naturais e sua Importância Econômica.....	1
1.2. Técnicas Hifenadas	3
1.3. Biodiversidade e Conservação	5
1.4. Locais de Estudo	6
1.4.1. Estação Ecológica Jureia-Itatins.....	6
1.4.2. Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar.....	7
1.5. Família Rutaceae.....	7
1.6. Gênero <i>Conchocarpus</i>	8
1.7. A Espécie <i>Conchocarpus fontanesianus</i> (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani.....	10
1.8. Antioxidantes	11
1.9. Antifúngicos.....	12
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo Geral.....	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Material Botânico – <i>Conchocarpus fontanesianus</i> (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani.....	15
4.2. Extração.....	16
4.2.1. Extração dos Óleos Voláteis	16
4.2.2. Preparação do Extrato Etanólico Bruto.....	17
4.2.3. Partição Líquido/Líquido	17
4.3. Análises Cromatográficas	18
4.3.1. Análise em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	18
4.3.2. Análise por Cromatografia a Gás – Espectrometria de Massas (GC-MS) dos Óleos Voláteis	18
4.3.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	19
4.3.4. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-TOF-MS)	21
4.3.5. Cromatografia Líquida de Media Pressão (MPLC-UV)	23

4.4. Identificação dos Compostos	25
4.4.1. Identificação dos Componentes dos Óleos voláteis.....	25
4.4.2. Identificação dos Componentes Isolados e Purificados dos Extratos	25
4.5. Ensaios Biológicos	26
4.5.1. Avaliação Antioxidante de Sequestro do Radical DPPH em Cromatografia de Camada Delgada Analítica (TLC).....	26
4.5.2. Avaliação Antioxidante de Sequestro do Radical DPPH em Microplaca	27
4.5.3. Avaliação Antioxidante com β -caroteno em TLC.....	27
4.5.4. Avaliação Antioxidante no Sistema β -caroteno/ácido linoleico em Microplaca.....	28
4.5.5. Avaliação da Atividade Antifúngica por Bioautografia com <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Cladosporium cladosporioides</i>	28
4.5.6. Avaliação da Atividade Antifúngica por Bioautografia com <i>Candida albicans</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Obtenção dos Extratos e Óleos Voláteis.....	31
5.1.1. Extração do Óleo Volátil	31
5.1.2. Extrato Etanólico Bruto	32
5.1.3. Partição Líquido/Líquido do Extrato Etanólico Bruto (EEB)	33
5.2. Análise Cromatográfica e Identificação dos Componentes dos Óleos Voláteis	34
5.3. Análise por Cromatografia em Camada Delgada.....	38
5.4. Avaliação Qualitativa de Atividades Biológicas por Bioautografia em TLC	40
5.4.1. Avaliação em TLC da Atividade Antioxidante dos Extratos com DPPH.....	40
5.4.2. Avaliação em TLC da Atividade Antioxidante dos Extratos com β -caroteno	42
5.4.4. Avaliação em TLC da Atividade Antifúngica dos Extratos contra <i>C. sphaerospermum</i>	44
5.4.4. Avaliação em TLC da Atividade Antifúngica dos Extratos contra <i>C. albicans</i>	45
5.5. Análise do Perfil Cromatográfico dos Extratos em HPLC-DAD.....	47
5.6. Microfracionamento em HPLC do Extrato DCM	54
5.7. Análise em HPLC-DAD-ESI-MS	57
5.8. Análise do Perfil Metabólico em UPLC-TOF (High Resolution Mass Spectrometry)	59
5.9. Purificação do extrato DCM por MPLC-UV	71
5.10. Elucidação estrutural dos compostos isolados do extrato DCM-RJ diretamente do fracionamento por MPLC-UV	72
5.11. Análise das frações restantes obtidas através do fracionamento do extrato DCM (ramos Jureia).	96
5.12. Avaliação Quantitativa da Atividade Antioxidante.....	222
5.12.1. Avaliação com DPPH em microplaca.....	222
5.12.2. Avaliação com β -caroteno / Ac. Linoleico em microplaca.....	226
5.13. Avaliação da Atividade Antifúngica	230
5.13.1. Avaliação contra <i>C. sphaerospermum</i> e <i>C. cladosporioides</i>	230

5.13.2. Avaliação contra <i>C.albicans</i>	233
6. CONCLUSÃO	233
7. REFERÊNCIAS	235

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de quinina, cânfora e cocaína.....	2
Figura 2 – Mapa do bioma Mata Atlântica.....	6
Figura 3 – Distribuição do gênero <i>Conchocarpus</i>	8
Figura 3A – Novos alcaloides de <i>Conchocarpus gaudichaudianus</i>	9
Figura 4 – Fotos de <i>C. fontanesianus</i>	10
Figura 5 - Mapa da E.E. Jureia-Itatins (1) e Parque Estadual da Serra do Mar (2).....	15
Figura 6 - Aparelho extrator ASE300 DIONEX®	17
Figura 7 – Procedimento experimental usado no processo de partição.....	18
Figura 8 – Cromatógrafo Agilent 1100 Series (HPLC-DAD).....	19
Figura 9 – Cromatógrafo Agilent 1200 Series acoplado a Espectrômetro de Massas Finnigan (HPLC-DAD-ESI-MS).....	20
Figura 10 – Cromatógrafo Preparativo Armen (PREP-HPLC-UV).....	21
Figura 11 – Sistema UPLC-TOF-MS.....	23
Figura 12 – Sistema MPLC-UV BÜCHI.....	24
Figura 13 - Cultura de <i>Candida albicans</i> utilizada no teste.....	29
Figura 14 - Cromatografia em camada delgada dos EEBs de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2).....	38
Figura 15 - Cromatografia em camada delgada dos extratos HEX de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2).....	39
Figura 16 - Cromatografia em camada delgada dos extratos DCM de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2).....	39
Figura 17 - Cromatografia em camada delgada dos extratos AcOEt de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2).....	40
Figura 18 - TLCs de sílica gel GF ₂₅₄ dos EEBs (1) e extrato HEX (2) reveladas com DPPH. Fatores de retenção (R _f s) calculados e intensidade da atividade apresentada (forte=***, média=**, fraca=*).....	41

Figura 19 - TLCs de sílica gel GF ₂₅₄ dos extratos DCM (3) e AcOEt (4) reveladas com DPPH. Fatores de retenção (R _f s) calculados e intensidade da atividade apresentada (forte=***, média=**, fraca=*).....	41
Figura 20 - TLCs de sílica gel GF ₂₅₄ dos EEBs (1) e extrato HEX (2) reveladas com β-caroteno. Fatores de retenção (R _f s) calculados e intensidade da atividade apresentada (forte=***, média=**, fraca=*).....	43
Figura 21 - TLCs de sílica gel GF ₂₅₄ dos extratos DCM (3) e AcOEt (4) reveladas com β-caroteno. Fatores de retenção (R _f s) calculados e intensidade da atividade apresentada (forte=***, média=**, fraca=*).....	43
Figura 22 - TLCs de sílica gel GF ₂₅₄ dos EEBs (1) e extrato HEX (2) reveladas com <i>C. sphaerospermum</i> . Fatores de retenção (R _f s) calculados e intensidade da atividade apresentada (forte=***, média=**, fraca=*).....	44
Figura 23 - TLCs de sílica gel GF ₂₅₄ dos extratos DCM (3) e AcOEt (4) reveladas com <i>C. sphaerospermum</i> . Fatores de retenção (R _f s) calculados e intensidade da atividade apresentada (forte=***, média=**, fraca=*).....	45
Figura 24 – Placa cromatográfica revelada com o fungo <i>C. albicans</i> . Avaliação dos extratos de ramos e folhas de <i>C. fontanesianus</i> . Padrão miconazol.....	46
Figura 25 – Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de ramos (A) e folhas (B) de <i>C. fontanesianus</i> coletados na Jureia, obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254, 280 e 366.....	48
Figura 26 – Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de ramos (A) e folhas (B) de <i>C. fontanesianus</i> coletados em Caraguatatuba, obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254, 280 e 366.....	48
Figura 27 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de ramos de <i>C. fontanesianus</i> coletados na Juréia (A) e em Caraguatatuba (B), obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254 nm.....	50

Figura 28 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de folhas de <i>C. fontanesianus</i> coletados na Juréia (A) e em Caraguatatuba (B), obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254 nm.....	51
Figura 29 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de ramos de <i>C. fontanesianus</i> coletados na Juréia e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254 nm.....	52
Figura 30 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de ramos de <i>C. fontanesianus</i> coletados em Caraguatatuba e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254 nm.....	52
Figura 31 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas de <i>C. fontanesianus</i> coletados na Juréia e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254 nm.....	53
Figura 32 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas de <i>C. fontanesianus</i> coletados em Caraguatatuba e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ= 254. nm.....	53
Figure 33 – Ilustração do procedimento experimental realizado para obtenção das regiões do perfil cromatográfico do extrato DCM ramos que possuem atividade antifúngica.....	56
Figure 34 – Ilustração do procedimento experimental realizado para obtenção das regiões do perfil cromatográfico do extrato DCM folhas que possuem atividade antifúngica.....	56
Figure 35 – Análise dos extratos DCM de ramos e folhas através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS. Perfil cromatográfico dos extratos DCM, espectros de UV e valores de <i>m/z</i> dos constituintes químicos detectados nas regiões onde foi localizada atividade antifúngica. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm i.d, 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo= 1 mL/min, λ= 254 nm.....	57

Figura 36 – Análise dos extratos DCM de ramos e folhas através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS. Perfil cromatográfico dos extratos DCM, espectros de UV e valores de <i>m/z</i> dos constituintes químicos detectados. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm i.d, 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo= 1 mL/min, λ= 254 nm.....	58
Figura 37 – Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB dos ramos do material vegetal coletado na E.E.Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.....	60
Figura 38 –Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB das folhas do material vegetal coletado na E.E.Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.....	61
Figura 39 – Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB dos ramos do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.....	62
Figura 40 – Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB das folhas do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.....	63
Figura 41 – Comparação dos perfis químicos através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB dos ramos.....	64
Figura 42 – Comparação dos perfis metabólicos através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB das folhas.....	65
Figura 43 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM dos ramos, coletados na E.E Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.....	66
Figura 44 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM dos ramos, coletados no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.....	67

Figura 45 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM das folhas, coletadas na E.E Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.....	68
Figura 46 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM das folhas, coletadas no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.....	69
Figura 47 – Ilustração das estruturas químicas dos alcaloides 2-fenil-1-metil-4-quinolona (1), esquimianina (2), γ -fagarina (3) e dictaminina (4), metabólitos detectados no extrato DCM dos ramos de <i>C. fontanesinaus</i> através da técnica UPLC-TOF-MS.....	70
Figura 48 – Ilustração da transposição das análises de HPLC do extrato DCM analítico para MPLC preparativo.....	72
Figura 49 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração 08, identificado como a amida polifenólica dimorfamida C (1).....	74
Figura 50 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida polifenólica dimorfamida C (1).....	75
Figura 51 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da dimorfamida C (1).....	76
Figura 52 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da dimorfamida C (1).....	77
Figura 53 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD da dimorfamida C (1).....	78
Figura 54 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da dimorfamida C (1).....	79
Figura 55 – Estrutura da amida dimorfamida C (1), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	80
Figura 55 – Estrutura da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	81
Figura 56 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração 20, identificado como a amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4).....	82
Figura 57 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4).....	83
Figura 58 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4).....	84

Figura 59 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4).....	85
Figura 60 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD (em CD_3OD) da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4).....	86
Figura 61 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida, 4).....	87
Figura 62 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração 68, identificado como o alcaloide 7-metoxiflindersina (19).....	89
Figura 63 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida 7-metoxiflindersina (19).....	90
Figura 64 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da 7-metoxiflindersina (19).....	91
Figura 65 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da 7-metoxiflindersina (19).....	92
Figura 66 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD da 7-metoxiflindersina (19).....	93
Figura 67 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da 7-metoxiflindersina (19).....	94
Figura 68 – Estrutura do alcaloide 7-metoxiflindersina (19), isolado do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	95
Figura 69 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração C-1, identificado como a lignana (-)-siringaresinol (5).....	98
Figura 70 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da lignana (-)-siringaresinol (5).....	99
Figura 71 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY do (-)-siringaresinol (5).....	100
Figura 72 – Mapa de contorno NOESY do (-)-siringaresinol (5).....	101
Figura 73 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do (-)-siringaresinol (5).....	102
Figura 74 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD do (-)-siringaresinol (5).....	103
Figura 75 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC do (-)-siringaresinol (5).....	104
Figura 76 – Estrutura da lignana (-)-siringaresinol (5), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	105

Figura 77 – Estrutura da amida <i>N-cis</i> -feruloiltiramina (2), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	107
Figura 78 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração D-1, identificado como a amida <i>N-cis</i> -feruloiltiramina (2).....	107
Figura 79 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida <i>N-cis</i> -feruloiltiramina (2).....	108
Figura 80 – Comparação entre os espectros de NMR ^1H da amida <i>N-cis</i> -Feruloiltiramina. A - composto isolado do extrato DCM RJ; B - espectro da amida <i>N-cis</i> -Feruloiltiramina consultado na literatura (King & Calhoun, 2005).....	109
Figura 81 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da <i>N-cis</i> -feruloiltiramina (5).....	110
Figura 82 – Mapa de contorno NOESY da <i>N-cis</i> -feruloiltiramina (2).....	111
Figura 83 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração E-1, identificado como a amida paprazina (3).....	113
Figura 84 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida paprazina (3).....	113
Figura 85 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da amida paprazina (3).....	114
Figura 86 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amida paprazina (3).....	114
Figura 87 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD da amida paprazina (3).....	115
Figura 88 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da amida paprazina (3).....	115
Figura 89 – Estrutura da amida paprazina (3), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	116
Figura 90 – Estrutura da piranocumarina linear aegelinol (6), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	118
Figura 91 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração E-2, identificado como a piranocumarina linear (-)-aegelinol (6).....	119
Figura 92 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da piranocumarina linear (-)-aegelinol (6).....	120
Figura 93 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY do aegelinol (6).....	121
Figura 94 – Mapa de contorno NOESY do aegelinol (6).....	122
Figura 95 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração F-1, identificado como o alcaloide furoquinolínico haplopina (7).....	124

Figura 96 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide furoquinolínico haplopina (7).....	124
Figura 97 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da haplopina (7).....	125
Figura 98 – Estrutura do alcaloide haplopina (7), isolado do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	125
Figura 99 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-1, identificado como o alcaloide furoquinolínico esquimianina (9).....	127
Figura 100 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide furoquinolínico esquimianina (9).....	128
Figura 101 – Estrutura do alcaloide esquimianina (9), isolado do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	128
Figura 102 – Estrutura da amida (+)-grossamida (11), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	131
Figura 103 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-2, identificado como a amida (+)-grossamida (11).....	131
Figura 104 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida (+)-grossamida (11).....	132
Figura 105 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da (+)-grossamida (11).....	133
Figura 106 – Mapa de contorno NOESY da (+)-grossamida (11).....	134
Figura 107 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amida (+)-grossamida (11).....	135
Figura 108 – Mapa de contorno $g\text{HSQCAD}$ da (+)-grossamida (11).....	136
Figura 109 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da (+)-grossamida (11).....	137
Figura 110 – Estrutura do novo limonoide CF-A1 (14), isolado do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	140
Figura 111 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-3, identificado como novo triterpeno, limonoide CF-A1 (14).....	141
Figura 112 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do novo triterpeno, limonoide CF-A1 (14).....	142
Figura 113 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ do limonoide CF-A1 (14).....	143
Figura 114 – Mapa de contorno NOESY do limonoide CF-A1 (14).....	144

Figura 115 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do limonoide CF-A1(14).....	145
Figura 116 – Mapa de contorno $g\text{HSQCAD}$ do limonoide CF-A1 (14).....	146
Figura 117 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ do limonoide CF-A1 (14).....	147
Figura 118 – Estruturas dos limonóides CF-A1 (14) e nomilinato de metila.....	149
Figura 119 – Estrutura do alcaloide 10-hidroxirutaecarpina (12), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	150
Figura 120 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-4, identificado como o alcaloide 10-hidroxirutaecarpina (12).....	151
Figura 121 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do alcaloide 10-hidroxirutaecarpina (12).....	152
Figura 122 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da 10-hidroxirutaecarpina (12).....	153
Figura 123 – Mapa de contorno NOESY da 10-hidroxirutaecarpina (12).....	154
Figura 124 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do alcaloide 10-hidroxirutaecarpina (12).....	155
Figura 125 – Mapa de contorno $g\text{HSQCAD}$ da 10-hidroxirutaecarpina (12).....	156
Figura 126 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da 10-hidroxirutaecarpina (12).....	157
Figura 127 – Estrutura do alcaloide γ -fagarina (10), isolado do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	159
Figura 128 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-1, identificado como o alcaloide γ -fagarina (10).....	160
Figura 129 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide γ -fagarina (10).....	160
Figura 130 – Estrutura da lignanamida canabisina F (15), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	161
Figura 131 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-2, identificado como a lignanamida canabisina F (15).....	162
Figura 132 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida canabisina F (15).....	163
Figura 133 – Ampliação do espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) em δ_{H} 2,0 - 4.5 ppm (A) e δ_{H} 6,4 – 7.6 ppm (B), da amida canabisin F (15).....	164

Figura 134 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da canabisina F (15).....	165
Figura 135 – Estrutura da novo triterpeno limonoide CF-B1 (17), isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	167
Figura 136 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-4, identificado como novo triterpeno, limonoide CF-B1 (17).....	168
Figura 137 – Espectro de NMR ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) do novo triterpeno, limonoide CF-B1 (17).....	169
Figura 138 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY do limonoide CF-B1 (17).....	170
Figura 139 – Mapa de contorno NOESY do limonoide CF-B1 (17).....	171
Figura 140 – Espectro de NMR APT de ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) do limonoide CF-B1(17).....	172
Figura 141 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD do limonoide CF-B1 (17).....	173
Figura 142 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC do limonoide CF-B1 (17).....	174
Figura 143 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-3, identificado como novo alcaloide conchocarpina A (16).....	177
Figura 144 – Espectro de NMR ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) do alcaloide conchocarpina A (16).....	178
Figura 145 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY da conchocarpina A (16).....	179
Figura 146 – Mapa de contorno NOESY da conchocarpina A (16).....	180
Figura 147 – Espectro de NMR APT de ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) do novo alcaloide conchocarpina A (16).....	181
Figura 148 – Mapa de contorno <i>g</i> HSQCAD da conchocarpina A (16).....	182
Figura 149 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da conchocarpina A (16).....	183
Figura 150 – Estrutura do alcaloide inédito conchocarpina A, isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i> (16).....	185
Figura 151 – Estrutura do alcaloide flindersina, isolado do lenho de <i>C. fontanesianus</i> (18).....	186
Figura 152 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração O-1, identificado como alcaloide quinolônico flindersina (18).....	186

Figura 153 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide flindersina (18).....	187
Figura 154 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da flindersina (18).....	187
Figura 155 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do alcaloide flindersina (18).....	188
Figura 156 – Mapa de contorno $g\text{HSQCAD}$ da flindersina (18).....	188
Figura 157 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da flindersina (18).....	189
Figura 158 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração S-1, identificado como novo alcaloide fontanesina A (20).....	191
Figura 159 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do alcaloide fontanesina A (20).....	192
Figura 160 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da fontanesina A (20).....	193
Figura 161 – Mapa de contorno NOESY da fontanesina A (20).....	194
Figura 162 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do novo alcaloide fontanesina A (20).....	195
Figura 163 – Mapa de contorno $g\text{HSQCAD}$ da fontanesina A (20).....	196
Figura 164 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da fontanesina A (20).....	197
Figura 165 – Estrutura do alcaloide inédito fontanesina A, isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i> (20).....	199
Figura 166 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração S-2, identificado como novo alcaloide conchocarpina B (21).....	200
Figura 167 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide conchocarpina B (21).....	201
Figura 168 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da conchocarpina B (21).....	202
Figura 169 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do novo alcaloide conchocarpina B (21).....	203
Figura 170 – Mapa de contorno $g\text{HSQCAD}$ da conchocarpina B (21).....	204
Figura 171 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da conchocarpina B (21).....	205
Figura 172 – Estrutura do alcaloide inédito conchocarpina B, isolada do lenho de <i>C. fontanesianus</i> (21).....	207

Figura 173 – Estrutura do alcaloide inédito fontanesina B, isolada dos ramos de <i>C. fontesianus</i> (22).....	207
Figura 174 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração U-1, identificado como novo alcaloide fontanesina B (22).....	208
Figura 175 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide fontanesina B (22).....	209
Figura 176 – Mapa de contorno NOESY da conchocarpina B (22).....	210
Figura 177 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do novo alcaloide fontanesina B (22).....	211
Figura 178 – Mapa de contorno gHSQCAD da fontanesina B (22).....	212
Figura 179 – Mapa de contorno gHMBC da fontanesina B (22).....	213
Figura 180 – Estrutura do alcaloide inédito fontanesina C, isolada do lenho de <i>C. fontesianus</i> (23).....	215
Figura 181 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração U-2, identificado como novo alcaloide fontanesina C (23).....	216
Figura 182 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide fontanesina C (23).....	217
Figura 183 – Mapa de contorno gCOSY da fontanesina C (23).....	218
Figura 184 – Mapa de contorno NOESY da fontanesina C (23).....	219
Figura 185 – Compostos identificados a partir do extrato DCM dos ramos de <i>C. fontesianus</i> : 1- dimorfamida C; 2- <i>N</i> -cis-feruloiltiramina; 3- paprazina; 4- moupinamida; 5- (-)-siringaresinol; 6- (-)-aegelinol; 7- haplopina; 8- 2-fenil-1-metil-4-quinolona; 9- esquimianina; 10- γ -fagarina; 11- grossamida; 12- 10-hidroxirutaecarpina; 13- dictaminina; 14- limonoide CF-A1; 15- canabisina F; 16- conchocarpina A; 17- limonoide CF-B1; 18- flindersina; 19- 7-metoxiflindersina; 20- fontanesina A; 21- conchocarpina B; 22- fontanesina B; 23- fontanesina C.....	221
Figura 186 – Resultado da avaliação qualitativa dos compostos puros (50 μg). QA – padrão quercitica (5 μg).....	225
Figura 187 – Resultado da avaliação qualitativa dos compostos puros (50 μg). QA – padrão quercitica (5 μg).....	230

Figura 188 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos compostos puros contra <i>C. sphaerospermum</i> (1 - paprazina, 2 - moupinamida, 3 - 7-metoxiflindersina, 4 - flindersina, 5 - γ -fagarina e 6 - haplopina; P - nistatina).....	231
Figura 189 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos compostos puros contra <i>C. cladosporioides</i> (1 - paprazina, 2 - moupinamida, 3 - 7-metoxiflindersina, 4 - flindersina, 5 - γ -fagarina e 6 - haplopina; P - nistatina).....	232
Figura 190 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis contra <i>C. sphaerospermum</i> (A - frutos Juréia; B - folhas Juréia; C - folhas Caraguatatuba; PV - padrão timol).....	232
Figura 191 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis contra <i>C. cladosporioides</i> (A - frutos Juréia; B - folhas Juréia; C - folhas Caraguatatuba; P - padrão timol).....	233
Figura 192 – TLC de avaliação da atividade antifúngica contra o fungo <i>C. albicans</i> (A - flindersnia; B - 7-metoxiflindersina; P - padrão miconazol, [1 μ g]).....	234

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Datas de coleta e dos locais onde foram realizadas.....	16
Tabela 2 – Condições analítica e preparativa para purificação do extrato DCM ramos Juréia.....	24
Tabela 3 – Rendimento dos óleos voláteis de <i>C. fontanesianus</i> de acordo com local de coleta.....	31
Tabela 4 – Rendimento dos extratos em relação a massa de material vegetal utilizado.....	32
Tabela 5 – Rendimento dos extratos na partição. Valores entre parênteses indicam o rendimento em relação ao EEB.....	33
Tabela 6 – Composição química dos óleos voláteis de <i>C. fontanesianus</i> coletados na E.E. Juréia-Itatins e P.E.S.M (Caraguatatuba).....	35
Gráfico 1 – Comparativo da composição dos óleos voláteis (folhas) entre as áreas estudadas.....	36
Tabela 7 – Composição das principais classes químicas dos óleos voláteis das diferentes partes de <i>C. fontanesianus</i> coletados em regiões de Mata Atlântica.....	37
Tabela 8 – Condição cromatográfica aplicada para obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos de <i>C. fontanesianus</i> através da técnica HPLC-DAD.....	47
Tabela 9 – Condições cromatográficas aplicadas no microfracionamento do extrato DCM de ramos e folhas da Juréia através da técnica PREP-HPLC-UV.....	55
Tabela 10 – Condição cromatográfica aplicada para obtenção dos perfis metabólicos dos extratos de <i>C. fontanesianus</i> através da técnica UPLC-TOF.....	59
Tabela 11 – Dados obtidos na detecção dos alcaloides presentes no extrato DCM dos ramos (Jureia) de <i>C. fontanesianus</i> através da técnica UPLC-TOF-MS.....	71
Tabela 12 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a dimorfamida C (1 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	80
Tabela 13 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a moupinamida (4 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	81

Tabela 14 – Espécies que acumulam moupinamida (4) e suas respectivas atividades biológicas.....	88
Tabela 15 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o alcaloide 7-metoxiflindersina (19 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	95
Tabela 17 – Agrupamento das frações obtidas através do processo de fracionamento do extrato DCM ramos (Juréia).....	96
Tabela 18 – Ilustração do processo de purificação das frações do extrato DCM-RJ através da técnica HPLC-UV-preparativo.....	97
Tabela 19 – Espécies que acumulam a lignana (-)-siringaresinol (5) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).....	98
Tabela 20 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a lignana (-)-siringaresinol (5 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	105
Tabela 21 – Espécies que acumulam a amida <i>N</i> -cis-feruloiltiramina e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).....	106
Tabela 22 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para a amida <i>N</i> -cis-feruloiltiramina (5 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	112
Tabela 23 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a amida paprazina (3 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	116
Tabela 24 – Espécies que acumulam a amida paprazina (3) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).....	117
Tabela 25 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o aegelinol (6 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	118
Tabela 26 – Espécies que acumulam o (-)-aegelinol (6) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).....	123
Tabela 27 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o alcaloide haplopina (7 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	126
Tabela 29 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o alcaloide esquimianina (9 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	129
Tabela 30 – Espécies que acumulam o alcaloide esquimianina (9) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).....	130

Tabela 31 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a amida (+)-grossamida (11 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	138
Tabela 32 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o novo limonoide CF-A1 (14 , em CD_3OD).....	148
Tabela 33 – Dados de NMR de ^1H e ^{13}C comparativos entre o novo limonoide CF-A1 (14) e o nomilinato de metila.....	149
Tabela 34 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o alcaloide 10-hidroxiturtaecarpina (12 , em $\text{DMSO}-d_6$), e os dados presentes na literatura.....	158
Tabela 35 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o alcaloide γ -fagarina (10 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	159
Tabela 36 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a canabisina F (15 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	166
Tabela 37 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o novo limonoide CF-B1 (17 , em CD_3OD).....	175
Tabela 38 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide conchocarpina A (16).....	184
Tabela 39 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o alcaloide flindersina (18 , em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.....	189
Tabela 40 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide fontanesina A (20)...198	
Tabela 41 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide conchocarpina B (21).....	206
Tabela 42 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide fontanesina B (22).....	214
Tabela 43 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide fontanesina C (23)....	220
Gráfico 2 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos do material vegetal coletado na Estação Ecológica Juréia-Itatins.....	222
Gráfico 3 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar.....	223
Tabela 44 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos do lenho de <i>C.fontanesianus</i>	224

Tabela 45 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos das folhas de <i>C. fontanesianus</i>	224
Gráfico 4 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos composto isolados do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	226
Gráfico 5 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos do material vegetal coletado na E.E. Juréia-Itatins.....	227
Gráfico 6 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba.....	227
Tabela 46 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos do lenho de <i>C. fontanesianus</i>	228
Tabela 47 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos das folhas de <i>C. fontanesianus</i>	229

LISTA DE ABREVIACES E SILGAS

ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
AF	cido fórmico
BHA	hidroxianisol butilado
BHT	hidroxitolueno butilado
CHCl₃	clorofórmio
<i>d</i>	dubleto
DAD	detector de arranjos de diodos
DCM	diclorometano (CH ₂ Cl ₂)
DMSO-<i>d</i>6	dimetilsufxido
DNA	cido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EEB	extrato etanólico bruto
EEJI	Estac Ecológica Juréia-Itatins
EI	ionizac por impacto eletrônico (eletronic impact ionization)
ESI	ionizac por electrospray (electrospray ionization)
EtOH	etanol
FAPESP	Funda de Amparo a Pesquisa do Estado de So Paulo
GC	Cromatografia a Gs (Gas Chromatography)
<i>g</i>COSY	<i>gradiente Correlation Spectroscopy</i>
<i>g</i>HMBC	<i>gradiente Heteronuclear Mutiple Bond Correlation</i>
<i>g</i>HSQC	<i>gradient Heteronuclear Sigle Quantum Coherence</i>
ha	hectares
HEX	hexano

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (High Resolution Mass Spectrometry)
H₂O	água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC₅₀	concentração inibitória de 50% (inibitory concentration of 50%)
<i>J</i>	constante de acoplamento (em Hertz)
LC	equipamentos de Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography)
MeOH	metanol
MIC	concentração inibitória mínima (mininal inhibitory concentration)
MPLC	Cromatografia Líquida de Média Pressão (Medium Pressure Liquid Chromatography)
MS	Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Ressonance)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PESM	Parque Estadual da Serra do Mar
R_f	fator de retenção (retention factor)
<i>s</i>	singleto
SPE	extração em fase sólida (solid phase extraction)
<i>t</i>	triplete
TLC	Cromatografia de Camada Delgada (Thin Layer Chromatography)
TOF	Analisador de Massas por Tempo de Voo (Time-of-Fly)
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiencia (Ultra Performance Liquid Chromatography)
UC's	Unidades de Conservação da Natureza
UV	detector de luz ultra violeta
δ	deslocamento químico (em ppm)

1. INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (Viegas Jr *et al.*, 2006).

1.1. Os Produtos Naturais e sua Importância Econômica

As plantas superiores constituem uma das fontes naturais mais importantes de alimentos, fibras, madeira e também de diversos produtos químicos como óleos, essências, corantes, além de diversas substâncias de importância farmacêutica, e desde os primórdios das civilizações, tem contribuído significativamente para o fornecimento de substâncias úteis aos seres humanos (Calixto, 2005).

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/insetos-plantas (Viegas Jr *et al.*, 2006).

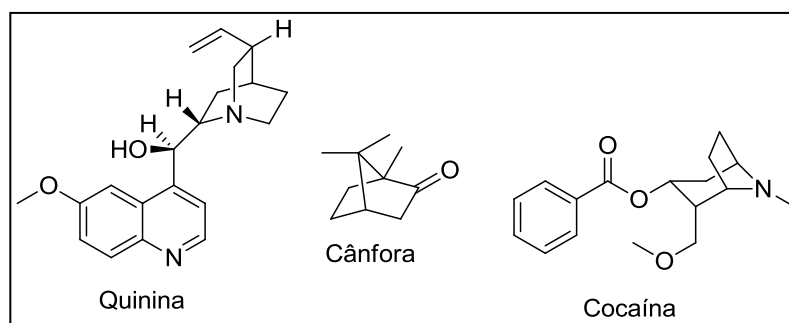
Muitos fatores são importantes para o sucesso no descobrimento de novos fármacos, dentre eles a diversidade química dos compostos que serão selecionados, cujas fontes podem ser: produtos naturais, compostos sintéticos ou semissintéticos. Dentre estas possibilidades os produtos naturais são considerados como a fonte de maior diversidade química (Strege, 1999). Os produtos naturais têm um papel relevante na economia, onde se estima que o mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha o maior mercado mundial de fitoterápicos (Pinto *et al.*, 2002).

Entre as 300 mil espécies de plantas conhecidas no planeta apenas uma pequena porcentagem, cerca de 25 mil, foi investigada fitoquimicamente e a fração destas submetidas à triagem biológica ou farmacológica é ainda menor. As plantas superiores são uma fonte de milhares de produtos naturais, com uma quase infinita variedade de diferentes estruturas

químicas (Henkel *et al.*, 1999; Calixto, 2005). Seus metabólitos secundários, melhor conceituados como metabólitos especiais (Gottlieb *et al.*, 1996), tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas e ao surgimento da Química de Produtos Naturais, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas com base científica (Montanari & Bolzani, 2001). A Química de Produtos Naturais é o estudo dos compostos químicos produzidos por organismos vivos sejam eles plantas, animais ou microrganismos, tanto terrestres quanto marinhos (Heinrich *et al.*, 2004).

O marco histórico ocorreu em 1806 quando o farmacêutico alemão Friederich Wilhelm Adam Sertürner, um dos pioneiros na utilização de substâncias naturais de forma pura, isolou a morfina da papoula (*Papaver sonniferum*), o primeiro produto natural isolado (Henriques, 1999; Barreiro, 2002). O trabalho realizado por Sertürner resultou posteriormente no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Muitas dessas substâncias isoladas são substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que atualmente ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo da quinina, cânfora e cocaína (**Figura 1**) (Wheelwrigth, 1974). A partir daí desenvolveu-se também a Farmacognosia, que é a ciência que estuda os princípios ativos naturais, originados de organismos vivos (Heinrich *et al.*, 2004).

Figura 1 – Estruturas químicas de quinina, cânfora e cocaína.



A fantástica variedade e complexidade das moléculas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas teriam sido resultado de milhões de anos de evolução, como forma de proteção e resistência às intempéries do clima, predadores e poluição, e também as condições de adaptação e regulação (Verpoorte, 2000; Montanari & Bolzani, 2001). Tal variedade e complexidade são inalcançáveis por métodos laboratoriais (Viegas-Jr. *et al.*, 2006).

Durante um período de 30 anos (1981 a 2010), 60,7% dos 1355 novos fármacos desenvolvidos e aprovados pelas agências mundiais de regulação foram provenientes de produtos naturais, ou substâncias desenvolvidas a partir deles (Newman & Cragg, 2012). As vendas mundiais totais de medicamentos derivados de plantas em 2002 foram estimadas em mais de US\$ 30 bilhões, demonstrando a continuidade do impacto econômico das plantas como fonte de fármacos (Raskin *et al.*, 2002).

O acúmulo de substâncias enantiomericamente puras é uma das coisas mais fascinantes do reino vegetal. A preocupação da indústria farmacêutica com produtos quirais intensificou-se depois dos graves efeitos causados por fármacos como a talidomida. Atualmente é de conhecimento que a teratogênese fetal é decorrente da ação do enantiômero (-). Este mercado explodiu na década de 90 e o faturamento de produtos quirais produzidos alcançou 45,2 bilhões de dólares em 1994 (Pinto *et al.*, 2002).

Atualmente muitos são os exemplos de moléculas oriundas de plantas, eficazes no tratamento das mais diversas enfermidades. Os alcaloides vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae, anticâncer), o diterpenoide plaxitel de *Taxus brevifolia* (Taxaceae, anticâncer), o alcaloide monoterpênico camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Cornaceae, anticâncer), o glicosídeo cardiotônico digoxina de *Digitalis inata* (Plantaginaceae, doenças cardíacas), o alcaloide quinina de *Cinchona officinalis* (Rubiaceae, antimalária), o alcaloide pilocarpina de *Pilocarpus jaborandi* (Rutaceae, glaucoma), o alcaloide galantamina de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae, mal de alzheimer) e o alcaloide tubocurarina de *Chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae, bloqueador neuromuscular) (Rates, 2001; Viegas Jr *et al.*, 2006; Hostettman & Marston, 2007).

1.2. Técnicas Hifenadas

A fim de descobrir novos compostos bioativos de plantas que poderiam tornar-se novos modelos moleculares ou novos fármacos, os extratos vegetais devem ser submetidos ao mesmo tempo à triagem química e a vários ensaios biológicos e farmacológicos. A triagem química ou perfil metabólico visa distinguir entre os compostos já conhecidos (desreplicação) e novas moléculas, diretamente nos extratos vegetais brutos. Assim o tedioso trabalho de isolamento de compostos conhecidos pode ser evitado e o isolamento de constituintes alvos que apresentam características espectroscópicas novas ou incomuns pode ser realizado (Hostettman *et al.*, 2001).

Com o desenvolvimento importante nas técnicas cromatográficas registradas durante os últimos anos, melhorias significativas em termos de eficiência de separação e diminuição do tempo de análise foram alcançadas para a análise de matrizes biológicas complexas. A este respeito, a introdução de partículas sub-2 µm e sistemas cromatográficos capazes de trabalhar em pressão muito elevada (UHPLC ou UPLC) demonstrou vantagens significativas para separações de alta resolução ou alto rendimento (Nguyen *et al.*, 2006; Petersson *et al.*, 2008). A melhoria na resolução dos cromatógrafos (LC) é muito relevante para os perfis metabólicos, devido à presença de vários compostos que possuem estruturas semelhantes e a possibilidade de evitar coeluição (Metz *et al.*, 2008).

O potencial da estratégia de “screening” químico foi consideravelmente aumentado pelo desenvolvimento de técnicas hifenadas, que são capazes de proporcionar uma separação eficiente dos metabólitos e informação estrutural ao mesmo tempo. Apesar de extratos vegetais serem misturas complexas de diferentes metabólitos, a análise de frações voláteis ou materiais apolares de superfícies foliares já é, há muito tempo realizada, não sendo necessário muitas vezes, nenhum fracionamento para total caracterização química do material estudado. O grande avanço na análise destas misturas decorreu do desenvolvimento de aparelhos de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), os quais são empregados rotineiramente, por exemplo, na análise de óleos essenciais ou óleos voláteis (Crews *et al.*, 1998). Acoplando um cromatógrafo líquido de alta eficiência com espectrômetro de massas e um detector ultravioleta de arranjos de diodos (LC-DAD-MS), uma grande quantidade de dados pode ser obtido dos constituintes de um extrato de planta antes de qualquer trabalho de isolamento (Wolfender *et al.*, 1998). Além disso, a recente introdução do acoplamento de HPLC com ressonância magnética nuclear (LC/RMN) permite que a estrutura completa de vários metabólitos de plantas possam ser elucidadas on-line (Wolfender *et al.*, 2001).

Quando comparado com a utilização clássica de detectores espectroscópicos de UV (ultra violeta), MS (espectrometria de massas) e NMR (ressonância magnética nuclear) aplicados aos produtos naturais puros, de preferência, a integração de todas estas técnicas nas suas formas acopladas/hifenadas (LC/UV, LC/MS e LC/NMR), com centralização de aquisição de dados espectroscópicos, permite a completa caracterização estrutural de diferentes metabólitos numa mistura em uma única análise. LC/UV/MS e LC/NMR são usados de uma maneira complementar para perfis metabólicos e desreplicação. Eles muitas vezes dão uma atribuição inequívoca de produtos naturais conhecidos e permite a determinação parcial da estrutura de componentes desconhecidos. Com base nesses

resultados, e ensaios de atividade biológica realizados paralelamente, o alvo de interesse pode ser eficientemente isolado (Wolfender *et al.*, 2003).

1.3. Biodiversidade e Conservação

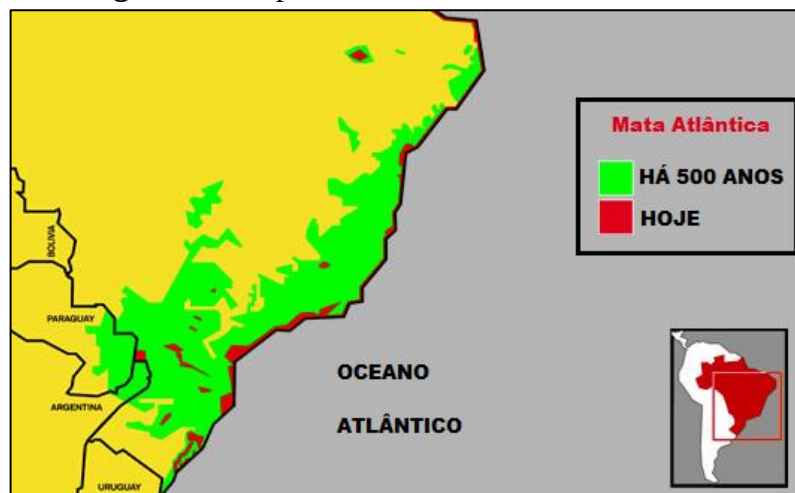
Estima-se que 20% de toda a biodiversidade mundial estejam em território nacional, distribuídas na Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado, sendo o Brasil considerado o maior berço mundial de espécies endêmicas. São 55 mil espécies de plantas (22% do total registrado no planeta), 1622 aves (191 endêmicas), 524 mamíferos (cerca de 131 endêmicos), 517 anfíbios (294 endêmicos), 468 reptéis (172 endêmicos), 3 mil peixes de água doce e cerca de 15 milhões de insetos, muitos sem qualquer descrição taxonômica (Lewinsonhn & Prado, 2002).

Essa biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental, tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica e de suas interações ecológicas, como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (Barreiro & Bolzani, 2009). Em razão disso, a exploração racional e a conservação da diversidade biológica é uma questão de prioridade e urgência (Bolzani *et al.*, 1999).

A expressão “Mata Atlântica”, adotada por vários autores, indica simplesmente a proximidade da floresta com o Oceano Atlântico. Essa formação deve sua exuberância à grande umidade do ar, trazida pelos ventos marinhos, que se precipita sob a forma de chuva nas costas, ao subirem para camadas frias de maior altitude. De acordo com o Manual Técnico da Vegetação Brasileira do IBGE, a Floresta Atlântica compreende um conjunto de tipologias vegetais, localizado na faixa litorânea brasileira desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, representado principalmente pela Floresta Ombrófila Densa e Floresta Estacional, associados a ecossistemas costeiros de restinga, mussunungas e mangues (Guedes *et al.*, 2005).

O bioma da Mata Atlântica é uma das maiores áreas de floresta tropical, ocupando o segundo lugar em extensão nas Américas, logo após a Floresta Amazônica. Atualmente está incluída entre os principais “hotspots” do mundo, sendo um dos centros de altíssima biodiversidade em que a extensão original foi dramaticamente reduzida, colocando em risco a sobrevivência de muitas espécies de animais e plantas (Myers *et al.*, 2000; Guedes *et al.*, 2005).

Figura 2 – Mapa do bioma Mata Atlântica.



Fonte – Mhttp://aldeiavelha-ipuca.blogspot.com.br

A implementação de Unidades de Conservação da Natureza (UC's) é uma estratégia mundial, adotada como a forma mais efetiva de conservação *in situ* da biodiversidade. As UC's constituem áreas de especial importância para preservação e conservação ambiental, desempenhando papel de grande relevância na manutenção da diversidade ecológica. Em um contexto mais amplo, as UC's protegem não apenas a biodiversidade de flora e fauna, mas também os seus processos ecológicos de interação. Existem no Estado de São Paulo 236 áreas naturais protegidas, divididas em 21 categorias de manejo de âmbito federal, estadual e particular, considerando Unidades de Proteção Integral, Unidades de Uso Sustentável e outras áreas especialmente protegidas (Xavier *et al.*, 2008).

1.4. Locais de Estudo

1.4.1. Estação Ecológica Jureia-Itatins

A Estação Ecológica Jureia-Itatins foi criada em 1986 por decreto (decreto estadual nº 24.646/1986, lei estadual nº 5.649/1987 e lei estadual nº 12.406/2006). Ela é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral que abrange parte dos municípios de Iguape, Itariri, Miracatu e Peruíbe, no sul do estado, possuindo uma área de 92.223,00 hectares (ha). Esta área se destaca pelo seu grau de preservação devido à dificuldade de acesso, caracterizando-se como um dos melhores e mais preservados trechos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Mamede *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2008).

1.4.2. Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar

O Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar foi criado por decreto como Reserva Florestal em 1956 (Decreto Estadual nº 26.393 de 11/09/1956). Em 14/05/1962, com a promulgação do Decreto Estadual nº 6.884, a Reserva Florestal de Caraguatatuba, abrangendo 13.969,60 ha foi transformada em Parque Estadual de Caraguatatuba e esta foi totalmente incorporada em 1977 ao Parque Estadual da Serra do Mar, quando se iniciou a configuração do território do Núcleo Caraguatatuba.

O Núcleo guarda aproximadamente 49.953 ha de Mata Atlântica remanescente, compreendendo os municípios de Caraguatatuba, Paraibuna e Natividade da Serra. A Vegetação predominante é a da Floresta Ombrófila Densa Montana, onde se encontram também encraves de Floresta de Neblina, abundância de bromélias e orquídeas (Brito & Oliveira, 2008).

1.5. Família Rutaceae

A Família Rutaceae, pertencente à ordem Sapindales (Bremer *et al.*, 2009), possui cerca de 155 gêneros e 1600 espécies, distribuídas em regiões Temperadas, Subtropicais e Tropicais, com maior incidência nas regiões da América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil são descritos 33 gêneros, 192 espécies sendo 107 endêmicas, 17 subespécies e 8 variedades (Pirani & Groppo, 2010).

As Rutaceas são normalmente plantas lenhosas, árvores ou arbustos, raramente ervas ou lianas, freqüentemente com espinhos. (Souza & Lorenzi, 2008). Esta família possui muitas espécies com grande importância econômica, dentre elas destacam-se as pertencentes ao gênero *Citrus*, que produzem tanto frutos de importância econômica (laranja, limão, tangerina) quanto óleos voláteis utilizados em perfumaria, ao gênero *Pilocarpus*, que são fontes de pilocarpina, um fármaco utilizado no tratamento do glaucoma, e aos gêneros *Boronia*, *Choisya*, *Poncirus* e *Skimmia*, usadas como ornamentais (Barroso *et al.*, 1986; Chase *et al.*, 1999). Existem ainda espécies produtoras de madeira de boa qualidade como pau-marfim (*Balfourodendron riedelianum*) e o guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*) (Souza & Lorenzi, 2008).

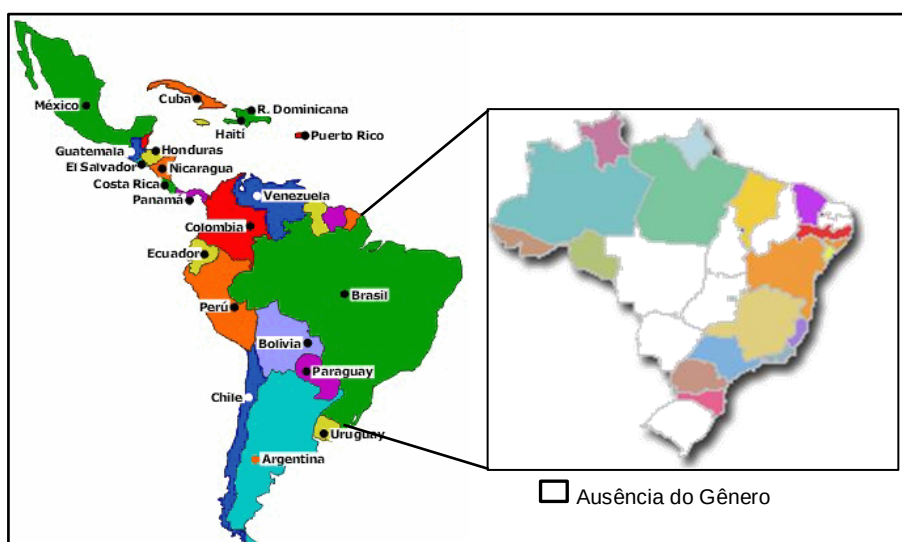
A família Rutaceae é rica em compostos secundários de grande diversidade química como: alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico (furoquinolínicos, indólicos e quinolínicos), cumarinas (furano e pirano cumarinas), lignanas, flavonóides, limonóides

(triterpenos) e óleos voláteis. (Waterman & Grundon, 1975; Ribeiro & Kaplan, 2002; Taveira *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2008; Albarici *et al.*, 2010).

1.6. Gênero *Conchocarpus*

O gênero *Conchocarpus*, pertencente à família Rutaceae e subfamília Rutoideae, é composto por arbustos ou pequenas árvores de até 7 metros de altura, com folhas alternas, inflorescência geralmente terminal ou extra-axilar, cálice relativamente pequeno e uma corola tubular formada por pétalas coerentes. Este gênero possui 45 espécies que são distribuídas da Nicarágua ao norte da Bolívia e Brasil (**Figura 3**). No Brasil apenas duas espécies não são encontradas (Kallunki & Pirani, 1998; Pirani, 2002; Groppo *et al.*, 2008).

Figura 3 – Distribuição do gênero *Conchocarpus*



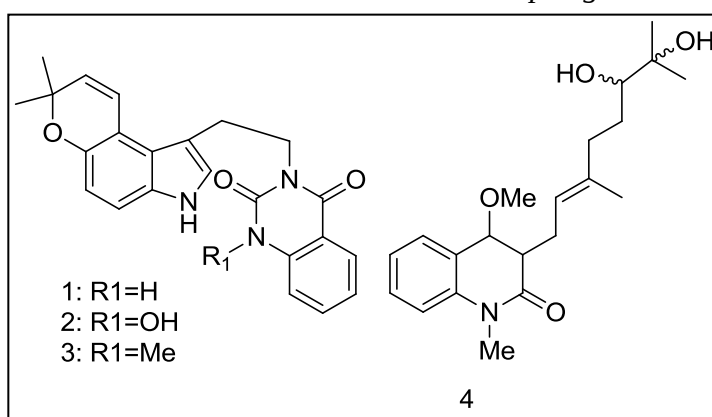
Fonte: <http://www.mundovestibular.com.br>

Algumas espécies pertencentes a esse gênero foram estudadas sob os pontos de vista químico e biológico. Em estudo químico realizado com a espécie *Conchocarpus gaudichaudianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani, quatro novos alcalóides foram isolados do extrato etanólico dos ramos caulinares (**Figura 3A**), sendo três deles do tipo indoloquinazolônico (1, 2 e 3) e um do tipo quinolônico (4). Também foram isoladas duas amidas conhecidas, a *N-trans-cumaroiltiramina* e *N-trans-feruloiltiramina* (Cortez *et al.*, 2009).

Em *Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (= *Angostura heterophylla*), extratos e frações de caules e folhas permitiram o isolamento de diversas substâncias. No extrato hexânico de caules foram isolados os esteróides β -sitosterol e

estigmasterol. Da fração acetato de etila do extrato hexânico de folhas se isolou 7-metoxiflavona, flavona e 5-hidroxiflavona. Da fração diclorometânica proveniente do extrato hexânico de folhas, foram isolados o benzoato de β -sitosterila e uma mistura de piranoflavonas inéditas. Da fração acetato de etila do extrato metanólico de caules foram isolados flavona, 7-metoxiflavona e os alcalóides haplotusina e 2-fenil-1-metil-4-quinolona. Todas as substâncias isoladas foram testadas contra as formas tripomastigotas do *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de chagas; as mais ativas foram os alcalóides haplotusina ($IC_{50} = 136,9 \mu M$) e o 2-fenil-1-metil-4-quinolona ($IC_{50} = 144,9 \mu M$) (Ambrozín *et al.*, 2008).

Figura 3A – Novos alcalóides de *Conchocarpus gaudichaudianus*



Na espécie *Conchocarpus paniculatus* (Engl.) Kallunki & Pirani (= *Angostura paniculata*), do extrato em diclorometano das folhas foram isolados dois novos alcalóides acridônicos, cuspanina e cusculina. Ambos apresentaram atividade moluscicida moderada contra a espécie de caracol aquático *Biomphalaria glabrata*, com LC_{50} de 5ppm para cuspanina e 20 ppm para cusculina. Esses alcalóides também apresentaram atividade citotóxica moderada contra linhagens de células cancerígenas (Vieira *et al.*, 1992).

O extrato metanólico de folhas de *Conchocarpus inopinatus* Pirani demonstrou forte atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* ($IC_{50} = 1,39 \text{ mg/mL}$). As frações em diclorometano ($IC_{50} = 1,29 \text{ mg/mL}$) e em acetato de etila ($IC_{50} = 1,44 \text{ mg/mL}$) obtidas da partição do extrato metanólico de folhas também apresentaram forte atividade tripanomicida (Mafezoli *et al.*, 2000). Ainda com a espécie *C. inopinatus*, em estudo fitoquímico realizado foram isolados diversos metabólitos oriundos do extrato metanólico das folhas, dentre eles 6 alcalóides acridônicos (arborinina, metil-arborinina, 1-hidroxi-3-metoxi-*N*-metil acridona, xanthoxolina, 1,2,3,5-tetrametoxi-*N*-metilacridona, toddaliopsina C), um alcaloide seco

acridônico inédito, os alcaloides 2-fenil-1-metil-4-quinolona e dictaminina, além das cumarinas escopoletina e marmesina (Bellele *et al.*, 2012).

Na espécie *Conchocarpus marginatus*, o estudo fitoquímico realizado com o extrato diclorometânico dos ramos e folhas levaram ao isolamento dos alcaloides arborinina, metil-arborinina e 1-hidroxi-3-metoxi-*N*-metil acridona, além dos alcaloides arilquinolin-4-onas, 2-fenil-1-metil-4-quinolona e 2-fenil-1-metil-7-metoxi-4-quinolona (Bellele *et al.*, 2012).

Em 1998, Kallunki & Pirani realizaram um trabalho de transposição taxonômica publicado no Kew Bulletin, reclassificando algumas espécies pertencentes à família Rutaceae, do gênero *Angostura* para o gênero *Conchocarpus*. Dentre estas espécies, *Angostura fontanesiana* foi reclassificada como *Conchocarpus fontanesianus*.

1.7. A Espécie *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani

Conchocarpus fontanesianus (**Figura 4**), conhecida popularmente como pitaguará, possui estrutura de arbusto ou arvoreta, podendo atingir de 1 a 3 metros de altura. Possuem folhas alternas, unifolioladas com nervação broquidódroma e com calosidade na base da folha junto ao pecíolo. A inflorescência é em pseudoracemos isolados com flores bem espaçadas. As flores são pentâmeras subsésseis com cálice campanulado e profundamente pentalobulado, com glândulas salientes (Kallunki & Pirani, 1998; Pirani, 2002).

Figura 4 - *C. fontanesianus*: 1-inflorescência, 2-frutos secos, 3-ramo caular e 4-fruto verde.



Fotos: Rodrigo Cabral e Maura Casari.

A espécie é nativa, endêmica e se distribui pelos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, sendo encontrada em regiões de Floresta Ombrófila Densa de Encosta, em áreas de Mata Atlântica, mais precisamente em regiões de restinga (Pirani, 2002; Pirani, 2010). Relatos de moradores que vivem nos locais de ocorrência desta espécie indicam que sua

madeira é utilizada na fabricação de agulhas para confecção de redes de pesca, devido á sua maleabilidade e resistência.

Em levantamentos bibliográficos realizados foi observada a ausência de estudos sob o ponto de vista químico da espécie *Conchocarpus fontanesianus*, sendo encontrados somente 2 trabalhos. Agripino *et al.* (2004), submete o extrato bruto das folhas de *C. fontanesianus* a testes de atividade antitumoral, antibactericida e antifúngico. Cabral *et al.* (2012) realizaram estudo fitoquímico com a espécie na busca dos compostos que demonstraram atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, identificando 3 alcalóides furoquinolínicos (dictaminina, esquimiaina e γ -fagarina), um alcaloide quinolônico (2-fenil-1-metil-4-quinolona) e uma furanocumarina (marmesina). De uma maneira geral esta espécie ainda é pouco estudada.

1.8. Antioxidantes

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento no interesse a respeito de antioxidantes, devido principalmente às descobertas sobre o efeito dos radicais livres nos organismos (Barreiros *et al.*, 2006). Os radicais livres têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano e sua presença é crítica para a manutenção de tais funções fisiológicas normais. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (Pompella, 1997; Molyneux, 2004; Huang, 2005).

Recentemente, envelhecimento, câncer, aterosclerose e algumas outras doenças graves, foram confirmadas terem relação com lipoproteínas de baixa densidade (LDL), membranas celulares e DNA expostos ao estresse oxidativo (Liu, 2010).

O oxigênio é, sem dúvida, uma parte indispensável da vida aeróbica. Contudo, sob certas circunstâncias ele pode afetar seriamente nosso bem-estar através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Jadhav & Bhutani, 2002; Gulcin *et al.*, 2002). ROS envolve uma série de oxidantes tais como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos lipídicos (LOOH), oxigênio singleto (1O_2), óxido nítrico ($NO^\cdot$), radical superóxido ($O_2^\cdot$), radical hidroxila ($^\cdot OH$), peroxinitrito ($^\cdot OONO$) etc., entre os quais os radicais atraem muita atenção, porque eles podem conduzir à carcinogênese por danificar o DNA e proteínas e causar doenças cardiovasculares por oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Liu, 2010). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana

e seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996; Yu & Anderson, 1997).

Antioxidantes são substâncias que, em pequenas quantidades, são capazes de prevenir ou retardar a velocidade da oxidação de forma significativa, de materiais facilmente oxidáveis tais como lipídios, podendo agir na neutralização ou sequestro de radicais livres e até mesmo na quelatação de metais de transição (Pietta, 2000; Liu, 2010; Miguel, 2010).

1.9. Antifúngicos

Durante os últimos 30 anos tem havido um aumento dramático no número de pacientes com o sistema imunológico comprometido, associados com o aumento na frequência de transplantes de órgãos, quimioterapias mais agressivas, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e avanços em cuidados críticos. Coincidência ou não, tem havido um aumento na prevalência de infecções por fungos oportunistas, sendo que *Candida* e *Aspergillus* spp continuam as causas mais comuns de infecções fúngicas invasivas em hospedeiros imunocomprometidos (Marr *et al.*, 2002). Infecções fúngicas invasivas têm sido historicamente associadas à alta morbidade e mortalidade de pacientes, em parte por causa das limitações das terapias antifúngicas disponíveis e da dificuldade em fazer um diagnóstico rápido e preciso (Sable *et al.*, 2008).

A falta de controle dos fungos pode resultar também em sérios prejuízos econômicos para agricultura global. Os fungos filamentosos (em que se incluem os endofíticos) dos gêneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Phomopsis* são considerados os maiores patógenos de plantas em todo o mundo. (Farr *et al.*, 1989). Os fungos do gênero *Colletotrichum*, por exemplo, causadores da antracnose em diversas culturas (caracterizada pela desfolha precoce), podem levar à morte do hospedeiro. O patógeno pode afetar qualquer parte da planta, e quando a doença atinge o fruto, inutiliza-o para consumo e, conseqüentemente para o comércio (Sussel, 2005).

A descoberta de novas substâncias antifúngicas de fontes naturais é muito importante, devido à evolução contínua da resistência dos fitopatógenos ou patógenos humanos. Além disso, a procura por agroquímicos mais seguros, com menor toxicidade sobre o meio ambiente e também sobre os mamíferos é uma grande preocupação. Os produtos naturais, nesse contexto, oferecem uma abordagem eficiente para a descoberta de novos compostos químicos para o controle de doenças causadas por fungos, tanto em plantas como em animais (Oliva *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, é de interesse científico e comercial o estudo de novos compostos com atividades biológicas, além do conhecimento sobre a diversidade química das espécies vegetais. A seleção de espécies com algum potencial medicinal/farmacológico pode ser realizada através de bioensaios dirigidos para a detecção de substâncias de interesse no sentido de, segundo Rouhi (1997), proteger e promover a exploração racional dessa diversidade vegetal como uma fonte de novos produtos disponíveis para a humanidade.

Nesse sentido, nosso grupo vem se dedicando à bioprospecção de plantas nativas com atividades biológicas, de diversas regiões do estado de São Paulo. Dentre as regiões de interesse neste trabalho estão duas Unidades de Conservação do Estado de São Paulo: Estação Ecológica Juréia-Itatins e o Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual Serra do Mar.

É consenso na área farmacológica que, substâncias que apresentam algum tipo de propriedade biológica têm grandes possibilidades de apresentar também outras atividades farmacológicas. Assim, foram avaliadas neste projeto a atividade antioxidante (DPPH e β -caroteno) e atividade antifúngica (*Cladosporium sphaerospermum*, *C. cladosporioides* e *Candida albicans*) nos extratos, frações, substâncias isoladas e compostos voláteis de *C. fontanesianus*. Esta espécie é rara, nativa e endêmica, e existe apenas um estudo sob o ponto de vista químico desenvolvido durante o mestrado, uma das razões que motivaram a continuidade do estudo com a espécie.

Este trabalho surgiu do projeto temático “Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Novos Fármacos - Fase II” dentro do programa BIOTA/FAPESP (Processo nº 03/02176-7), cujos objetivos principais eram a descoberta de fármacos de alto valor comercial, a conservação, o desenvolvimento sustentável e o aumento do conhecimento da biodiversidade química dos biomas Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo químico de *Conchocarpus fontanesianus* e avaliar o potencial biológico dos extratos, frações, substâncias isoladas e constituintes dos óleos voláteis.

3.2. Objetivos Específicos

- Coletar ramos caulinares e folhas para preparo dos extratos etanólico bruto
- Coletar folhas para extração dos compostos voláteis
- Purificar, isolar e identificar estruturalmente compostos secundários presentes nas folhas e ramos caulinares de *C. fontanesianus*;
- Comparar o perfil químico das populações de *C. fontanesianus* provenientes da Estação Ecológica Juréia-Itatins e do Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar;
- Avaliar o potencial antioxidante e antifúngico dos extratos, frações semi-purificadas e substâncias isoladas de folhas e ramos caulinares de *C. fontanesianus*.
- Comparar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. fontanesianus* coletadas em duas áreas de Mata Atlântica;
- Avaliar o potencial antioxidante e antifúngico dos óleos essenciais de folhas de *C. fontanesianus*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Botânico – *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani

O material vegetal (ramos e folhas) de *C. fontanesianus* foi coletado em dois parques estaduais, Núcleo Arpoador da Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI), no município de Peruíbe (litoral sul) e Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual Serra do Mar (PESM), no município de Caraguatatuba (litoral norte), ambos no Estado de São Paulo (licença processo SMA n° 007.532 2009). A **Figura 5** indica, no mapa, os locais de coleta dos indivíduos estudados.

Figura 5 - Mapa da Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI) (1) e Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) (2).



Fonte: Goole Earth.

Foram realizadas, durante o doutorado, cinco expedições para coletas. As duas primeiras expedições realizadas em 15 e 22 de março de 2012 foram para coleta de material vegetal (ramos caulinares e folhas) para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB), realizadas na E.E. Juréia-Itatins e Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar, respectivamente. Nos dias 05 e 11 de outubro de 2012 foram realizadas outras duas expedições na E.E. Juréia-Itatins e Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar, respectivamente, para coleta de material vegetal (folhas) para extração dos óleos voláteis.

A última expedição foi realizada na E.E. Juréia-Itatins na tentativa de coletar frutos para extração dos óleos voláteis, expedição realizada com êxito. Os frutos foram coletados somente na E.E. Jureia-Itatins devido ao maior número de indivíduos da espécie (> 30) e

também pela dificuldade em obtê-los pelo curto período de frutificação (**Tabela 1**). Em princípio a coleta dos frutos não estava nos objetivos do deste trabalho.

Houve também a utilização de material coletado durante o mestrado para obtenção de extrato etanólico bruto.

Tabela 1 - Datas de coleta e dos locais onde foram realizadas.

Coleta do material utilizado durante o doutorado		
<i>Data</i>	<i>Local</i>	<i>Observações</i>
12/08/2010	Núcleo Caraguatatuba	Realizada durante o mestrado
15/03/2012	Núcleo Arpoador	Material estéril (ramos e folhas)
22/03/2012	Núcleo Caraguatatuba	Material estéril (ramos e folhas)
05/10/2012	Núcleo Arpoador	Material estéril (folhas)
11/10/2012	Núcleo Caraguatatuba	Material estéril (folhas)
19/10/2014	Núcleo Arpoador	Coleta frutos

A Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo foi a responsável pela identificação da espécie, e uma exsicata (voucher – coletor nº RSCabral 09) da planta se encontra depositada no Herbário São Paulo “Maria Eneida P. Kauffmann Fidalgo” do Instituto de Botânica de São Paulo. Autorização de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético nº 010741/2013-5.

4.2. Extração

4.2.1. Extração dos Óleos Voláteis

O material fresco (folhas e frutos) foi submetido à extração do óleo volátil por hidrodestilação, em processo contínuo com aparelho do tipo Clevenger, por 3 horas aproximadamente, em triplicata. O óleo foi separado do hidrolato com pentano e seco com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório. O óleo volátil obtido foi armazenado em frasco com tampa, em freezer a -22 °C, para posterior análise (Santos *et al.* 2004, Pino *et al.* 2006, Kelen & Tepe 2008).

4.2.2. Preparação do Extrato Etanólico Bruto

O material vegetal de *C. fontanesianus* foi separado em folhas e ramos caulinares e colocado em galpão próprio para secagem à temperatura ambiente. Após a secagem o material foi moído em moinho de facas para obtenção do pó (Moinho de facas TE 625 Tipo Cróton, Marca TECNAL, Mesh 20). O pó foi submetido à extração com álcool etílico comercial (EtOH), sob pressão (1500 psi) e temperatura (60 °C) em extrator ASE300 (DIONEX, CA, EUA) (**Figura 6**). A solução etanólica obtida foi concentrada em evaporador rotatório (BÜCHI) e levada ao banho-maria à temperatura de 40 °C para eliminação completa do solvente e obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) seco.

Figura 6 - Aparelho extrator ASE300 DIONEX®.



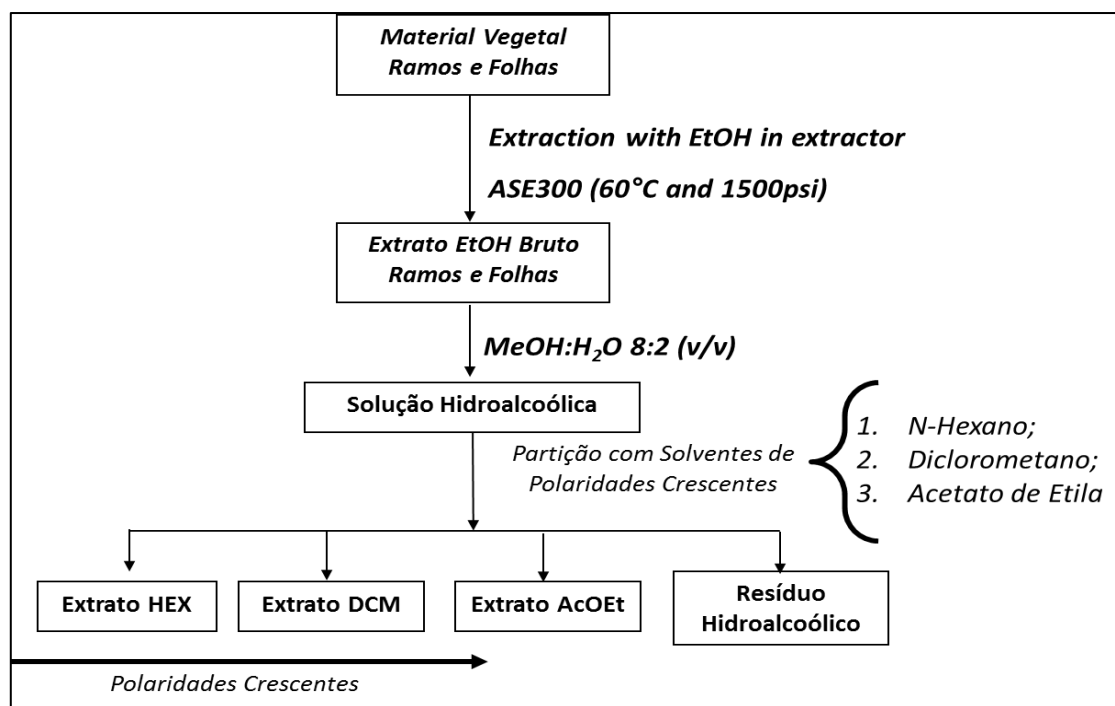
Foto: Rodrigo Cabral

4.2.3. Partição Líquido/Líquido

O EEB obtido foi submetido a partições líquido/líquido em funil de separação, com solventes de diferentes graus de polaridade: n-hexano, diclorometano e acetato de etila (AcOEt). No início da partição o EEB foi suspenso em uma solução de metanol (MeOH) e água (H₂O) na proporção de 8:2 (v/v) para extração com n-hexano. A proporção de água na mistura aumenta para 6:4 (MeOH:H₂O) à medida que os solventes são trocados.

Os extratos obtidos no processo de partição foram concentrados em evaporador rotatório e levados ao banho-maria à temperatura de 40 °C para eliminação completa dos solventes. Ao final do processo foram obtidos o extrato hexânico (HEX), extrato diclorometânico (DCM) e o extrato acetato de etila (AcOEt). Abaixo segue o procedimento experimental para partição do EEB (**Figura 7**).

Figura 7 – Procedimento experimental usado no processo de partição.



4.3. Análises Cromatográficas

4.3.1. Análise em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As amostras de extratos foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando placas de alumínio de silica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e os sistemas de eluição foram os seguintes: CHCl₃:MeOH (9:1; v/v) para os EEB's, CH₂Cl₂:Hex:AcOEt (80:20:05; v/v) para os extratos HEX, CH₂Cl₂:AcOEt:MeOH (65:30:05; v/v) para os extratos DCM e CHCl₃:MeOH:AcOEt (5:3:2; v/v) para os extratos AcOEt. Após o desenvolvimento da cromatografia em camada delgada, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda (λ) de 254 nm e 366 nm, em equipamento Camag ReproStar 3 (Camag, NC, EUA) e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z.

4.3.2. Análise por Cromatografia a Gás – Espectrometria de Massas (GC-MS) dos Óleos Voláteis

Os óleos voláteis foram analisados em um sistema GC-MS (Cromatógrafo a Gás – Espectrômetro de Massas) composto por um cromatógrafo a gás Agilent 6890 Series Hewlett-Packard, acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5937 NetWork tendo como fonte de ionização impacto eletrônico (EI), com analisador de massas do tipo quadrupolo (Agilent

Technologies, CA, EUA). O sistema conta com injetor automático Agilent modelo 7683 Series. A coluna capilar utilizada foi DB-5MS de 30 m x 0,25 mm (0,25 µm de filme).

As amostras dos óleos voláteis foram diluídas em acetona na proporção de 1:9 de óleo volátil:acetona (v/v). O método de análise dos óleos utiliza injetor (com divisão de fluxo-split/splitless, razão de divisão 1:20) a 250 °C, injeção de 1 µL, ionização em 70 eV e temperatura da fonte de íons de 230 °C. A análise cromatográfica foi desenvolvida no seguinte programa: temperatura inicial 40 °C por um minuto, aumentando 3 °C por minuto até 240 °C, mantendo em 240 °C por 10 minutos (tempo total 78 minutos), utilizando hélio como gás de arraste a uma pressão de 80 kpa e velocidade linear de 1 mL/min.

4.3.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Todas as análises cromatográficas em HPLC foram realizadas durante o período de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra, em Genebra, Suíça.

4.3.3.1. Análise por HPLC-DAD

A análise do perfil cromatográfico dos extratos foi realizada utilizando equipamento HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, CA, EUA) composto pelos seguintes módulos da série 1100: injetor automático, sistema de bombas, misturador de alta pressão e um detector por arranjo de diodos (DAD) (**Figura 8**). A coluna usada foi XBridge C-18, 5 µm, 4,6 x 250 mm (Waters, MA, EUA) e o fluxo foi 1 mL/min em todas as análises. As fases móveis foram H₂O (A) (ultra pura, milli Q) e Metanol (B) (grau HPLC), cada um contendo 0,1% de ácido fórmico (AF) (v/v).

Figura 8 – Cromatógrafo Agilent 1100 Series (HPLC-DAD).



Foto: Rodrigo Cabral

4.3.3.2. Análise por HPLC-DAD-ESI-MS

A análise do perfil cromatográfico em HPLC-DAD-ESI-MS foi realizada utilizando equipamento HPLC Agilent Infinity 1200 Series (Agilent Technologies, CA, EUA) composto pelos seguintes módulos da série 1200: injetor automático, sistema de bombas, misturador de alta pressão e um detector por arranjo de diodos (DAD). A coluna utilizada foi XBridge C-18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm (Waters, MA, USA) e o fluxo foi 1 mL/min em todas as análises. As fases móveis foram H₂O (A) (ultra pura, milli Q) e metanol (B) (grau HPLC), cada um contendo 0,1% AF (v/v). O HPLC-DAD Agilent série 1200 foi acoplado a um espectrômetro de massas Finnigan MAT LCQ (**Figura 9**).

Os dados obtidos através da técnica de espectrometria de massas (MS) foram adquiridos em um equipamento Finnigan MAT LCQ com detector de armadilha de íons (ion-trap), equipado com interface eletrospray (ESI). Os parâmetros do equipamento nas análises foram: voltagem do capilar 30 V, temperatura do capilar de 200 °C, fonte da tensão de 4,5 kV, fonte da corrente de 80 AU e ionização nos modos positivo e negativo.

Figura 9 – Cromatógrafo Agilent 1200 Series acoplado a Espectrômetro de Massas Finnigan (HPLC-DAD-ESI-MS).



Foto: Rodrigo Cabral

4.3.3.3. Microfracionamento e Purificação por HPLC Preparativo (PREP-HPLC-UV)

O procedimento experimental usado para o microfracionamento e purificação no HPLC Preparativo (PREP-HPLC-UV) foi baseado nas análises realizadas anteriormente para obtenção do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos brutos (EEB, ramos e folhas) e dos demais extratos (HEX, DCM e AcOEt) usando a técnica de HPLC-DAD. O

Microfracionamento e purificação foi feito por equipamento PREP-HPLC-UV Spot Prep ARMEN (ARMEN, Saint-Avé, França) com bomba binária, detector ultravioleta (UV), coletor de fração, injetor com loop de 200 μ L e coluna X-Bridge C-18 Waters, 5 μ m, 19 x 150 mm (Waters, MA, EUA) (**Figura 10**). Os solventes usados foram H₂O (A) (ultra pura, milli Q) e metanol (B) (grau HPLC), ambos contendo 0,1% AF (v/v). Para transferência das condições utilizadas em escala analítica para escala preparativa foi utilizado o software HPLC calculator 3.0 (desenvolvido por Davy GUILLARME, Universidade de Genebra).

Figura 10 – Cromatógrafo Preparativo Armen (PREP-HPLC-UV).



Foto: Rodrigo Cabral

4.3.4. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-TOF-MS)

Todas as análises cromatográficas em UPLC foram realizadas durante o período de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra, em Genebra, Suíça.

4.3.4.1. Preparação dos extratos para Análise por UPLC-TOF-MS

Para as análises dos extratos em UPLC-TOF-MS foi necessário um procedimento prévio de clean-up através da técnica de extração em fase sólida – SPE (Waters Sep-Pak C18, Vac 1 cm³, 100 mg). A fase estacionária foi ativada com 1 mL de metanol (MeOH) e foi equilibrada com 1 mL de MeOH:H₂O (85:15, v/v). O cartucho foi carregado com 5 mg de cada extrato, que foram solubilizados em 500 μ L de MeOH:H₂O (85:15, v/v). A eluição foi feita com 1 mL MeOH:H₂O (85:15 v/v) para eliminar clorofilas e outros compostos de baixa polaridade (Grata *et al.*, 2008). Após a eluição, o extrato foi seco sob nitrogênio e

solubilizado em MeOH:H₂O (85:15, v/v) para fornecer as amostras na concentração de 1 mg/mL.

4.3.4.2. Análises de Perfil Metabólico por UPLC-TOF-MS (Long Run)

As análises de perfil metabólico dos extratos foram realizadas em UPLC Waters Acquity acoplado a um espectrômetro de massas (MS) Waters Micromass-LCT Premier com analisador por tempo de voo (Time of Flight – TOF, alta resolução), equipado com interface eletrospray (ESI). As separações foram realizadas utilizando-se coluna C18 Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 150 mm, 1,7µm (Waters Acquity, MA, EUA). Para as análises de perfil metabólico os solventes utilizados foram H₂O (A) (ultra pura, milli Q) e acetonitrila (ACN) (B) (grau UPLC), cada um contendo 0,1% de AF (v/v), com o seguinte gradiente de eluição: 5–95% B (0,0–30,0 min), 95% B (30,0–40,0 min), 95–5% B (40,0–40,2 min) and 5% B (40,2–50 min). O fluxo utilizado foi de 460 µL/min e o volume de injeção 2 µL na concentração de 0,5 mg/mL. As temperaturas no injetor automático e no forno da coluna foram fixadas em 10 e 40 °C, respectivamente. Esta é a metodologia padrão utilizada no laboratório para análise de perfil metabólico em UPLC-TOF-MS.

Os parâmetros do espectrômetro de massas (MS) foram em ambos os modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI), na faixa de 100-1300 Da com tempo de aquisição de 0,3 s. As condições da interface ESI foram: voltagem capilar de 2450 V, cone de tensão a 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C, fluxo de gás do cone 20 L/h, fluxo do gás de dessolvatação 800 L/h, e voltagem do detector MCP (microchannel plate) 2500 V.

4.3.4.3. Análises de “*Fingerprint*” por UPLC-TOF-MS (Short Run)

As análises de *fingerprint* das frações e substâncias purificadas foram realizadas em UPLC Waters Acquity acoplado a um espectrômetro de massas (MS) Waters Micromass-LCT Premier com analisador por tempo de voo (Time of Flight – TOF, alta resolução), equipado com interface eletrospray (ESI) (**Figura 11**). As separações foram realizadas utilizando-se coluna C18 Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 150 mm, 1,7µm (Waters Acquity, MA, EUA). Para as análises de *fingerprint* os solventes utilizados foram H₂O (A) (ultra pura, milli Q) e ACN (B) (grau UPLC), cada um contendo 0,1% de AF (v/v), com o seguinte gradiente de eluição: 5–95% B (0,0–4,0 min), 95% B (4,0–4,8 min), 95–5% B (4,8–4,9 min) e 5% B (4,9–6,0 min). O fluxo utilizado foi de 300 µL/min e o volume de injeção foi 1 µL na

concentração de 0,5 mg/mL. As temperaturas no injetor automático e no forno da coluna foram fixadas em 10 e 40 °C, respectivamente. Esta é a metodologia padrão utilizada no laboratório para análise de *fingerprint* em UPLC-TOF-MS.

As análises por MS das frações e compostos purificados foram realizadas em ambos os modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI), na faixa de 100-1300 Da com tempo de aquisição de 0,25 s. As condições da interface ESI foram: voltagem capilar de 2400 V, cone de tensão a 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C, fluxo de gás do cone 20 L/h, fluxo do gás de dessolvatação 800 L/h, e voltagem do detector MCP (microchannel plate) 2500 V.

Figura 11 – Sistema UPLC-TOF-MS.



Foto: Rodrigo Cabral

4.3.5. Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC-UV)

A purificação foi feita usando uma técnica de grande escala por Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC-UV) (**Figura 12**), usando-se um sistema MPLC-UV BÜCHI composto por um sistema de bomba BÜCHI Pump Manager C-615, detector BÜCHI UV Photometer C-640 e um coletor de frações BÜCHI Fraction Collector C-660 (BÜCHI, Flawil, Switzerland). Para transferência das condições de separação usadas em escala analítica para escala preparativa foi utilizado o software HPLC Calculator 3.0. Por esta razão, as análises em escala analítica foram feitas usando uma coluna com a mesma fase estacionária e com o mesmo tamanho de partícula da fase estacionária preparativa, Silica Gel C18 ZEOprep 60 Å, 15-25 µm (Zeochem, Suíça). Os solventes utilizados no sistema de eluição foram H₂O (A) (milli Q) e metanol (B) (grau técnico), cada um contendo 0,1% de FA (v/v). As condições em escala analítica e preparativa das análises são apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Condições analítica e preparativa para purificação do extrato DCM ramos Juréia.

	ANALITICAL HPLC-DAD		PREPARATIVE MPLC-UV	
COLUMN:				
Height (mm)	250		920	
Diameter (mm)	4,6		49,0	
Particle (µm)	15,0		25,0	
FLOW (mL/min)	1		10	
DWELL volume (mL)	0,95		13	
Method:	t (min)	%B	t (min)	%B
	0	45	0	45
	10	45	210,23	45
	55	80	1079,55	80
	80	100	1562,51	100
	85	100	1659,10	100

Figura 12 – Sistema MPLC-UV BÜCHI.

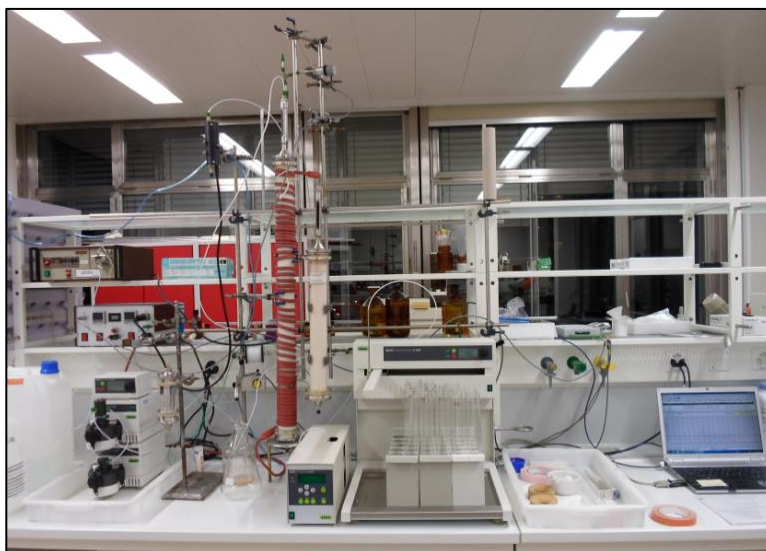


Foto: Rodrigo Cabral

4.4. Identificação dos Compostos

4.4.1. Identificação dos Componentes dos Óleos voláteis

A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação entre os espectros de massas obtidos nas análises com aqueles registrados na base de dados das bibliotecas instaladas no equipamento (Willey 275 e Adams 2007), e dados retirados da literatura ou, ainda, por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados como NIST 08 (National Institute of Standards and Technology).

A fim de permitir uma comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos obtidos com os dados da literatura e banco de dados, foi utilizado o índice de retenção de Kovats, que utiliza uma série de n-alcenos (C8 a C40), para evitar erros decorrentes de variações do tempo de retenção dos compostos, em função de alterações como temperatura, fluxo e operador. O índice de retenção de Kovats corrigido varia muito pouco e de maneira linear com a temperatura. Os índices de retenção de Kovats calculados foram, então, comparados com os da literatura ou com amostras autênticas (Sandra & Bichi 1987; Collins & Braga 1988).

Fórmula utilizada para o cálculo do índice de retenção de Kovats:

$$IR = 100Z + 100 \left[\frac{\log t'_{RX} - \log t'_{RZ}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ}} \right]$$

Onde:

Z = número de átomos de carbono do padrão de n-alcenos com menor massa molecular.

t'_{RX} = tempo de retenção do composto X , sendo que t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$.

t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

4.4.2. Identificação dos Componentes Isolados e Purificados dos Extratos

Os dados de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) foram registrados em um espectrômetro VARIAN INOVA 500 MHz (Vernon Hills, Illinois, USA), operando a frequência de 500 MHz para núcleo de hidrogênio (^1H) e 125 MHz para núcleo de carbono (^{13}C). Para a obtenção dos espectros de NMR foram usados os solventes deuterados (D_2O , CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$, CDCl_3 ; CIL - Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA, EUA). Os deslocamentos químicos são reportados em partes por milhão (δ) usando o sinal residual do

CD₃OD (δ_H 3,31; δ_C 49,0) ou o sinal do DMSO-*d*₆ (δ_H 2,50; δ_C 39,5) como padrões internos para ¹H e ¹³C, e as constantes de acoplamento (*J*) em hertz (Hz). As completas atribuições das estruturas dos compostos isolados foram realizadas com base nos experimentos de 2D-NMR (COSY, NOESY, HSQC e HMBC).

Os dados de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos em UPLC Waters Acquity acoplado a um espectrômetro de massas Waters Micromass-LCT Premier com analisador por tempo de voo (Time of Flight – TOF), equipado com interface eletrospray (ESI). Os dados obtidos foram processados usando o software MassLynx, versão 4.1 (Waters Corporation, MA, EUA). As possíveis fórmulas moleculares foram extraídas utilizando os elementos C, H, N e O, através da ferramenta de composição elementar do MassLynx.

As análises de rotação óptica foram mensuradas em soluções metanólicas no polarímetro Perkin-Elmer (Waltham, MA, EUA), modelo lambda 25 com lâmpada de mercúrio (Hg – 589 nm), em tubos de 1 cm. Os espectros de UV foram mensurados em equipamento HACH UV-Vis DR/4000.

Todas as análises para identificação dos componentes isolados foram realizadas na Universidade de Genebra durante o período de realização do estágio de doutorado sanduíche, em Genebra, Suíça.

4.5. Ensaios Biológicos

4.5.1. Avaliação Antioxidante de Sequestro do Radical DPPH em Cromatografia de Camada Delgada Analítica (TLC)

A atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos brutos (EEB) (200 µg), extratos obtidos através da partição do EEB (HEX, DCM e AcOEt) (100 µg) e substâncias purificadas (50 µg), foi avaliada qualitativamente em TLC utilizando placas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como padrão (controle positivo) foi utilizado quercetina (5 µg) (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Após a aplicação das amostras, as placas foram eluídas com solventes apropriados em cuba de vidro. Após desenvolvimento da cromatografia em camada delgada, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda (λ) de 254 nm e 366 nm, em equipamento Camag ReproStar 3 (Camag, NC, EUA) e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z. As substâncias puras não foram eluídas.. As cromatoplasmas foram borrifadas com solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (0,2%, DPPH)

(Sigma-Aldrich, MO, EUA). A coloração roxa aparece em aproximadamente 15 minutos, assim como as manchas brancas ou amarelas que são indicativas de atividade antioxidante (Cuendet *et al.*, 1997).

4.5.2. Avaliação Antioxidante de Sequestro do Radical DPPH em Microplaca.

A atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH dos extratos etanólicos brutos (EEB), extratos obtidos através da partição do EEB (HEX, DCM e AcOEt) e substâncias purificadas foi quantificada usando microplaca de 96 cavidades, Leitor de ELIZA BIOTEK KC4 e solução metanólica de 0,3 mM do radical DPPH. Foram pipetados 178,5 µL das amostras a serem analisadas e 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mM). No controle negativo foram pipetados 178,5 µL de metanol e 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mM). Como controle positivo foi utilizado extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (Herbarium®) e/ou quercitina, na concentração de 31,25 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. A primeira leitura (back ground) se faz após a adição da amostra, e o início da contagem de tempo se faz após a adição do DPPH, sendo a absorbância medida a (λ) 518 nm, aos 15 e 30 minutos. Durante o ensaio a microplaca foi mantida a temperatura ambiente em local escuro (Alma *et al.*, 2003). A expressão dos resultados se dá pelo decaimento da absorbância da amostra em relação ao controle negativo.

4.5.3. Avaliação Antioxidante com β -caroteno em TLC

A atividade antioxidante com β -caroteno dos extratos etanólicos brutos (EEB) (200 µg), extratos obtidos através da partição do EEB (HEX, DCM e AcOEt) (100 µg) e substâncias purificadas (50 µg) foi avaliada qualitativamente em TLC utilizando placas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como padrão (controle positivo) foi utilizado quercitina (5 µg). As placas foram eluídas com solventes apropriados em cuba de vidro. Após desenvolvimento da cromatografia em camada delgada, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda (λ) de 254 nm e 366 nm, em equipamento Camag ReproStar 3 (Camag, NC, EUA) e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z. As substâncias puras não foram eluídas. As cromatoplasmas foram borrifadas com solução de β -caroteno em diclorometano (0,04%), permanecendo amarelada e, em seguida, expostas à luz. O β -caroteno é oxidado pelo oxigênio atmosférico, numa reação fotoquímica e após cerca de duas a três horas já se consegue perceber que a placa de sílica

volta à cor original branca, exceto nas áreas onde existam substâncias com atividade antioxidante, verificando-se a permanência da coloração amarela do β -caroteno (Pratt *et al.*, 1984).

4.5.4. Avaliação Antioxidante no Sistema β -caroteno/ácido linoleico em Microplaca

A quantificação da atividade inibitória da lipoperoxidação foi determinada usando o ensaio de descoloramento do β -caroteno descrito por Duarte-Almeida (2006). A atividade antioxidante dos extratos etanólicos brutos (EEB), extratos obtidos através da partição do EEB (HEX, DCM e AcOEt) e substâncias purificadas foi quantificada usando microplaca de 96 cavidades, Leitor de ELIZA BIOTEK KC4 e solução reativa que é formada por: 21 μ L de ácido linoleico, 84 μ L do emulsificante TWEEN 40 e 210 μ L de solução diclorometânica de β -caroteno [2 mg/mL]. O diclorometano foi totalmente eliminado da mistura (solução reativa) sob fluxo de nitrogênio. Após sua eliminação foram adicionados 25 mL de água ultra pura (Milli Q) previamente saturada por borbulhamento com gás oxigênio puro durante 30 minutos. A mistura foi agitada vigorosamente.

Na microplaca foram pipetados 10 μ L das amostras e 250 μ L de solução reativa. No controle negativo foram pipetados 10 μ L de metanol e 250 μ L de solução reativa. Como controles positivos foram utilizados os padrões sintéticos BHA e BHT (20 μ g/mL). Logo após houve a incubação à temperatura de 45 °C durante todo ensaio, e a absorbância medida a (λ) 450 nm a cada 15 minutos, por um período de 2 horas (120 min.). A primeira leitura realizada foi considerada o tempo zero, após a pipetagem da solução reativa.

A expressão dos resultados se dá pelo decaimento da absorbância da amostra em relação ao controle negativo.

4.5.5. Avaliação da Atividade Antifúngica por Bioautografia com *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*.

Os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* Penz (CCIBt 491) e *Cladosporium cladosporioides* Fresen de Vries (CCIBt140) foram utilizados como reveladores nos bioensaios de detecção de substâncias fungitóxicas.

Para a obtenção das culturas, os fungos foram mantidos em placas de BDA (batata – dextrose – ágar), incubadas a 24 °C, no escuro, por 14 dias. As suspensões de conídios dos

fungos foram obtidas em solução de sais e glicose 30% na proporção 6:1 (v/v) e armazenadas em freezer.

Os extratos etanólicos brutos (EEB) (400 µg) e os extratos HEX, DCM e AcOEt (200 µg) foram avaliados em TLC, utilizando placas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) desenvolvidas com solventes apropriados. Após a eliminação completa dos solventes, as cromatoplaças foram borrifadas com a suspensão de conídios dos fungos (5x10⁷ esporos/ml) e encubadas em câmara úmida a 27°C, por 48 horas, no escuro (Homans & Fuchs, 1970). Como controle positivo foi utilizado nistatina (1 µg).

Para os óleos voláteis e substâncias puras foram determinados os limites de detecção (quantidades mínimas, µg, requeridas para inibir o crescimento do fungo) variando-se as quantidades das amostras aplicadas nas placas. Onde houve inibição, foram observados halos brancos de inibição do crescimento dos fungos em um fundo de coloração verde escuro.

4.5.6. Avaliação da Atividade Antifúngica por Bioautografia com *Candida albicans*.

As cepas de *C. albicans* foram obtidas a partir de isolados clínicos do Serviço de Dermatologia, Centro Hospitalar Universitário de Vaudois, Lausane, Suíça. Para cultura de *C. albicans* foi utilizado o meio líquido de Sabouraud. O meio foi autoclavado a temperatura de 120 °C por 20 minutos. Com a finalidade de obter uma fase de crescimento exponencial de *C. albicans*, o meio Sabouraud (20 mL) foi inoculado com a cepa 12 horas antes do teste. Malte agar (Oxoid) foi usado como meio sólido para recobrir as placas de TLC. A suspensão (Malte Agar) foi preparada imediatamente antes da realização do ensaio. O composto de referência utilizado na determinação do limiar de detecção foi o miconazol (Janssen, Beerse, Belgium).

Figura 13 - Cultura de *Candida albicans* utilizada no teste.



Foto: Rodrigo Cabral

A avaliação da atividade dos extratos etanólicos brutos (EEB) e extratos obtidos através da partição do EEB (HEX, DCM, AcOEt) foi realizada em TLC, utilizando placas de vidro de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha), em diferentes concentrações por amostra/spot: 300, 200 e/ou 100 µg para os extratos, e 40 e/ou 20 µg para frações purificados ou compostos puros. O padrão (controle positivo) foi o miconazol (1 µg). As placas TLC foram colocadas em placa aquecedora mantida a 35 °C. Aproximadamente 25 mL do inóculo foram rapidamente distribuídos sobre a placa TLC (20 x 20 cm) com uma pipeta descartável esterilizada. Após a solidificação do meio, as placas TLC foram incubadas durante a noite (12 a 24 horas) a 30 °C em caixas de polietileno forradas com papel de cromatografia úmido. Após esse período de incubação, os bioautogramas (placas de TLC) foram borrifados com uma solução aquosa (2,5 mg/mL) de azul de tiazolil (metil brometo de tetrazólio tiazolio; MTT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), e incubados por 4 horas a 30°C. Zonas claras de inibição do crescimento do fungo são observadas contra um fundo roxo quando há atividade (Hostettmann *et al*, 1991).

Para as substâncias puras que apresentaram atividade foram determinado os limites de detecção (quantidades mínimas, µg, requeridas para inibir o crescimento do fungo) variando-se as quantidades das amostras aplicadas nas placas.

Esta técnica de avaliação da atividade antifúngica com *C. albicans* foi realizada na Universidade de Genebra durante o período de realização do estágio de doutorado sanduíche, em Genebra, Suíça.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos Extratos e Óleos Voláteis

5.1.1. Extração do Óleo Volátil

A extração dos óleos essenciais pode ser realizada através de diversas técnicas diferentes, como por exemplo, enfloração, prensagem e fluído supercrítico. Neste trabalho a extração foi realizada através da técnica de hidrodestilação, que possui como princípio arrastar o óleo volátil através do vapor. Nesta técnica o material vegetal fica em contato com a água, em estado líquido, e os óleos voláteis por serem imiscíveis em água e possuírem pressão de vapor mais elevado, são arrastados pela água. Essa técnica é a mais empregada em laboratório, utilizando-se o aparelho do tipo Clevenger (Santos *et al.*, 2004; Pino *et al.*, 2006; Kelen & Tepe, 2008). O rendimento (em mg.g⁻¹ massa fresca e porcentagem) dos óleos voláteis das partes aéreas de *C. fontanesianus* estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Rendimento dos óleos voláteis de *C. fontanesianus* de acordo com local de coleta. Folhas coletadas durante período vegetativo (MF, Massa Fresca).

Local de Coleta	Orgão	Rendimento	
		mg.g ⁻¹ MF	%
E.E. Jureia-Itatins	Folhas	0,1335	0,015
E.E. Jureia-Itatins	Frutos	0,2625	0,023
P.E.S.M (Núcleo Caraguatatuba)	Folhas	0,0965	0,009

O rendimento do óleo volátil obtido apresentou variação entre os locais de coleta. O maior rendimento, no entanto, foi observado para os frutos, que possivelmente está relacionado ao período reprodutivo, onde ocorrem alterações metabólicas que tem como principal função o sucesso deste período, assim como a dispersão das sementes para propagação da espécie. As plantas são submetidas a condições ambientais que influenciam seu desenvolvimento e crescimento, isso sugere a existência de alterações metabólicas como respostas à pressão seletiva do meio, que podem acarretar alterações e mutações genéticas. Os fatores ambientais podem ser de caráter biótico ou abiótico. Fatores bióticos estão relacionados com as interações planta-herbívoros, planta-microrganismo ou planta-planta. Os mecanismos de respostas a estas interações variam de acordo com as relações ecológicas locais e imediatas, e podem resultar em diversas alterações na síntese de metabólitos. Dentre os fatores abióticos estão às condições de clima e solo (Andrade & Casali 1999).

5.1.2. Extrato Etanólico Bruto

A extração do material vegetal (pó dos ramos caulinares e folhas) com o equipamento extrator ASE300 (Accelerated Solvent Extraction, 60° C, 1500 psi) foi realizada utilizando como solvente etanol comercial (92,8°). Foram obtidos quatro extratos etanólicos brutos (EEB): EEB-folhas e EEB-ramos coletados na Estação Ecológica Juréia-Itatins e EEB-folhas e EEB-ramos coletados no Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar. O rendimento obtido nas extrações está descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Rendimento dos extratos em relação a massa de material vegetal utilizado.

Local	E.E. Juréia Itatins		Núcleo Caraguatatuba	
Órgão	<i>Ramos</i>	<i>Folhas</i>	<i>Ramos</i>	<i>Folhas</i>
Quantidade de pó	1559,78 g	791,58 g	1323,6 g	788,82 g
Extrato Etanólico Bruto Seco	43,42 g	54,22g	42,7 g	68,2 g
RENDIMENTO	2,78%	6,85 %	3,22 %	8,65 %

O uso de altas temperaturas aumenta a capacidade de o solvente solubilizar amostras, além de poder agir quebrando a forte interação matriz-soluto causado pelas forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo entre as moléculas do soluto e os sítios ativos da matriz. Altas temperaturas também diminuem a viscosidade do solvente ajudando sua penetração na matriz e facilitando o contato com o analito. A utilização de pressão auxilia a extração de materiais presos em poros e regiões da matriz (material vegetal) onde não seria alcançado em condições atmosféricas normais (Richter, 1996; Ong, 2000; Huie, 2002), como alguns compartimentos subcelulares, o que é muito importante já que muitos metabólitos secundários como alcalóides, por exemplo, são frequentemente produzidos e armazenados em regiões celulares como vacúolos, vesículas e regiões restritas da membrana do retículo endoplasmático (Hashimoto & Yamada, 1994). A pressão também auxilia a solubilização de bolhas de ar mais rapidamente, aumentando a superfície de contato do solvente com as partículas da matriz, além de manter o solvente orgânico no estado líquido em condições de altas temperaturas (Richter *et al.*, 1996; Huie, 2002).

A extração de material vegetal sob pressão e temperatura em comparação com outros métodos, como por exemplo, maceração, Soxhlet ou percolação apresenta vantagens em relação ao consumo reduzido de solvente, menor tempo de extração e maior rendimento obtido nas frações. (Kaufmann & Christen, 2002). O teor de metabólitos secundários pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles o local e época de coleta da planta e principalmente a parte da planta utilizada (Falkenberg *et al.*, 1999).

5.1.3. Partição Líquido/Líquido do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

Os extratos de plantas são misturas bastante complexas, contém milhares de diferentes metabólitos secundários, um número enorme de moléculas (Hostettman *et al.*, 1998). Com o objetivo de tornar essas matrizes um pouco menos complexas para as análises cromatográficas de separação e purificação, a técnica de partição foi utilizada, separando esses diferentes componentes da mistura por suas polaridades.

Os extratos obtidos no processo de partição foram concentrados à vácuo em evaporador rotatório para eliminação do solvente. Posteriormente para completa eliminação do solvente os extratos foram levados a banho-maria a temperatura de 50°C. Ao final do processo foram obtidos o extrato hexânico (HEX), extrato diclorometânico (DCM) e o extrato em acetato de etila (AcOEt) (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Rendimento dos extratos na partição. Valores entre parênteses indicam o rendimento em relação ao EEB.

Extratos	E.E. Jureia Itatins		Núcleo Caraguatatuba	
	Folhas	Ramos	Folhas	Ramos
HEX	5,24g (9,66%)	2,82g (6,48%)	6,57g (9,64%)	3,14g (7,35%)
DCM	12,64g (23,3%)	6,67g (15,37%)	14,93g (21,8%)	7,57g (17,73%)
AcOEt	3,78g (6,9%)	4,27g (9,83%)	5,62g (8,25%)	3,95g (9,25%)
EEB	54,22g	43,42g	68,2g	42,7g

5.2. Análise Cromatográfica e Identificação dos Componentes dos Óleos Voláteis

O teor de metabólitos secundários pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles o local e época de coleta da planta e principalmente a parte da planta utilizada (Falkenberg *et al.* 1999). De acordo com Bell (1981), a intensidade luminosa pode alterar a ação de enzimas fotossensíveis envolvidas na rota biossintética, de forma a alterar a composição de óleos essenciais. Em outras palavras, condições ambientais que interferem no metabolismo primário, influenciam indiretamente o metabolismo secundário, visto que há uma relação intrínseca entre eles.

A **Tabela 6** mostra a composição química dos óleos voláteis de *C. fontanesianus* proveniente das duas populações estudadas, de ocorrência natural na Estação Ecológica Jureia Itatins (Núcleo Arpoador) e no Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar. Ao todo foram detectados 42 componentes, sendo que vinte destes eram comuns nas folhas dos dois locais de coleta; dez só foram detectados na composição dos óleos provenientes das folhas da população do Núcleo Arpoador da EEJI; três se mostraram exclusivos dos óleos voláteis obtidos da população do Núcleo Caraguatatuba do PESM. Nas análises foram considerados apenas componentes com áreas de picos superior a 0,5%.

Apesar da grande quantidade de compostos exclusivos nos óleos das folhas dos indivíduos da Juréia, o que demonstra uma maior complexidade química, os dois compostos majoritários, espatulenol e α -cadinol, são comuns aos dois locais de coleta. O óleo volátil obtido das folhas de *C. fontanesianus*, em ambos os locais de coleta, apresentou como principais classes de componentes os sesquiterpenos oxigenados (45,0% Juréia e 44,7% Caraguatatuba), seguidos dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (36,6% Juréia e 38,4% Caraguatatuba) e com um percentual bastante inferior de monoterpenos (**Gráfico 1**).

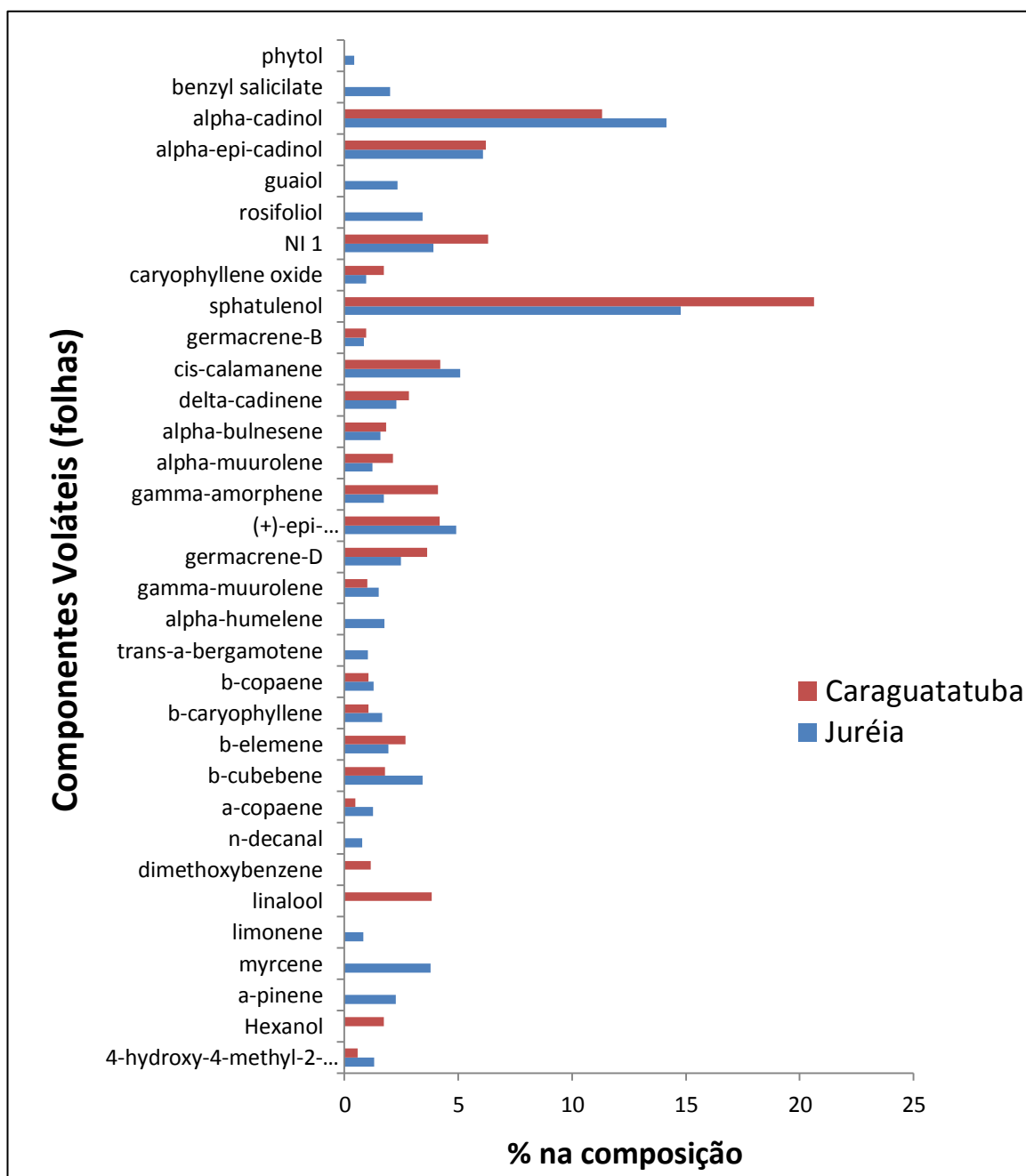
Tabela 6 - Composição química dos óleos voláteis de *C. fontanesianus* coletados na EEJI (Juréia) e PESM (Caraguatatuba).

Peak	Compounds	IK ^a	IK ^b	ÓLEO-JU		ÓLEO-CAR	
				FOLHA	FRUTO	FOLHA	
1	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	840	839	1,3 ± 0,4	-	1,5 ±	1,2
2	hexanol	870	870	-	-	1,7 ±	0,1
3	α-pineno	934	939	2,3 ± 0,4	2,5 ± 0,1	-	
4	mirreno	990	990	3,8 ± 0,1	34,1 ± 2,0	-	
5	limoneno	1030	1029	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,0	-	
6	cis-β-ocimeno	1038	1037	-	1,6 ± 0,0	-	
7	trans-β-ocimeno	1049	1050	-	4,0 ± 0,3	-	
8	linalool	1099	1096	-	-	3,8 ±	0,1
9	dimetoxibenzeno	1165	1165	-	-	1,7 ±	0,0
10	n-decanal	1205	1201	1,2 ± 0,1	-	-	
11	geranial	1267	1267	-	0,6 ± 0,0	-	
12	α-copaeno	1373	1376	1,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,7 ±	1,0
13	β-cubebeno	1385	1388	3,4 ± 0,1	4,7 ± 0,1	2,3 ±	0,1
14	β-elemeno	1387	1390	1,9 ± 0,0	-	2,7 ±	0,2
15	β-cariofileno	1415	1419	1,7 ± 0,1	8,0 ± 0,5	2,3 ±	0,2
16	β-copaeno	1426	1432	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,6 ±	0,1
17	trans-α-bergamoteno	1431	1434	1,1 ± 0,0	1,9 ± 0,1	-	
18	trans-muurolo-3,5-dieno	1446	1453	-	0,7 ± 0,0	-	
19	α-humuleno	1452	1454	1,8 ± 0,1	4,4 ± 0,3	-	
20	cis-cadina-1(6),4-dieno	1457	1463	-	0,8 ± 0,0	-	
21	cis-muurolo-4(14),5-dieno	1459	1466	-	0,9 ± 0,0	-	
22	dauca-5,8-dieno	1469	1472	-	3,4 ± 0,2	-	
23	γ-muurolo	1472	1479	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,5 ±	0,1
24	germacreno-D	1477	1485	2,5 ± 0,3	4,3 ± 0,2	3,6 ±	0,2
25	(+)-epi-biciclosesquifelandreno	1487	1493	4,9 ± 0,4	8,1 ± 0,2	5,7 ±	0,2
26	γ-amorphen	1491	1495	2,7 ± 0,3	-	4,1 ±	0,1
27	biciclogermacreno	1491	1500	-	6,8 ± 0,4	-	
28	α-muurolo	1494	1500	1,2 ± 0,3	-	2,1 ±	0,1
29	α-bulneseno	1497	1509	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,1	2,4 ±	0,2
30	δ-cadineno	1514	1523	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,1	2,8 ±	0,1
31	cis-calamaneno	1518	1529	5,1 ± 0,2	-	4,2 ±	0,1
32	trans-cadina-1,4-dieno	1529	1534	-	2,9 ± 0,1	-	
33	germacreno-B	1554	1561	2,3 ± 0,1	-	1,4 ±	0,5
34	espatulenol	1573	1578	17,8 ± 0,5	-	20,6 ±	0,5
35	óxido de cariofileno	1577	1583	1,0 ± 0,2	-	1,7 ±	0,1
36	NI 1	1580		3,9 ± 0,2	-	6,3 ±	0,4
37	rosifoliol	1601	1600	3,4 ± 0,3	-	-	
38	guaiol	1609	1600	2,3 ± 0,5	-	-	
39	α-epi-cadinol	1638	1640	6,2 ± 0,1	0,7 ± 0,0	7,2 ±	0,1
40	α-cadinol	1652	1654	15,1 ± 0,3	-	15,8 ±	0,2
41	salicilato de benzil	1862	1865	2,0 ± 0,2	-	-	
42	fitol	2103	2104	0,6 ± 0,7	-	-	

^a Índices de retenção de Kovats em coluna apolar (DB-5); ^b Índices de retenção de Kovats em coluna apolar, da literatura (Adams, 2007); NI 1: [m/z (%): 218 (M+), 187 (56), 159 (100), 145 (53), 133 (65), 131 (56), 119 (54), 105 (84), 91 (80), 79 (48), 43 (48)].

JU= Juréia e CAR= Caraguatatuba

Grafico 1 - Comparativo da composição dos óleos voláteis (folhas) entre as áreas estudadas.



O óleo volátil obtido dos frutos de *C. fontanesianus* apresentou na sua composição como composto majoritário o mirceno, presente também apenas nos óleos voláteis das folhas dos indivíduos da Juréia. As principais classes de substâncias encontradas nos óleos voláteis dos frutos foram hidrocarbonetos sesquiterpênicos (53,8%), seguido dos hidrocarbonetos monoterpênicos (42,7%), e com um percentual bastante inferior de monoterpênicos e sesquiterpenos oxigenados, diferente do que foi observado nas folhas (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Composição das principais classes químicas dos óleos voláteis das diferentes partes de *C. fontanesianus* coletados em regiões de Mata Atlântica.

Compostos	ÓLEO-JU		ÓLEO-CAR
	FOLHA	FRUTO	FOLHA
Monoterpeno			
Hidrocarbonetos (%)	7,4	42,7	-
Oxigenados (%)	-	0,6	3,6
Sesquiterpeno			
Hidrocarbonetos (%)	36,6	53,8	38,4
Oxygenados (%)	45,0	0,7	44,7
Outros (%)	8,6	-	11,2
Compostos identificados (%)	97,6	97,8	97,9

JU= Juréia e CAR= Caraguatatuba

Em *Quercus ilex*, árvore de clima mediterrâneo, que domina também áreas de clima temperado na Europa, as emissões de monoterpenos são reguladas positivamente pela disponibilidade de luz e temperatura (Staudt & Bertin 1998). Segundo os autores, a dependência da luz na emissão dos voláteis existe em decorrência da necessidade de produtos fotossintéticos para a biossíntese de isopreno, ao passo que a dependência da temperatura está relacionada a ação da isopreno sintase, enzima do cloroplasto que sintetiza isoprenos, a partir de difosfato de dimetil-alila (DMAPP).

De um modo geral, a composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas dos indivíduos da Juréia e de Caraguatatuba, mostrou pequenas diferenças. Diferenças na composição química em função da localização geográfica foram relatadas para diversas espécies. As condições edafoclimáticas, a altitude e as interações intra-específicas diferem entre regiões geográficas e é difícil determinar, em estudos de variabilidade intra-específica relacionada à variação geográfica, o grau de interferência dos fatores ambientais e genéticos, uma vez que estes estão intrinsecamente relacionados, pois são condições ambientais (bióticas e abióticas) que proporcionam a pressão seletiva em detrimento de um ou outro genótipo (Souza, 2009).

No caso dos frutos coletados na E.E Juréia Itatins, existe também uma diferença na composição química, quando comparado com as folhas. Apesar dos grandes esforços para a obtenção dos frutos nos dois locais de coleta, o que tornaria possível a comparação da composição química dos óleos voláteis de frutos de ambos os locais, não foi possível encontra-los na época de frutificação da espécie em Caraguatatuba, talvez pelo número inferior de indivíduos nessa população, impossibilitando a coleta dos frutos nos dois locais.

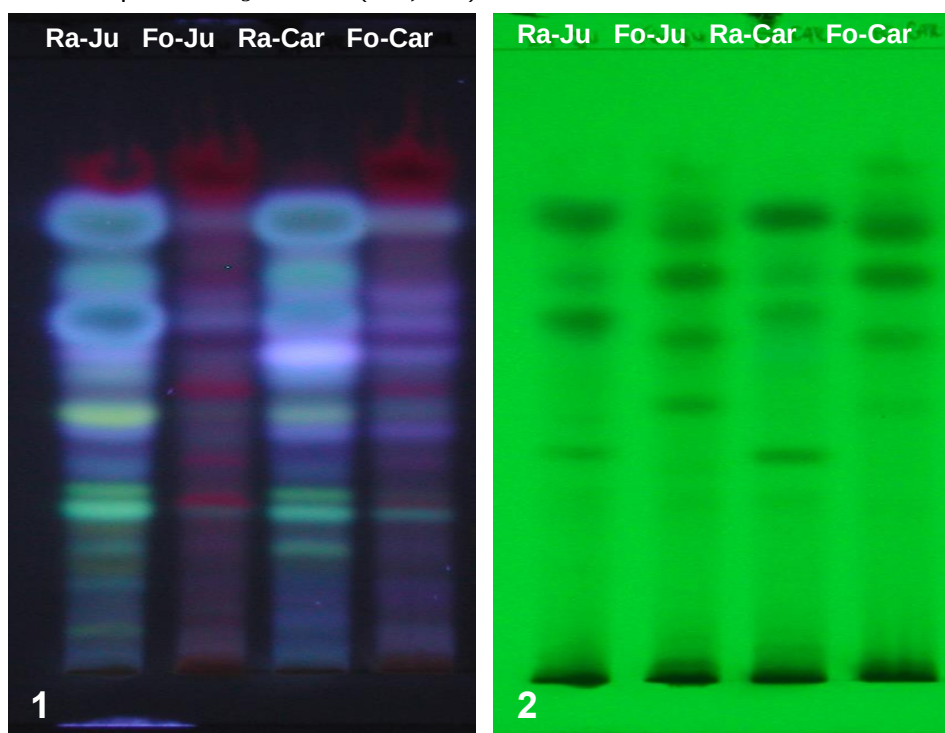
5.3. Análise por Cromatografia em Camada Delgada

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sílica como fase estacionária foi utilizada com a finalidade de verificar a complexidade de cada extrato e o comportamento em diferentes sistemas de eluição. A análise por CCD também foi importante para comparação das regiões ativas nos ensaios de bioautografia com fungos e ensaios qualitativos de avaliação da atividade antioxidante.

Os resultados das análises por CCD dos extratos são apresentados abaixo. As siglas nas placas indicam o órgão e o local de coleta: **Ramos Juréia (Ra-Ju)**, **Folhas Juréia (Fo-Ju)**, **Ramos Caraguatatuba (Ra-Car)** e **Folhas Caraguatatuba (Fo-Car)**.

Abaixo as fotos das cromatoplas das extratos etanólicos brutos observados em luz ultravioleta (λ) 366 nm e 254 nm.

Figura 14 - Cromatografia em camada delgada dos EEBs de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2). Sistema de eluição CHCl_3 :MeOH (9:1; v/v).



Abaixo seguem as fotos das cromatoplas dos extratos obtidos através da partição do EEB, observadas em luz ultravioleta (λ) 366 nm e 254 nm, identificadas de acordo com o solvente utilizado na partição

Figura 15 - Cromatografia em camada delgada dos extratos HEX de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2). Sistema de eluição CH_2Cl_2 :Hex:AcOEt (80:20:05; v/v)

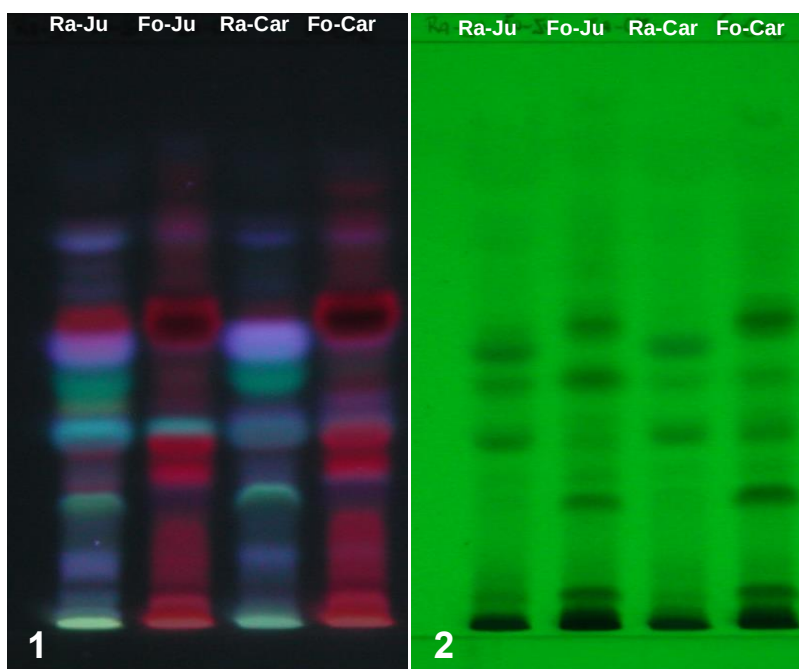


Figura 16 - Cromatografia em camada delgada dos extratos DCM de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2). Sistema de eluição CH_2Cl_2 :AcOEt:MeOH (65:30:05; v/v).

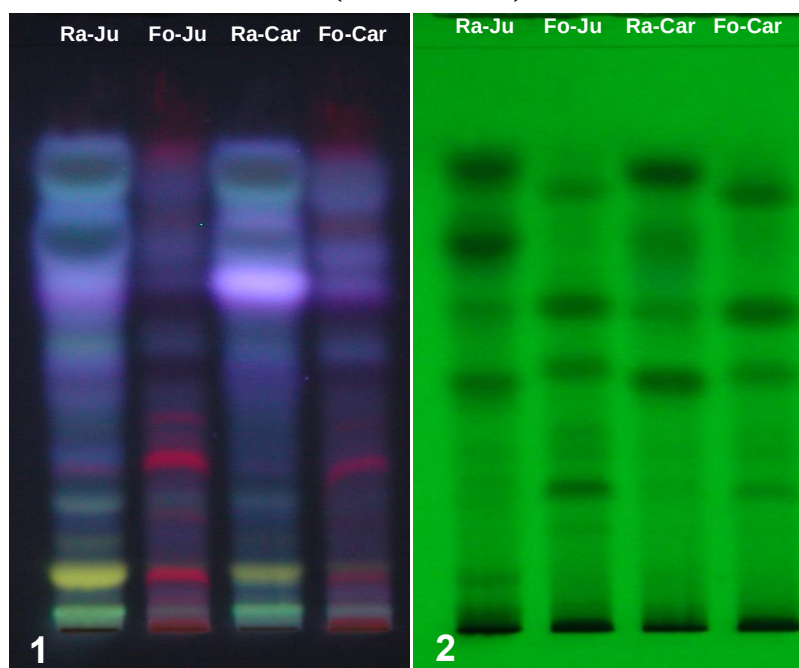
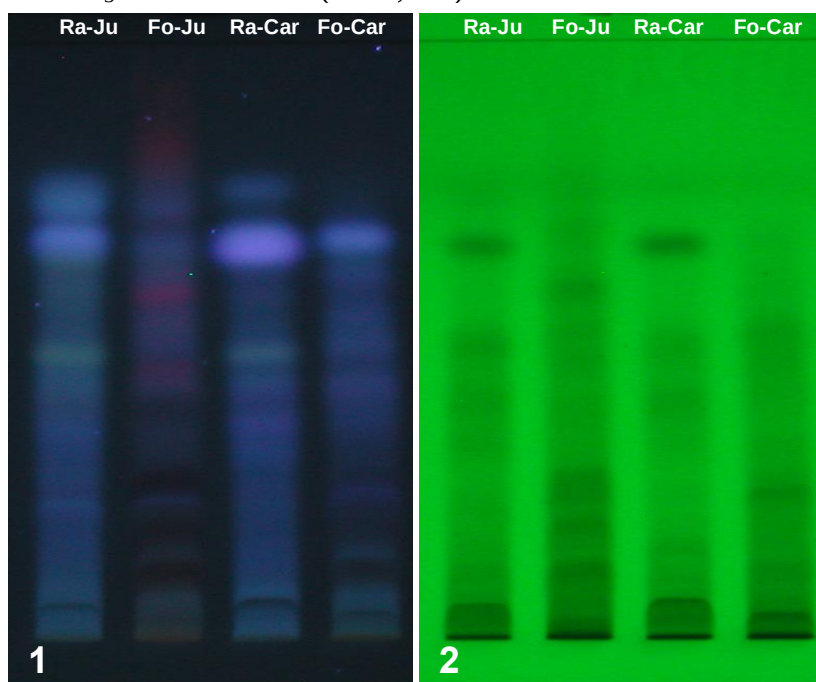


Figura 17 - Cromatografia em camada delgada dos extratos AcOEt de caules e folhas, observadas sob luz UV em 366 nm (1) e 254 nm (2). Sistema de eluição CHCl_3 :MeOH:AcOEt (5:3:2; v/v)



Examinando as placas de cromatográficas de todas as amostras, podemos observar que os extratos de maior interesse para os estudos foram os de baixa e média polaridade (HEX, DCM) por ser visível a maior complexidade nesses extratos.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é o único método cromatográfico que oferece a possibilidade de apresentar o resultado como uma imagem. Nela quase todos os componentes da amostra estão incluídos na cromatoplaça. É uma técnica simples e barata (Marston & Hostettman, 2009). Além disso, é flexível e permite múltipla detecção, em conjunto com microrganismos e outros agentes biológicos, a bioautografia em CCD pode ser utilizada para detectar atividades biológicas (Hostettman *et al.*, 1997).

5.4. Avaliação Qualitativa de Atividades Biológicas por Bioautografia em CCD

5.4.1. Avaliação por CCD da Atividade Antioxidante dos Extratos com DPPH

Os extratos foram avaliados quanto à capacidade de sequestro do radical livre DPPH. Abaixo são apresentados os resultados das avaliações. As siglas sobre as placas indicam o órgão, local de coleta e o controle positivo para o ensaio biológico: **Ramos Juréia (Ra-Ju)**, **Folhas Juréia (Fo-Ju)**, **Ramos Caraguatatuba (Ra-Car)** **Folhas Caraguatatuba (Fo-Car)** e **Padrão Quercetina (P)**. As placas foram fotografadas sob luz branca.

Figura 18 - CCDs de sílica gel GF₂₅₄ dos EEBs (1) e extrato HEX (2) reveladas com DPPH. Fatores de retenção (Rfs) calculados e intensidade da atividade antioxidante (forte***, média**, fraca*).

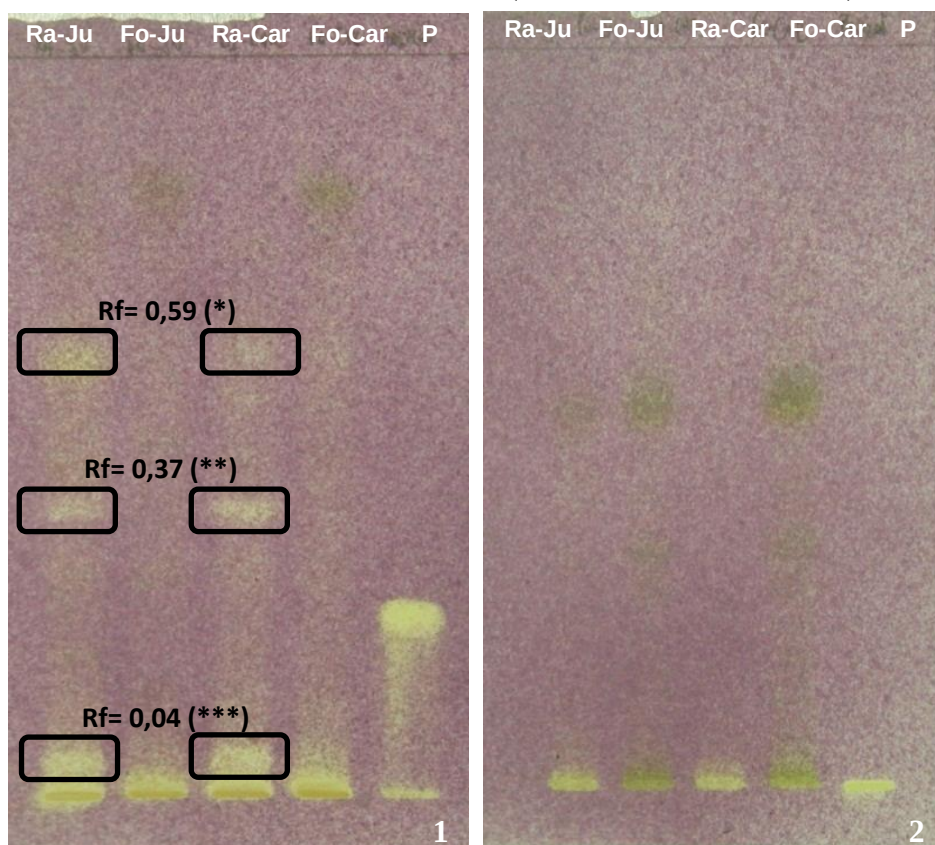
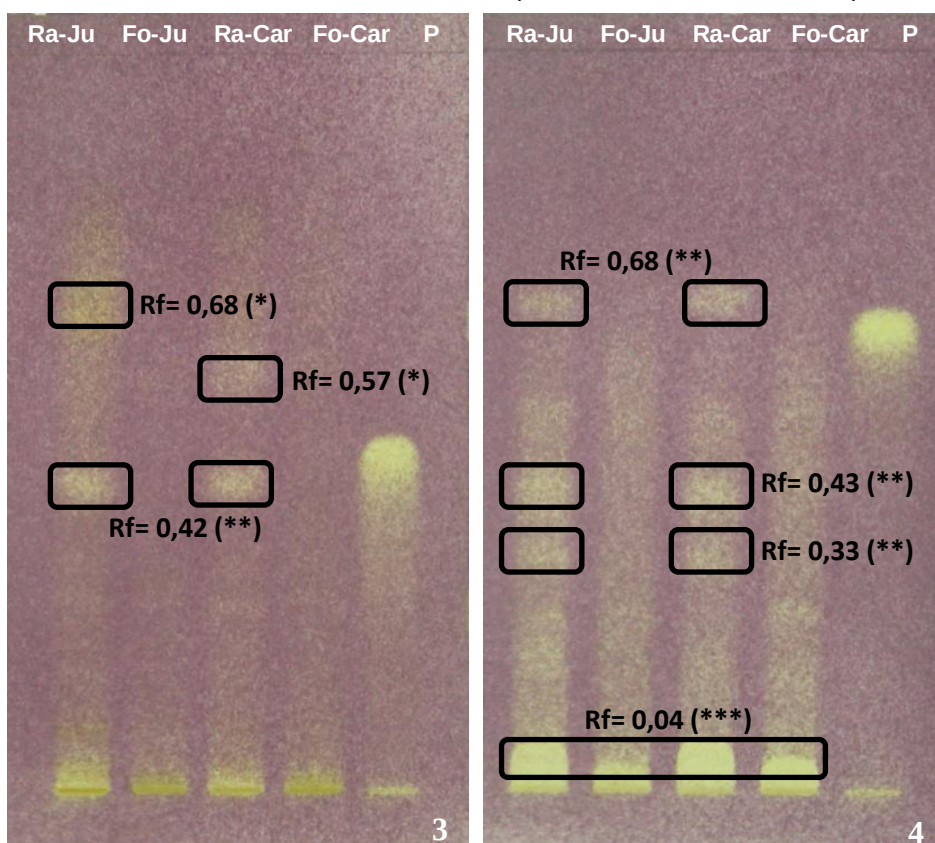


Figura 19 - CCDs de sílica gel GF₂₅₄ dos extratos DCM (3) e AcOEt (4) reveladas com DPPH. Fatores de retenção (Rfs) calculados e intensidade da atividade antioxidante (forte***, média**, fraca*).



Após as revelações com DPPH das placas cromatográficas podemos observar que os extratos etanólicos brutos (EEBs) e todos os demais extratos, principalmente dos ramos, apresentam atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH, com exceção do extrato HEX (2) que não apresentou potencial antioxidante. O extrato que pareceu ser mais ativo foi o AcOEt, o mais polar, porém com atividade forte próximo a base da CCD, em Rf's muito baixos, característica que pode dificultar a separação/purificação para identificação destes compostos.

A determinação do Rf (fator de retenção) é muito importante, sendo um dos fatores mais significantes em cromatografia de camada delgada (CCD); é definido como a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel (Degani *et al.*, 1998). Tendo os seus valores definidos, torna-se possível fazer a comparação com valores de Rf de substâncias conhecidas, ou padrões (Marino *et al.*, 2010).

5.4.2. Avaliação por CCD da Atividade Antioxidante dos Extratos com β -caroteno

Os extratos foram avaliados quanto à capacidade de impedir a oxidação do β -caroteno pelo oxigênio atmosférico, numa reação fotoquímica. Abaixo são apresentados os resultados das avaliações. As siglas sobre as placas indicam o órgão, local de coleta e o controle positivo para o ensaio biológico: **Ramos Juréia (Ra-Ju), Folhas Juréia (Fo-Ju), Ramos Caraguatatuba (Ra-Car) Folhas Caraguatatuba (Fo-Car) e Padrão Quercetina (P).**

As avaliações das atividades antioxidantes em CCD foram realizadas antes da viagem a Genebra para o estágio de doutorado sanduíche. Elas são avaliações qualitativas importantes para podermos, inicialmente, observar o potencial biológico de cada extrato. As placas foram fotografadas sob luz branca (**Figuras 20 e 21**).

Figura 20 - CCDs de sílica gel GF₂₅₄ dos EEBs (1) e extrato HEX (2) reveladas com β -caroteno. Fatores de retenção (Rfs) calculados e intensidade da atividade antioxidante (forte***, média**, fraca*).

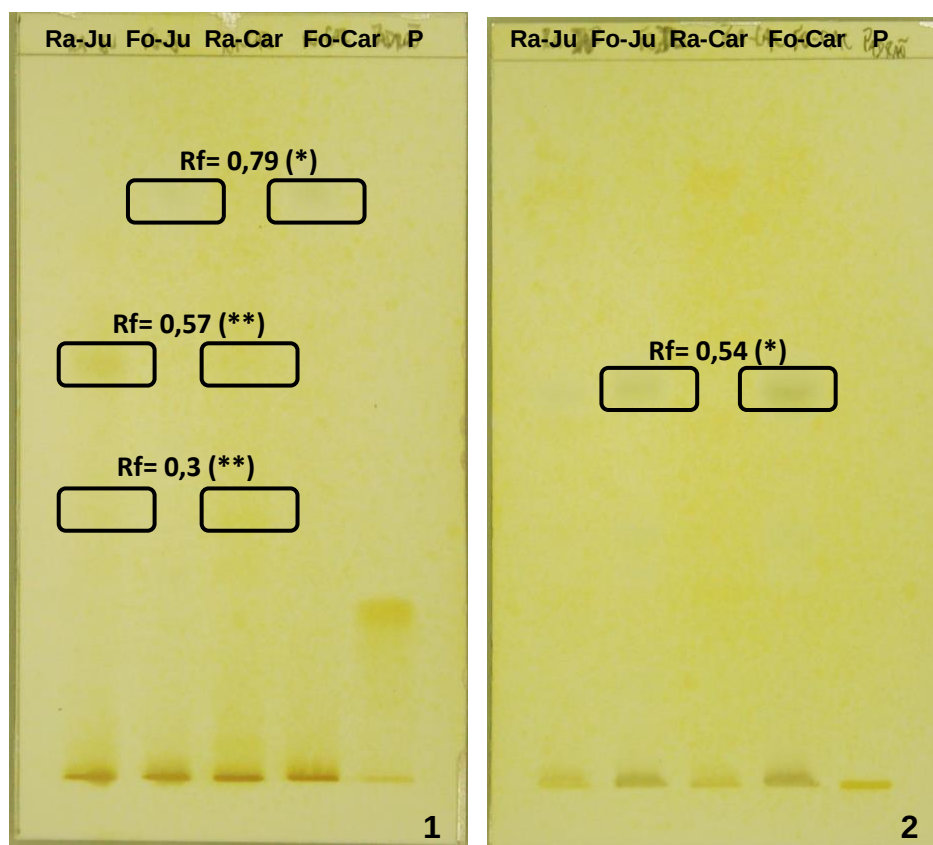
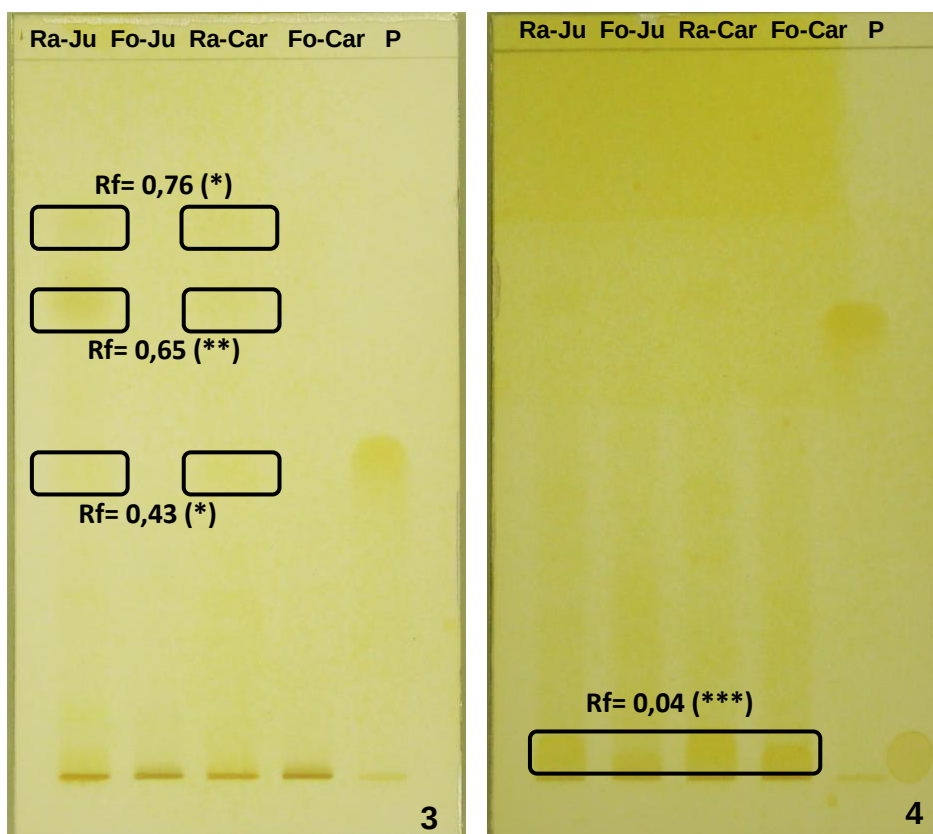


Figura 21 - CCDs de sílica gel GF₂₅₄ dos extratos DCM (3) e AcOEt (4) reveladas com β -caroteno. Fatores de retenção (Rfs) calculados e intensidade da atividade antioxidante (forte***, média**, fraca*).



Após as revelações das CCDs podemos observar que todos os extratos, principalmente dos ramos, apresentam potencial de impedir a oxidação fotoquímica do β -caroteno. O extrato que demonstrou ser mais ativo foi o AcOEt, com forte atividade bem próximo a base da placa cromatográfica, em Rf's muito baixos. A fração diclorometânica também demonstrou potencial antioxidante em Rf's intermediários.

5.4.4. Avaliação por CCD da Atividade Antifúngica dos Extratos contra *C. sphaerospermum*

A avaliação do potencial antifúngico de todos os extratos contra *C. sphaerospermum* em ensaio descrito por Homans & Fuchs (1970), foi realizado anteriormente ao período de estagio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra, em Genebra, Suíça. A avaliação da atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* é uma ferramenta importante para achar compostos com potencial antifúngico de maneira rápida e eficiente. Abaixo são apresentados os resultados das avaliações. As siglas sobre as placas indicam o órgão, local de coleta e o controle positivo para o ensaio biológico: **Ramos Juréia (Ra-Ju)**, **Folhas Juréia (Fo-Ju)**, **Ramos Caraguatatuba (Ra-Car)**, **Folhas Caraguatatuba (Fo-Car)** e **Padrão Nistatina (P)**. As placas foram fotografadas sob luz branca.

Figura 22 - CCDs de sílica gel GF₂₅₄ dos EEBs (1) e extrato HEX (2) reveladas com *C. sphaerospermum*. Fatores de retenção (Rfs) calculados e intensidade da atividade antifungica (forte***, média**, fraca*).

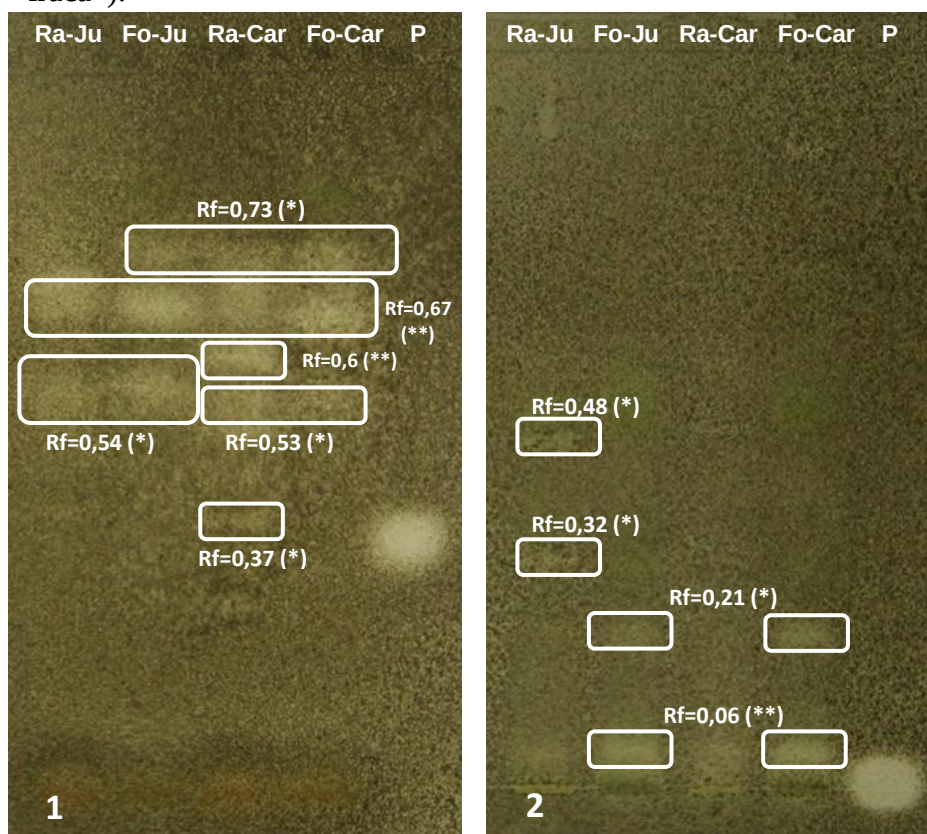
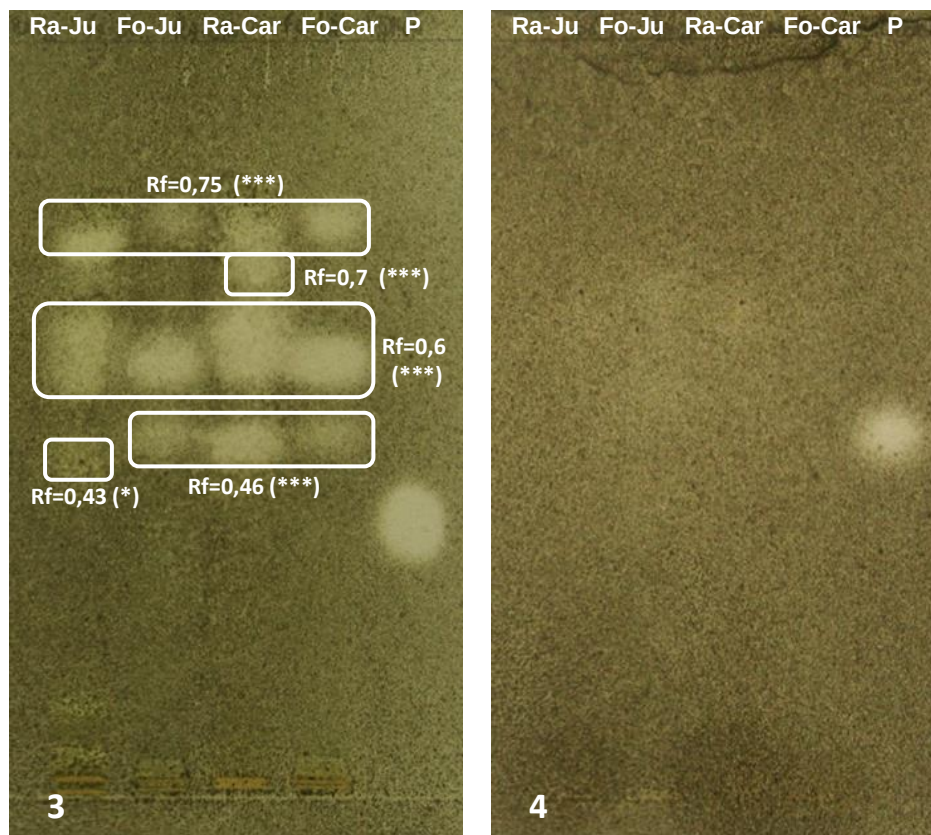


Figura 23 - TLCs de sílica gel GF₂₅₄ dos extratos DCM (3) e AcOEt (4) reveladas com *C. sphaerospermum*. Fatores de retenção (Rf) calculados e intensidade da atividade antifúngica (forte***, média**, fraca*).



Após as revelações das CCDs com suspensão de esporos de conídios do fungo *C. sphaerospermum* observamos que o extrato etanólico bruto (1) e o extrato DCM (3) de ramos e folhas de ambos os locais de coleta apresentam forte potencial antifúngico. O extrato HEX (2) apresentou fraca atividade e o extrato AcOEt não apresentou potencial antifúngico. Os extratos mais ativos foram DCM, com Rf's de valores intermediários.

A avaliação da atividade antifúngica contra o fungo *C. cladosporioides* não foi possível nesta etapa do desenvolvimento do projeto porque houve problemas de crescimento das cepas, o que inviabilizou os testes.

5.4.4. Avaliação por CCD da Atividade Antifúngica dos Extratos contra *C. albicans*

A avaliação do potencial antifúngico de todos os extratos contra *C. albicans* em ensaio descrito por Hostettman e colaboradores (1991), foi realizado durante o período de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra, em Genebra, Suíça. Durante meu estágio

A avaliação desta atividade é uma ferramenta importante para achar compostos com potencial antifúngico de maneira rápida. Abaixo são demonstrados os resultados da avaliação da atividade antifúngica contra *C. albicans*, de todos os extratos (**Figura 24**).

Conchocarpus fontanesianus

Ramos - Juréia	Ramos - Caraguá	Folhas - Juréia	Folhas - Caraguá	
100 200 300(µg)	100 200 300(µg)	100 200 300(µg)	100 200 300(µg)	→ Extrato Etanólico Bruto
				→ Extrato HEX
				→ Extrato DCM
				→ Extrato AcOEt

Miconazol (padrão)

5µg 1µg 0,5µg

46

5.5. Análise do Perfil Cromatográfico dos Extratos por HPLC-DAD

Os perfis cromatográficos dos extratos de *C. fontanesianus*, provenientes de ramos e folhas, foram obtidos através da técnica HPLC-DAD. Após algumas análises em gradiente exploratório optou-se por utilizar o sistema de eluição composto por H₂O/MeOH, ambos contendo 0,1% de AF, pois com este sistema observamos uma melhor resolução entre as bandas. Foi empregado um método de eluição em modo gradiente, com variação não linear da porcentagem do solvente orgânico em 85 minutos (**Tabela 8**). As amostras foram previamente filtradas em filtro SIMPLEPURE PTFE/L com poros de 0,45 µm de diâmetro. Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEBs), obtidos através da metodologia descrita, estão ilustrados a seguir nos comprimentos de onda de 254, 280 e 366 nm respectivamente (**Figuras 25 e 26**).

Tabela 8 – Condição cromatográfica aplicada para obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos de *C. fontanesianus* através da técnica HPLC-DAD.

	Gradiente	
	Tempo (min)	%B
Solvente A - H ₂ O + 0,1% AF		
Solvente B - MeOH + 0,1% AF	0	5
Fluxo = 1 mL/min	5	10
Inj. Volume = 10µL	15	45
[] amostra = 5 mg/mL	75	100
	85	100

Figura 25 – Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de ramos (A) e folhas (B) de *C. fontanesianus* coletados na Jureia, obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254, 280 e 366.

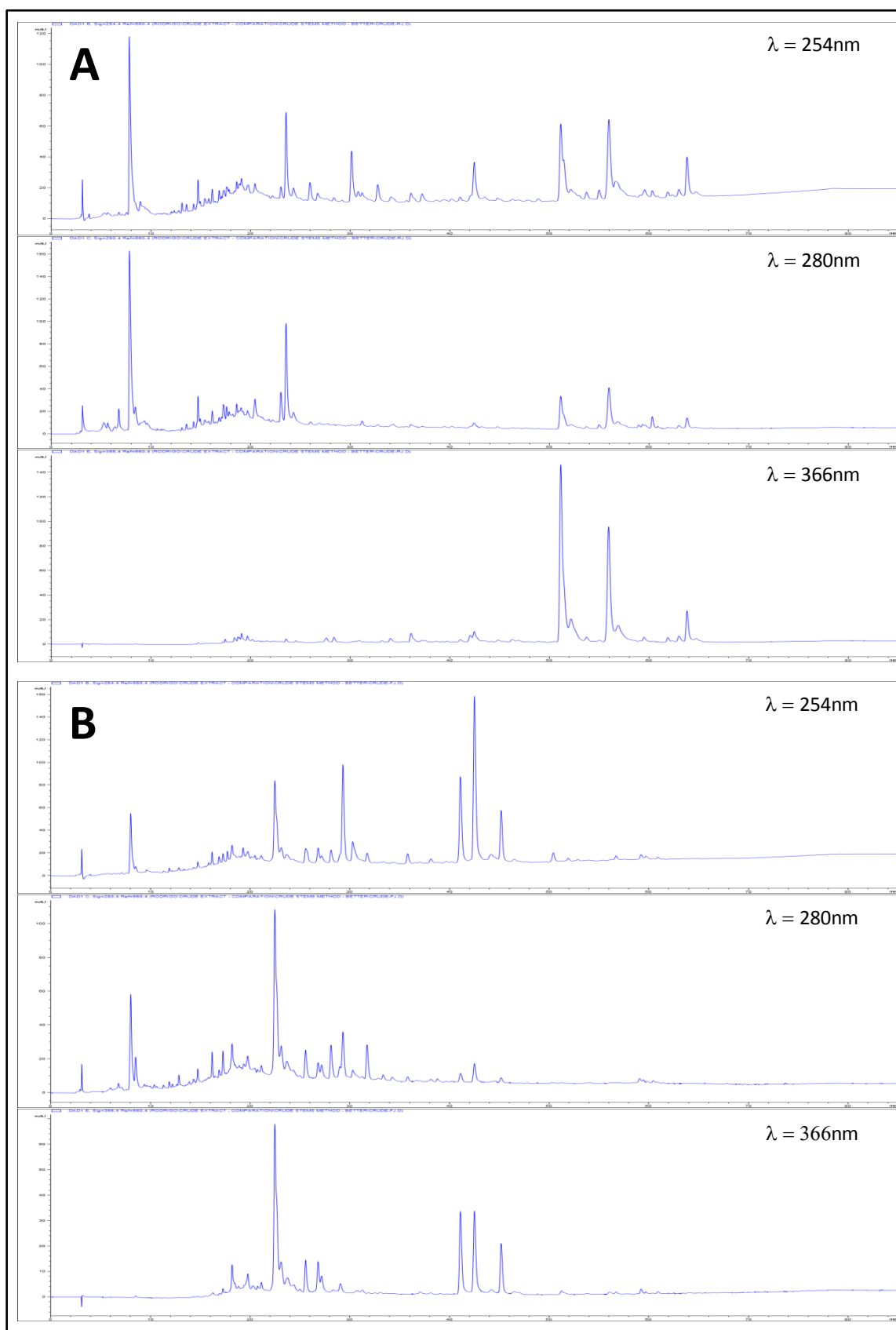
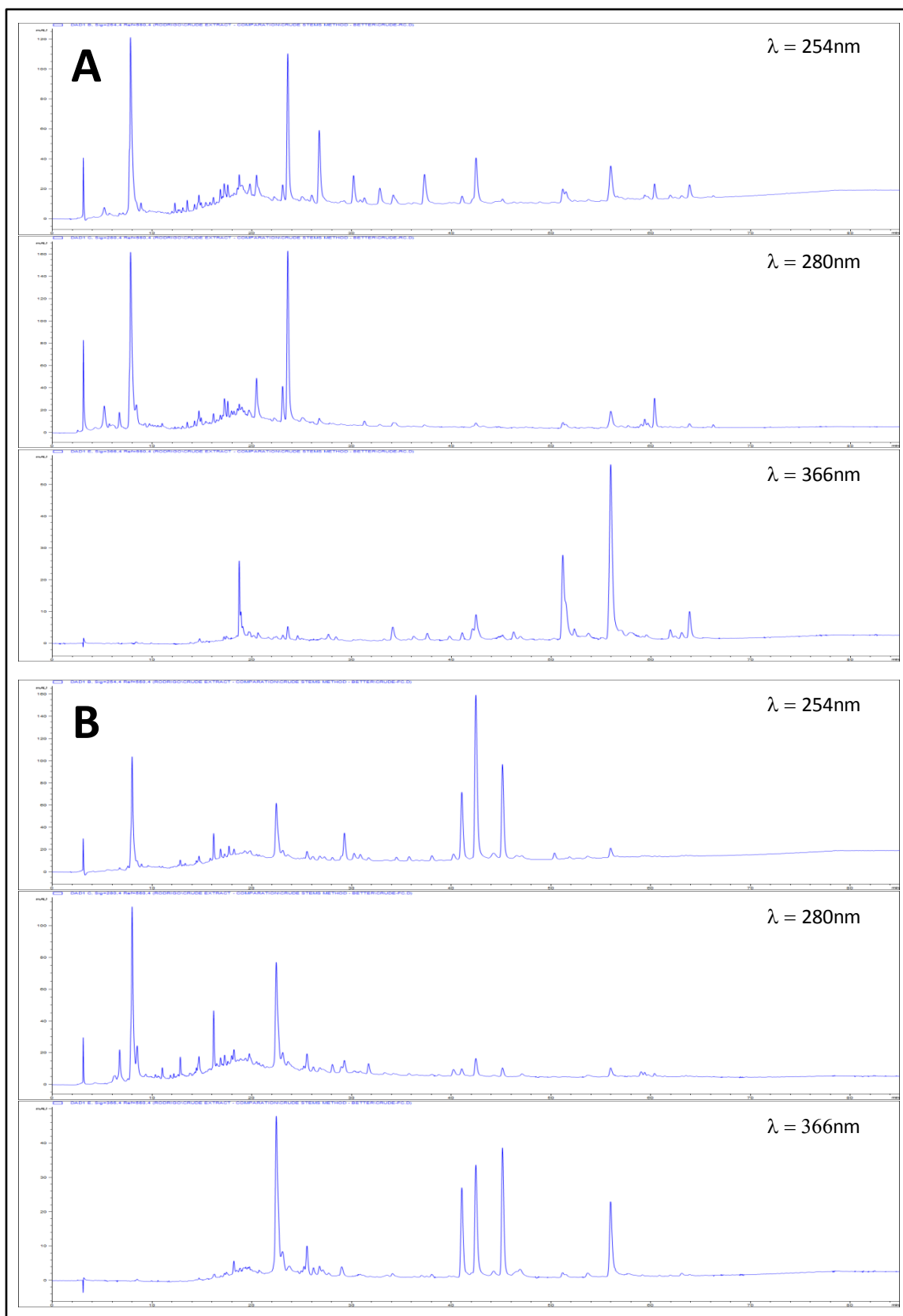


Figura 26 – Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de ramos (A) e folhas (B) de *C. fontanesianus* coletados em Caraguatatuba, obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254, 280 e 366.



A partir das análises dos perfis cromatográficos dos EEBs de ramos e folhas, de ambos os locais de coleta, realizados nas mesmas condições cromatográficas, pode-se observar a alta complexidade das amostras analisadas, as quais apresentam inúmeras bandas em diferentes tempos de retenção. Comparando os cromatogramas, pode-se constatar a grande semelhança entre os perfis cromatográficos de ambos os locais de coleta, Núcleo Arpoador da Estação Ecológica Juréia-Itatins (litoral sul do Estado de São Paulo) e Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar (litoral norte do Estado de São Paulo), para ambos os órgãos estudados, folhas e ramos (**Figuras 27 e 28**). No entanto, a complexidade química dos EEBs dos ramos mostrou ser superior em relação ao extrato das folhas.

Fig. 27 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de ramos de *C. fontanesianus* coletados na Juréia (**A**) e em Caraguatatuba (**B**), obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.

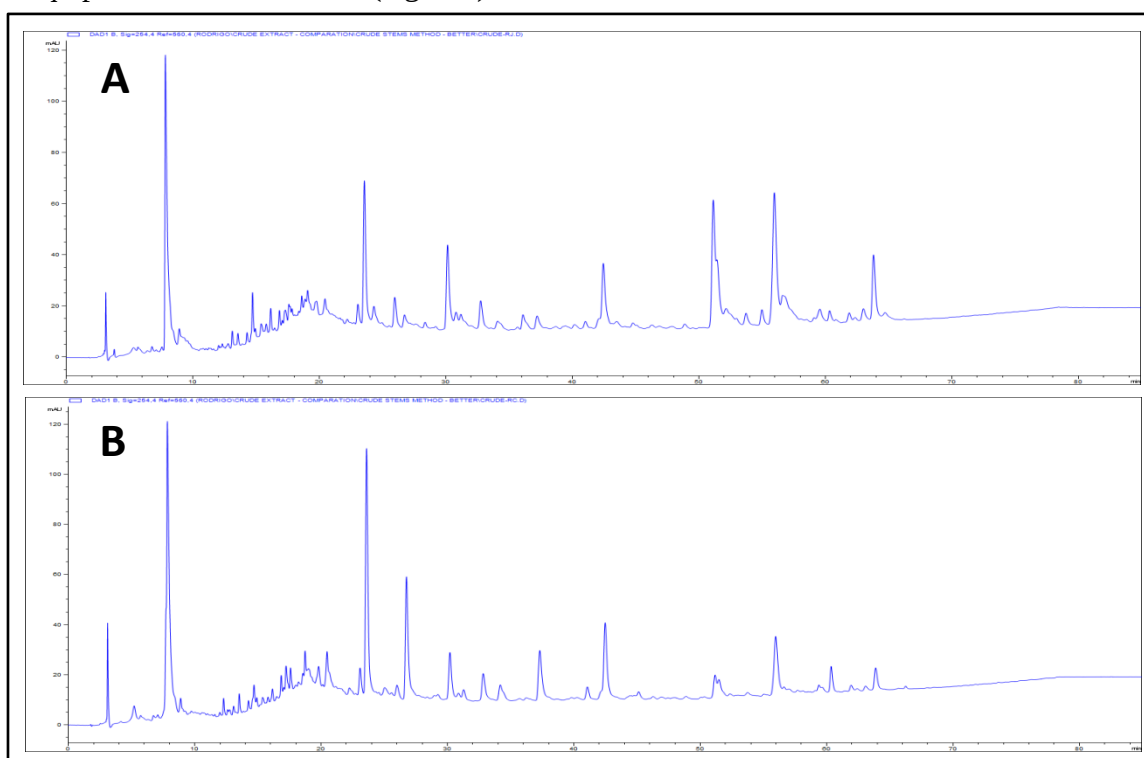
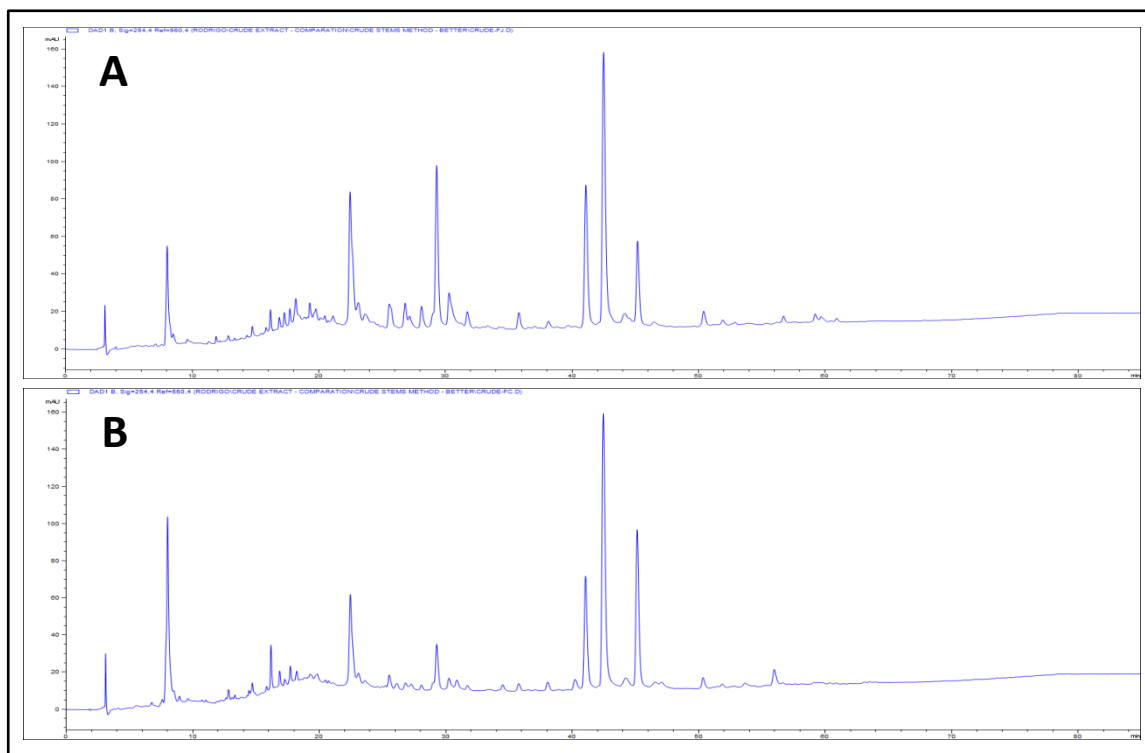


Fig. 28 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos de folhas de *C. fontanesianus* coletados na Juréia (**A**) e em Caraguatatuba (**B**), obtidos através da técnica de HPLC-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.



Devido à complexidade química já conhecida nos extratos vegetais, foram realizadas partições líquido/líquido com os EEBs, com objetivo de reduzir a complexidade das amostras, separando os grupos de componentes por polaridade crescente, utilizando-se solventes com tais características no processo de partição (n-hexano, diclorometano e acetato de etila). Os extratos obtidos através do procedimento experimental descrito acima foram analisados pela técnica HPLC-DAD com a finalidade de observar se houve segregação dos componentes e se houve diferença significativa no que diz respeito a uma análise qualitativa entre os extratos (HEX, DCM e AcOEt). Abaixo seguem os perfis cromatográficos dos extratos obtidos através da partição (**Figuras 29, 30, 31 e 32**).

Figura 29 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de ramos de *C. fontesianus* coletados na **Juréia** e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.

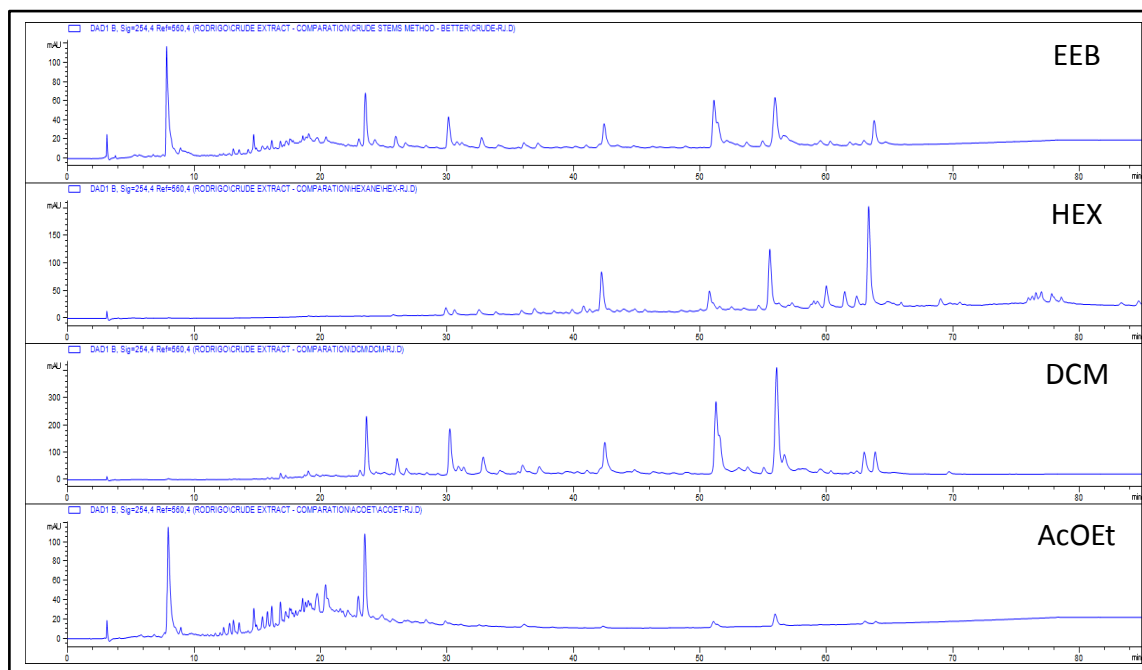


Figura 30 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de ramos de *C. fontesianus* coletados em **Caraguatatuba** e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.

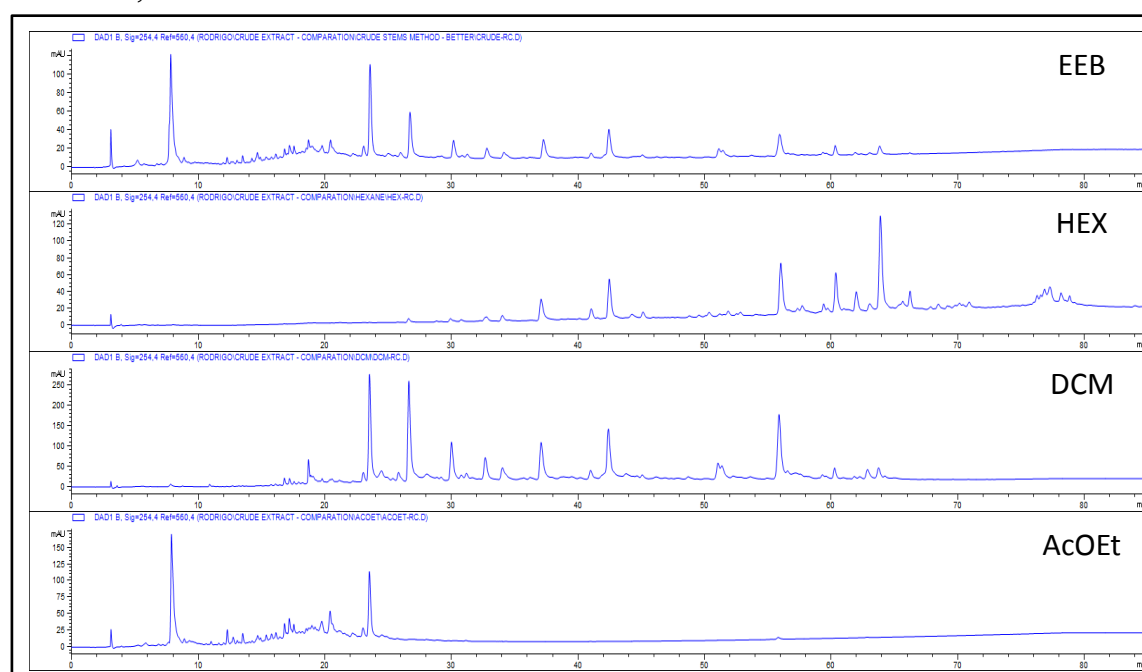


Figura 31 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas de *C. fontanesianus* coletados na **Juréia** e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.

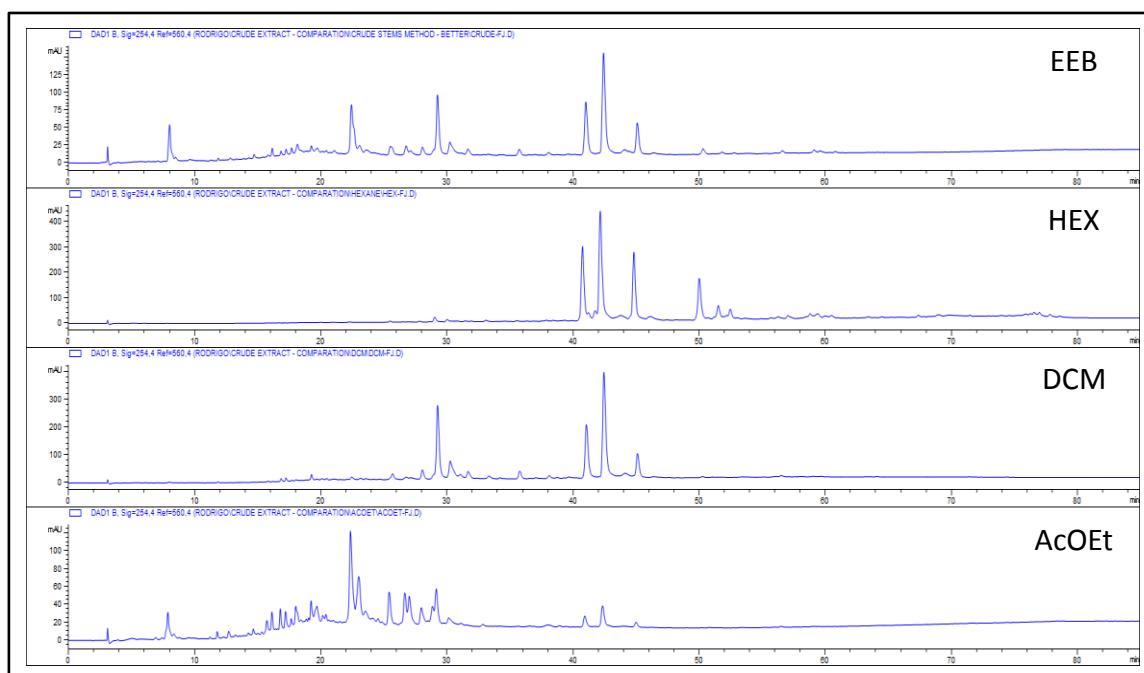
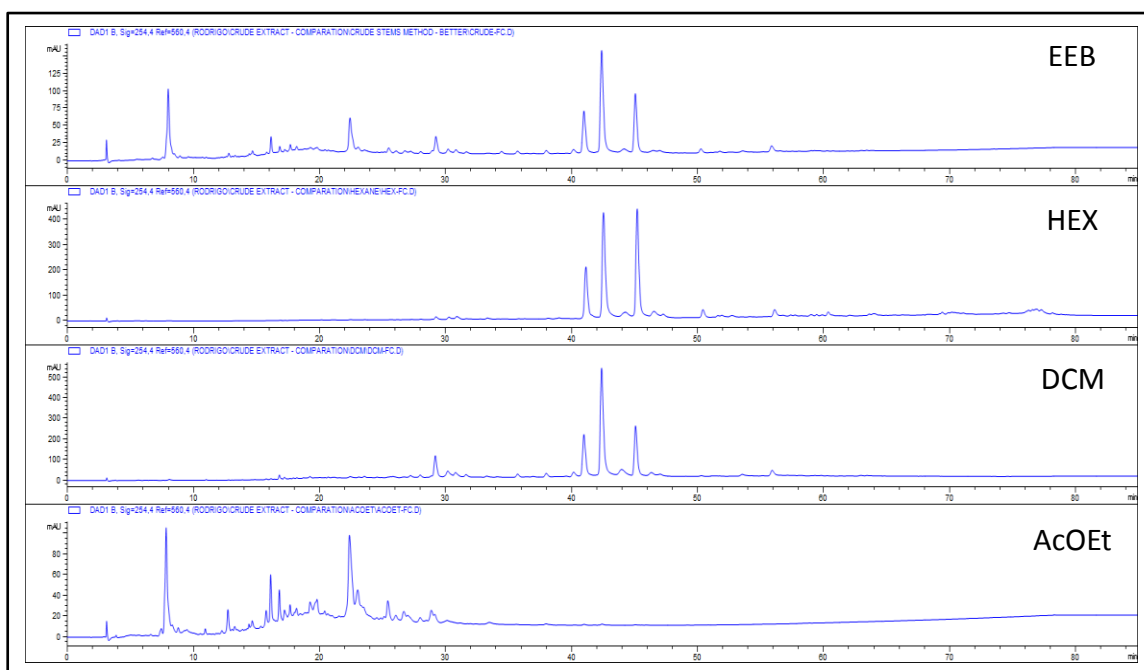


Figura 32 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas de *C. fontanesianus* coletados em **Caraguatatuba** e os extratos obtidos através da técnica de partição (HEX, DCM e AcOEt). Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.



Pela análise dos resultados obtidos em HPLC-DAD pode-se concluir que houve separação satisfatória dos componentes dos EEBs através da técnica de partição líquido/líquido, utilizando os solventes n-hexano, diclorometano e acetato de etila. Os constituintes apolares encontram-se no extrato hexânico (HEX), os de polaridade intermediária encontram-se no extrato diclorometânico (DCM) e os constituintes de maior polaridade encontram-se no extrato acetato de etila (AcOEt). Por comparação dos perfis dos extratos HEX, DCM e AcOEt com os EEBs é possível observar as diferentes faixas de polaridade em cada amostra, sem a alteração significativa no conteúdo dos constituintes das mesmas.

Através das análises e comparação dos perfis cromatográficos dos extratos podemos dizer que em geral os perfis químicos são similares entre as áreas de coleta, variando somente na sua intensidade/abundância de alguns componentes. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese e acúmulo é frequentemente afetada por condições ambientais (Kutchan, 2001). Tais condições podem ser fatores fisiológicos (nutrição, fenologia, genética), climáticos (chuvas, temperatura, radiação solar), geográficos (altitude, poluição do ar) e ecológicos (competição, herbivoria) (Gobo-Neto & Lopes, 2007).

5.6. Microfracionamento por HPLC do Extrato em DCM

De acordo com os resultados obtidos até então, com indicativos da presença de constituintes com atividade antifúngica contra o fungo *Candida albicans*, foram planejados os experimentos de microfracionamento dos extratos em DCM de ramos e folhas do material vegetal coletado na EEJI, utilizando a técnica de HLPC-UV em escala preparativa, com o objetivo de localizar a(s) região(ões) do perfil cromatográfico responsável(eis) por tal atividade.

Para que houvesse maior eficiência no experimento de microfracionamento foi necessário aperfeiçoar as condições cromatográficas de separação em HPLC-DAD para os extratos em DCM de ramos e folhas. Após, foram realizadas as transposições dos métodos analíticos para o preparativo utilizando-se o software HPLC calculator 3,0. As condições cromatográficas de separação em escala preparativa estão descritas na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Condições cromatográficas aplicadas no microfracionamento do extrato DCM de ramos e folhas da Juréia através da técnica PREP-HPLC-UV.

	Gradiente			
	Ramos		Folhas	
	Tempo (min)	%B	Tempo (min)	%B
Solvente A - H ₂ O + 0,1% AF	0	40	0	40
Solvente B - MeOH + 0,1% AF	27	64	48,17	70
Fluxo = 17 mL/min	45,06	78	54,19	100
Injeção = 200µL	54,09	100	60,21	100
[] amostra = 100 mg/mL	57,1	100		

Após o procedimento de microfracionamento foram obtidas 102 frações para extrato DCM dos ramos e 105 frações para as folhas. Foram coletados 10 mL por fração em cada processo de microfracionamento. As frações foram coletadas em tubos de ensaio e posteriormente secas utilizando aparelho Genevac (SP Scientific, PA, EUA). O passo seguinte foi à transferência das frações coletadas para uma placa de TLC com sílica como fase estacionária. Em seguida, foi realizado o ensaio de avaliação da atividade antifúngica com *C. albicans* descrito por Hostettmann e colaboradores (1991).

A partir da metodologia descrita foi possível localizar no perfil cromatográfico dos extratos DCM de ramos e folhas da Juréia as áreas com resultados positivos para o ensaio de atividade antifúngica. Os resultados destas análises estão ilustrados nas **Figuras 33 e 34** a seguir.

Figura 33 – Ilustração do procedimento experimental realizado para determinação das regiões do perfil cromatográfico do extrato DCM ramos que possuem atividade antifúngica.

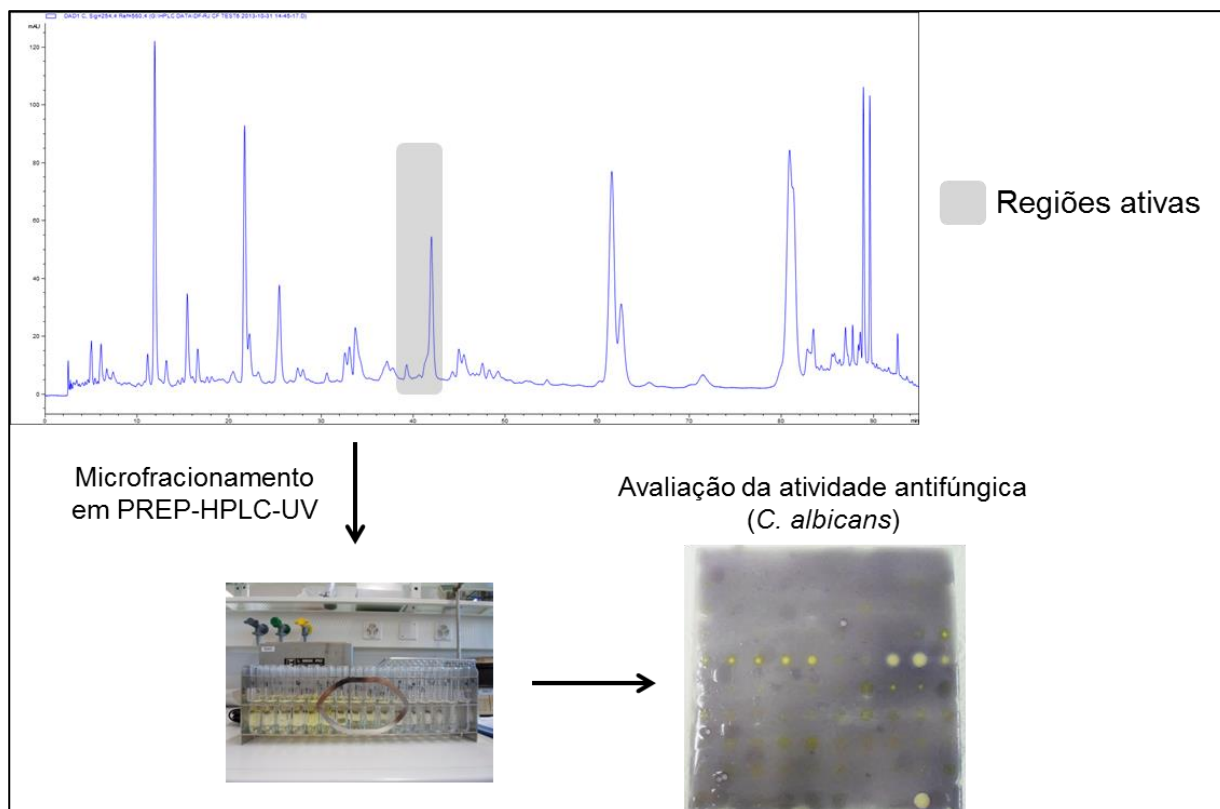
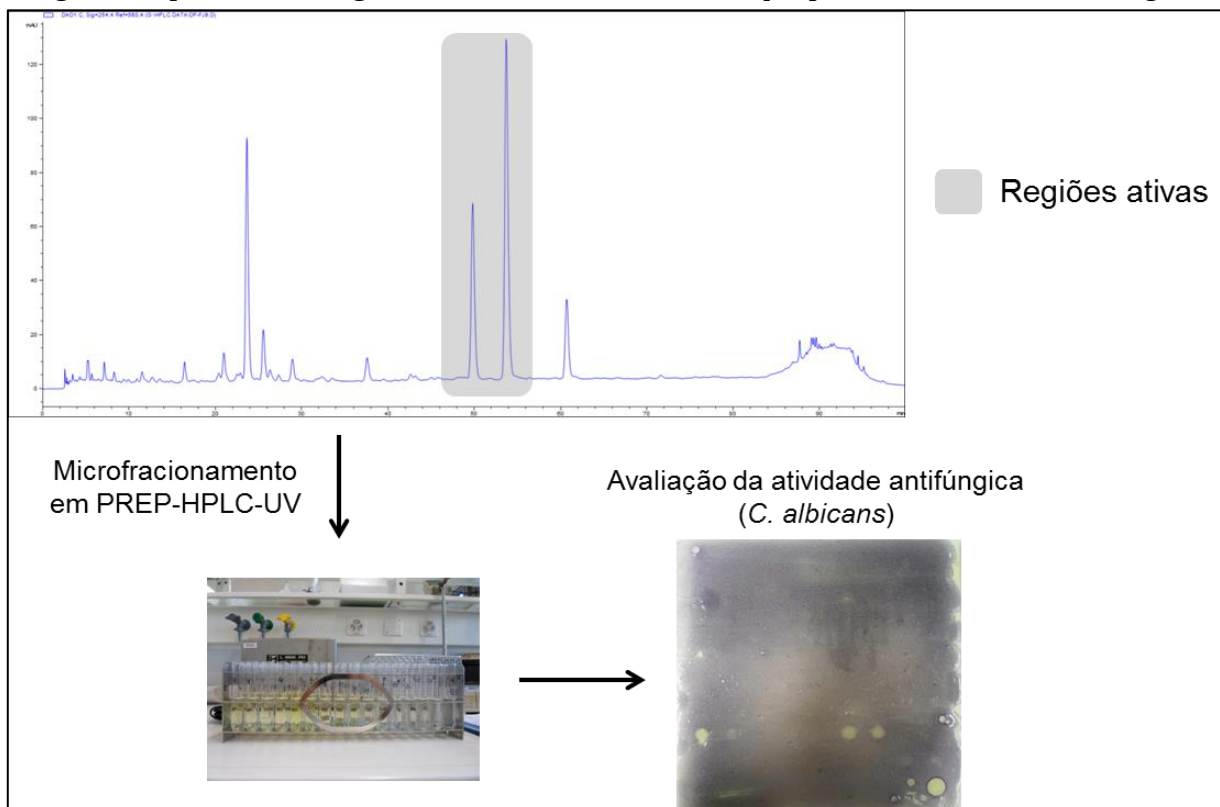


Figura 34 – Ilustração do procedimento experimental realizado para determinação das regiões do perfil cromatográfico do extrato DCM folhas que possuem atividade antifúngica.

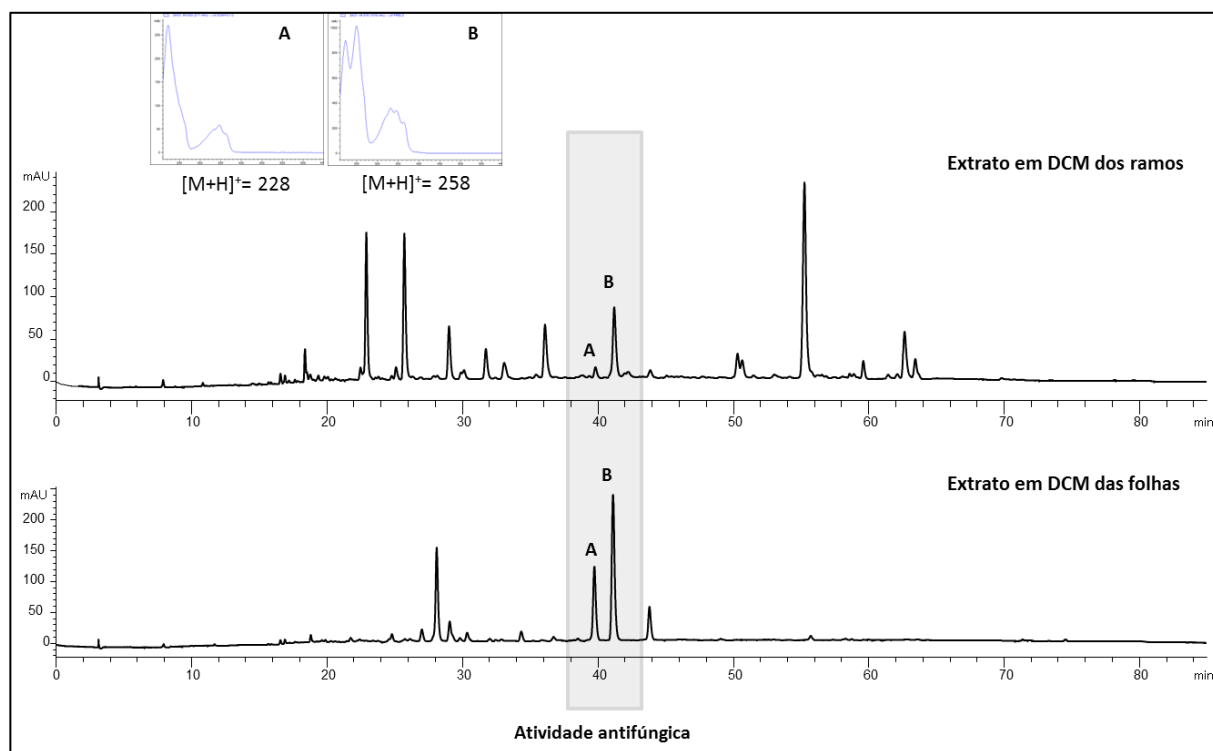


Os resultados obtidos até agora são importantes no que diz respeito à identificação e/ou isolamento de compostos que possuem atividade antifúngica.

5.7. Análise por HPLC-DAD-ESI-MS

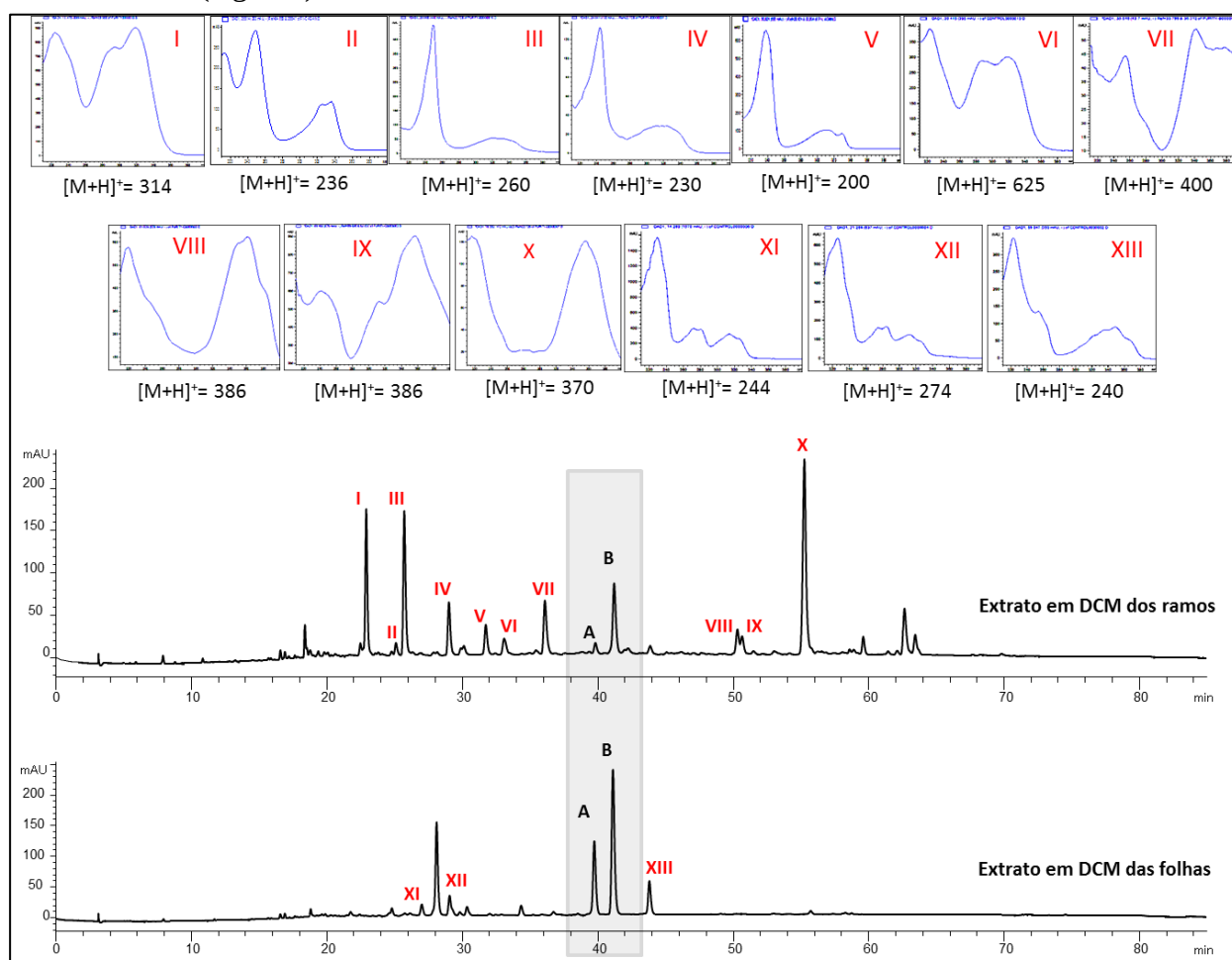
Com o intuito de identificar os constituintes químicos com atividade antifúngica presentes no extrato em DCM de ramos e folhas, foi realizada a análise através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS, técnica hifenada que conta com interface electrospray (ESI) como fonte ionizadora e analisador de massas ion-trap. Os experimentos foram realizados nos modos positivo e negativo, porém obteve-se melhor ionização no modo positivo. Os resultados desta análise estão ilustrados a seguir na **Figura 35**, onde é possível observar o perfil cromatográfico da fração analisada, os espectros de UV e os valores de m/z dos constituintes químicos detectados nas regiões onde foi localizada atividade antifúngica.

Figura 35 – Análise dos extratos em DCM de ramos e folhas pela técnica HPLC-DAD-ESI-MS. Perfil cromatográfico dos extratos em DCM, espectros de UV e valores de m/z dos constituintes químicos detectados nas regiões onde foi localizada atividade antifúngica. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm i.d, 5 μ m), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo= 1 mL/min, λ = 254 nm.



A análise dos resultados obtidos permitiu não somente obter dados referentes aos componentes responsáveis pela atividade antifúngica, como também resultou na constatação da alta complexidade das amostras analisadas, principalmente no extrato em DCM dos ramos, conclusão essa obtida pela observação da diversidade de bandas de UV e m/z dos constituintes detectados (**Figura 36**).

Figura 36 – Análise dos extratos em DCM de ramos e folhas através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS. Perfil cromatográfico dos extratos em DCM, espectros de UV e valores de m/z dos constituintes químicos detectados. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm i.d, 5 μ m), equipamento HPLC-DAD (Agilent), fluxo= 1 mL/min, λ = 254 nm.



A partir dos dados gerados foi possível a comparação destes com aqueles presentes na literatura para a espécie *Conchocarpus fontanesianus*, na tentativa de identificar os compostos presentes nos extratos em DCM de ramos e folhas previamente isolados.

Pode-se observar que os compostos III, IV e V apresentam banda de UV com formato similar, mas com diferentes m/z . Pressupõe-se que a diferença de 30 Da entre os compostos V e IV refere-se à presença de um grupo metoxila a mais na estrutura IV, e a diferença de 30 Da

entre os compostos IV e III indicam a presença de outro grupo metoxila a mais na estrutura III. O padrão do espectro UV, o valor de λ_{max} na região de 245 nm pra estes três adutos e os valores de m/z , 260 ($[M+H]^+$) para composto III, 230 ($[M+H]^+$) para composto IV e 200 ($[M+H]^+$) para composto V no modo positivo, dão indícios da presença dos alcaloides furoquinolínicos esquimianina, γ -fagarina e dictaminina respectivamente. O composto II apresenta valor de m/z 236 ($[M+H]^+$) e espectro de UV com λ_{max} em 248, 213 e 336 nm característico de alcaloides quinolônicos, e com base nessas informações é possível sugerir que se trata do alcaloide 2-fenil-1-metil-4-quinolona. Todos estes metabólitos foram previamente isolados e identificados na espécie em estudo (Cabral *et al.*, 2011). Para os demais compostos, os dados obtidos foram insuficientes para sugerir suas identificações.

A fim de se obter dados mais precisos acerca dos adutos detectados, foi utilizado equipamento de espectrometria de massas que gera dados em alta resolução. A partir destas análises foi possível gerar informações precisas das massas e fórmulas moleculares dos constituintes químicos presentes nos extratos DCM.

5.8. Análise do Perfil Metabólico por UPLC-TOF (High Resolution Mass Spectrometry)

Com a finalidade de obter informações mais precisas acerca do perfil metabólico dos extratos e seus constituintes, optou-se pela utilização da técnica Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) acoplada a espectrometria de massas, dotada de interface eletrospray (ESI) e analisador Time of Flight (TOF).

As amostras dos extratos foram então analisadas e os Cromatogramas de Íons Totais (modo Base Peak Intensity – BIP) estão ilustrados nas figuras abaixo. A metodologia de análise utilizada para o perfil metabólico é padrão, e esta descrita na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Condição cromatográfica aplicada para obtenção dos perfis metabólicos dos extratos de *C. fontanesianus* através da técnica UPLC-TOF.

	Gradiente	
	Tempo (min)	%B
Solvente A - H ₂ O + 0,1% FA		
Solvente B - ACN + 0,1% FA	0	5
Fluxo = 0,46 mL/min	30	95
Inj. Volume = 2 μ L	40	95
[] amostra = 1 mg/mL	40,2	5
	50	5

Figura 37 – Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB dos ramos do material vegetal coletado na E.E.Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.

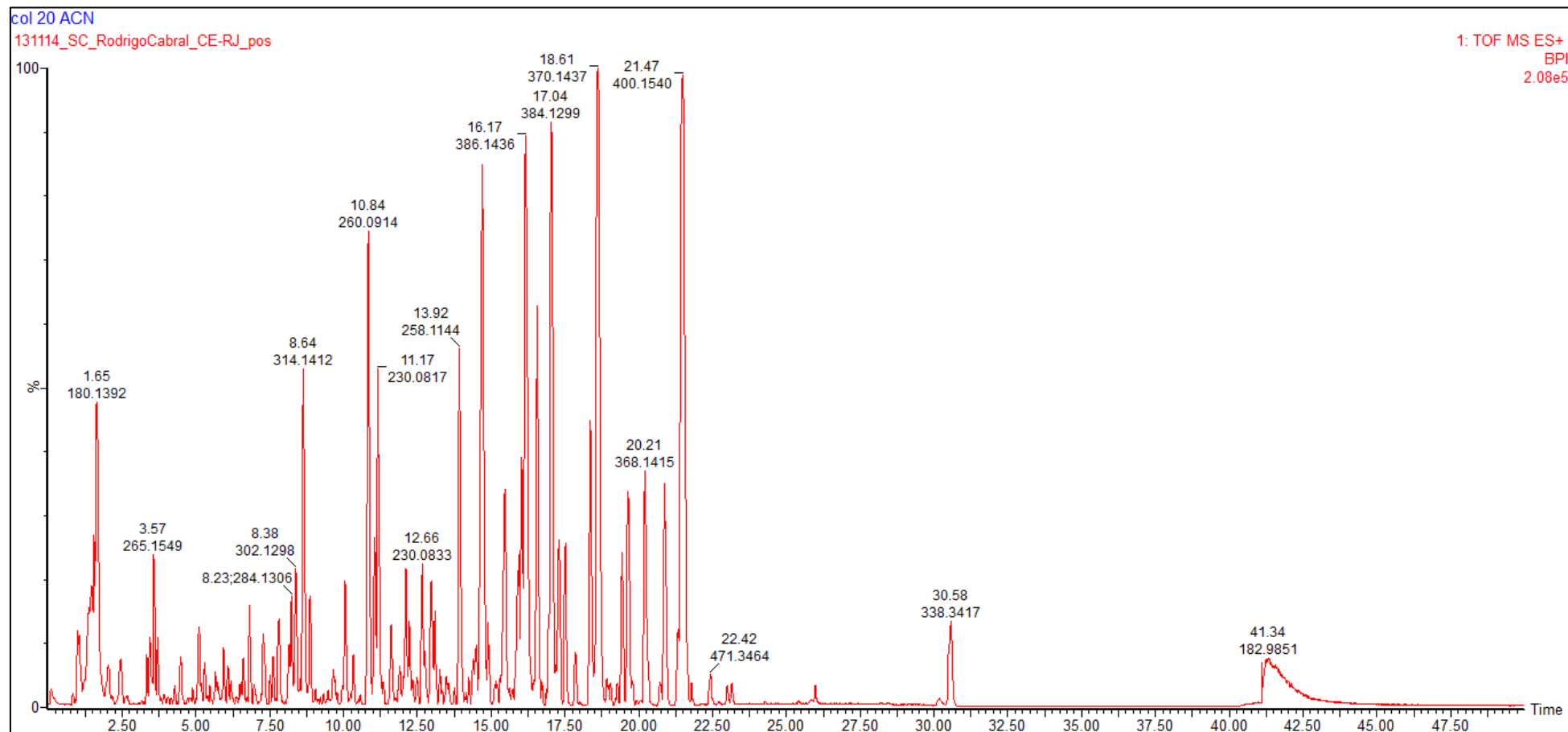


Figura 38 –Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB das folhas do material vegetal coletado na E.E.Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.

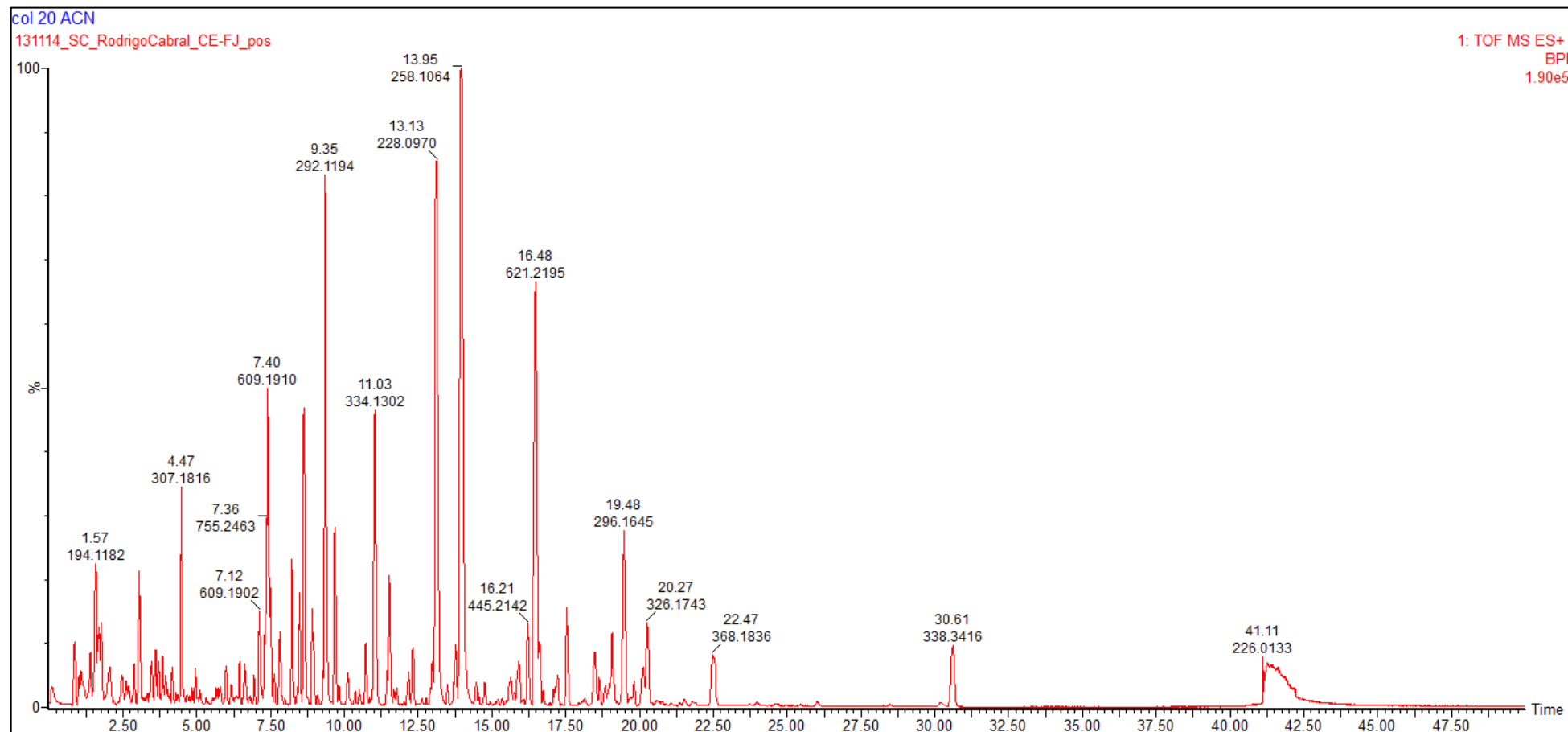


Figura 39 – Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB dos ramos do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.

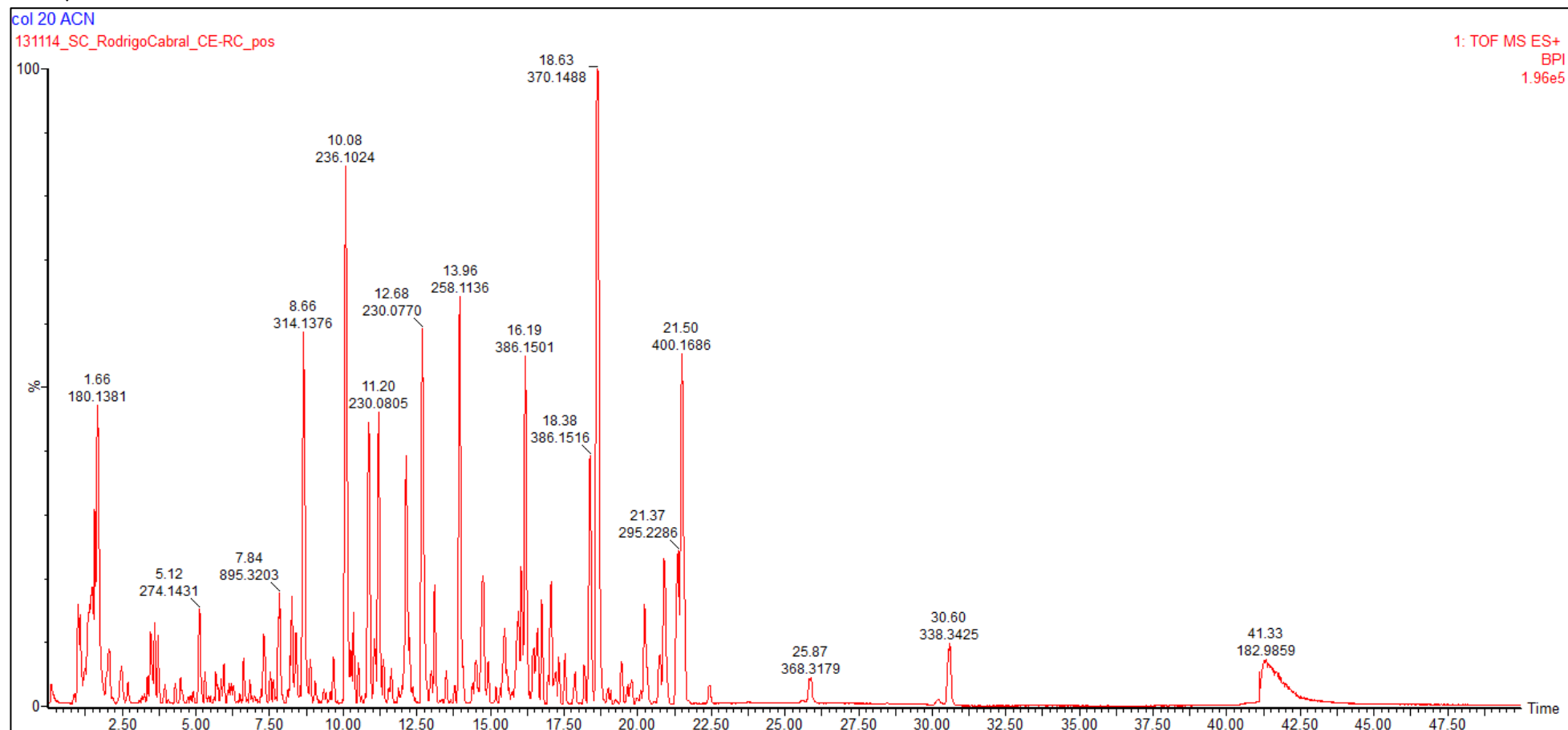
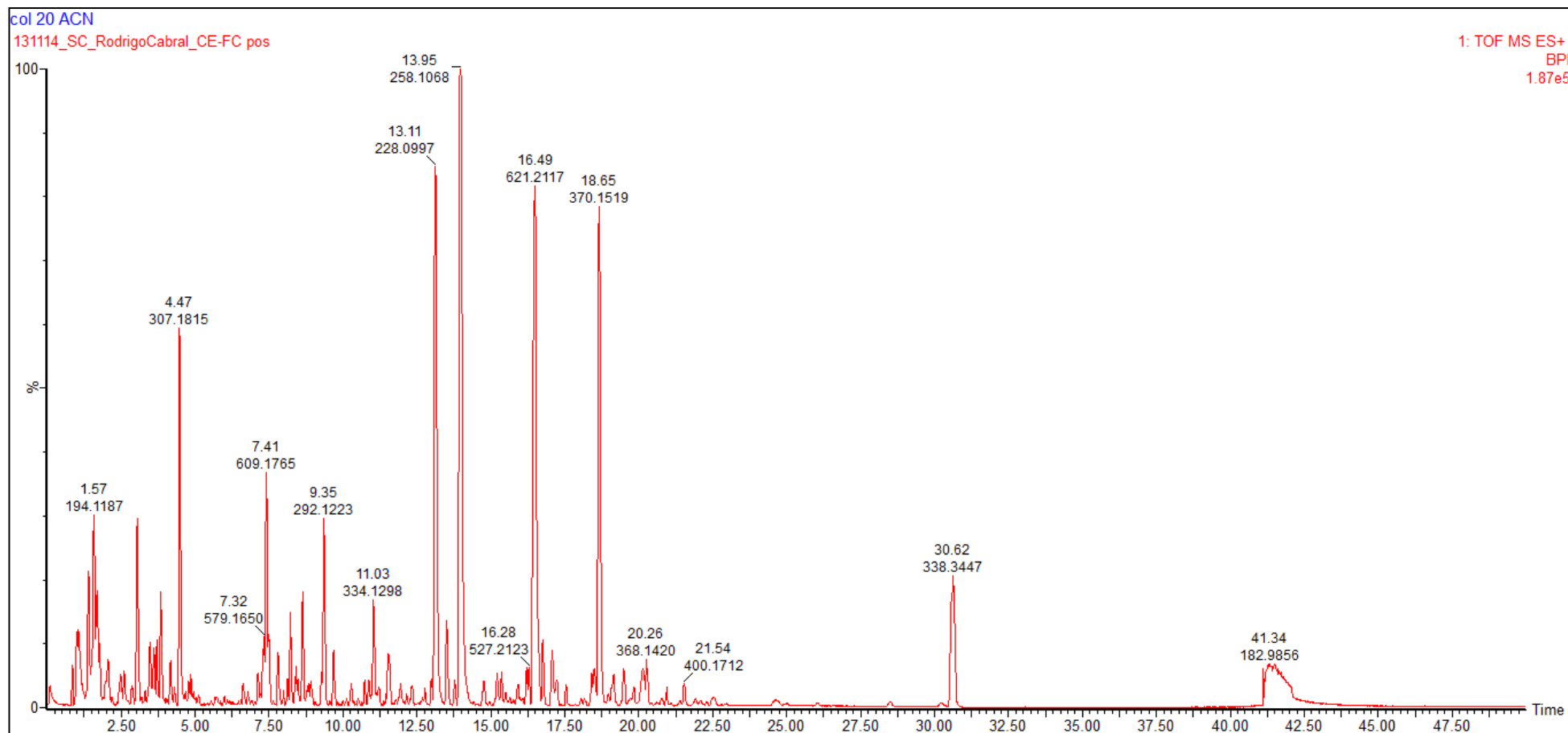


Figura 40 – Perfil metabólico obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB das folhas do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.



O UPLC permite trabalhar com elevadas pressões, utilizando partículas de fase estacionárias $\leq 2,0 \mu\text{m}$, menor tempo de análise e baixo consumo de solventes, possibilitando obter uma melhor eficiência e resolução cromatográfica entre as bandas quando comparado com a técnica comumente utilizada, HPLC. Esta plataforma possibilita também a obtenção tanto do perfil metabólico de alta resolução como um rápido “*Fingerprinting*” de extratos vegetais (Eugster *et al.*, 2011; Guillaume *et al.*, 2009; Wolfender *et al.*, 2010; Zhua *et al.*, 2010). O analisador de massas por tempo de voo (TOF) possui alta resolução, que está diretamente relacionado com o comprimento da trajetória de voo. Os íons são separados de acordo com seu tempo de chegada ao detector (os de menor massa chegam antes), e existem instrumentos lineares e não lineares (maior trajetória do íon). A Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) realiza medições precisas de m/z , com capacidade de gerar a fórmula molecular, além de permitir a diferenciação de íons moleculares com a mesma m/z nominais em espectros de baixa resolução (Jarmusch & Cooks, 2014; Ernst *et al.*, 2014).

Os dados obtidos durante a análise dos extratos etanólicos brutos (EBBs) confirmam a grande semelhança e complexidade entre os perfis químicos de ambos os locais de coleta. Abaixo são comparados os resultados entre os EEBs para evidenciar a semelhança entre as amostras analisadas.

Figura 41 – Comparação dos perfis químicos através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB dos ramos.

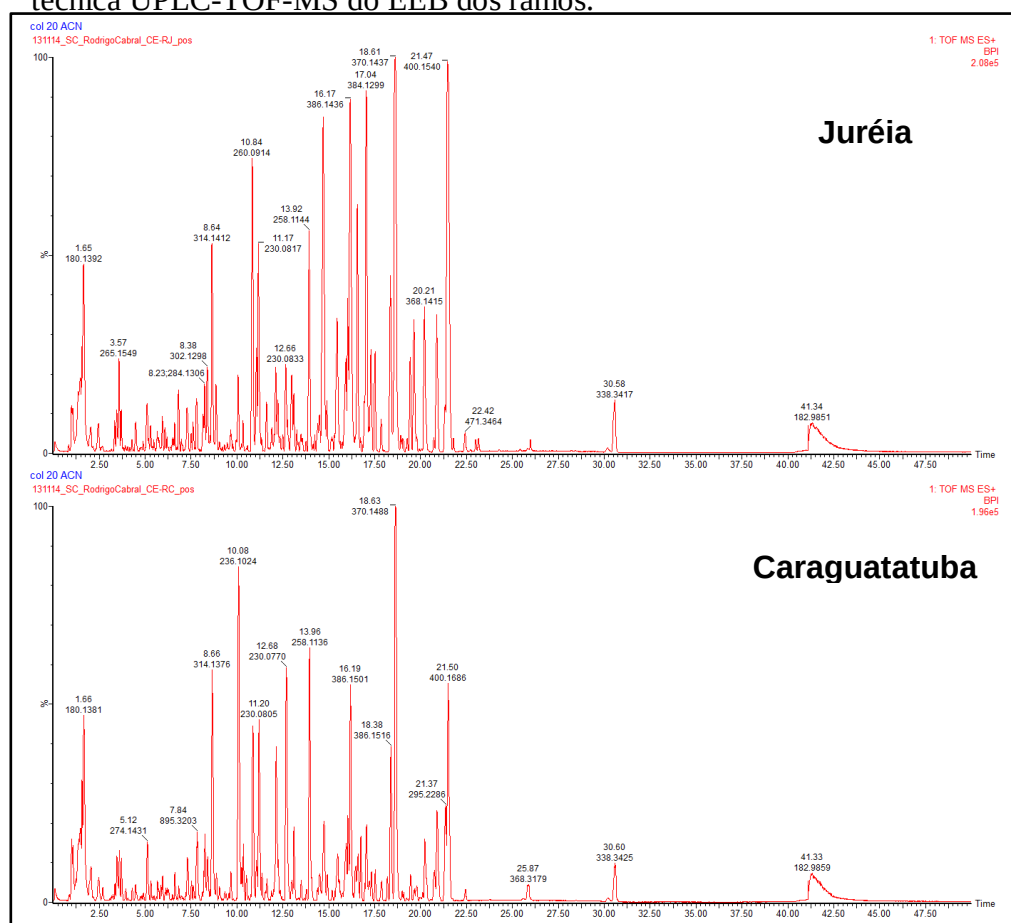
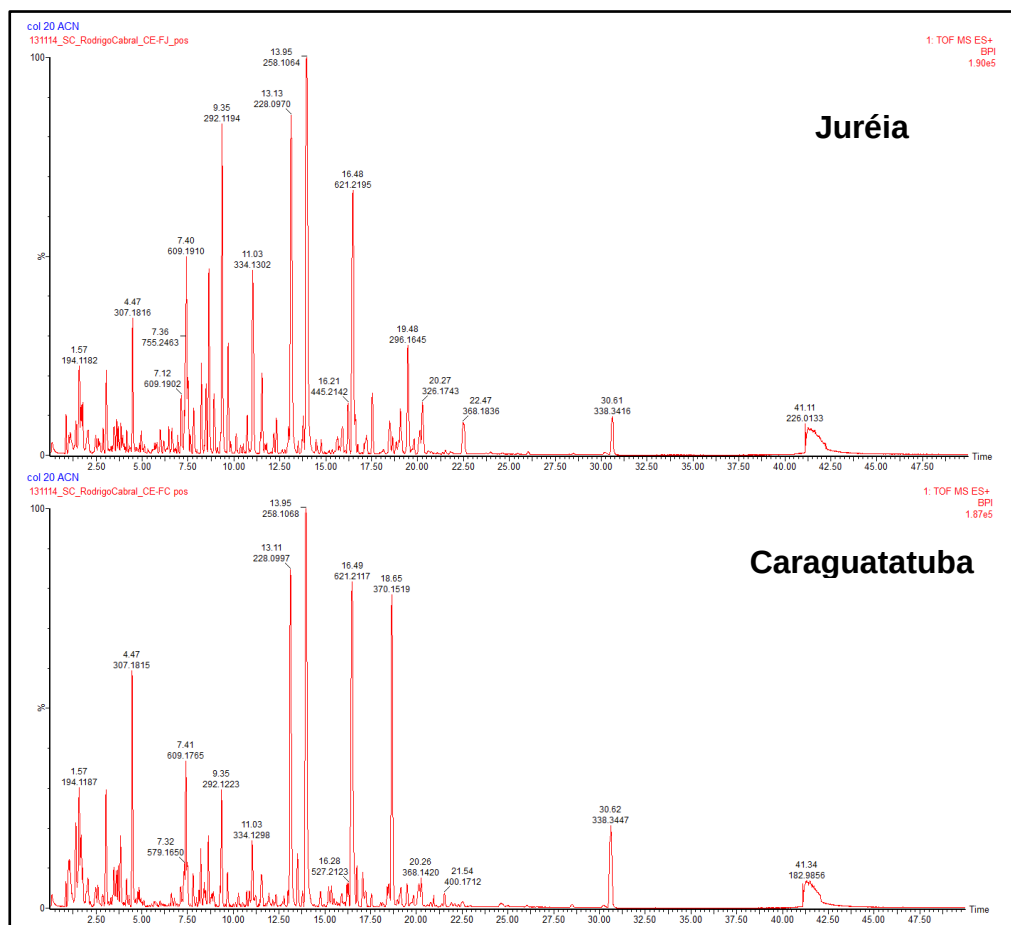


Figura 42 – Comparação dos perfis metabólicos através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do EEB das folhas.



A análise do perfil metabólico em UPLC-TOF foi realizada com os extratos etanólicos brutos (EEBs) e os extratos HEX, DCM e AcOEt para obter e comparar os perfis, porém somente o perfil do extrato DCM será apresentado a seguir. Com estes resultados é possível utilizar a técnica de desreplicação para encontrar e identificar nos extratos em DCM de Caraguatatuba os mesmos biomarcadores presentes e identificados nos extratos em DCM da Juréia, assim como compostos já identificados no gênero *Conchocarpus* e na espécie em estudo.

Figura 43 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM dos ramos, coletados na E.E Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.

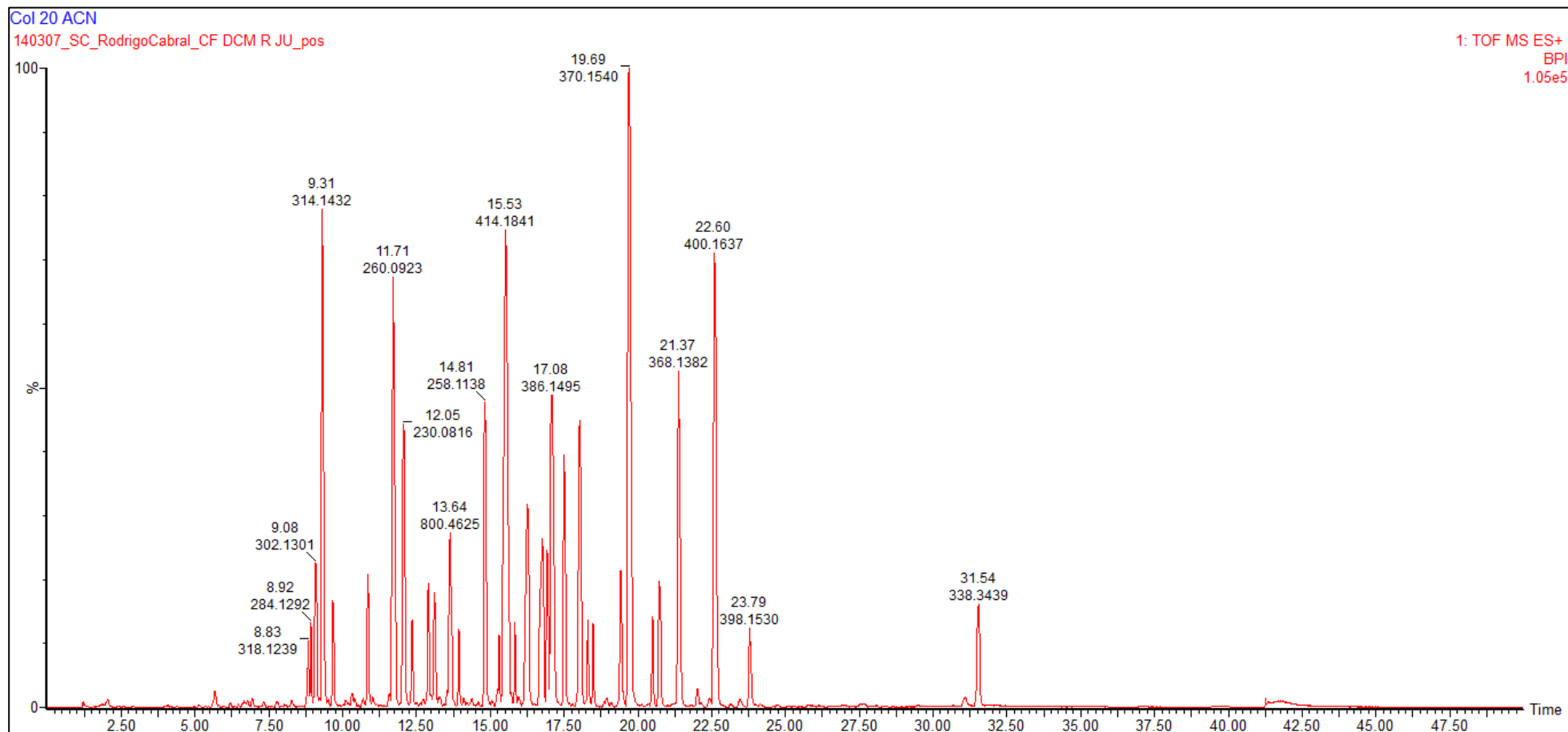


Figura 44 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM dos ramos, coletados no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.

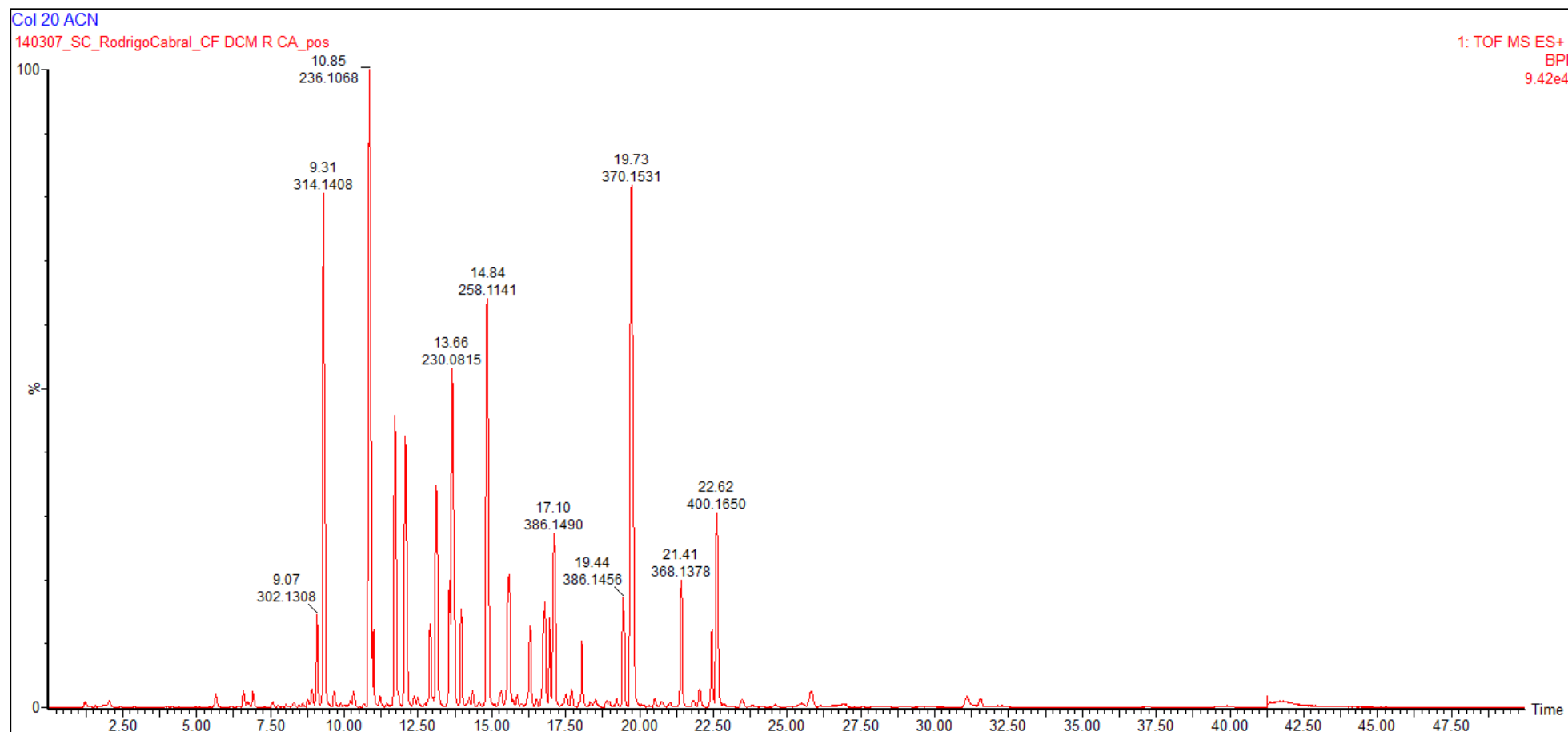


Figura 45 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM das folhas, coletadas na E.E Jureia-Itatins. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460 μ L/min.

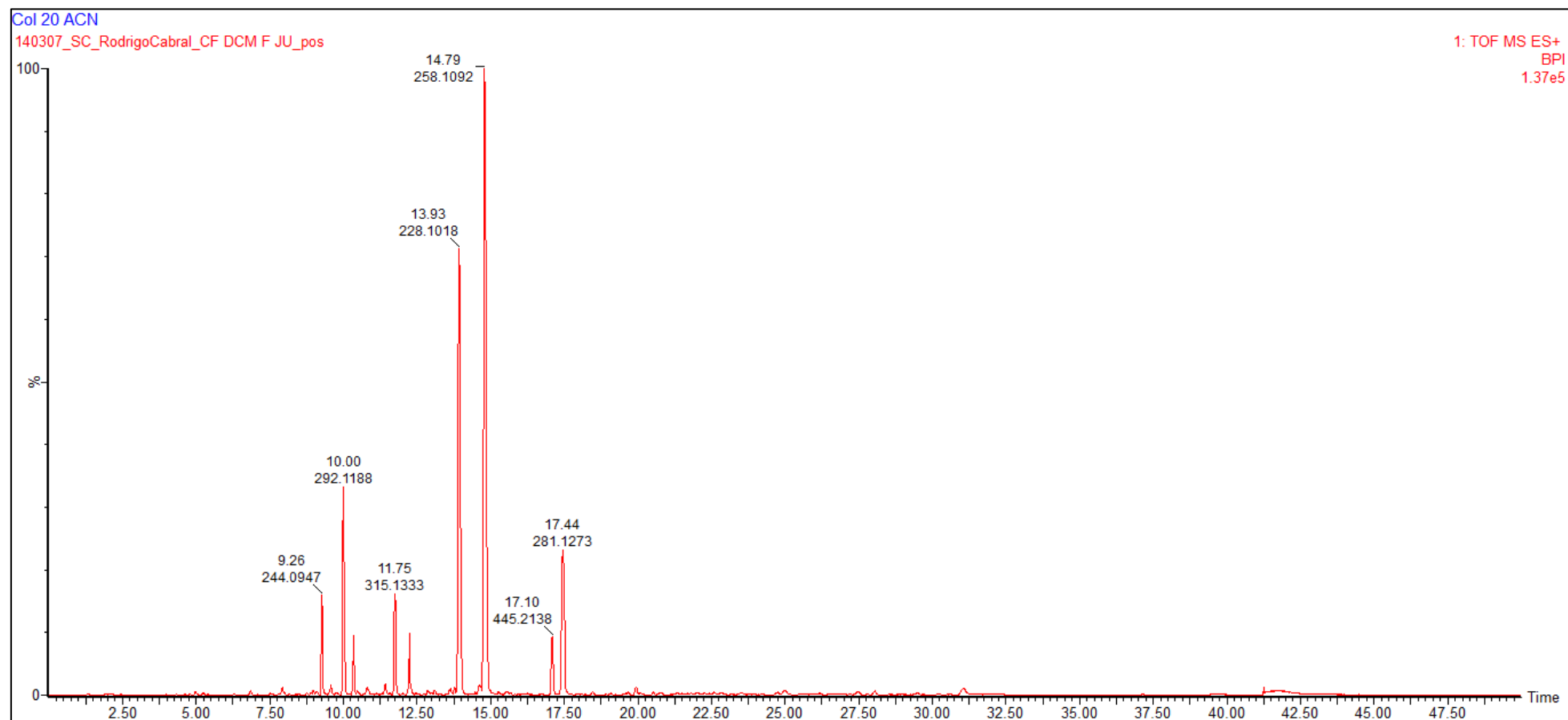
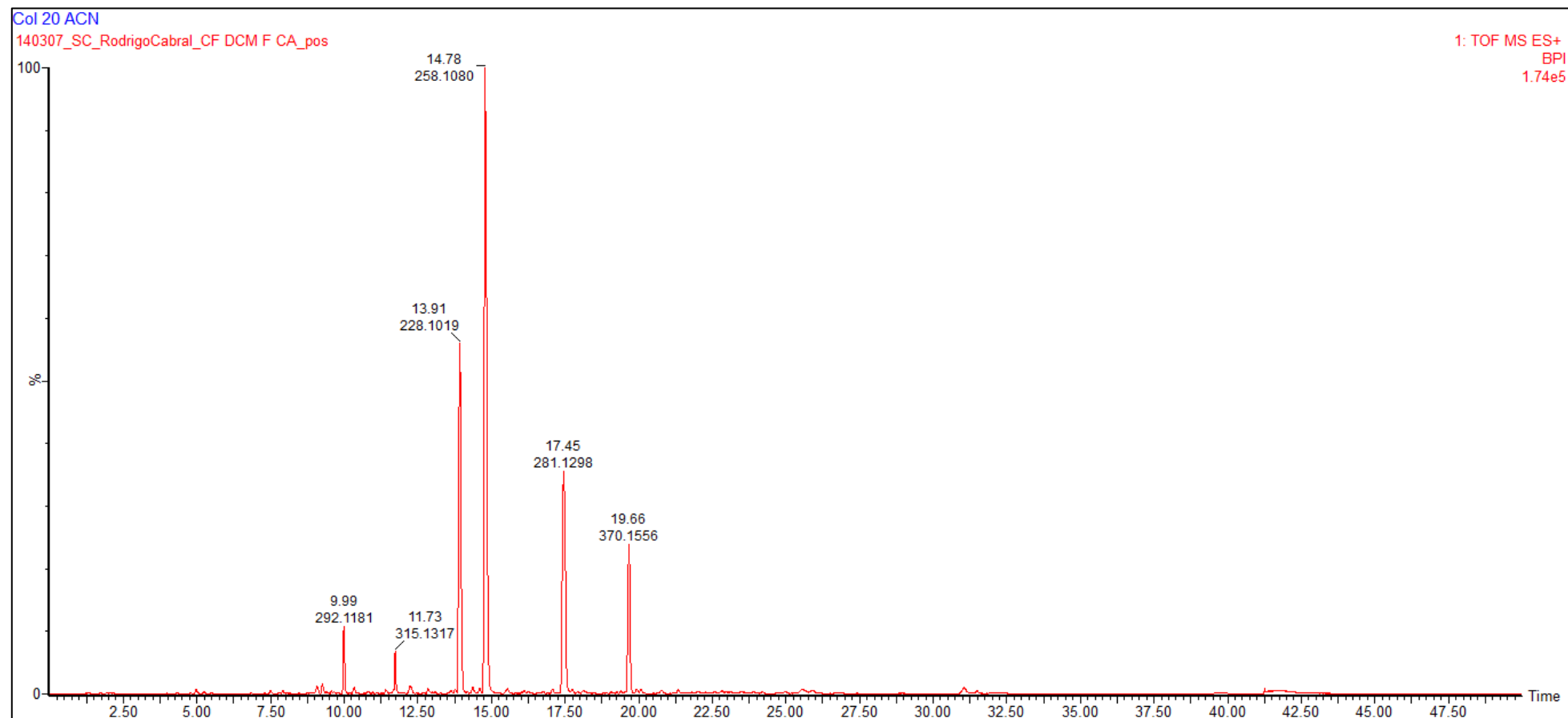


Figura 46 – Resultado obtido através da análise pela técnica UPLC-TOF-MS do extrato DCM das folhas, coletadas no Núcleo Caraguatatuba. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-MS (Waters), fluxo 460µL/min.



Os dados obtidos durante a análise dos extratos DCM de ramos e folhas da Jureia pela técnica UPLC-TOF-MS foram comparados com aqueles presentes na literatura para as substâncias já descritas na espécie *C. fontanesianus* e na família Rutaceae. A partir de tal procedimento pode-se identificar nos ramos a presença de diversos adutos, inicialmente no tempo de retenção 10,8 min no modo positivo ($[M+H]^+$), m/z 236,1069), como sendo o alcaloide 2-fenil-1-metil-4-quinolona. Outro aduto no tempo de retenção 11,7 min no modo positivo ($[M+H]^+$), m/z 260,0920), como sendo alcaloide esquimianina; também no modo positivo e no tempo de retenção 12,05 min ($[M+H]^+$), m/z 230, 0816), o alcaloide γ -fagarina; e no tempo de retenção 13,1 min no modo positivo ($[M+H]^+$), m/z 200,0712), o alcaloide dictaminina. Estes metabólitos são descritos como biomarcadores da família Rutaceae e foram previamente identificados na espécie *C. fontanesianus* (Biavatti, *et al.*, 2002; Wattanapiromsakul *et al.*, 2003; Ambrozin *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006; Ambrozin *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2011). Os resultados que levaram a identificação dos compostos detectados estão ilustrados na **Tabela 11 (Figura 47)**.

Figura 47 – Ilustração das estruturas químicas dos alcaloides 2-fenil-1-metil-4-quinolona (1), esquimianina (2), γ -fagarina (3) e dictaminina (4), metabólitos detectados no extrato DCM dos ramos de *C. fontanesinaus* através da técnica UPLC-TOF-MS.

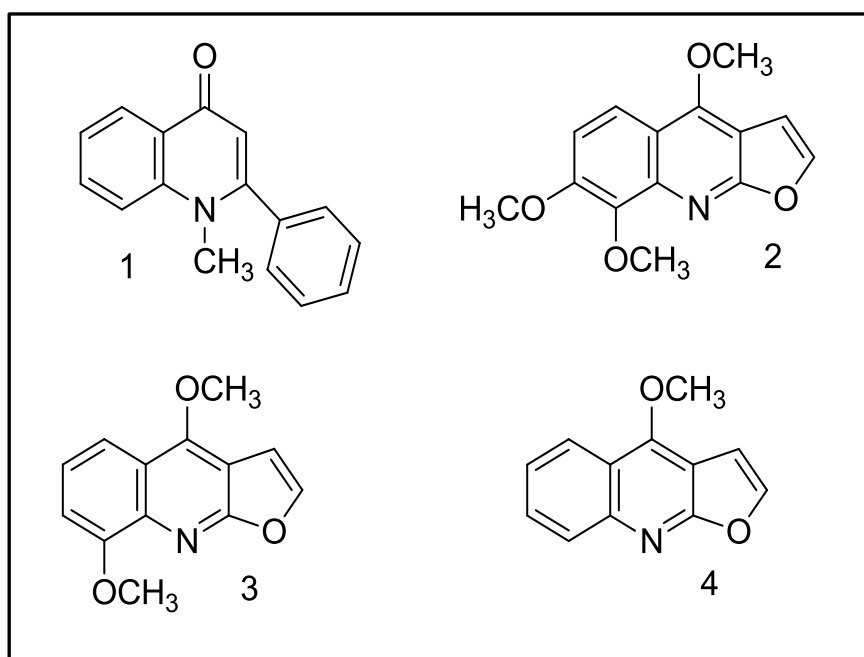


Tabela 11 – Dados obtidos na detecção dos alcaloides presentes no extrato DCM dos ramos (Jureia) de *C. fontanesianus* através da técnica UPLC-TOF-MS.

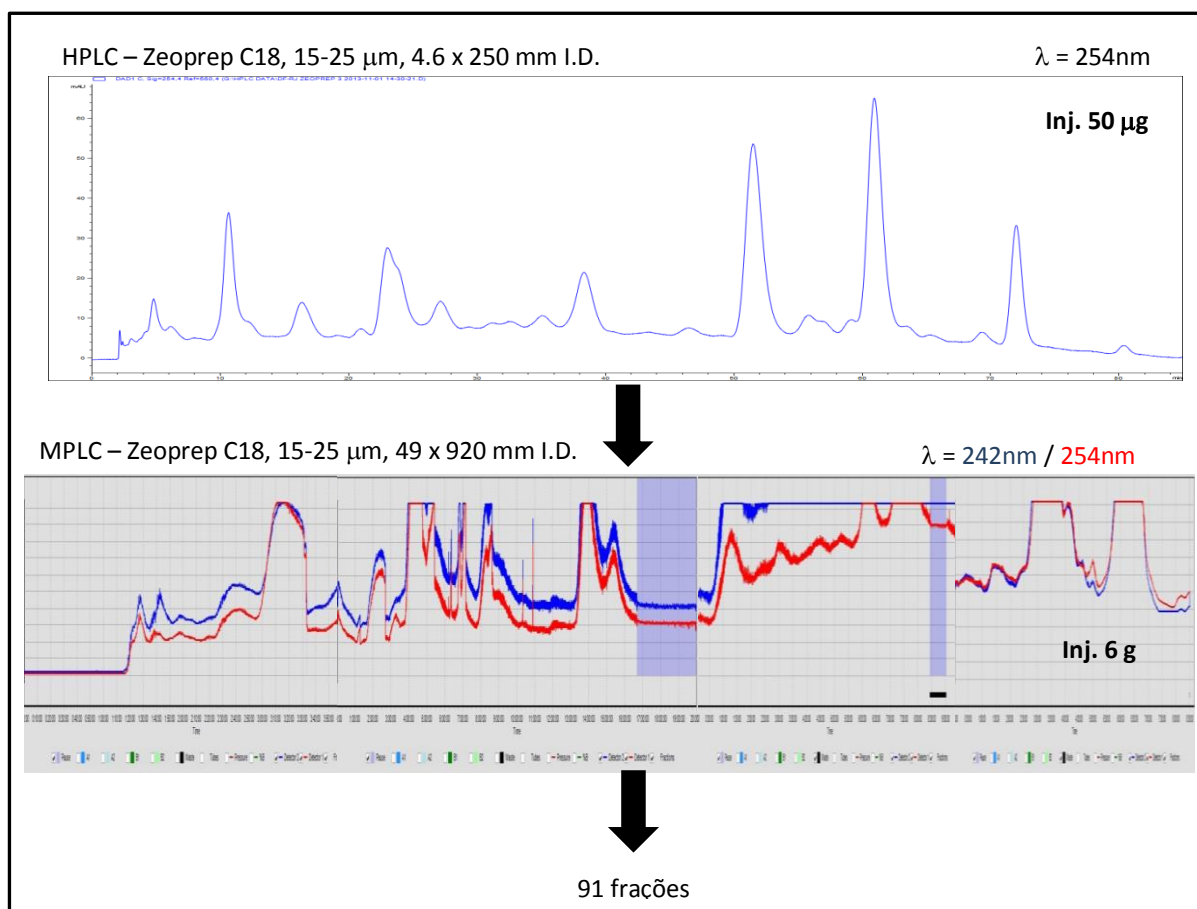
Composto	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	Modo de ionização	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórico	Desvio (ppm)
2-fenil-1-metil-4-quinolona	10,8	C ₁₆ H ₁₃ NO	ESI+ ([M+H] ⁺)	236,1069	236,1075	-2,5
Esquimianina	11,7	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	ESI+ ([M+H] ⁺)	260,0920	260,0923	-1,2
γ-fagarina	12,05	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	ESI+ ([M+H] ⁺)	230,0816	230,0817	-0,4
Dictaminina	13,1	C ₁₂ H ₉ NO ₂	ESI+ ([M+H] ⁺)	200,0712	200,0711	0,4

Através dos resultados obtidos não foi possível identificar os demais compostos presentes no extrato DCM dos ramos e folhas (Jureia) de *C. fontanesianus*. Com o objetivo de identificar os demais constituintes foi planejado o isolamento utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de média pressão (MPLC) do extrato em DCM dos ramos dos indivíduos coletados na E.E.Jureia-Itatins. O extrato em DCM dos ramos (Jureia) foi selecionado por possuir maior complexidade química, e porque o curto tempo de trabalho permite somente a purificação/isolamento de um único extrato.

5.9. Purificação do extrato em DCM por MPLC-UV

Com a finalidade de ampliar o conhecimento acerca dos constituintes produzidos e acumulados no metabolismo secundário de *C. fontanesianus*, e também isolar os constituintes presentes no perfil cromatográfico onde há atividade antifúngica, 6 g do extrato em DCM dos ramos do material vegetal coletado no Núcleo Arpoador da EEJI foram submetidos à separação cromatográfica em larga escala através da técnica MPLC-UV. As condições de separação analítica obtida através da técnica de HPLC-DAD foram transferidas para cromatografia preparativa MPLC-UV como apresentado na **Figura 48** a seguir (Challal *et al.*, 2015). A separação foi realizada com fase móvel composta por água e metanol nas bombas A e B respectivamente, ambas contendo 0,1% de AF. Através deste procedimento foram obtidas 91 frações.

Figura 48 – Ilustração da transposição das análises de HPLC do extrato DCM analítico para MPLC preparativo.



Para a determinação da composição química das frações obtidas, estas foram analisadas por HPLC-DAD e HPLC-DAD-MS. O resultado destas análises demonstrou que dentre as 91 frações, 3 apresentavam compostos puros. As frações **Fr 8** (7,3 mg), **Fr 20** (57,7 mg) e a **Fr 68** (43,8 mg). Estas frações foram analisadas pelas técnicas de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais (NMR 1 e 2D), o que resultou na completa caracterização dos compostos.

5.10. Elucidação estrutural dos compostos isolados do extrato em DCM-RJ diretamente do fracionamento por MPLC-UV

Fração 8

O composto presente na Fração 8 (7,3 mg), apresentou-se sólido amorfo, incolor e solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF no modo positivo ($[M+H]^+$) para esta fração

apresentou pico em m/z 348,1093, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{17}NO_7$ ($\Delta ppm = 2,9$) (**Figura 49**).

Os espectros de NMR de 1H e ^{13}C (**Tabela 12**) apresentam sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise por HRMS. Esta observação foi obtida com base nos espectros de NMR de ^{13}C , que apresentou 17 sinais. Os sinais nas análises de NMR de ^{13}C em campos baixos a δ_C (ppm) 170,1 e 169,9 sugerem a presença de dois grupos amida CO, confirmadas através das análises de NMR de 1H que apresentaram sinais na região de hidrogênios aromáticos, com a presença de um anel aromático tetrasubstituído em 1,3,4,5, com δ_H (ppm) 7,33 (s, H-2') e 7,33 (s; H-6'). Estes dois átomos de hidrogênio mostraram possuir correlação com o grupo amida CO em δ_C (ppm) 169,9 (C-7') através de análise por $gHMBC$. Um segundo anel aromático 1,3,4-trisubstituído pode ser inferido também através da análise de NMR de 1H com δ_H (ppm) 7,55 (m, H-2), 7,55 (m, H-6) e 6,83 (d; $J=8,6$, H-5), com seus hidrogênios em C-2 e C-6 mostrando correlação com um grupo amida CO em δ_C (ppm) 170,1 (C-7) através de análise por $gHMBC$. Os demais sinais obtidos através da análise de NMR de ^{13}C apresentam sinais que sugerem a presença de cinco átomos de carbonos aromáticos ligados a oxigênios, que podem ser observados em δ_C (ppm) 152,8 (C-4), 148,8 (C-3' e C-5'), 148,5 (C-3) e 142,3 (C-4'). Os sinais a δ_C (ppm) 56,7 (C-3' e C-5') e 56,3 (C-3) foram atribuídos a 3 grupos metoxila (MeO). Os átomos de hidrogênios a δ_H (ppm) 3,89 (s) presente nos 3 grupos MeO a δ_C (ppm) 56,7 (2C) e 56,3 mostraram correlação com os átomos de carbono C-3', C-5' e C-3, respectivamente. Provavelmente os átomos de carbonos aromáticos a δ_C (ppm) 152,8 (C-4) e 142,3 (C-4') indicam a presença de grupos hidroxilas ligados. Estas afirmações foram confirmadas através dos experimentos APT, $gCOSY$, $gHMBC$ e $gHSQC$. A comparação destes resultados com os dados da literatura levaram à identificação do composto presente na Fração 8 como sendo a amida polifenólica 4-hidroxi-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzoil)-3,5-dimetoxibenzamida, também conhecida como **dimorfamida C (composto 1)** (**Figura 55**), encontrada pela primeira vez na espécie *Atriplex dimorphostagia* (Karim *et al.*, 2011). Esta é a primeira vez que este tipo de amida polifenólica é descrito em espécies da família Rutaceae.

Figura 49 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração 08, identificado como a amida polifenólica dimorfamida C (**1**).

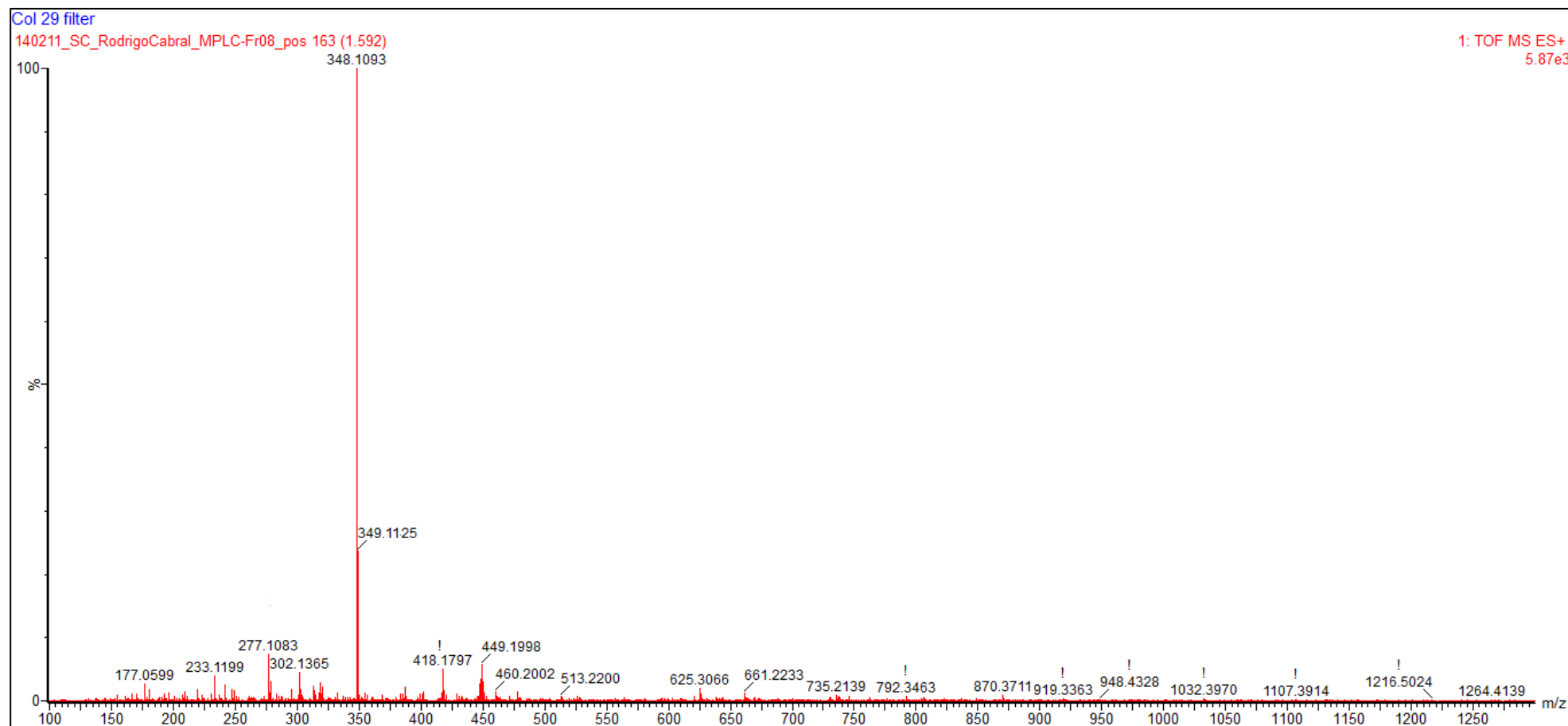


Figura 50 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida polifenólica dimorfamida C (**1**).

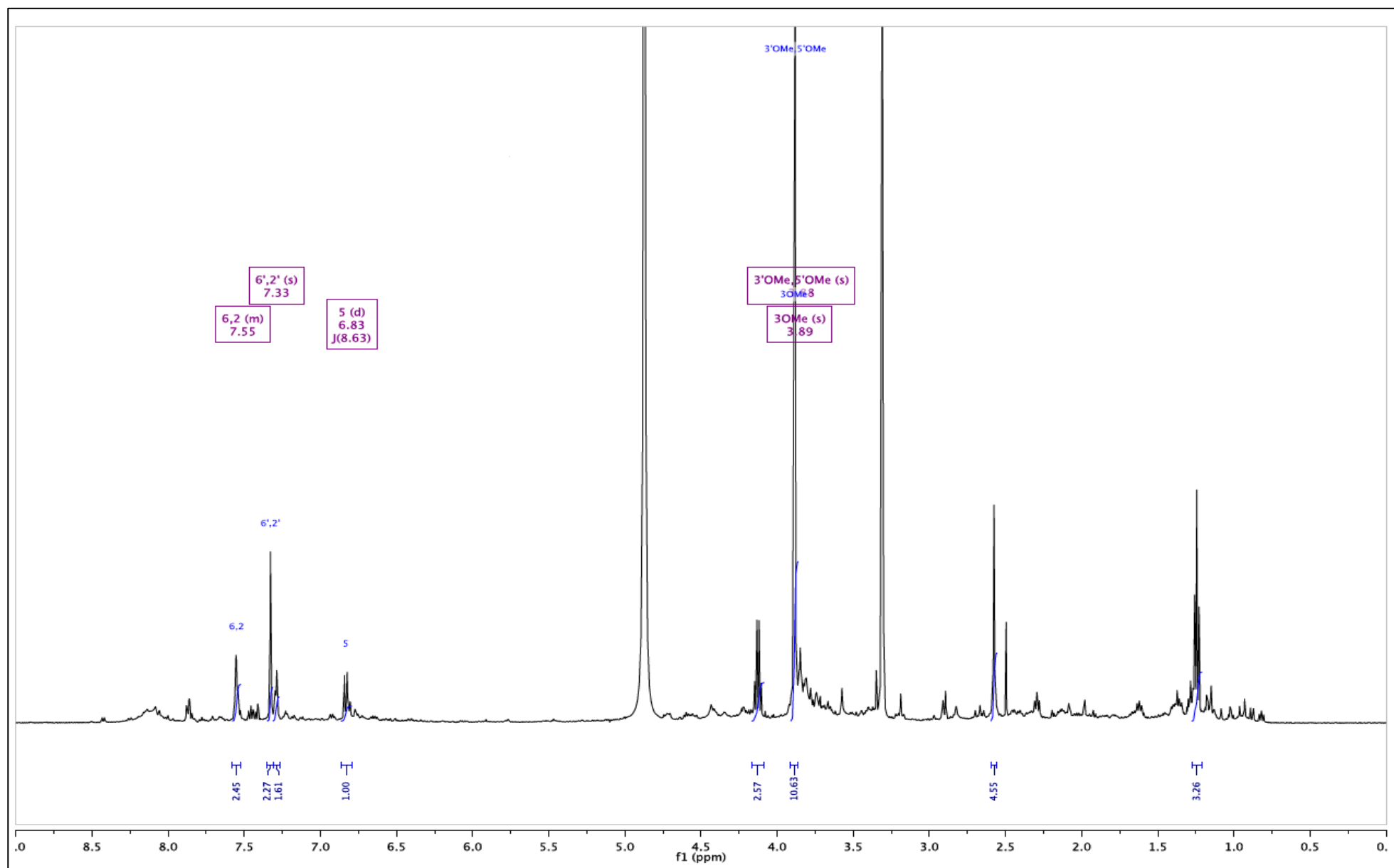


Figura 51 – Mapa de contorno *g*COSY da dimorfamida C (**1**).

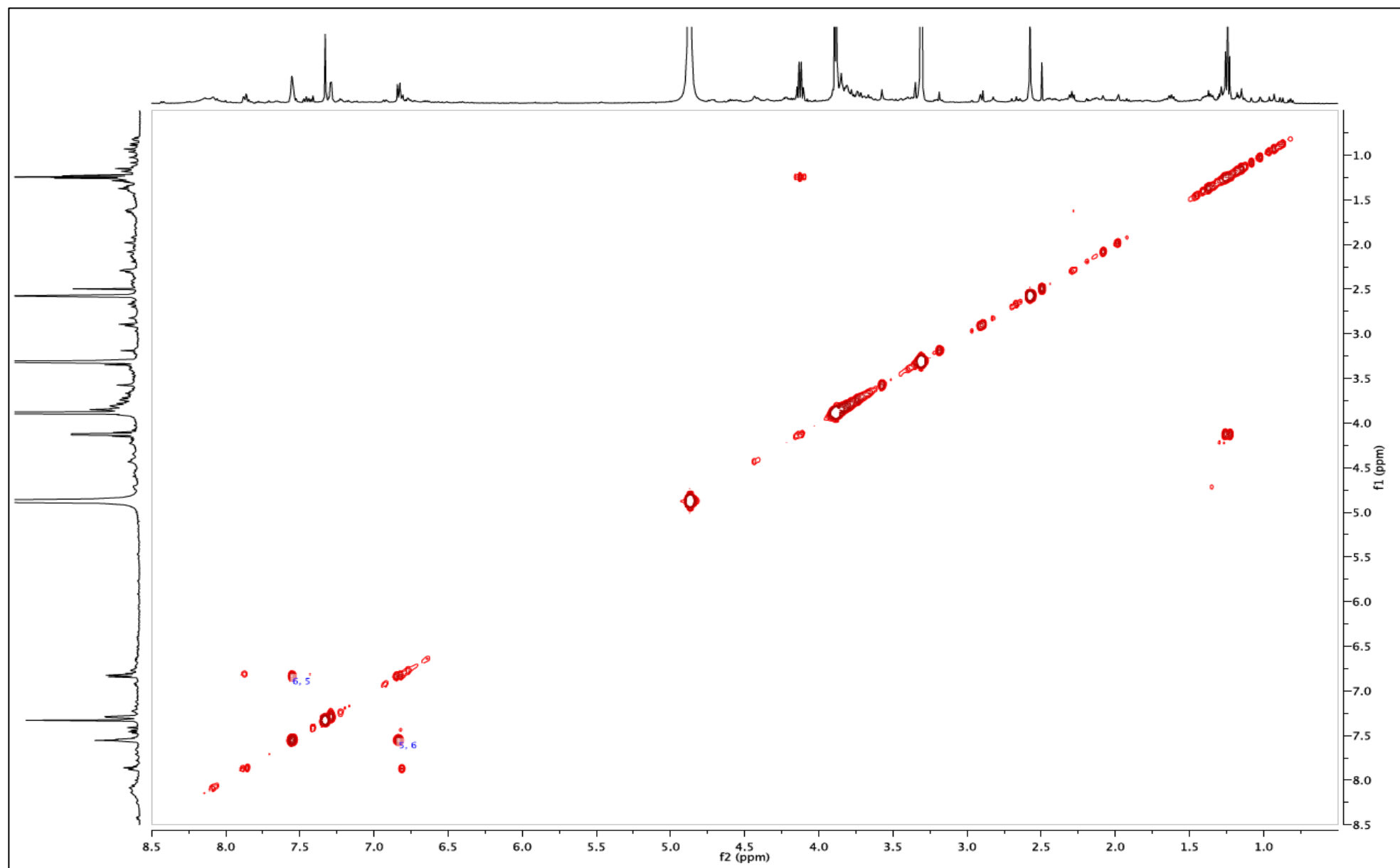


Figura 52 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da dimorfamida C (**1**).

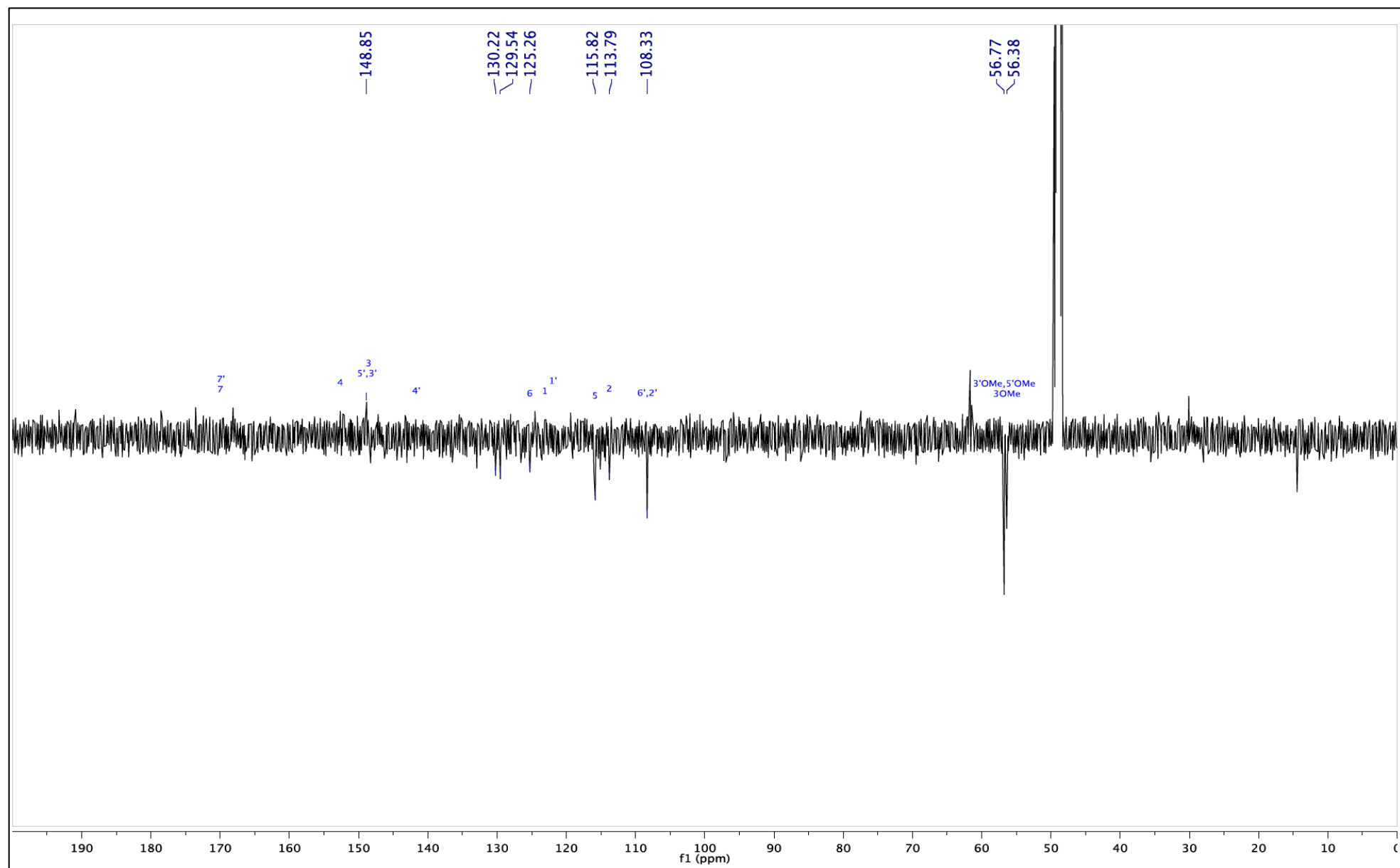


Figura 53 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da dimorfamida C (**1**).

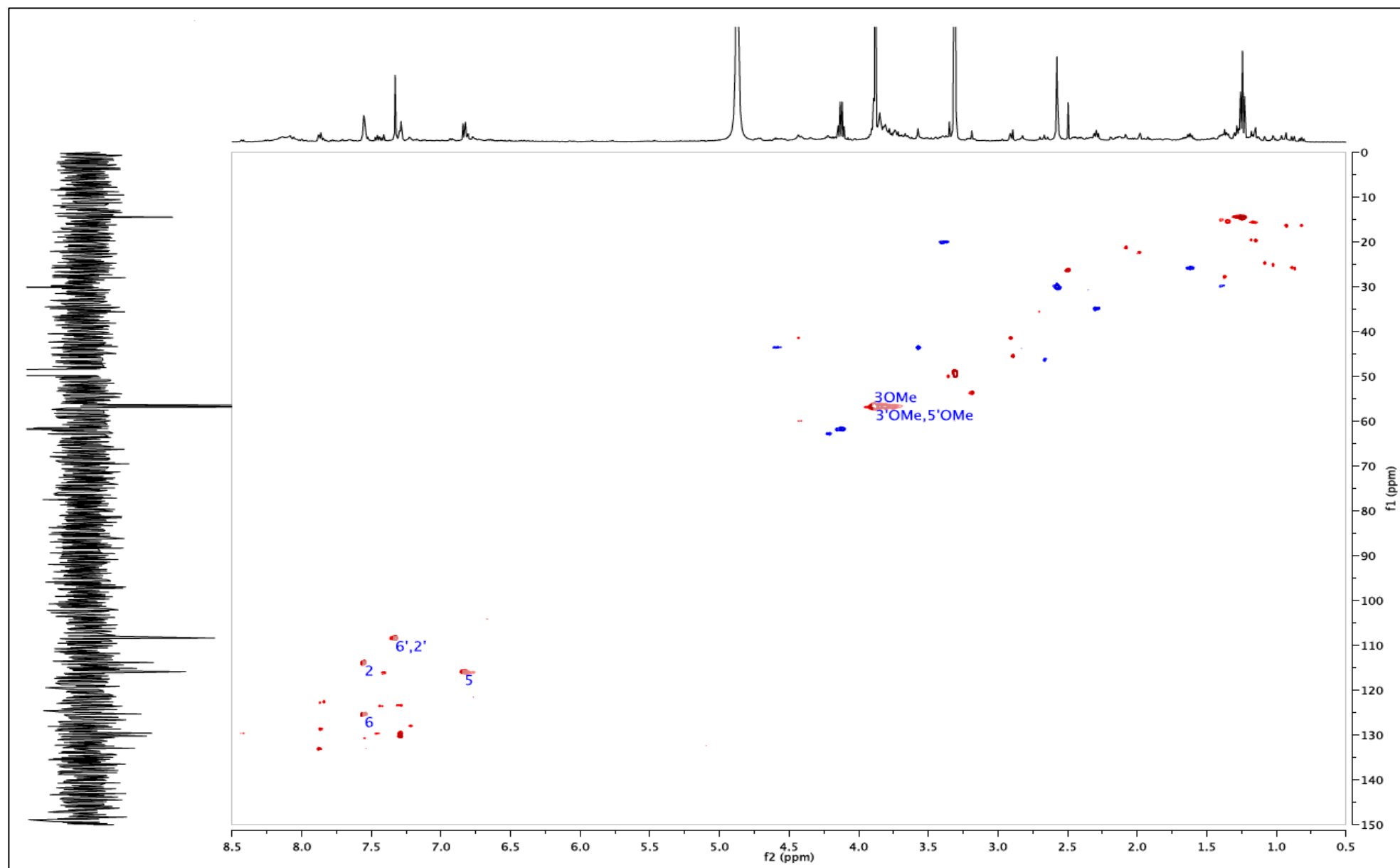


Figura 54 – Mapa de contorno *g*HMBC da dimorfamida C (**1**).

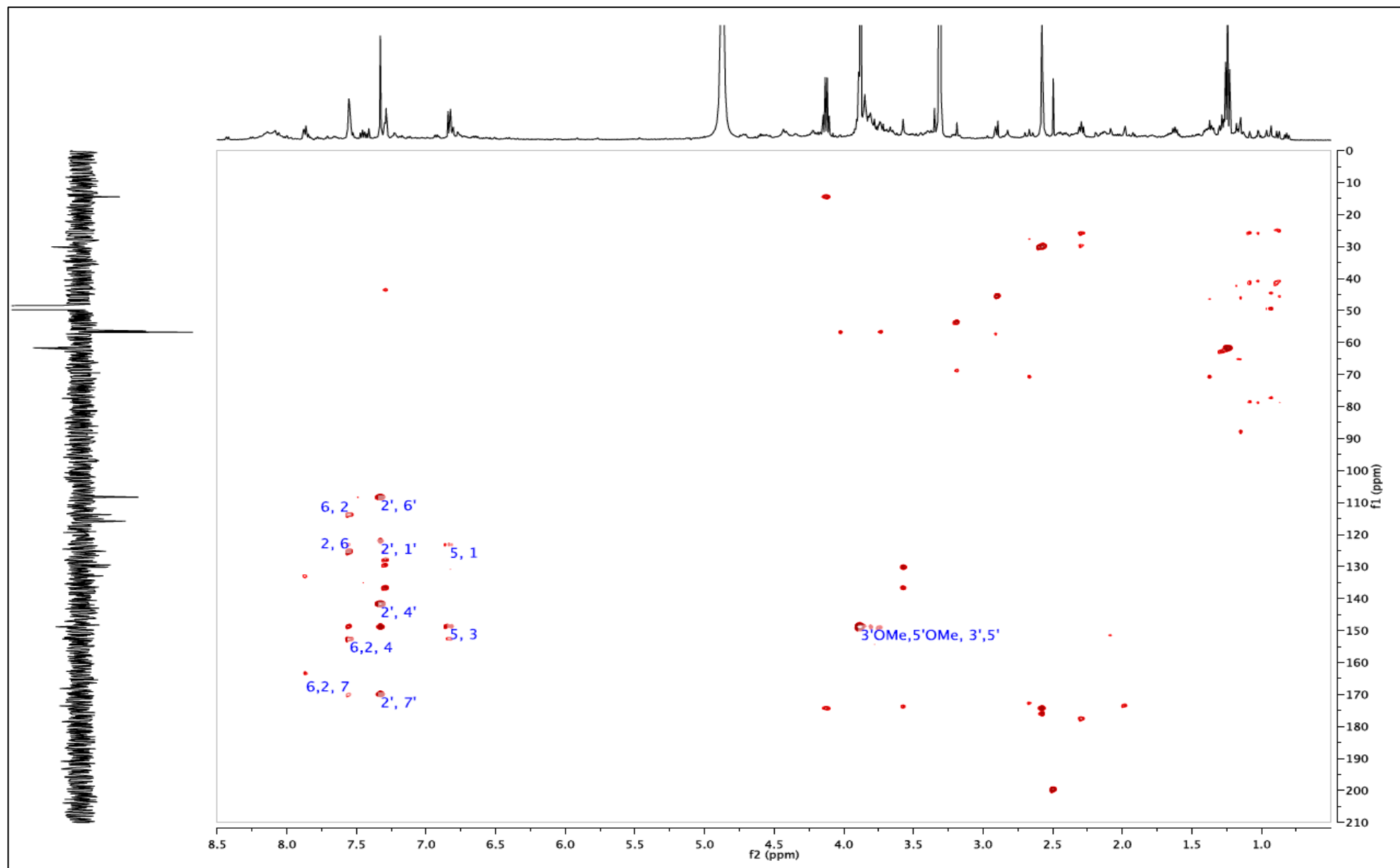


Figura 55 – Estrutura da amida dimorfamida C (1), isolada dos ramos de *C. fontesianus*.

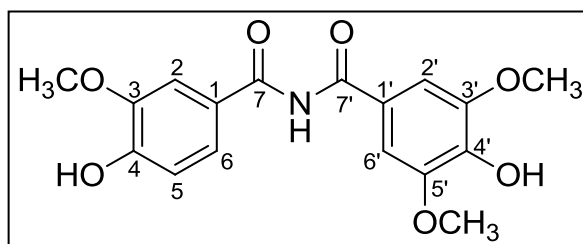


Tabela 12 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a dimorfamida C (1, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 1 (Dimorfamida C)		Literatura ^(*)	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	δ_{C} (ppm)
1	-	125.4	-	123.1
2	7.55 (s)	113.7	7.55 (d; 2.0)	113.8
3	-	148.5	-	148.6
4	-	152.8	-	152.6
5	6.83 (d; 8.6)	115.8	6.81 (d; 8.5)	115.8
6	7.52 (s)	130.2	7.53 (dd; 2.0, 8.5)	125.2
7	-	170.1	-	170.0
1'	-	125.2	-	122.0
2'	7.33 (s)	108.3	7.32 (s)	108.3
3'	-	148.8	-	148.8
4'	-	142.3	-	141.8
5'	-	148.8	-	148.8
6'	7.33 (s)	108.3	7.32 (s)	108.3
7'	-	169.9	-	169.9
MeO-C (3)	3.89 (s)	56.3	3.88 (s)	56.4
MeO-C (3')	3.89 (s)	56.7	3.87 (s)	56.8
MeO-C (5')	3.89 (s)	56.7	3.87 (s)	56.8

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^(*) Karim *et al.*, 2011

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração 20

O composto presente na fração 20 (57,7 mg), apresentou-se como um óleo amarelo solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS) (**Figura 56**). A **Tabela 13** abaixo apresenta os resultados obtidos por NMR.

A análise por UPLC-TOF no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 314,1393 para esta fração, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{19}NO_4$ ($\Delta ppm = 0,3$), consonante com a estrutura da amida *N-trans*-feruloiltiramina (**moupinamida**, **composto 4**) (**Figura 55**). Esta proposição foi confirmada pela comparação dos dados aqui obtidos, com os presentes na literatura (Amaro *et al.*, 2014; Al-Taweel *et al.*, 2012). Esta amida já foi descrita anteriormente em trabalho realizado por Cortez *et al.* (2009) na espécie *Conchocarpus gaudichaudianus* (Cortez *et al.*, 2009).

Figura 55 – Estrutura da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

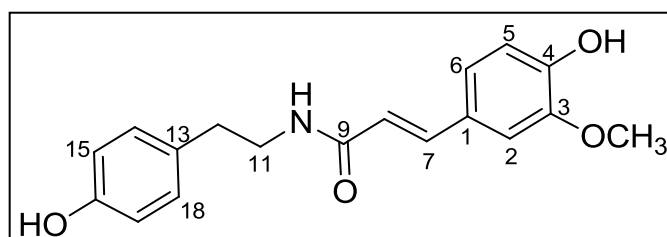


Tabela 13 – Dados de NMR de 1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a moupinamida (**4**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 4 (Moupinamida)		Literatura ^(*)	Literatura ^(**)	
	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_C (ppm)	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_C (ppm)
1	-	128.2	-	-	128.2
2	7.11 (d; 1.9)	111.5	7.10 (d; 2.0)	7.13 (d; 1.2)	111.5
3	-	149.2	-	-	149.3
4	-	149.8	-	-	149.8
5	6.79 (d; 8.2)	116.4	6.79 (d; 8.2)	6.81 (d; 8.5)	116.4
6	7.02 (dd; 8.2, 1.9)	123.2	7.0 (dd; 8.2, 2.0)	7.04 (dd; 8.5, 1.2)	123.2
7	7.43 (d; 15.6)	142.0	7.43 (d; 15.6)	7.44 (d; 15.5)	142.0
8	6.40 (d; 15.6)	118.7	6.40 (d; 15.6)	6.41 (d; 15.5)	118.7
9	-	169.1	-	-	169.2
10 (NH)	8.03 (t; 5.8)	-	-	-	-
11	3.46 (t; 7.3)	42.5	3.46 (dd; 7.2, 6.5)	3.47 (t; 7.5)	42.5
12	2.75 (t; 7.3)	35.8	2.75 (dd; 7.1, 7.5)	2.76 (t; 7.5)	35.8
13	-	131.2	-	-	131.3
14	7.05 (d; 8.4)	130.7	7.05 (d; 6.8)	-	130.7
15	6.72 (d; 8.4)	116.2	6.72 (d; 7.2)	6.73 (d; 8.4)	116.2
16	-	156.9	-	-	156.9
17	6.72 (d; 8.4)	116.2	6.72 (d; 7.2)	6.73 (d; 8.4)	116.2
18	7.05 (d; 8.4)	130.7	7.05 (d; 6.8)	7.07 (d; 8.4)	130.7
MeO-C (3)	3.88 (s)	56.3	-	3.85 (s)	56.4

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Amaro *et al.*, 2014^(*)

Al-Taweel *et al.*, 2012^(**)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Figura 56 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração 20, identificado como a amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**).

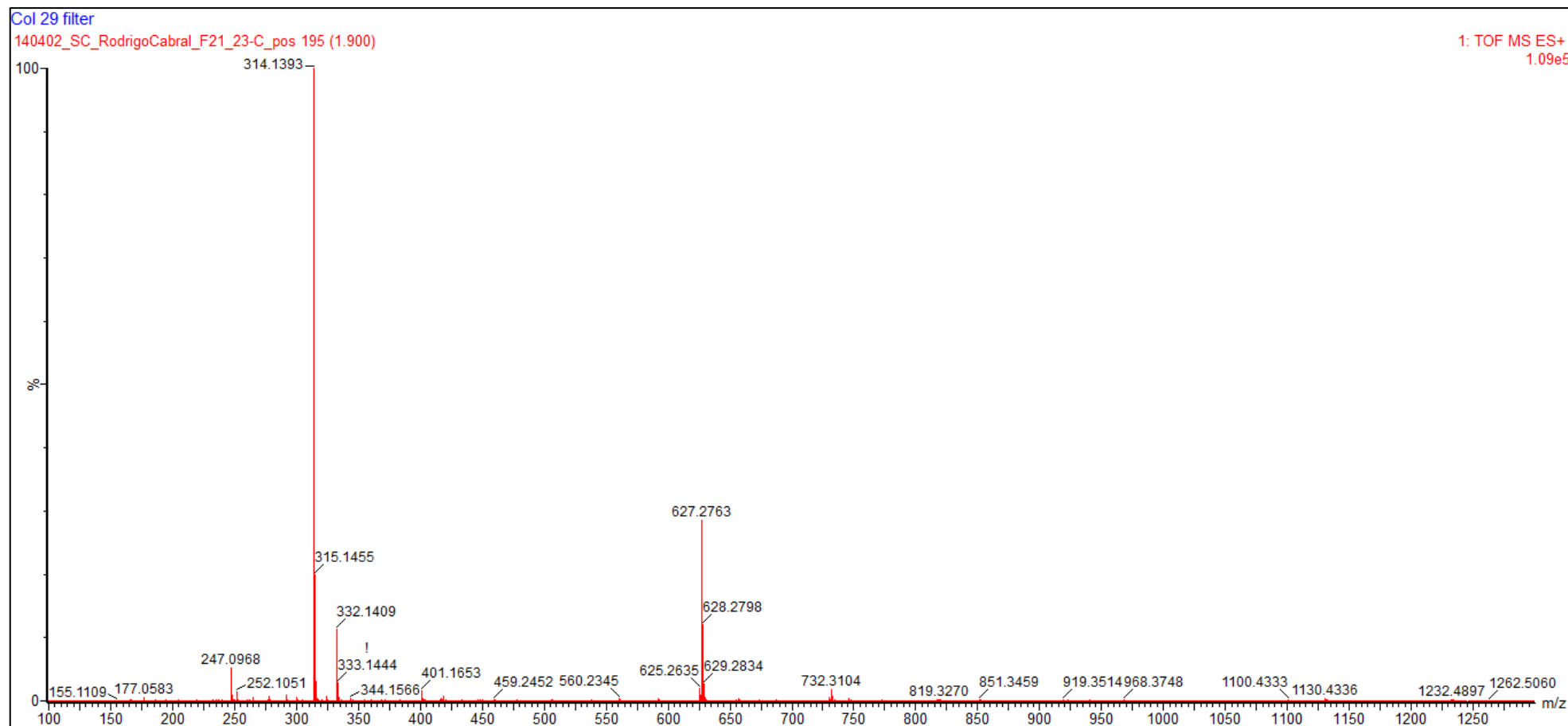


Figura 57 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**).

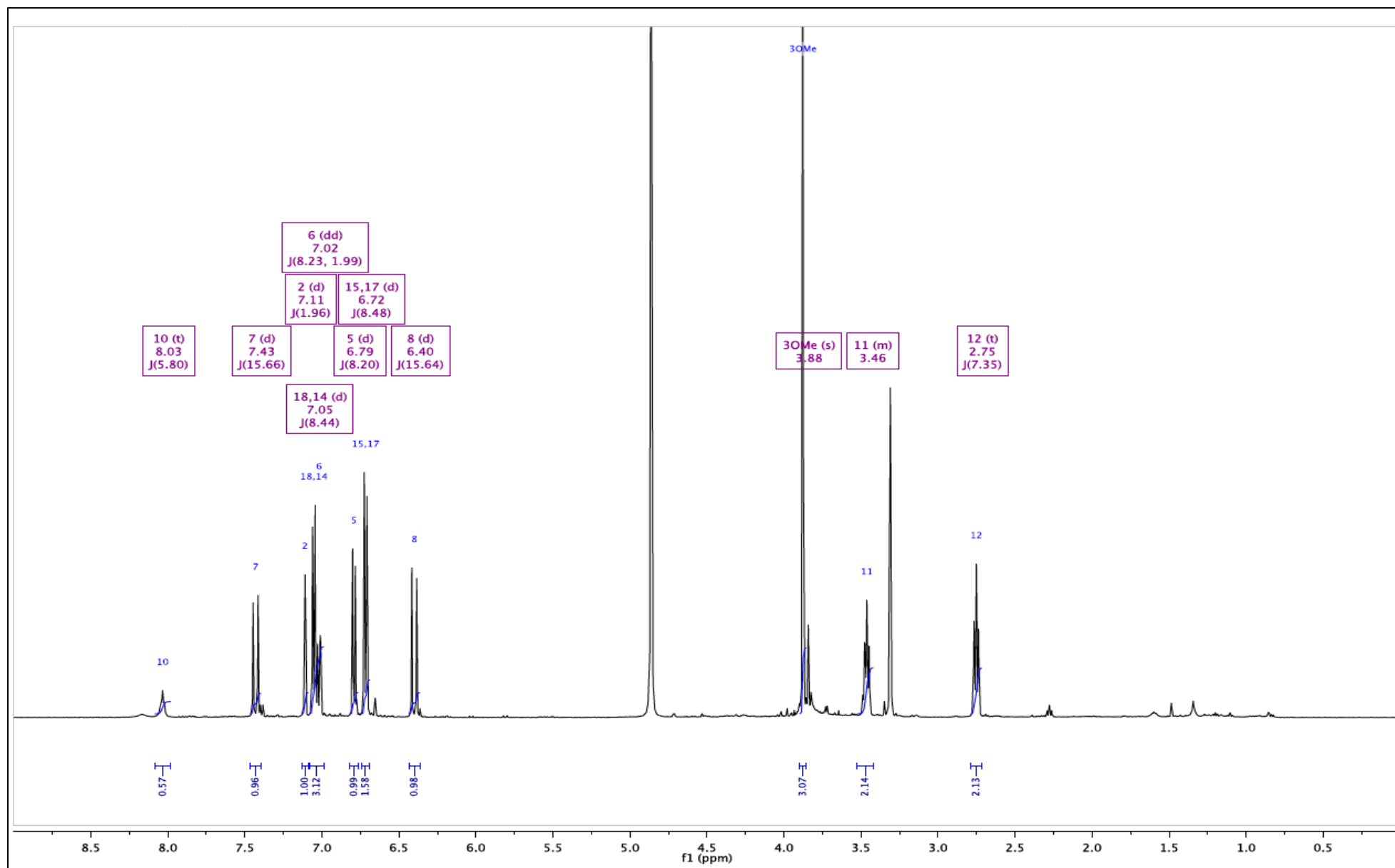


Figura 58 – Mapa de contorno *g*COSY da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**).

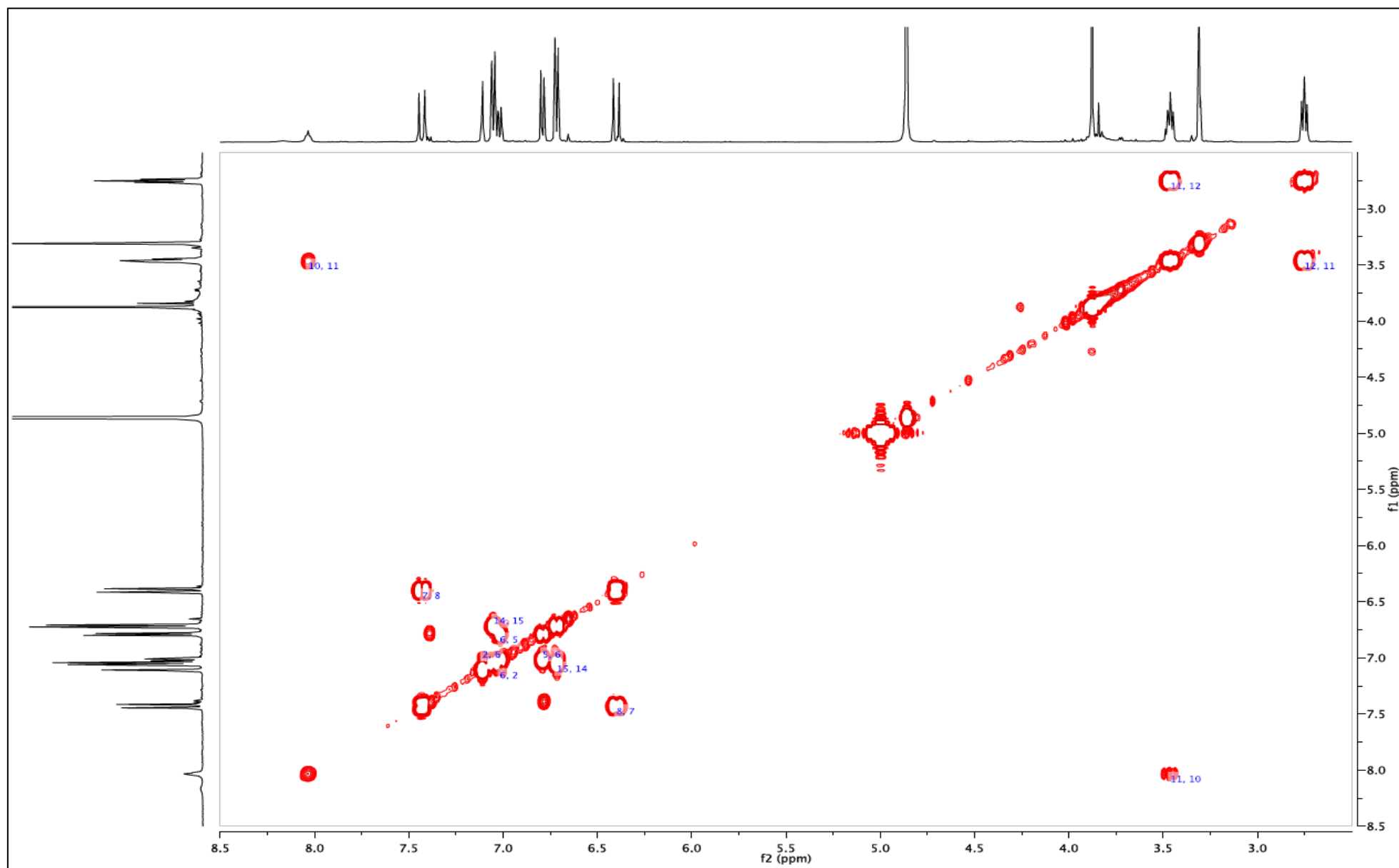


Figura 59 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**).

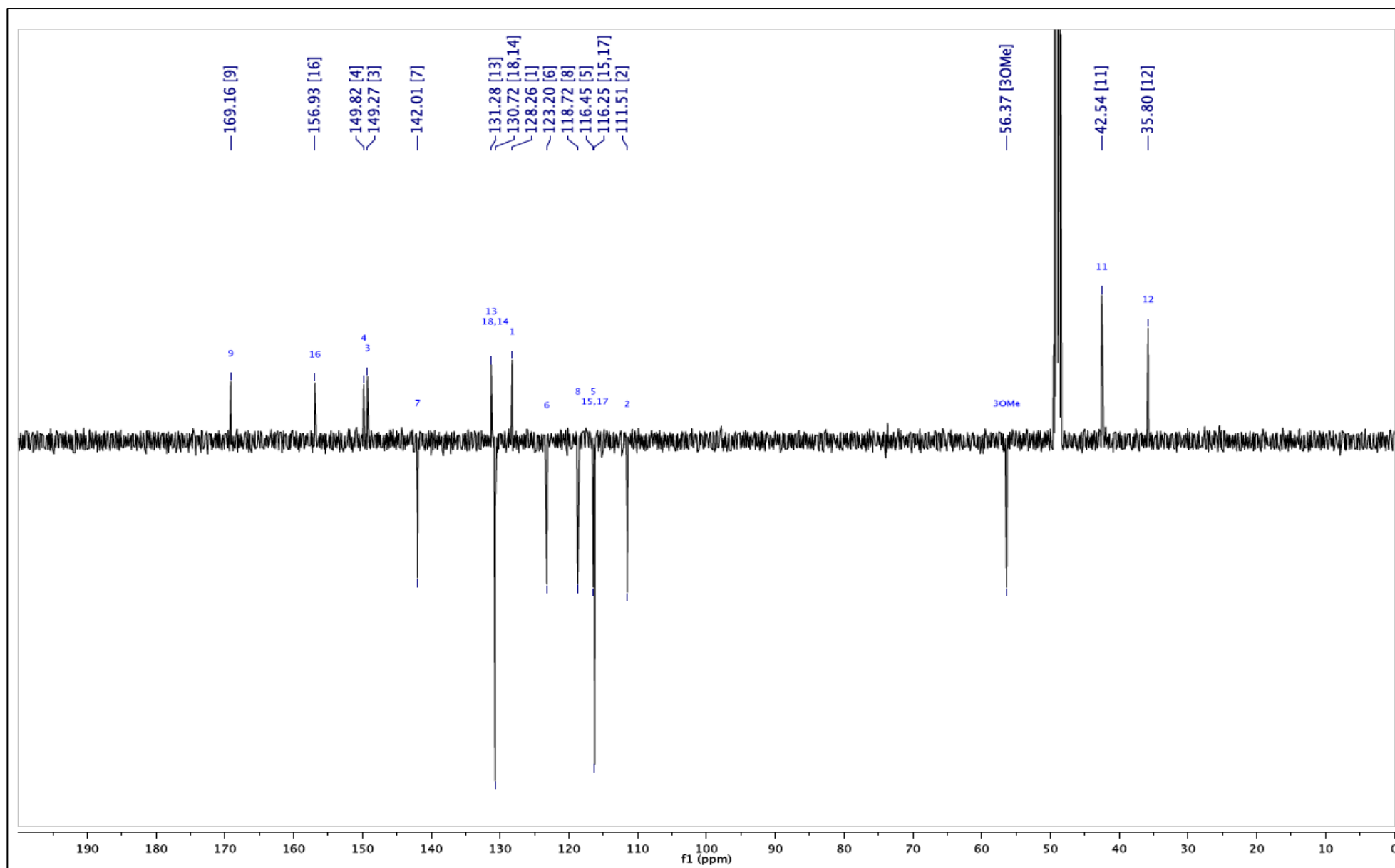


Figura 60 – Mapa de contorno *g*HSQCAD (em CD₃OD) da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**).

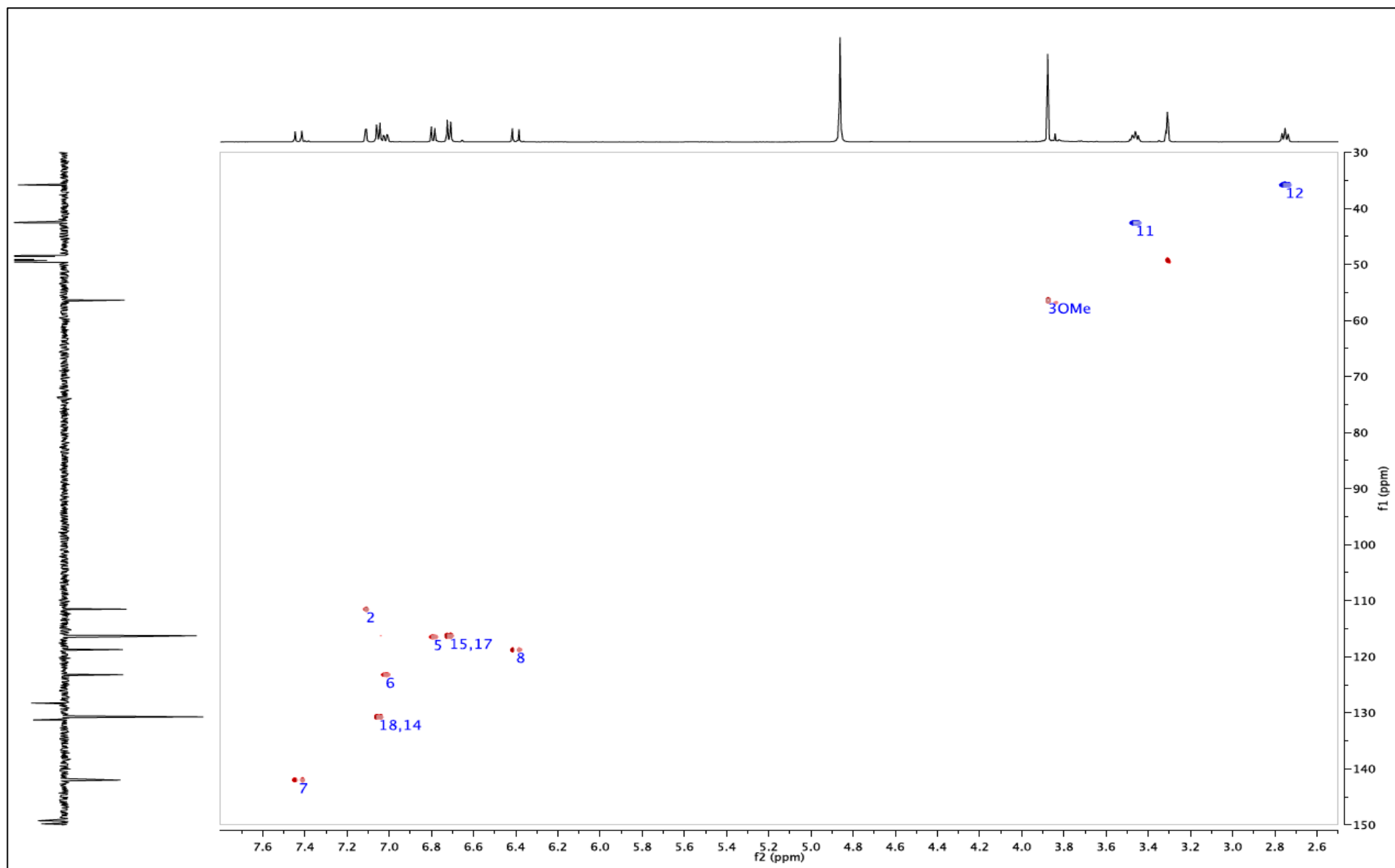
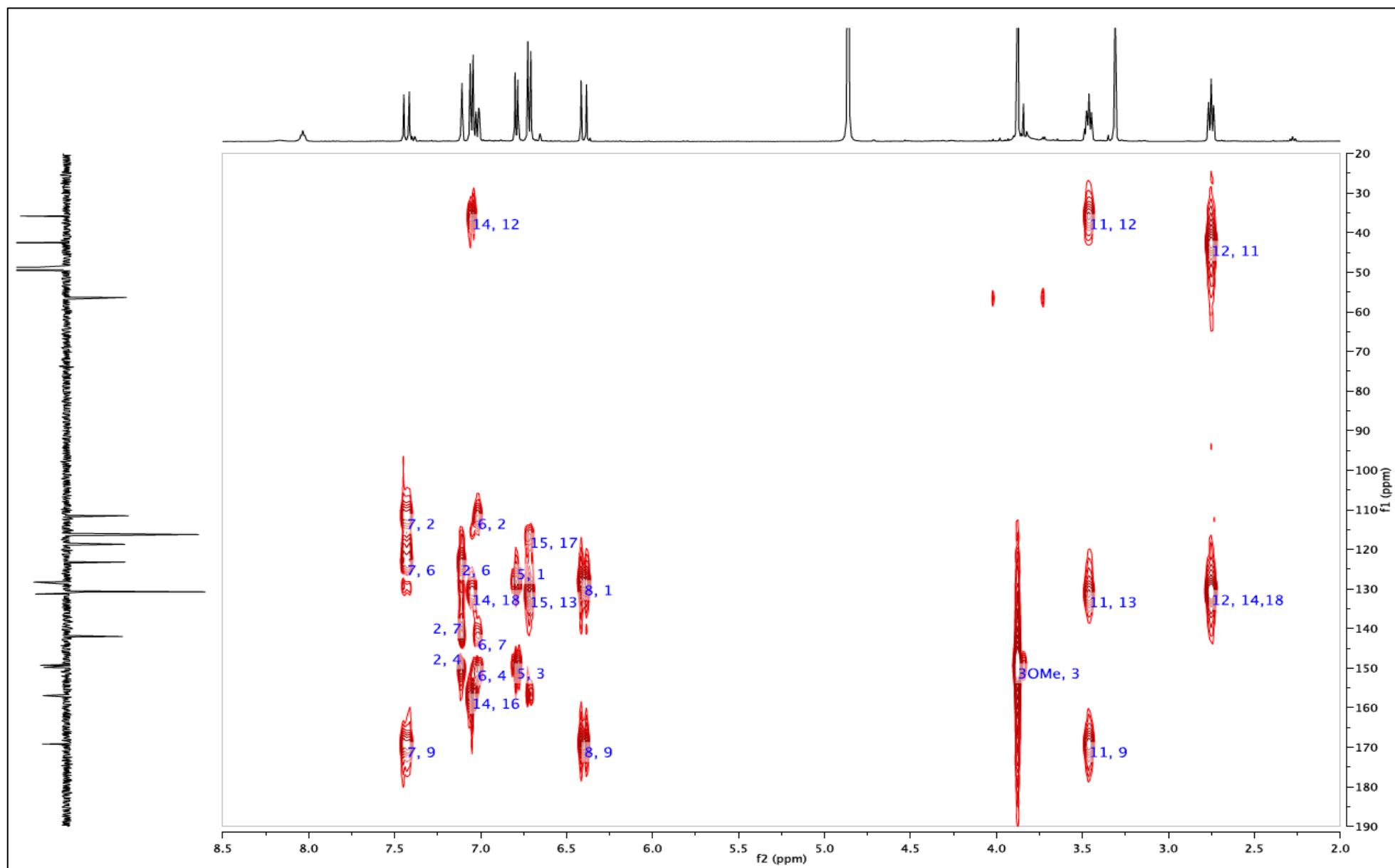


Figura 61 – Mapa de contorno *g*HMBC da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida, **4**).



Esta amida já foi descrita em diversas plantas, como portadora de atividades biológicas (Tabela 14).

Tabela 14 – Espécies que acumulam moupinamida (4) e suas respectivas atividades biológicas.

Espécie	Atividade	Referência
<i>Smilax aristolochiifolia</i> , Smilacaceae	Hipoglicêmica e hipotensiva	Amaro <i>et al.</i> , 2014
<i>Neolitsea aciculata</i> , Lauraceae	Inibidora da enzima tirosinase	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Acorus gramineus</i> , Acoraceae	Anticâncer e anti-inflamatória	Kim <i>et al.</i> , 2012
<i>Celtis africana</i> , Cannabaceae	Citotóxica, anti-inflamatória e iache	Al-Tawee <i>et al.</i> , 2012
<i>Synsepalum dulcificum</i> , Sapotaceae	Antimelanogênica, inibe a enzima tirosinase	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Erycibe hainanesis</i> , Convolvulaceae	Hepatoprotetora	Song <i>et al.</i> , 2010
<i>Peperomia duclouxii</i> , Piperaceae	Citotoxicidade	Li <i>et al.</i> , 2007
<i>Beta vulgaris</i> , Chenopodiaceae	Inibidor da síntese de NO	Kim <i>et al.</i> , 2003

Fração 68

O composto presente na Fração 68 (43,8 mg) foi obtido como um sólido amorfo, solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS) (Figura 62).

A análise desta substância por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 258,1133, compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{15}NO_3$ ($\Delta ppm = 1,2$). Com base nos resultados obtidos neste estudo e por comparação com os dados presentes na literatura, foi possível propor a identificação desta substância, como o alcaloide do tipo quinolônico 2,6-dihidro-7-metoxi-2,2-dimetil-5H-pirano[3,2c]quinolin-5-ona (7-metoxiflindersina, composto 19) (Figura 68), aqui descrito pela primeira vez para o gênero *Conchocarpus*. A Tabela 15 apresenta os dados de NMR para o composto 19 e os dados encontrados na literatura para a 7-metoxiflindersina (Hifnawy *et al.*, 1977; Jackson *et al.*, 1990).

Figura 62 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração 68, identificado como o alcaloide 7-metoxiflindersina (19).

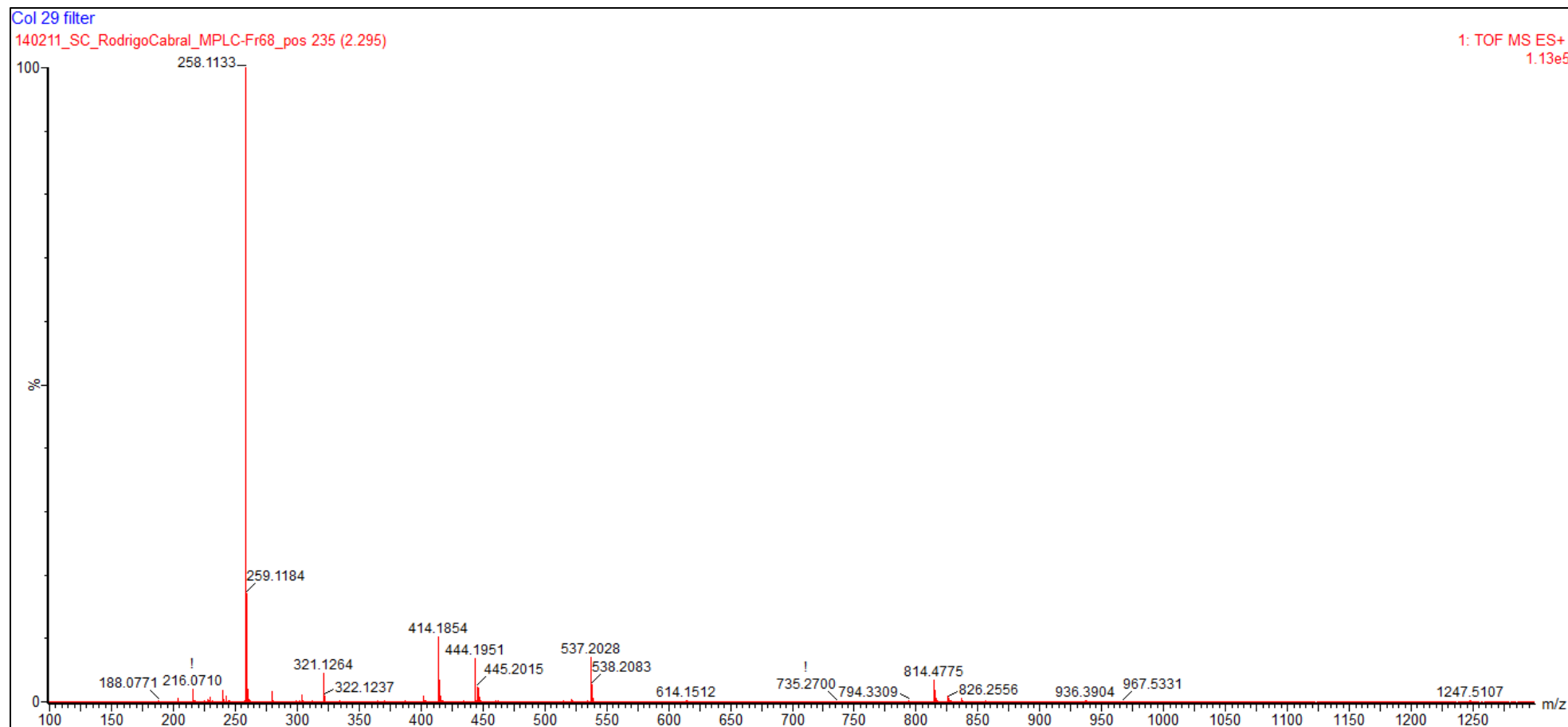


Figura 63 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida 7-metoxiflindersina (**19**).

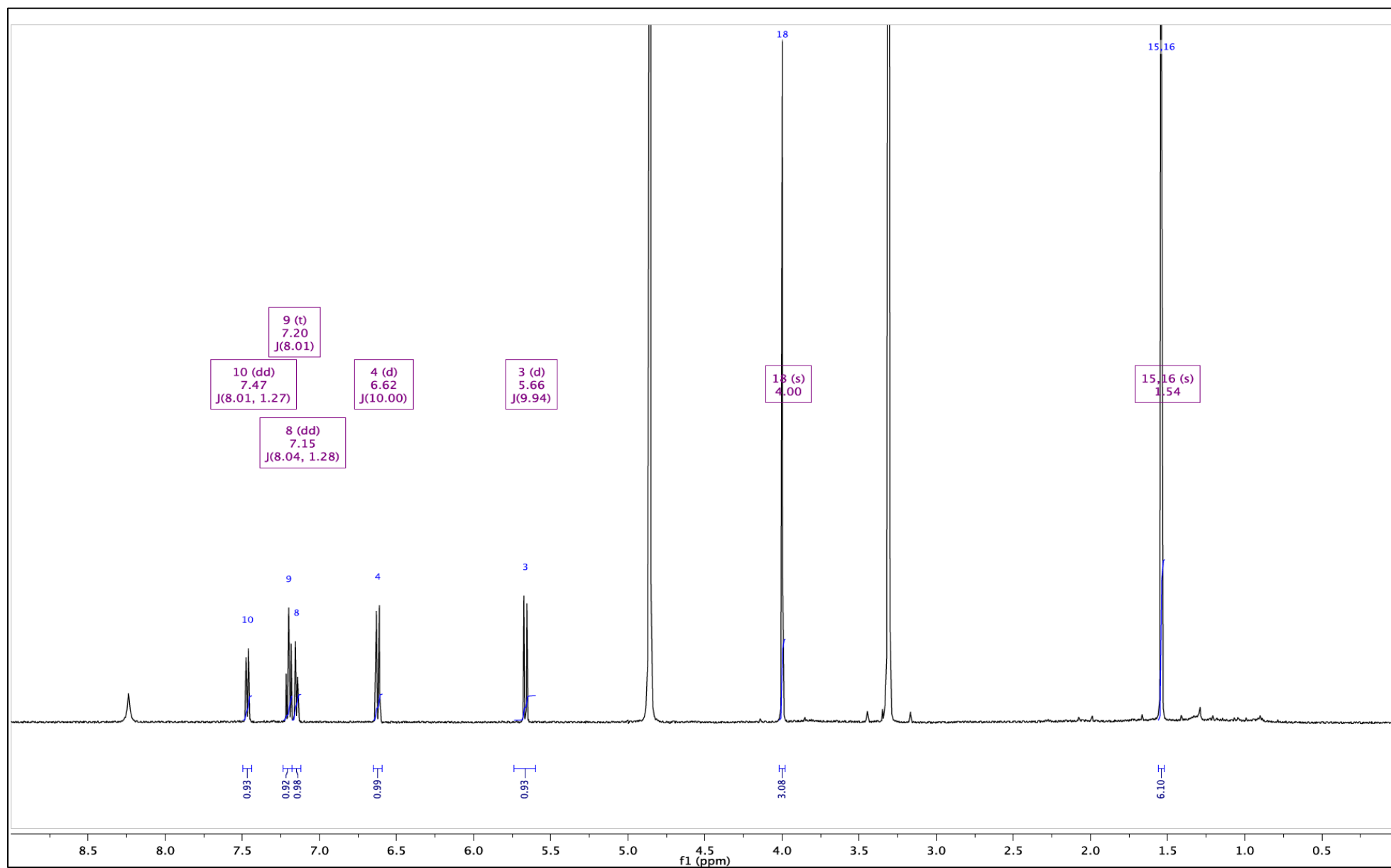


Figura 64 – Mapa de contorno *g*COSY da 7-metoxiflindersina (**19**).

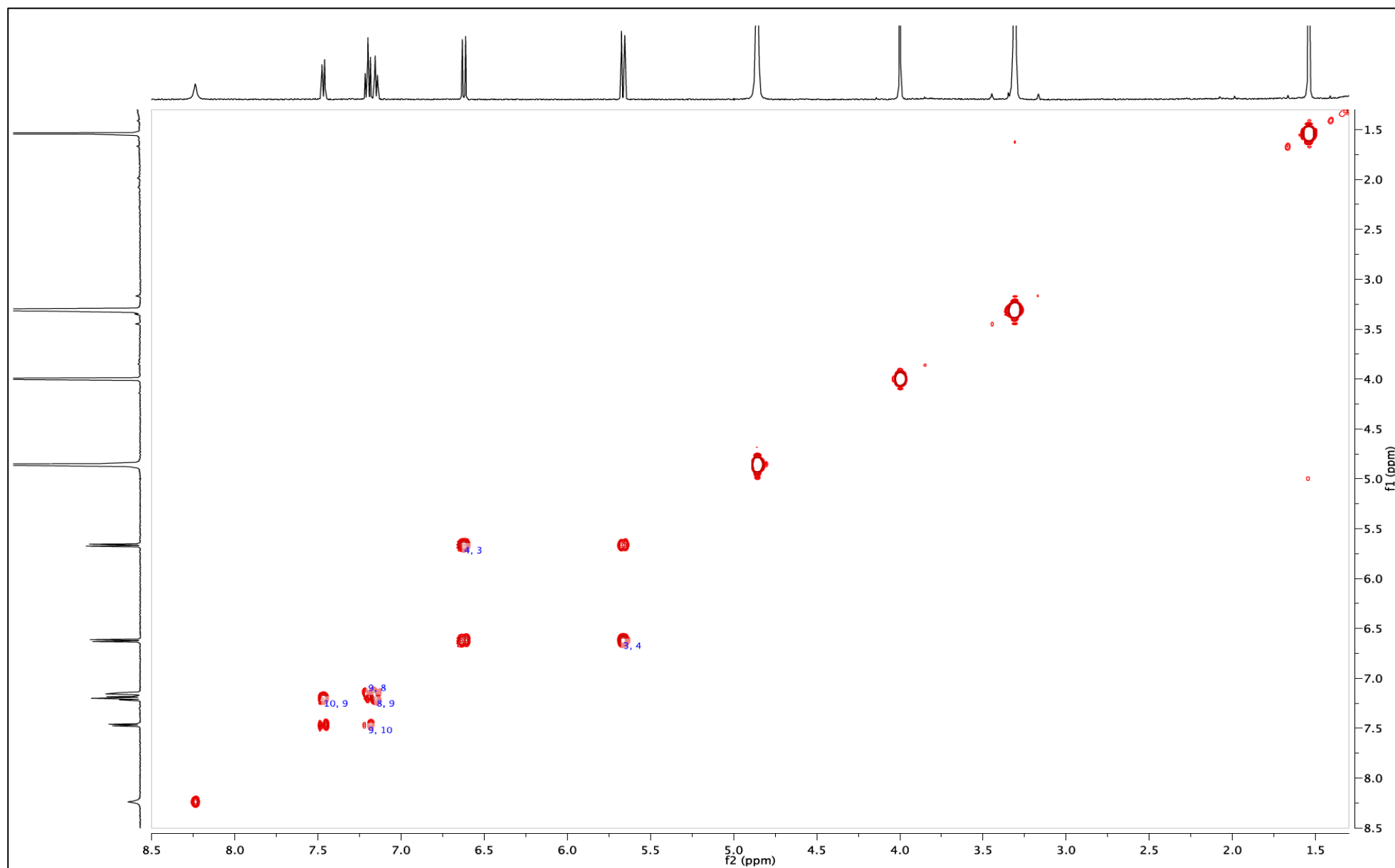


Figura 65 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da 7-metoxiflindersina (**19**).

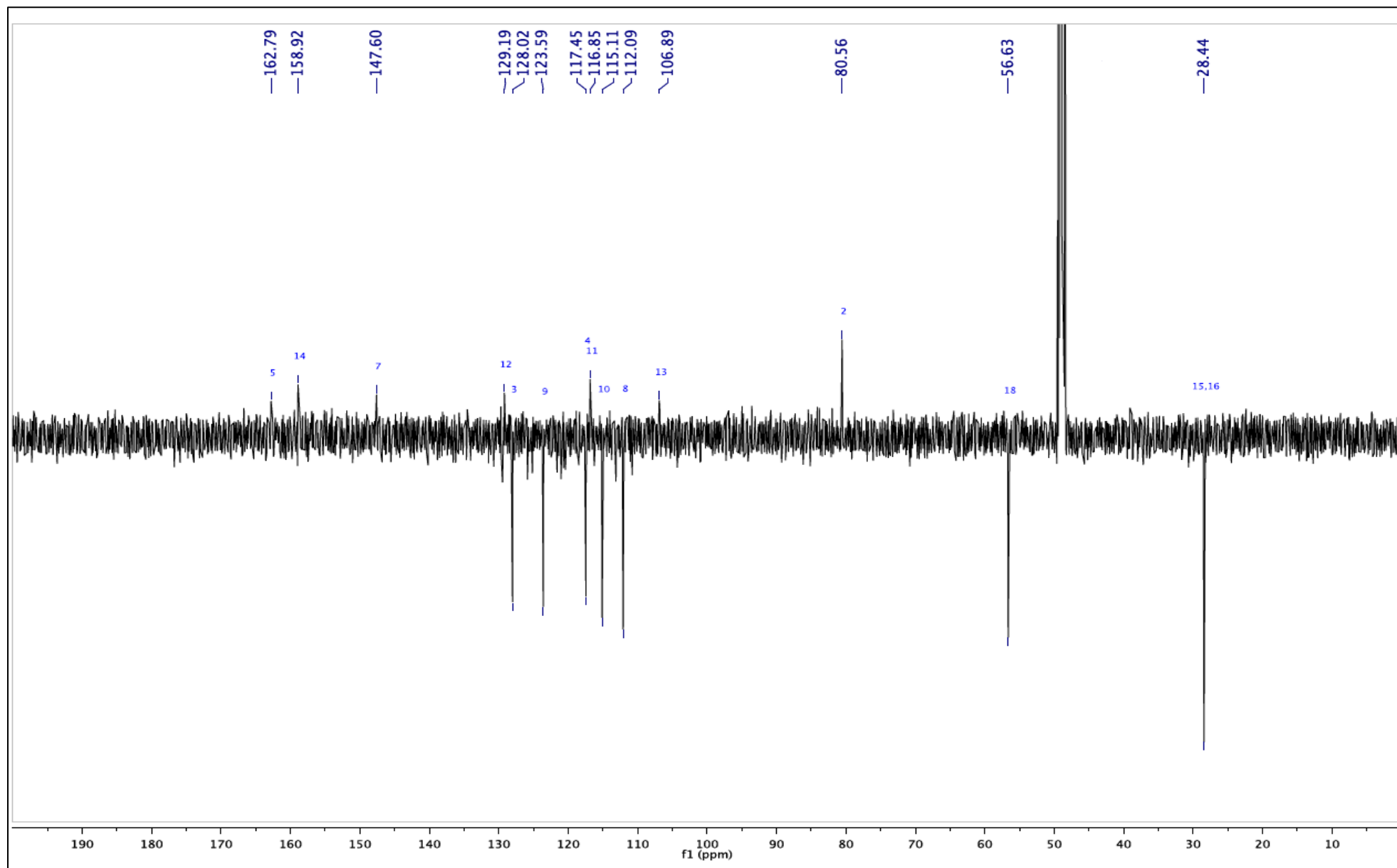


Figura 66 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da 7-metoxiflindersina (**19**).

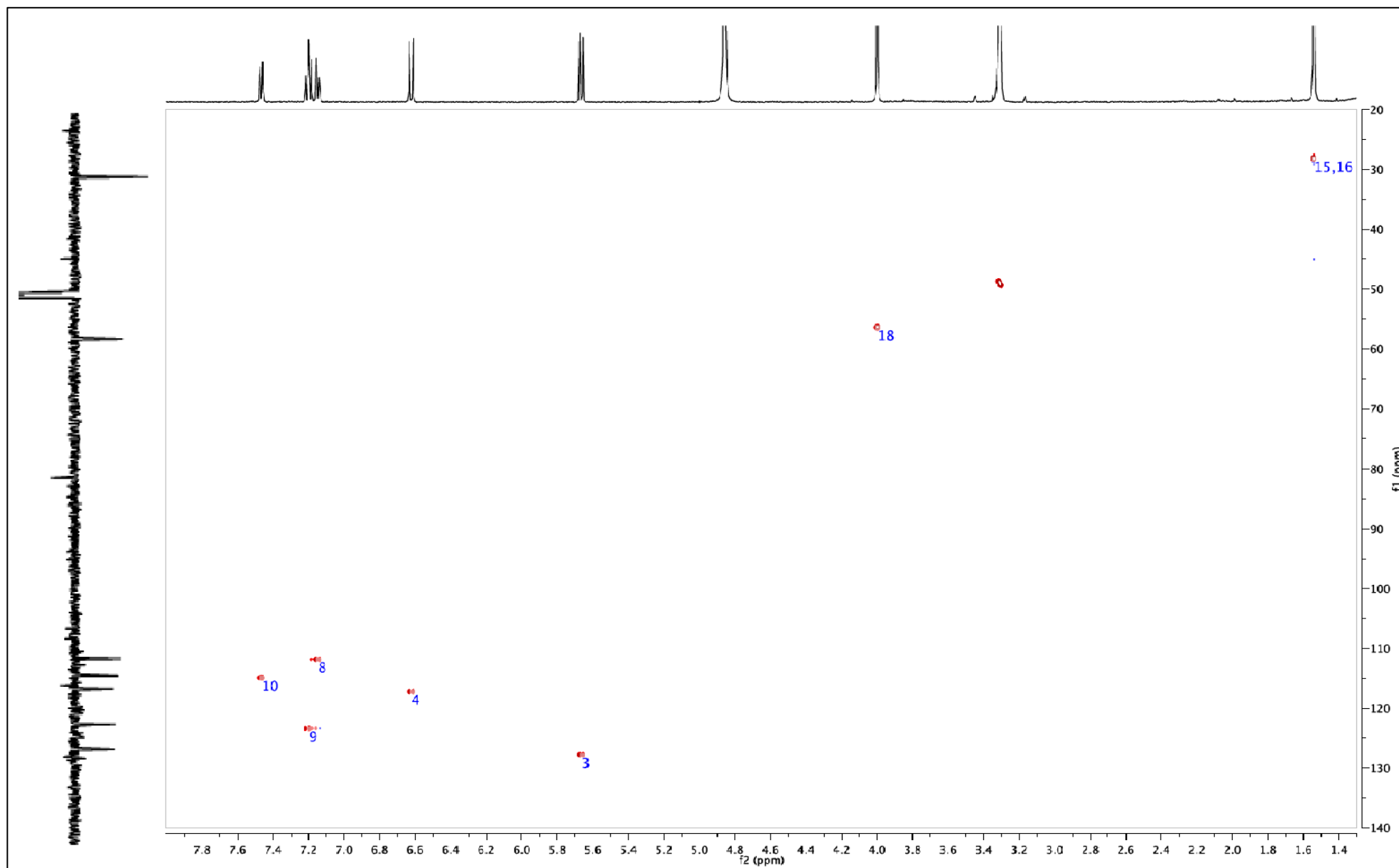


Figura 67 – Mapa de contorno *g*HMBC da 7-metoxiflindersina (**19**).

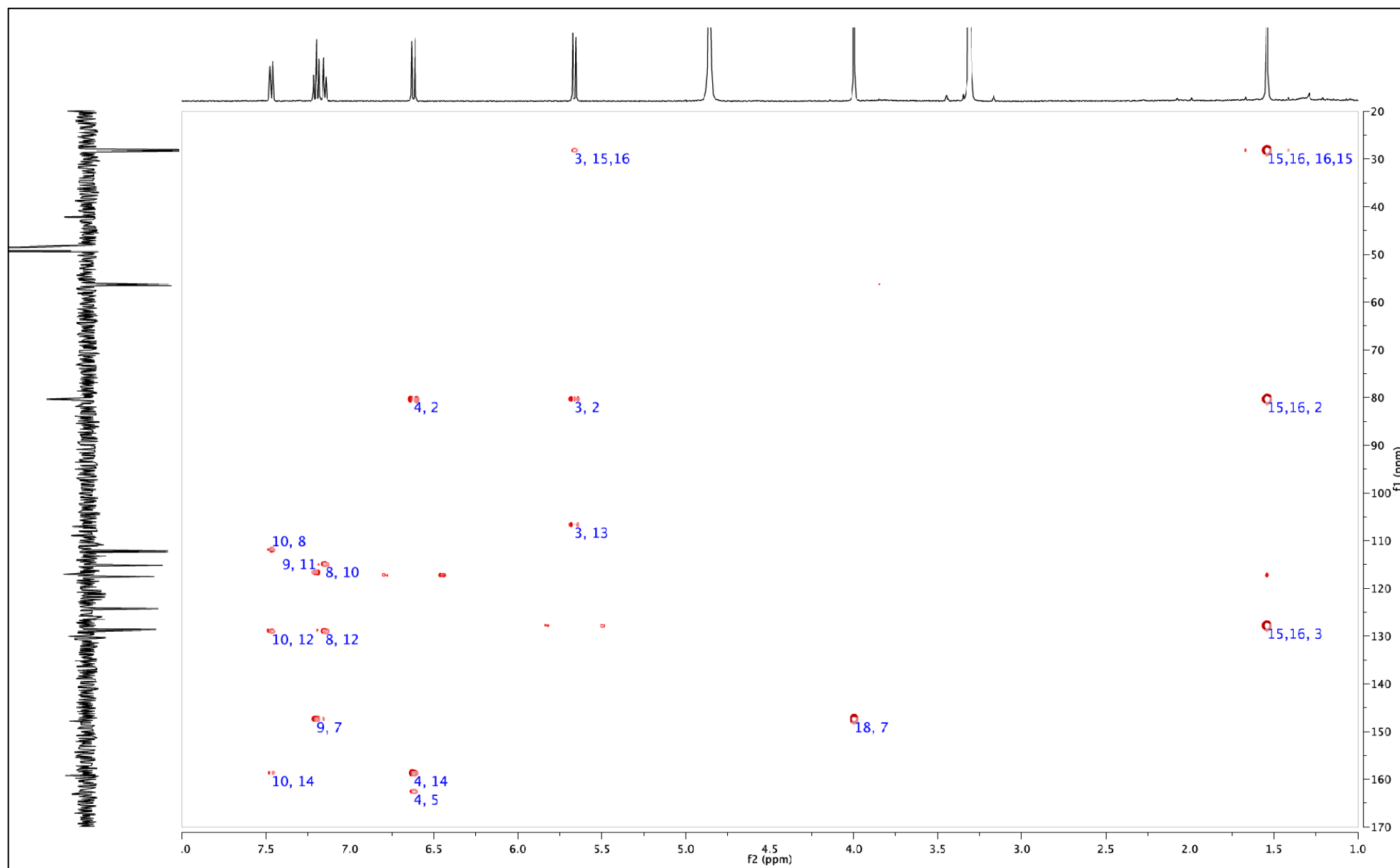


Figura 68 – Estrutura do alcaloide 7-metoxiflindersina (**19**), isolado dos ramos de *C. fontesianus*.

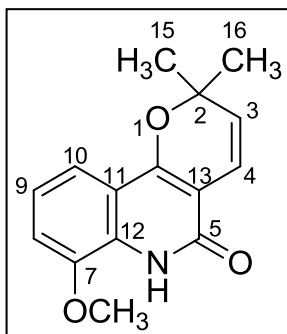


Tabela 15 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o alcaloide 7-metoxiflindersina (**19**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 19 (7-metoxiflindersina)		Literatura ^(*)		Literatura ^(**)	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	
1	-	-	-	-	-	
2	-	80.5	-	-	78.9	
3	5.66 (d; 10.0)	128.0	5.50 (d; 10)	5.50 (d; 11)	126.0	
4	6.62 (d; 10.0)	117.4	6.7 (d; 10)	6.68 (d; 11)	117.2	
5 (C=O)	-	162.7	-	-	160.4	
6 (NH)	8.35 (s)	-	8.9 (s)	8.93 (s)	-	
7	-	147.6	-	-	145.3	
8	7.15 (dd; 8.0, 1.2)	112.0	7.25 (m)	6.93 (dd; 9.0, 2.8)	110.0	
9	7.20 (t; 8.0)	123.5	6.93 (m)	7.09 (dd; 9.0, 9.0)	121.4	
10	7.47 (dd; 8.0, 1.2)	115.1	7.45 (m)	7.45 (dd; 9.0, 2.8)	114.2	
11	-	116.8	-	-	115.5	
12	-	129.1	-	-	127.8	
13	-	106.8	-	-	106.2	
14	-	158.9	-	-	156.8	
Me (15)	1.54 (s)	28.4	1.5 (s)	1.5 (s)	28.2	
Me (16)	1.54 (s)	28.4	1.5 (s)	1.5 (s)	28.2	
Me O-C (7)	4.00 (s)	56.6	3.97 (s)	3.93 (s)	55.9	

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Hifnawy *et al.*, 1977^(*)

Jackson *et al.*, 1990^(**)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

A 7-metoxiflindersina (ou 8-metoxiflindersina) é acumulada em diversas espécies de Rutaceae, principalmente no gênero *Zanthoxylum* (Brader *et al.*, 1992; Stermitz *et al.*, 1977). Também é encontrada em *Andreodoxa flava*, *Neouraputia paraenses*, *Teclea nobilis* e

Myrtopsis macrocarpa (Santana *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2003; Al-Rehaily *et al.*, 2003; Hifnawy *et al.*, 1977).

5.11. Análise das frações restantes obtidas por fracionamento do extrato em DCM (ramos Jureia).

As demais frações obtidas por fracionamento do extrato DCM dos ramos dos indivíduos coletados na EEJI foram analisados por HPLC-DAD. Aquelas que possuíam perfil cromatográfico semelhante foram agrupadas resultando em 20 novas frações (A-T) conforme ilustrado na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Agrupamento das frações obtidas através do processo de fracionamento do extrato em DCM ramos (Juréia).

Fração	Agrupamento*	Massa (mg)	Fração	Agrupamento*	Massa (mg)
A	1+7	373,6	L	48+51	95,1
B	9+11	110,8	M	52+55	156,4
C	12+19	156,6	N	56+59	198,6
D	21+23	129,1	O	60+63	251,1
E	24+28	145,5	P	64+67	219,8
F	29+30	55,5	Q	69+71	129,9
G	31+35	125,3	R	72+77	295,5
H	36+39	89,7	S	78+80	354,9
I	40+41	46,0	T	81+84	208,1
J	42+44	113,1	U	85	45,5
K	45+47	98,5	V	86+91	324,7

*Grupo de frações reunidas

As frações selecionadas para o processo de purificação foram as que se apresentaram mais interessantes dos pontos de vista cromatográfico e espectroscópico, além daquelas com atividade contra *Candida albicans* (perfil cromatográfico em HPLC-DAD). Devido à escassez de estudos sobre a espécie *C. fontanesianus* quanto maior o número de compostos identificados, maior a contribuição para o conhecimento da espécie e do gênero *Conchocarpus*. A **Tabela 18** mostra as frações selecionadas para o processo de purificação, suas respectivas massas, modos de eluição, vazão, tipo de coluna utilizada e número de frações enviadas para análise pelas técnicas NMR mono e bidimensionais.

Tabela 18 – Ilustração do processo de purificação das frações do extrato em DCM-RJ através da técnica HPLC-UV-preparativo.

Fração	Massa (mg)	Modo de eluição	Tempo (min)	Vazão (mL/min)	Frações analisadas por NMR
C*	3,1	isocrático 36% MeOH	42	10	C-1
D*	2,7	isocrático 34% MeOH	38	10	D-1
E*	17,2	isocrático 30% MeOH	45	10	E-1
	1,7				E-2
F*	5,2	isocrático 28% MeOH	39	10	F-1
J*	12,4	isocrático 42% MeOH	52	10	J-1
	4,1				J-2
	4,9				J-3
	4,1				J-4
M*	19,2	isocrático 40% MeOH	55	10	M-1
	2,5				M-2
	8,8				M-3
	5,4				M-4
O*	4,1	isocrático 50% MeOH	40	10	O-1
S**	25,9	Gradiente linear, 35 a 55% AcOEt	47	5	S-1
	4,3				S-2
U**	4,6	Gradiente linear, 20 a 32% AcOEt	36	5	U-1
	3,1				U-2

*Purificadas em coluna de Fase Reversa (RP) Sistema de Eluição: MeOH-H₂O (+ 0,1% FA)

**Purificadas em coluna de Fase Normal (NP) Sistema de Eluição: AcOEt-Hex

Para obter informações sobre a composição química das frações obtidas, estas foram analisadas por HPLC-DAD e UPLC-TOF-MS. Os resultados destas análises mostraram que 18 destas frações eram compostas por substâncias puras. A caracterização destes compostos é feita a seguir.

Fração C-1

O composto presente na Fração C-1 (3,1 mg) foi obtido como um sólido amorfo e solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS).

A análise por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 419,1716, compatível com a fórmula C₂₂H₂₆O₈ (Δ ppm = 2,4) (**Figura 76**). O alfa-D para esta fração apresentou valor de $-9,6$ (c 1,0; MeOH). Pela comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura foi possível caracterizar o composto presente na Fração C-1 como a lignana (-)-siringaresinol (**composto 5**) (Monterio *et al.*, 2007; Das *et al.*, 1999). Esta

é a primeira descrição deste metabólito no gênero *Conchocarpus*. Na **Tabela 19** estão ilustradas algumas espécies que acumulam este metabólito e algumas atividades biológicas apresentadas. Os dados obtidos por NMR estão ilustrados na **Tabela 20**.

Tabela 19 – Espécies que acumulam a lignana (-)-siringaresinol (5) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Simira glaziovii</i> , Rubiaceae		Araújo <i>et al.</i> , 2012
<i>Daphne genkwa</i> , Thymelaeaceae	Anticâncer	Park <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhus javanica</i> , Anacardiaceae	Antiviral	Ouyang <i>et al.</i> , 2007
<i>Sasa borealis</i> , Poaceae	Anticancer	Jeong <i>et al.</i> , 2007
<i>Caesalpinia pyramidalis</i> , Fabaceae		Bahia <i>et al.</i> , 2005
<i>Leptadenia arborea</i> , Apocynaceae	Inibidor da acetilcolinesterase	El-Hassan <i>et al.</i> , 2003
<i>Holacantha emoryi</i> , Simaroubaceae		Stöcklin <i>et al.</i> , 1969

Figura 69 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração C-1, identificado como a lignana (-)-siringaresinol (5).

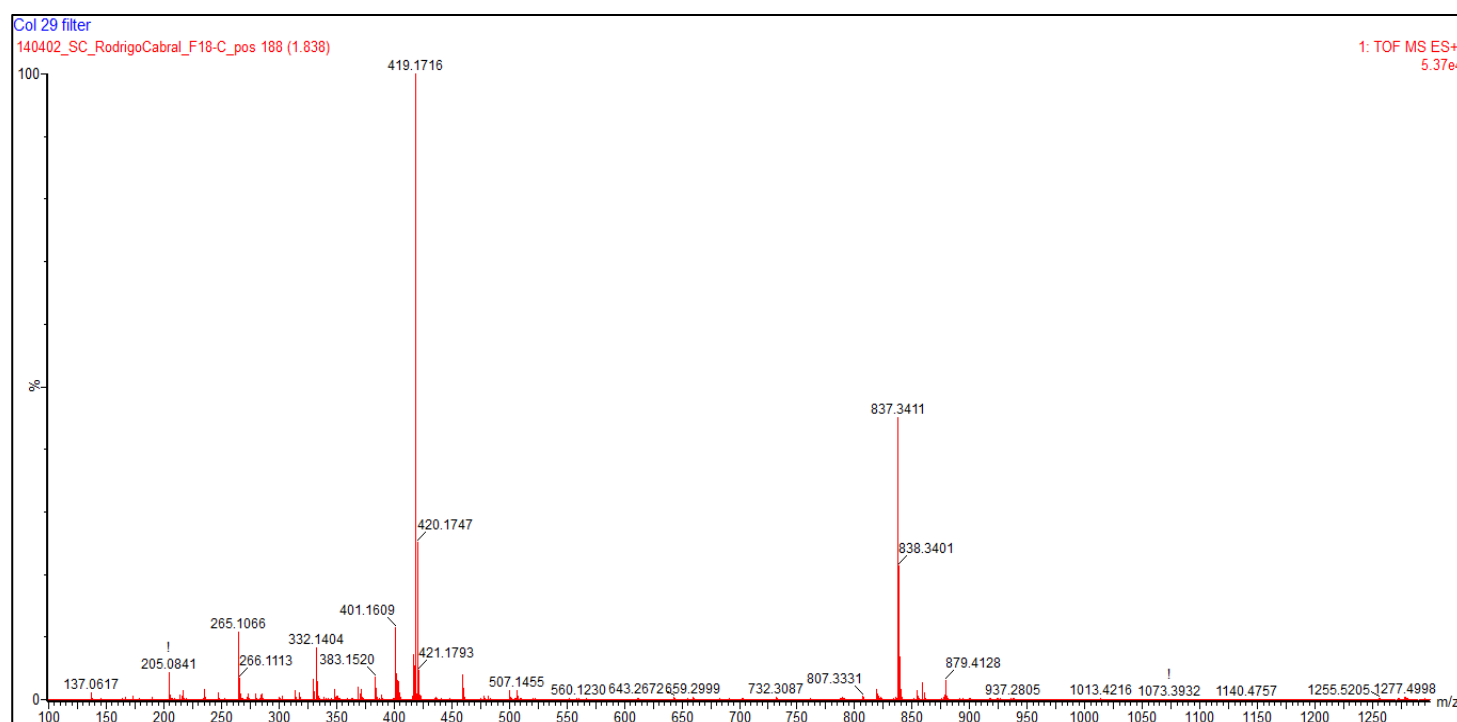


Figura 70 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da lignana (-)-siringaresinol (5).

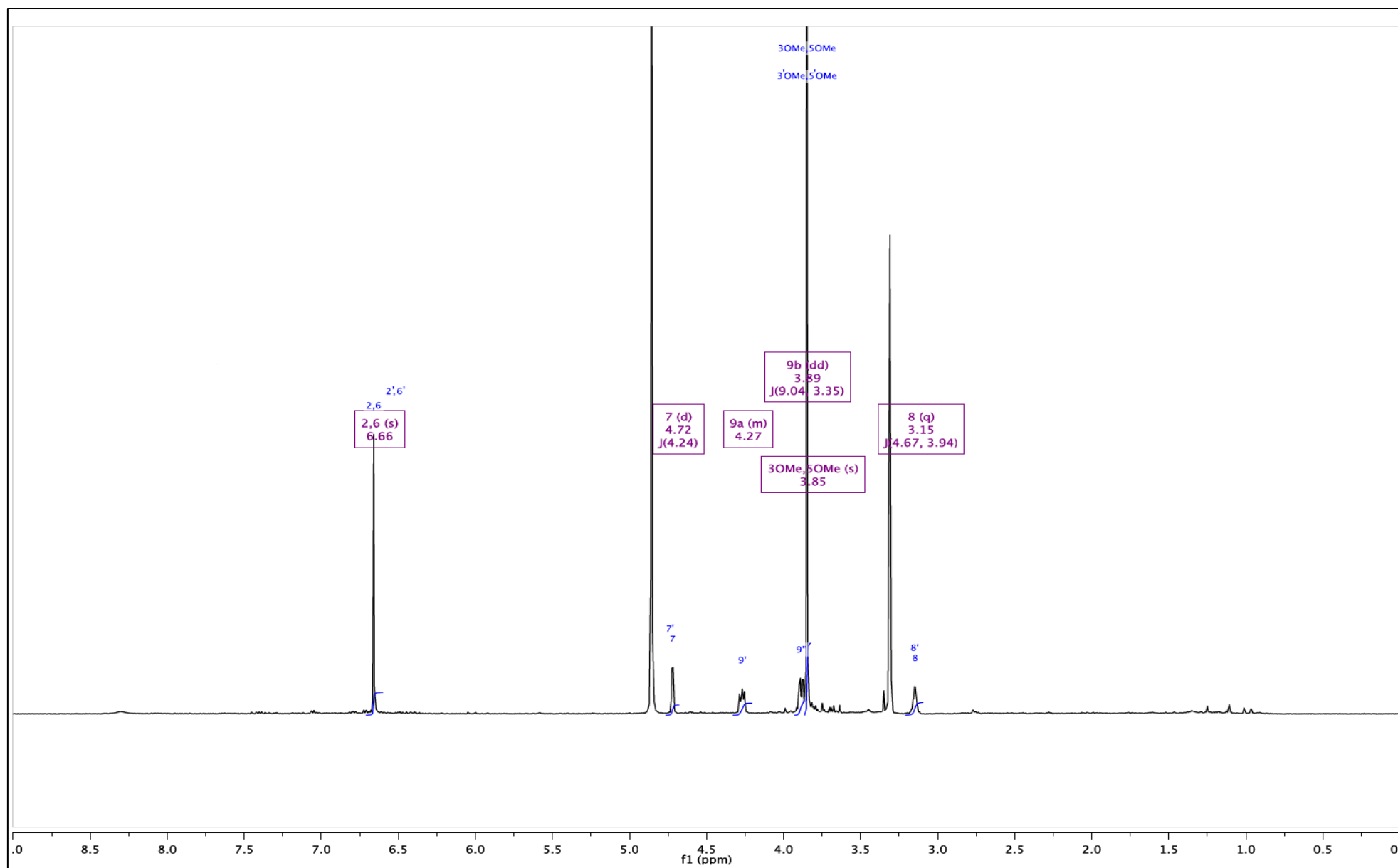


Figura 71 – Mapa de contorno *g*COSY do (-)-sirigaresinol (**5**).

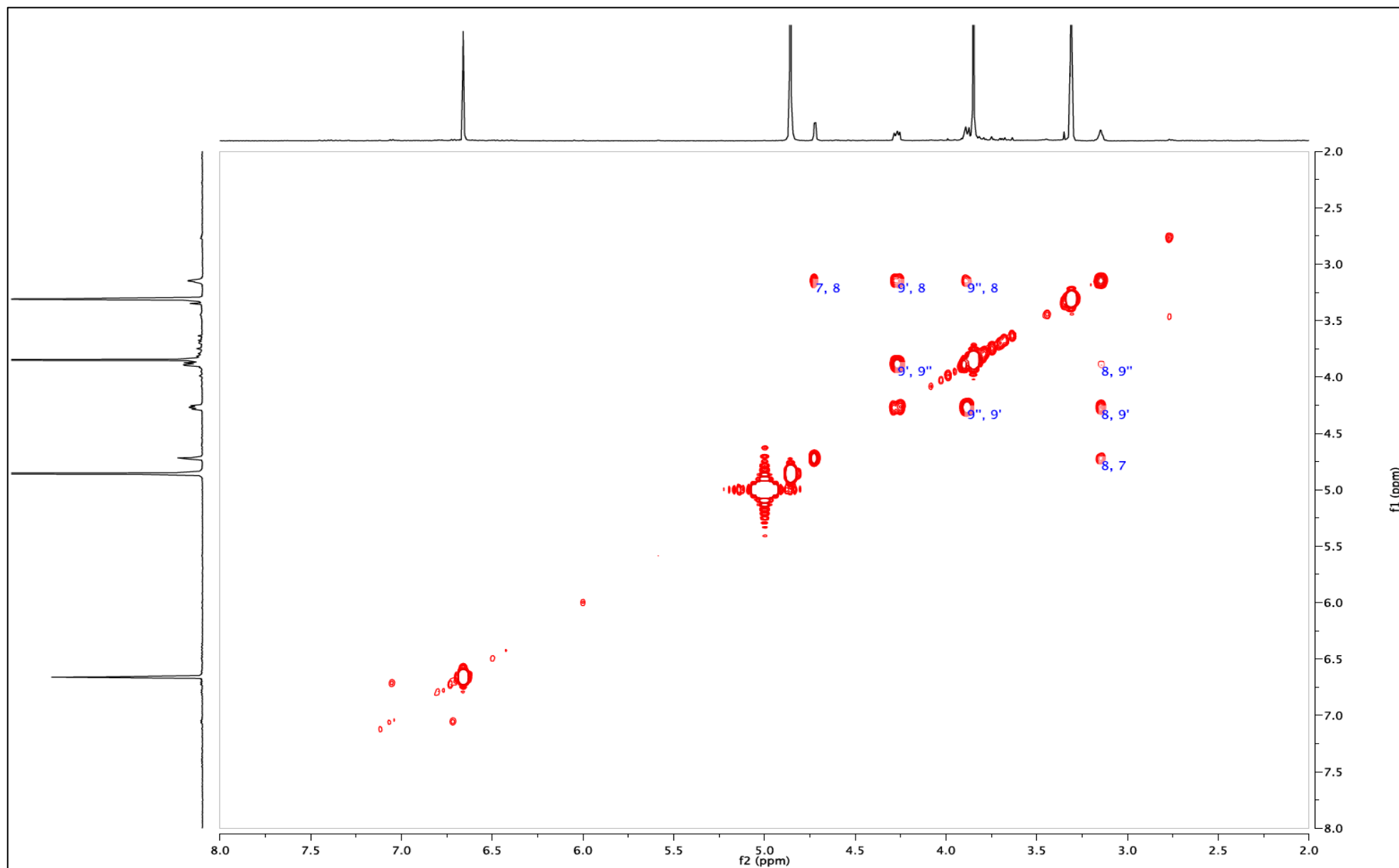


Figura 72 – Mapa de contorno NOESY do (-)-siringaresinol (5).

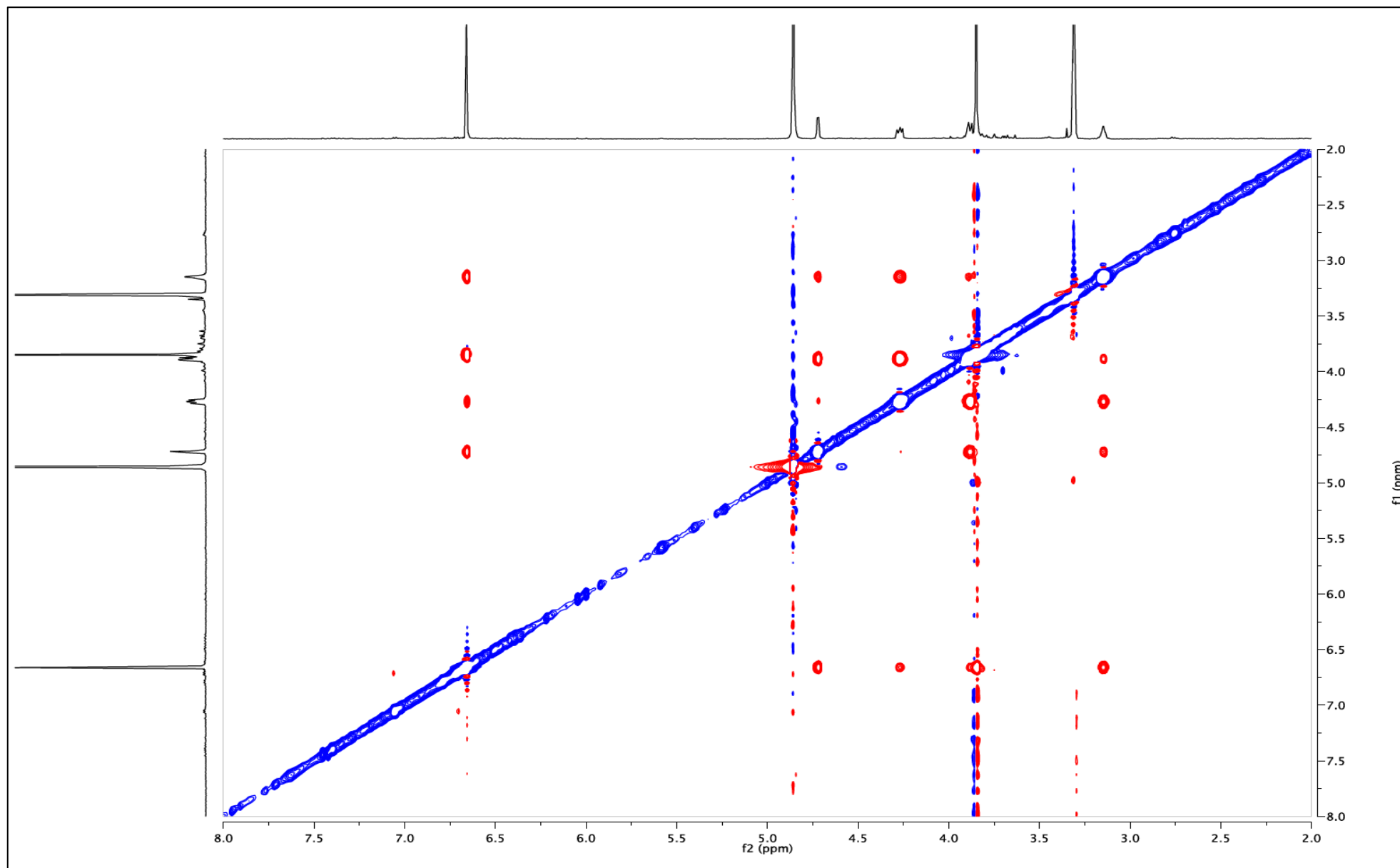


Figura 73 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do (-)-siringaresinol (5).

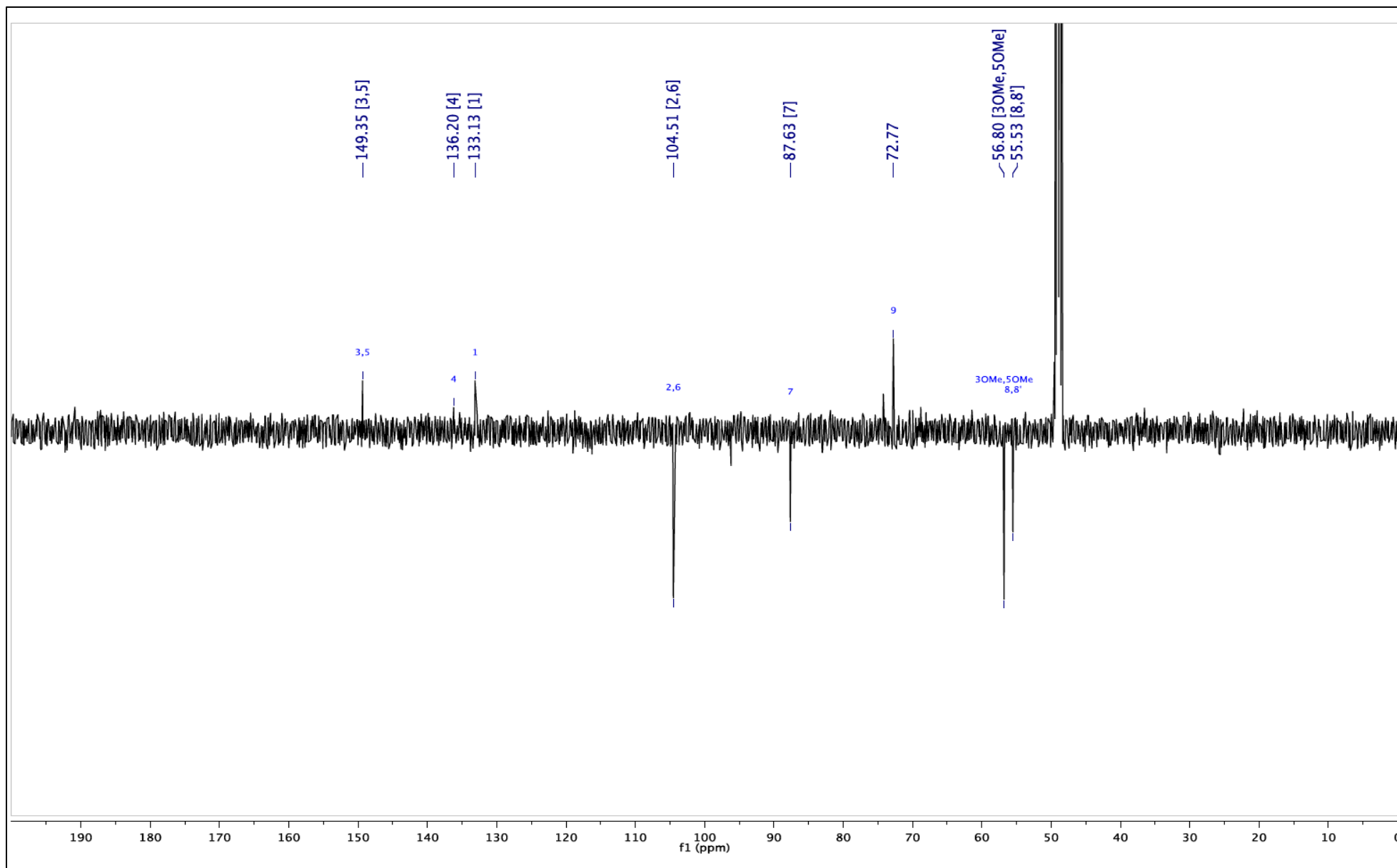


Figura 74 – Mapa de contorno gHSQCAD do (-)-siringaresinol (5).

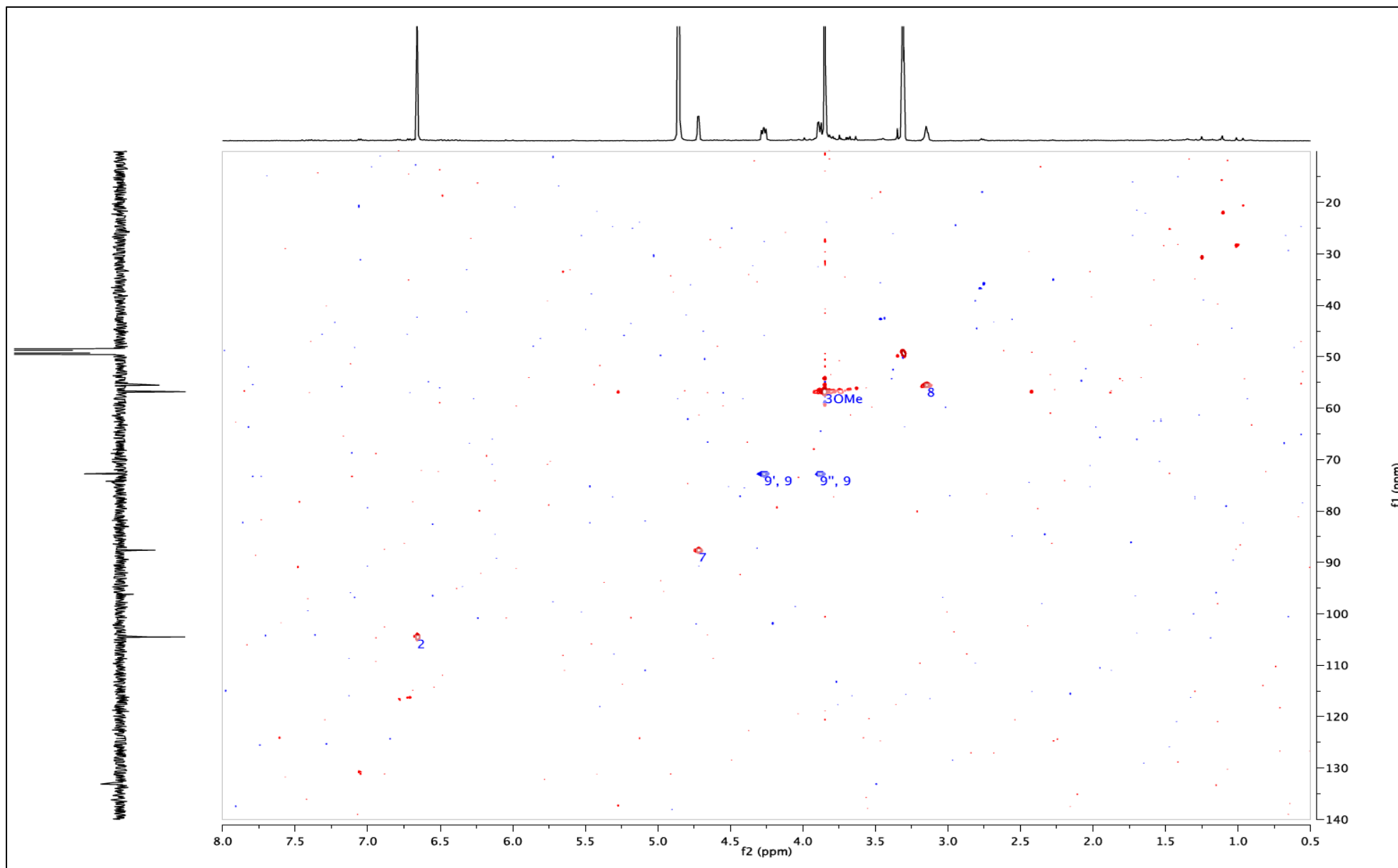


Figura 75 – Mapa de contorno *g*HMBC do (-)-siringaresinol (5).

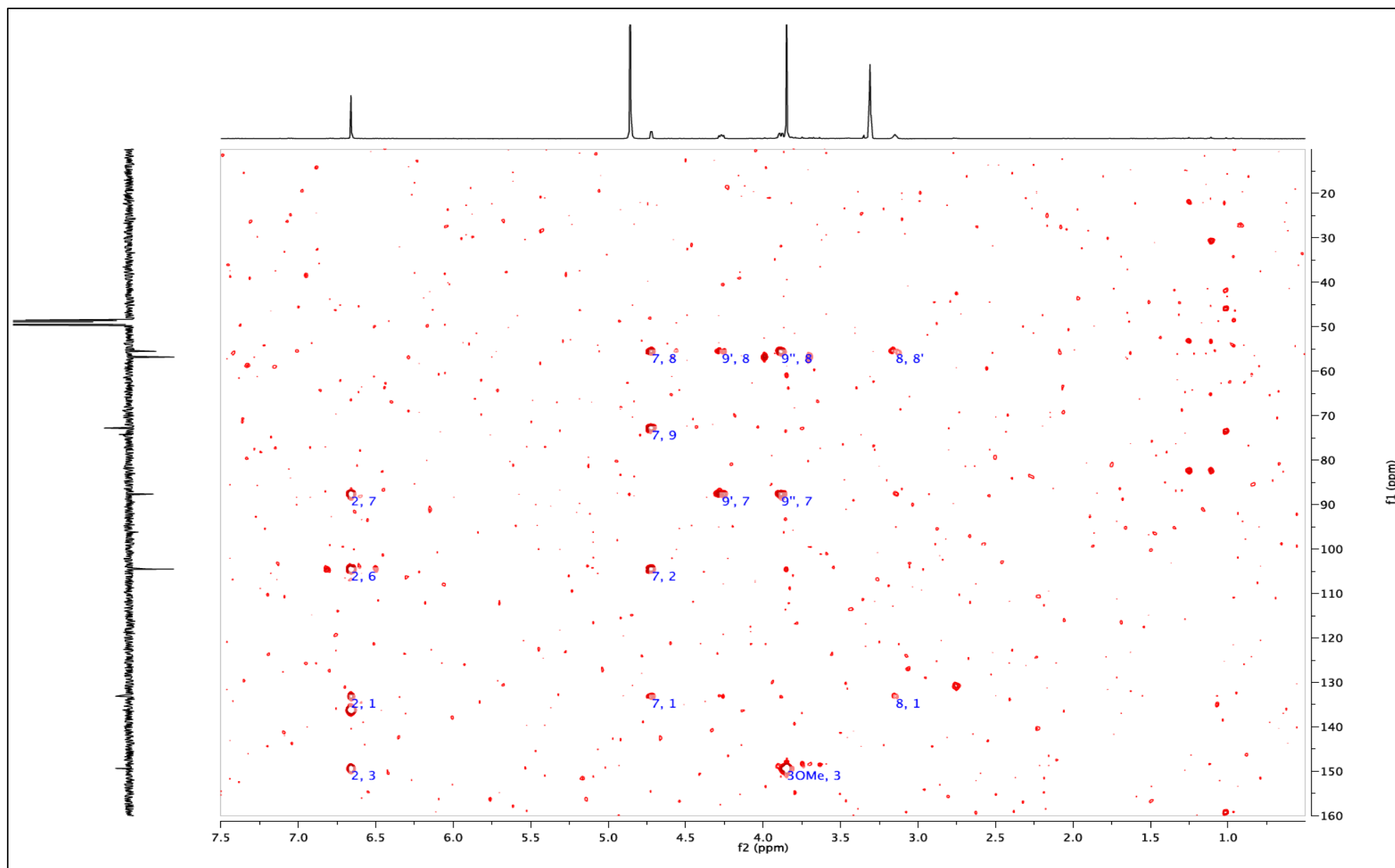


Figura 76 – Estrutura da lignana (-)-siringaresinol (5), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

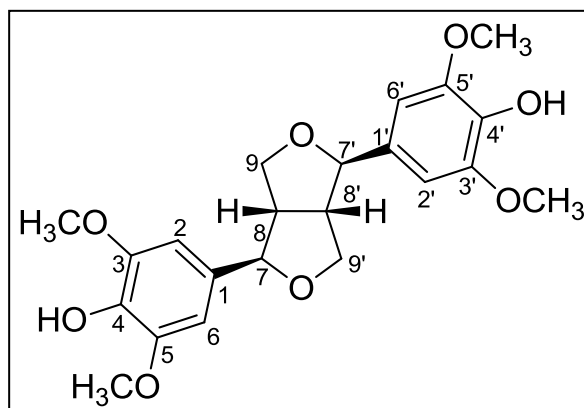


Tabela 20 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a lignana (-)-siringaresinol (5, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 5 (siringaresinol)		Literatura*	Literatura**	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	δ_{C} (ppm)
1	-	133.1	-	-	134.7
2	6.66 (s)	104.5	6.52 (s)	6.59 (s)	103.6
3	-	149.3	-	-	147.9
4	-	136.2	-	-	131.4
5	-	149.3	-	-	147.9
6	6.66 (s)	104.5	6.52 (s)	6.59 (s)	103.6
7	4.72 (d; 4.2)	87.6	4.68 (d; 4.0)	4.61 (d; 4.0)	85.3
8	3.15 (dd; 4.6, 3.9)	55.5	3.09 (m)	3.04 (m)	53.6
9	4.27 (dd; 9.0, 7.0)	72.7	4.23 (dd; 9.0, 7.0)	4.15 (dd; 7.0, 5.0)	71.0
1'	-	133.1	-	-	134.7
2'	6.66 (s)	104.5	6.52 (s)	6.59 (s)	103.6
3'	-	149.3	-	-	147.9
4'	-	136.2	-	-	131.4
5'	-	149.3	-	-	147.9
6'	6.66 (s)	104.5	6.52 (s)	6.59 (s)	103.6
7'	4.72 (d; 4.2)	87.6	4.68 (d; 4.0)	4.61 (d; 4.0)	85.3
8'	3.15 (dd; 4.6, 3.9)	55.5	3.00 (m)	3.04 (m)	53.6
9'	3.89 (dd; 9.0, 3.3)	72.7	3.87 (dd; 9.0, 4.0)	3.77 (dd; 7.0, 3.5)	71.0
MeO-C (3)	3.85 (s)	56.8	3.9 (s)	3.75 (s)	56.0
MeO-C (5)	3.85 (s)	56.8	3.9 (s)	3.75 (s)	56.0
MeO-C (3')	3.85 (s)	56.8	3.9 (s)	3.75 (s)	56.0
MeO-C (5')	3.85 (s)	56.8	3.9 (s)	3.75 (s)	56.0

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Das, *et al.*, 1999*

Monteiro *et al.*, 2007**

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração D-1

O composto presente na Fração D-1 (2,7 mg) foi obtido como um óleo amarelo, solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS). A **Tabela 22** apresenta os resultados obtidos por NMR.

A análise por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 314,1392, compatível com a fórmula $C_{18}H_{19}NO_4$ ($\Delta ppm = 0,0$), consonante com a fórmula da amida ***N-cis-feruloiltiramina* (composto 2)** (**Figura 77**). A hipótese foi confirmada pela comparação dos dados aqui obtidos, com os presentes na literatura (King & Calhoun, 2005; Chang *et al.*, 2001). Esta é a primeira descrição desta amida na família Rutaceae. A **Tabela 21** apresenta espécies que acumulam a amida *N-cis-feruloiltiramina* e algumas de suas atividades biológicas.

Tabela 21 – Espécies que acumulam a amida *N-cis-feruloiltiramina* e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Synsepalum dulcificum</i> , Sapotaceae	Antimelanogênica, inibidor da enzima tirosinase	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Solanum tuberosum</i> , Solanaceae		King & Calhoun, 2005
<i>Beta vulgaris</i> , Chenopodiaceae	Inibidor da síntese de NO	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Lindera glauca</i> , Lauraceae		Chang <i>et al.</i> , 2001
<i>Tinospora tuberculata</i> , Menispermaceae		Fukuda <i>et al.</i> , 1983
<i>Capsicum annuum</i> , Solanaceae		Yoshihara <i>et al.</i> , 1981

Figura 77 – Estrutura da amida *N-cis-feruloiltiramina* (2), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

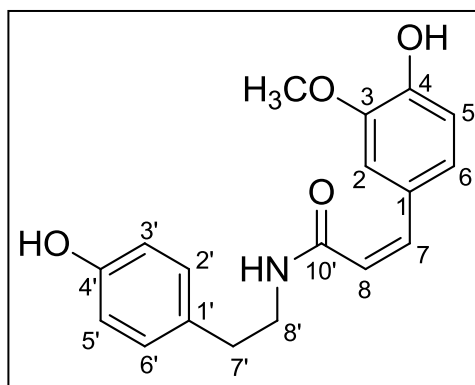


Figura 78 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração D-1, identificado como a amida *N-cis-feruloiltiramina* (2).

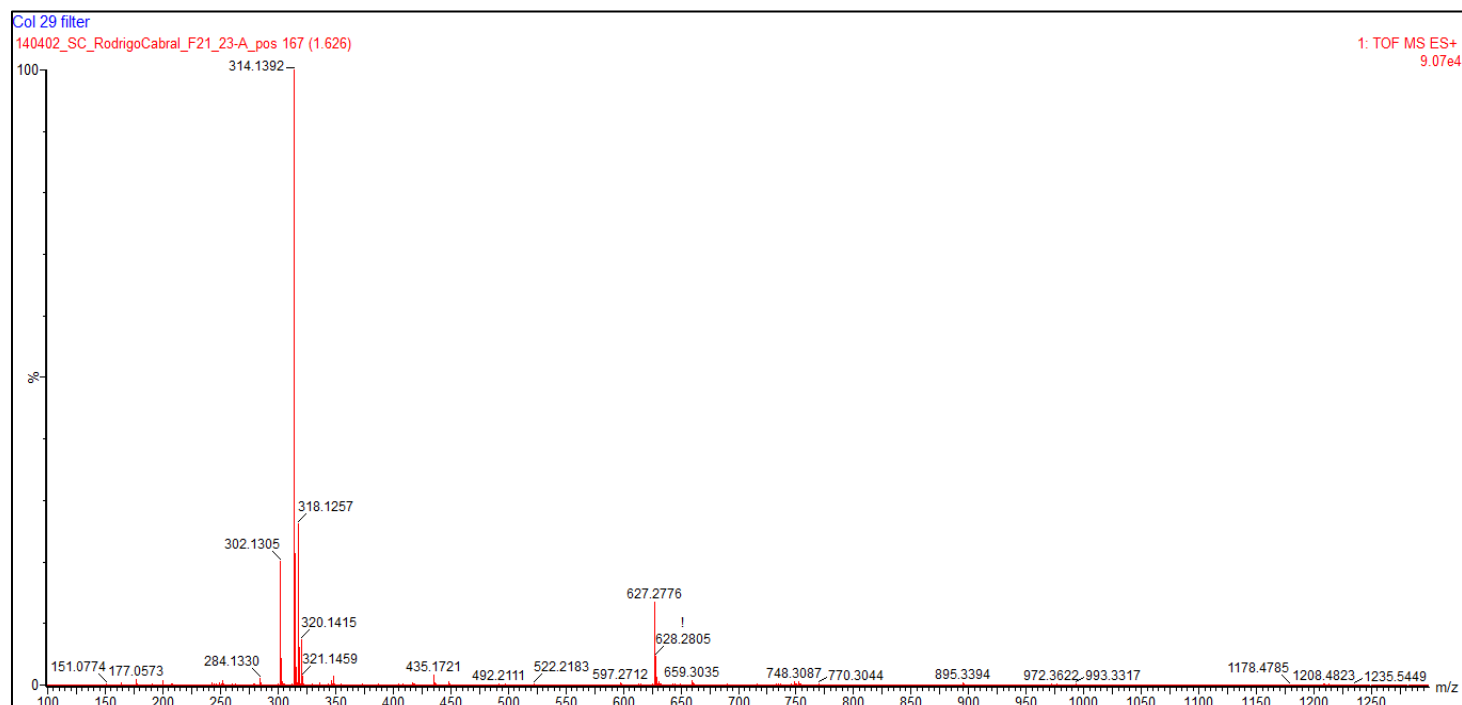


Figura 79 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida *N*-cis-feruloiltiramina (2).

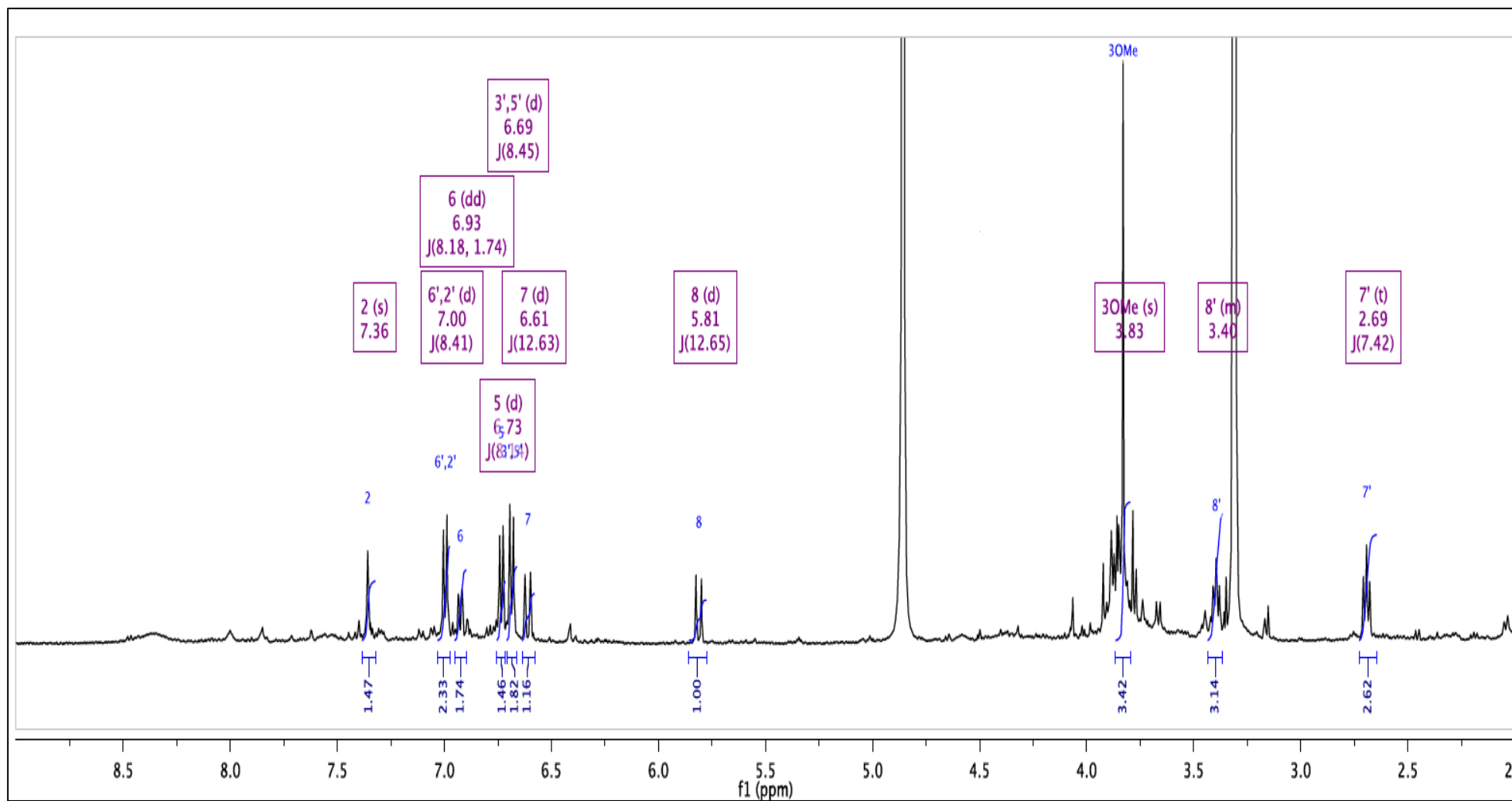


Figura 80 – Comparação entre os espectros de NMR ^1H da amida *N-cis*-Feruloiltiramina. **A** - composto isolado do extrato DCM RJ; **B** - espectro da amida *N-cis*-Feruloiltiramina consultado na literatura (King & Calhoun, 2005).

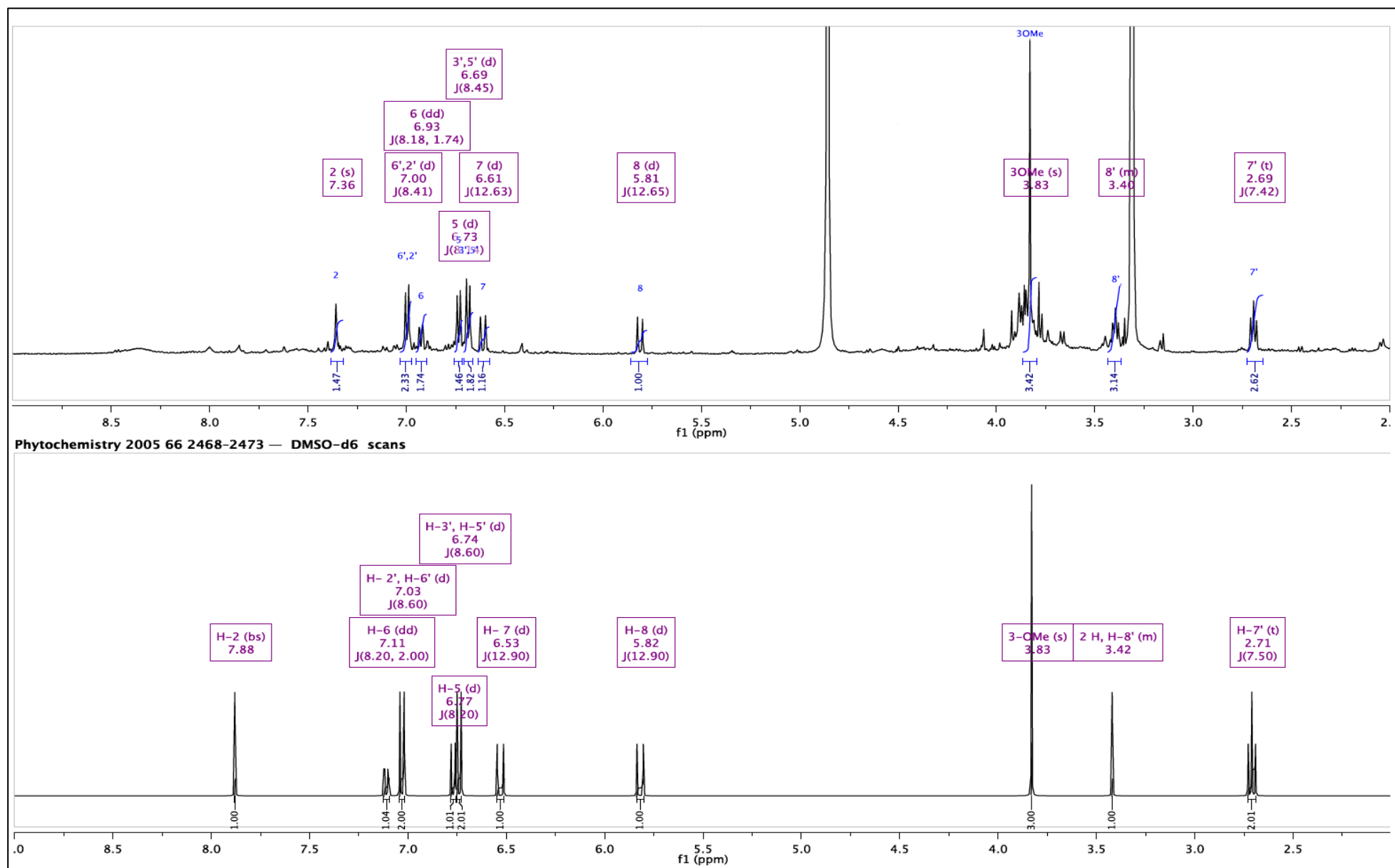


Figura 81 – Mapa de contorno *g*COSY da *N*-*cis*-feruloiltiramina (5).

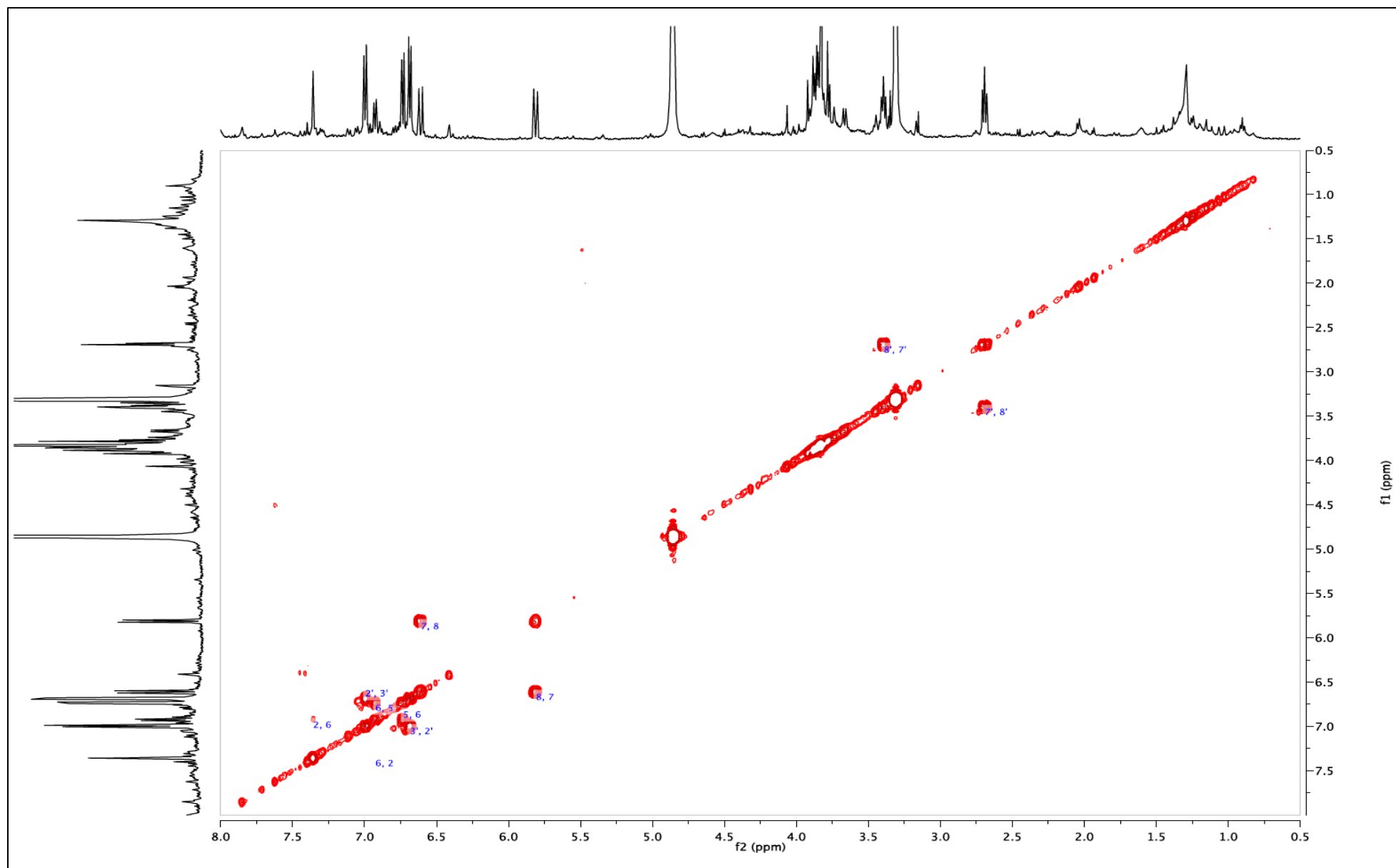


Figura 82 – Mapa de contorno NOESY da *N-cis-feruloiltiramina* (2).

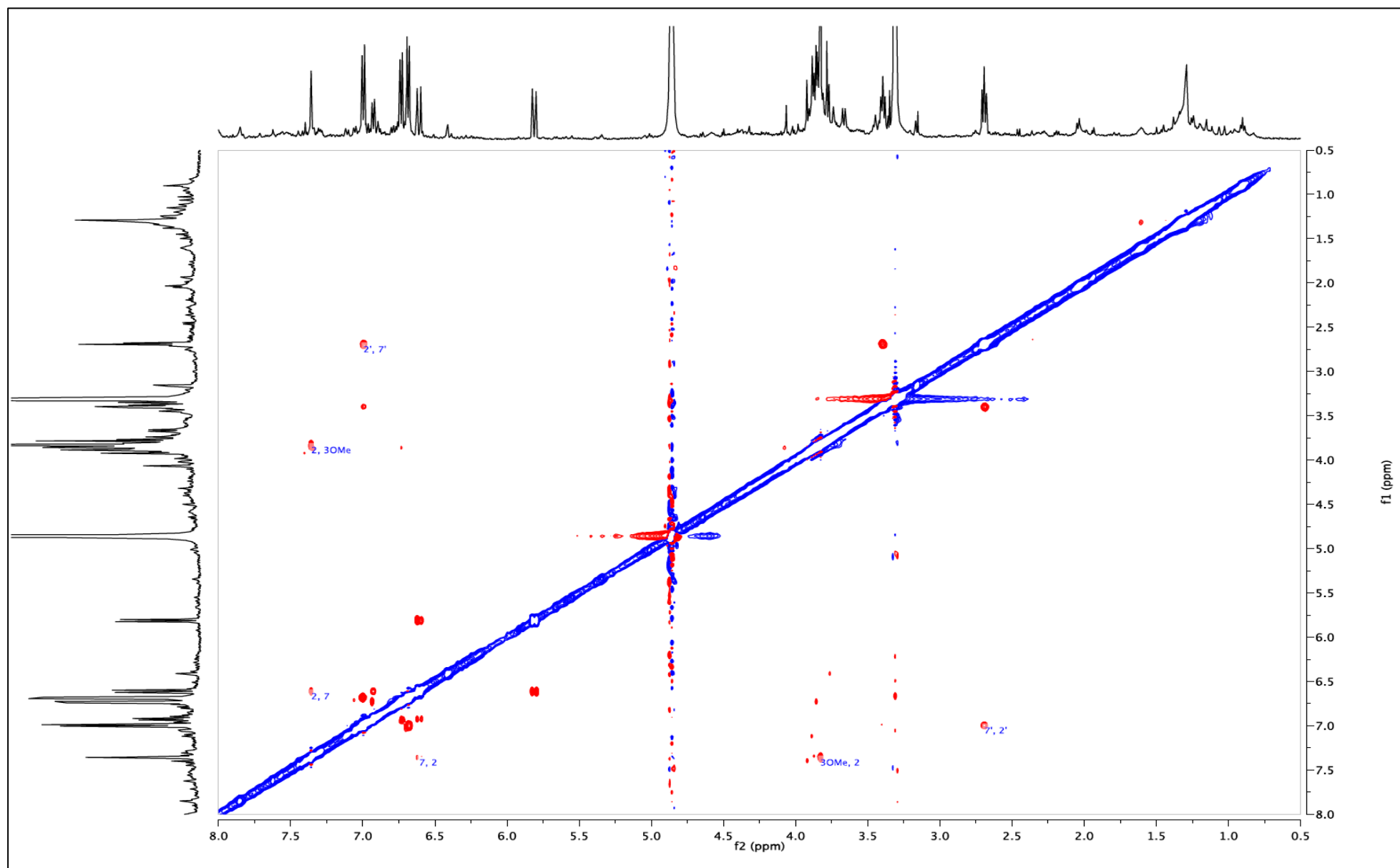


Tabela 22 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para a amida *N-cis-feruloiltiramina* (**2**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 2 (<i>N-cis-feruloiltiramina</i>)	Literatura*	Literatura**
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})
1	-	-	-
2	7.36 (s)	7.36 (d; 2.0)	7.88 (s)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	6.73 (d; 8.1)	6.73 (d; 8.0)	6.77 (d; 8.2)
6	6.93 (dd; 8.1, 1.7)	6.92 (dd; 8.0, 2.0)	7.11 (dd; 8.2, 2.0)
7	6.61 (d; 12.6)	6.62 (d; 12.6)	6.53 (d; 12.9)
8	5.81 (d; 12.6)	5.81 (d; 12.6)	5.82 (d; 12.9)
1'	-	-	-
2'	7.00 (d; 8.4)	7.00 (d; 8.4)	7.03 (d; 8.6)
3'	6.69 (d; 8.4)	6.68 (d; 8.4)	6.74 (d; 8.6)
4'	-	-	-
5'	6.69 (d; 8.4)	6.68 (d; 8.4)	6.74 (d; 8.6)
6'	7.00 (d; 8.4)	7.00 (d; 8.4)	7.03 (d; 8.6)
7'	2.69 (t; 7.4)	2.67 (t; 7.7)	2.71 (t; 7.5)
8'	3.40 (m)	3.40 (t, 7.7)	3.42 (m)
Me O-C (3)	3.83 (s)	3.83 (s)	3.83 (s)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Chang, *et al.*, 2001*

King & Calhoun, 2005**

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração E-1

O composto presente na fração E-1 (17,2 mg) foi obtido como um sólido amorfo, solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS). A **Tabela 23** abaixo apresenta os resultados obtidos por NMR.

A análise por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$) apresentou pico em m/z de 284,1289, compatível com a fórmula $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ ($\Delta\text{ppm} = 0,7$), o que corrobora com a estrutura proposta, a amida *N-trans-cumaroiltiramina* (**paprazina, composto 3**) (**Figura 89**). A identificação foi confirmada através da comparação dos dados espectrais obtidos com os presentes na literatura (Treeratanapiboon *et al.*, 2011). Esta amida já foi descrita anteriormente na espécie *Conchocarpus gaudichaudianus* (Cortez *et al.*, 2009). A **Tabela 24** apresenta espécies onde a amida paprazina é acumulada e algumas atividades biológicas relatadas.

Figura 83 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração E-1, identificado como a amida paprazina (**3**).

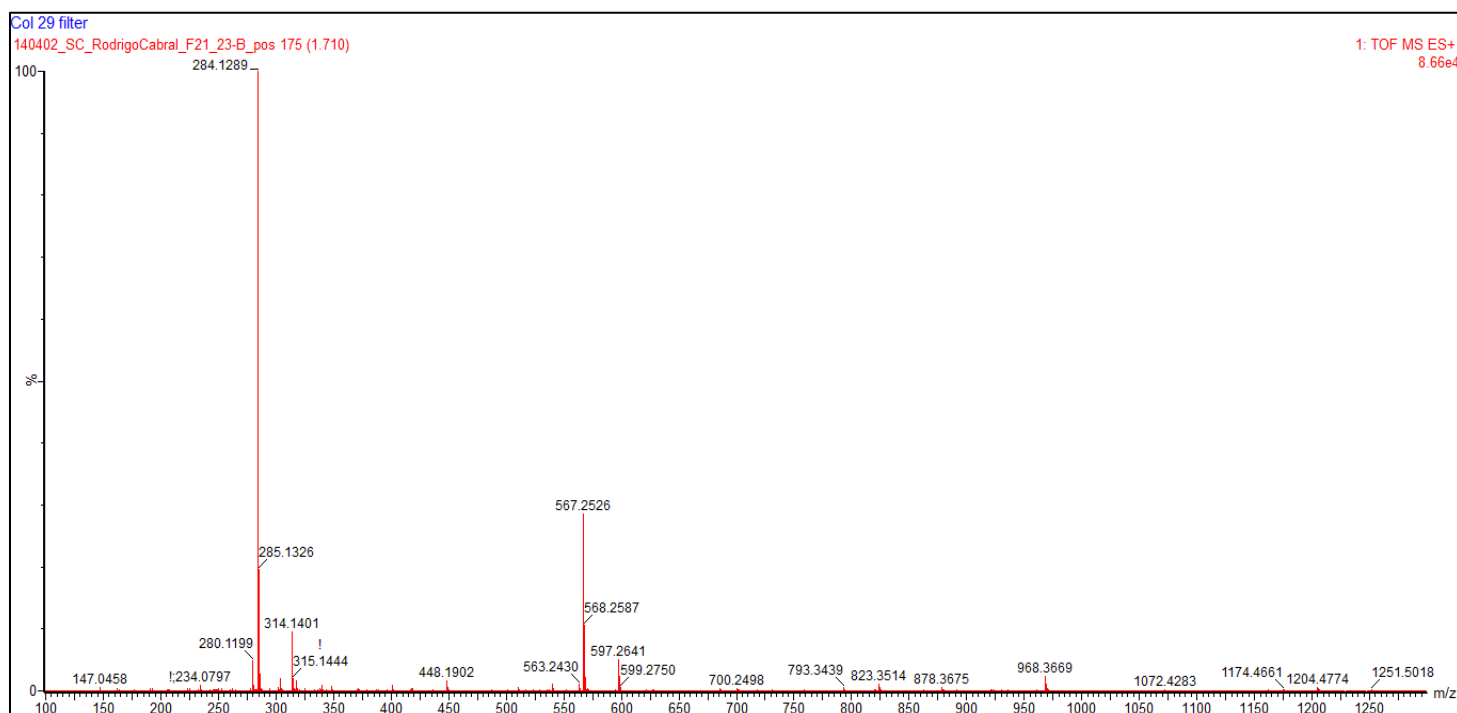


Figura 84 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida paprazina (**3**).

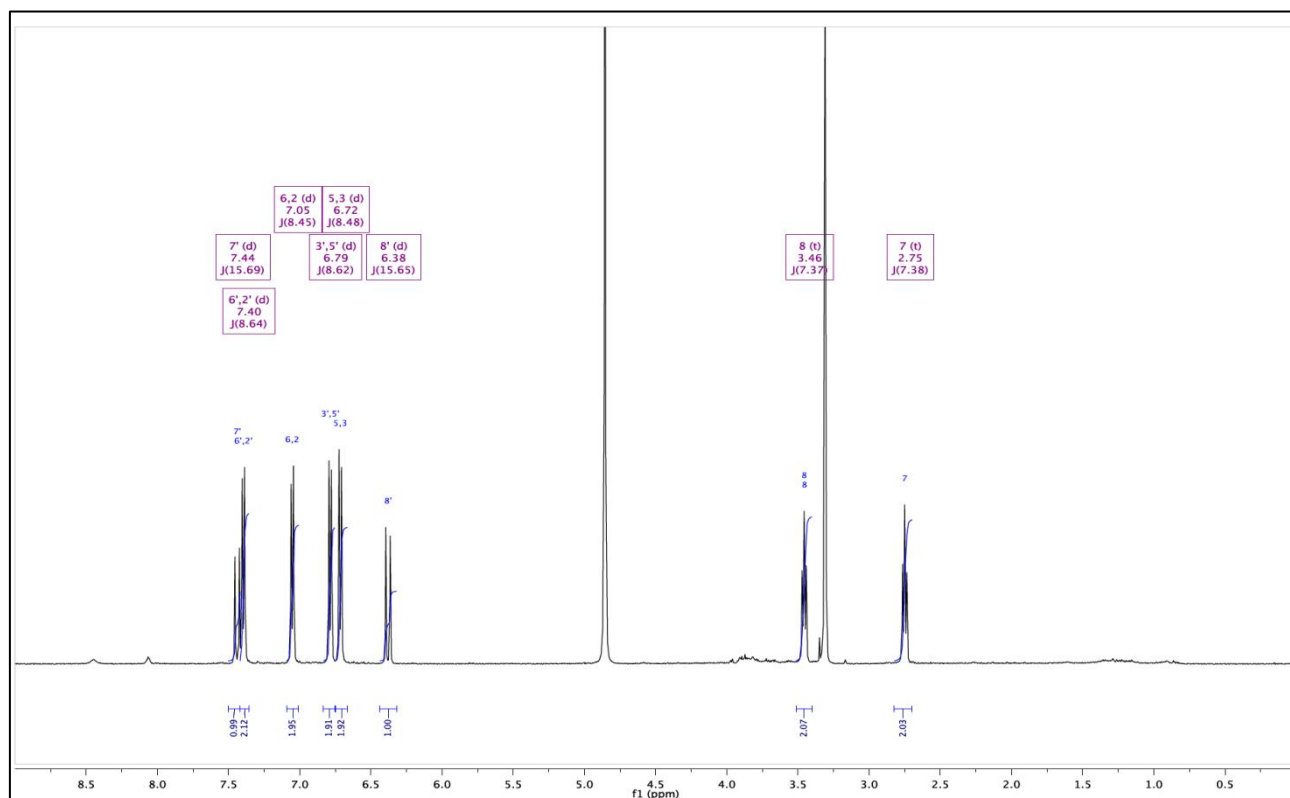


Figura 85 – Mapa de contorno *g*COSY da amida paprazina (**3**).

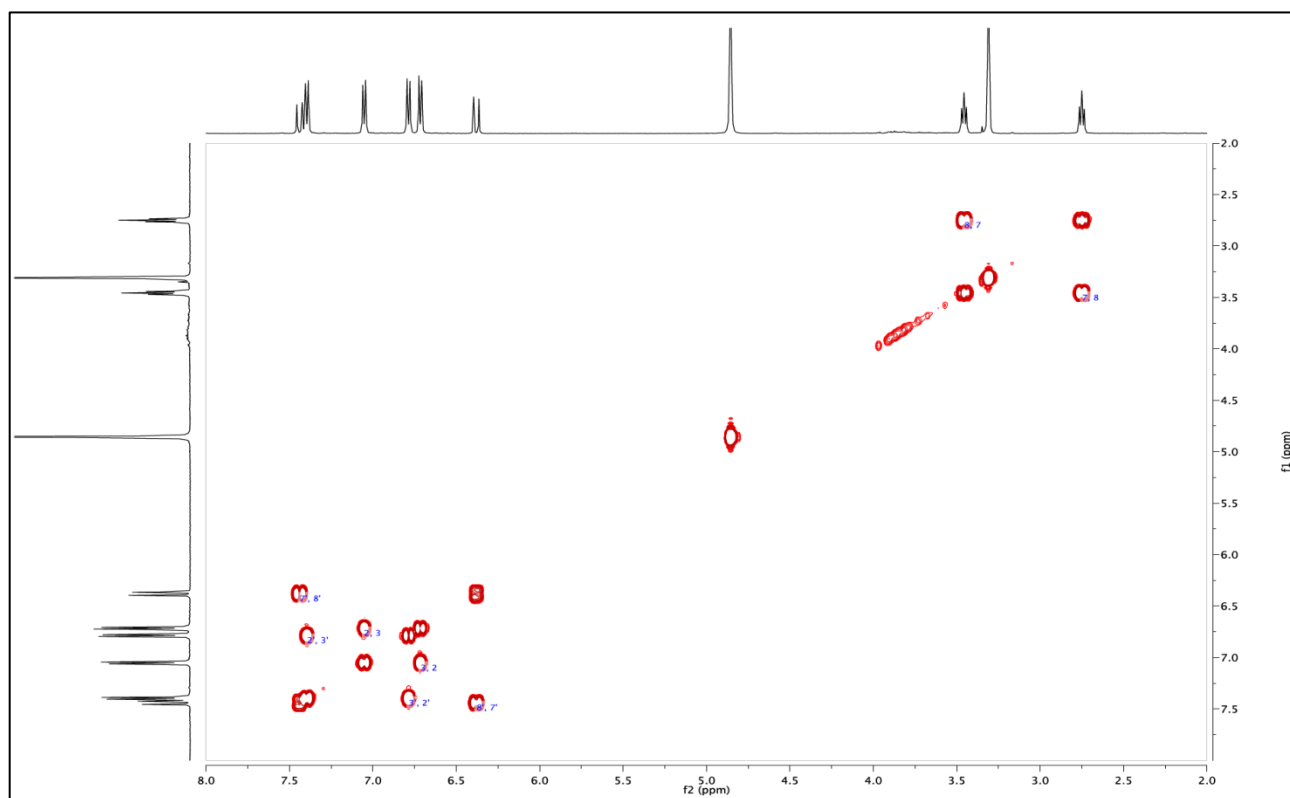


Figura 86 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amida paprazina (**3**).

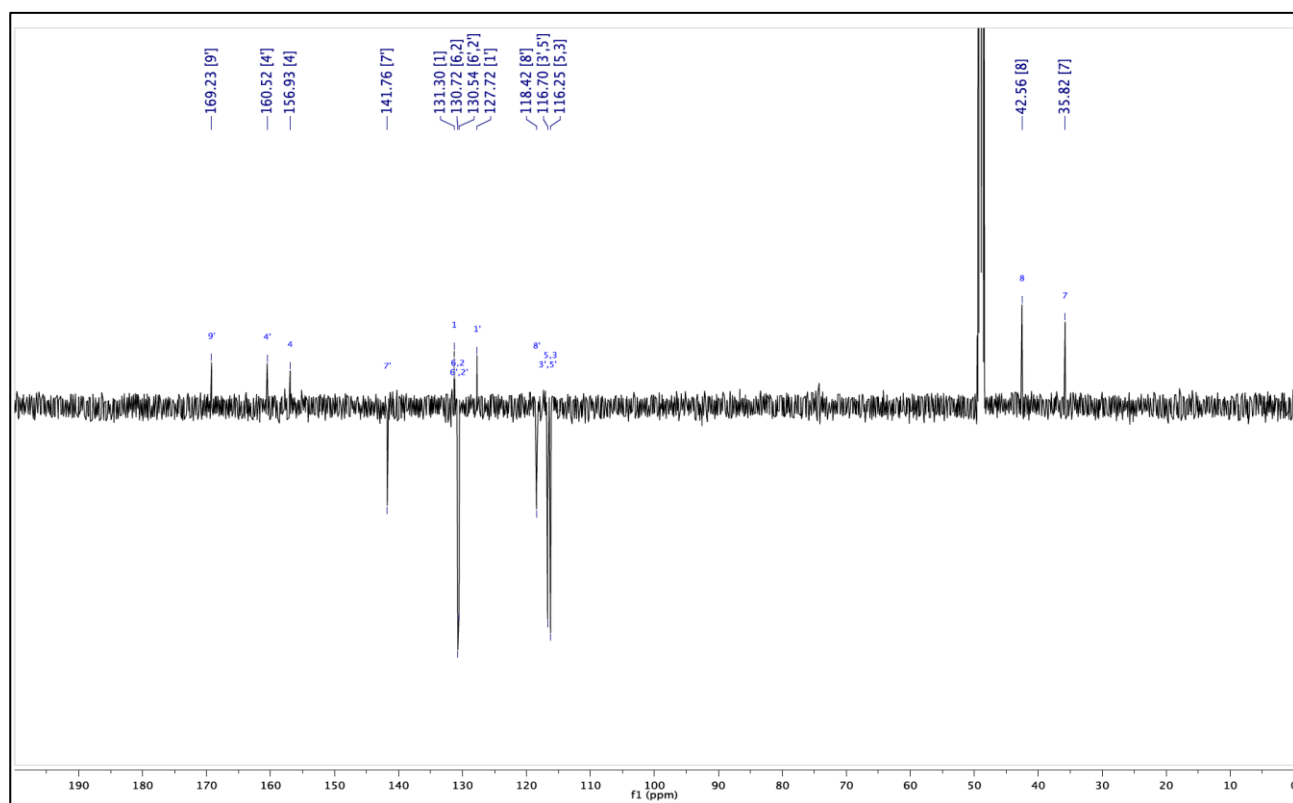


Figura 87 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da amida paprazina (**3**).

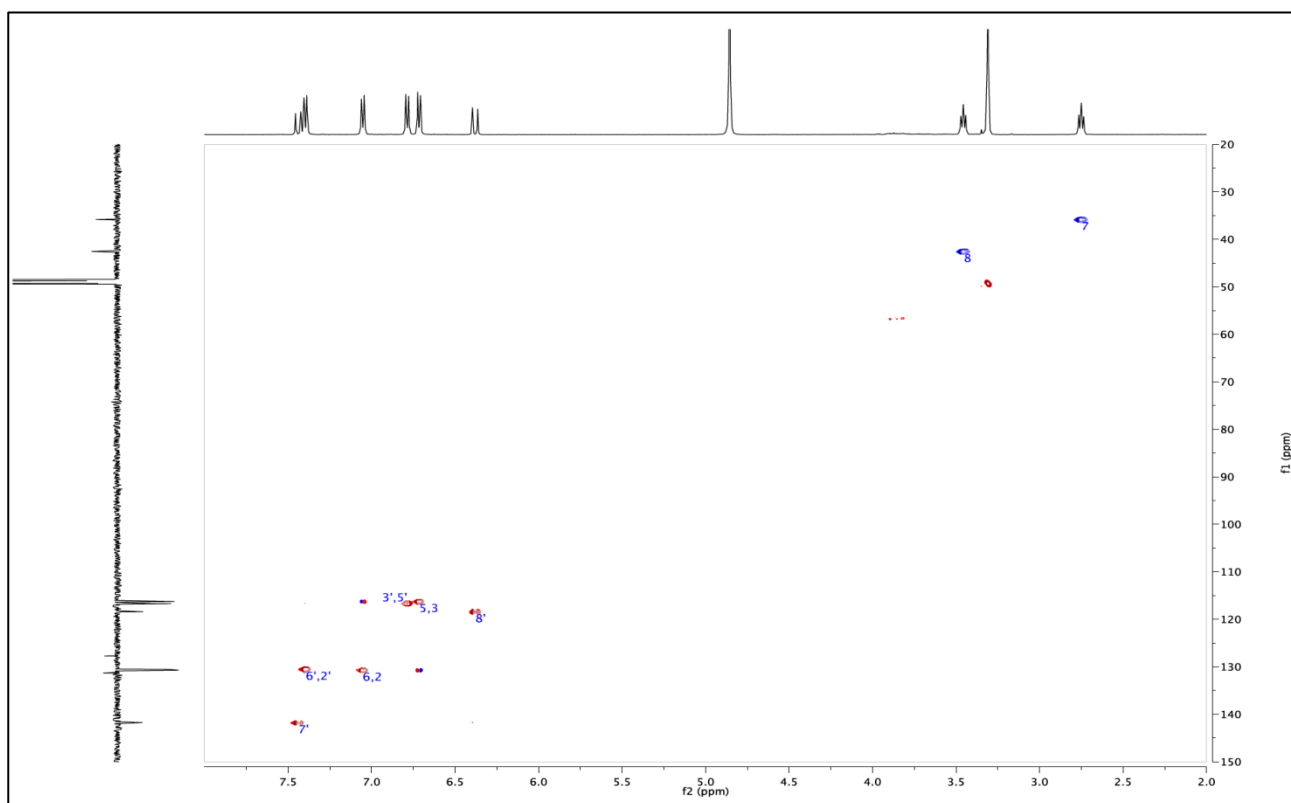


Figura 88 – Mapa de contorno *g*HMBC da amida paprazina (**3**).

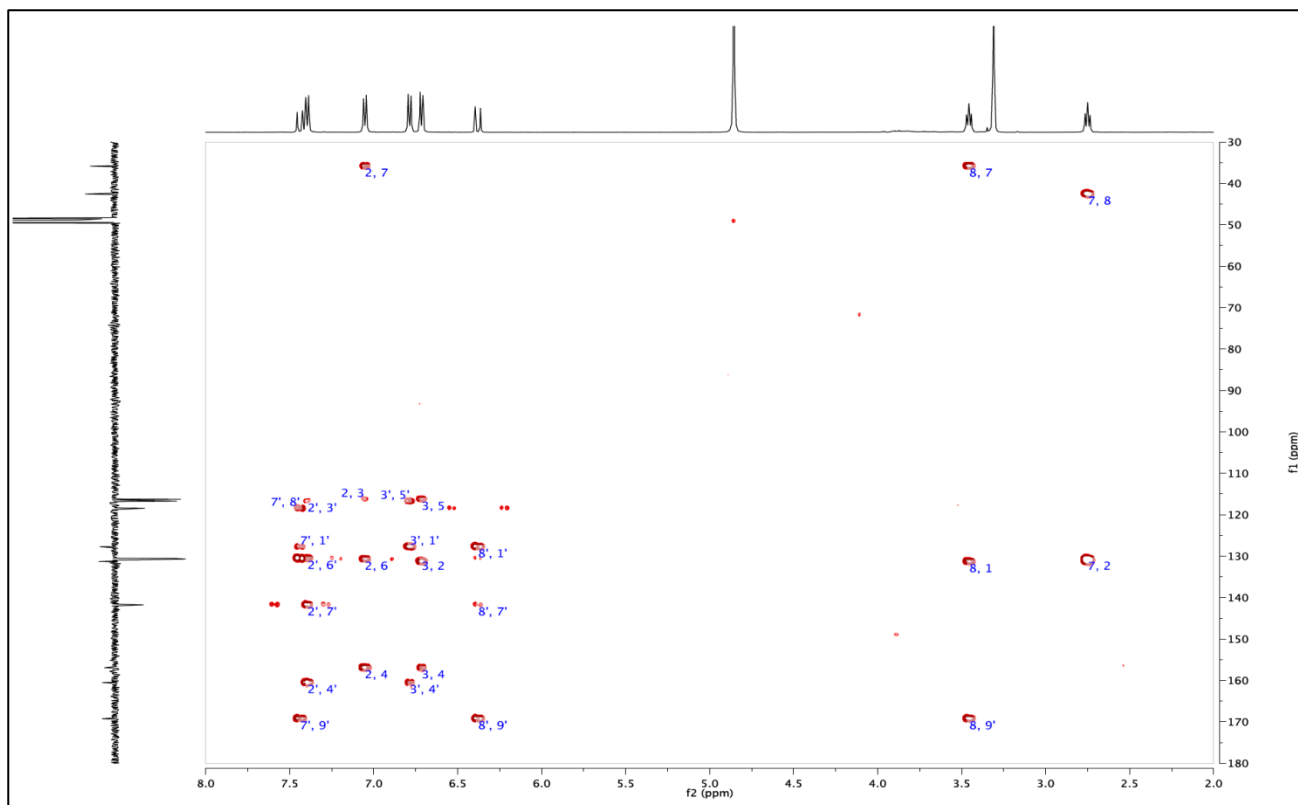


Tabela 23 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a amida paprazina (**3**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 3 (paprazina)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^{\text{b}}; J^{\text{c}}$)	δ_{C} (ppm)
1	-	131.3	-	131.2
2	7.05 (d; 8.4)	130.7	7.04 (d; 8.5)	130.6
3	6.72 (d; 8.4)	116.2	6.72 (d; 8.5)	116.2
4	-	156.9	-	156.7
5	6.72 (d; 8.4)	116.2	6.72 (d; 8.5)	116.2
6	7.05 (d; 8.4)	130.7	7.04 (d; 8.5)	130.6
7	2.75 (t; 7.3)	35.8	2.75 (t; 7.4)	35.7
8	3.46 (t; 7.3)	42.5	3.46 (t; 7.4)	42.4
1'	-	127.7	-	127.6
2'	7.40 (d; 8.6)	130.5	7.39 (d; 8.6)	130.4
3'	6.79 (d; 8.6)	116.7	6.78 (d; 8.6)	116.6
4'	-	160.5	-	160.3
5'	6.79 (d; 8.6)	116.7	6.78 (d; 8.6)	116.6
6'	7.40 (d; 8.6)	130.5	7.39 (d; 8.6)	130.4
7'	7.44 (d; 15.6)	141.7	7.44 (d; 15.7)	141.7
8'	6.38 (d; 15.6)	118.4	6.37 (d; 15.7)	118.3
9' (C=O)	-	169.2	-	169.1

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ) Treeratanapiboon *et al.*, 2011*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Figura 89 – Estrutura da amida paprazina (**3**), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

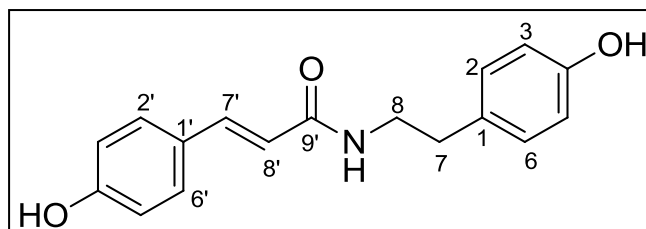


Tabela 24 – Espécies que acumulam a amida paprazina (**3**) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Dendrobium devonianum</i> , Orchidaceae		Sun <i>et al.</i> , 2014
<i>Tinospora crispa</i> , Menispermaceae	Anticâncer	Rahman & Khan, 2013
<i>Polyalthia cerasoides</i> , Annonaceae		Treeratanapiboon <i>et al.</i> , 2011
<i>Conchocarpus gaudichaudianus</i> , Rutaceae		Cortez <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper nigrum</i> , Piperaceae		Ee <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper sarmentosum</i> , Piperaceae		Ee <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper umbellatum</i> , Piperaceae	Antioxidante	Tabopda <i>et al.</i> , 2008
<i>Trema orientales</i> , Ulmaceae		Kuo <i>et al.</i> , 2007
<i>Solanum indicum</i> , Solanaceae		Syu <i>et al.</i> , 2001
<i>Fumaria indica</i> , Papaveraceae		Rahman <i>et al.</i> , 1992
<i>Asimina triloba</i> , Annonaceae	Citotóxica	Zhao <i>et al.</i> , 1992
<i>Capsicum annuum</i> , Solanaceae		Yoshihara <i>et al.</i> , 1981
<i>Solanum melongena</i> , Solanaceae		Yoshihara <i>et al.</i> , 1978

Fração E-2

O composto presente na Fração E-2 (1,7 mg) foi obtido como um sólido amorfo e solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS).

A análise por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 247,0972, compatível com a fórmula $C_{14}H_{14}O_4$ ($\Delta ppm = 0,8$). Na **Tabela 25** estão apresentados os dados de NMR de 1H do composto isolado e os dados de comparação com a literatura (Razavi *et al.*, 2013). O alfa-D para esta fração apresentou valor de $-6,6$ (c 1,0; MeOH). Através da comparação dos dados obtidos, com aqueles presentes na literatura foi possível caracterizar o composto presente na Fração E-2 como a piranocumarina linear (-)-**aegelinol** (composto **6**) (**Figura 90**).

Figura 90 – Estrutura da piranocumarina linear aegelinol (**6**), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

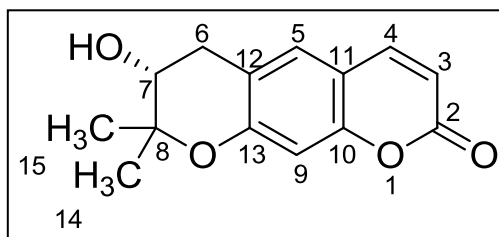


Tabela 25 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o aegelinol (**6**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 6 (aegelinol)	Literatura*
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})
1	-	-
2	-	-
3	6.19 (d; 9.4)	6.18 (d; 9.4)
4	7.85 (d; 9.4)	7.58 (d; 9.4)
5	7.40 (s)	7.21 (s)
6	3.24 (dd; 8.7)	3.22 (dd; 6.1)
7	4.75 (t; 8.7)	4.73 (t)
8	-	-
9	6.72 (s)	6.70 (s)
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	1.29 (s)	1.37 (s)
15	1.23 (s)	1.27 (s)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ) Razavi *et al.*, 2013*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Figura 91 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração E-2, identificado como a piranocumarina linear (-)-aegelinol (**6**).

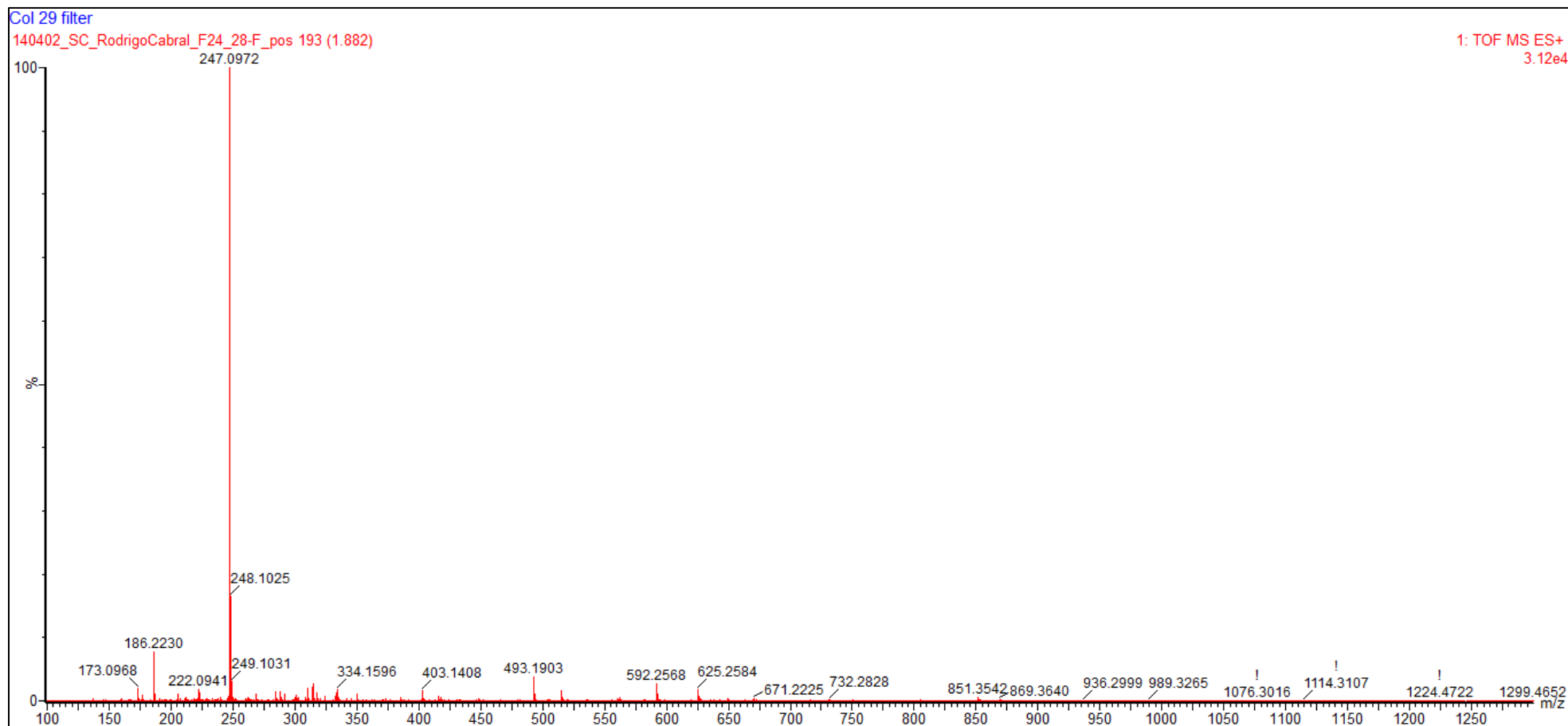


Figura 92 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da piranocumarina linear (-)-aegelinol (**6**).

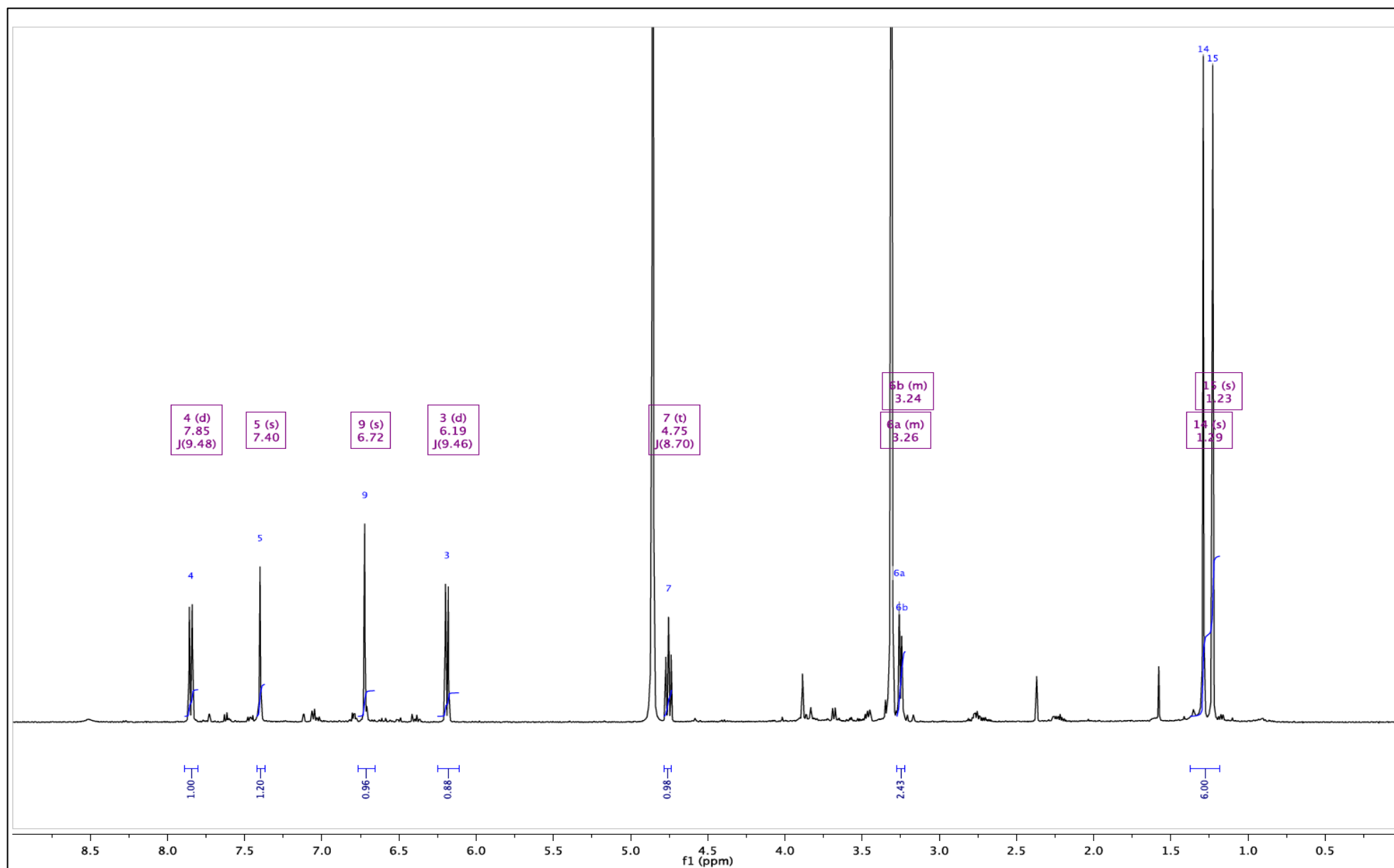


Figura 93 – Mapa de contorno *g*COSY do aegelinol (**6**).

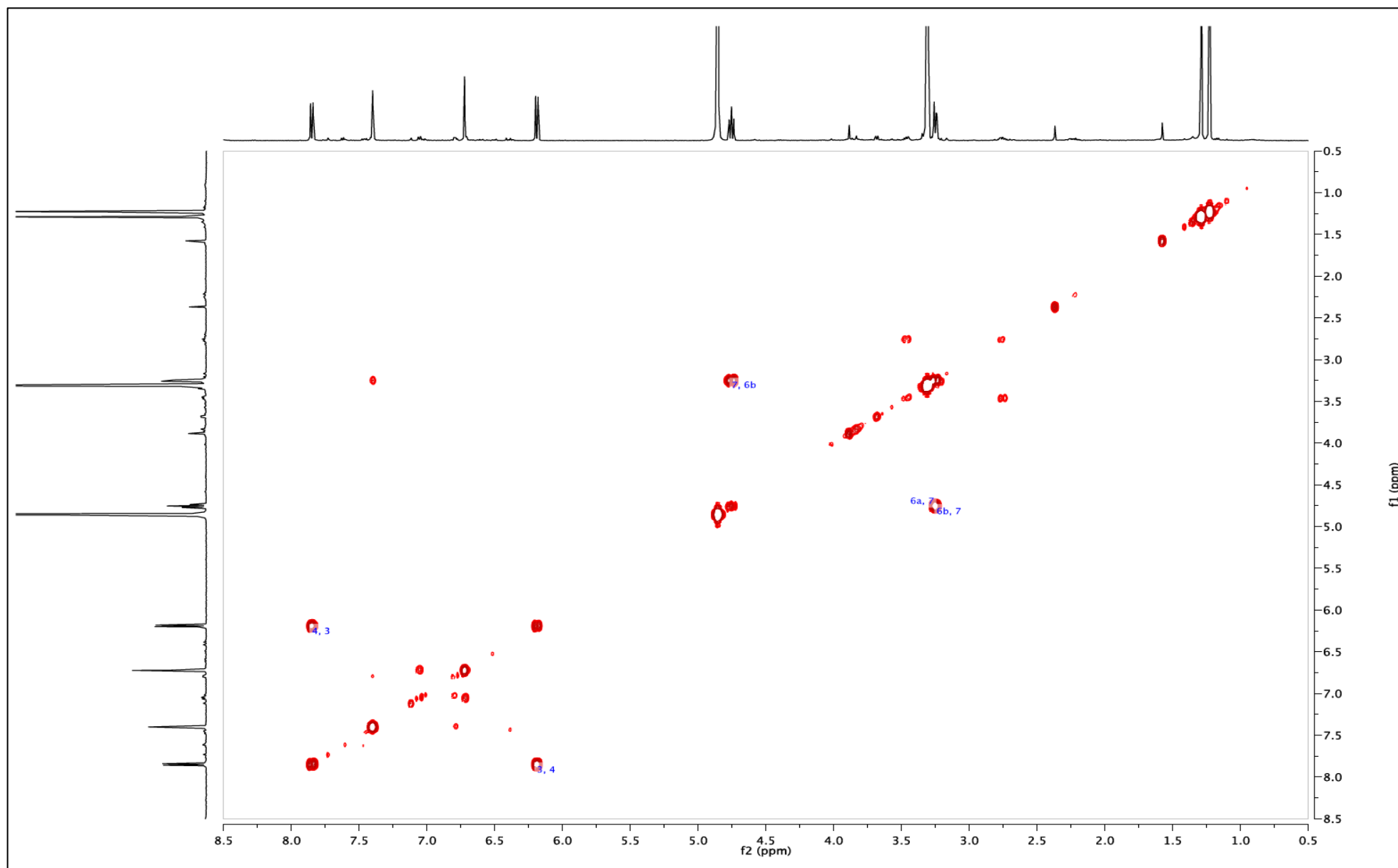
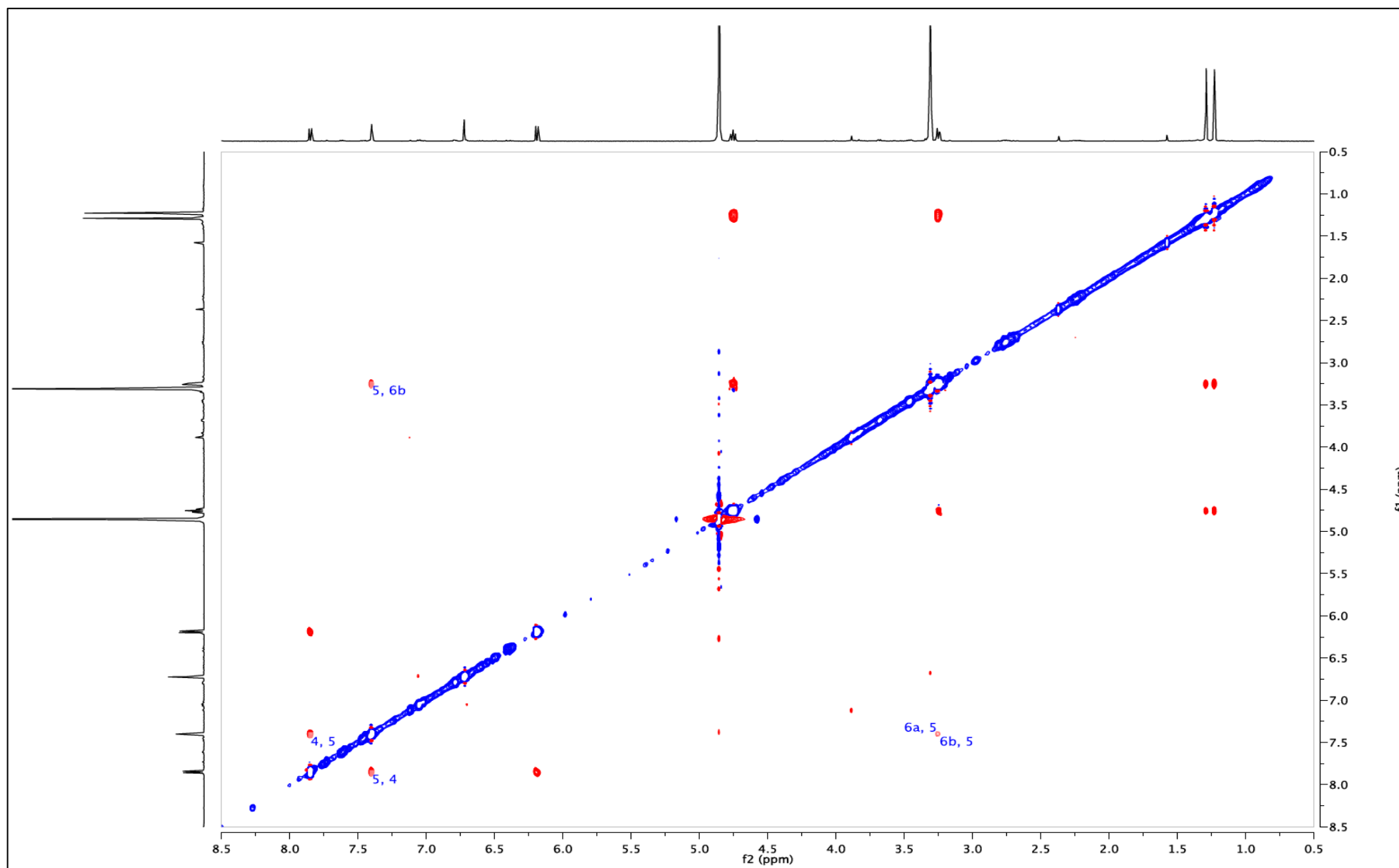


Figura 94 – Mapa de contorno NOESY do aegelinol (**6**).



A **Tabela 26** apresenta algumas espécies em que o aegelinol é acumulado e algumas atividades descritas para este composto.

Tabela 26 – Espécies que acumulam o (-)-aegelinol (**6**) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Zosima absinthifolia</i> , Apiaceae		Razavi <i>et al.</i> , 2013
<i>Cleome viscosa</i> , Capparidaceae		Almahy & Alagimi, 2012
<i>Ferulago campestris</i> , Apiaceae	Antibacteriana	Basile <i>et al.</i> , 2009; Rosselli <i>et al.</i> , 2009
<i>Ferulago asparagifolia</i> , Apiaceae		Alkhatib <i>et al.</i> , 2009
<i>Aegle marmelos</i> , Rutaceae		Chatterjee <i>et al.</i> , 1978

O aegelinol (**composto 6**) é um metabólito secundário encontrado em diversas espécies, incluindo as da família Rutaceae, porém este é o primeiro relato no gênero *Conchocarpus*.

Fração F-1

O composto presente na Fração F-1 (5,2 mg) foi obtido como um sólido amorfo e solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS).

A análise por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 246,0759, compatível com a fórmula $C_{13}H_{11}NO_4$ ($\Delta ppm = -2,8$). Na **Tabela 27** estão apresentados os dados de NMR de 1H do composto isolado e os dados de comparação com a literatura (Razakova *et al.*, 1983). A comparação dos resultados obtidos, com aqueles presentes na literatura possibilitou a caracterização do composto presente na Fração F-1 como o alcaloide furoquinolínico 7-hidroxi-4,8-dimetoxifuranoquinolina (**haplopina, composto 7**) (**Figura 98**).

Figura 95 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração F-1, identificado como o alcaloide furoquinolínico haplopina (7).

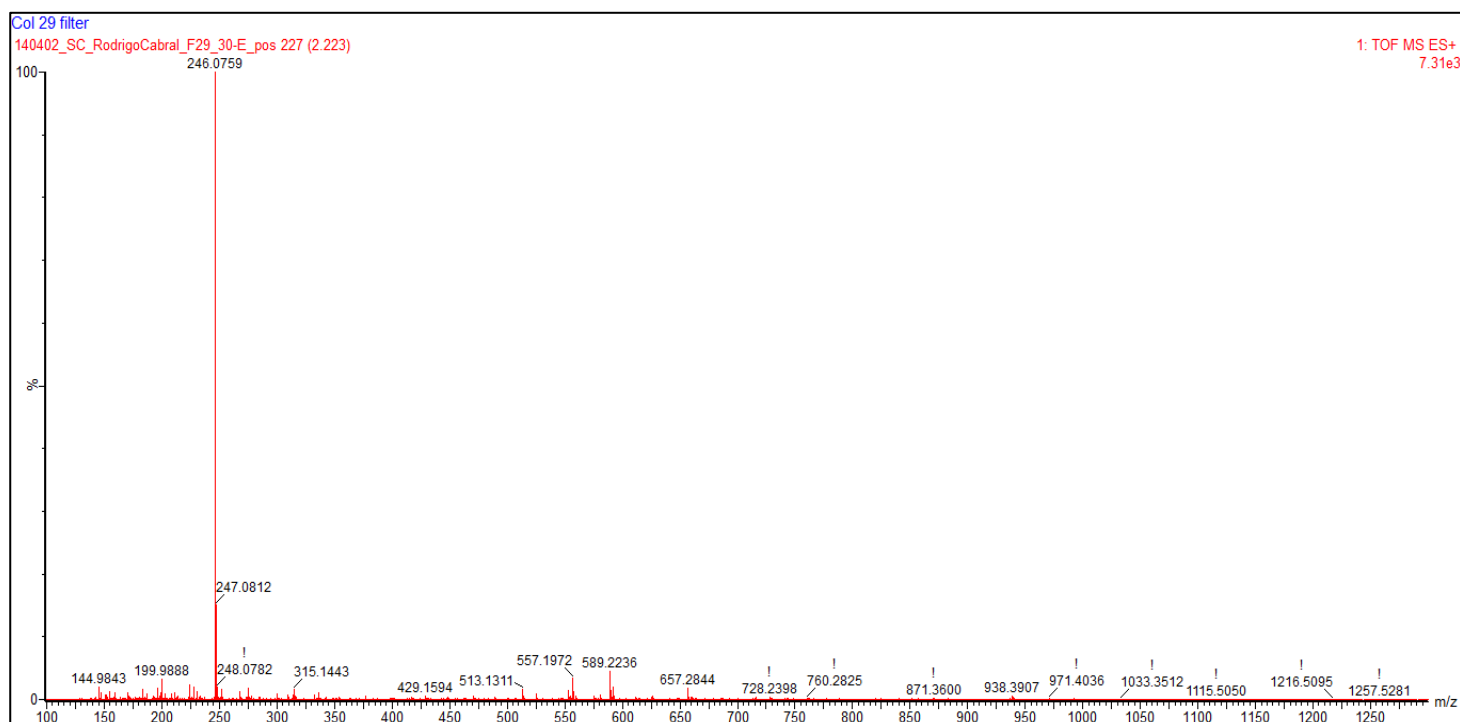


Figura 96 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide furoquinolínico haplopina (7).

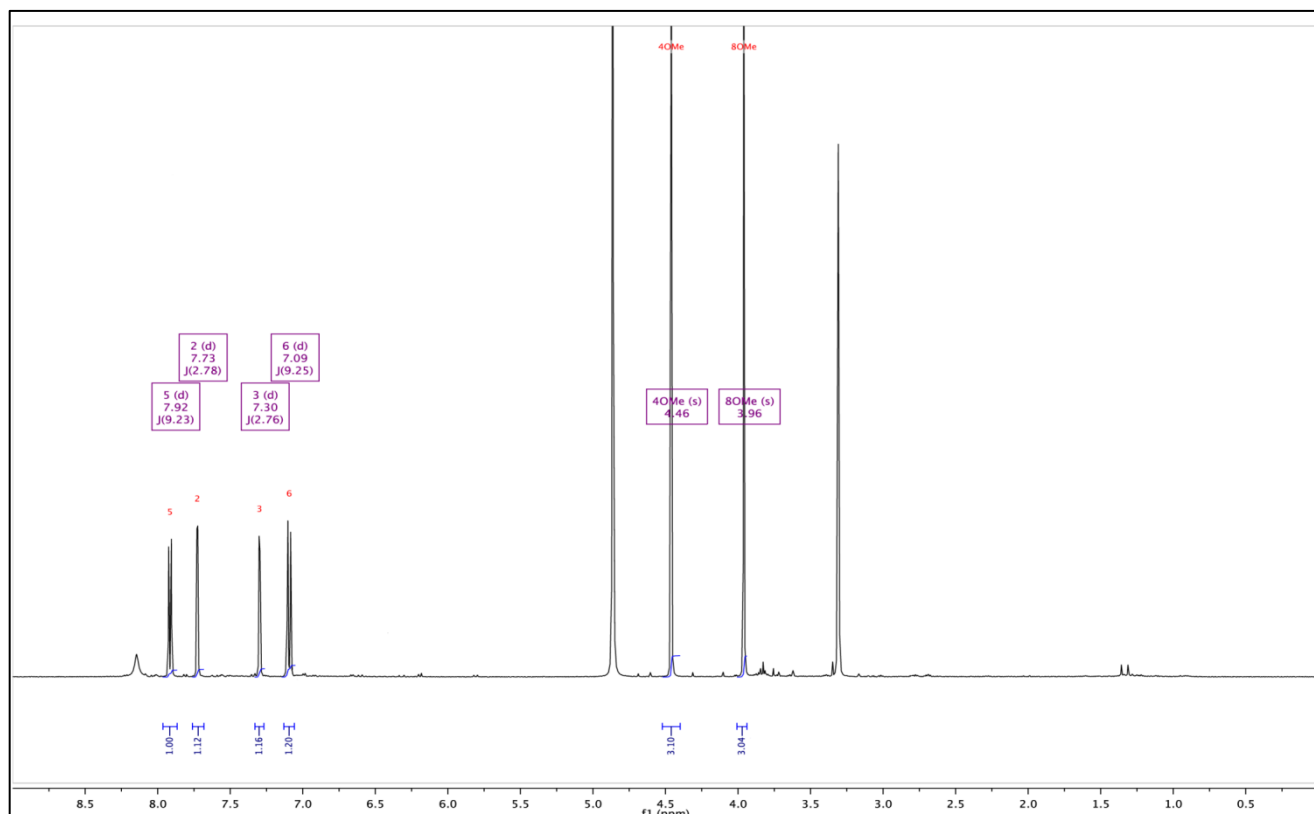


Figura 97 – Mapa de contorno *g*COSY da haplopina (7).

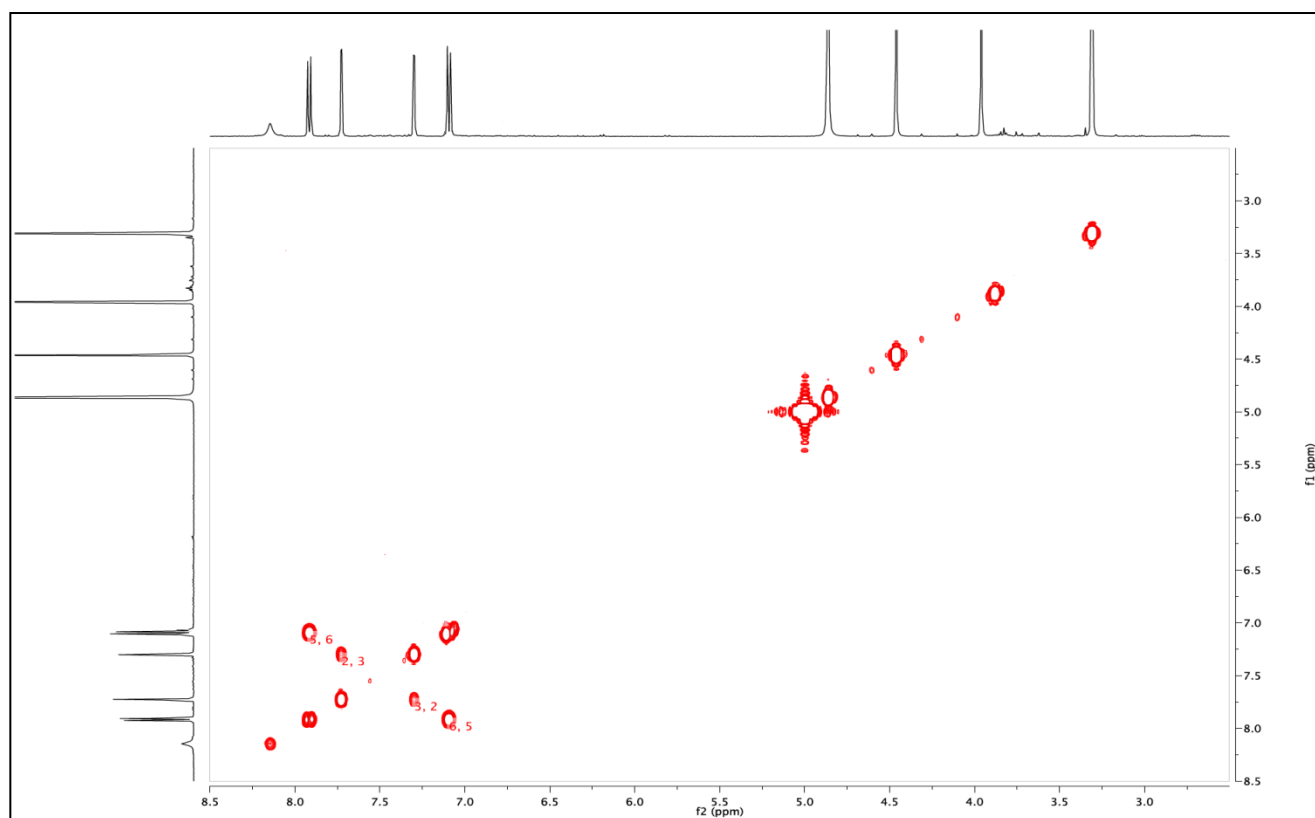


Figura 98 – Estrutura do alcaloide haplopina (7), isolado dos ramos de *C. fontanesianus*.

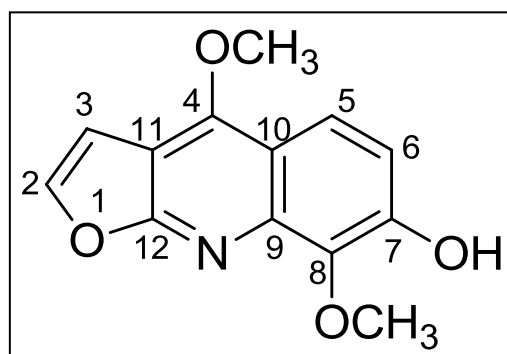


Tabela 27 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o alcaloide haplopina (**7**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 7 (haplopina)	Literatura*
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})
1	-	-
2	7.73 (d; 2.7)	7.39 (d; 3.0)
3	7.30 (d; 2.7)	7.08 (d; 3.0)
4	-	-
5	7.92 (d; 9.2)	7.79 (d; 9.0)
6	7.09 (d; 9.2)	7.05 (d; 9.0)
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
Me O-C (4)	3.95 (s)	3.76 (s)
Me O-C (8)	4.46 (s)	4.31 (s)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Razakova *et al.*, 1983*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Este alcaloide é amplamente encontrado na família Rutaceae, nos gêneros *Haplophyllum* e *Zanthoxylum* (Akhmedjanova *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2005; Nazrullaev *et al.*, 2001; Güzler *et al.*, 1995; Bessone *et al.*, 1986; Boulware *et al.*, 1981), além de espécies como *Melicope semecarpifolia*, *Dutailleya baudouinii*, *Oricia suaveolens*, e *Skimmia reevesiana* (Wansi *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 1995; Muyard *et al.*, 1991; Wondimu, *et al.* 1988; Wu, 1987). Existe relato para este alcaloide de atividade citotóxica e estrogênica (Jansen *et al.*, 2005; Nazrullaev *et al.*, 2001). Esta é a primeira descrição deste alcaloide no gênero *Conchocarpus*.

Fração J-1

O composto presente na Fração J-1 (12,4 mg) foi obtido como um sólido amorfo e solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS).

A análise por UPLC-TOF-MS (**Figura 99**) no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$) apresentou pico em m/z 260,0919, compatível com a fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ($\Delta\text{ppm} = -1,5$). Na **Tabela 29**

estão apresentados os dados de NMR de ^1H do composto isolado e os dados de comparação com a literatura (Robertson, 1963). Por comparação dos resultados obtidos com aqueles presentes na literatura, foi possível caracterizar a substância presente na Fração J-1 como sendo o alcaloide furoquinolínico 4,7,8-trimetoxi-furo[2,3-*b*]quinolina (**esquimianina, composto 9**) (Figura 101).

Figura 99 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-1, identificado como o alcaloide furoquinolínico esquimianina (**9**).

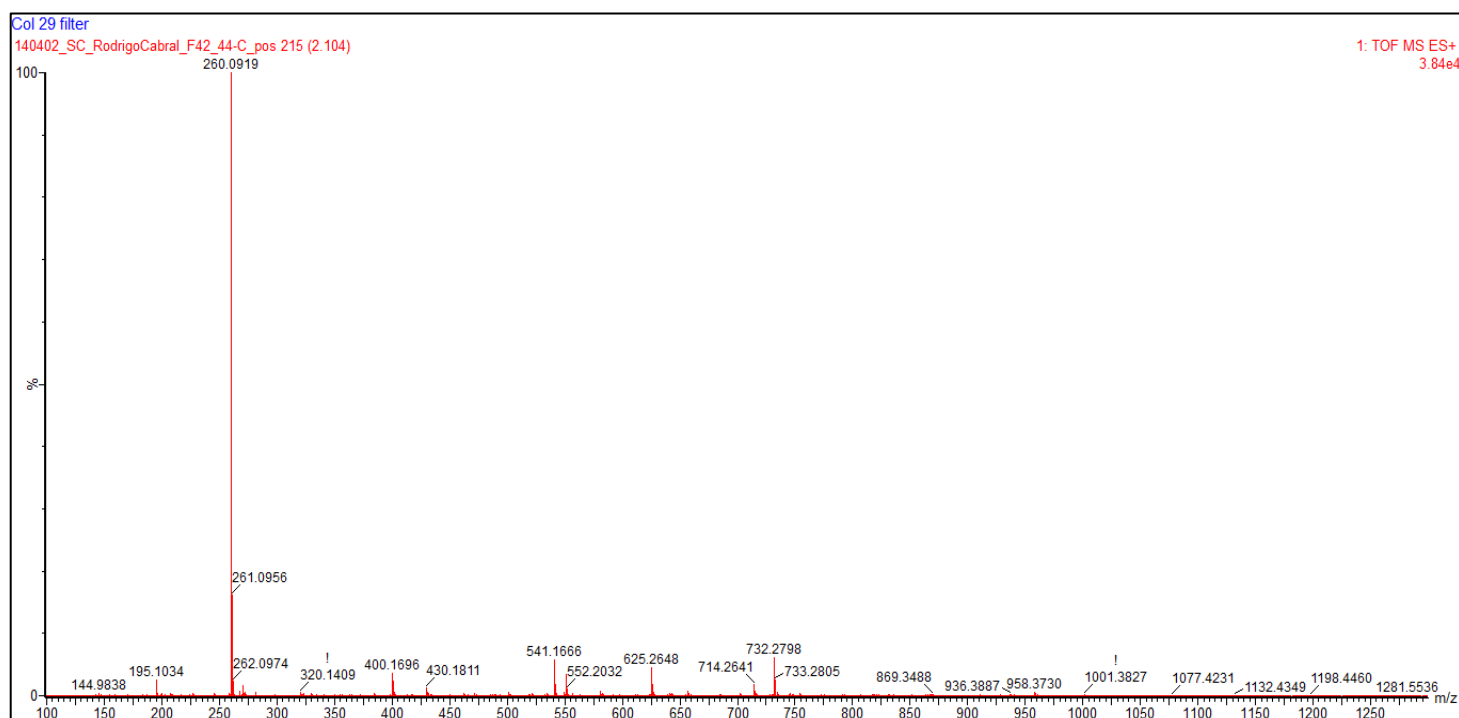


Figura 100 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide furoquinolínico esquimianina (9).

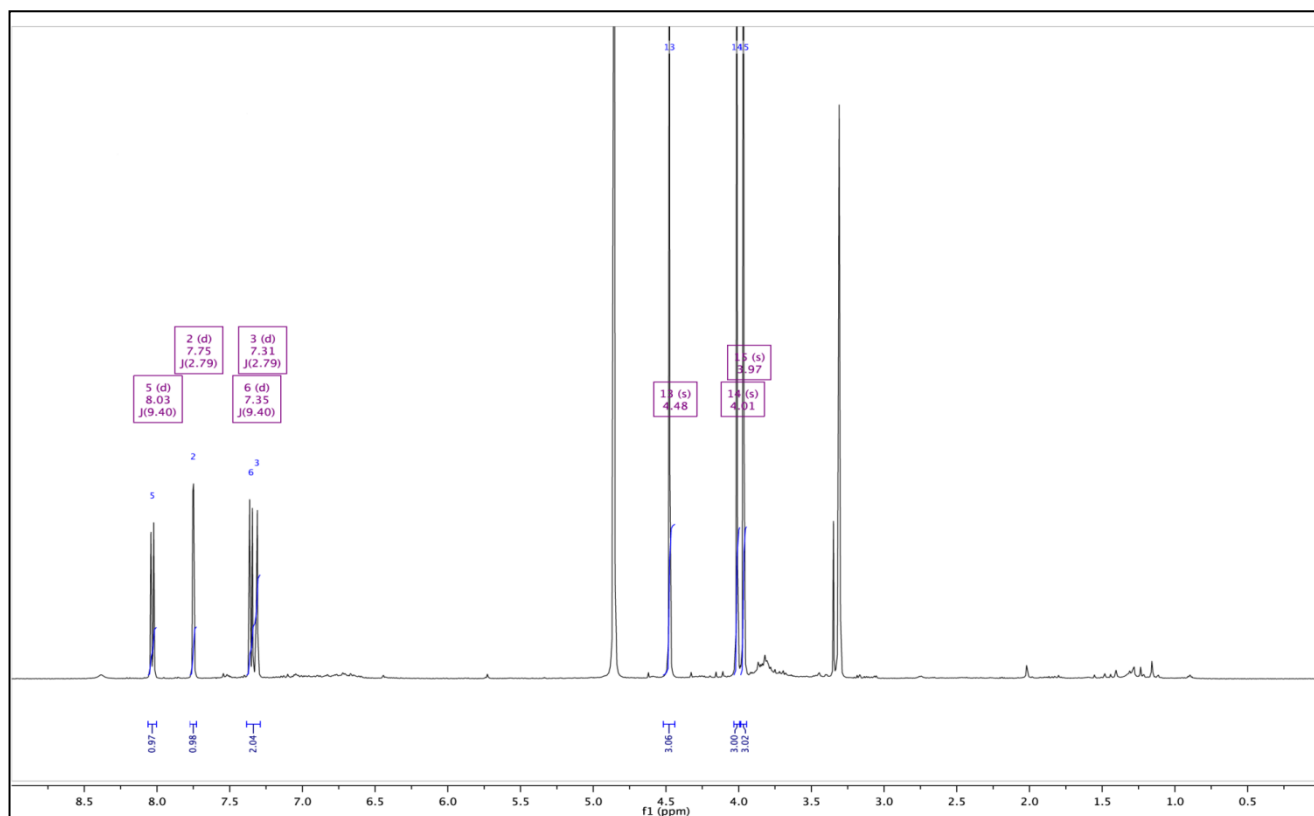


Figura 101 – Estrutura do alcaloide esquimianina (9), isolado dos ramos de *C. fontanesianus*.

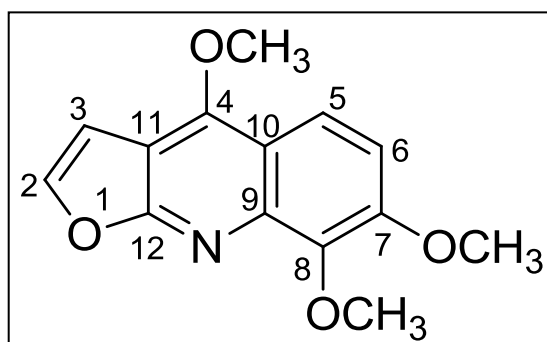


Tabela 29 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o alcaloide esquimianina (**9**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 9 (esquimianina)	Literatura*
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})
1	-	-
2	7.75 (d; 2.7)	7.58 (d; 2.5)
3	7.31 (d; 2.7)	7.05 (d; 2.5)
4	-	-
5	8.03 (d; 9.4)	8.03 (d; 9.0)
6	7.35 (d; 9.4)	7.23 (d; 9.0)
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
MeO-C (4)	3.97 (s)	4.07 (s)
MeO-C (7)	4.01 (s)	4.16 (s)
MeO-C (8)	4.48 (s)	4.46 (s)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Robertson, 1963*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Este alcaloide já havia sido identificado no extrato DCM do lenho (Jureia) através do procedimento de desreplicação. Este é um composto biomarcador da família Rutaceae. A **Tabela 30** abaixo apresenta algumas espécies onde existe o acúmulo deste alcaloide e algumas de suas atividades biológicas já descritas. Entre as atividades já descritas para este alcaloide destaca-se o potencial antagonista de receptores 5-hidroxitriptamínicos em animais (Cheng *et al.*, 1994). Este alcaloide já havia sido isolado anteriormente na espécie *Conchocarpus fontanesianus* (Cabral *et al.*, 2011).

Tabela 30 – Espécies que acumulam o alcaloide esquimianina (9) e suas respectivas atividades biológicas (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Zanthoxylum nitidum</i> , Rutaceae	Inibidor da enzima acetilcolinesterase	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>Conchocarpus fontanesianus</i> , Rutaceae	Inibidor da enzima acetilcolinesterase	Cabral <i>et al.</i> , 2011
<i>Aegle marmelos</i> , Rutaceae		Nugroho <i>et al.</i> , 2010
<i>Haplophyllum pedicellatum</i> , Rutaceae		Akhmedjanova <i>et al.</i> , 2008
<i>Oricia suaveolens</i> , Rutaceae	Citotóxica	Wansi <i>et al.</i> , 2008
<i>Haplophyllum bucharicum</i> , Rutaceae	Citotóxica	Jansen <i>et al.</i> , 2005
<i>Melicope semecarpifolia</i> , Rutaceae		Tsai <i>et al.</i> , 1995
<i>Skimmia reevesiana</i> , Rutaceae		Wu, 1987
<i>Zanthoxylum dimoncillo</i> , Rutaceae		Dreyer & Brenner, 1980
<i>Zanthoxylum caribaeum</i> , Rutaceae		Dreyer & Brenner, 1980
<i>Z. fagara</i> , Rutaceae		Dreyer & Brenner, 1980
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> , Rutaceae		Al-Shamma <i>et al.</i> , 1978
<i>Zanthoxylum coco</i> , Rutaceae		Colonna & Gros, 1971

Fração J-2

O composto presente na Fração J-2 (4,1 mg) foi obtido como um sólido amorfo e solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS). A **Tabela 31** abaixo apresenta os resultados obtidos na análise por NMR para esta fração. A análise por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 625,2572, compatível com a fórmula $C_{36}H_{36}N_2O_8$ ($\Delta ppm = 3,5$). A comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura levou a identificação da substância presente na fração J-2 como sendo a amida **grossamida (composto 11)** (Seca *et al.*, 2001). Sua estrutura está ilustrada na **Figura 102** abaixo.

A análise por alfa-D para esta fração apresentou valor de +22 (c 1,0; MeOH). A configuração absoluta dos centros assimétricos foi inferida comparando-se os dados obtidos

com aqueles presentes na literatura (amida **(+)-grossamida**) (King & Calhoun, 2005; Seca *et al.*, 2001; Yoshihara *et al.*, 1983 e 1981). A grossamida já foi descrita em algumas espécies como: *Cannabis sativa* (Cannabaceae), *Hibiscus cannabinus* (Malvaceae), *Capsicum annum* (Solanaceae), *Annona crassiflora* (Annonaceae) (Seca *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 1996; Sakakibara *et al.*, 1995; Yoshihara *et al.*, 1981). Esta é a primeira descrição desta amida em espécie de Rutaceae.

Figura 102 – Estrutura da amida **(+)-grossamida (11)**, isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

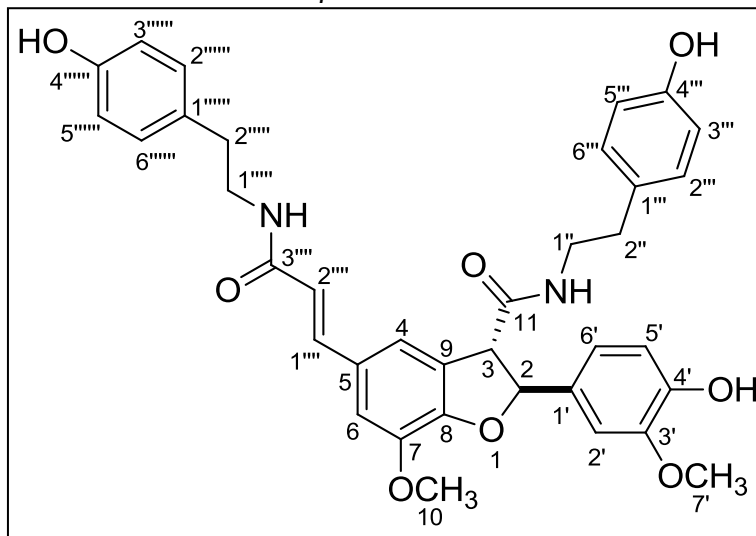


Figura 103 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-2, identificado como a amida **(+)-grossamida (11)**.

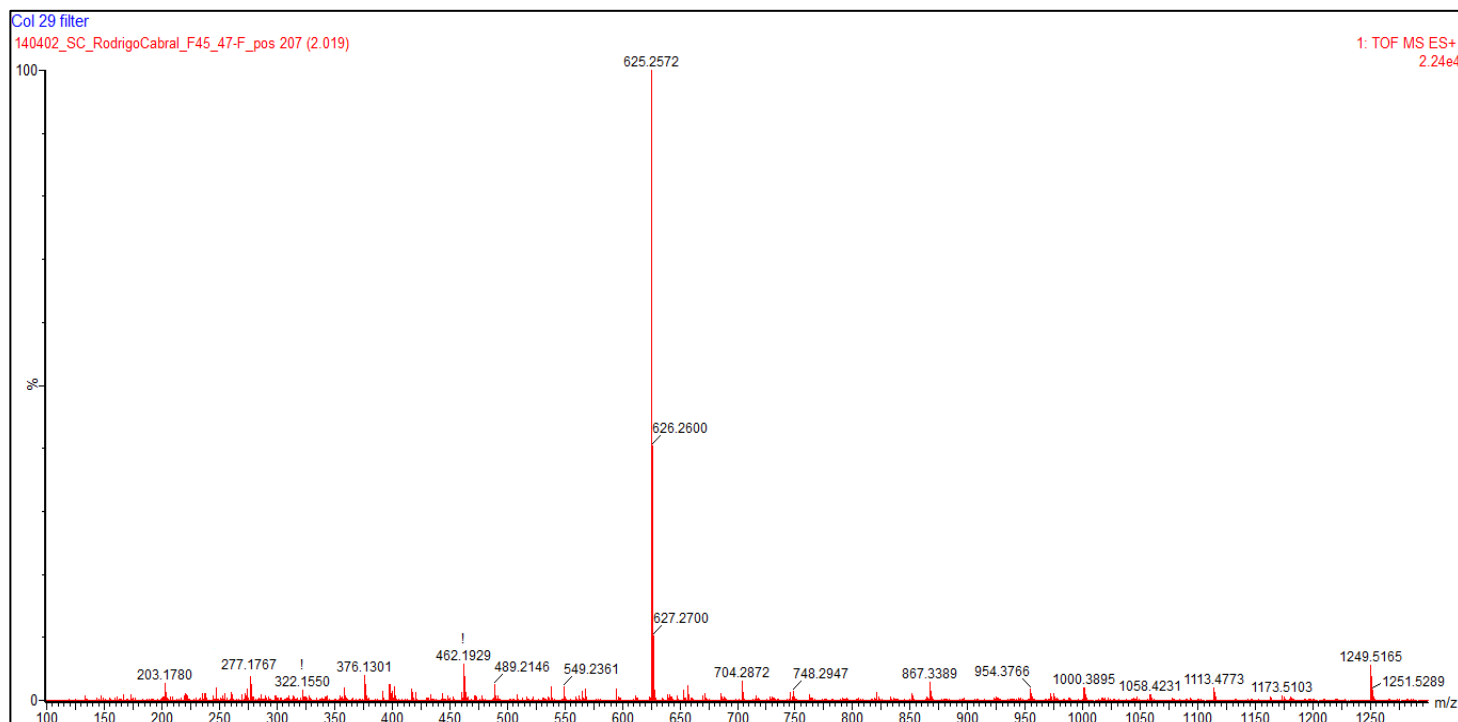


Figura 104 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida (+)-grossamida (**11**).

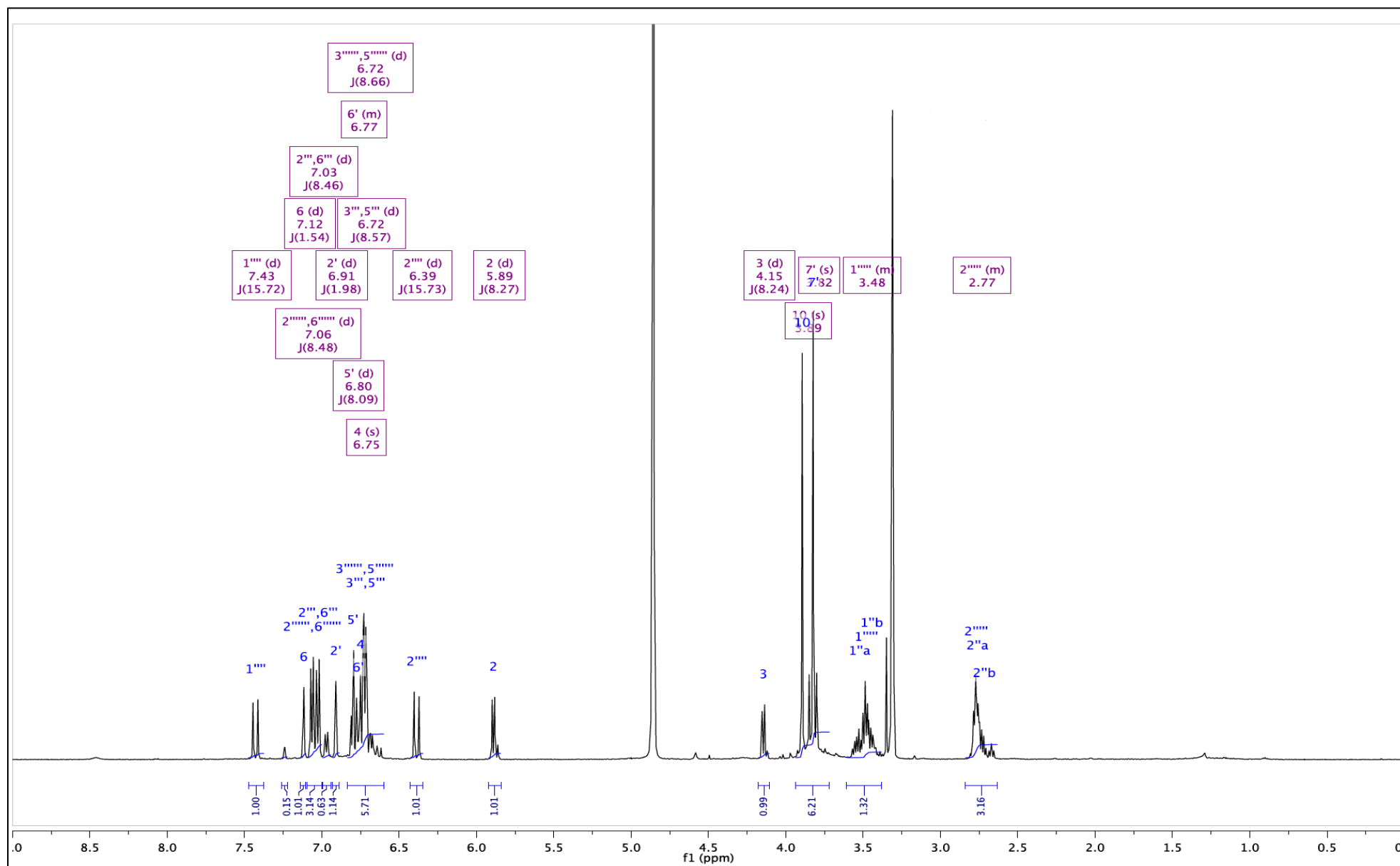


Figura 105 – Mapa de contorno *g*COSY da (+)-grossamida (**11**).

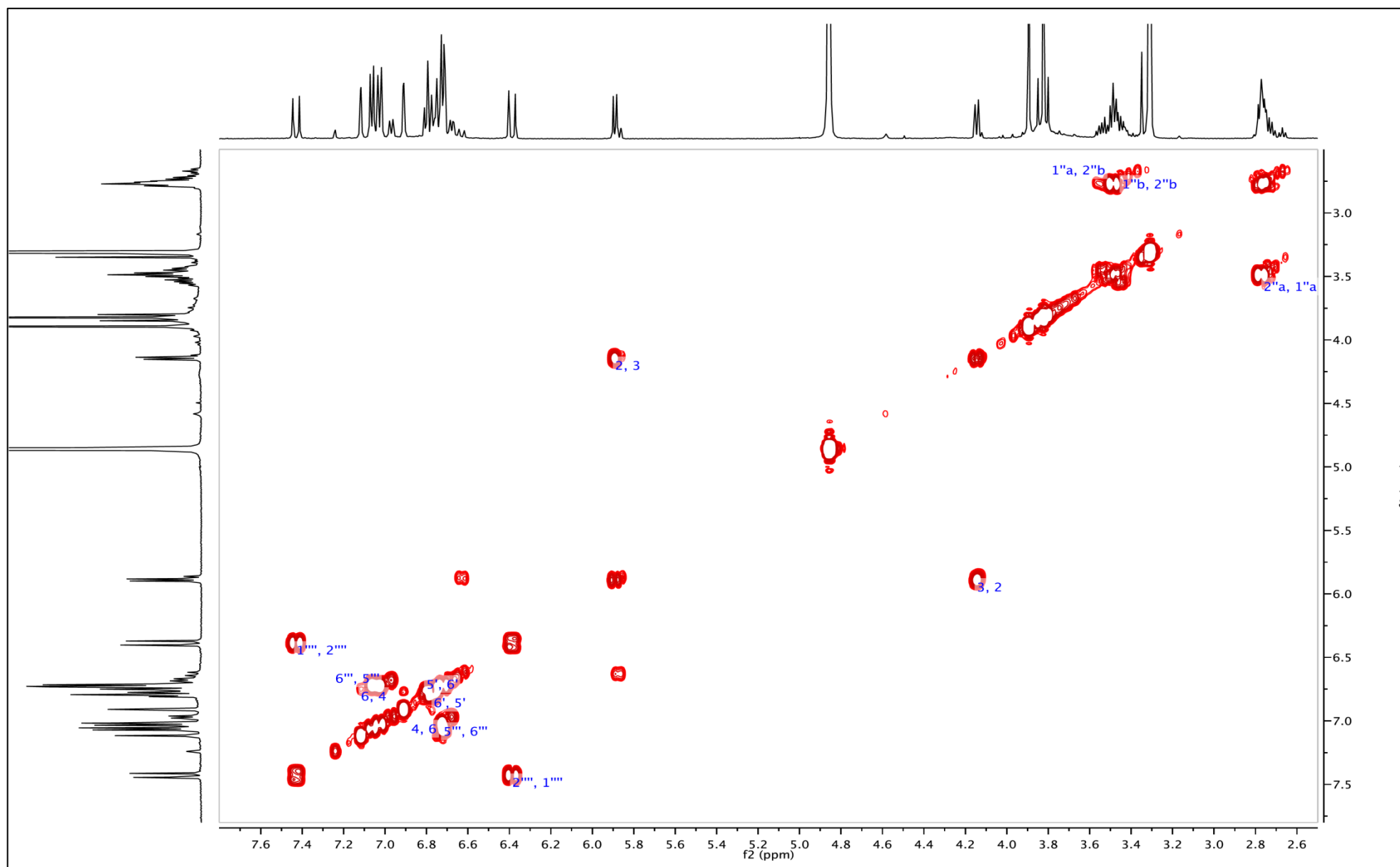


Figura 106 – Mapa de contorno NOESY da (+)-grossamida (**11**).

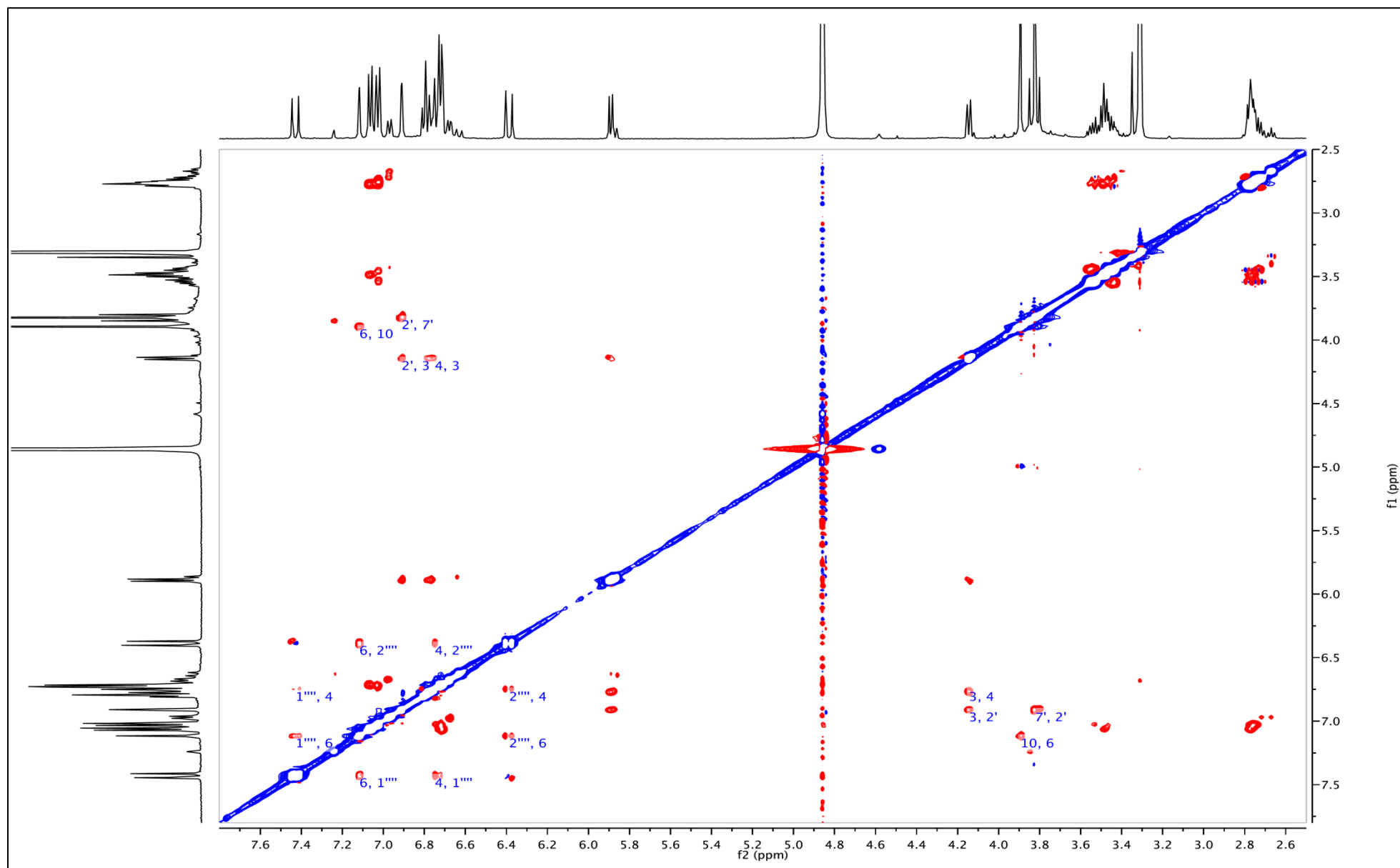


Figura 107 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da amida (+)-grossamida (**11**).

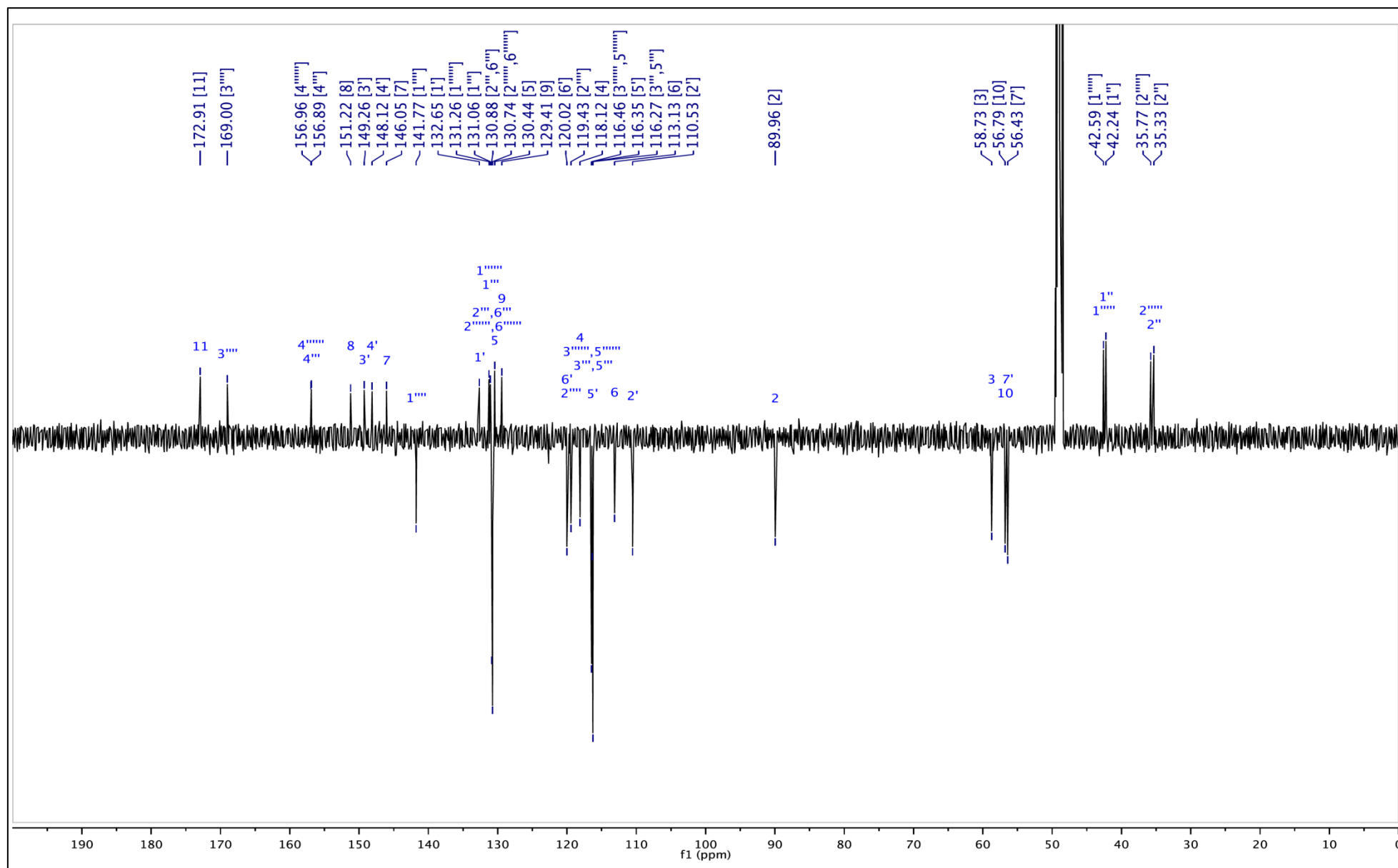


Figura 108 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da (+)-grossamida (**11**).

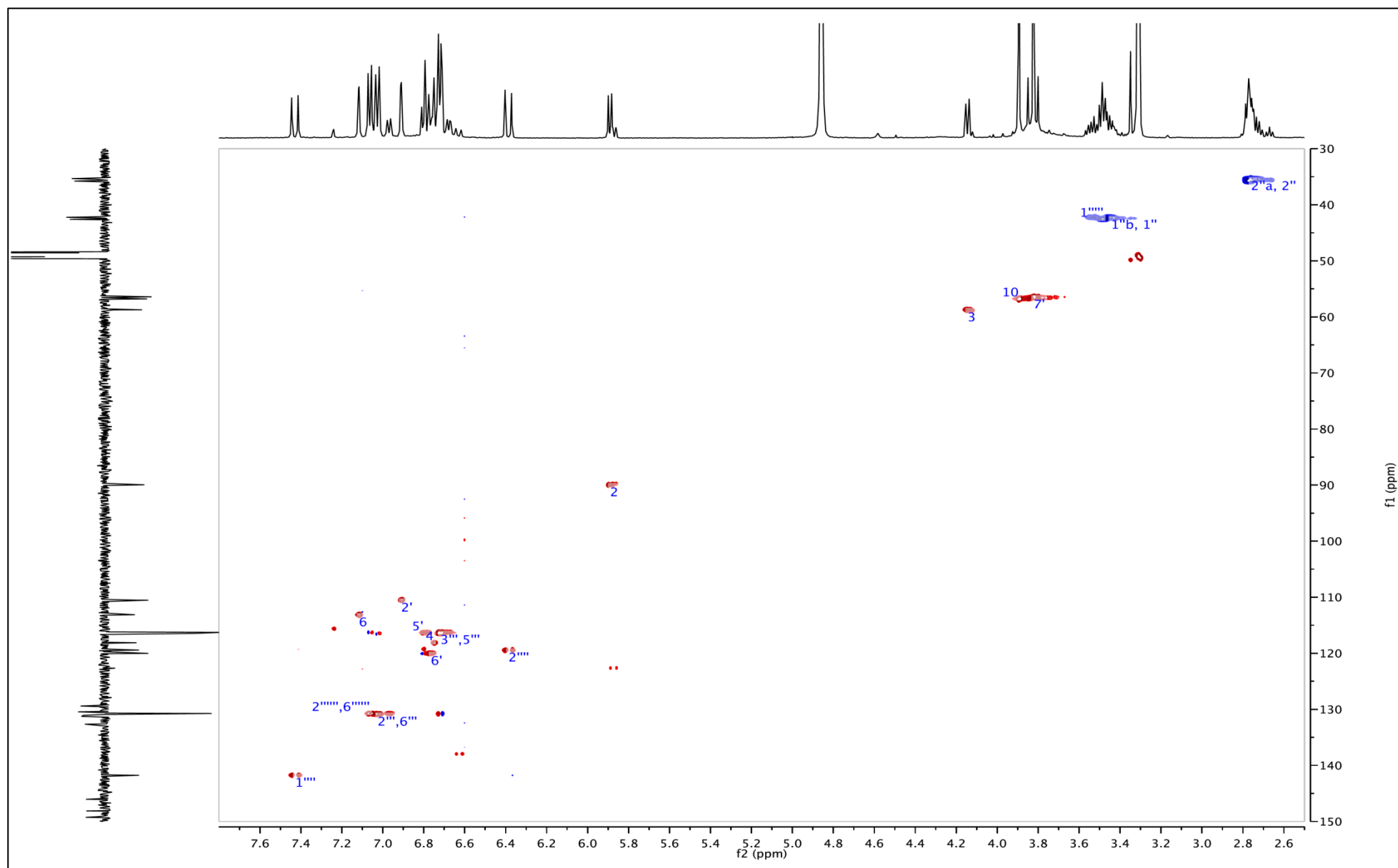


Figura 109 – Mapa de contorno *g*HMBC da (+)-grossamida (**11**).

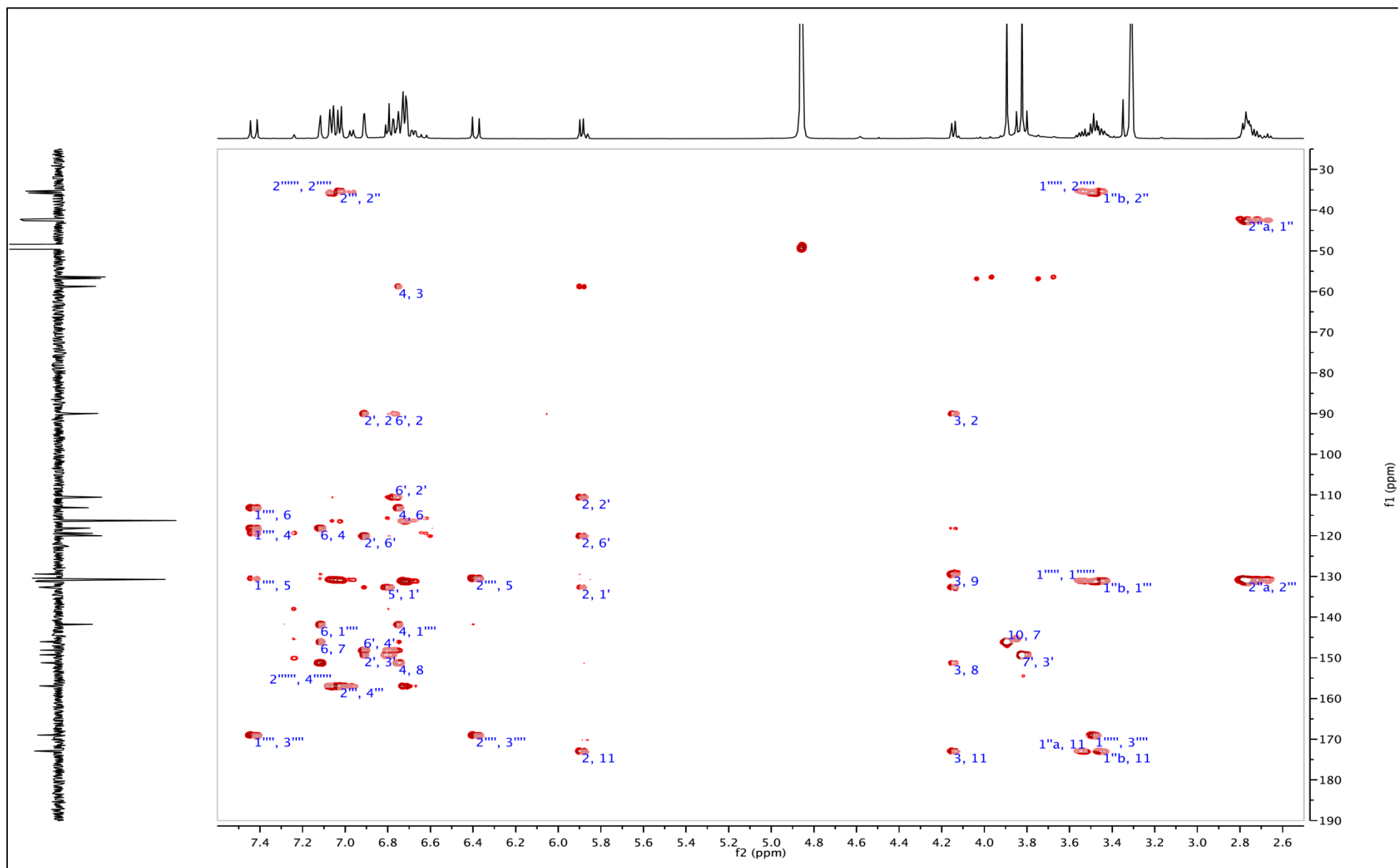


Tabela 31 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a amida (+)-grossamida (**11**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 11 (grossamida)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	-
2	5.89 (d; 8.2)	89.9	6.02 (d; 8.6)	88.8
3	4.15 (d; 8.2)	58.7	4.18 (d; 8.6)	57.6
4	6.75 (s)	118.1	6.44 (s)	119.0
5	-	130.4	-	129.4
6	7.12 (d; 1.5)	113.1	7.07 (s)	111.0
7	-	146.0	-	145.4
8	-	151.2	-	151.0
9	-	129.4	-	129.0
10 (Me O-C)	3.89 (s)	56.7	3.83 (s)	56.2
11 (C=O)	-	172.9	-	170.3
1'	-	132.6	-	132.3
2'	6.91 (d; 1.9)	110.5	6.96 (s)	110.4
3'	-	149.2	-	148.3
4'	-	148.1	-	147.5
5'	6.80 (8.0)	116.3	6.81 (s)	115.7
6'	6.77 (m)	120.0	6.70 (m)	119.7
7' (Me O-C)	3.82 (s)	56.4	3.80 (s)	56.2
1''	3.60 (m)	42.2	3.75 (m)	41.4
2''	2.65 (m)	35.3	2.83 (t; 6.0)	34.5
1'''	-	131.0	-	130.7
2''' e 6'''	7.03 (d; 8.4)	130.8	7.05 (d; 8.3)	130.3
3''' e 5'''	6.72 (d; 8.4)	116.2	6.74 (d; 8.3)	115.9
4'''	-	156.8	-	156.7
1''''	7.43 (d; 15.7)	141.7	7.41 (d; 15.8)	141.2
2''''	6.39 (d; 15.7)	119.4	6.46 (d; 15.8)	118.8
3'''' (C=O)	-	169.0	-	167.4
1'''''	3.48 (m)	42.5	3.5 (m)	42.0
2'''''	2.77 (m)	35.7	2.77 (t; 7.1)	35.4
1''''''	-	131.2	-	130.4
2'''''' e 6''''''	7.06 (d; 8.5)	130.7	6.77 (d; 6.9)	130.5
3'''''' e 5''''''	6.72 (d; 8.5)	116.4	6.80 (d; 6.9)	116.7
4''''''	-	156.9	-	156.5

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Seca *et al.*, 2001*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração J-3

O composto presente na Fração-J3 (4,9 mg) apresentou-se como um sólido cristalino e solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 563,2501, compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{38}O_{11}$ ($\Delta ppm = 1,6$ ppm) (**composto 14**). Os dados de NMR de 1H e ^{13}C estão descritos na **Tabela 32**. O espectro de NMR 1H em $CDOD_3$ da substância **14** apresentou 4 singletos em δ_H 1.16 (2 x 3H; s; H-18 e H-30), 1.24 (3H; s; H-29) e 1.38 (3H; s; H-28), referentes a grupos metílicos; também foram observados sinais característicos de um anel furânico β substituído em δ_H 7.55 (1H; dt; $J = 1.69, 0.76$ Hz; H-21), 7.52 (1H; t; $J = 1.71$ Hz; H-23) e 6.45 (1H; dd; $J = 1.94, 0.88$ Hz; H-22) e de hidrogênios ligados a carbono adjacente a um átomo de oxigênio em δ_H 5.74 (1H; s; H-17), 5.65 (1H; dd; $J = 7.78, 1.62$; H-1), 4.88 (1H; s; H-19'), 4.59 (1H; ddd; $J = 9.06, 7.46, 5.46$; H-11), 3.96 (1H; s; H-15) 3.80 (1H; d; $J = 9.61$; H-19'') e 3.41 (1H; d; $J = 3.36$; H-7).

No espectro de RMN ^{13}C APT (**Tabela 32**) foram observados sinais correspondentes a 29 carbonos, sendo 3 deles indicativos da presença de 3 grupos carbonílicos.

Os dados desses espectros aliados aos dos espectros HSQC, HMBC, NOESY, COSY sugerem para esta substância um esqueleto triterpênico; uma comparação desses dados com os de triterpenos do grupo dos limonóides, substâncias que ocorrem em plantas da família Rutacea (Kim *et al.*, 2012), mostra que a estrutura aqui proposta para a substância **14** (**Figura 110**), apresenta similaridade com o nomilinato de metila, principalmente com relação aos anéis D e E (carbonos 13-17 e 20-23, respectivamente) (**Figura 118**).

O nomilinato de metila possui um grupo metílico (C-19) a mais do que o **composto 14**, ligado ao C-10 (δ_C 45,7); na substância **14**, o C-10 (δ_C 53,6) aparece em campo mais baixo, ligado ao C-19 (δ_C 73,1; δ_H 4.88 (1H; s; H-19') e 3,80 (1H; d; $J = 9.61$; H-19'')), um grupo metilênico ligado a um oxigênio.

No nomilinato de metila, o espectro de RMN ^{13}C mostra que C-9 tem δ_C 44,2; em **14**, o C-9 está ligado ao hidrogênio que aparece em δ_H 3.02 (1H; d; $J = 5.68$). O C-9, em ambas as estruturas está ligado ao C-11, que no nomilinato de metila aparece em δ_C 17,4 e em **14**, aparece em δ_C 76,3, como um grupo metínico em δ_H 4,59 (1H; ddd; $J = 9.06, 7.46, 5.46$; H-11) que está ligado a um oxigênio. A reunião destes dados permite inferir que os átomos C-10, C-9, C-19, C-11 e o oxigênio formam um anel de cinco membros. No espectro HMBC, são observadas as correlações entre H-19' e C-9, C-10 e C-11; também são observadas correlações entre H-19'' e C-9, C-10 e C-1. Essas correlações corroboram a presença do anel oxidado de 5 membros (**Tabela 33**).

O espectro bidimensional NOESY do **composto 14** mostra proximidade entre o H-9 e o grupo metílico em C-18. Este espectro mostra também que o grupo metílico em C-18 se encontra próximo ao H-11 (C-11); existe, ainda, proximidade entre H-12' e o grupo metílico em C-30; entre H-2'' e C-9; entre H-12'' e os hidrogênios de C18.

No nomilinato de metila, o sinal de C-7 aparece em δ_C 209.8, característico de grupo carbonílico; no **composto 14**, o sinal de C-7 aparece em δ_C 68.3, valor semelhante aos que mostram carbonos ligados a oxigênio de grupo hidroxila. O sinal do hidrogênio ligado ao C-7 aparece em δ_H 3.41 (1H; d; $J = 3.36$; H-7).

No nomilinato de metila, o sinal do C-6 é visto em δ_C 35.3 e seus respectivos hidrogênios como dubletos em δ_H 2.53 e 2.61. No **composto 14**, o grupo metilênico C-6 aparece (espectro apt) em δ_C 30.5, e seus correspondentes hidrogênios H_{6'} e H_{6''} aparecem em δ_H 1,81 – 1,92 (m). Com base nos resultados obtidos, o **composto 14** foi definido como novo triterpeno do tipo limonoide, chamado **Limonoide CF-A1 (Figura 110)**.

Figura 110 – Estrutura do novo limonoide CF-A1 (**14**), isolado dos ramos de *C. fontanesianus*.

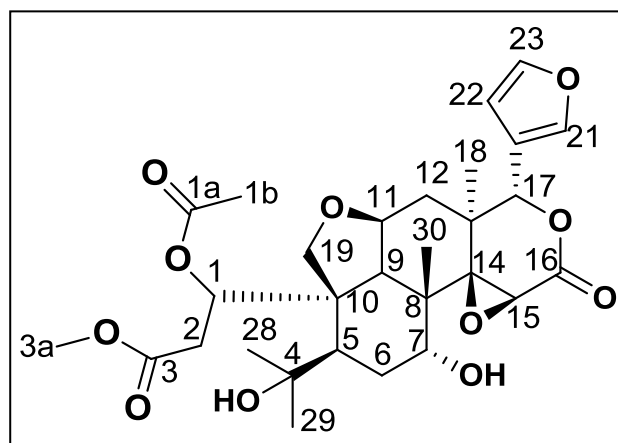


Figura 111 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-3, identificado como novo triterpeno, limonoide CF-A1 (**14**).

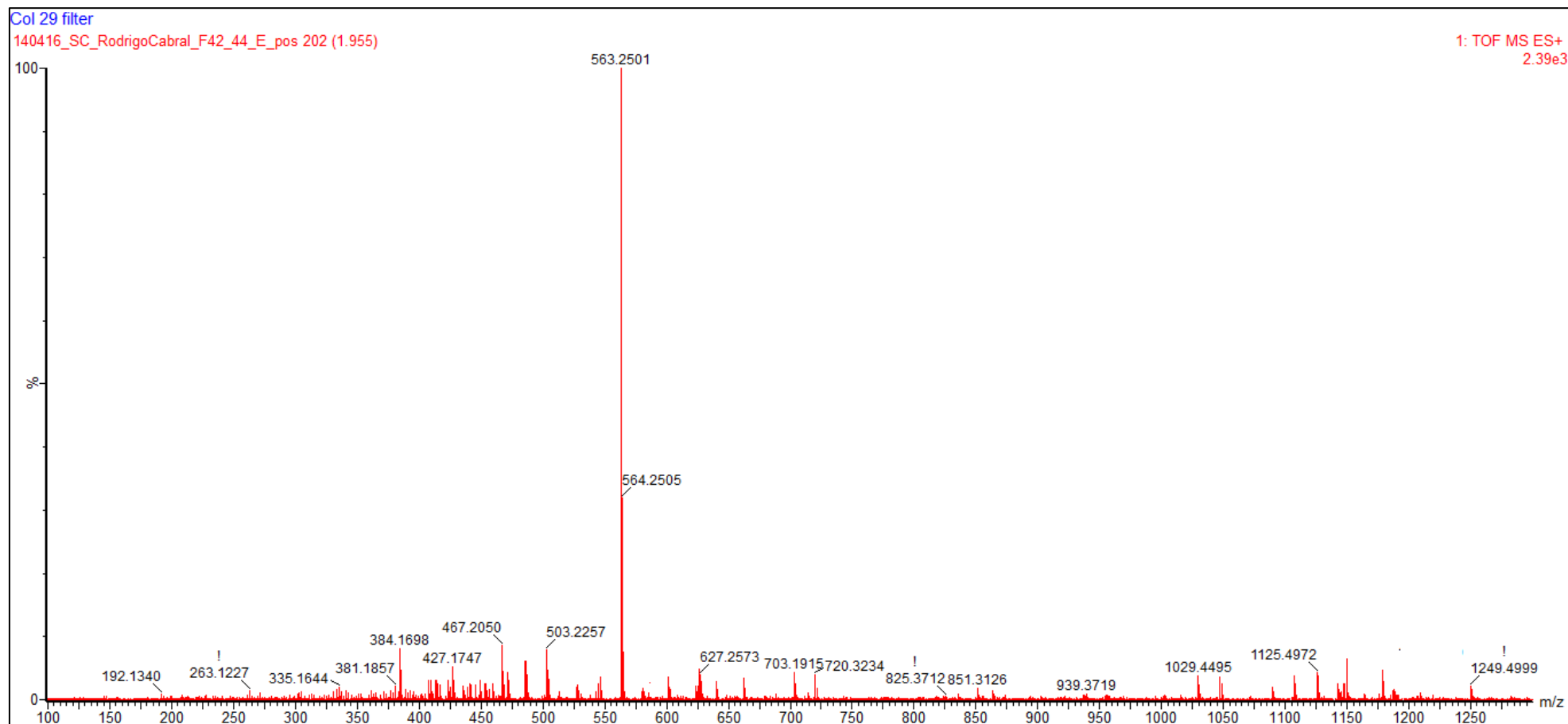


Figura 112 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do novo triterpeno, limonoide CF-A1 (**14**).

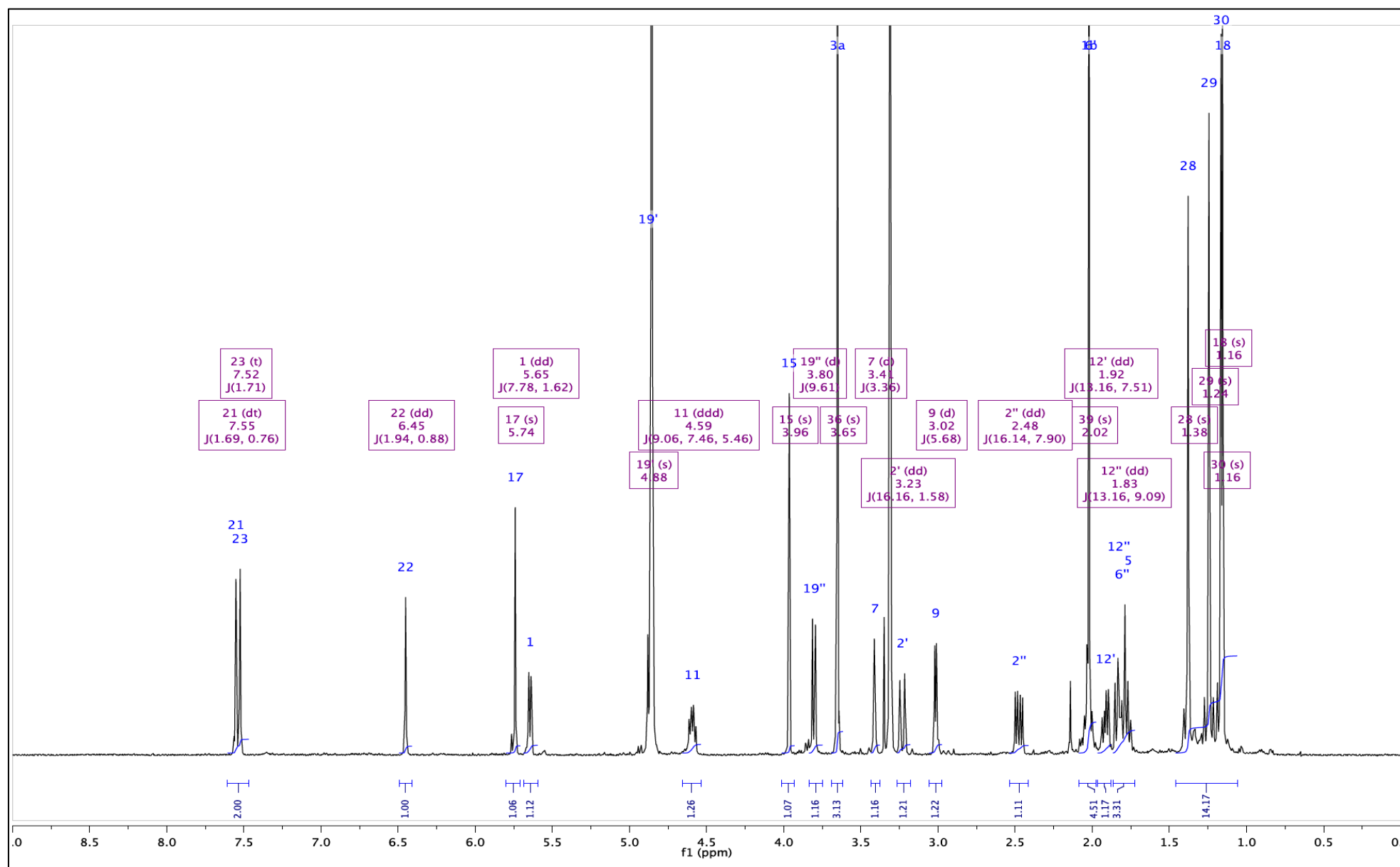


Figura 113 – Mapa de contorno *g*COSY do limonoide CF-A1 (**14**).

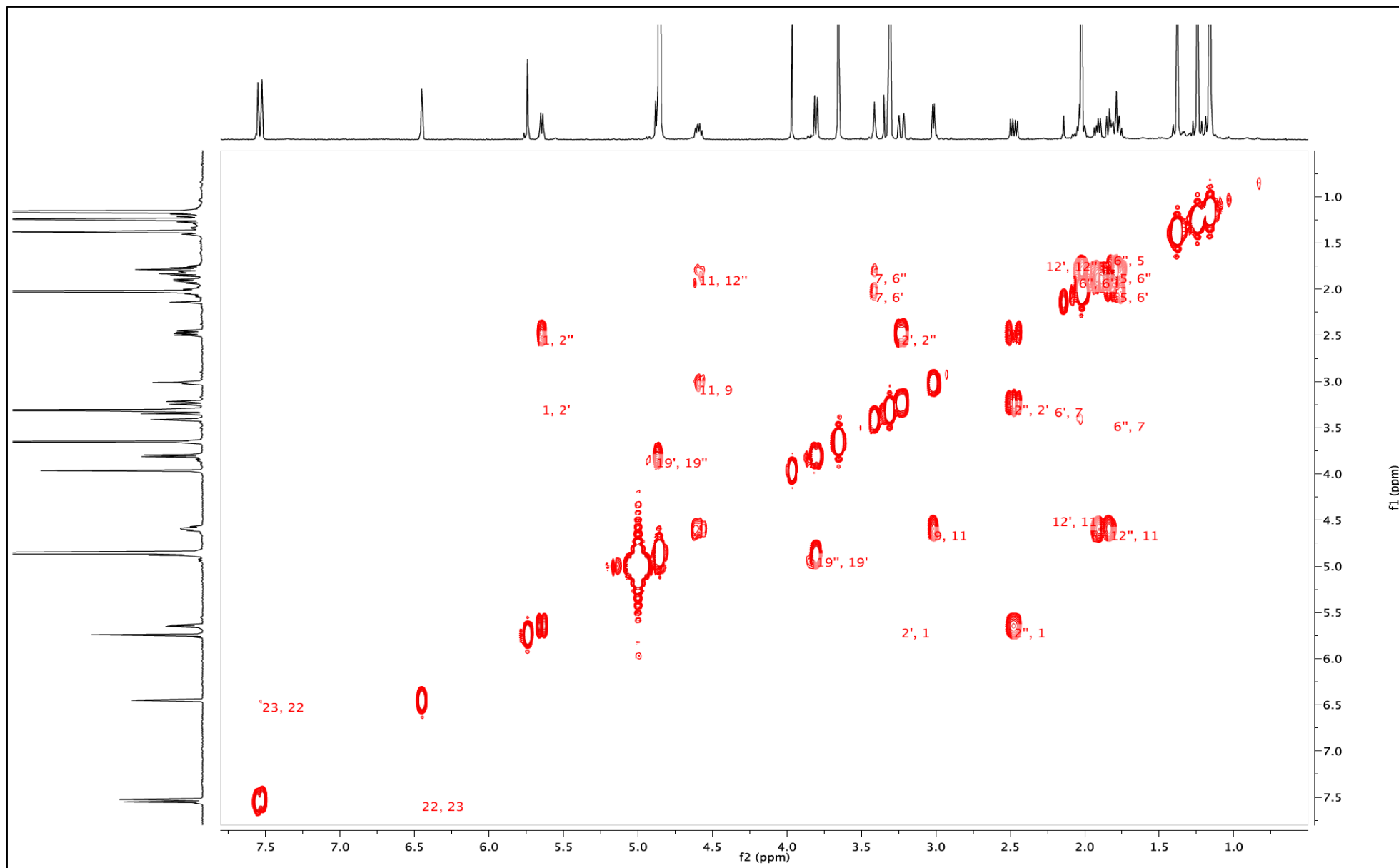


Figura 114 – Mapa de contorno NOESY do limonoide CF-A1 (**14**).

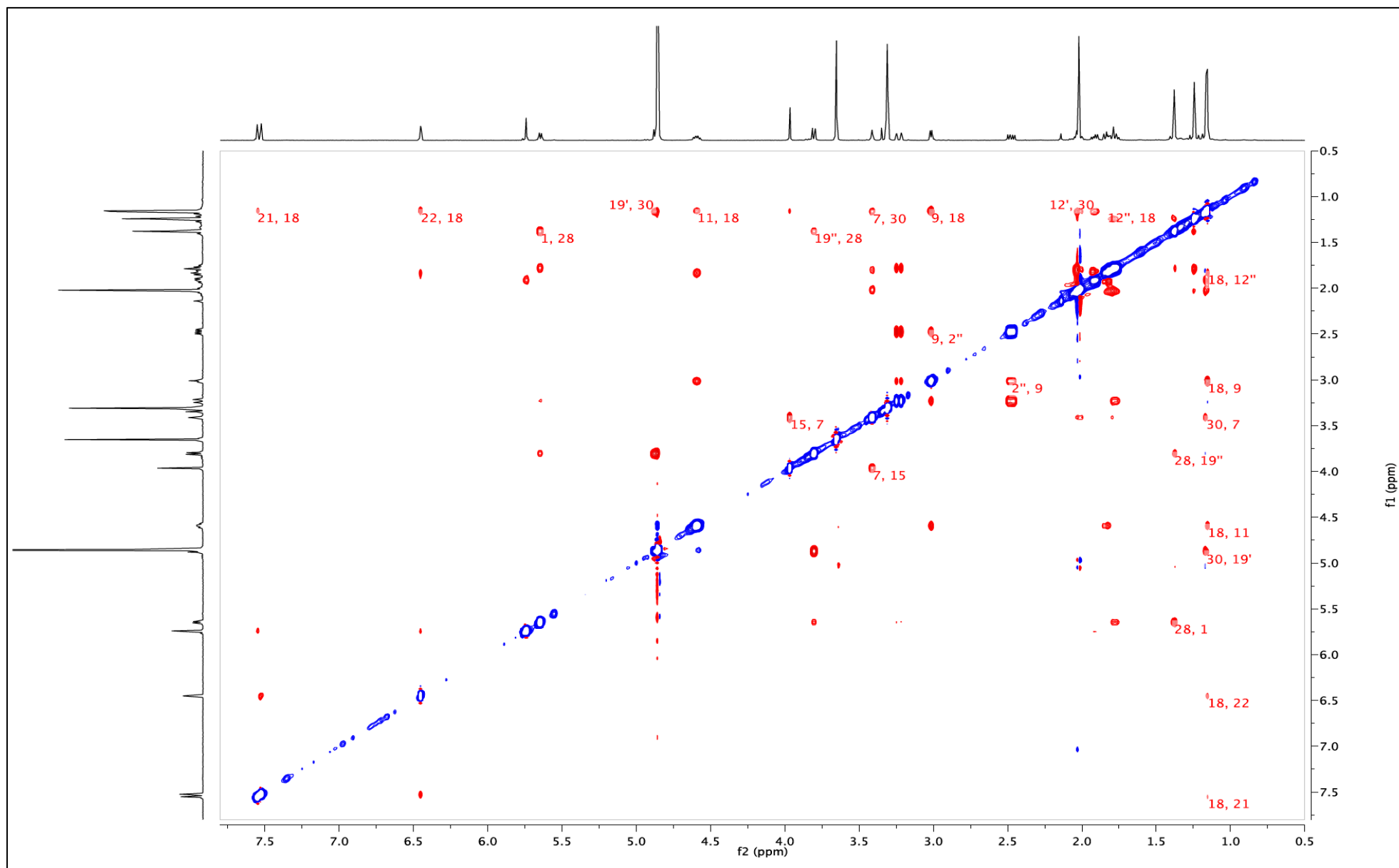


Figura 115 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do limonoide CF-A1(**14**).

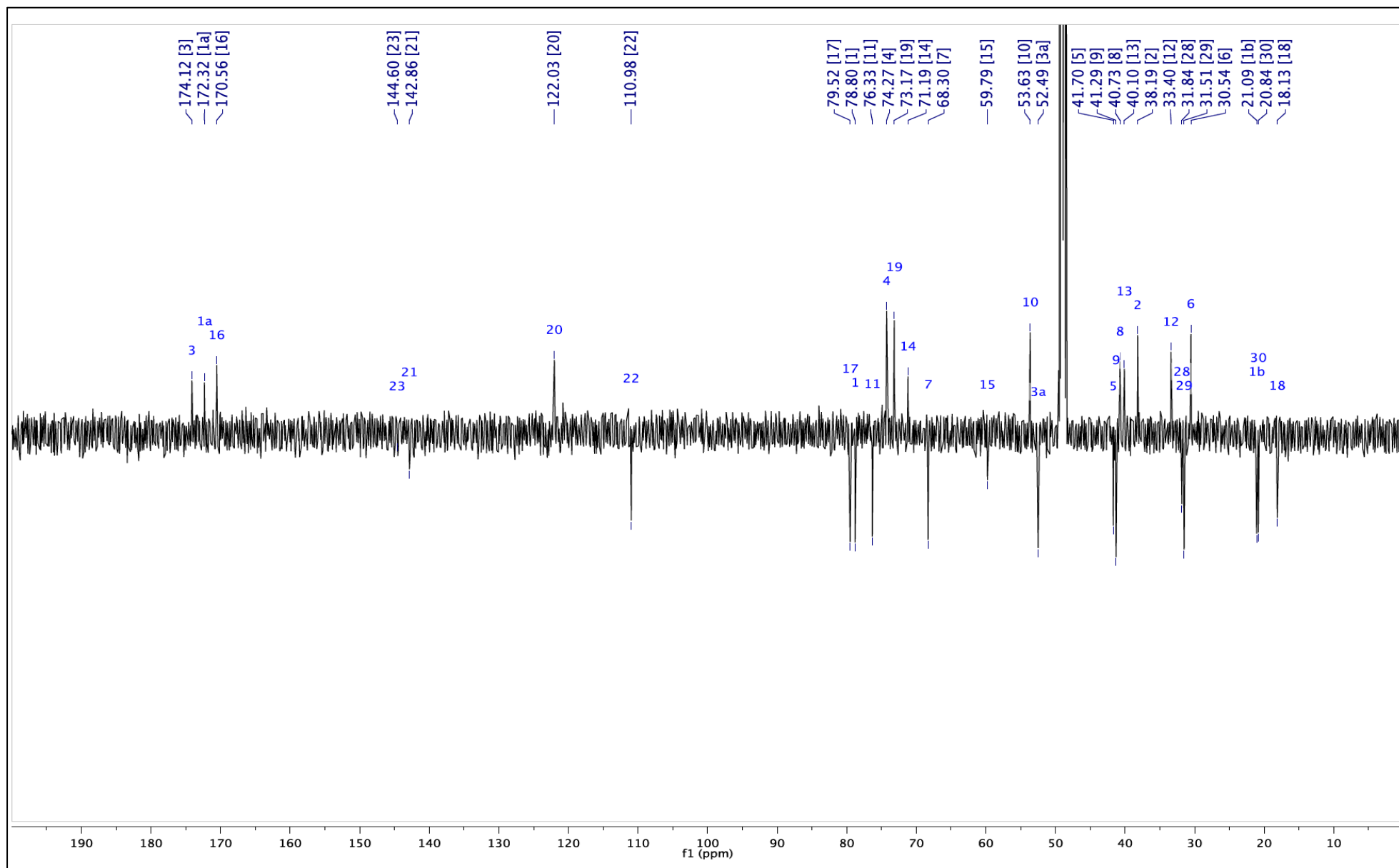


Figura 116 – Mapa de contorno *g*HSQCAD do limonoide CF-A1 (**14**).

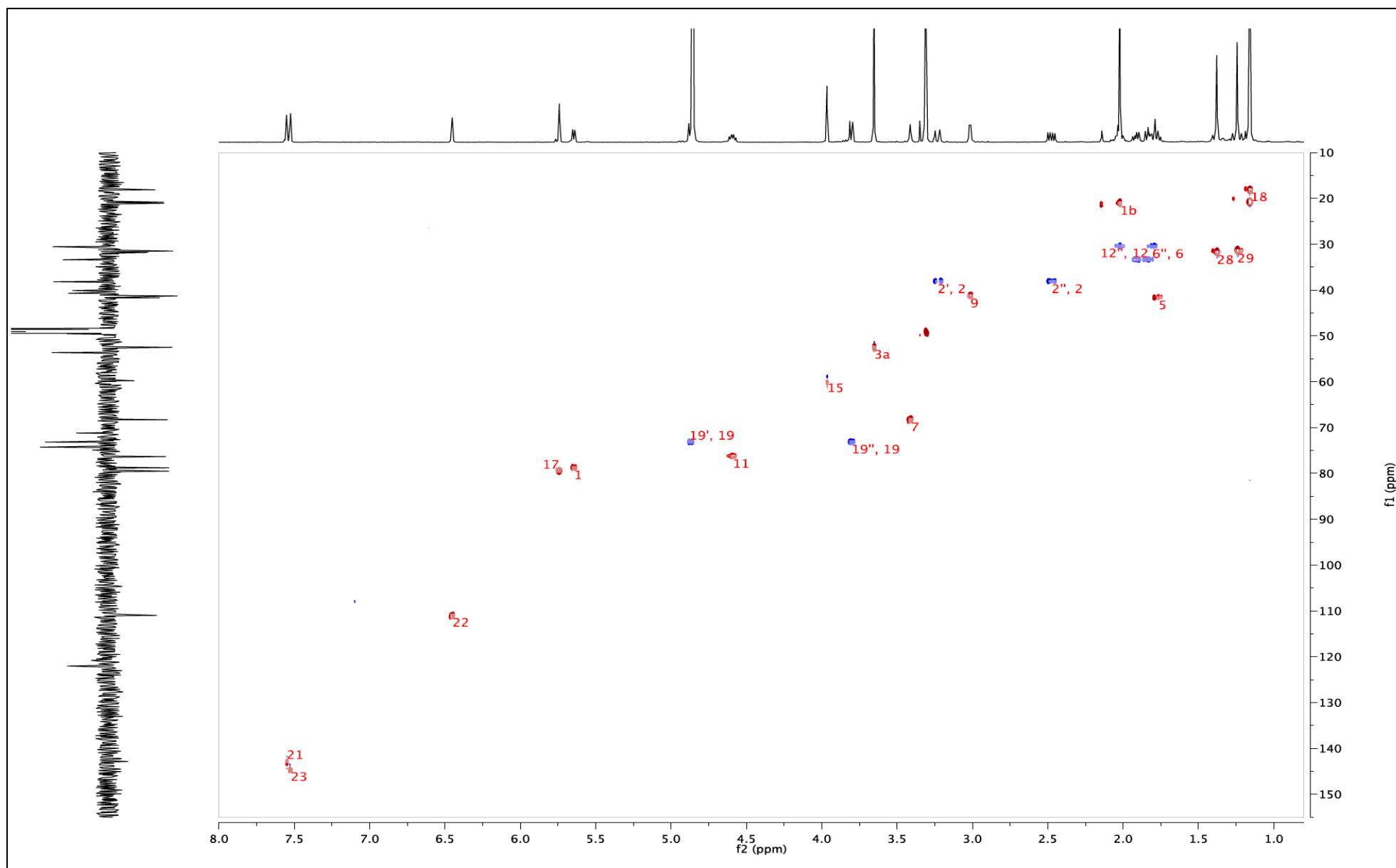


Figura 117 – Mapa de contorno *g*HMBC do limonoide CF-A1 (**14**).

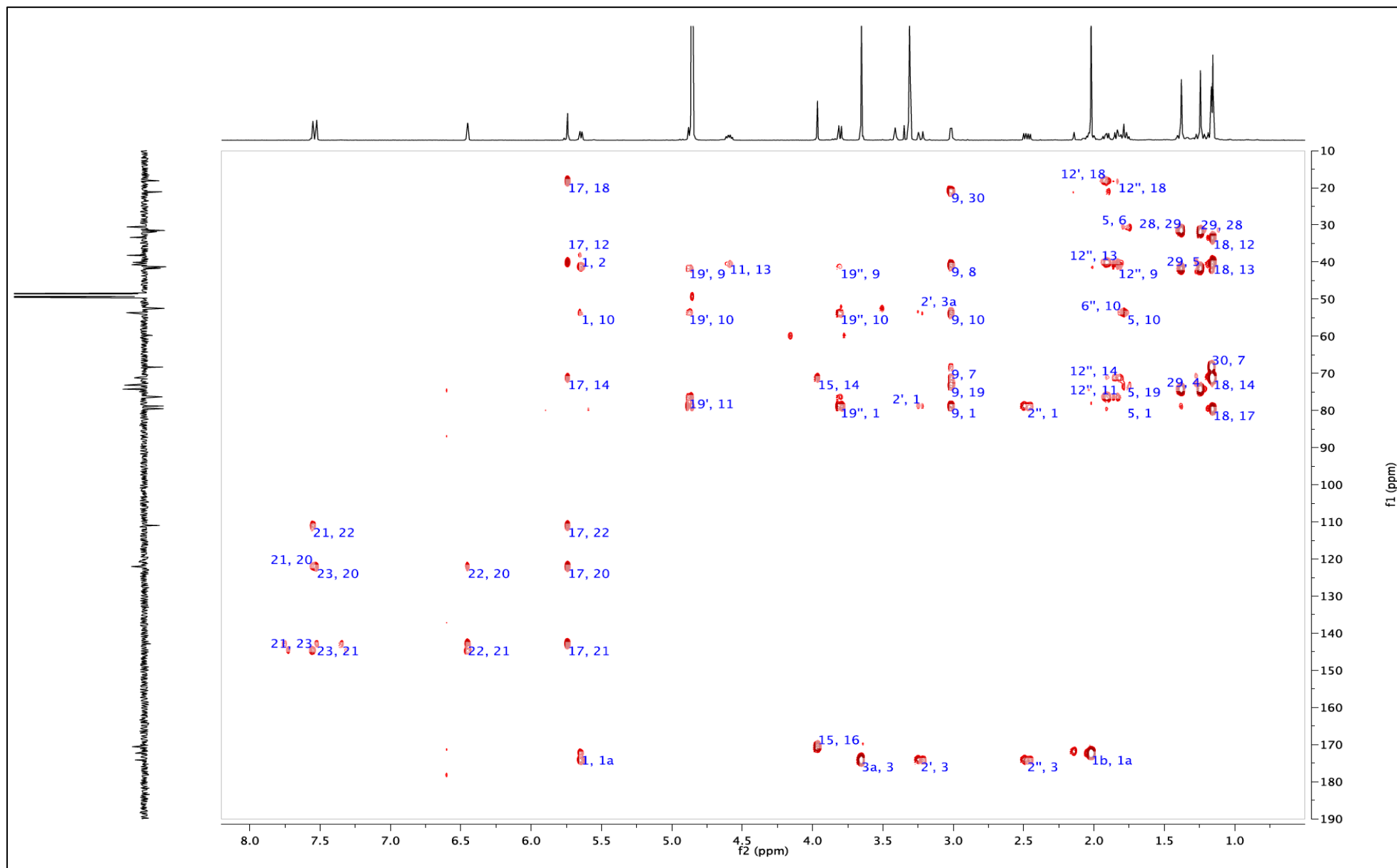


Tabela 32 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o novo limonoide CF-A1 (**14**, em CD₃OD).

Posição	Composto 14 (Limonoide CF-A1)		
	δ_H^a (m ^b)	δ_C (ppm)	<i>g</i> HMBC
1	5.65 (dd; 7.7, 1.6)	78.80	38.19 (2); 53.63 (10); 76.33 (11)
1a	-	172.32	
1b	3.65 (s)	21.09	172.32 (1a)
2a	3.23 (dd; 16.1, 1.6)	38.19	52.49 (3a); 78.80 (1); 174.12 (3)
2b	2.48 (dd; 16.1, 7.9)	38.19	78.80 (1); 174.12 (3)
3	-	174.12	
3a	3.65 (s)	52.49	174.12 (3)
4	-	74.27	
5	1.70 (dd; 10.4, 8.8)	41.70	30.54 (6); 53.63 (10); 73.17 (19); 78.80 (1)
6	1.81 - 1.92 (m)	30.54	53.63 (10)
7	3.41 (d; 3.3)	68.30	
8	-	40.73	
9	3.02 (d; 5.6)	41.29	20.85 (30); 40.73 (8); 53.63 (10); 68.30 (7); 73.17 (19); 78.80 (1)
10	-	53.63	
11	4.59 (ddd; 9.0, 7.5, 5.6)	76.33	40.10 (13)
12a	1.92 (dd; 13.1, 7.5)	33.40	18.13 (18)
12b	1.83 (dd; 13.1, 9.0)	33.40	18.13 (18); 40.10 (13); 41.29 (9); 71.19 (14); 76.33 (11)
13	-	40.10	
14	-	71.19	
15	3.96 (s)	59.79	71.19 (14); 170.56 (16)
16	-	170.56	
17	5.74 (s)	79.52	18.13 (18); 33.40 (12); 71.19 (14); 110.98 (22); 122.03 (20); 142.86 (21)
18	1.16 (s)	18.13	33.40 (12); 40.10 (13); 71.19 (14); 79.52 (17)
19a	4.88 (s)	73.17	41.29 (9); 53.63 (10); 76.33 (11)
19b	3.80 (d; 9.6)	73.17	41.29 (9); 53.63 (10); 78.80 (1)
20	-	122.03	
21	7.55 (dd; 1.9, 0.8)	142.86	110.98 (22); 122.03 (20); 144.60 (23)
22	6.45 (dd; 1.9, 0.8)	110.98	122.03 (20); 142.86 (21)
23	7.52 (t; 1.71)	144.60	122.03 (20); 142.86 (21)
28	1.38 (s)	31.84	31.51 (29); 41.70 (5); 74.27 (4)
29	1.24 (s)	31.51	31.84 (28); 41.70 (5); 74.27 (4)
30	1.16 (s)	20.85	68.30 (7)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (*J*), expressa em Hz

Figura 118 – Estruturas dos limonóides CF-A1 (**14**) e nomilinato de metila.

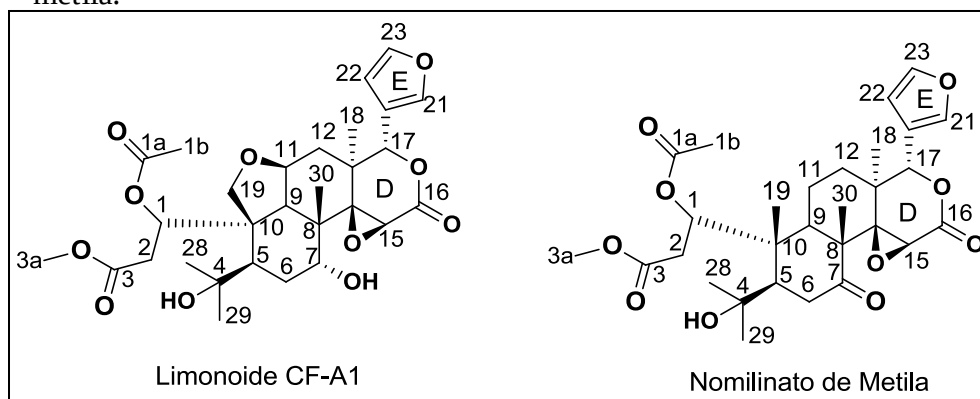


Tabela 33 – Dados de NMR de ^1H e ^{13}C comparativos entre o novo limonoide CF-A1 (**14**) e o nomilinato de metila.

Posição	Composto 14 (Limonoide CF-A1)		Nomilinato de metila*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b})	δ_{C} (ppm)
1	5.65 (dd; 7.7, 1.6)	78.80	5.23 (d)	76.8
1a	-	172.32	-	169.5
1b	3.65 (s)	21.09	2.10 (s)	20.7
2a	3.23 (dd; 16.1, 1.6)	38.19	2.60, 2.72 (d)	38.9
2b	2.48 (dd; 16.1, 7.9)	38.19		
3	-	174.12	-	171.3
3a	3.65 (s)	52.49	3.53 (s)	51.2
4	-	74.27	-	73.2
5	1.70 (dd; 10.4, 8.8)	41.70	-	51.8
6	1.81 - 1.92 (m)	30.54	2.53 - 2.61 (d)	35.3
7	3.41 (d; 3.3)	68.30		
8	-	40.73	-	52.5
9	3.02 (d; 5.6)	41.29	-	44.2
10	-	53.63	-	45.7
11	4.59 (ddd; 9.0, 7.5, 5.6)	76.33	-	17.4
12a	1.92 (dd; 13.1, 7.5)	33.40	-	31.9
12b	1.83 (dd; 13.1, 9.0)	33.40		
13	-	40.10	-	37.4
14	-	71.19	-	65.7
15	3.96 (s)	59.79	3.76 (s)	52.8
16	-	170.56	-	166.9
17	5.74 (s)	79.52	5.66 (s)	77.8
18	1.16 (s)	18.13	1.12 (s)	16.8
19a	4.88 (s)	73.17	1.27 (s)	16.0
19b	3.80 (d; 9.6)	73.17		
20	-	122.03	-	120.3
21	7.55 (dd; 1.9, 0.8)	142.86	7.41 (d)	141.4
22	6.45 (dd; 1.9, 0.8)	110.98	6.44 (s)	110.2
23	7.52 (t; 1.71)	144.60	7.74 (d)	143.2
28	1.38 (s)	31.84	1.17 (s)	23.1
29	1.24 (s)	31.51	1.21 (s)	33.4
30	1.16 (s)	20.85	1.22 (s)	20.8

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Kim *et al.*, 2012*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração J-4

O composto presente na Fração J-4 (4,5 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em DMSO e MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS).

A análise por UPLC-TOF-MS (**Figura 120**) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 304,1084, compatível com a fórmula $C_{18}H_{13}N_3O_2$ ($\Delta ppm = -0,7$). Na **Tabela 34** estão apresentados os dados de NMR de 1H e ^{13}C do composto isolado e os dados de comparação com a literatura (Hu *et al.*, 2012). A comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura levou a identificação da substância presente na fração J-4 como sendo o alcaloide do tipo indolopiridoquinazolina **10-hidroxirutaecarpina (composto 12)** (Hu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2008; Ueng *et al.*, 2005). A estrutura deste alcaloide está ilustrada na **Figura 119**.

Este alcaloide havia sido descrito como produto do metabolismo oxidativo do alcaloide rutaecarpina (Ueng *et al.*, 2006 e 2005). Como produto natural foi isolado anteriormente somente em uma espécie, *Euodia rutaecarpa* (= *Evodia rutaecarpa*) (Rutaceae) (Hu *et al.*, 2012). Esta é a sua primeira descrição no gênero *Conchocarpus*.

Figura 119 – Estrutura do alcaloide 10-hidroxirutaecarpina (12), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

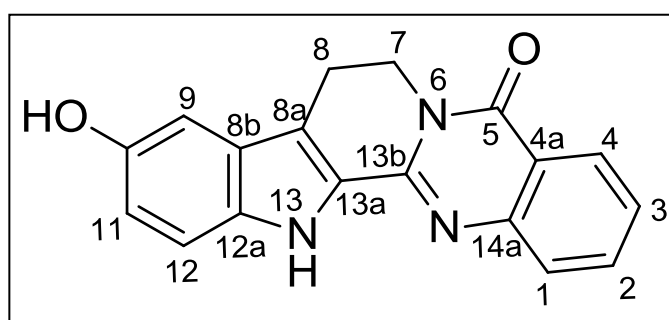


Figura 120 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração J-4, identificado como o alcaloide 10-hidroxiturtaecarpina (**12**).

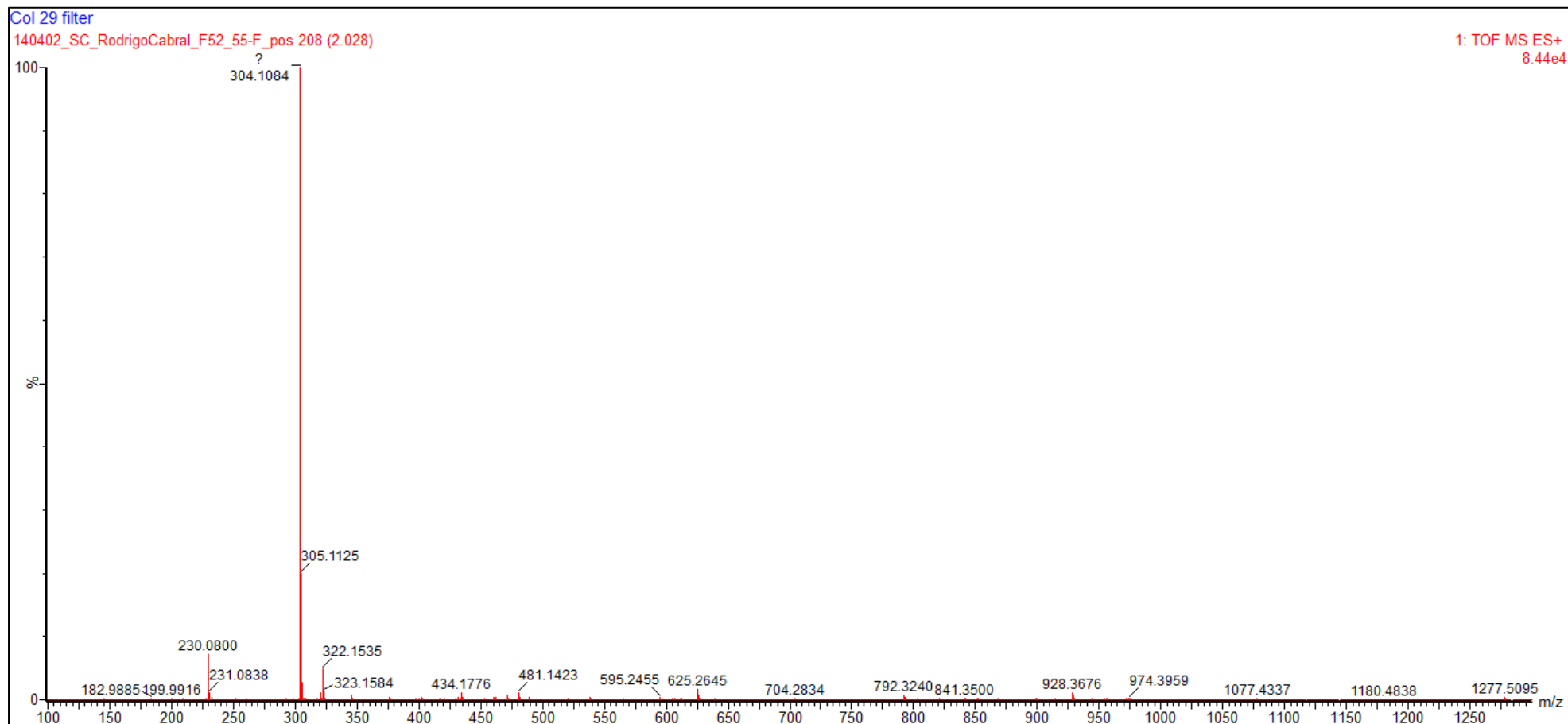


Figura 121 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do alcaloide 10-hidroxitacarpina (**12**).

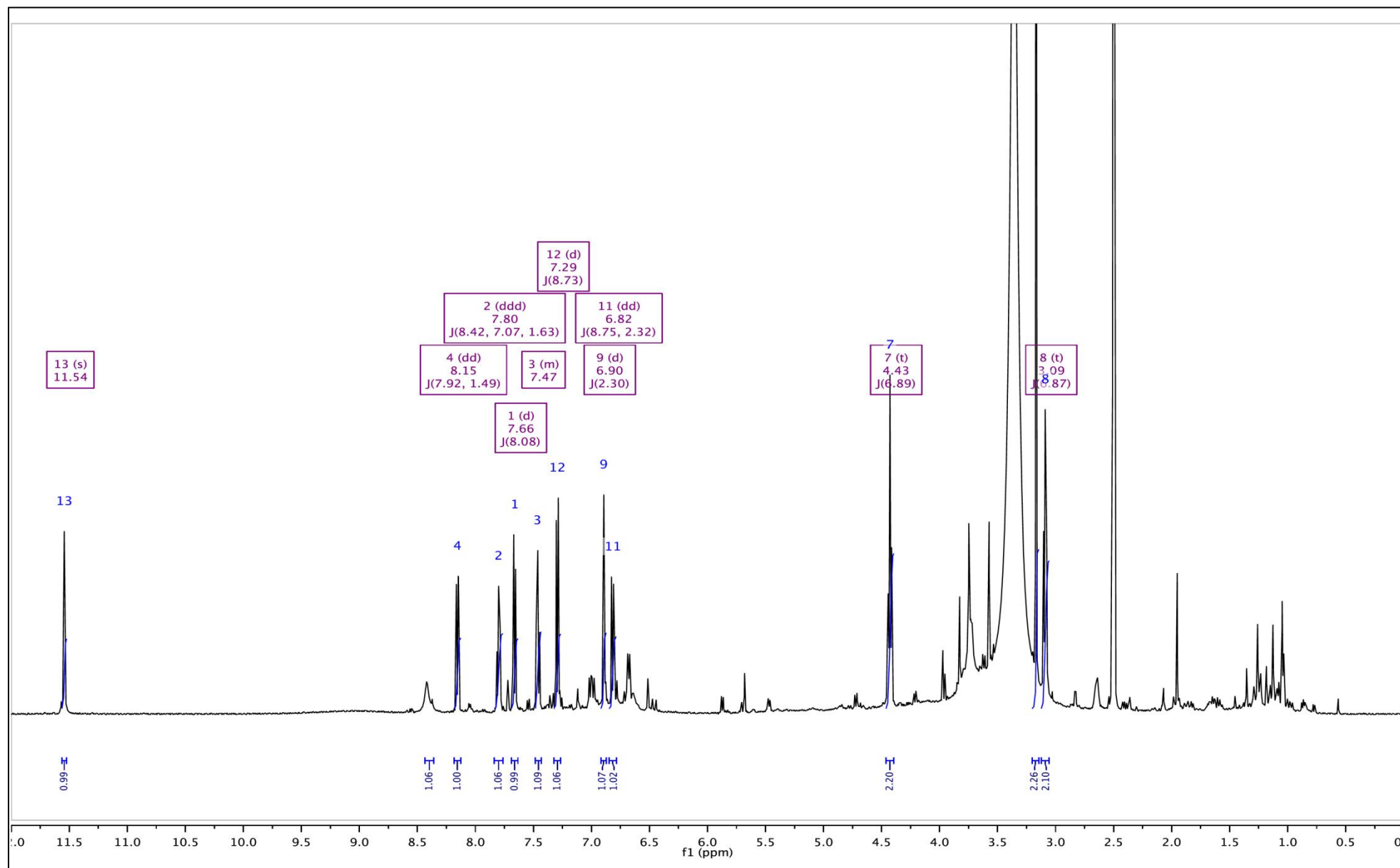


Figura 122 – Mapa de contorno *g*COSY da 10-hidroxiturtaecarpina (**12**).

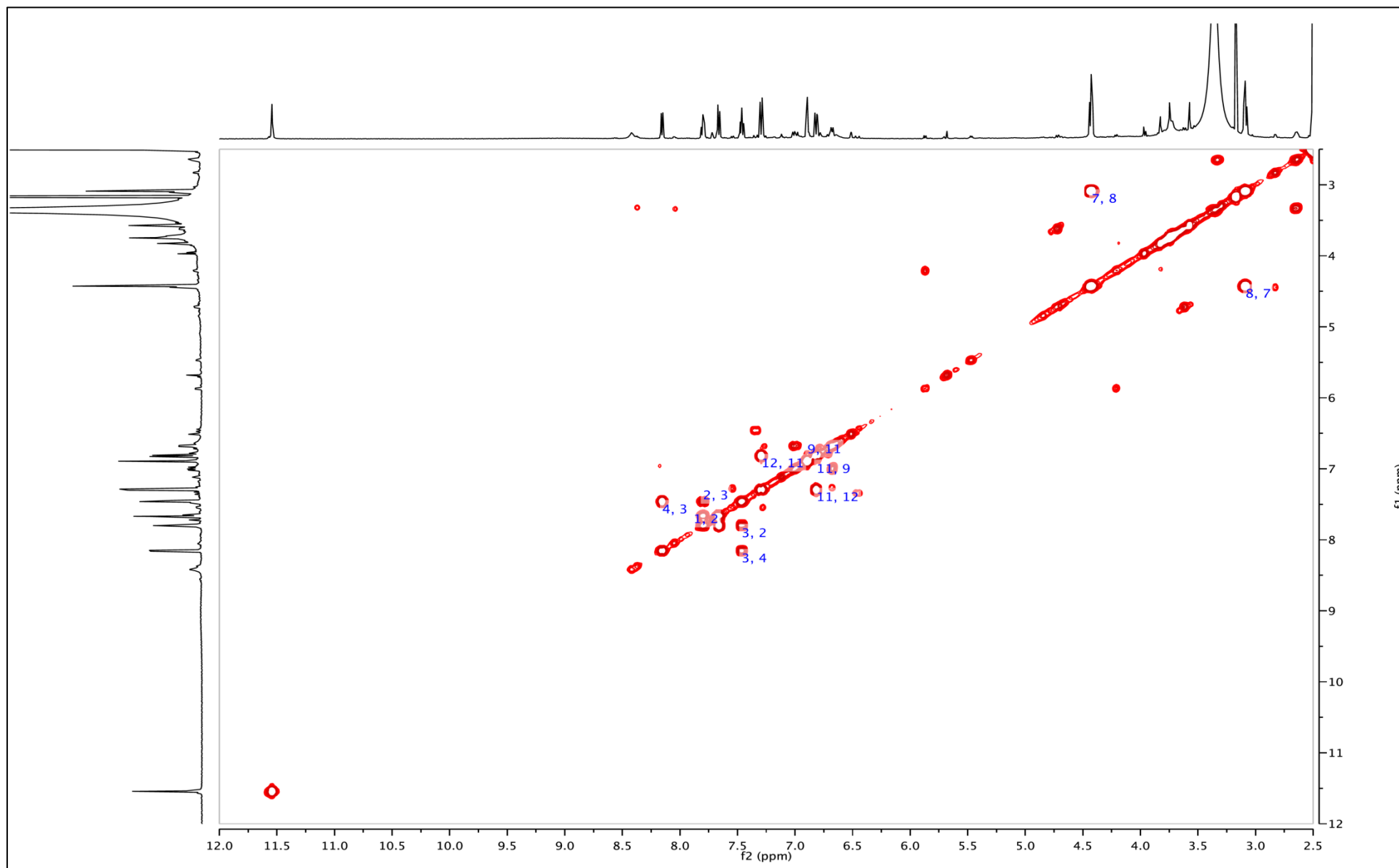


Figura 123 – Mapa de contorno NOESY da 10-hidroxiturtaecarpina (**12**).

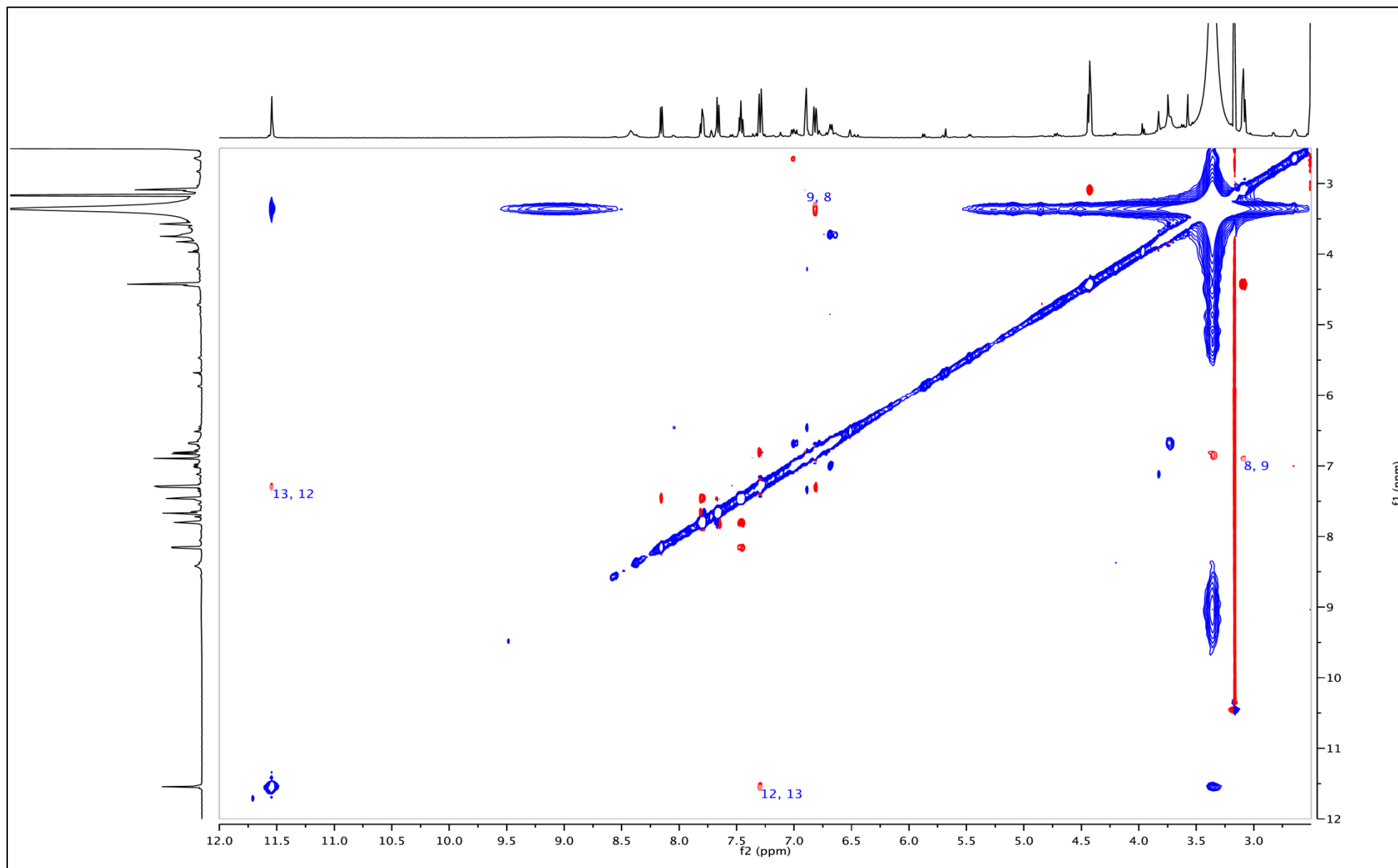


Figura 124 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6) do alcaloide 10-hidroxirutaecarpina (**12**).

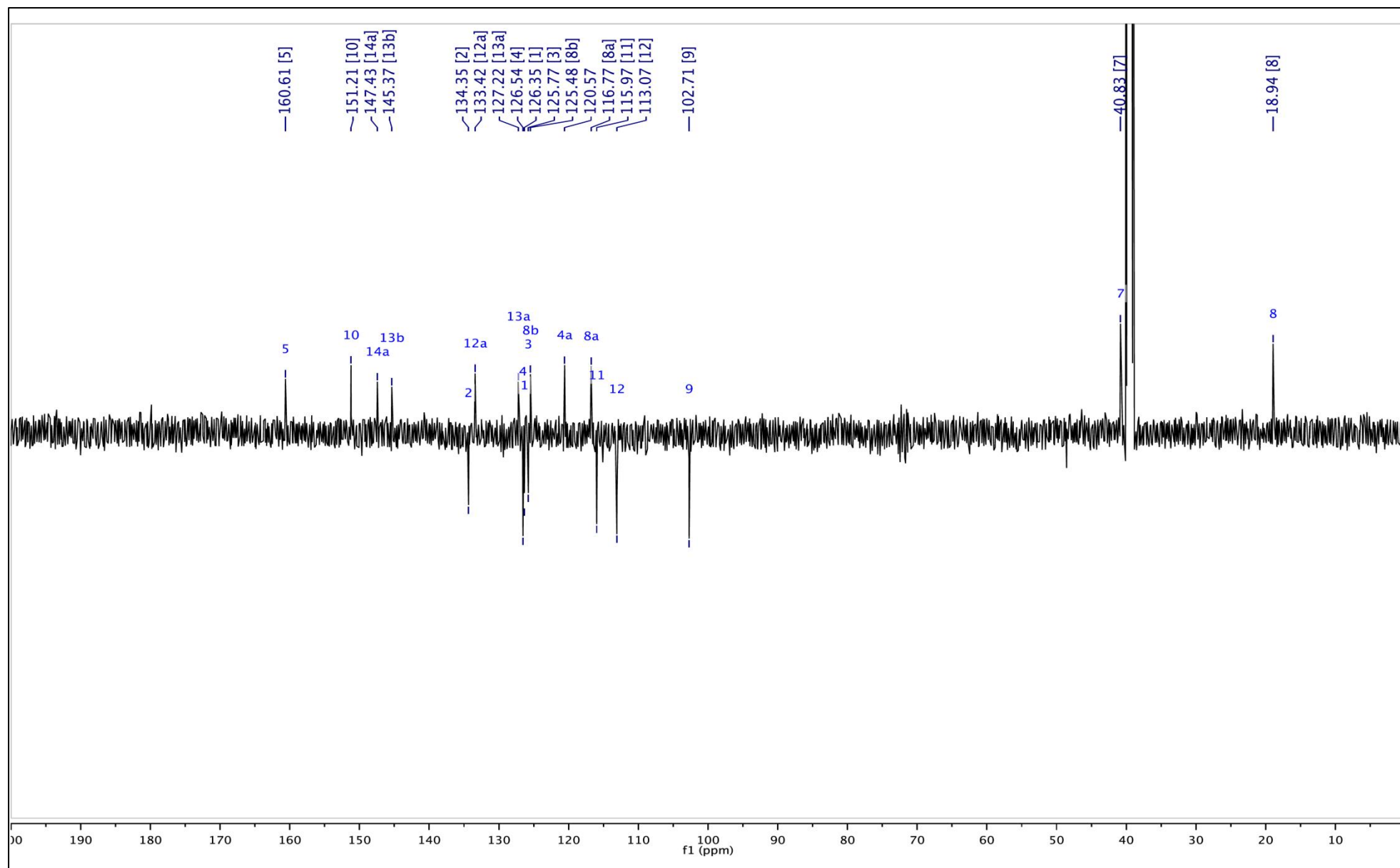


Figura 125 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da 10-hidroxirutaecarpina (**12**).

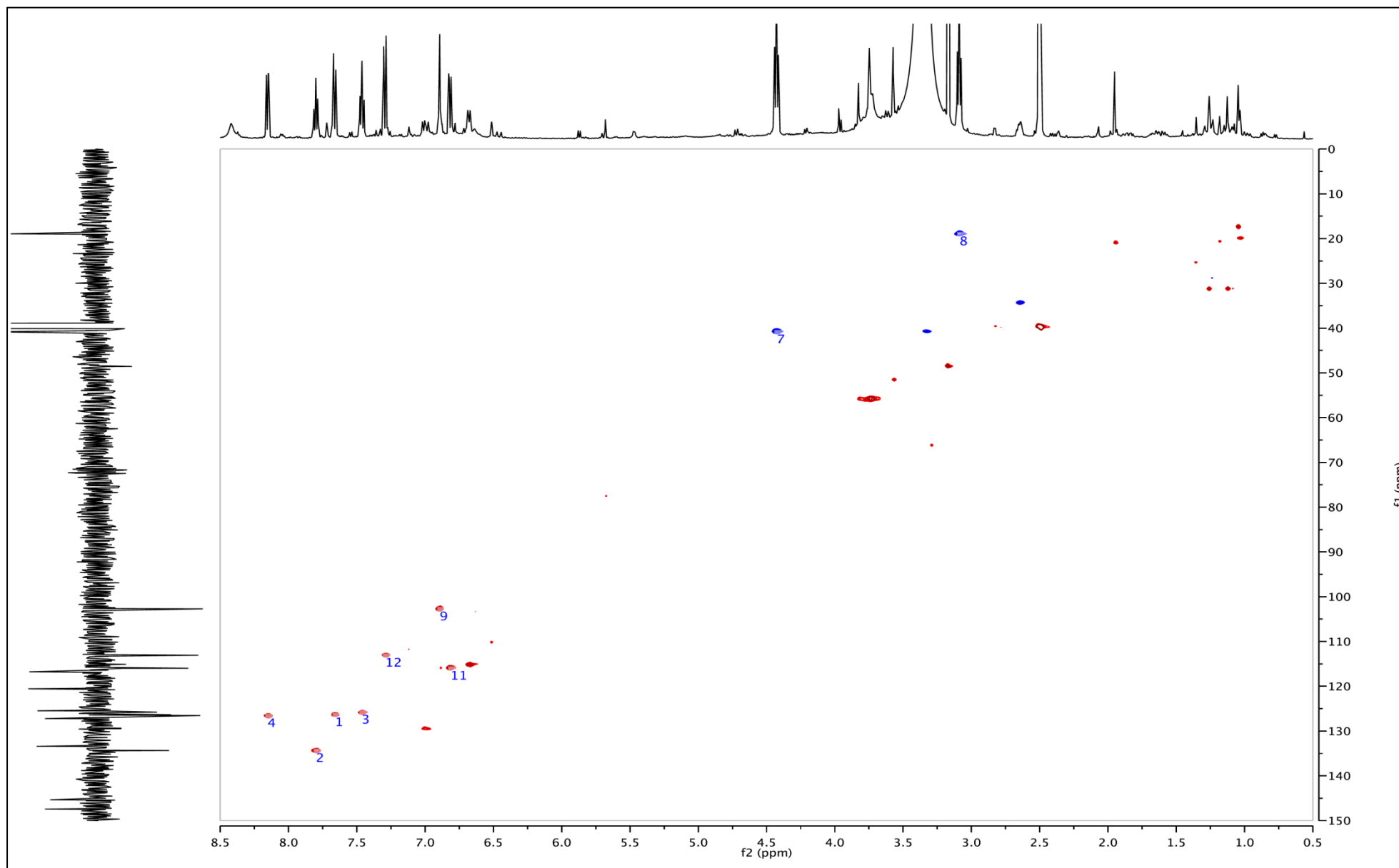


Figura 126 – Mapa de contorno *g*HMBC da 10-hidroxiturtaecarpina (**12**).

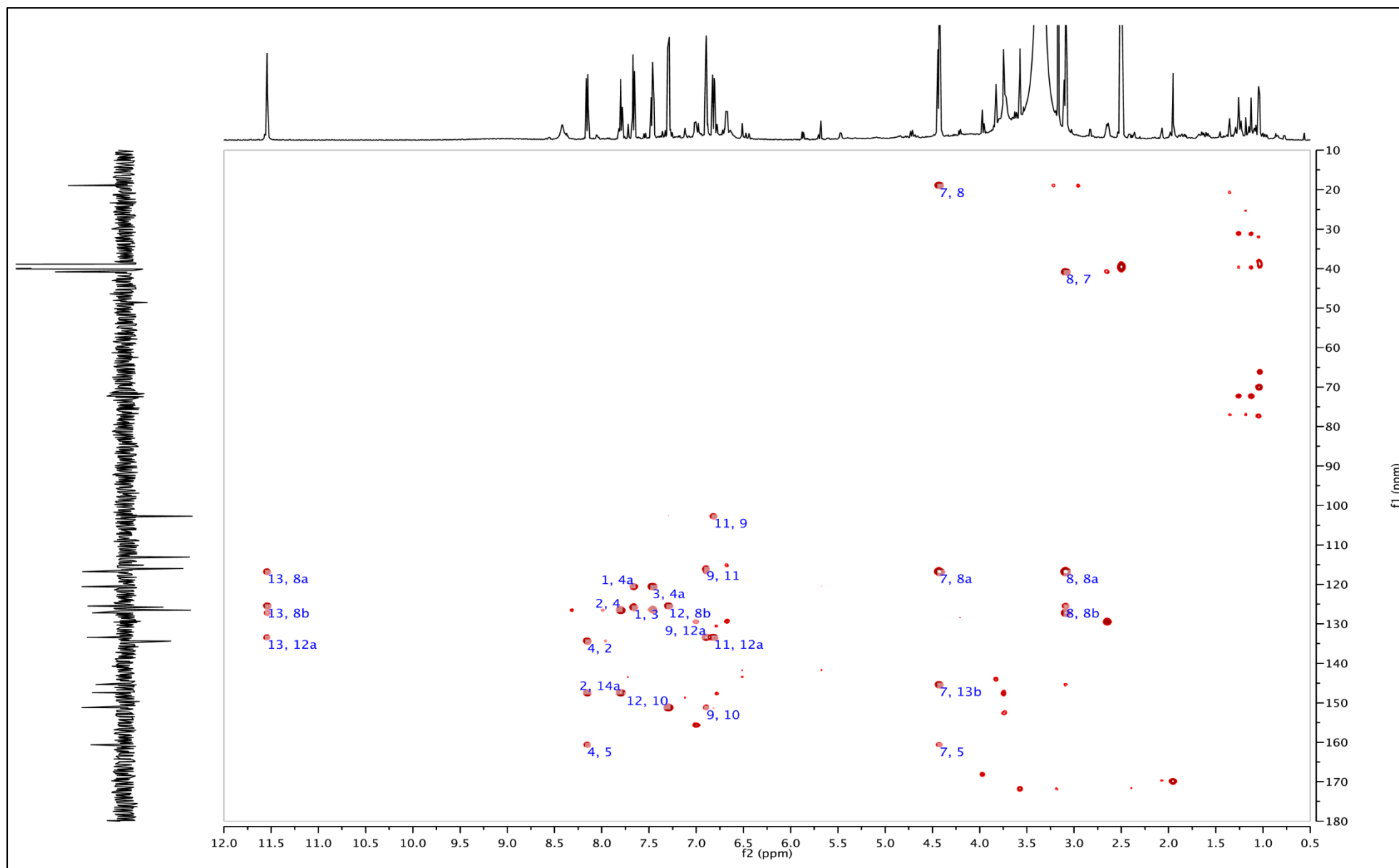


Tabela 34 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o alcaloide 10-hidroxitartarapina (**12**, em DMSO- d_6), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 12 (10-hidroxitartarapina)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1	7.66 (d; 8.4)	126.3	7.66 (d; 8.7)	126.9
2	7.80 (ddd; 8.4, 7.0, 1.6)	134.3	7.80 (ddd; 8.7, 7.2, 1.5)	134.9
3	7.5 (m)	125.7	7.47 (ddd; 7.8, 7.2, 1.5)	126.4
4	8.15 (dd; 7.5, 1.4)	126.5	8.15 (d; 7.8)	127.0
4a	-	120.5	-	121.1
5 (C=O)	-	160.6	-	161.1
7	4.43 (t; 6.89)	40.8	4.43 (dd; 7.5, 6.3)	41.3
8	3.09 (t; 6.87)	18.9	3.15 (dd; 7.5, 6.3)	19.4
8a	-	116.7	-	117.6
8b	-	125.4	-	125.5
9	6.90 (d; 2.3)	102.7	7.30 (d; 2.4)	106.2
10	-	151.2	-	152.4
11	6.82 (dd; 8.7, 2.3)	115.9	7.04 (dd; 9.0, 2.4)	118.0
12	7.29 (d; 8.7)	113.0	7.37 (d; 9.0)	113.5
12a	-	133.4	-	135.3
13a	-	127.2	-	128.2
13b	-	145.3	-	145.7
14a	-	147.4	-	147.9
NH-13	11.54 (s)	-	11.76 (s)	-
OH	8.39 (s)	-	8.31 (s)	-

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Hu *et al.*, 2012*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração M-1

O composto presente na Fração M-1 (19,2 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS).

A análise por UPLC-TOF-MS (**Figura 128**) no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$) apresentou pico em m/z 230,0819, compatível com a fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ($\Delta\text{ppm} = 0,9$). Na **Tabela 35** estão apresentados os dados de NMR de ^1H do composto isolado e os dados de comparação com a literatura (Robertson, 1962). A comparação dos dados obtidos com os presentes na literatura levou a identificação da substância presente na Fração M-1 como sendo o alcaloide do tipo furoquinolínico γ -fagarina (**composto 10**). A estrutura deste alcaloide está ilustrada na **Figura 127**. Este metabólito já havia sido identificado no extrato em DCM (ramos, Jureia) através do procedimento de desreplicação.

A γ -fagarina é um alcaloide furoquinolínico comum em espécies da família Rutaceae e que apresenta algumas atividades biológicas, como por exemplo, citotóxica e mutagênica (Akhmedjanova *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2006; Nazrullaev *et al.*, 2001; Schimmer & Leimeister, 1989; Mizuta & Kanamori, 1985; Al-Shamma *et al.*, 1979; Kikvidze *et al.*, 1971; Berinzaghi *et al.*, 1945). Este alcaloide já havia sido isolado anteriormente na espécie *Conchocarpus fontanesianus* (Cabral *et al.*, 2011).

Figura 127 – Estrutura do alcaloide γ -fagarina (**10**), isolado dos ramos de *C. fontanesianus*.

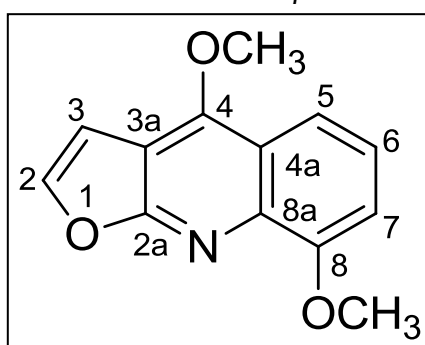


Tabela 35 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) para o alcaloide γ -fagarina (**10**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 10 (γ -fagarina)	Literatura*
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})
1	-	-
2	7.75 (d; 2.7)	7.52 (d; 2.5)
2a	-	-
3	7.26 (d; 2.7)	6.97 (d; 2.5)
3a	-	-
4	-	-
4a	-	-
5	7.72 (d; 8.5)	7.80 (q; 9.0, 2.5)
6	7.30 (t; 8.5)	7.34 (q; 9.0, 2.5)
7	7.10 (d; 8.5)	7.01 (q; 9.0, 2.5)
8	-	-
8a	-	-
Me O-C (4)	4.00 (s)	4.05 (s)
Me O-C (8)	4.42 (s)	4.35 (s)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Robertson, 1963*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Figura 128 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-1, identificado como o alcaloide γ -fagarina (**10**).

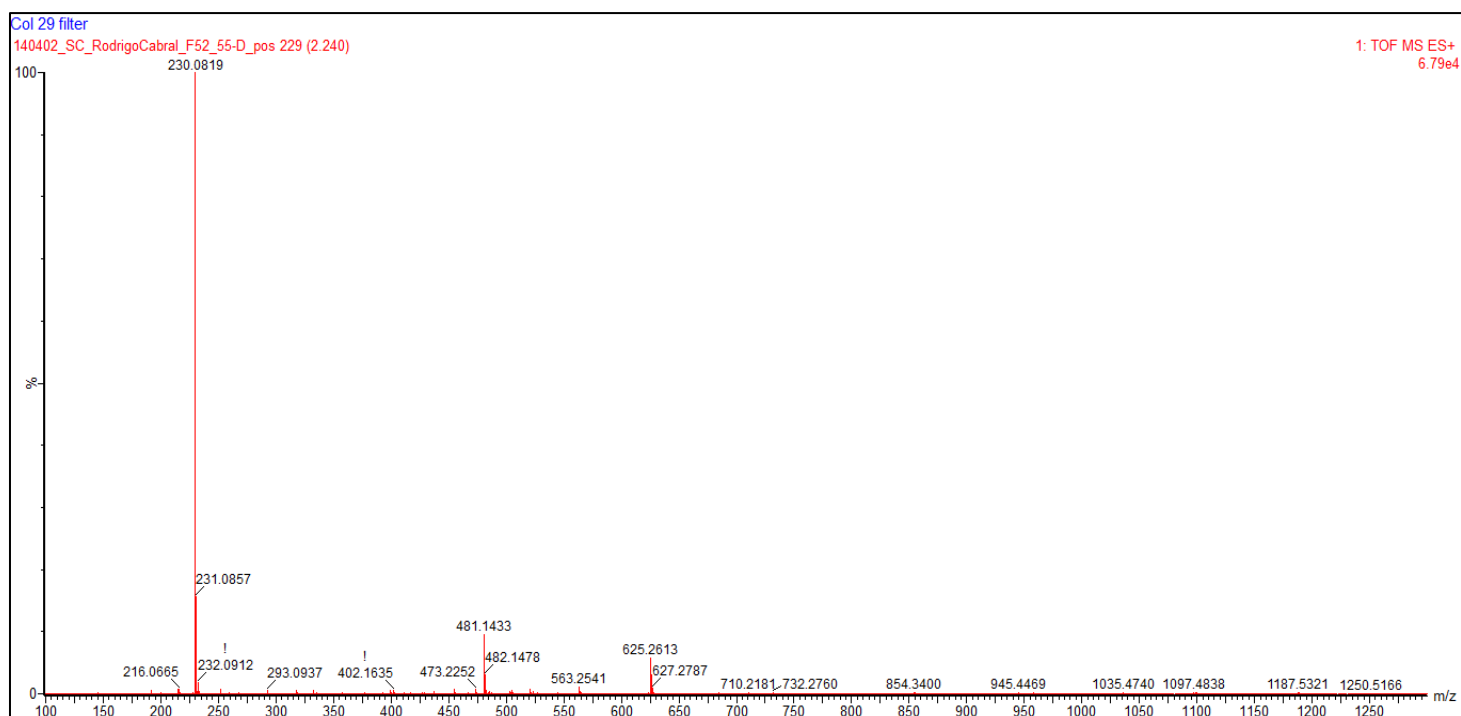
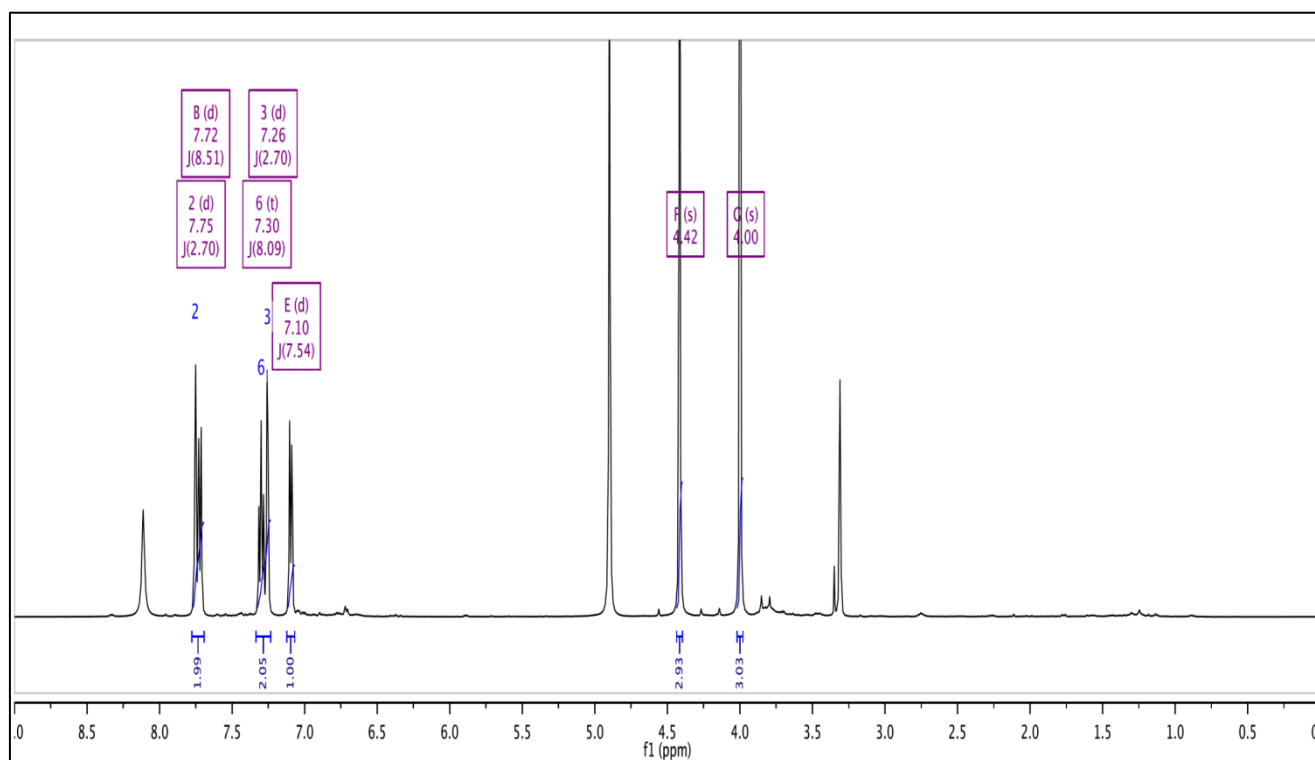


Figura 129 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide γ -fagarina (**10**).



Fração M-2

O composto na Fração M-2 (2,5 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH e ACN. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS). A **Tabela 36** ilustra os resultados obtidos através da análise por NMR e os dados de comparação com a literatura (Sakakibara *et al.*, 1995).

A análise por UPLC-TOF-MS no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 625,2525, compatível com a fórmula $C_{36}H_{36}N_2O_8$ ($\Delta ppm = -0,4$) (**Figura 131**). A comparação dos dados obtidos com os presentes na literatura levou a identificação da substância presente na fração M-2 como sendo a amida **canabisina F (composto 15)**. A estrutura está ilustrada na **Figura 130** abaixo. Esta amida possui este nome por ter sido isolada pela primeira vez na espécie *Canabis sativa* (Cannabaceae) (Sakakibara *et al.*, 1995), sendo descrita também como um dos constituintes das sementes de *Mitrephora thorelii* (Annonaceae) (Ge *et al.*, 2008). Esta é a primeira descrição deste metabólito na família Rutaceae.

Figura 130 – Estrutura da lignanamida cannabisina F (15), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

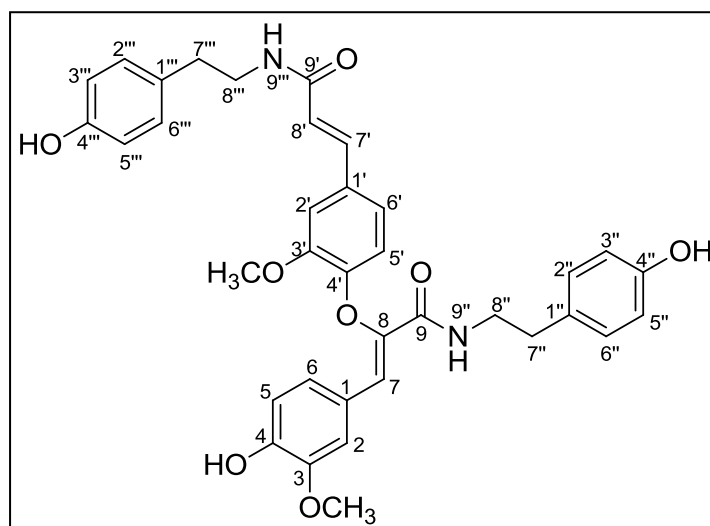


Figura 131 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-2, identificado como a lignanamida canabissina F (15).

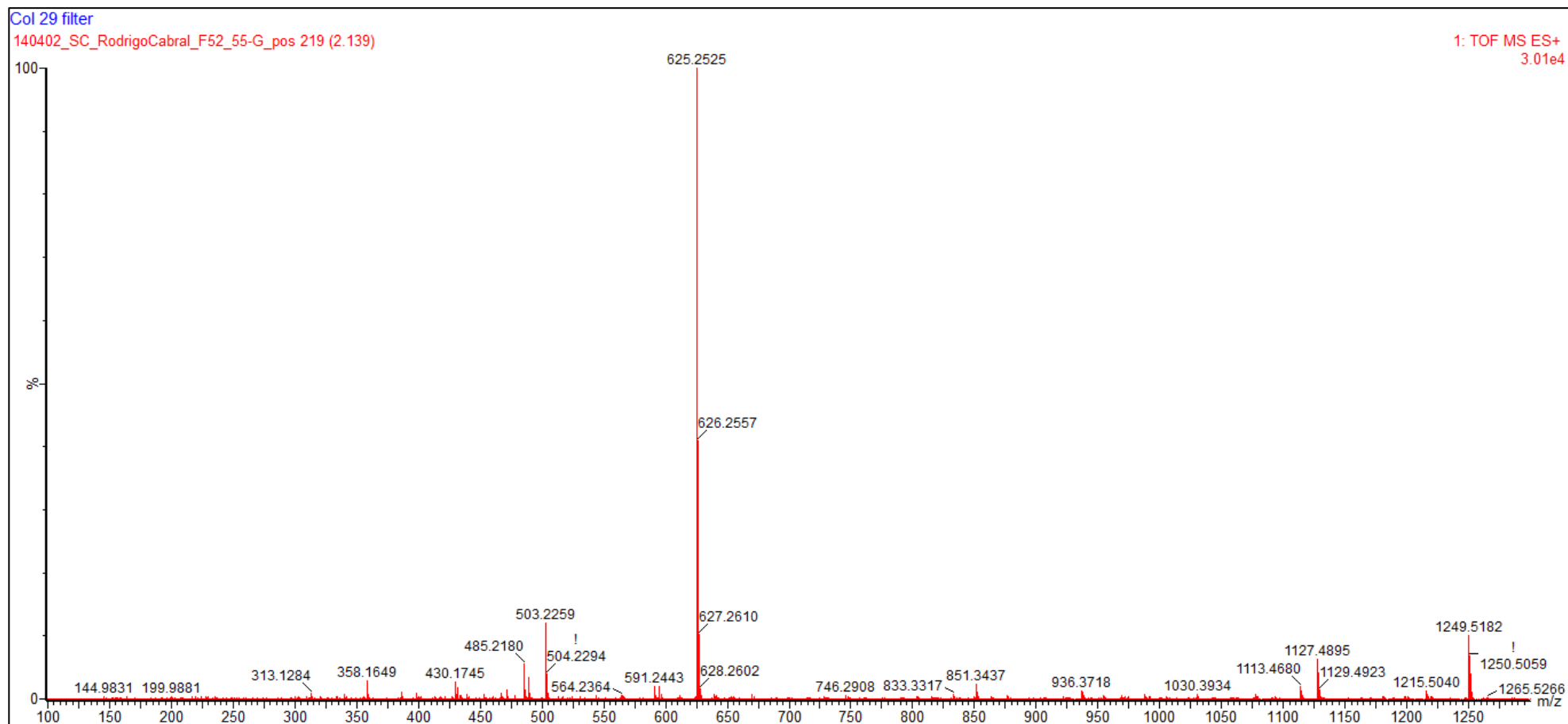


Figura 132 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amida canabisina F (**15**).

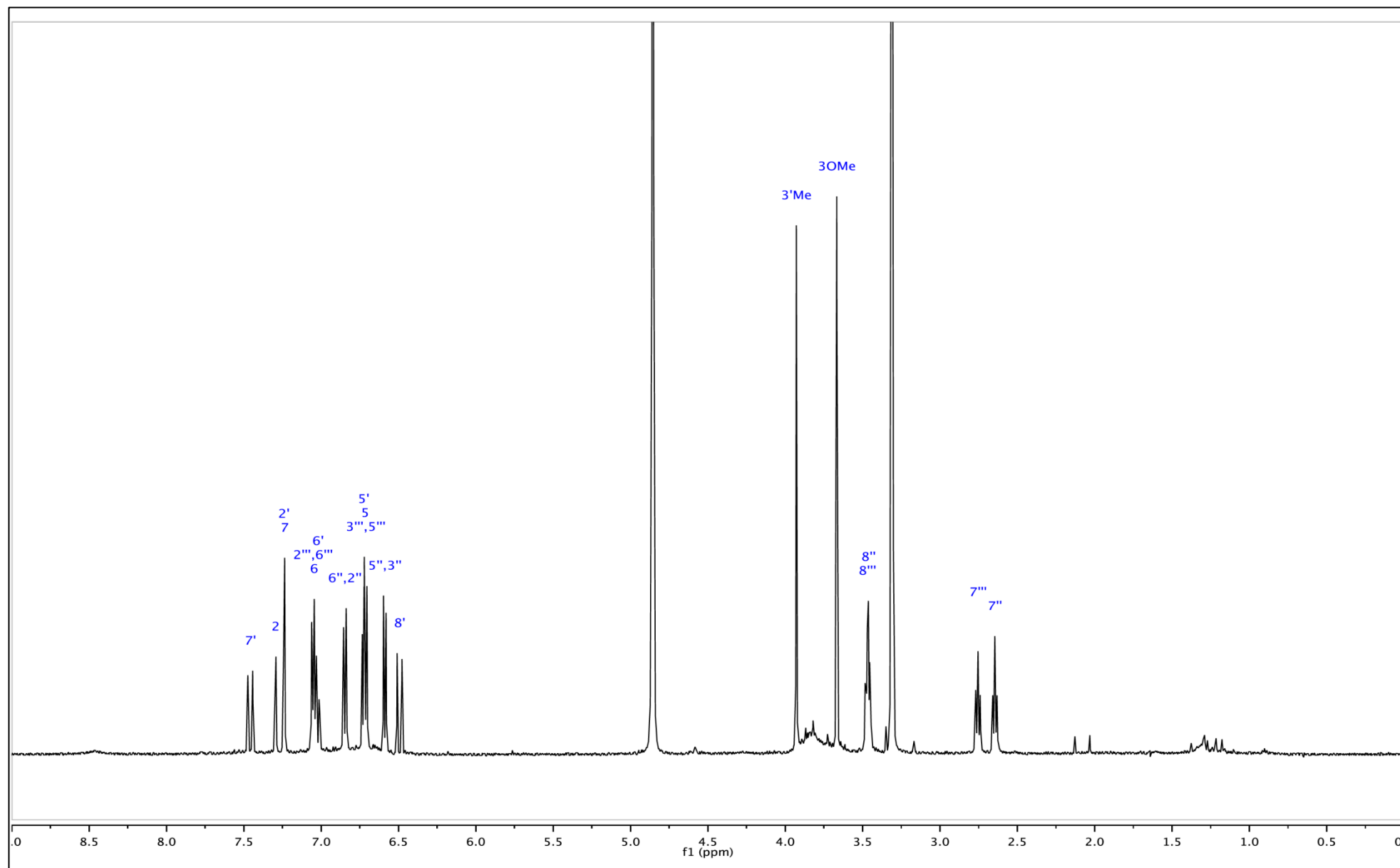


Figura 133 – Ampliação do espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) em δ_{H} 2,0 - 4,5 ppm (**A**) e δ_{H} 6,4 – 7,6 ppm (**B**), da amida canabisin F (**15**).

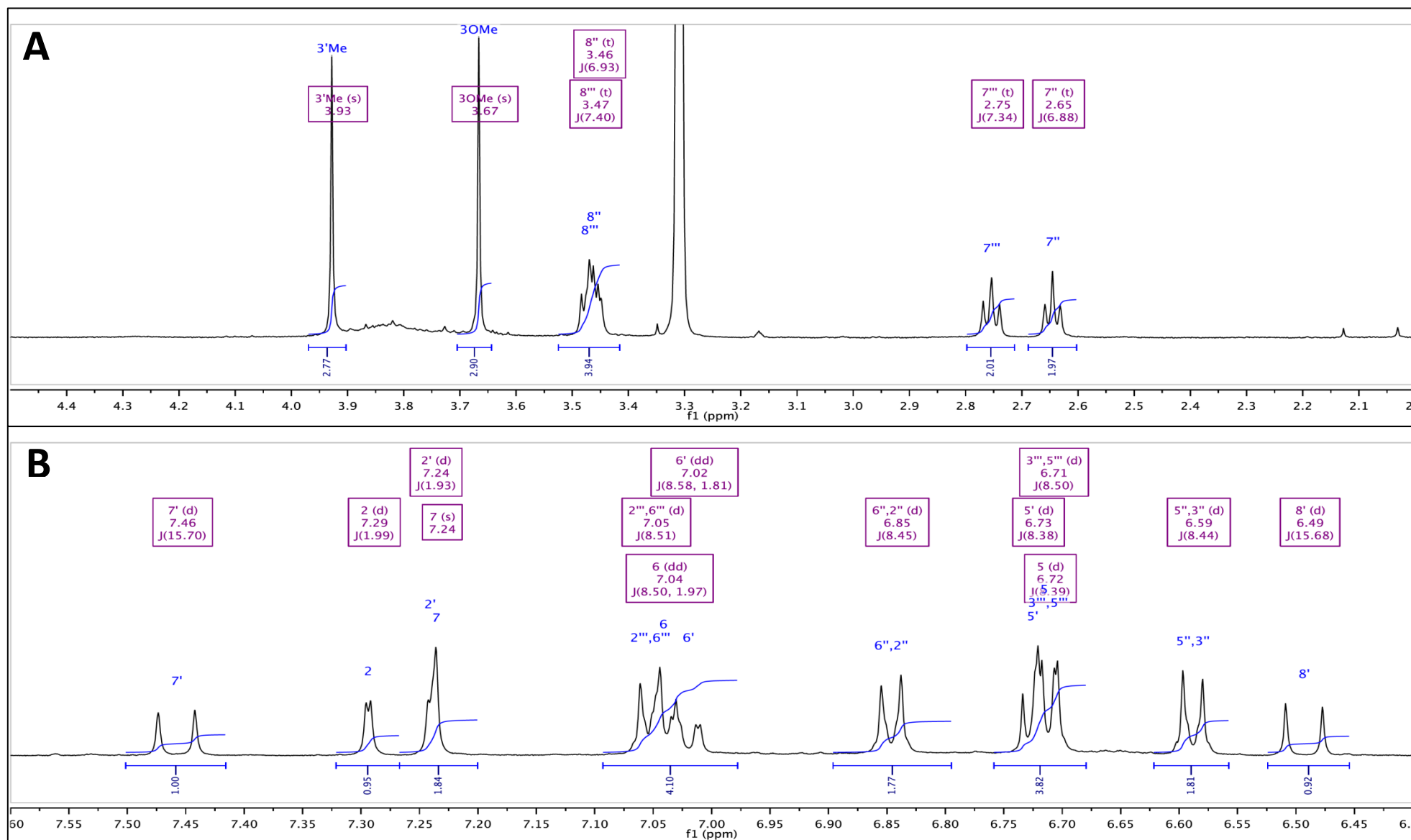


Figura 134 – Mapa de contorno *g*COSY da canabisina F (15).

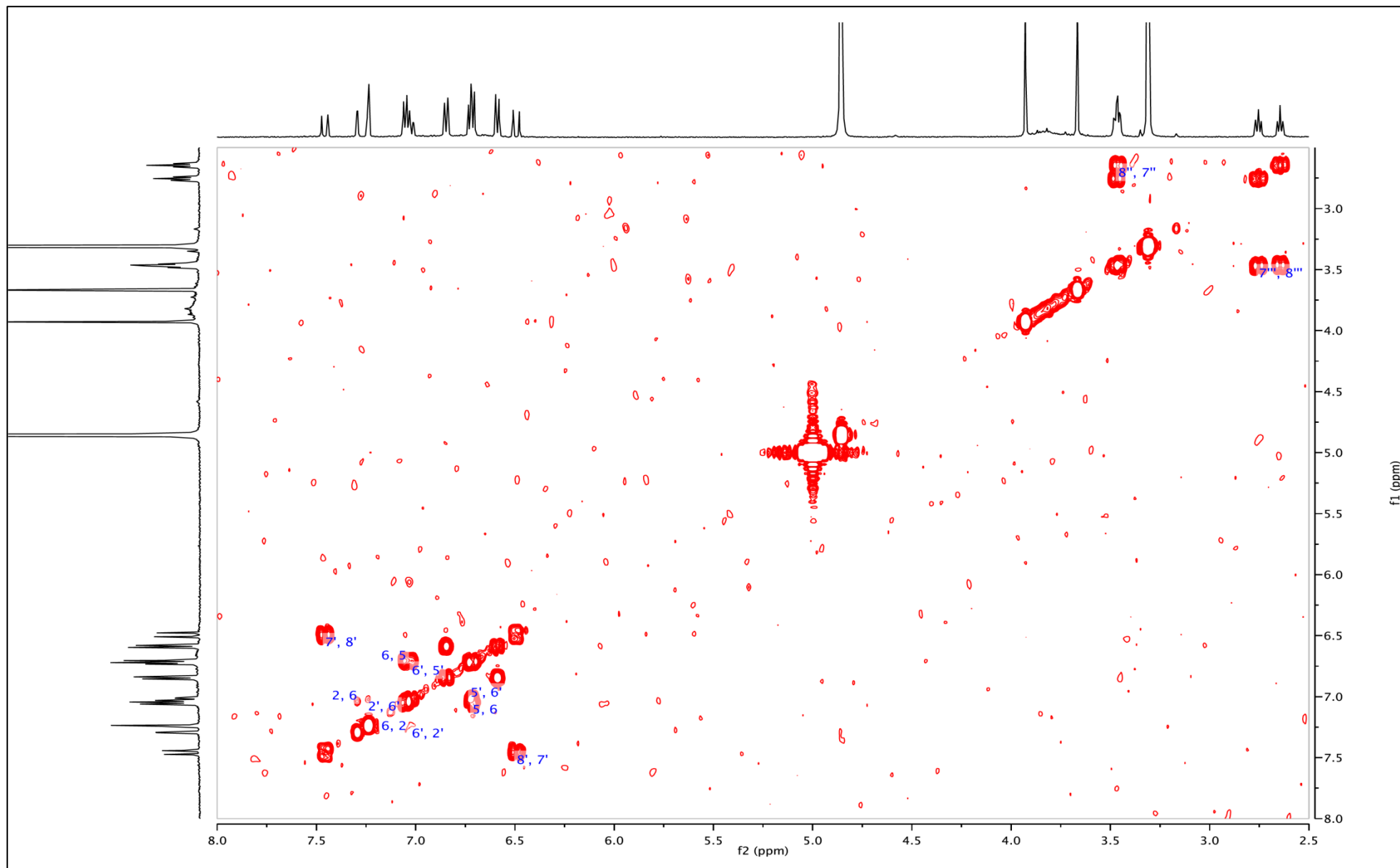


Tabela 36 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a canabisina F (**15**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 15 (canabisina F)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1	-	129.3	-	125.5
2	7.29 (d; 1.9)	110.8	7.27 (d; 2.0)	112.3
3	-	148.5	-	148.3
4	-	155.8	-	147.1
5	6.72 (d; 8.5)	114.8	6.75 (d; 8.4)	115.1
6	7.02 (dd; 8.5, 1.9)	124.5	7.03 (dd; 8.4, 2.0)	121.5
7	7.24 (s)	121.9	7.27 (s)	123.7
8	-	140.5	-	142.3
9 (C=O)	-	162.3	-	166.1
1'	-	129.8	-	131.7
2'	7.24 (d; 1.9)	113.2	7.35 (d; 2.0)	113.6
3'	-	147.5	-	150.2
4'	-	146.1	-	148.8
5'	6.73 (d; 8.5)	115.4	6.78 (d; 8.4)	115.9
6'	7.02 (dd; 8.5, 1.9)	123.4	7.14 (dd; 8.4, 2.0)	125.5
7'	7.46 (d; 15.7)	138.1	7.46 (d; 15.7)	139.6
8'	6.49 (d; 15.7)	120.2	6.57 (d; 15.7)	122.0
9' (C=O)	-	165.0	-	163.3
1''	-	130.4	-	130.8
2'' e 6''	6.85 (d; 8.4)	128.7	6.90 (d; 8.6)	130.5
3'' e 5''	6.59 (d; 8.4)	113.8	6.69 (d; 8.6)	116.1
4''	-	155.5	-	156.7
7''	2.65 (t; 6.9)	34.8	2.65 (t; 7.1)	35.5
8''	3.46 (t; 6.9)	41.0	3.46 (dd; 13.0, 6.0)	41.8
1'''	-	130.0	-	131.1
2''' e 6'''	7.05 (d; 8.5)	128.9	7.06 (d; 8.6)	130.5
3''' e 5'''	6.71 (d; 8.5)	115.4	6.75 (d; 8.6)	116.1
4'''	-	155.3	-	156.7
7'''	2.75 (t; 7.4)	35.1	2.75 (t; 7.1)	35.7
8'''	3.47 (t; 7.4)	40.2	3.49 (dd; 13.0, 6.0)	42.0
Me O-C (3)	3.67 (s)	54.9	3.69 (s)	56.0
Me O-C (3')	3.93 (s)	55.6	3.94 (s)	56.2

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Sakakibara *et al.*, 1995*

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração M-3

O composto presente na Fração M-3 (8,8 mg) apresentou-se como um sólido cristalino e solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 605,2595, compatível com a fórmula molecular $C_{31}H_{40}O_{12}$ ($\Delta_{ppm} = -0,5$ ppm) (**composto 17**). Os dados de NMR são similares aos observados para o composto **14**, exceto pela presença de um grupo acetila, resultante da acetilação do grupo OH em C-7. Esta atribuição foi obtida através do espectro HMBC. Com base nos resultados obtidos, o **composto 17** foi definido como novo triterpeno do tipo limonoide chamado **Limonoide CF-B1** (Figura 135). Os dados obtidos por NMR estão apresentados na Tabela 37.

Figura 135 – Estrutura da novo triterpeno limonoide CF-B1 (**17**), isolada dos ramos de *C. fontanesianus*.

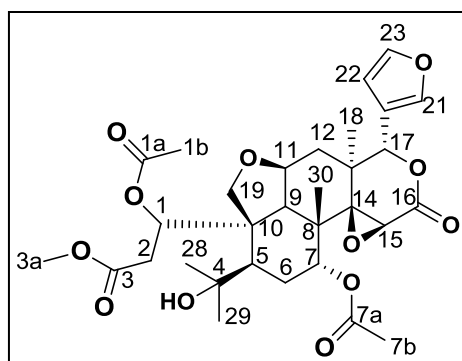


Figura 136 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-4, identificado como novo triterpeno, limonoide CF-B1 (17).

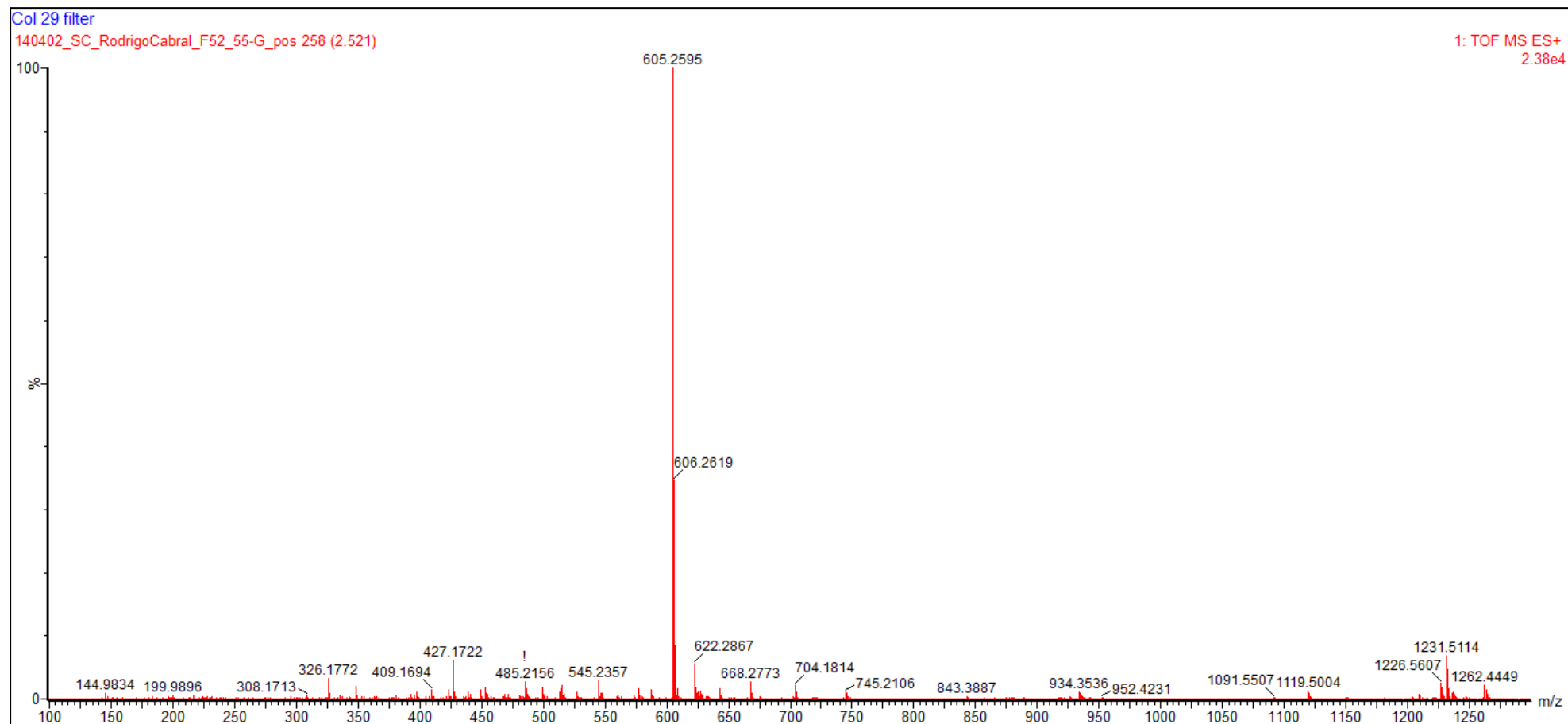


Figura 137 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do novo triterpeno, limonoide CF-B1 (**17**).

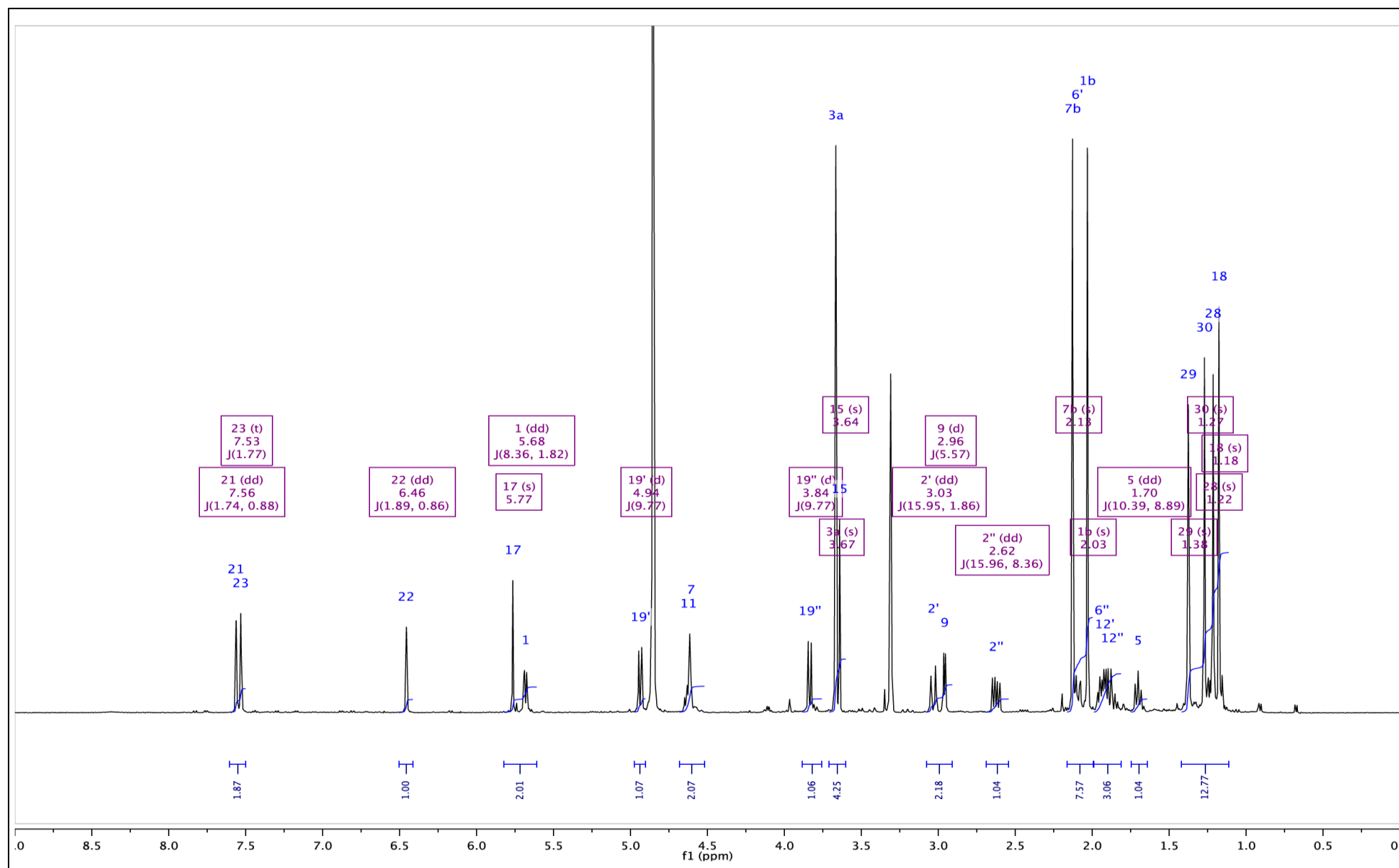


Figura 138 – Mapa de contorno *g*COSY do limonoide CF-B1 (17).

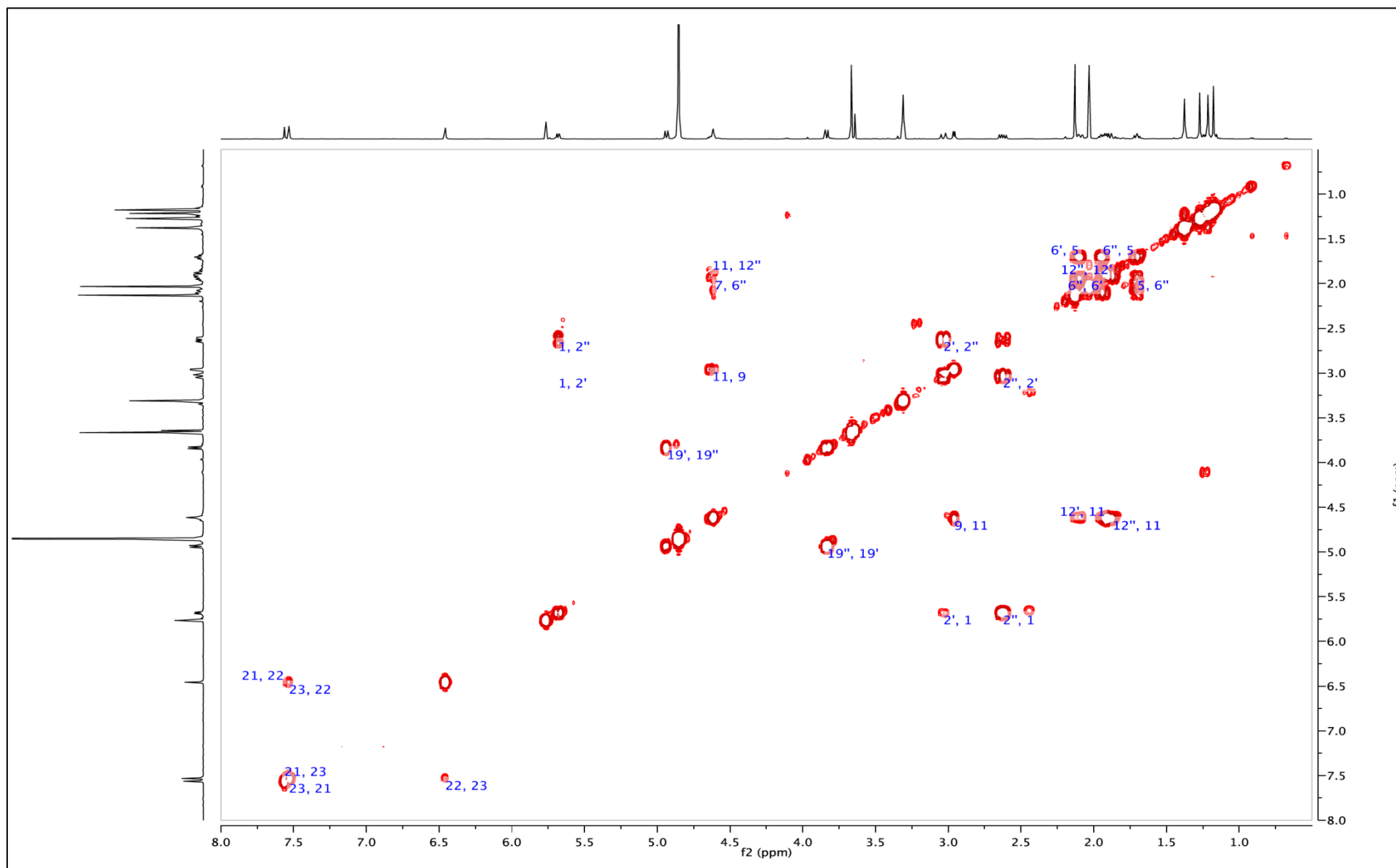


Figura 139 – Mapa de contorno NOESY do limonoide CF-B1 (**17**).

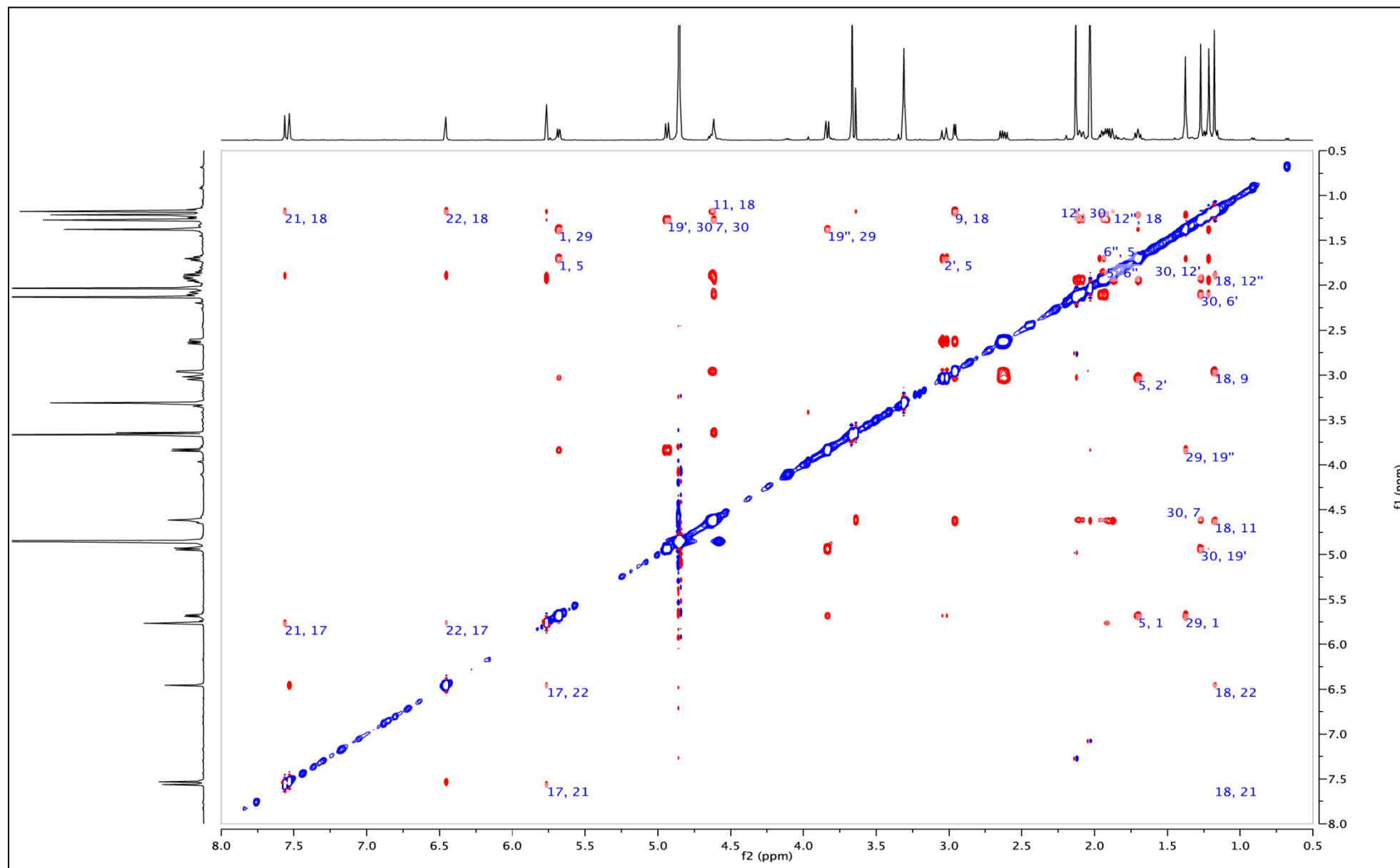


Figura 140 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do limonoide CF-B1(**17**).

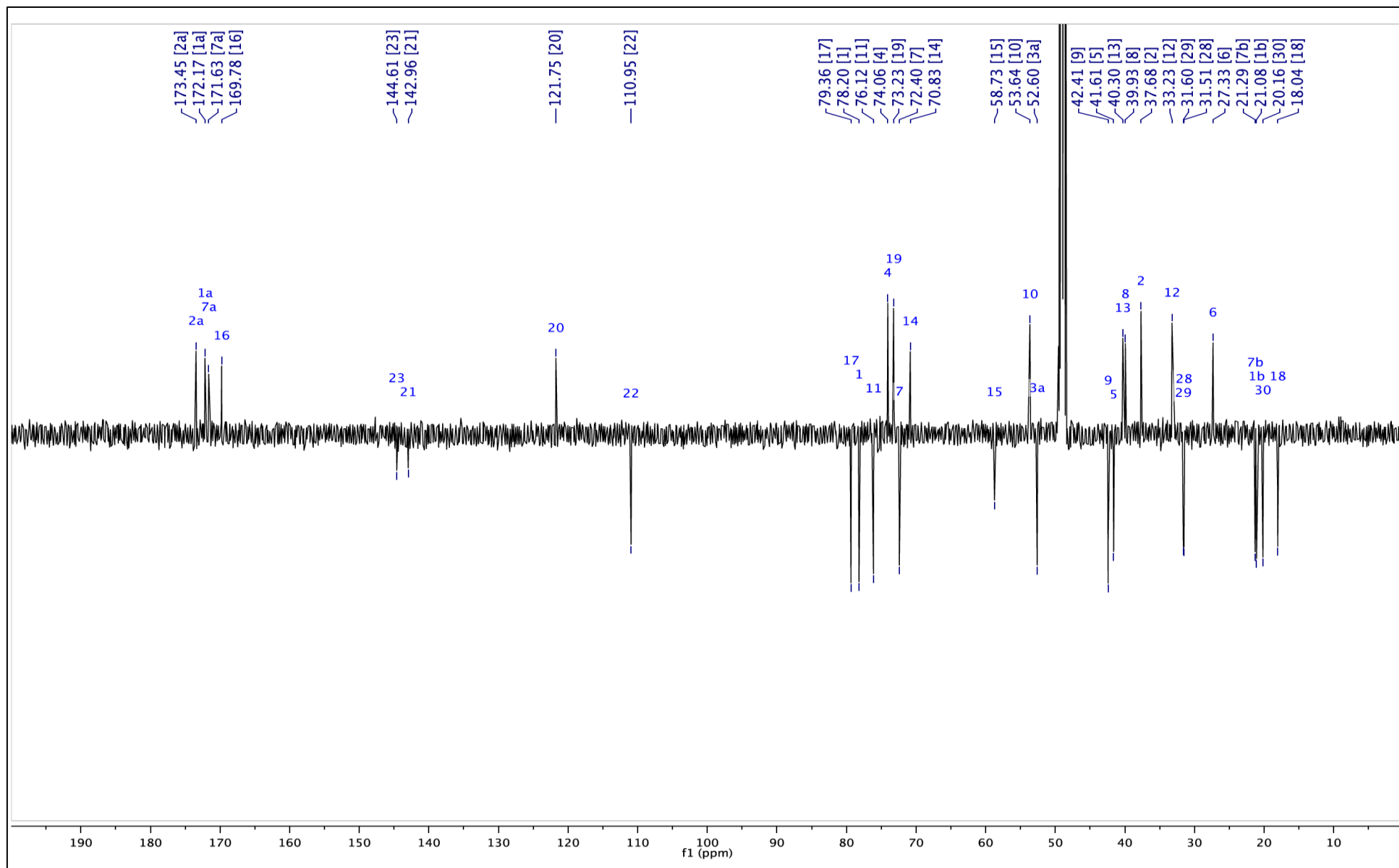


Figura 141 – Mapa de contorno *g*HSQCAD do limonoide CF-B1 (**17**).

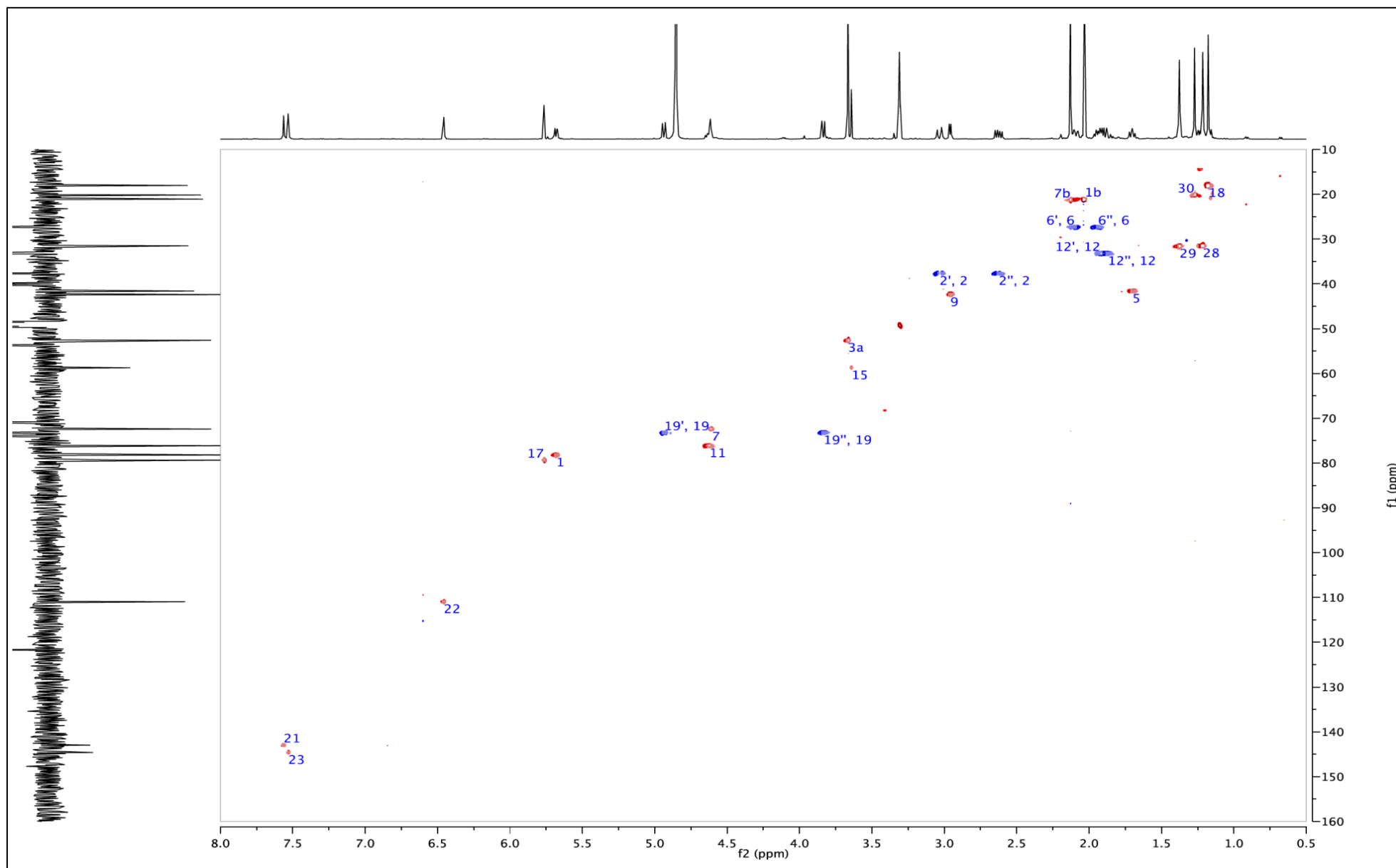


Figura 142 – Mapa de contorno *g*HMBC do limonoide CF-B1 (**17**).

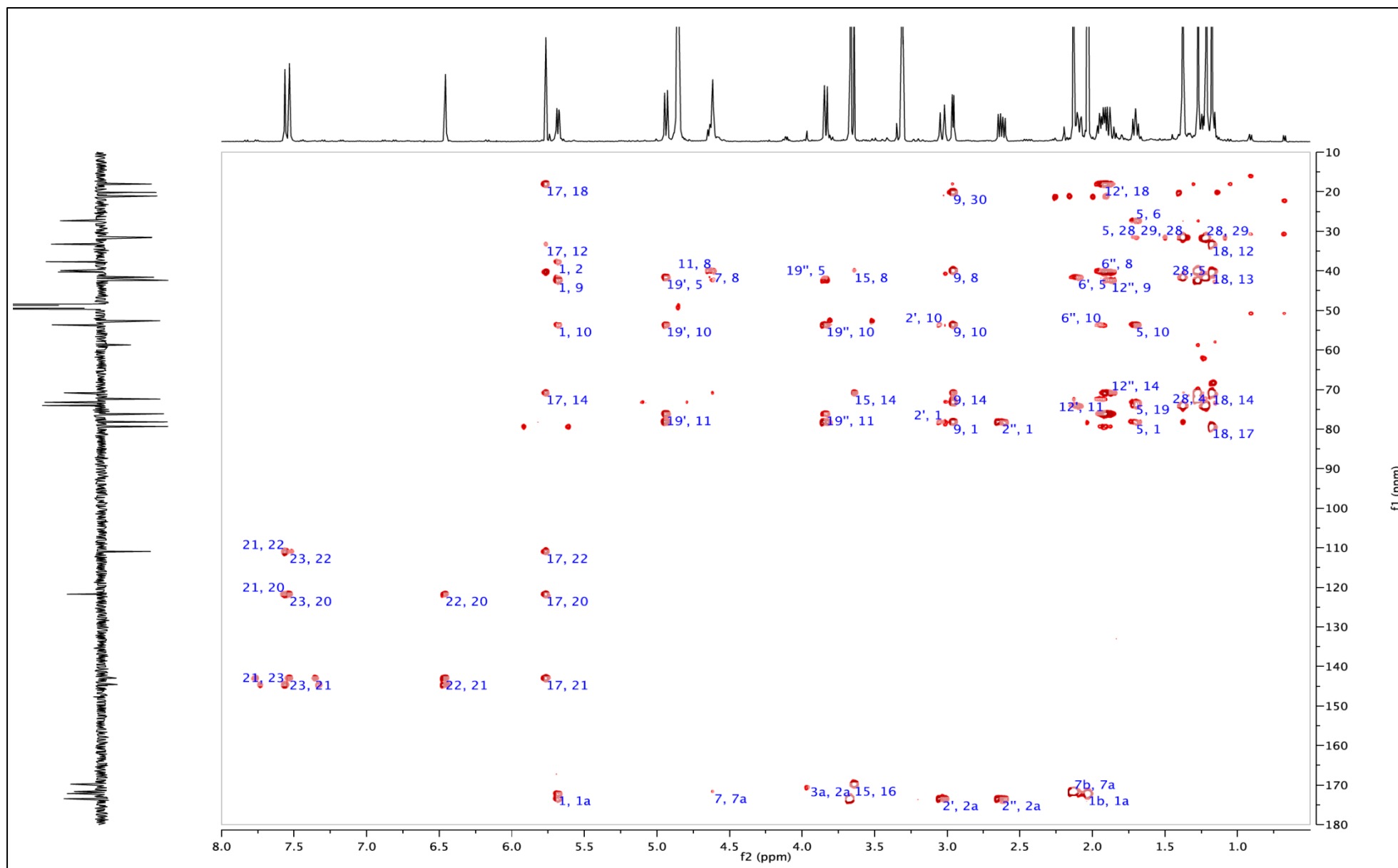


Tabela 37 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o novo limonoide CF-B1 (**17**, em CD₃OD).

Posição	Composto 17 (Limonoide CF-B1)		
	δ_H^a (m ^b)	δ_C (ppm)	<i>g</i> HMBC
1	5.68 (dd; 8.3, 1.8)	78.20	37.68 (2); 42.41 (9); 53.64 (10); 172.17 (1a)
1a	-	172.17	
1b	2.03 (s)	21.08	172.17 (1a)
2a	3.03 (dd; 15.9, 1.8)	37.68	53.64 (10); 78.20 (1); 173.45 (3)
2b	2.62 (dd; 15.9, 8.3)	37.68	78.20 (1); 173.45 (3)
3	-	173.45	
3a	3.67 (s)	52.60	173.45 (3)
4	-	74.06	
5	1.70 (dd; 10.3, 8.8)	41.61	27.33(6); 31.51 (28); 53.64 (10); 73.23 (19); 78.20 (1)
6	1.98 - 2.12 (m)	27.33	39.93 (8); 41.61 (5); 53.64 (10)
7	4.62 (m)	72.40	39.93 (8); 171.63 (7a)
7a	-	171.63	
7b	2.13 (s)	21.29	171.63 (7a)
8	-	39.93	
9	2.96 (d; 5.5)	42.41	20.16 (30); 39.93 (8); 53.64 (10); 70.83 (14); 78.20 (1);
10	-	53.64	
11	4.56 (m)	76.12	39.93 (8)
12a	1.90 (dd; 13.1, 7.5)	33.23	18.04 (18); 76.12 (11)
12b	1.81 (dd; 13.1, 9.0)	33.23	42.41 (9); 70.83 (14)
13	-	40.30	
14	-	70.83	
15	3.64 (s)	58.73	39.93 (8); 70.83 (14); 169.78 (16)
16	-	169.78	
17	5.77 (s)	79.36	18.04 (18); 33.23 (12); 70.83 (14); 110.95 (22); 121.75 (20); 142.96 (21)
18	1.18 (s)	18.04	33.23 (12); 40.30 (13); 70.83 (14); 79.36 (17)
19a	4.94 (d; 9.7)	73.23	41.61 (5); 53.64 (10); 76.12 (11)
19b	3.84 (d; 9.7)	73.23	41.61 (5); 53.64 (10); 76.12 (11)
20	-	121.75	
21	7.56 (dd; 1.7, 0.8)	142.96	110.95 (22); 121.75 (20); 144.61 (23)
22	6.46 (dd; 1.7, 0.8)	110.95	121.75 (20); 142.96 (21)
23	7.53 (t; 1.7)	144.61	110.95 (22); 121.75 (20); 142.96 (21)
28	1.22 (s)	31.51	31.60 (29); 41.61 (5); 74.06(4)
29	1.38 (s)	31.60	31.51 (28)
30	1.27 (s)	20.16	

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (*J*), expressa em

Fração M-4

O composto presente na Fração M-4 (5,4 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em DMSO e MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 400,1669, compatível com a fórmula $C_{24}H_{21}N_3O_3$ ($\Delta ppm = 0,2$) (**Figura 143**) (**composto 16**). O espectro de UV [(MeOH); λ_{max} (log ϵ) nm: 255 (3.9), 339 (3.9), 366 (3.8)] deste composto (**16**) é semelhante ao observado para o composto 10-hidroxitacropina (**12**) (Hu *et al.*, 2012), sugerindo a presença de um cromóforo UV semelhante ao indolopiridoquinazolino. Os espectros de NMR 1H e HSQC indicaram a presença de dois grupos metílenos (δ_H/δ_C 4,51/43,2 e 3,52/21,7), um sistema de spin com três sinais aromáticos a δ_H 6,64 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-10), 7,45 (1H, d, $J = 11,3$ Hz, H-11), 7,18 (1H, s, H-12) característicos de anel aromático tri-substituído. Os sinais de NMR em δ_H/δ_C 3,99/56,1 sugerem a presença de um grupo metoxila. Este grupo foi localizado em C-9 de acordo com as correlações NOESY e HMBC (**Figuras 146 e 149**).

O espectro de NMR 1H apresenta um segundo sistema spin correspondente a dois sinais aromáticos em orto a δ_H 7,80 (1H, d, $J = 7,79$ Hz, H-1) e 7,42 (1H, d, $J = 7,79$ Hz, H-2). A presença de um anel 2,2-dimetilcromeno foi indicada pelos sinais de hidrogênio em δ_H 1,40 (6H, s, 2 x CH_3), 6,05 (1H, d, $J = 10,26$ Hz, H-16), 7,94 (1H, d, $J = 10,26$ Hz, H-17). O espectro HMBC mostrou uma correlação entre H-16 com os carbonos quaternários em δ_C 154,6 (C-3), 122,6 (C-4) e 115,3 (C-4a) indicando a posição exata do anel cromeno na molécula. As correlações entre os prótons aromáticos em δ_H 7,18 (H-12), 7,45 (H-11) e 6,64 (H-10) e os carbonos sp^2 quaternários em δ_C 132,4 (C-8a), 116,7 (C-8b), 144,8 (C-12a), e 155,5 (C-9) permitiram identificar a presença de um grupo indólico oxigenado com carbono quaternário remanescente detectado no espectro de NMR ^{13}C em δ_C 128,9 (C-13). O espectro de NMR HMBC mostrou ainda correlações entre os hidrogênios dos grupos metileno em δ_H 3,52 e 4,51 e os carbonos sp^2 quaternários em 132,4 (C-8a), 116,7 (C-8b), 128,9 (C-13), 149,5 (C-13a) e 159,7 (C-5). Baseado nestes resultados, o composto presente na Fração M-4 foi identificado como o novo alcaloide indolopiridoquinazolino, chamado Conchocarpina A (**composto 16**) (**Figura 150**). A **Tabela 38** ilustra os dados de NMR obtidos para a conchocarpina A.

Figura 143 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração M-3, identificado como novo alcaloide conchocarpina A (**16**).

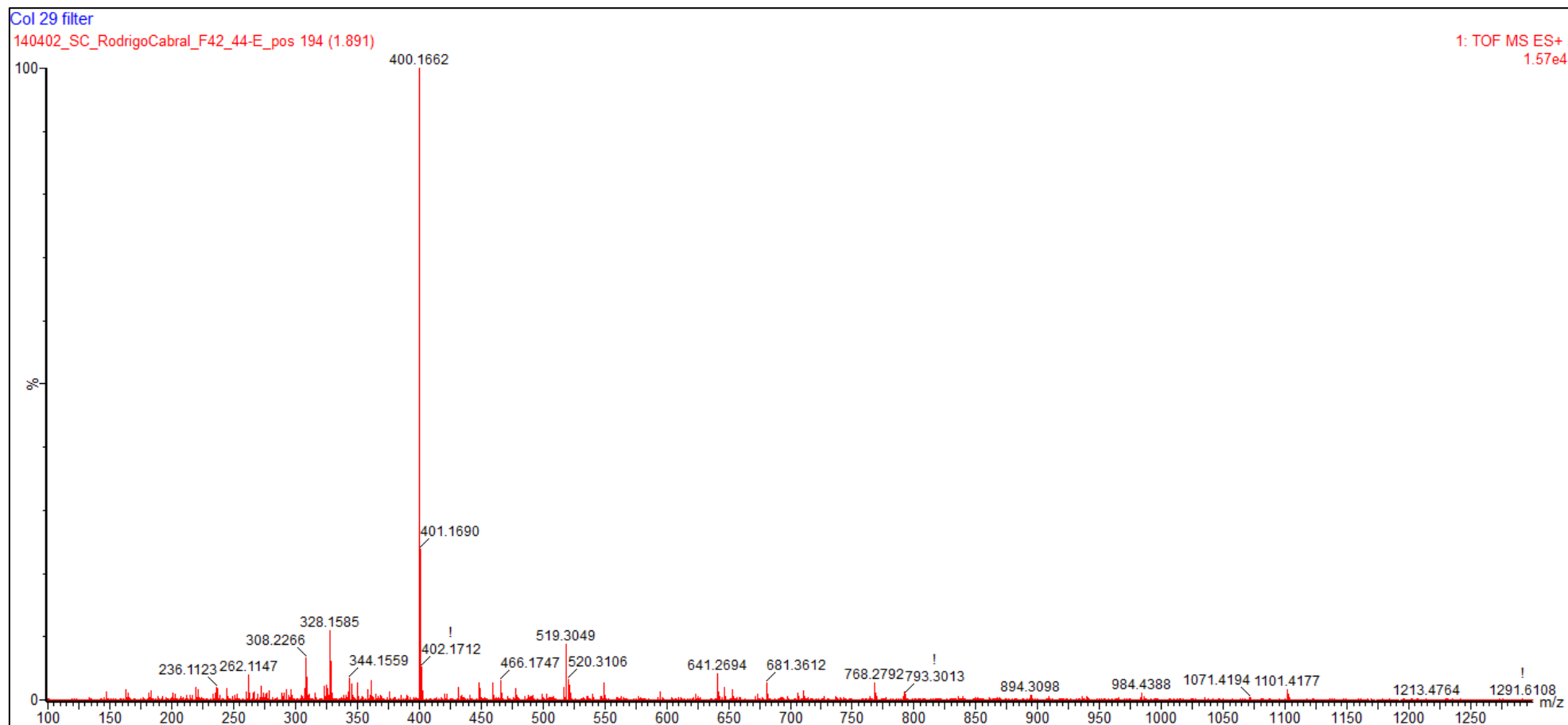


Figura 144 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide conchocarpina A (**16**).

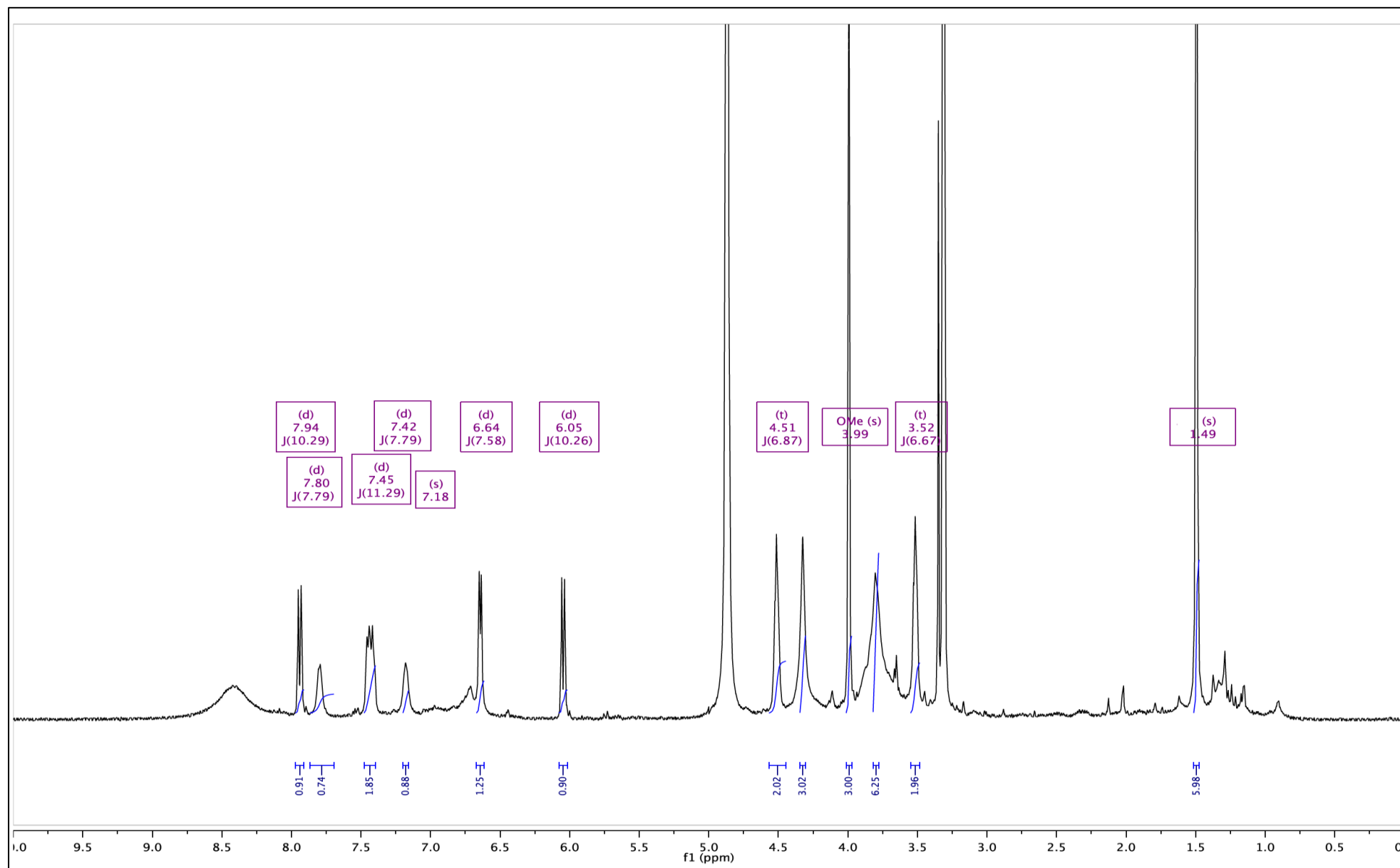


Figura 145 – Mapa de contorno *g*COSY da conchocarpina A (**16**).

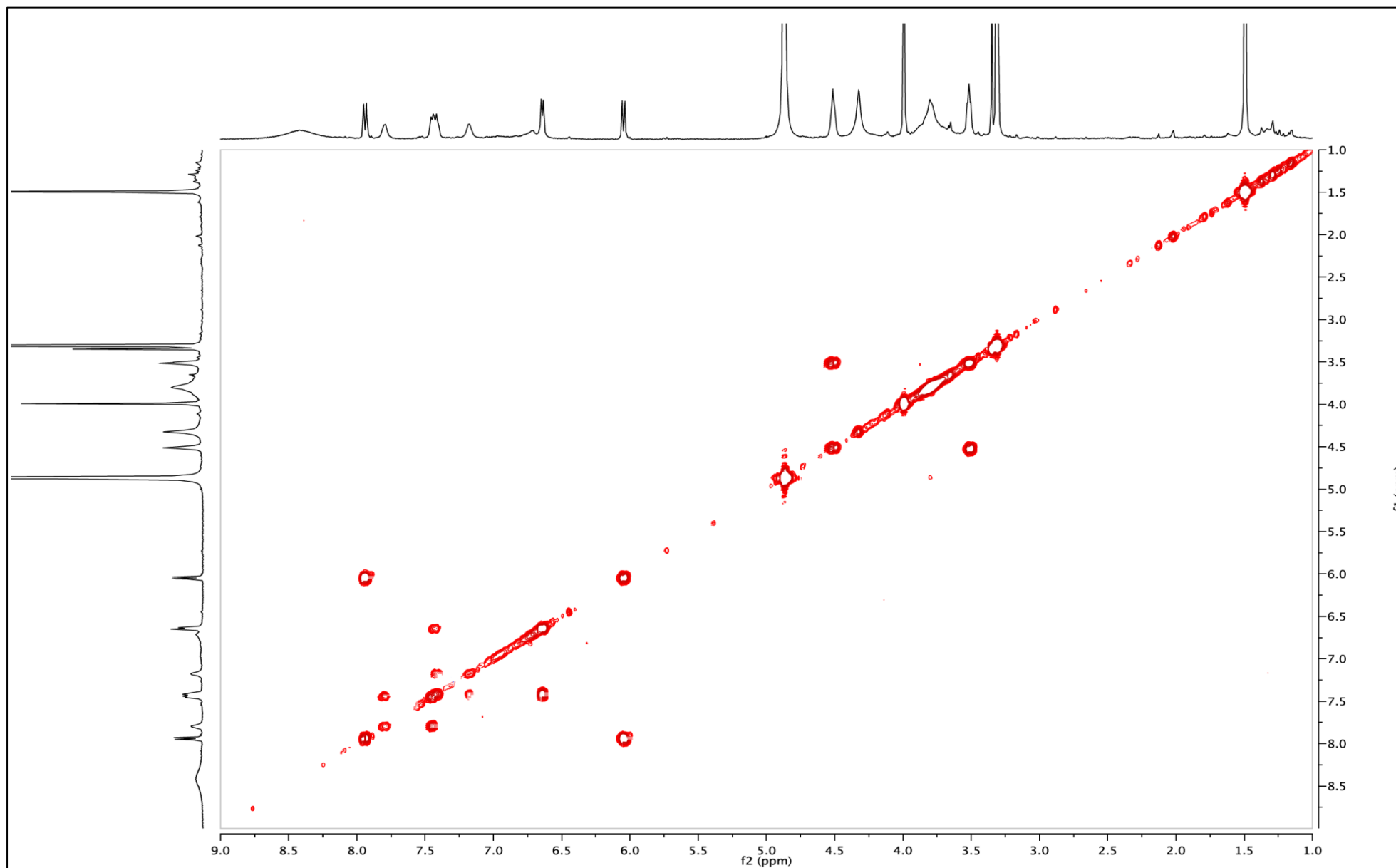


Figura 146 – Mapa de contorno NOESY da conchocarpina A (**16**).

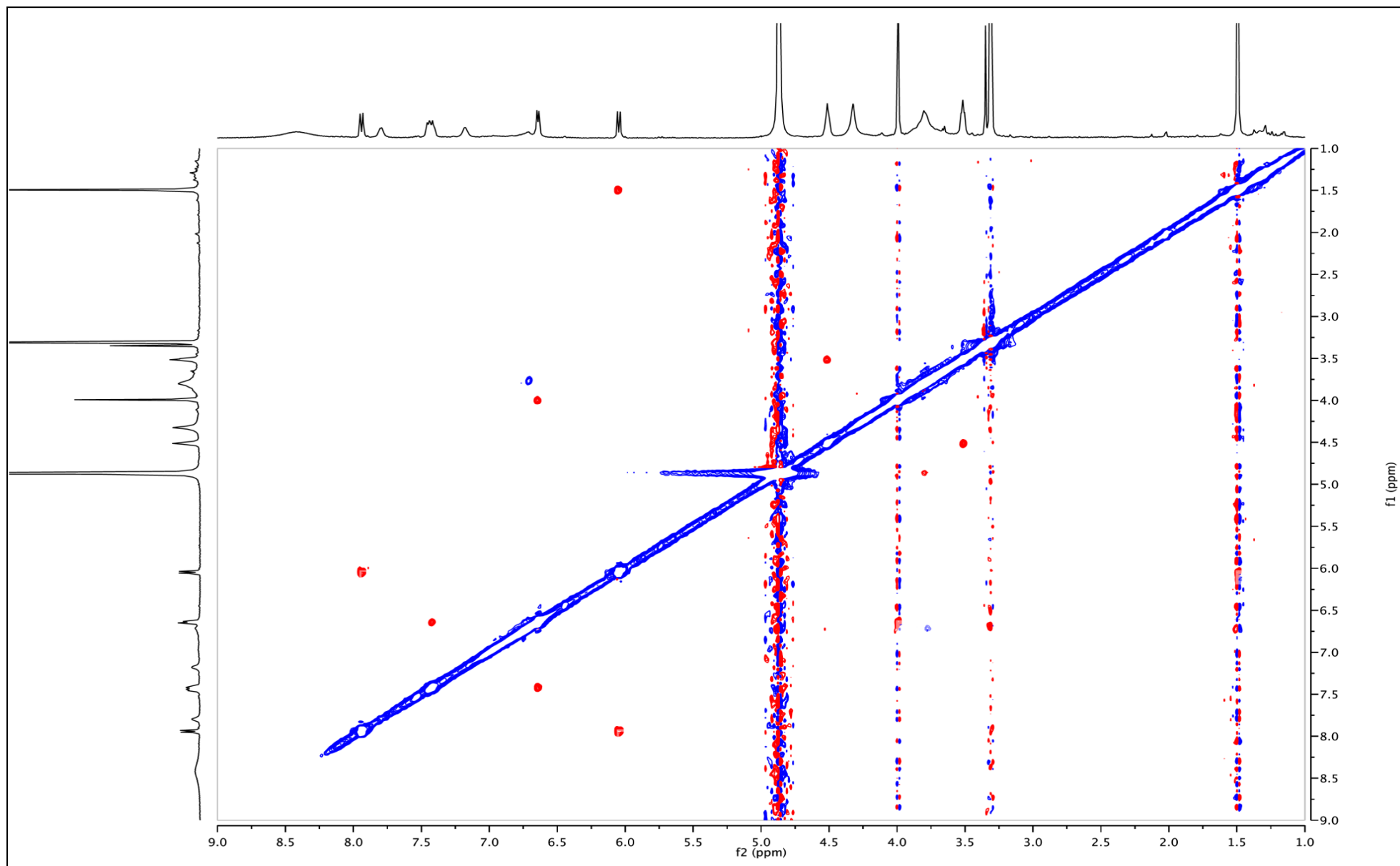


Figura 147 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do novo alcaloide conchocarpina A (**16**).

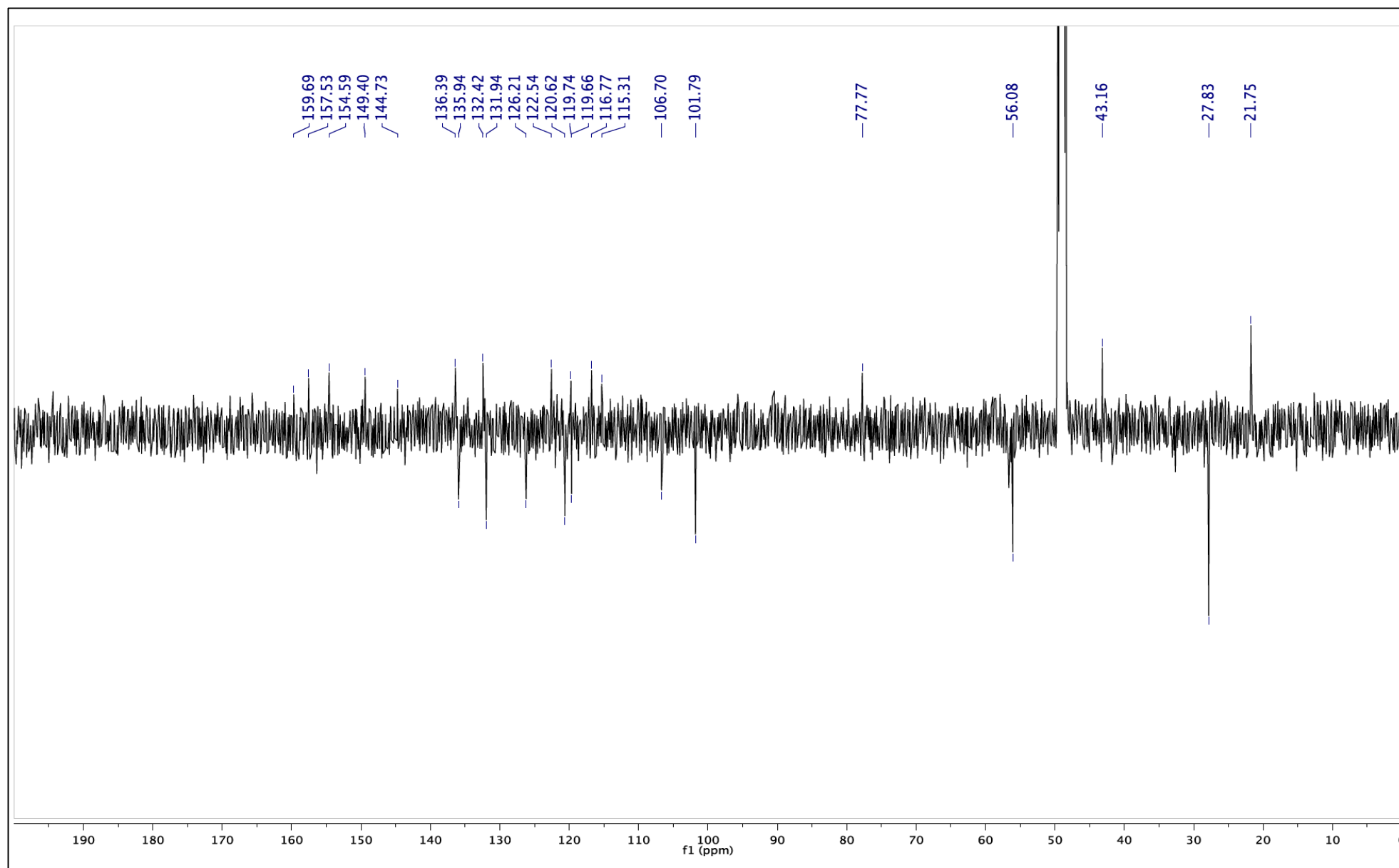


Figura 148 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da conchocarpina A (**16**).

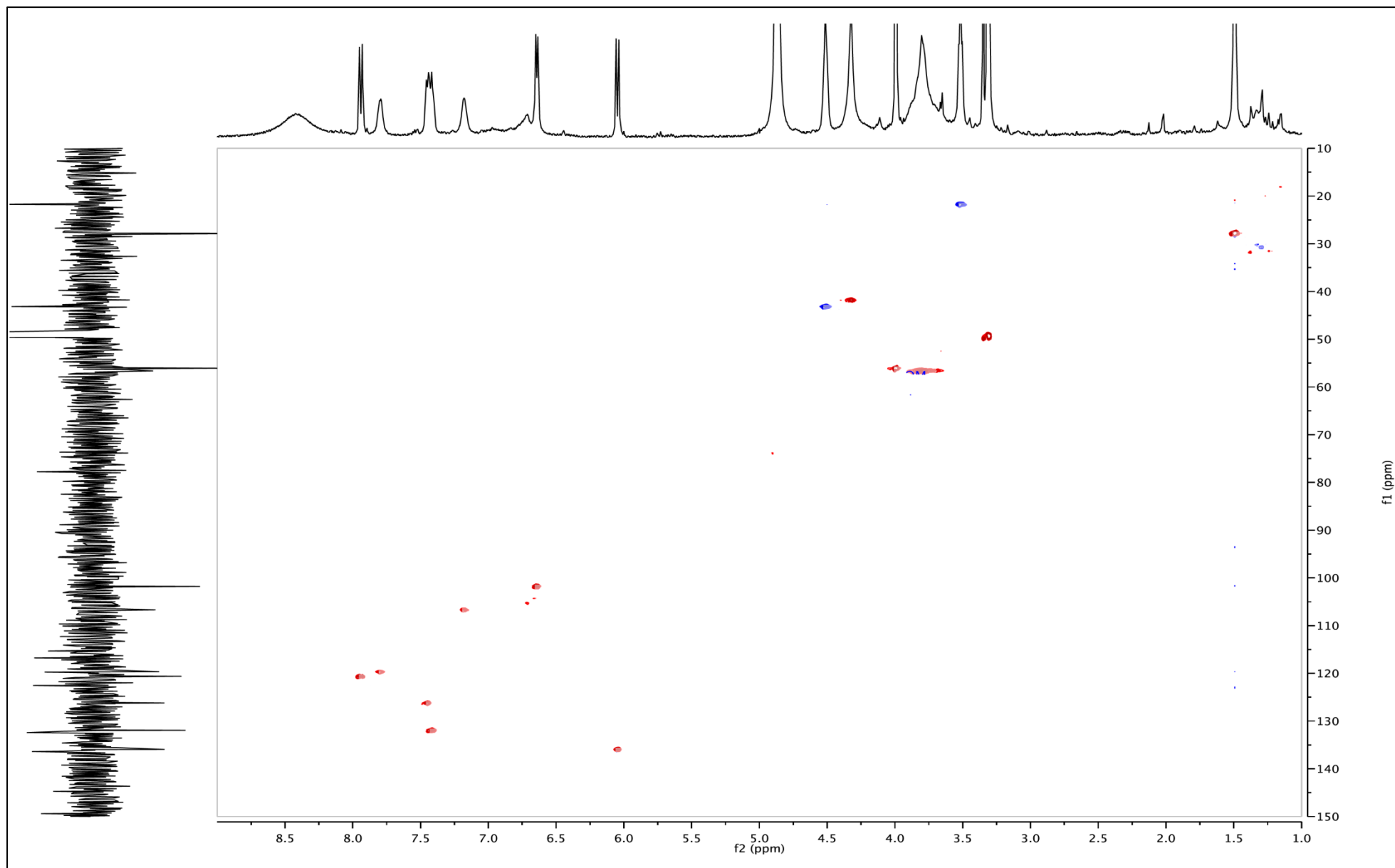


Figura 149 – Mapa de contorno *g*HMBC da conchocarpina A (**16**).

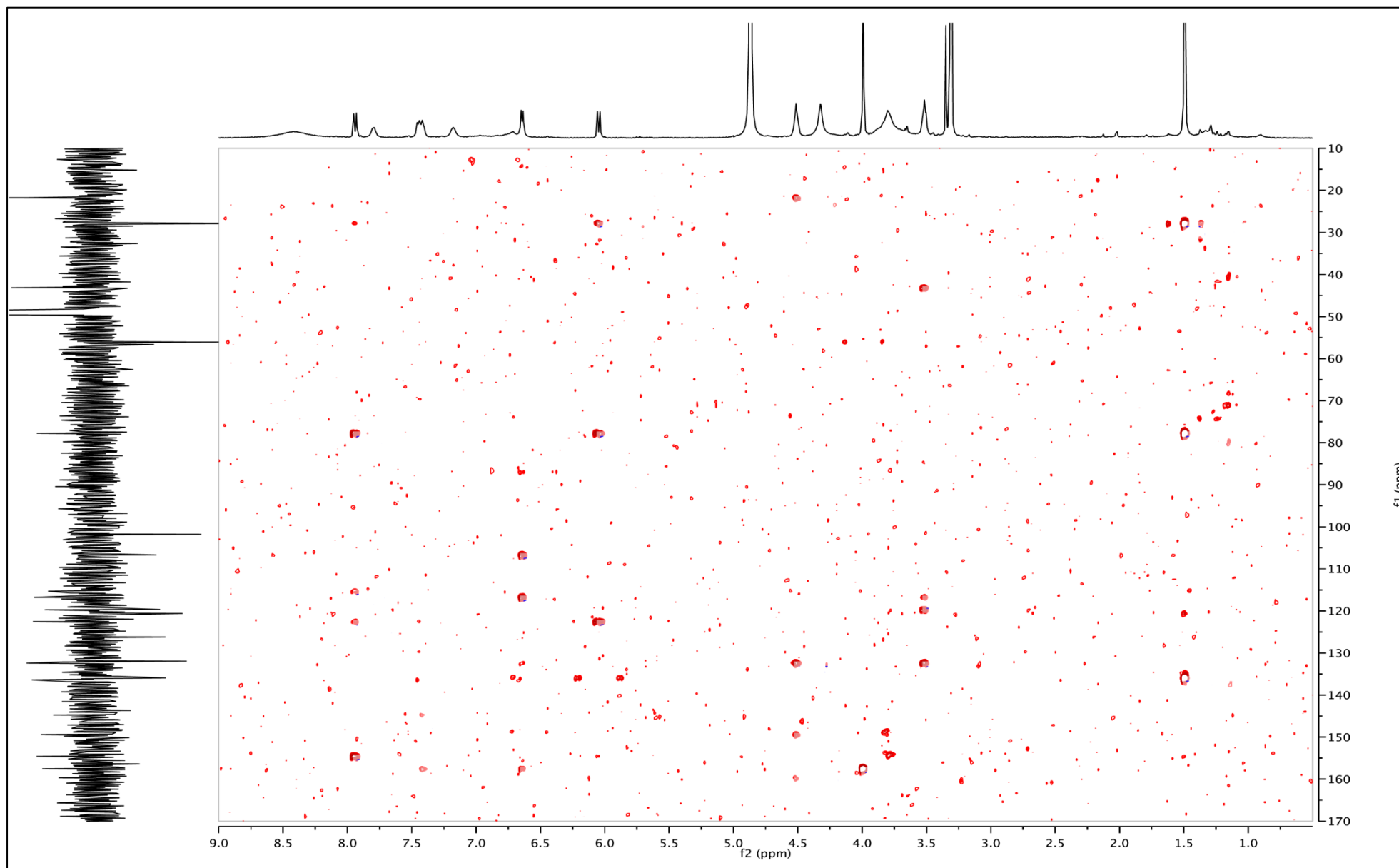


Tabela 38 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide conchocarpina A (**16**).

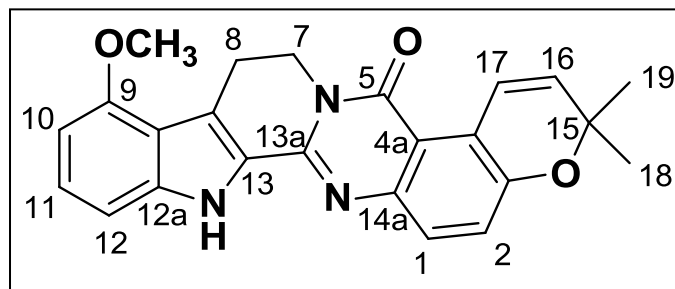
Posição	Composto 16 (conchocarpina A)		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m ^b ; <i>J</i> ^c)	δ_{C} (ppm)	<i>g</i> HMBC
1	7.80 (d; 7.7)	119.7	
2	7.42 (d; 7.7)	126.2	
3	-	154.6	
4	-	122.6	
4a	-	115.3	
5	-	159.7	
7	4.51 (t; 6.8)	43.2	21.7 (8); 132.4 (8a); 149.5 (13a); 159.7 (5)
8	3.52, (t; 6.8)	21.7	43.2 (7); 116.7 (8b); 132.4 (8a)
8a	-	132.4	
8b	-	116.7	
9	-	155.5	
10	6.64 (d; 7.5)	101.8	106.7 (12); 116.7 (8b); 155.5 (9)
11	7.45 (d; 11.3)	131.9	144.8 (12a); 155.5 (9)
12	7.18 (s)	106.7	
12a	-	144.8	
13	-	128.9	
13a	-	149.5	
14a	-	136.7	
15	-	77.8	
16	6.05 (d; 10.2)	136.0	27.8 (18 e 19); 77.8 (15); 122.6 (4)
17	7.94 (d; 10.2)	120.4	77.8 (15); 115.3 (4a); 122.6 (4); 154.6 (3)
18	1.40 (s)	27.8	27.8 (19); 77.8 (15); 136.0 (16)
19	1.40 (s)	27.8	27.8 (18); 77.8 (15); 136.0 (16)
MeO (9)	3.99 (s)	56.1	155.5 (9)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (*J*), expressa em Hz

Figura 150 – Estrutura do alcaloide inédito conchocarpina A, isolada dos ramos de *C. fontanesianus* (**16**).



Fração O-1

O composto presente na Fração O-1 (4,1 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (NMR) e espectrométricos (UPLC-TOF-MS). A **Tabela 39** abaixo ilustra os resultados obtidos através da técnica de NMR.

A análise por UPLC-TOF-MS (**Figura 152**) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 228,1024, compatível com a fórmula $C_{14}H_{13}NO_2$ ($\Delta ppm = -0,4$). Após comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura a substância presente na fração O-1 foi identificada como sendo o alcaloide do tipo piranoquinolínico angular, flindersina (**composto 18**) (Shakirov *et al.*, 1996; Stermitz & Sharifi, 1977; Akhmedzhanova *et al.*, 1974). A estrutura deste alcaloide está ilustrada na **Figura 151**.

A flindersina é um metabólito comum em espécies da família Rutaceae, acumulada nos gêneros *Zanthoxylum* L., *Haplophyllum* A. Juss., *Fagara* entre outras. Já foram relatadas algumas atividades como antifúngica, antibacteriana e citotóxica para este alcaloide (Duraipandiyan & Ignacimuthu, 2009; Jansen *et al.*, 2006; Ulubelen *et al.*, 1993 e 1984; Ahamad, 1983; Muñoz *et al.*, 1982; Stermitz & Sharifi, 1977; Akhmedzhanova *et al.*, 1974). Esta é a primeira descrição deste metabólito no gênero *Conchocarpus*.

Figura 151 – Estrutura do alcaloide flindersina, isolado dos ramos de *C. fontanesianus* (**18**).

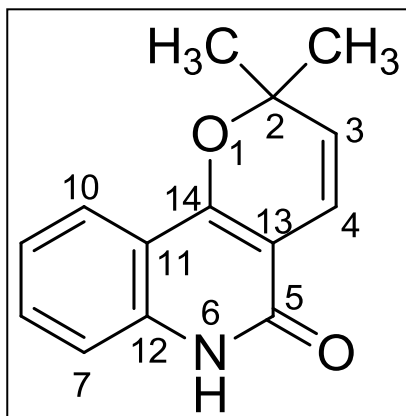


Figura 152 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração O-1, identificado como alcaloide quinolônico flindersina (**18**).

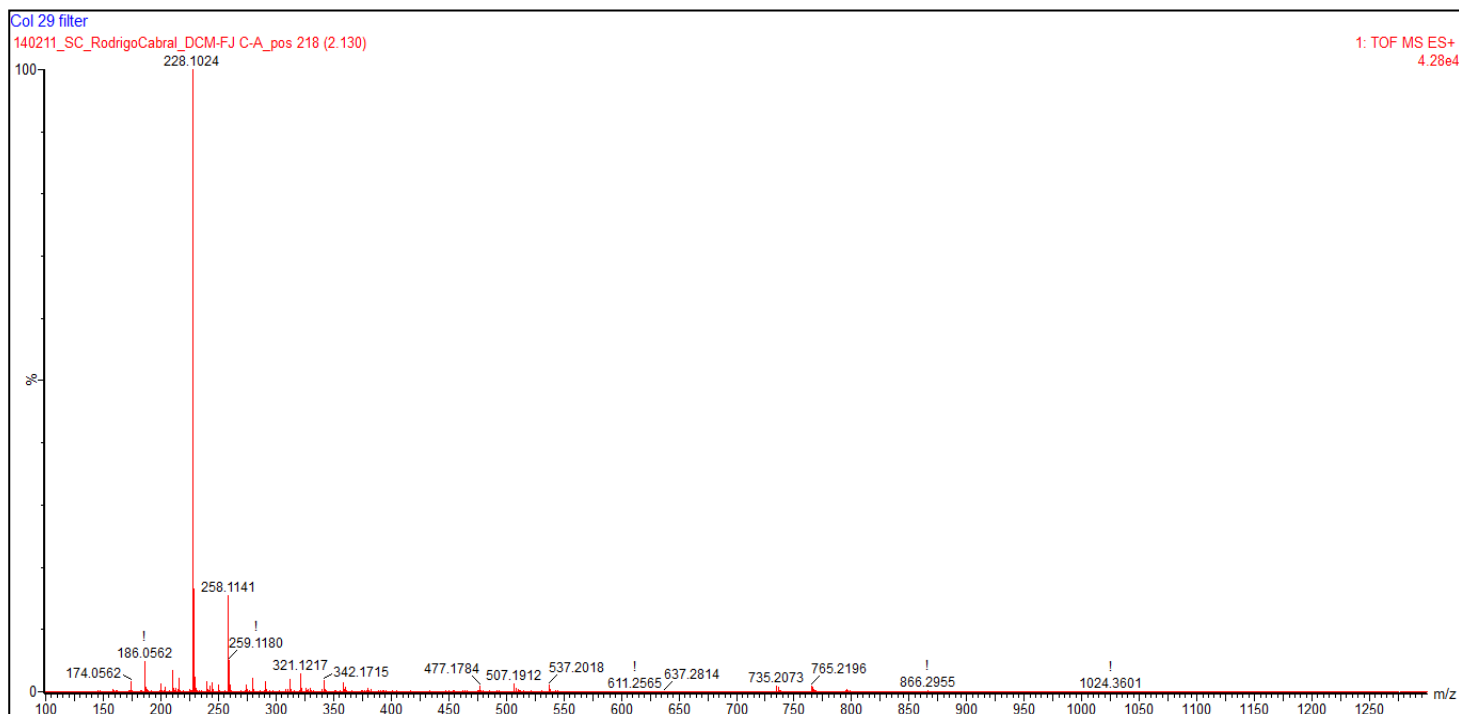


Figura 153 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide flindersina (**18**).

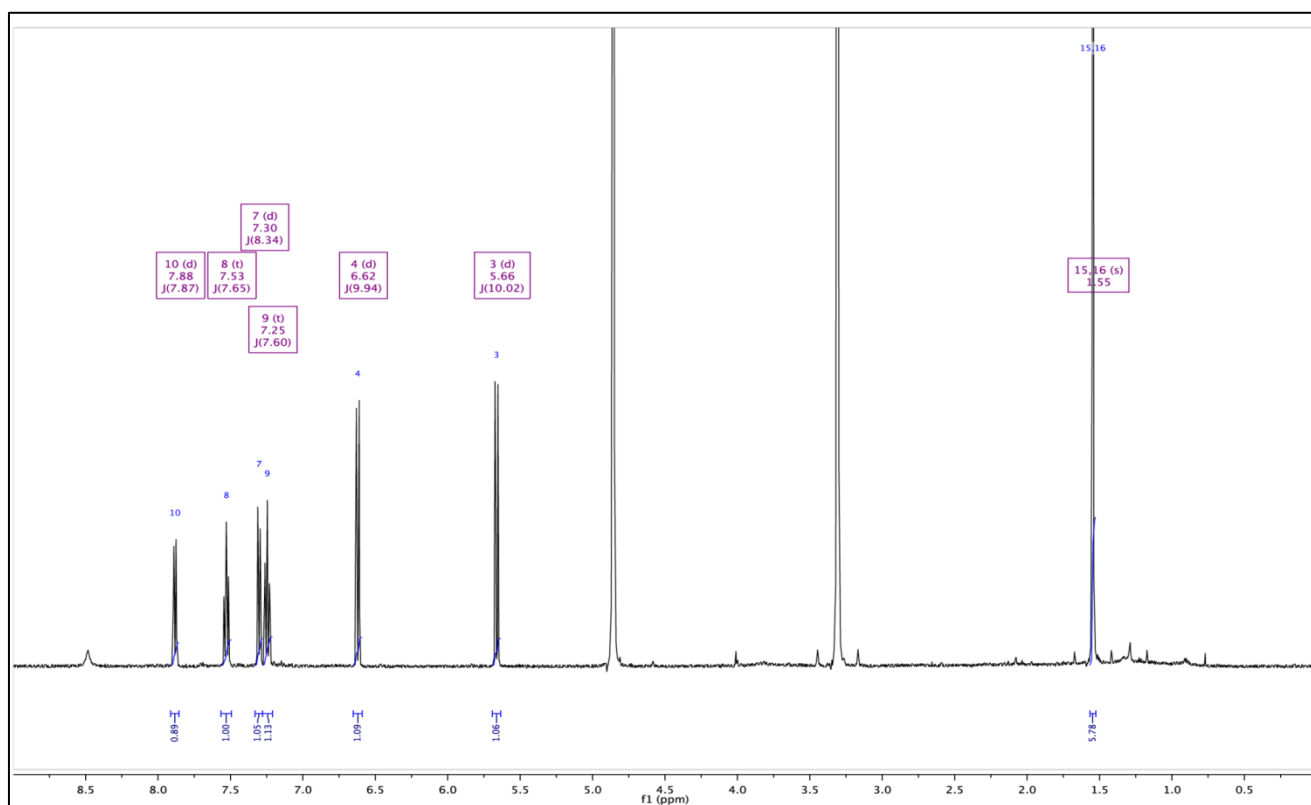


Figura 154 – Mapa de contorno gCOSY da flindersina (**18**).

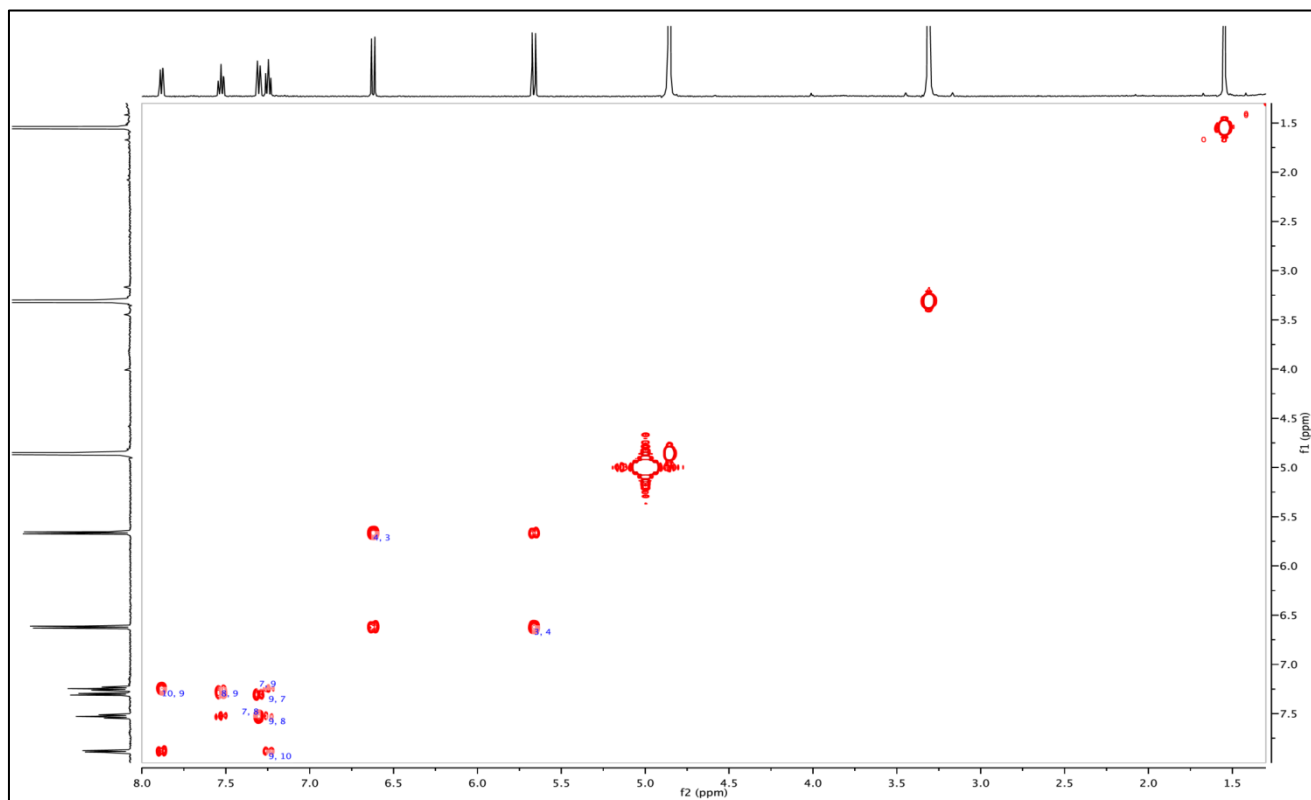


Figura 155 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do alcaloide flindersina (**18**).

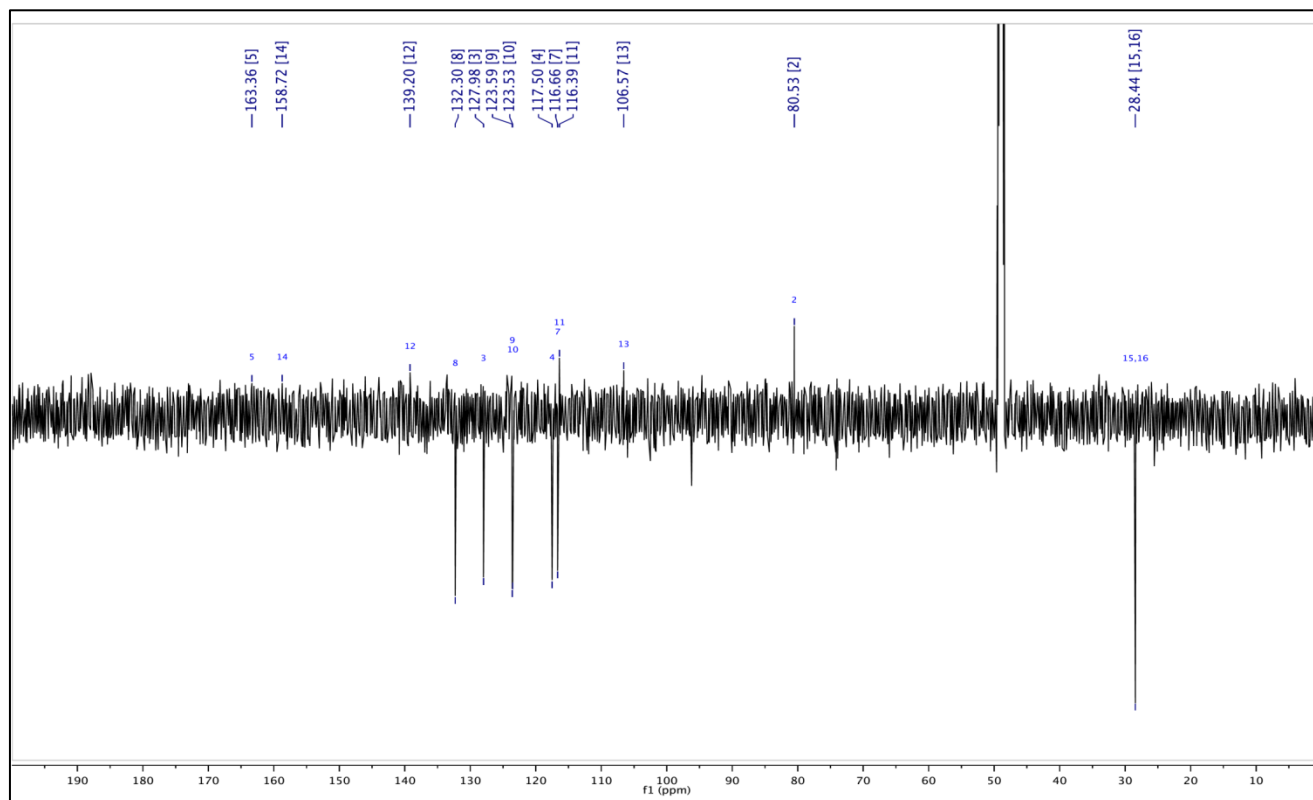


Figura 156 – Mapa de contorno gHSQCAD da flindersina (**18**).

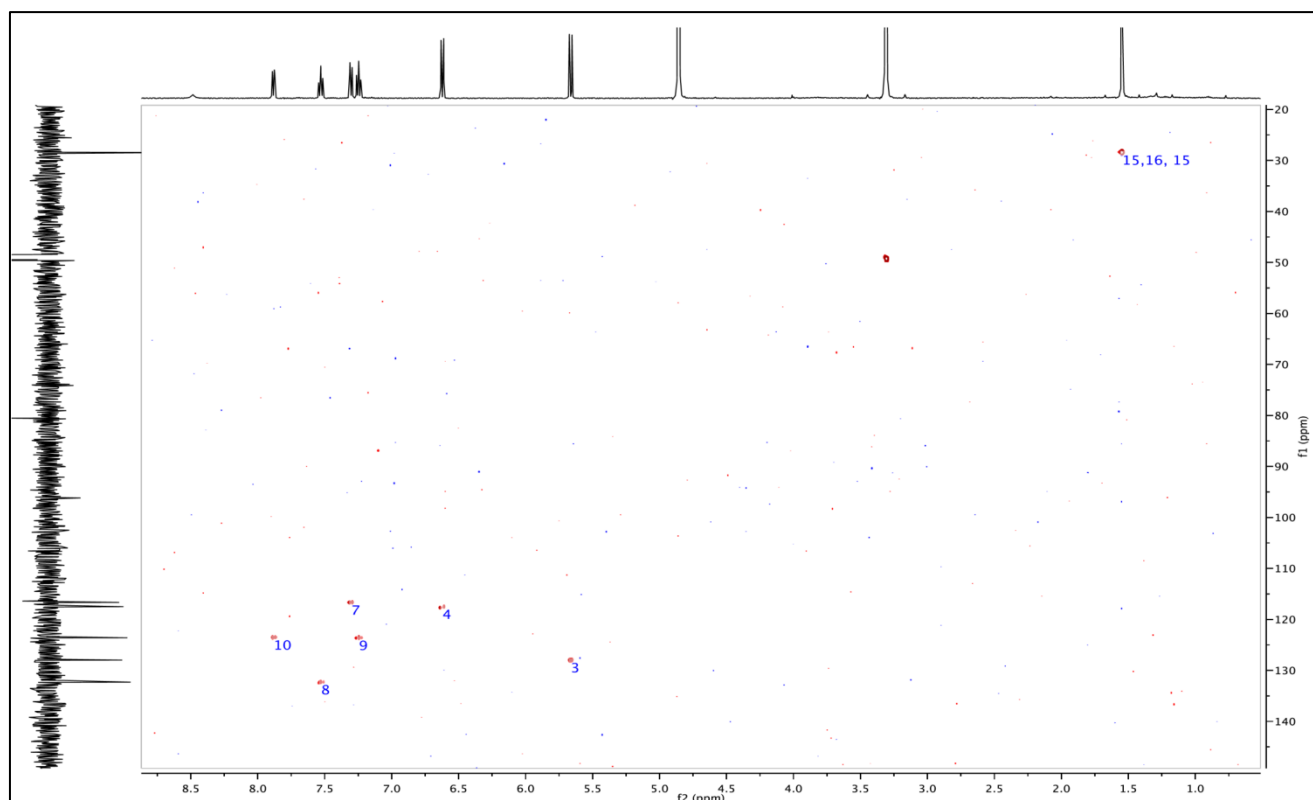


Figura 157 – Mapa de contorno *g*HMBC da flindersina (**18**).

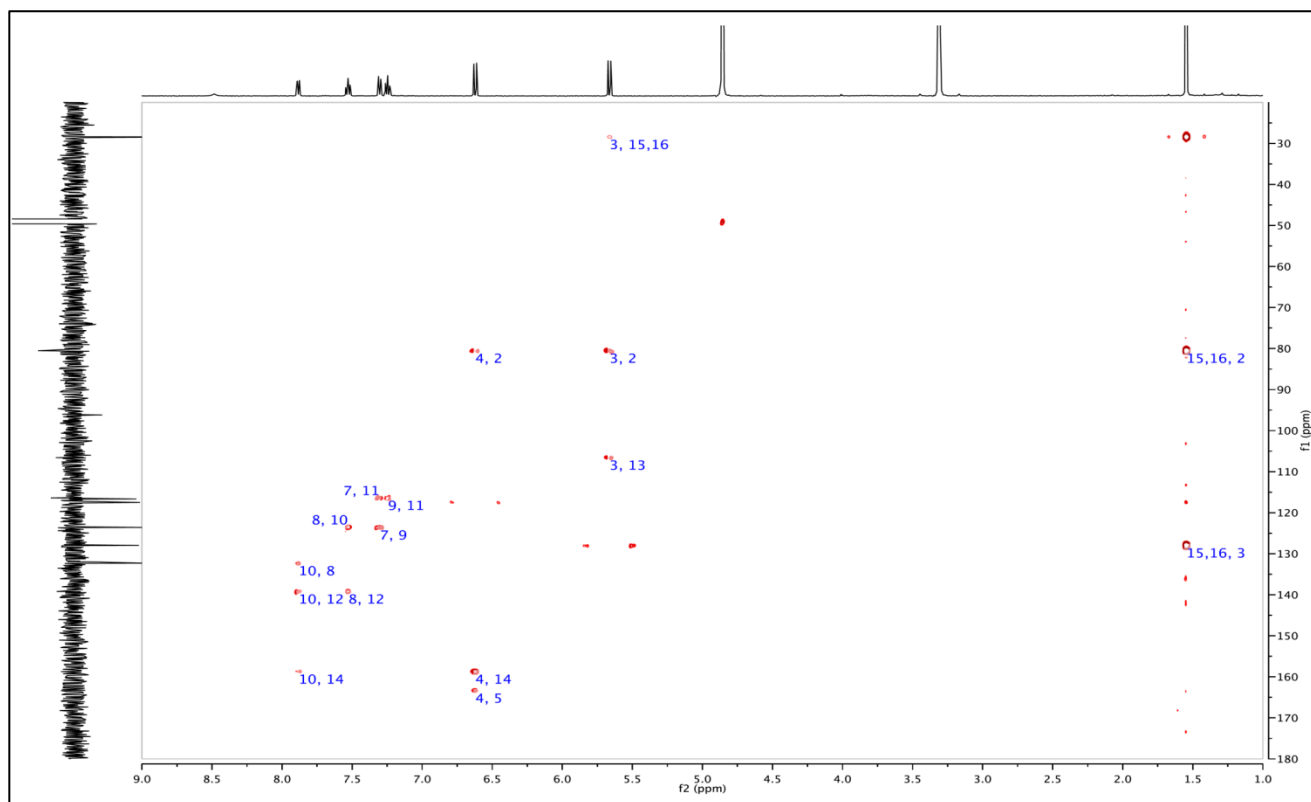


Tabela 39 – Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o alcaloide flindersina (**18**, em CD_3OD), e os dados presentes na literatura.

Posição	Composto 18 (flindersina)		Literatura*	Literatura**
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	-
2	-	80.5	-	79.5
3	5.66 (d; 9.9)	127.9	5.48 (d; 10.0)	126.8
4	6.62 (d; 9.9)	117.5	6.75 (d; 10.0)	117.0
5 (C=O)	-	163.3	-	162.9
7	7.30 (d; 7.6)	116.6	7.00-7.45 (m)	118.5
8	7.53 (t; 7.6)	132.3	7.00-7.45 (m)	130.9
9	7.25 (t; 7.6)	123.59	7.00-7.45 (m)	122.6
10	7.88 (d; 7.6)	123.53	7.78 (d; 8.0)	122.0
11	-	116.3	-	115.7
12	-	139.2	-	138.3
13	-	106.5	-	106.7
14	-	158.7	-	151.9
Me (15)	1.55 (s)	28.4	1.52 (s)	28.7
Me (16)	1.55 (s)	28.4	1.52 (s)	28.7

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

Akhmedzhanova *et al.*, 1974*

^bMultiplicidade (m)

Shakirov *et al.*, 1996**

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração S-1

O composto presente na Fração S-1 (25,9 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em DMSO e MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 386,1507, compatível com a fórmula $C_{23}H_{19}N_3O_3$ ($\Delta ppm = 0,5$) (**Figura 158**) (**composto 20**). O espectro e UV [(MeOH); λ_{max} (log ϵ) nm: 347 (4,24), 363 (4,28), 385 (4,16)] deste composto (**20**) é similar ao do alcaloide conchocarpina A (**16**), sugerindo a presença do mesmo cromóforo correspondente a um alcaloide indolopiridoquinazolinico.

O espectro de NMR 1H apresenta três sinais aromáticos característicos de um sistema spin ABX em δ_H 7.56 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-1), 7.28 (1H, d, $J = 8.8, 2.9$ Hz, H-2), 7.48 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-4) e dois sinais aromáticos característico de sistema spin tetrasubstituído em δ_H 6.74 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-11), 7.23 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-12). Os prótons aromáticos em δ_H 7.56 (H-1), 7.28 (H-2), 7.48 (H-4) apresentam correlações HMBC (**Figura 164**) com os carbonos quaternários em δ_C 121.6 (C-4a), 140.5 (C-14a) e 160.1 (C-5) sugerindo a presença de um anel quinazolinico ligado ao anel aromático. Estes hidrogênios aromáticos também apresentam correlação com um carbono oxigenado em δ_C 155.7 no espectro HMBC, sugerindo a presença de um grupo hidroxila em C-3. O espectro de NMR HMBC também indica a presença de dois metilenos (δ_H/δ_C 4.41/40.6 e 3.29/20.8). A presença de um anel 2,2-dimetilcromeno foi indicada pelos sinais de hidrogênios em δ_H 1.38 (6H, s, 2 x CH_3), 5.74 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-16), 6.86 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-17). A posição do anel cromeno foi determinada baseando-se nas correlações HMBC entre H-17 com os carbonos quaternários em δ_C 121.0 (C-8b), 112.5 (C-9) e 146.1 (C-10). O espectro de NMR HMBC mostrou correlações entre os prótons aromáticos em δ_H 6.74 (H-11) e 7.23 (H-12) e os carbonos sp^2 quaternários em δ_C 121.0 (C-8b), 112.5 (C-9), 146.1 (C-10), e 134.1 (C-12a) que permitiram identificar a presença de um grupo indólico oxigenado com um carbono quaternário remanescente detectado no espectro de ^{13}C em δ_C 128.2 (C-13). O espectro HMBC mostrou também correlações entre os prótons dos metilenos em δ_H 4.41 and 3.29 e os carbonos sp^2 quaternários em δ_C 115.3 (C-8a), 121.0 (C-8b), 128.2 (C-13), 142.4 (C-13a) and 160.1 (C-5). Baseado nestes resultados, o composto presente na Fração S-1 foi identificado como o novo alcaloide indolopiridoquinazolino, chamado Fontanesina A (**composto 20**) (**Figura 165**). A **Tabela 40** ilustra os dados de NMR obtidos.

Figura 158 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração S-1, identificado como novo alcaloide fontanesina A (20).

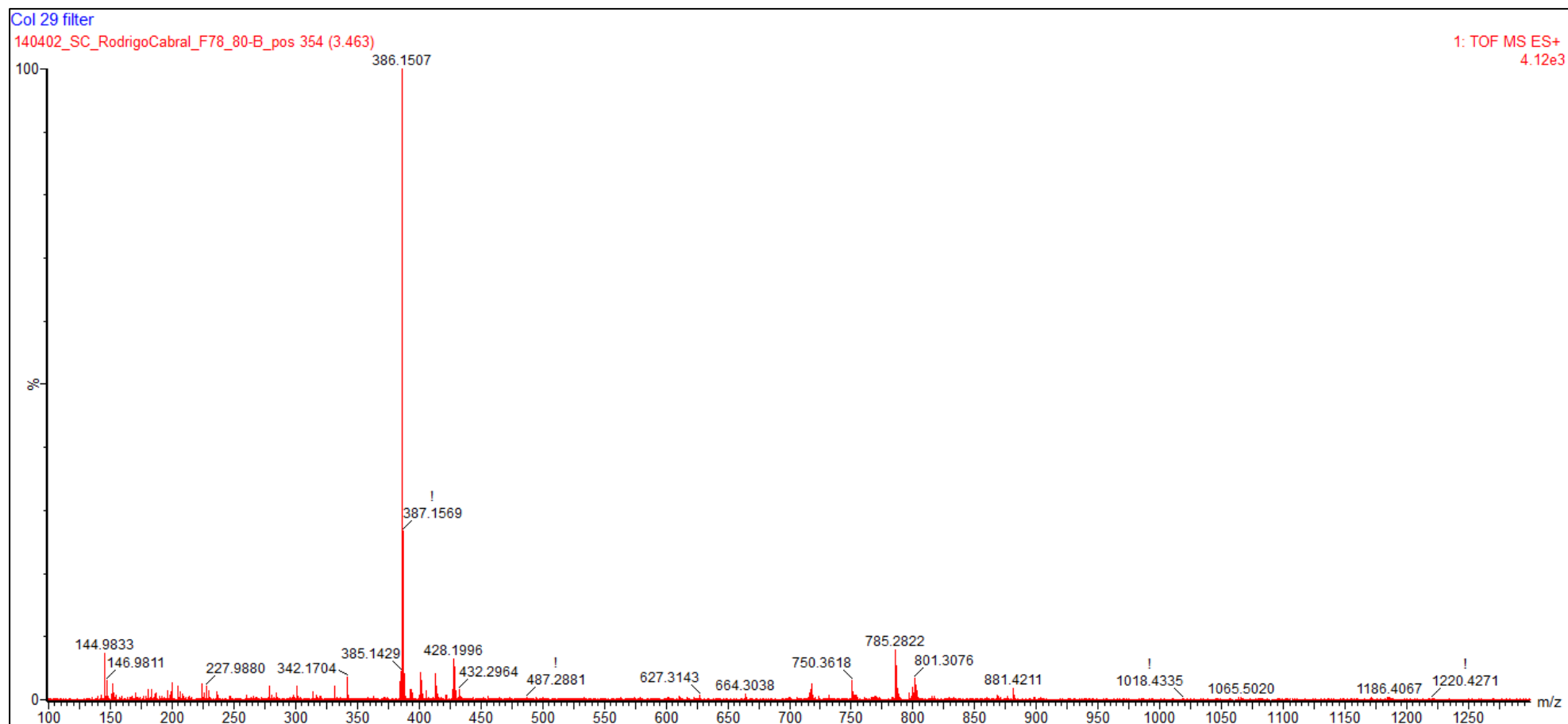


Figura 159 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do alcaloide fontanesina A (**20**).

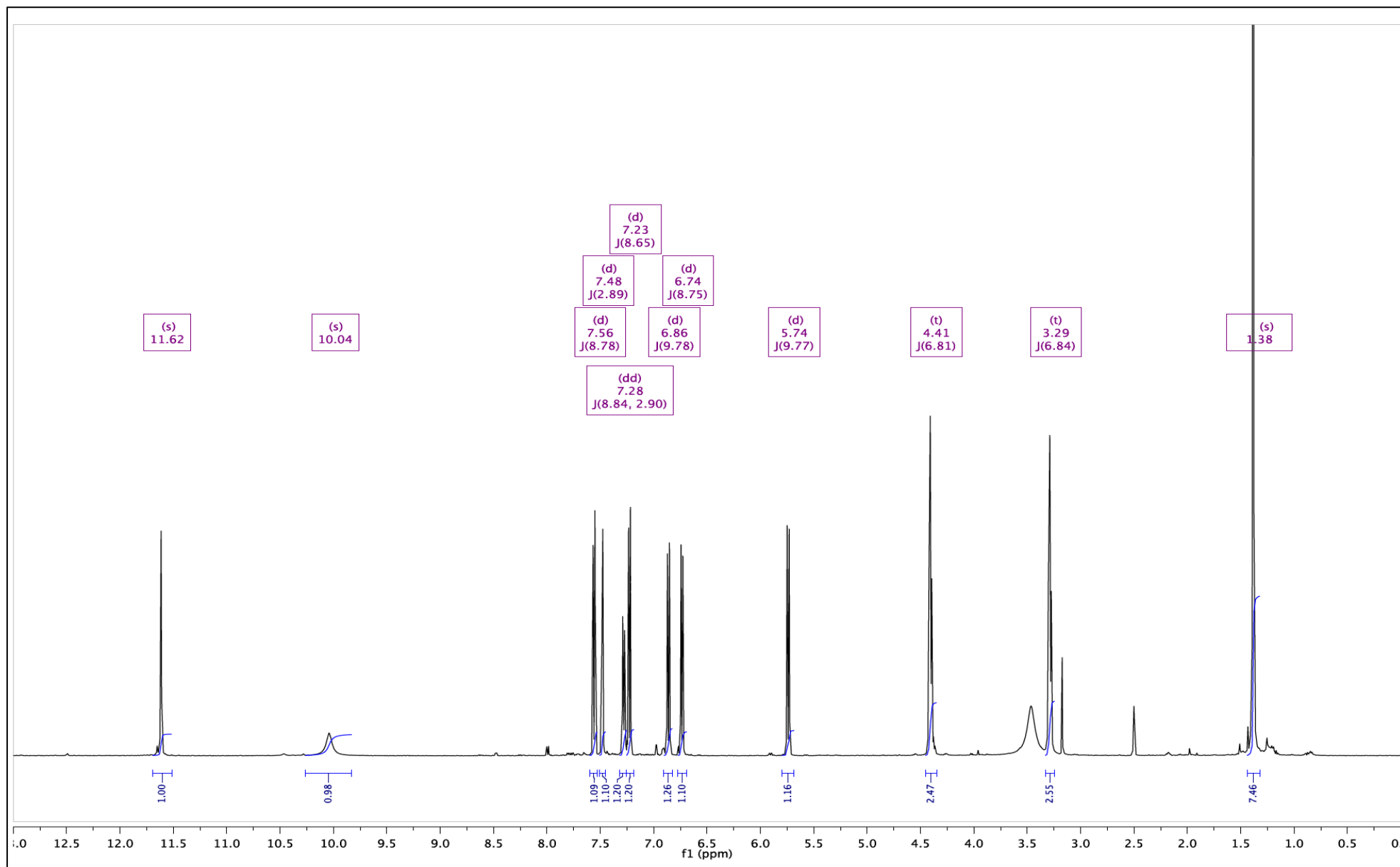


Figura 160 – Mapa de contorno *g*COSY da fontanesina A (**20**).

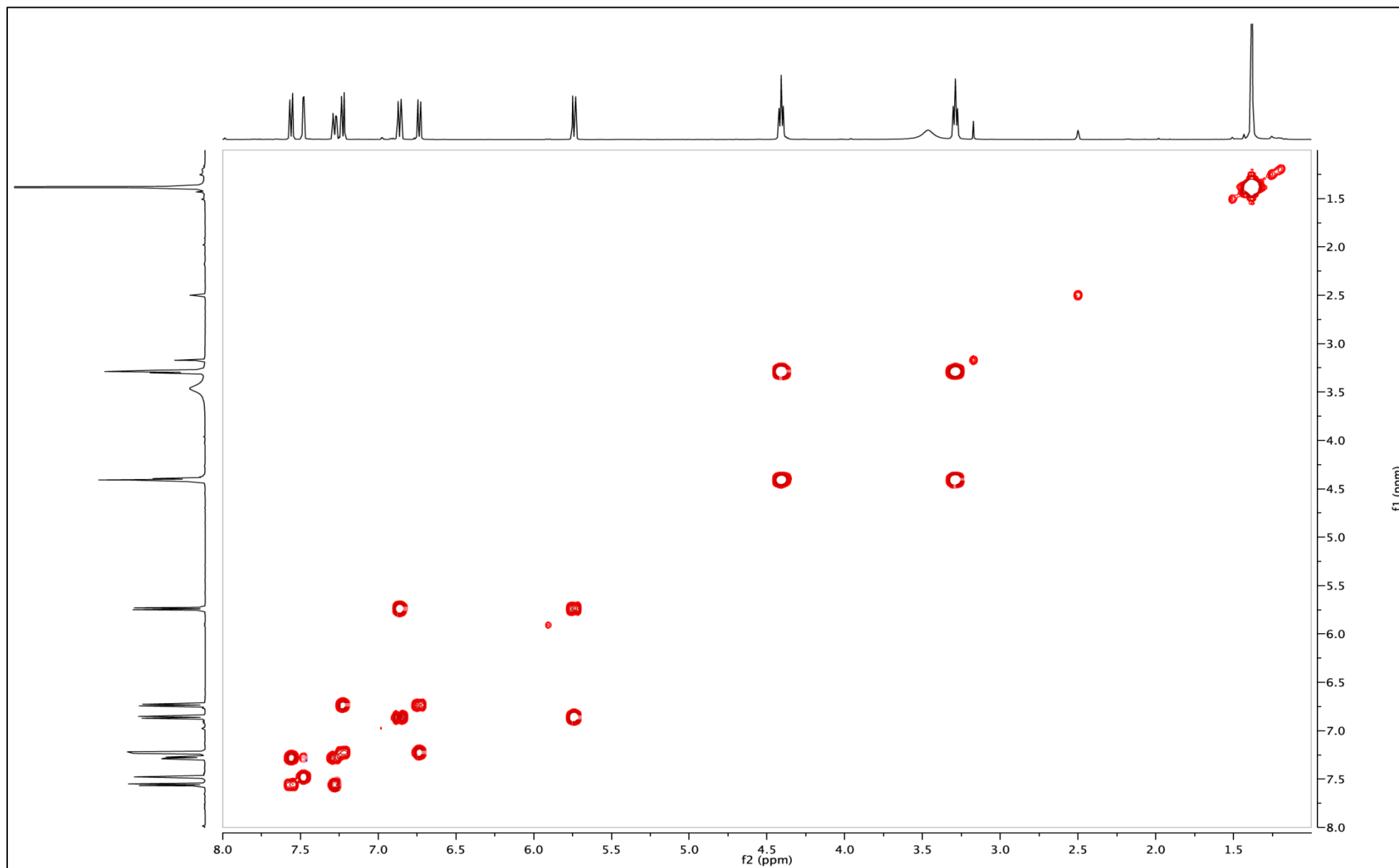


Figura 161 – Mapa de contorno NOESY da fontanesina A (**20**).

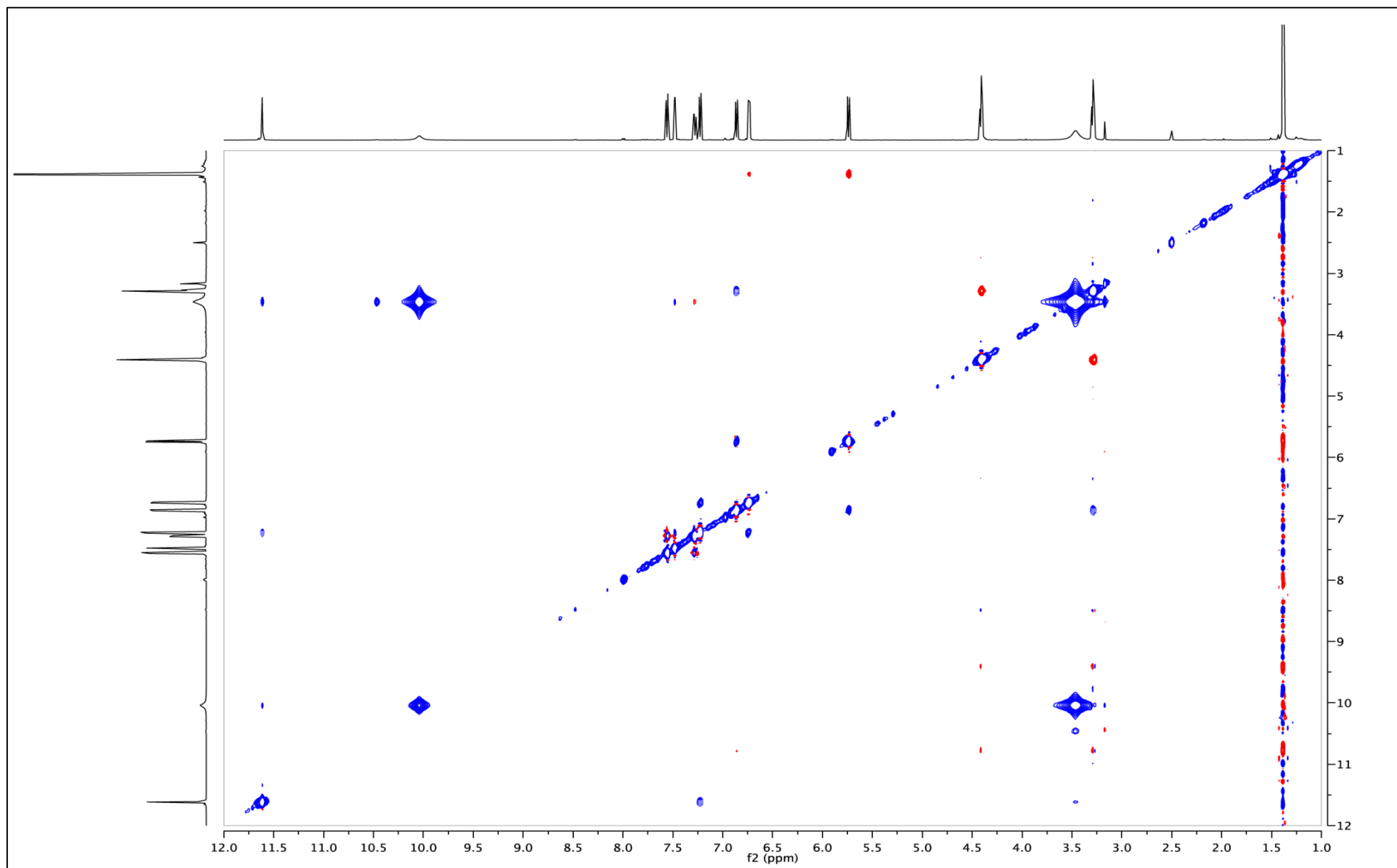


Figura 162 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆) do novo alcaloide fontanesina A (**20**).

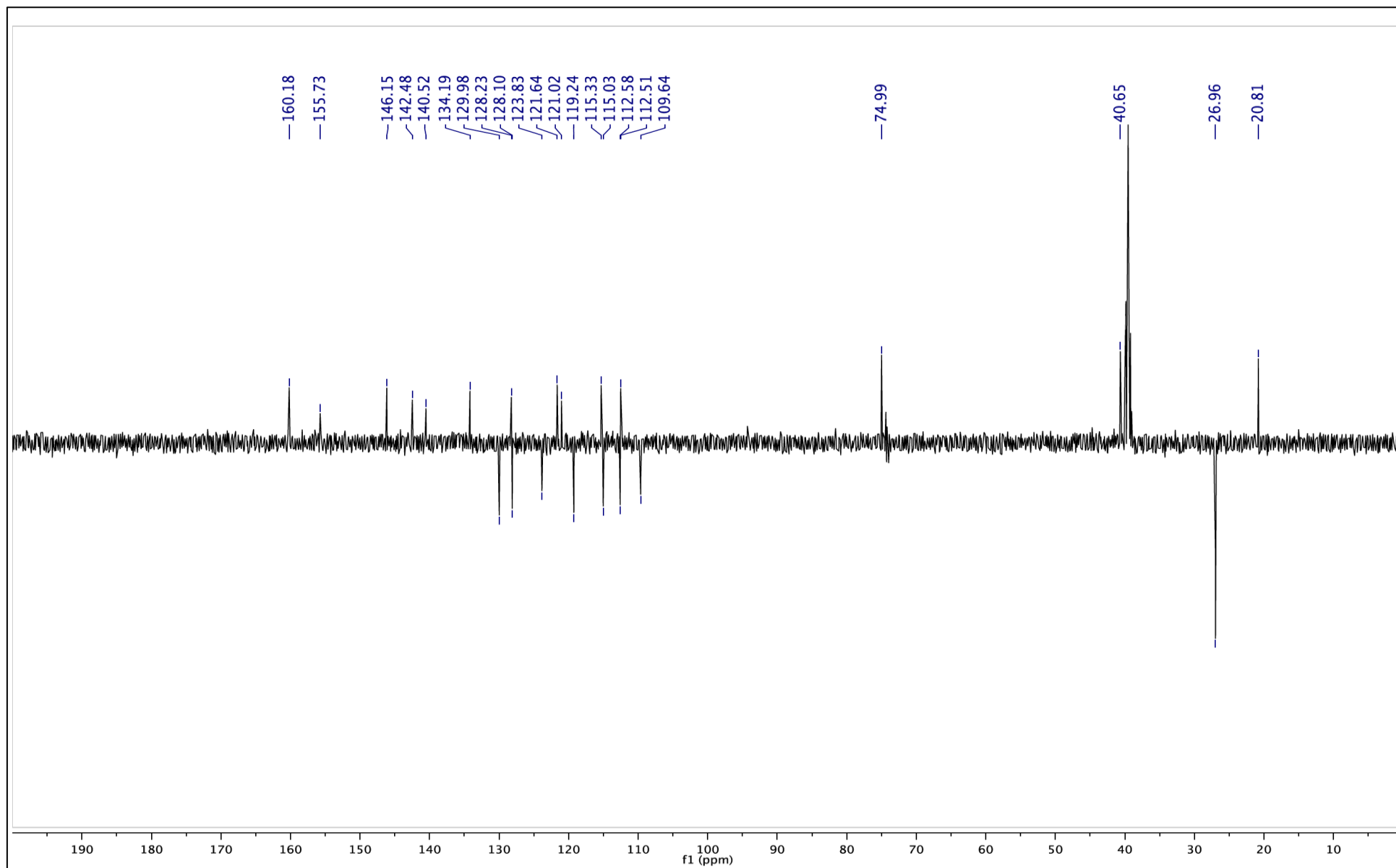


Figura 163 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da fontanesina A (**20**).

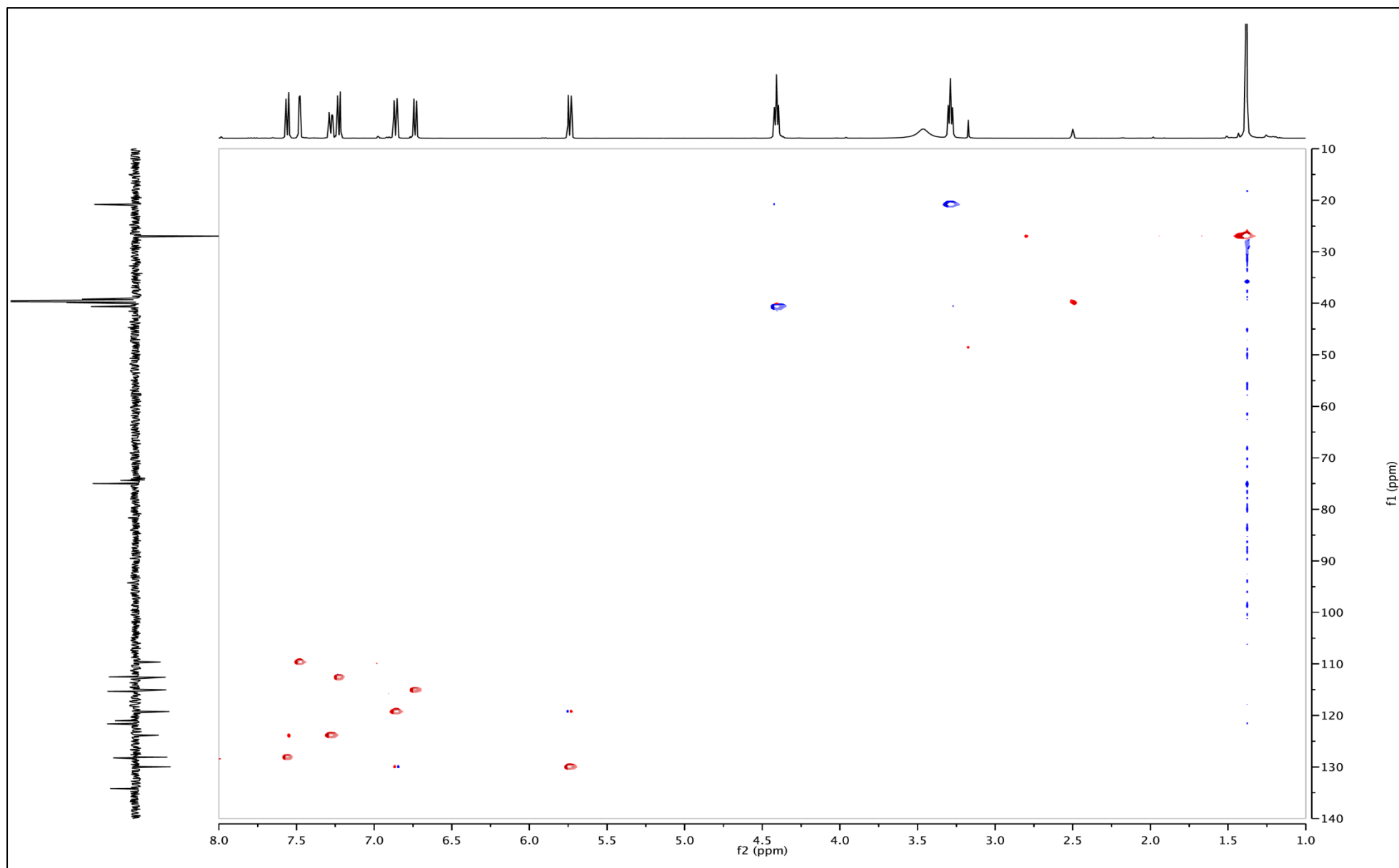


Figura 164 – Mapa de contorno *g*HMBC da fontanesina A (**20**).

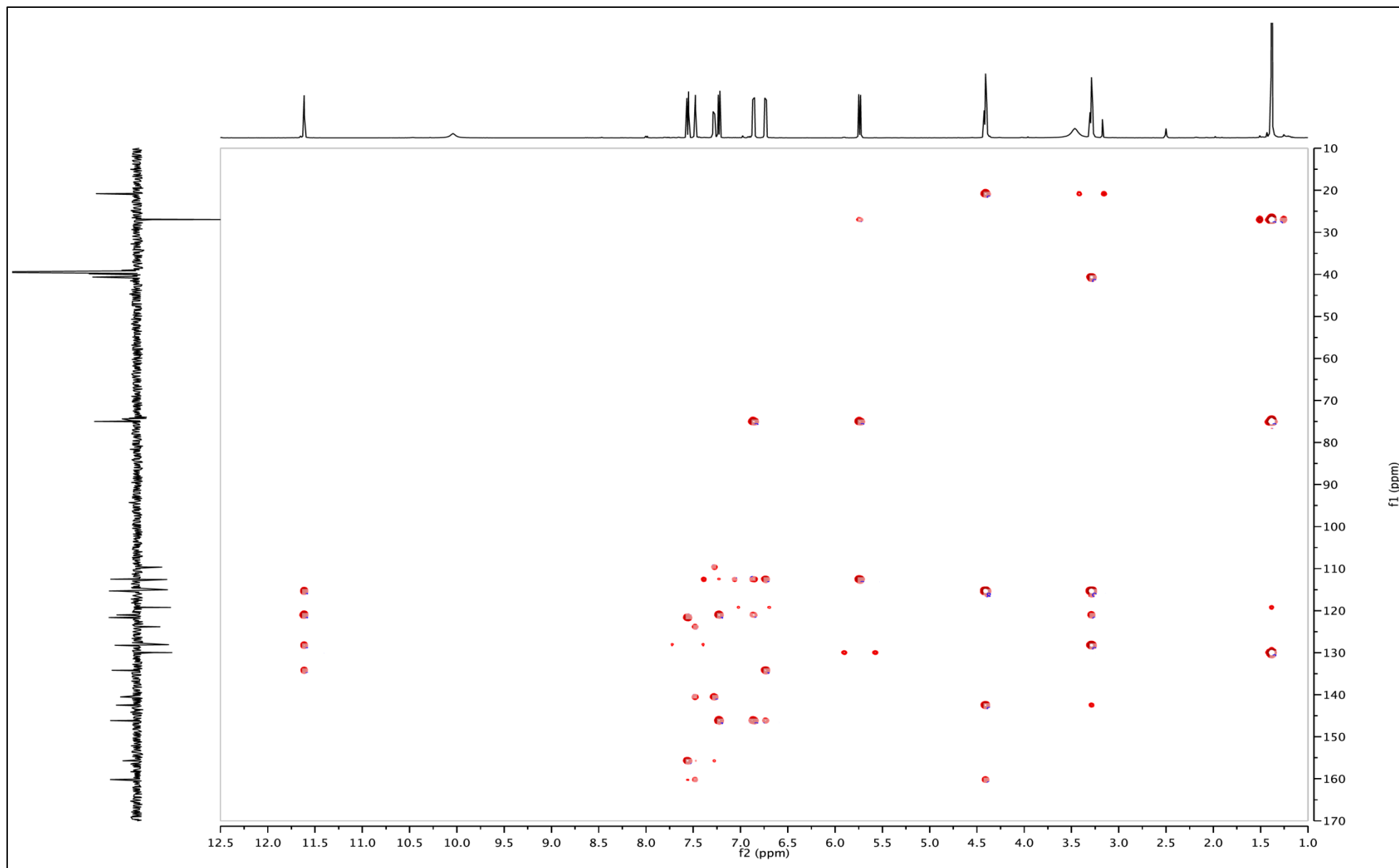


Tabela 40 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide fontanesina A (**20**).

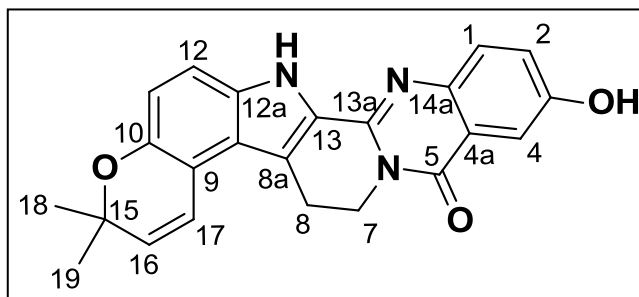
Posição	Composto 20 (fontanesina A)		
	δ_H^a (m ^b ; J ^c)	δ_C (ppm)	<i>g</i> HMBC
1	7.56 (d; 8.7)	128.1	121.6 (4a); 155.7 (3)
2	7.28 (d; 8.7, 2.9)	123.8	109.6 (4); 140.5 (14a)
3	-	155.7	
4	7.48 (d; 2.9)	109.6	160.1 (5); 140.5 (14a); 123.8 (2)
4a	-	121.6	
5	-	160.1	
6 (N)	-	-	
7	4.41 (t; 6.8)	40.6	160.1 (5); 142.4 (13a); 115.3 (8a); 20.8 (8)
8	3.29 (t; 6.8)	20.8	40.6 (7); 115.3 (8a); 121.0 (8b); 128.2 (13)
8a	-	115.3	
8b	-	121.0	
9	-	112.5	
10	-	146.1	
11	6.74 (d; 8.6)	115.0	134.1 (12a); 112.5 (9)
12	7.23 (d; 8.6)	112.6	146.1 (10); 121.0 (8b)
12a	-	134.1	
13	-	128.2	
13a	-	142.4	
14a	-	140.5	
15	-	74.9	
16	5.74 (d; 9.7)	129.9	112.5 (9); 74.9 (15); 26.9 (18 e 19)
17	6.86 (d; 9.7)	119.2	121.0 (8b); 146.1 (10); 112.5 (9); 74.9 (15)
18	1.38 (s)	26.9	
19	1.38 (s)	26.9	
OH	10.04	-	
NH	11.62	-	115.3 (8a); 121.0 (8b); 128.2 (13); 134.1 (12a)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (*J*), expressa e

Figura 165 – Estrutura do alcaloide inédito fontanesina A, isolada dos ramos de *C. fontesianus* (**20**).



Fração S-2

O composto presente na Fração S-2 (4,3 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em DMSO e MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 386,1503, compatível com a fórmula $C_{23}H_{19}N_3O_3$ ($\Delta ppm = -0,5$) (**Figura 166**) (**composto 21**). O espectro de UV [(MeOH); λ_{max} (log ϵ) nm: 241 (4.19), 310 (4.11), 358 (4.3)] e os dados obtidos através das análises de NMR mostraram que o composto presente na Fração S-2 está intimamente relacionado com a conchocarpina A (**composto 16**). A única diferença entre estes compostos é a presença de prótons aromáticos em δ_H 6.91 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-9), 6.83 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, H-11) and 7.27 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-12) característicos de um sistema ABX. As correlações HMBC entre H-12 (7.27) e um carbono oxigenado em δ_C 152.3 sugerem a presença de um grupo hidroxila livre em C-10. Esta hipótese foi confirmada pela fórmula molecular $C_{23}H_{19}N_3O_3$ determinada pela análise HRMS. Baseado nestes resultados, o **composto 21** foi identificado como um novo alcaloide indolopiridoquinazolinico chamado Conchocarpina B, e sua estrutura está ilustrada na **Figura 172**. A **Tabela 41** ilustra os dados de NMR obtidos.

Figura 166 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração S-2, identificado como novo alcaloide conchocarpina B (**21**).

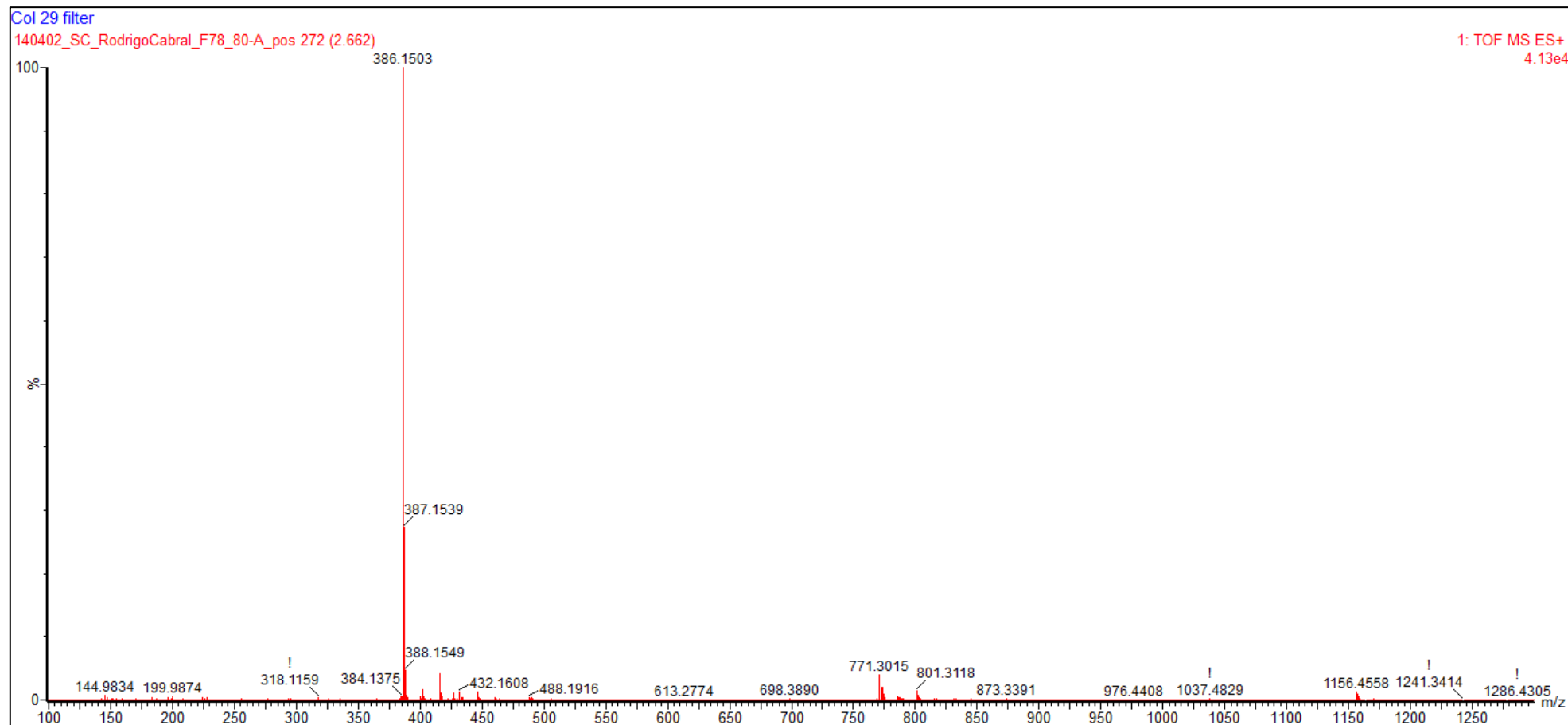


Figura 167 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, CD_3OD) do alcaloide conchocarpina B (**21**).

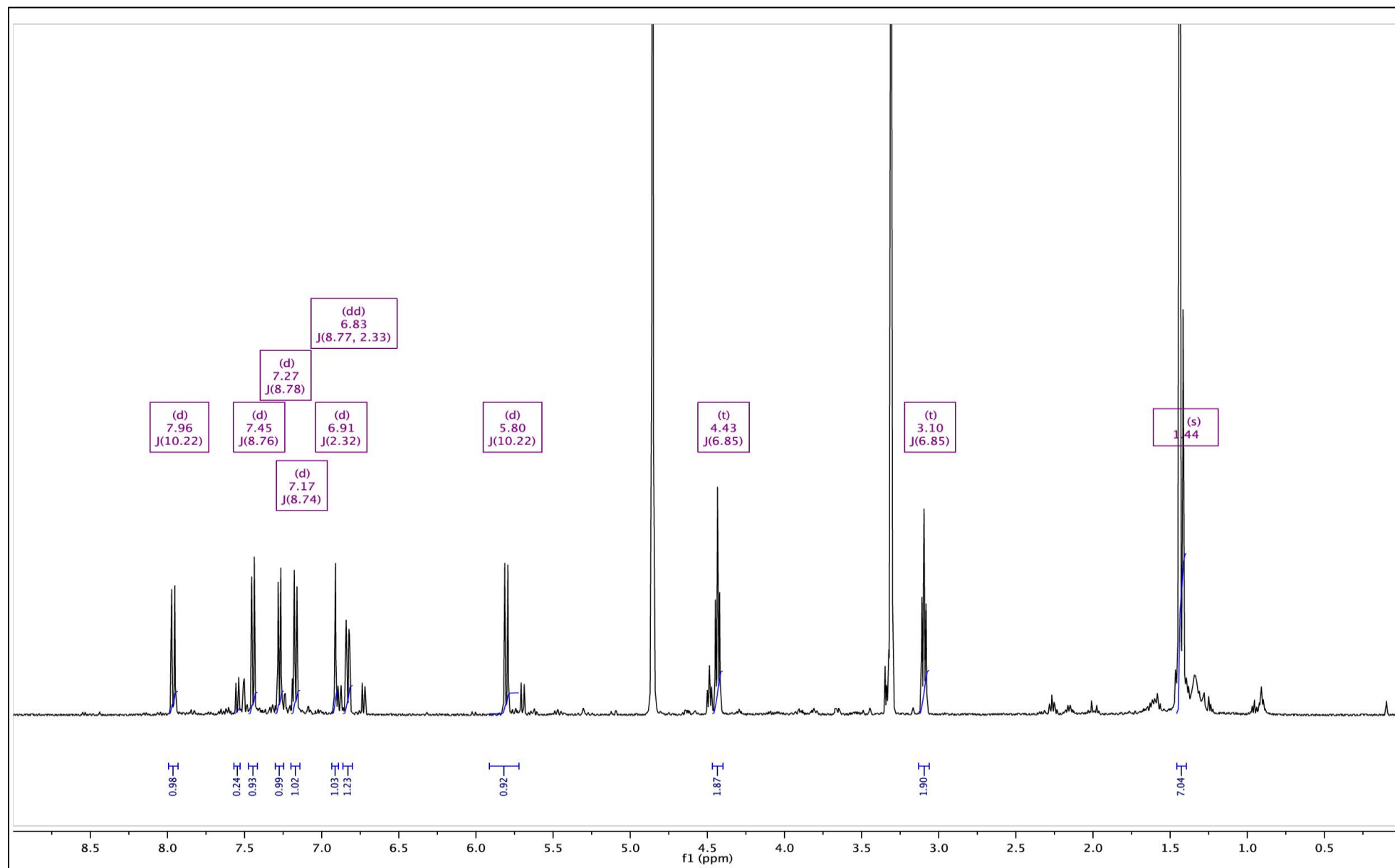


Figura 168 – Mapa de contorno *g*COSY da conchocarpina B (**21**).

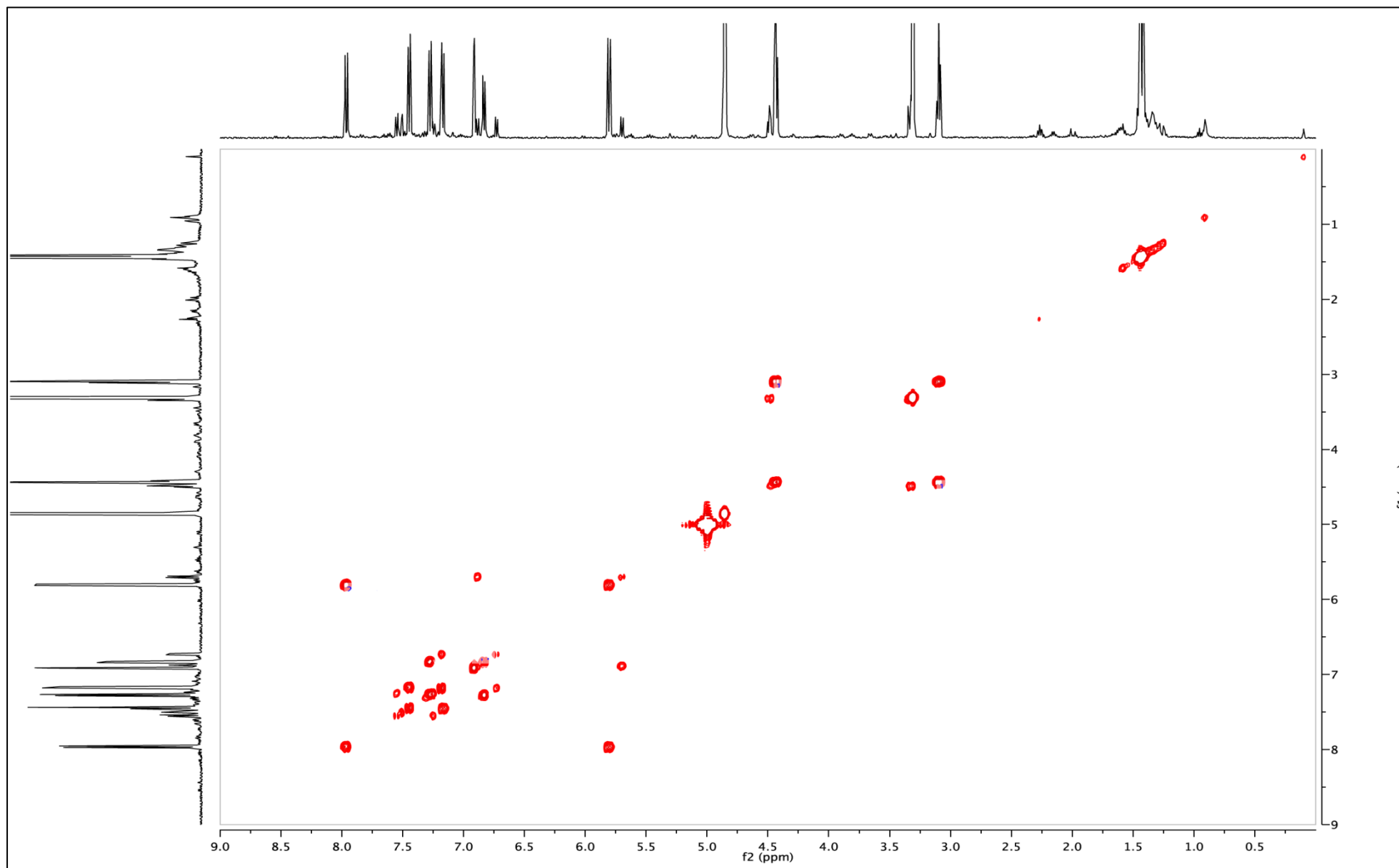


Figura 169 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) do novo alcaloide conchocarpina B (**21**).

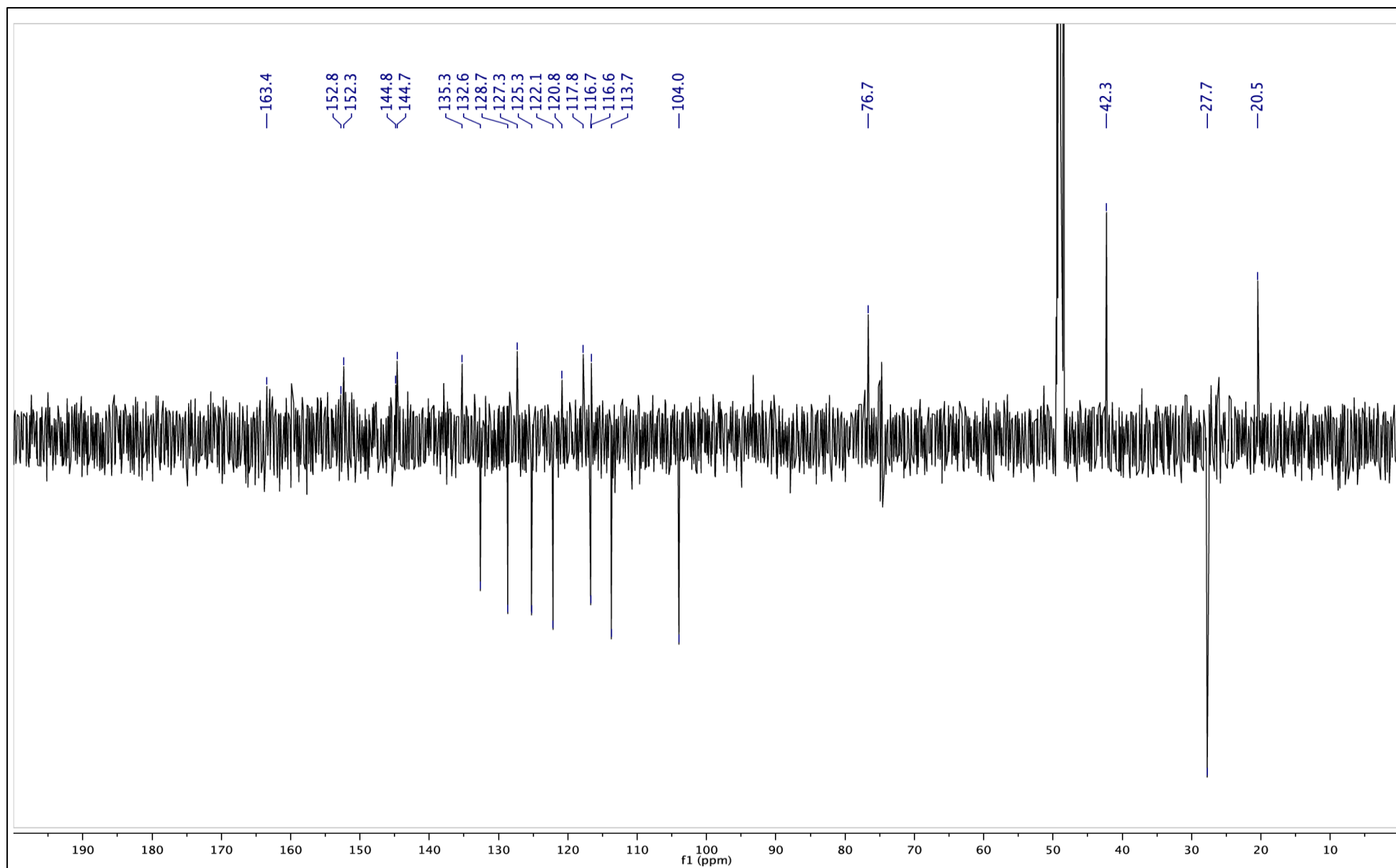


Figura 170 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da conchocarpina B (**21**).

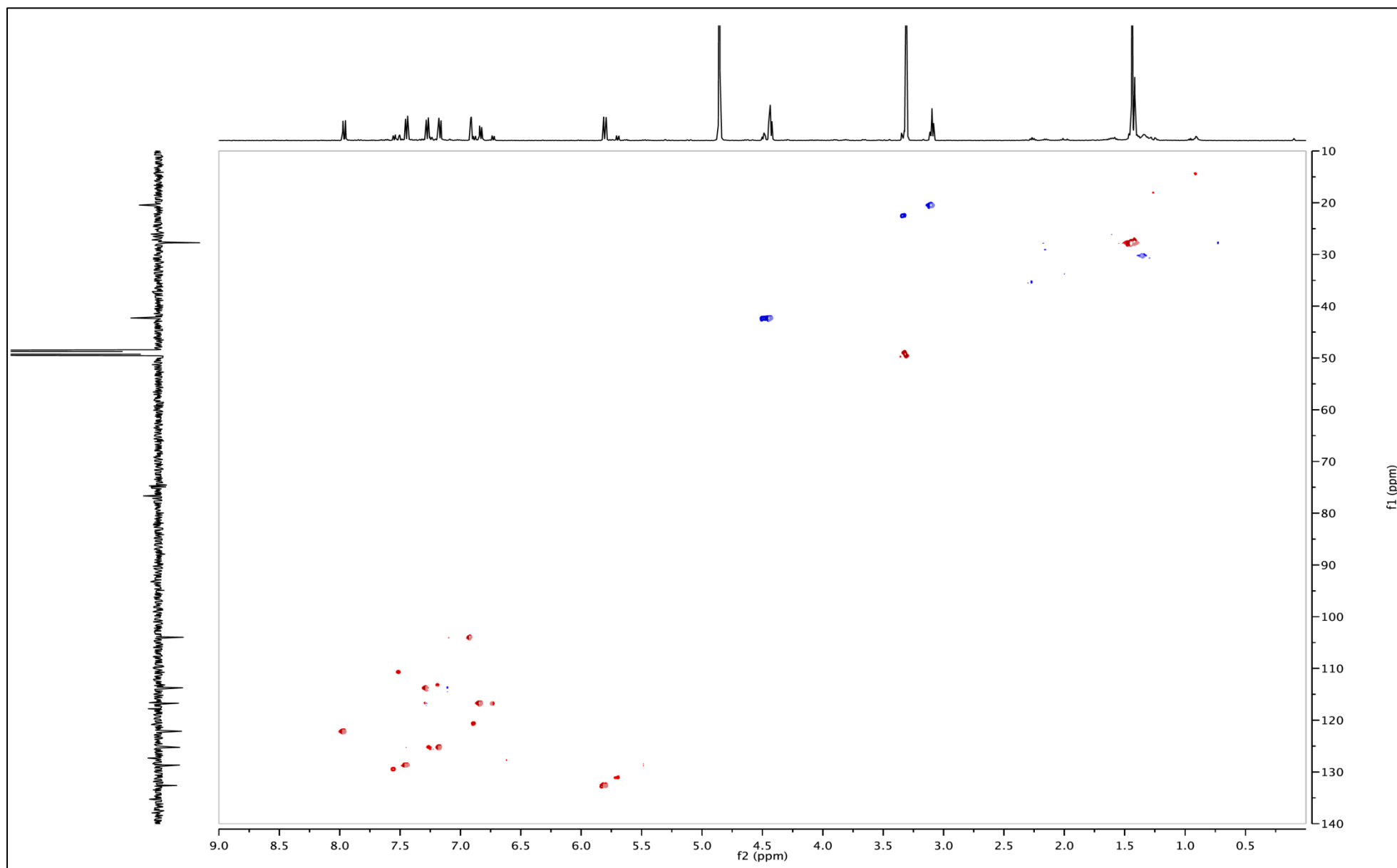


Figura 171 – Mapa de contorno *g*HMBC da conchocarpina B (**21**).

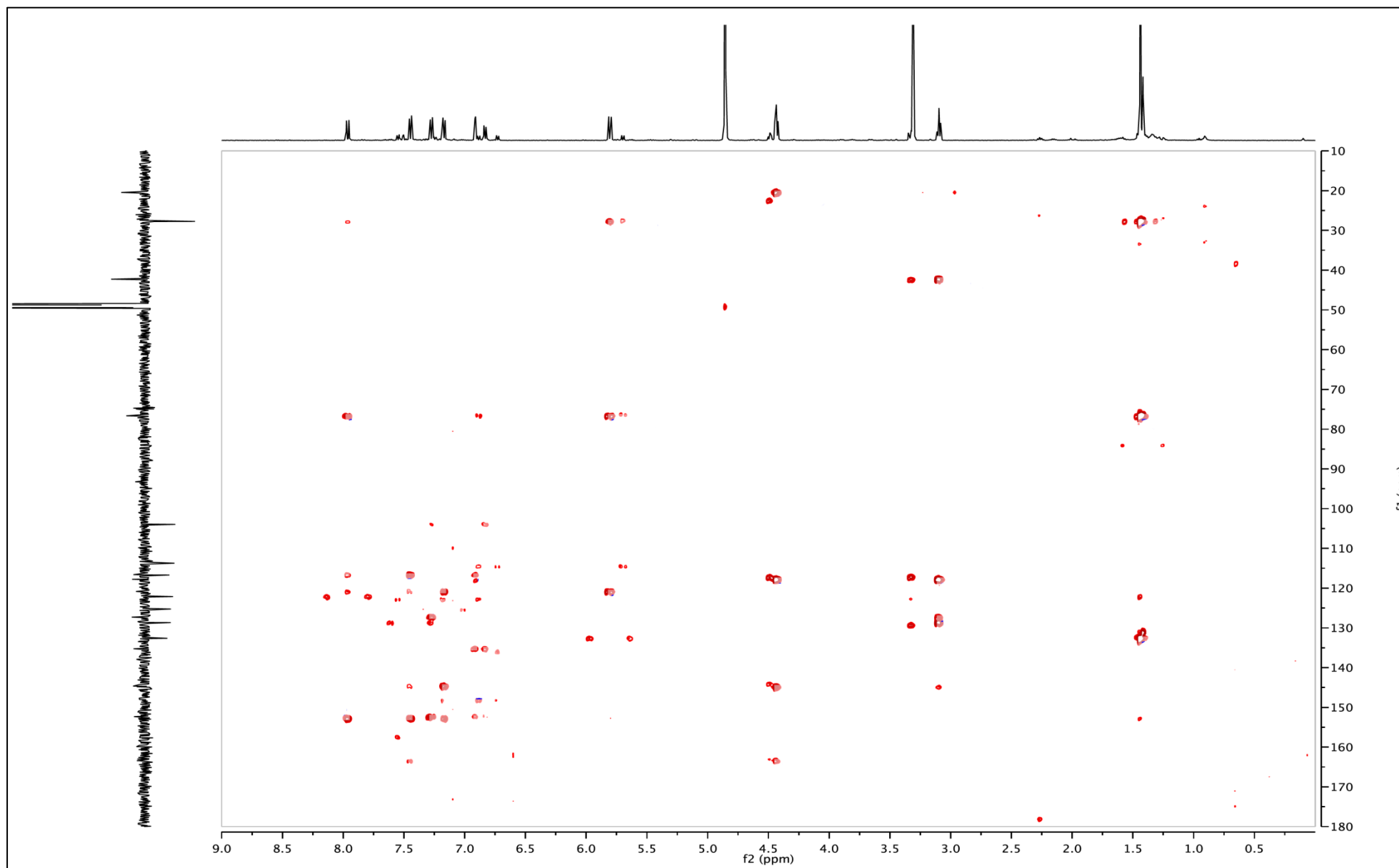


Tabela 41 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide conchocarpina B (**21**).

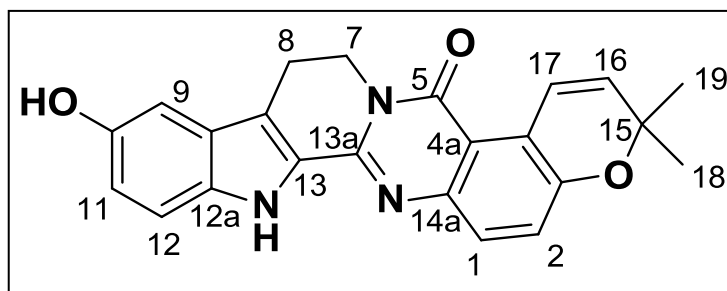
Posição	Composto 21 (conchocarpina B)		
	δ_H^a (m ^b ; J ^c)	δ_C (ppm)	<i>g</i> HMBC
1	7.45 (d; 8.7)	128.7	152.8 (3); 163.4 (5)
2	7.17 (d; 8.7)	125.3	120.8 (4); 144.7 (14a)
3	-	152.8	
4	-	120.8	
4a	-	116.6	
5	-	163.4	
7	4.43 (t; 6.8)	42.3	20.5 (8); 117.8 (8a); 144.8 (13a); 163.4 (5)
8	3.10 (t; 6.8)	20.5	42.3 (7); 117.8 (8a); 127.3 (8b)
8a	-	117.8	
8b	-	127.3	
9	6.91 (d; 2.3)	104.0	116.7 (11); 135.3 (12a); 152.3 (10)
10	-	152.3	
11	6.83 (dd; 8.7, 2.3)	116.7	104.0 (9); 135.3 (12a)
12	7.27 (d; 8.7)	113.7	127.3 (8b); 152.3 (10)
12a	-	135.3	
13	-	128.7	
13a	-	144.8	
14a	-	144.7	
15	-	76.7	
16	5.80 (d; 10.2)	132.6	27.7 (19); 76.7 (15); 120.8 (4)
17	7.96 (d; 10.2)	122.1	76.7 (15); 116.6 (4a); 152.8 (3)
18	1.44 (s)	27.7	27.7 (19); 76.7 (15); 132.6 (16)
19	1.44 (s)	27.7	27.7 (18); 76.7 (15); 132.6 (16)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (*J*), expressa em Hz

Figura 172 – Estrutura do alcaloide inédito conchocarpina B, isolada dos ramos de *C. fontesianus* (21).



Fração U-1

O composto presente na Fração U-1 (4,6 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em DMSO e MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 370,1555, compatível com a fórmula $C_{23}H_{19}N_3O_2$ ($\Delta ppm = -0,3$) (**Figura 174**) (**composto 22**). Este composto apresenta espectro de UV [(MeOH); λ_{max} (log ϵ) nm: 355 (4.65)] similar ao dos **compostos 16, 20 e 21** descritos acima, sugerindo a presença de um alcaloide com estrutura do tipo indolopiridoquinazolinico. Os dados de NMR para o **composto 22** são semelhantes aos do composto **20**, exceto pela presença de um próton aromático adicional em δ_H 7.47 (1H, ddd, $J = 8.09, 7.05, 1.16$, Hz). Este próton adicional foi localizado em C-3 baseado nas correlações HMBC. Com base nestes resultados, o **composto 22** foi identificado como novo alcaloide indolopiridoquinazolinico chamado Fontanesina B (**Figura 173**). Os dados obtidos por NMR estão ilustrados na **Tabela 42**.

Figura 173 – Estrutura do alcaloide inédito fontanesina B, isolada dos ramos de *C. fontesianus* (22).

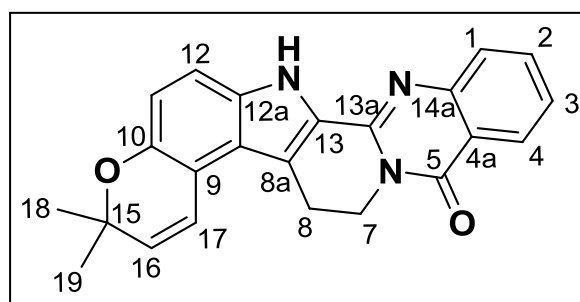


Figura 174 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração U-1, identificado como novo alcaloide fontanesina B (22).

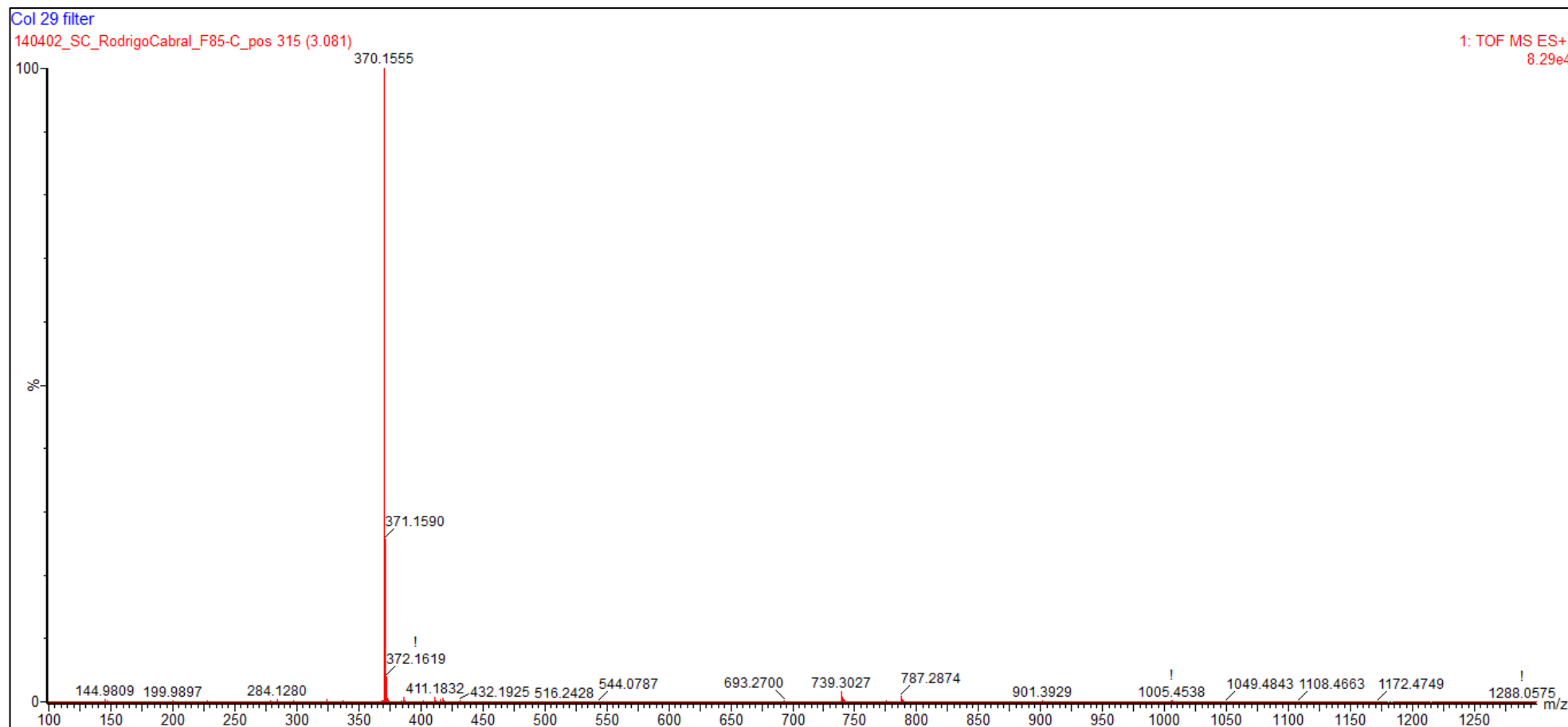


Figura 175 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do alcaloide fontanesina B (**22**).

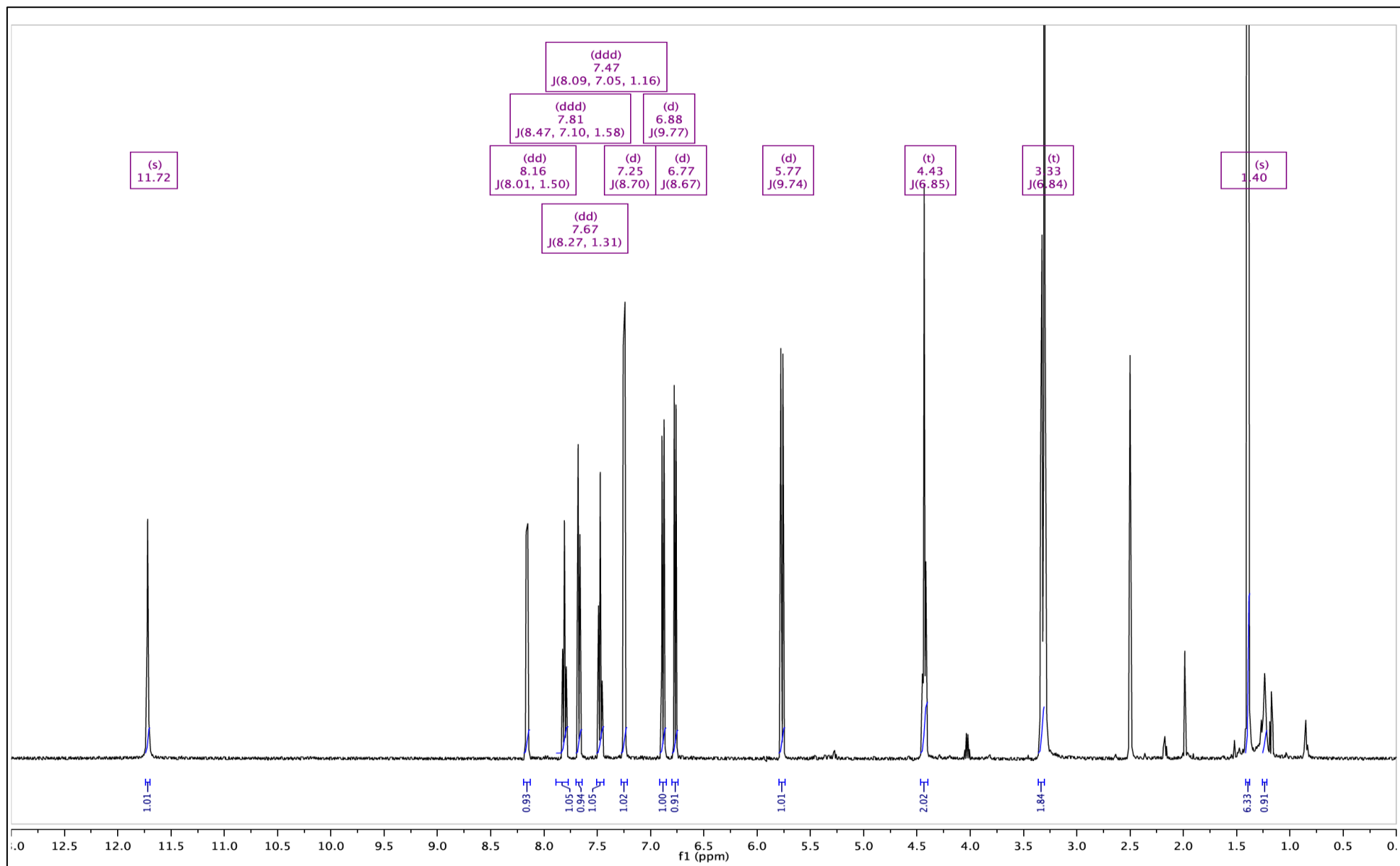


Figura 176 – Mapa de contorno NOESY da conchocarpina B (22).

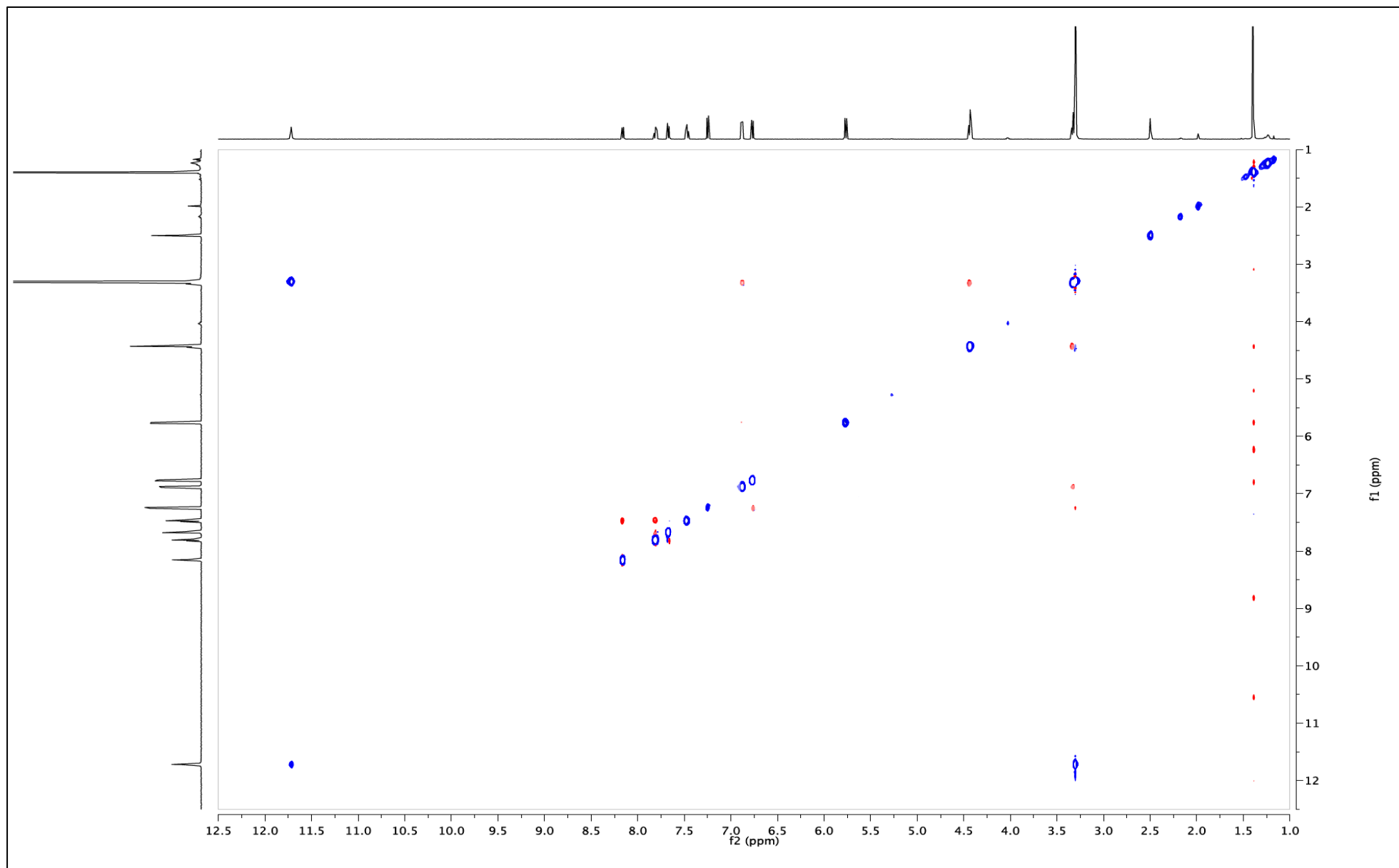


Figura 177 – Espectro de NMR APT de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) do novo alcaloide fontanesina B (22).

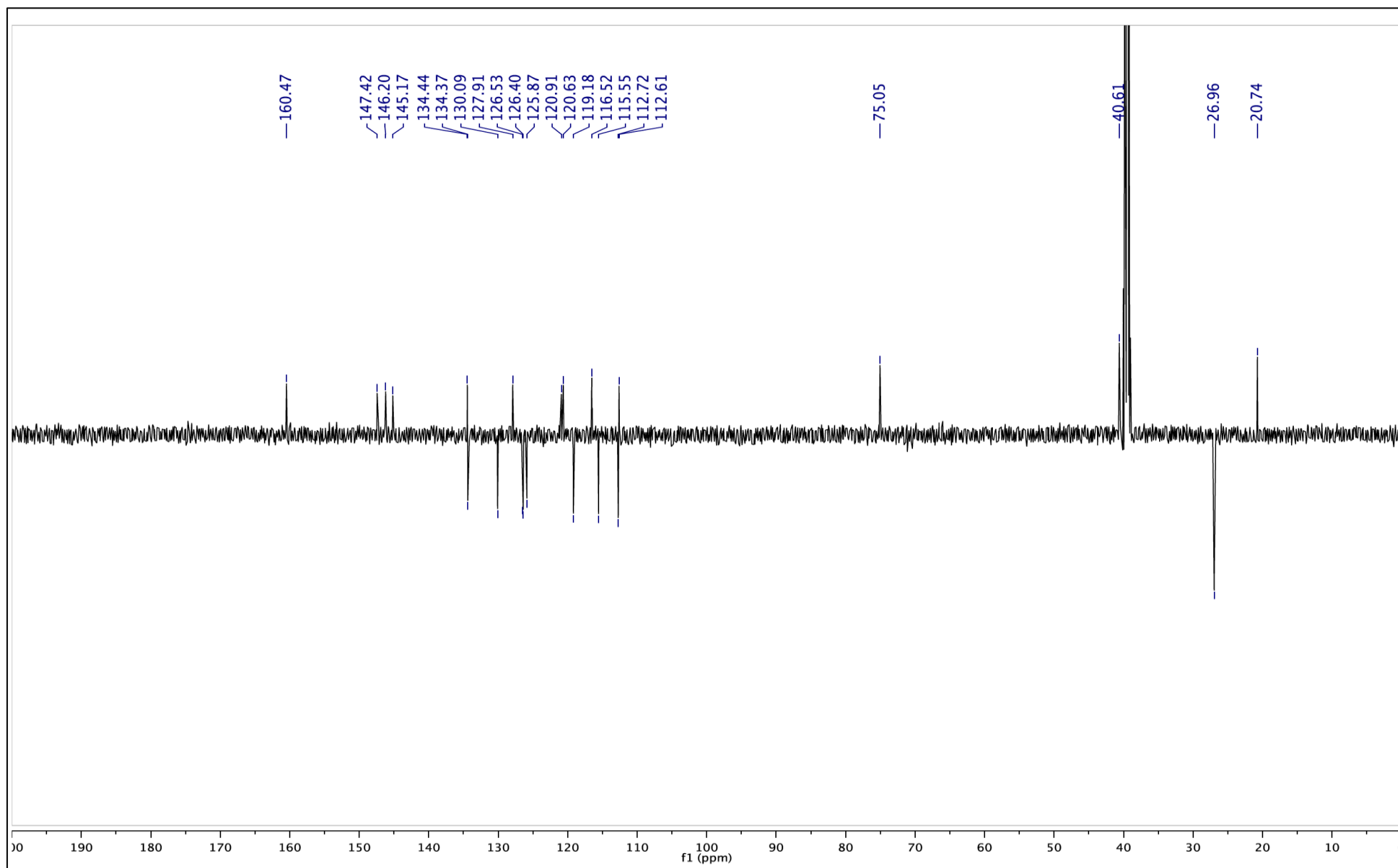


Figura 178 – Mapa de contorno *g*HSQCAD da fontanesina B (22).

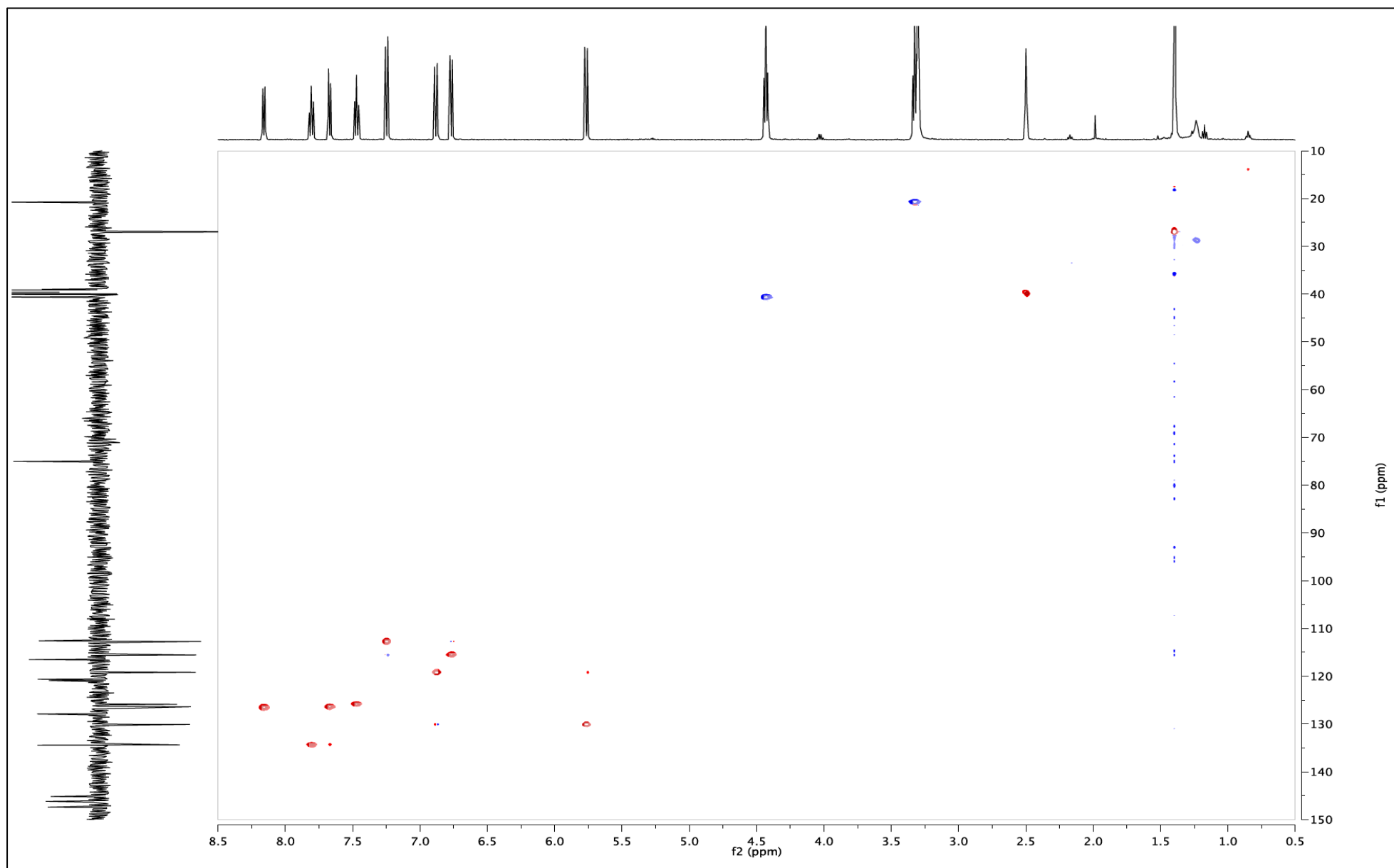


Figura 179 – Mapa de contorno *g*HMBC da fontanesina B (22).

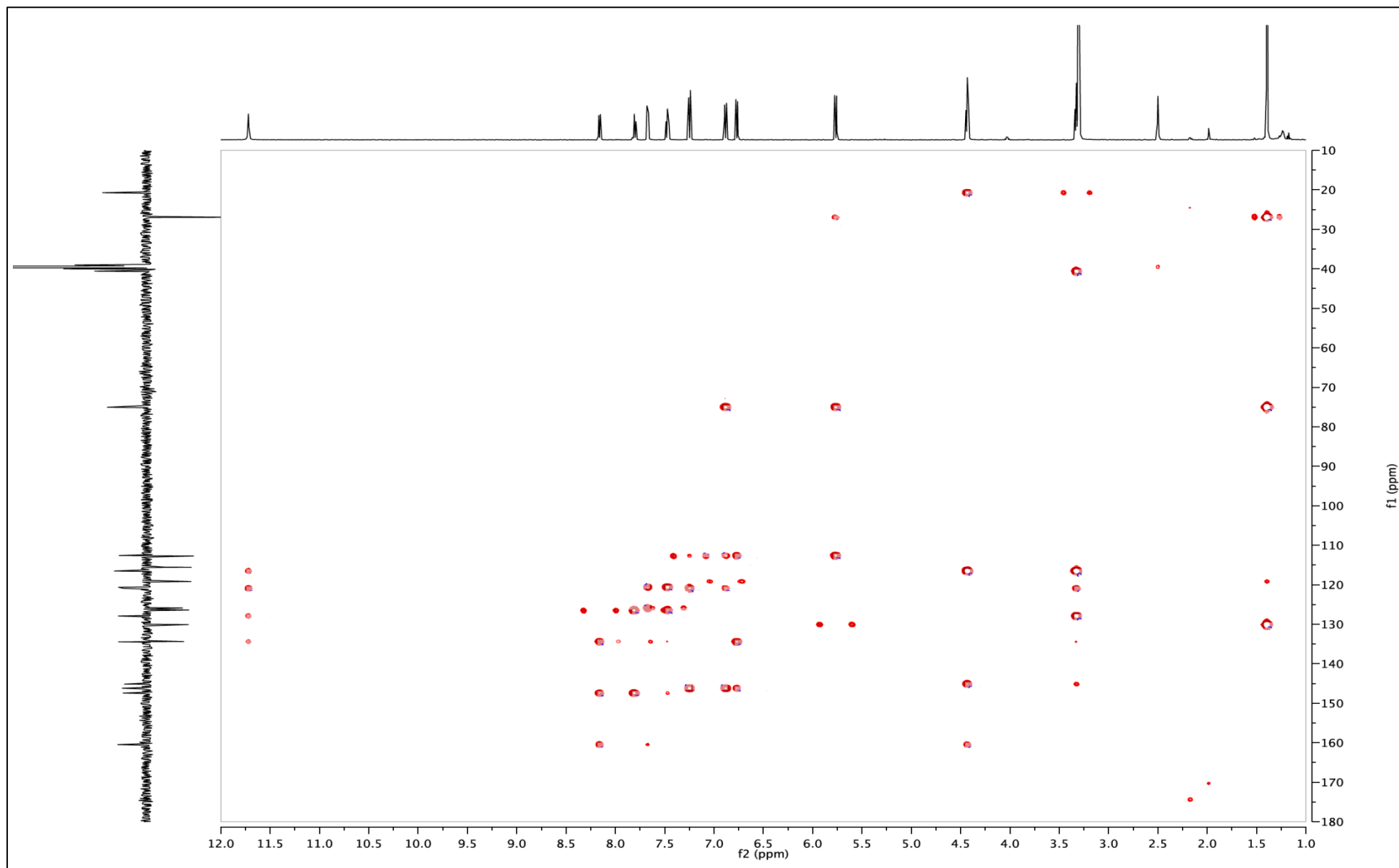


Tabela 42 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide fontanesina B (**22**).

Composto 22 (fontanesina B)			
Posição	δ_H^a (m ^b ; J ^c)	δ_C (ppm)	<i>g</i> HMBC
1	7.67 (dd; 8.4, 1.5)	126.4	120.6 (4a); 125.8 (3)
2	7.81 (ddd; 8.4, 7.1, 1.5)	134.3	126.5 (4); 147.4 (14a)
3	7.47 (ddd; 8.0, 7.1, 1.0)	125.8	120.6 (4a); 126.4 (1)
4	8.16 (dd; 8.0, 1.0)	126.5	134.3 (2); 147.4 (14a); 160.4 (5)
4a	-	120.6	
5	-	160.4	
7	4.43 (t; 6.8)	40.6	20.7 (8); 116.5 (8a); 145.1 (13a); 160.4 (5)
8	3.33 (t; 6.8)	20.7	40.6 (7); 116.5 (8a); 120.9 (8b); 127.9 (13)
8a	-	116.5	
8b	-	120.9	
9	-	112.6	
10	-	146.2	
11	6.77 (d; 8.7)	115.5	112.6 (9); 134.4 (12a); 146.2 (10)
12	7.25 (d; 8.7)	112.7	120.9 (8b); 146.2 (10)
12a	-	134.4	
13	-	127.9	
13a	-	145.1	
14a	-	147.4	
15	-	75.0	
16	5.77 (d; 9.7)	131.0	26.9 (18 e 19); 75.0 (15); 112.6 (9)
17	6.88 (d; 9.7)	119.1	75.0 (15); 112.6 (9); 120.9 (8b); 146.2 (10)
18	1.40 (s)	26.9	26.9 (19); 75.0 (15); 131.0 (16)
19	1.40 (s)	26.9	26.9 (18); 75.0 (15); 131.0 (16)
NH	11.72 (s)	-	116.5 (8a); 120.9 (8b); 127.9 (13); 134.4 (12a)

^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (*J*), expressa em Hz

Fração U-2

O composto presente na Fração U-2 (3,1 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em DMSO e MeOH. A análise por UPLC-TOF-MS (HRMS) no modo positivo ($[M+H]^+$) apresentou pico em m/z 386,1507, compatível com a fórmula $C_{23}H_{19}N_3O_3$ ($\Delta_{ppm} = 0,5$) (**Figura 181**) (**composto 23**). O espectro de UV [(MeOH); λ_{max} (log ϵ) nm: 251 (4.38), 335 (4.42), 354 (4.5), 386 (4.48)] indica que o **composto 23** também é um alcaloide indolopiridoquinazolinico. Os dados de NMR são similares aos observados para o composto **20**, exceto pela posição do grupo hidroxila livre em C-1 (δ_C 151.7). Esta atribuição foi obtida através do espectro HMBC. Com base nos resultados obtidos, o **composto 23** foi definido como novo alcaloide indolopiridoquinazolinico chamado Fontanesina C (**Figura 180**). Os dados obtidos por NMR estão ilustrados na **Tabela 43**.

Figura 180 – Estrutura do alcaloide inédito fontanesina C, isolada dos ramos de *C. fontanesianus* (**23**).

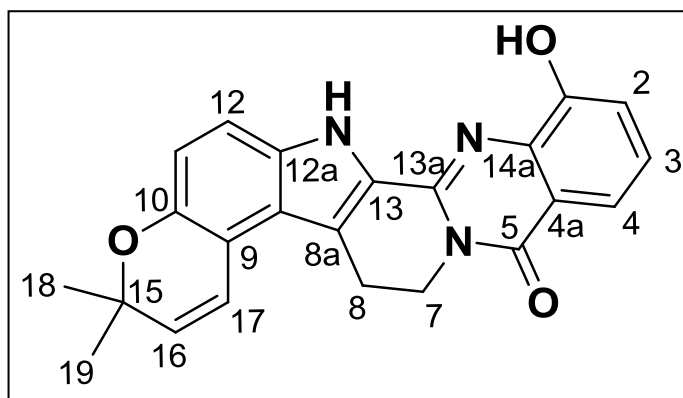


Figura 181 – Espectro de massas de alta resolução (HRMS) para o composto presente na Fração U-2, identificado como novo alcaloide fontanesina C (23).

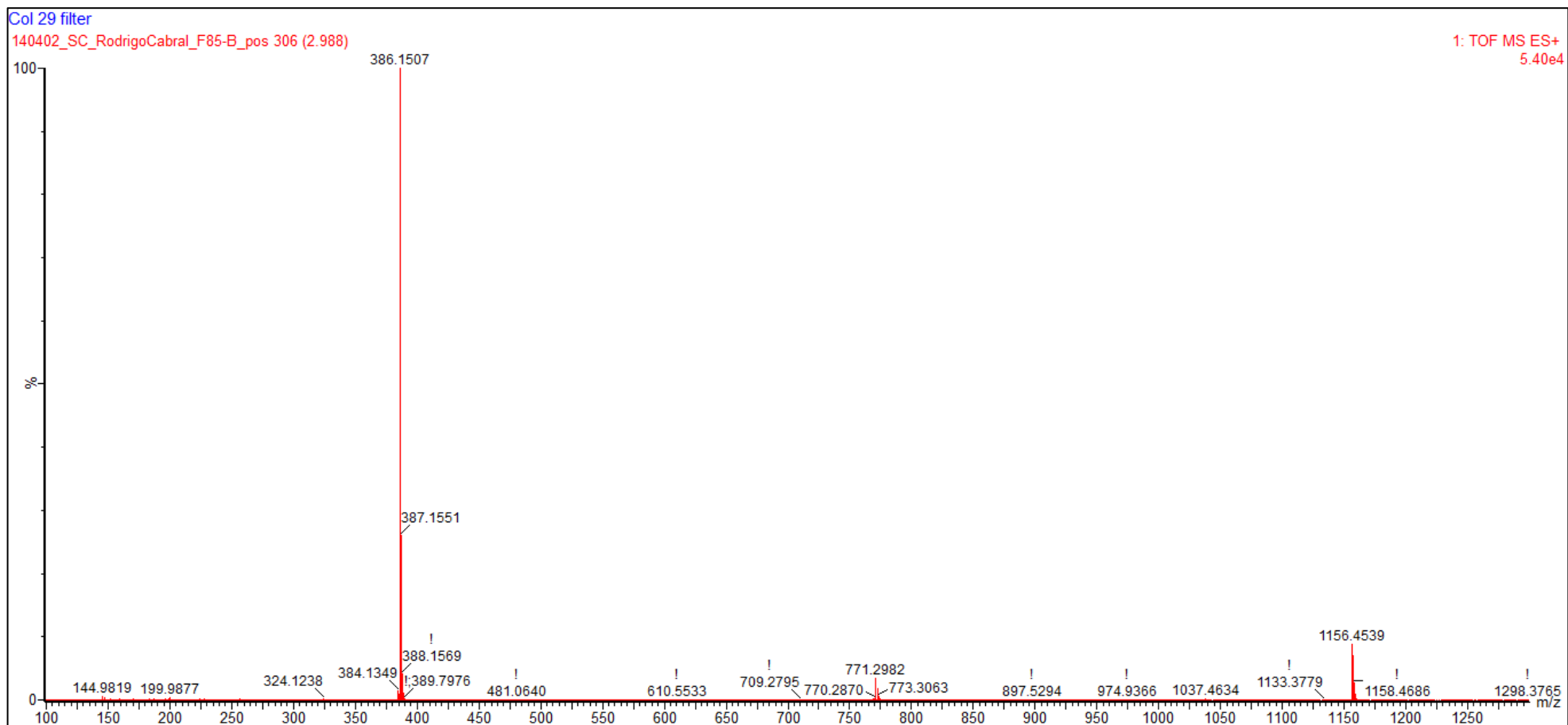


Figura 182 – Espectro de NMR ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do alcaloide fontanesina C (**23**).

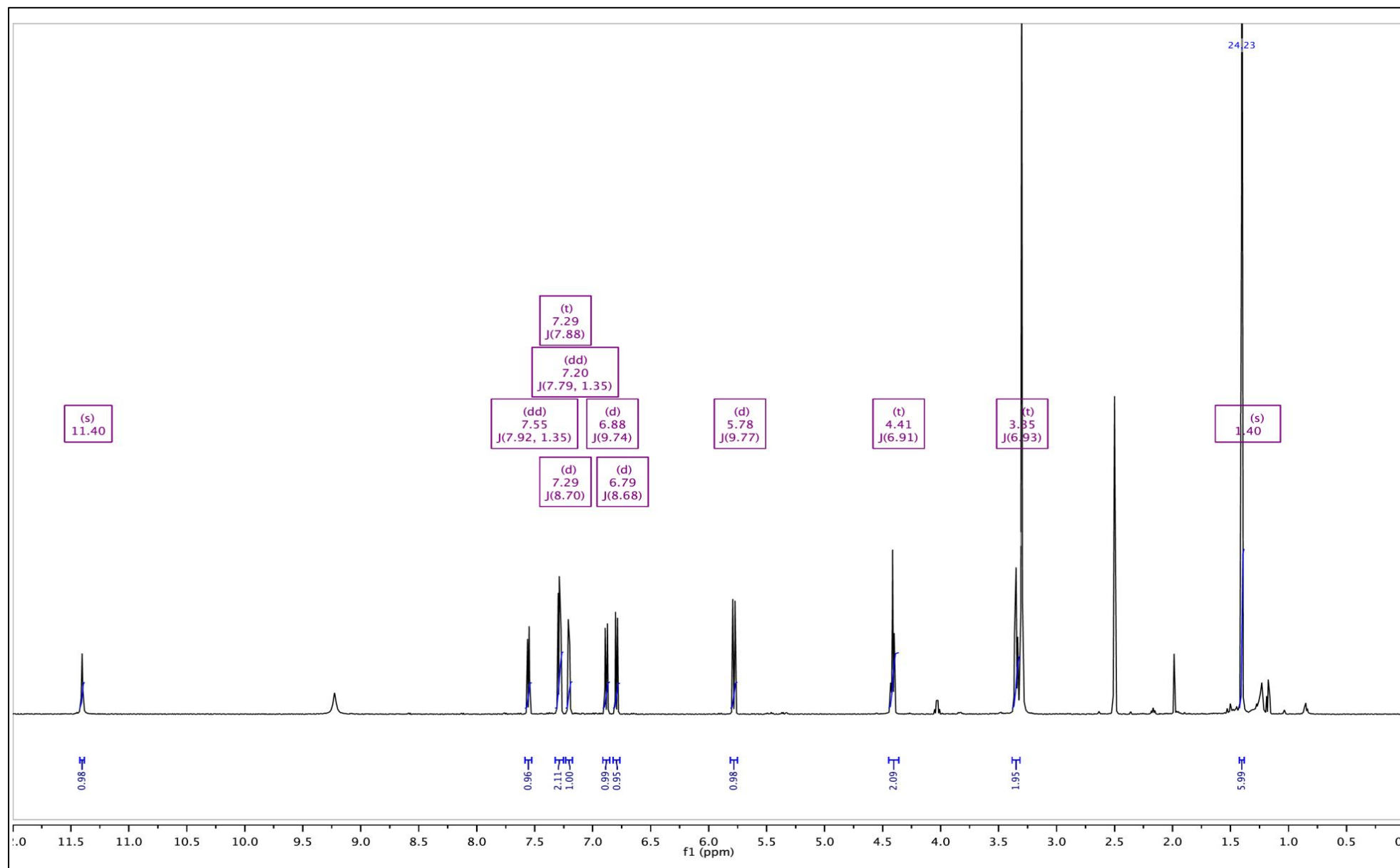


Figura 183 – Mapa de contorno *g*COSY da fontanesina C (**23**).

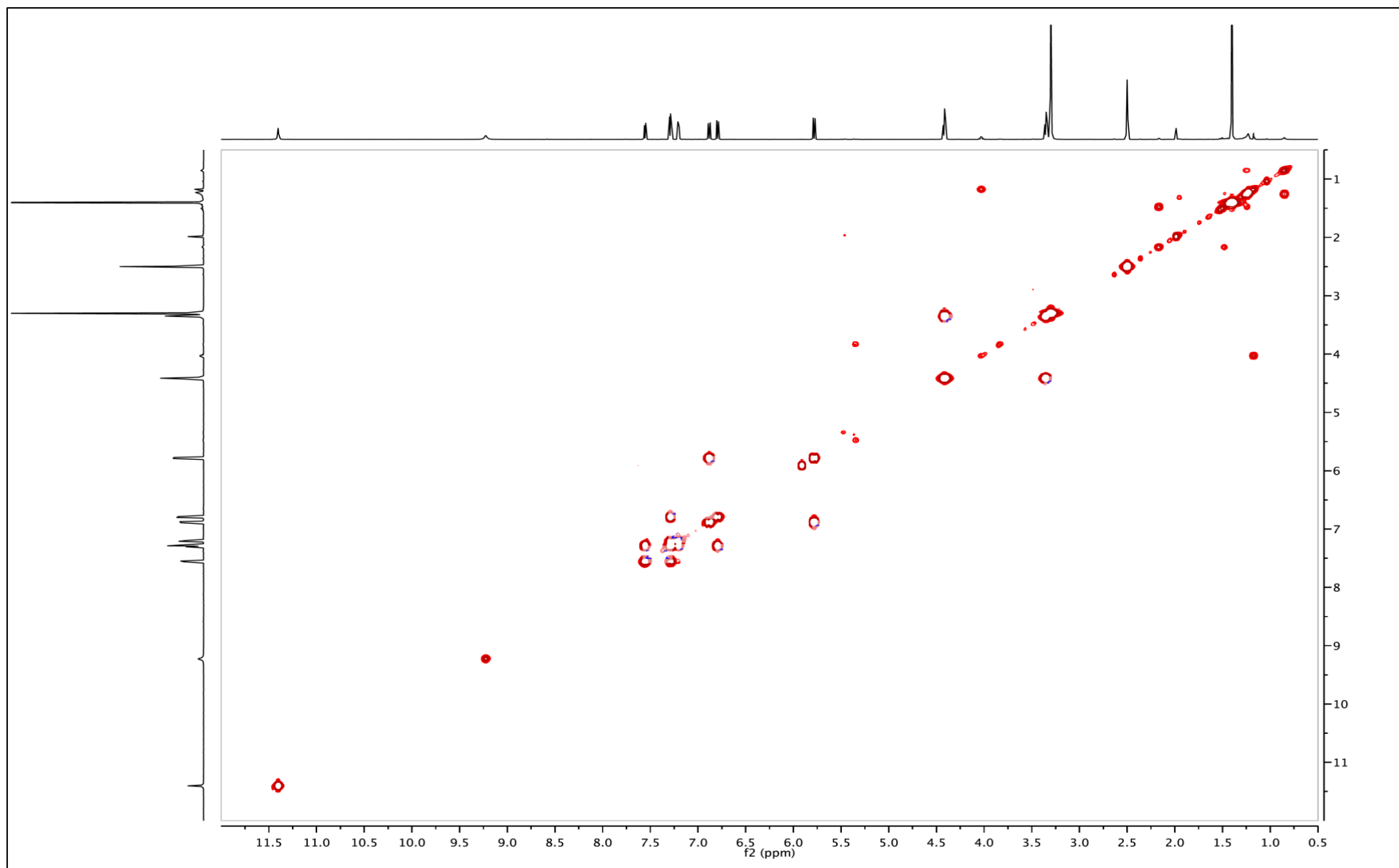


Figura 184 – Mapa de contorno NOESY da fontanesina C (23).

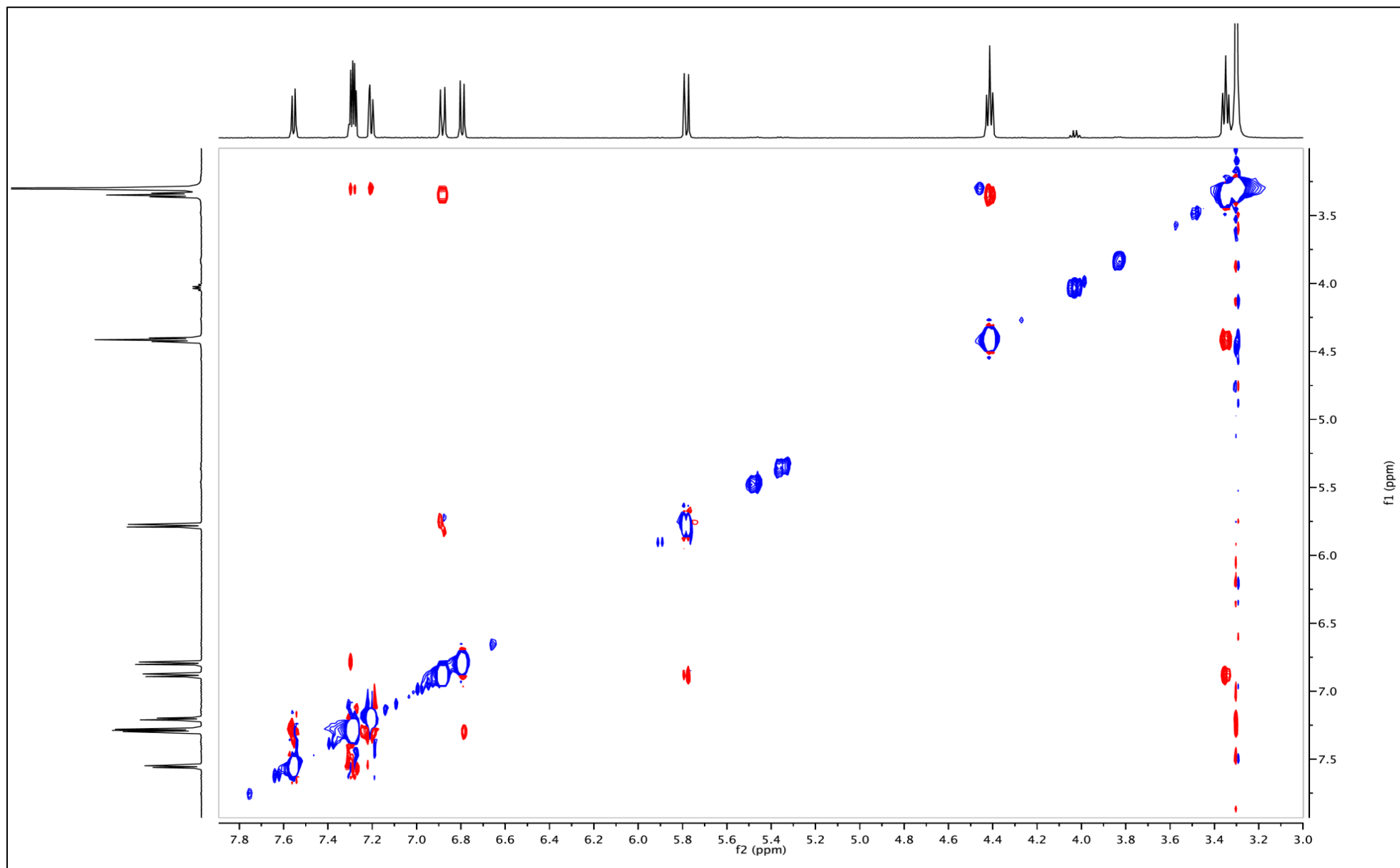


Tabela 43 – Dados de NMR mono e bidimensionais para o alcaloide fontanesina C (**23**).

Posição	Composto 23 (fontanesina C)		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	g HMBC
1	-	151.7	
2	7.20 (dd; 7.8, 1.3)	118.4	116.3 (4); 138.9 (14a); 151.7 (1)
3	7.29 (t; 7.8)	123.8	121.8 (4a); 151.7 (1)
4	7.55 (dd; 7.8, 1.3)	116.3	118.4 (2); 138.9 (14a); 160.8 (5)
4a	-	121.8	
5	-	160.8	
7	4.41 (t; 6.9)	40.2	20.5 (8); 116.1 (8a); 143.9 (13a); 160.8 (5)
8	3.35 (t; 6.9)	20.5	40.2 (7); 116.1 (8a); 121.8 (8b); 128.9 (13)
8a	-	116.1	
8b	-	121.8	
9	-	113.3	
10	-	146.8	
11	6.79 (d; 8.7)	115.2	113.3 (9); 134.6 (12a)
12	7.29 (d; 8.7)	112.1	146.8 (10)
12a	-	134.6	
13	-	128.9	
13a	-	143.9	
14a	-	138.9	
15	-	75.6	
16	5.78 (d; 9.7)	129.9	26.6 (18 e 19); 75.6 (15); 113.3 (4)
17	6.88 (d; 9.7)	118.8	75.6 (15); 113.3 (9); 121.8 (8b); 146.8 (10)
18	1.40 (s)	26.6	26.6 (19); 75.6 (15); 129.9 (16)
19	1.40 (s)	26.6	26.6 (18); 75.6 (15); 129.9 (16)
NH	11.40 (s)		116.1 (8a); 121.8 (8b); 128.9 (13); 134.6 (12a)

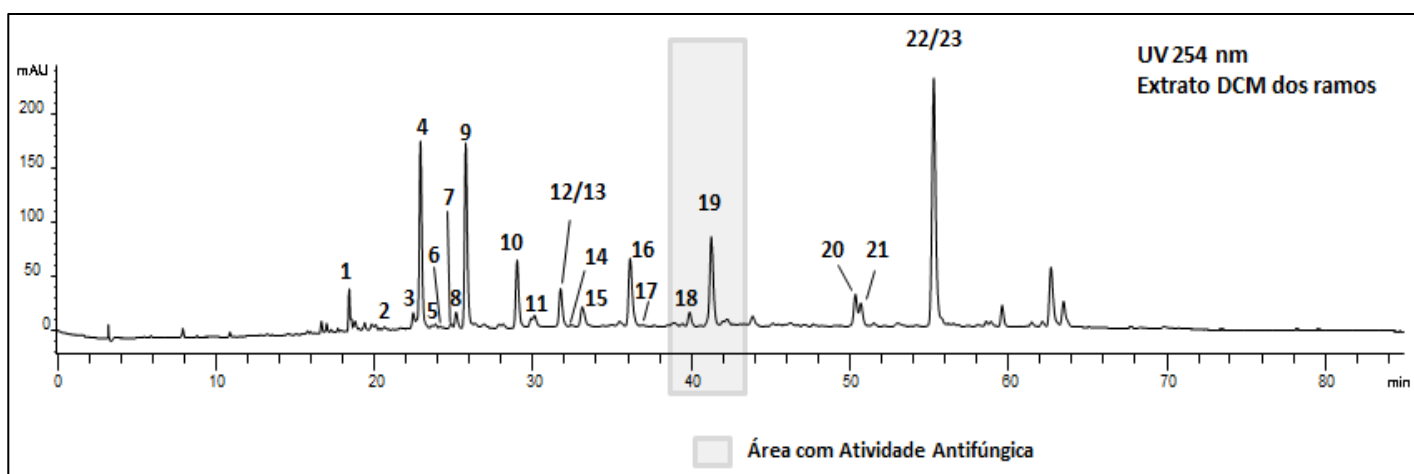
^aDeslocamentos químicos em ppm (δ)

^bMultiplicidade (m)

^cConstante de acoplamento (J), expressa em Hz

O isolamento bioguiado dos dois alcaloides (substâncias 18 e 19) presentes no extrato dos ramos de *C. fontanesianus* (Jureia) pela atividade de inibição de crescimento do fungo *Candida albicans* levou a identificação de 23 compostos, destes 13 são alcaloides: 6 indolopiridoquinazolínicos, sendo 1 conhecido (12), 5 novos (16, 20, 21, 22 e 23) e 7 derivados do ácido antranílico (7, 8, 9, 10, 13, 18 e 19); 6 amidas (1, 2, 3, 4, 11 e 15); 1 lignana (5); 1 piranocumarina (6) e 2 novos triterpenos do tipo limonoide (14 e 17). Destes compostos, apenas dois não foram isolados, o 2-fenil-1-metil-4-quinolona (8) e a dictaminina (13), e identificados por desreplicação com base nas análises por HPLC-DAD-ESI-MS e UPLC-TOF-MS (HRMS).

Figura 185 – Compostos identificados a partir do extrato DCM dos ramos de *C. fontanesianus*: 1- dimorfamida C; 2- *N*-cis-feruloiltiramina; 3- paprazina; 4- moupinamida; 5- (-)-siringaresinol; 6- (-)-aegelinol; 7- haplopina; 8- 2-fenil-1-metil-4-quinolona; 9- esquimianina; 10- γ -fagarina; 11- (+)grossamida; 12- 10-hidroxiturtaecarpina; 13- dictaminina; 14- limonoide CF-A1; 15- canabisina F; 16- conchocarpina A; 17- limonoide CF-B1; 18- flindersina; 19- 7-metoxiflindersina; 20- fontanesina A; 21- conchocarpina B; 22- fontanesina B; 23- fontanesina C.



Este estudo fitoquímico bioguiado com a espécie *C. fontanesianus* tem grande importância quimiotaxonômica, uma vez que havia ausência de estudos químicos com esta espécie. Contribui de maneira efetiva para o conhecimento químico do gênero *Conchocarpus*.

5.12. Avaliação Quantitativa da Atividade Antioxidante

5.12.1. Avaliação com DPPH em microplaca

Todos os extratos e frações tiveram sua atividade antioxidante quantificada preliminarmente, para avaliação do potencial de sequestro de radical livre DPPH no ensaio em microplaca e leitor de Eliza. Os extratos etanólicos brutos foram avaliados em concentração de 200 µg/mL e os demais extratos em concentração de 100 µg/mL (concentrações finais na microplaca). O padrão utilizado nesta avaliação foi *Ginkgo biloba* (Herbarium®) na concentração de 31,25 µg/mL. As siglas para identificação das amostras são: extrato etanólico bruto ramos (**EEBrR**), extrato etanólico bruto folhas (**EEBrF**), extrato HEX ramos (**EHexR**), extrato HEX folhas (**EHexF**), extrato DCM ramos (**EDcmR**), extrato DCM folhas (**EDcmF**), extrato AcOEt ramos (**EAcR**) e extrato AcOEt folhas (**EAcF**). Os extratos obtidos das plantas dos dois locais de estudo foram avaliados, o Núcleo Arpoador da Estação Ecológica Jureia-Itatins (**Gráfico 2**) e o Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar (**Gráfico 3**).

Gráfico 2 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos do material vegetal coletado na Estação Ecológica Jureia-Itatins.

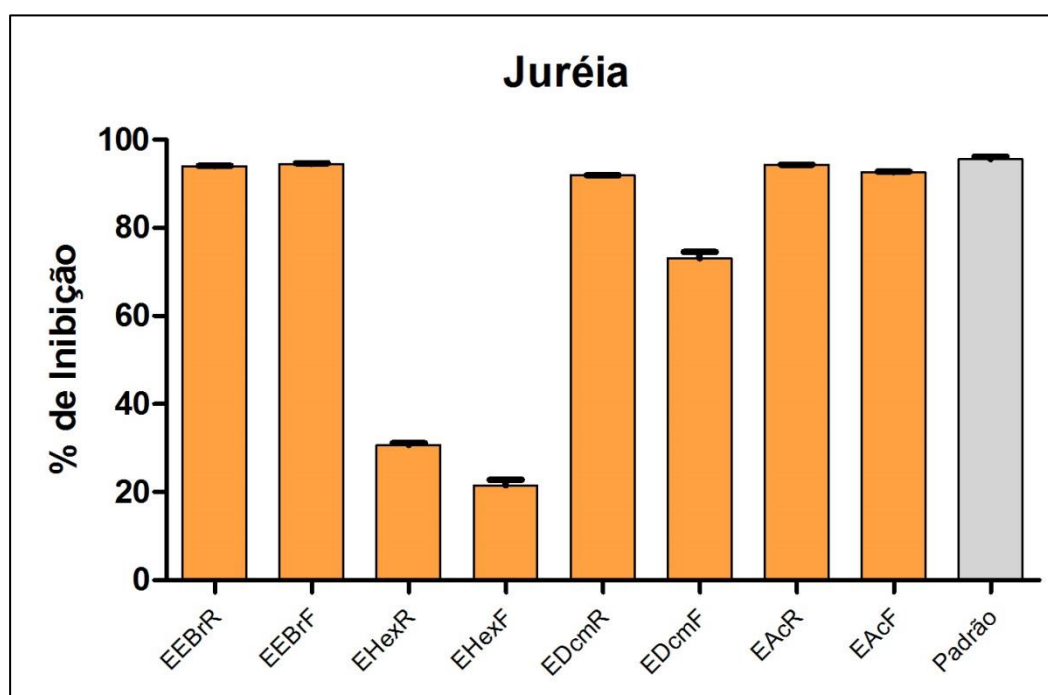
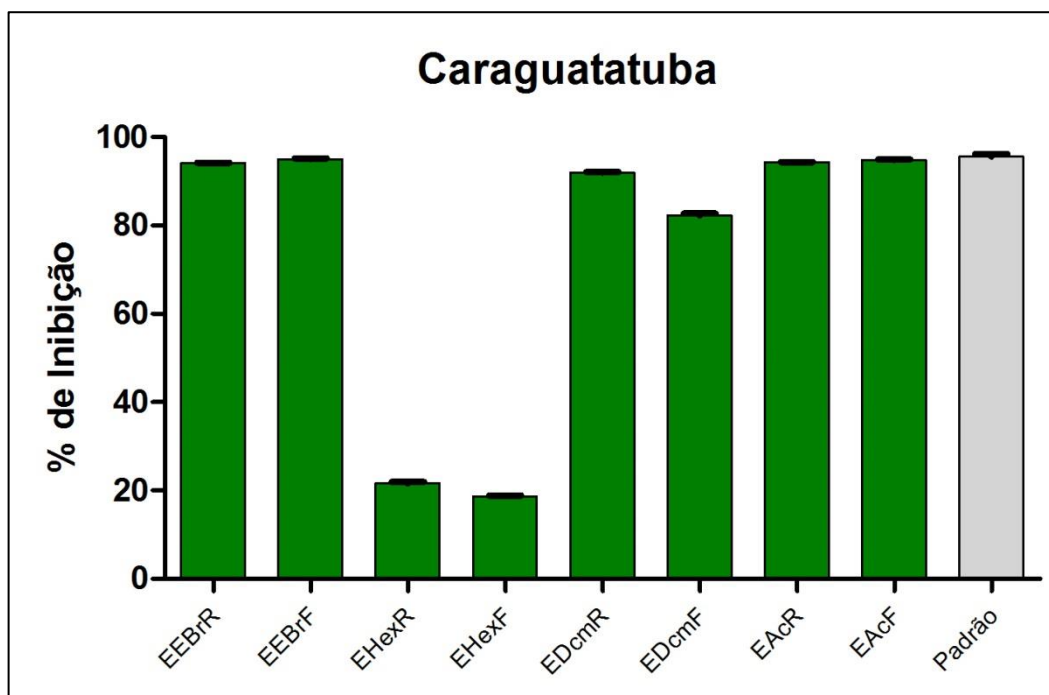


Gráfico 3 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar.



Este método de detecção da atividade antioxidante se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre (DPPH), que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Estas transferências de elétrons impedem ou minimizam o estresse oxidativo causado pelos radicais livres (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Sharma & Bhat, 2009).

Os resultados apresentados nos **Gráficos 2 e 3** confirmam o fraco potencial antioxidante apresentado pelos extratos hexânicos, que pode ter como uma das causas a baixa solubilidade em metanol. Os resultados também confirmam o promissor potencial antioxidante dos demais extratos, em conformidade com o que já havia sido observado nas avaliações qualitativas em TLC.

Após os resultados obtidos acima, foi realizada a quantificação da atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH em curva concentração-resposta, nas concentrações 1,95 µg/mL, 3,90 µg/mL, 7,80 µg/mL, 15,60 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,50 µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL. Foram avaliados todos os extratos de ambos os locais de coleta, com exceção do hexânico. Abaixo seguem as tabelas com os resultados das avaliações. Os padrões utilizados, *Gingko biloba* (Herbarium®) (31,25 µg/mL) e quercetina, (4 µg/mL) apresentaram inibição de 75,50% ($\pm 0,166$) e 91,60% ($\pm 0,191$), respectivamente (**Tabelas 44 e 45**).

Tabela 44 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos do lenho de *C.fontanesianus* e seus IC₅₀.

Ramos Caulinares				
Jureia	Concentração (µg/mL)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition ±S.E.M	Extrato DCM % inhibition ±S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition ±S.E.M
	1,95	3,47 ±0,54	0,89 ±0,40	8,22 ±0,96
	3,90	8,09 ±0,44	4,07 ±0,26	9,80 ±1,14
	7,80	13,97 ±0,45	10,33 ±0,20	14,97 ±0,46
	15,60	24,92 ±0,16	23,13 ±0,40	30,17 ±0,38
	31,25	46,80 ±0,16	43,45 ±0,80	51,90 ±0,46
	62,50	70,77 ±0,32	69,86 ±0,26	73,52 ±0,09
	125,00	91,33 ±0,22	89,26 ±0,05	92,37 ±0,05
	250,00	94,49 ±0,47	92,70 ±0,25	94,55 ±0,14
	IC ₅₀	34,78 µg/mL	38,58 µg/mL	29,89 µg/mL
Caraguatatuba	Concentração (µg/mL)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition ±S.E.M	Extrato DCM % inhibition ±S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition ±S.E.M
	1,95	4,12 ±0,76	3,06 ±0,27	5,41 ±0,43
	3,90	5,33 ±0,42	5,37 ±0,16	13,05 ±0,97
	7,80	11,95 ±0,84	10,50 ±0,46	24,09 ±1,02
	15,60	24,08 ±0,73	21,30 ±0,75	38,33 ±0,55
	31,25	43,44 ±0,53	37,73 ±1,08	57,84 ±0,56
	62,50	65,53 ±0,32	61,76 ±0,12	72,22 ±0,60
	125,00	85,80 ±0,10	82,52 ±0,69	85,34 ±0,06
	250,00	94,41 ±0,06	92,15 ±0,06	95,83 ±0,11
	IC ₅₀	39,84 µg/mL	46,10 µg/mL	24,53 µg/mL

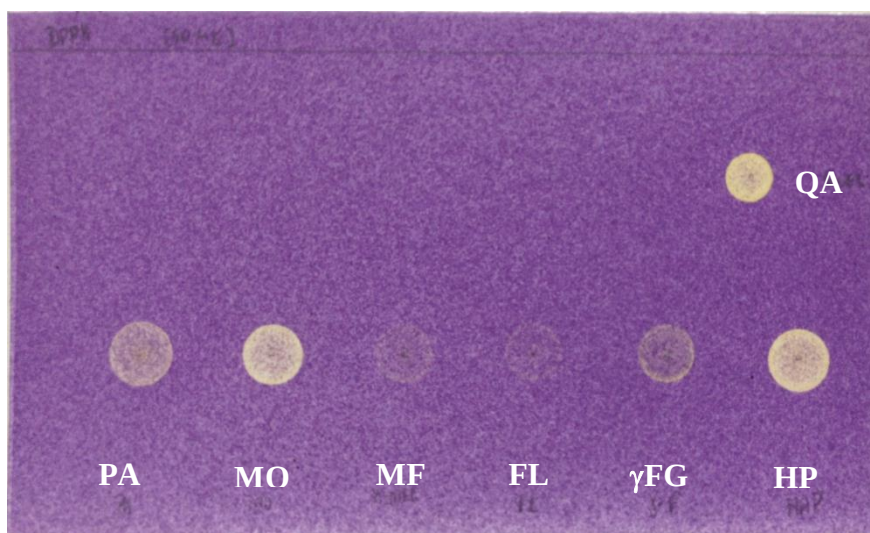
Tabela 45 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos extratos obtidos das folhas de *C.fontanesianus* e seus IC₅₀.

Folhas				
Jureia	Concentração (µg/mL)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition ±S.E.M	Extrato DCM % inhibition ±S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition ±S.E.M
	1,95	0,63 ±0,16	1,35 ±0,12	0,4 ±0,09
	3,90	2,86 ±0,29	4,82 ±0,39	1,26 ±0,62
	7,80	6,58 ±0,52	6,75 ±0,05	3,05 ±0,52
	15,60	14,88 ±1,24	8,97 ±0,68	15,62 ±0,74
	31,25	29,01 ±0,44	15,17 ±0,77	24,19 ±1,45
	62,50	54,07 ±0,39	29,84 ±0,86	40,04 ±0,058
	125,00	82,18 ±0,22	46,56 ±1,19	62,14 ±0,55
	250,00	93,51 ±0,11	64,14 ±0,61	88,15 ±0,35
	IC ₅₀	58,51 µg/mL	144,93 µg/mL	85,83 µg/mL
Caraguatatuba	Concentração (µg/mL)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition ±S.E.M	Extrato DCM % inhibition ±S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition ±S.E.M
	1,95	5,9 ±0,33	2,56 ±0,88	2,28 ±0,98
	3,90	15,87 ±1,02	4,76 ±0,79	14,24 ±0,22
	7,80	26,26 ±1,32	6,75 ±0,05	24,22 ±0,71
	15,60	33,75 ±0,55	12,06 ±0,35	35,18 ±0,38
	31,25	53,94 ±0,81	25,8 ±1,34	49,08 ±0,23
	62,50	73,14 ±0,05	38,83 ±0,55	57,81 ±0,18
	125,00	84,83 ±0,06	59,88 ±0,84	71,47 ±1,18
	250,00	95,22 ±0,25	70,81 ±0,63	81,88 ±0,90
	IC ₅₀	28,96 µg/mL	88,14 µg/mL	32,73 µg/mL

Os resultados apresentados demonstram o promissor potencial da espécie quando se trata da atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH, confirmando os resultados obtidos anteriormente nas avaliações realizadas. Os extratos DCM e AcOEt dos ramos, aparentemente apresentaram um maior potencial antioxidante quando comparados com os mesmos extratos das folhas. Já entre os diferentes locais de coleta não existe grande variação do potencial antioxidante.

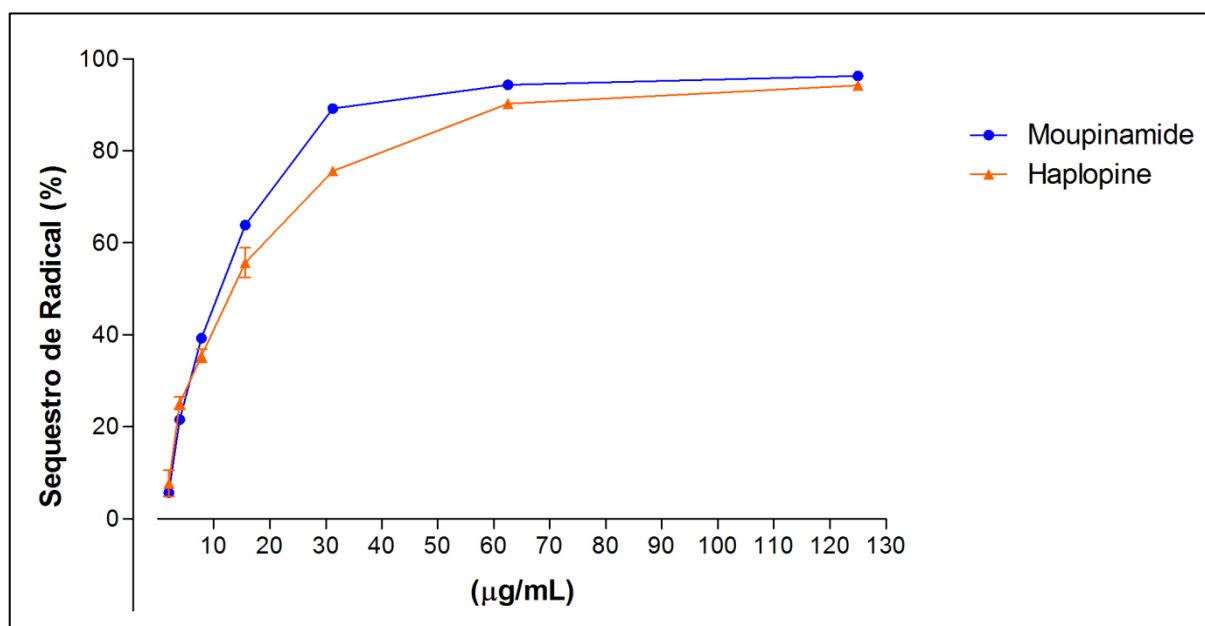
Algumas das substâncias puras identificadas (paprazina -**PA**; moupinamida -**MO**; 7-metoxiflindersina -**MF**; flindersina -**FL**; γ -fagarina - **γ FG**; haplopina -**HP**) tiveram seu potencial antioxidante (DPPH) avaliados qualitativamente em TLC (50 μ g) (**Figura 186**).

Figura 186 – Resultado da avaliação qualitativa dos compostos puros (50 μ g). QA – padrão quercetina (5 μ g).



Com base nos resultados acima, foi realizada a quantificação da atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH em curva dose-reposta da amida moupinamida e do alcaloide furoquinolínico haplopina, que apresentaram potencial oxidante semelhante ao padrão quercetina. As concentrações utilizadas foram: 1,95 μ g/mL, 3,90 μ g/mL, 7,80 μ g/mL, 15,60 μ g/mL, 31,25 μ g/mL, 62,50 μ g/mL, 125 μ g/mL. O **Gráfico 4** ilustra os resultados obtidos. Os padrões utilizados, *Ginkgo biloba* (Herbarium®) (31,25 μ g/mL) e quercetina, (4 μ g/mL) apresentaram inibição de 79,30% ($\pm$ 0,196) e 92,80% ($\pm$ 0,071), respectivamente.

Gráfico 4 – Quantificação da atividade antioxidante com DPPH dos composto isolados do lenho de *C. fontanesianus*.



Com base nos resultados foi possível calcular o IC_{50} da amida moupinamida (**4**) ($IC_{50} = 10,53 \mu\text{g/mL}$) e do alcaloide haplopina (**7**) ($IC_{50} = 12,64 \mu\text{g/mL}$). Possivelmente um dos principais compostos responsáveis pela atividade de sequestro do radical DPPH nos extratos do lenho de *C. fontanesianus*.

Os óleos voláteis extraído das folhas (Jureia e Caraguatatuba) e frutos (Juréia) de *C. fontanesianus* também foram avaliados qualitativamente em TLC quanto ao seu potencial antioxidante de sequestro do radical DPPH, porém não apresentaram tal atividade biológica.

5.12.2. Avaliação com β -caroteno / Ac. Linoleico em microplaca

Todos os extratos e frações tiveram sua atividade antioxidante quantificada preliminarmente, para avaliação do potencial de inibição da lipoperoxidação, em ensaio em microplaca e leitor de Eliza. Os extratos etanólicos brutos foram avaliados em concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ e os demais extratos em concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (concentrações finais na microplaca). Os controles positivos foram BHA ($20 \mu\text{g/mL}$) e BHT ($20 \mu\text{g/mL}$). As siglas para identificação das amostras são: extrato etanólico bruto ramos (**EEBrR**), extrato etanólico bruto folhas (**EEBrF**), extrato HEX ramos (**EHexR**), extrato HEX folhas (**EHexF**), extrato DCM ramos (**EDcmR**), extrato DCM folhas (**EDcmF**), extrato AcOEt ramos (**EAcR**) e extrato AcOEt folhas (**EAcF**). Os extratos dos dois locais de estudo foram avaliados, o

Núcleo Arpoador da Estação Ecológica Jureia-Itatins (**Gráfico 5**) e o Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar(**Gráfico 6**).

Gráfico 5 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos do material vegetal coletado na E.E. Jureia-Itatins.

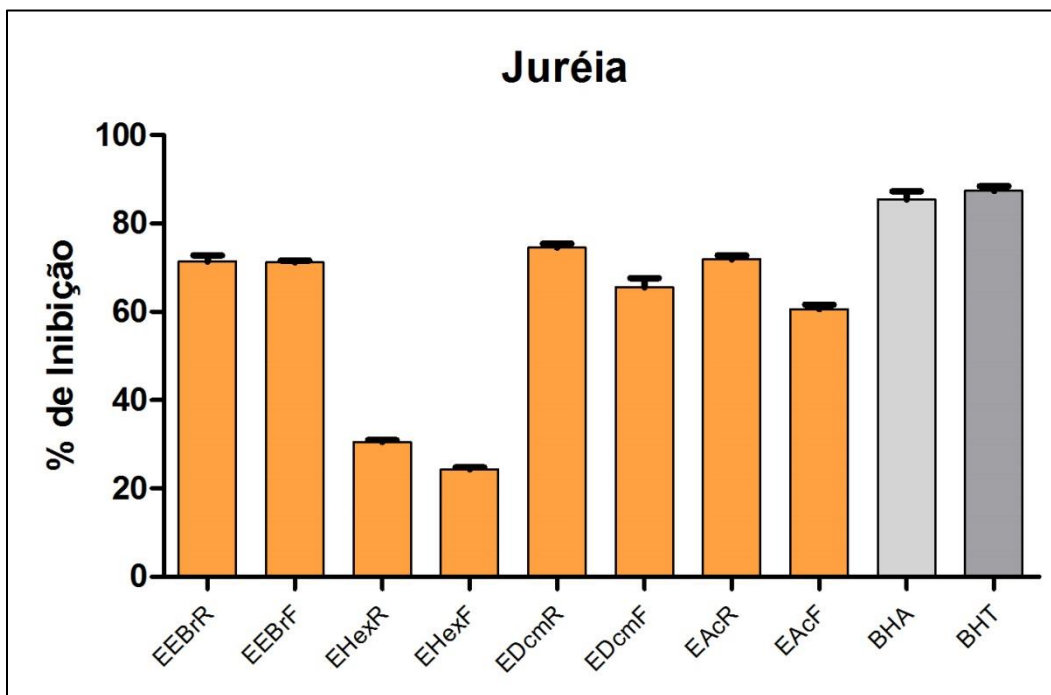
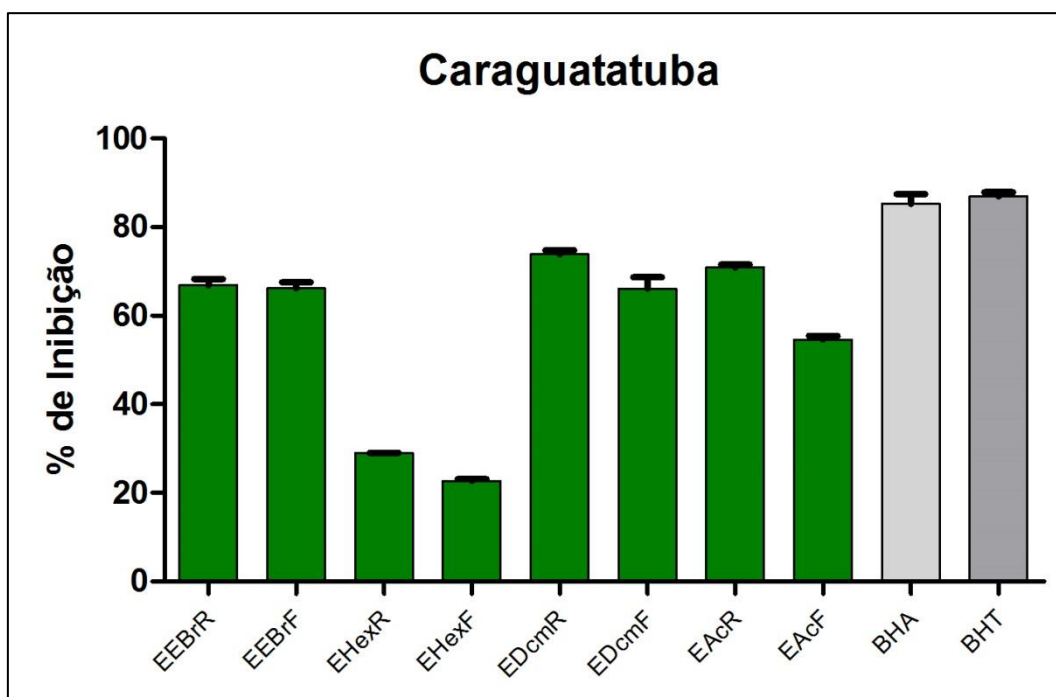


Gráfico 6 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos do material vegetal coletado no Núcleo Caraguatatuba.



Os resultados apresentados nos **Gráficos 5 e 6** mostram o fraco potencial antioxidante dos extratos hexânicos e confirmam o potencial antioxidante dos demais extratos, em conformidade com o que já havia sido observado nas avaliações qualitativas em TLC.

Após os resultados obtidos acima, foi realizada a quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico em curva concentração-reposta, nas concentrações 1,95 $\mu\text{g/mL}$, 3,90 $\mu\text{g/mL}$, 7,80 $\mu\text{g/mL}$, 15,60 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 62,50 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$. Foram avaliados todos os extratos de ambos os locais de coleta, com exceção do hexânico. Abaixo seguem ilustradas as tabelas com os resultados das avaliações. Os controles positivos utilizados, BHA (20 $\mu\text{g/mL}$) e BHT (20 $\mu\text{g/mL}$), apresentaram inibição de 88,28% ($\pm 1,464$) e 83,85% ($\pm 1,186$), respectivamente (**Tabelas 46 e 47**).

Tabela 46 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos do lenho de *C.fontanesianus* e seus IC_{50} .

Ramos Caulinares				
Jureia	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato DCM % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition $\pm$ S.E.M
	1,95	20,95 $\pm 1,94$	8,57 $\pm 1,15$	11,96 $\pm 0,95$
	3,90	25,15 $\pm 2,17$	14,61 $\pm 1,62$	20,44 $\pm 1,01$
	7,80	36,10 $\pm 0,71$	29,17 $\pm 2,05$	29,26 $\pm 1,06$
	15,60	47,72 $\pm 1,56$	54,71 $\pm 1,32$	35,42 $\pm 2,09$
	31,25	57,51 $\pm 0,30$	74,51 $\pm 0,32$	55,63 $\pm 0,95$
	62,50	63,89 $\pm 1,31$	82,48 $\pm 0,79$	67,59 $\pm 0,80$
	125,00	75,51 $\pm 1,59$	90,45 $\pm 0,43$	75,61 $\pm 0,53$
	250,00	83,48 $\pm 0,986$	95,57 $\pm 0,469$	85,13 $\pm 1,108$
	IC_{50}	23,74 $\mu\text{g/mL}$	14,25 $\mu\text{g/mL}$	28,08 $\mu\text{g/mL}$
Caraguatatuba	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato DCM % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition $\pm$ S.E.M
	1,95	6,74 $\pm 3,24$	8,89 $\pm 3,48$	16,27 $\pm 0,38$
	3,90	11,53 $\pm 2,58$	20,70 $\pm 2,74$	19,26 $\pm 0,97$
	7,80	28,49 $\pm 3,03$	26,92 $\pm 0,55$	25,69 $\pm 1,89$
	15,60	40,28 $\pm 0,56$	41,90 $\pm 1,80$	36,21 $\pm 1,25$
	31,25	54,79 $\pm 0,84$	60,90 $\pm 2,01$	50,38 $\pm 0,67$
	62,50	65,54 $\pm 1,81$	70,05 $\pm 0,65$	62,90 $\pm 1,86$
	125,00	74,09 $\pm 1,52$	80,59 $\pm 1,79$	69,76 $\pm 0,97$
	250,00	83,54 $\pm 1,44$	86,61 $\pm 1,16$	84,71 $\pm 2,16$
	IC_{50}	28,51 $\mu\text{g/mL}$	25,65 $\mu\text{g/mL}$	30,15 $\mu\text{g/mL}$

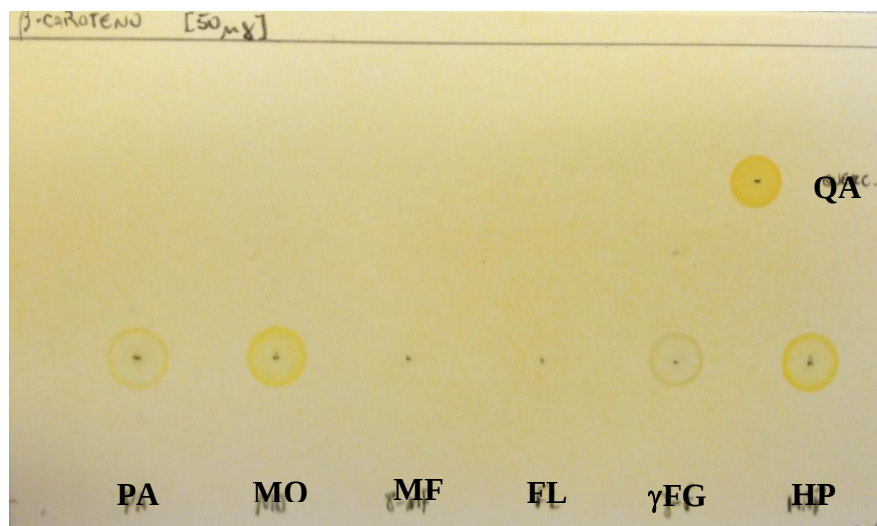
Tabela 47 – Quantificação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ác. linoleico dos extratos obtidos das folhas de *C.fontanesianus* e seus IC₅₀.

Folhas				
Jureia	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato DCM % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition $\pm$ S.E.M
	1,95	3,6 $\pm$ 1,50	7,06 $\pm$ 1,57	1,89 $\pm$ 0,95
	3,90	5,74 $\pm$ 1,06	9,68 $\pm$ 0,45	4,69 $\pm$ 1,01
	7,80	15,18 $\pm$ 0,68	16,85 $\pm$ 0,63	20,93 $\pm$ 1,05
	15,60	24,36 $\pm$ 3,45	25,96 $\pm$ 0,69	33,41 $\pm$ 2,09
	31,25	40,35 $\pm$ 1,42	37,13 $\pm$ 1,75	46,11 $\pm$ 0,95
	62,50	54,85 $\pm$ 0,59	45,33 $\pm$ 2,12	61,21 $\pm$ 0,80
	125,00	65,97 $\pm$ 1,26	52,39 $\pm$ 1,48	79,06 $\pm$ 0,53
	250,00	71,25 $\pm$ 1,05	64,46 $\pm$ 1,45	82,72 $\pm$ 1,10
	IC ₅₀	56,97 $\mu\text{g/mL}$	119,29 $\mu\text{g/mL}$	51,05 $\mu\text{g/mL}$
Caraguatatuba	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Extrato Etanólico Bruto % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato DCM % inhibition $\pm$ S.E.M	Extrato AcOEt % inhibition $\pm$ S.E.M
	1,95	4,22 $\pm$ 0,88	2,81 $\pm$ 1,73	4,90 $\pm$ 0,38
	3,90	9,49 $\pm$ 1,53	7,45 $\pm$ 1,64	10,69 $\pm$ 0,99
	7,80	17,23 $\pm$ 1,83	16,5 $\pm$ 3,37	24,03 $\pm$ 0,67
	15,60	26,90 $\pm$ 0,35	33,49 $\pm$ 0,95	31,44 $\pm$ 1,25
	31,25	38,10 $\pm$ 0,40	47,31 $\pm$ 0,74	49,56 $\pm$ 1,86
	62,50	54,39 $\pm$ 0,58	61,49 $\pm$ 2,86	68,67 $\pm$ 0,38
	125,00	62,01 $\pm$ 1,13	76,77 $\pm$ 1,61	79,24 $\pm$ 2,16
	250,00	76,31 $\pm$ 1,72	82,51 $\pm$ 1,80	86,41 $\pm$ 0,99
	IC ₅₀	57,45 $\mu\text{g/mL}$	50,82 $\mu\text{g/mL}$	45,5 $\mu\text{g/mL}$

Os resultados apresentados demonstram o promissor potencial da espécie quando se trata da atividade de inibição da lipoperoxidação, confirmando os resultados obtidos anteriormente nas avaliações realizadas. Os extratos DCM e AcOEt dos ramos, aparentemente apresentaram um potencial antioxidante levemente superior quando comparados com as folhas. Já entre os diferentes locais de coleta não existe grande variação do potencial antioxidante, assim como foi observado na avaliação antioxidante de sequestro do radical DPPH.

Algumas das substâncias puras identificadas (paprazina -**PA**; moupinamida -**MO**; 7-metoxiflindersina -**MF**; flindersina -**FL**; γ -fagarina - **γ FG**; haplopina -**HP**) tiveram seu potencial antioxidante (DPPH) avaliados qualitativamente em TLC (50 μg). Abaixo segue ilustrado a placa de TLC com o resultado da avaliação qualitativa dos compostos puros (Figura 187).

Figura 187 – Resultado da avaliação qualitativa dos compostos puros (50 µg). QA – padrão quercitica (5 µg).



Com base nos resultados obtidos foi possível observar o promissor potencial de inibição da lipoperoxidação dos compostos moupinamida (4) e haplopina(7), repetindo o resultado da avaliação antioxidante com DPPH. Neste ensaio os compostos paprazina (3) e γ -fagarina (10) também apresentaram potencial, porém mais moderado. A quantificação da atividade não foi possível devido a pouca quantidade dos compostos puros trazidos para o Brasil após o estagio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra. A prioridade foi a avaliação do potencial antifúngico destes compostos contra os fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* por bioautografia.

Os óleos voláteis extraído das folhas (Jureia e Caraguatatuba) e frutos (Juréia) de *C. fontanesinaus* também foram avaliados qualitativamente em TLC quanto ao seu potencial de inibição da lipoperoxidação, porém não apresentaram tal atividade biológica.

5.13. Avaliação da Atividade Antifúngica

5.13.1. Avaliação contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*

Nesta etapa foram avaliados o potencial antifúngico dos óleos voláteis de folhas (Jureia e Caraguatatuba) e frutos (Jureia), e das substâncias puras trazidas após o período de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra; paprazina, moupinamida, 7-metoxiflindersina, flindersina, γ -fagarina e haplopina, contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* em ensaio descrito por Homans & Fuchs (1970). A avaliação da atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* é uma ferramenta importante para achar substâncias com potencial antifúngico de maneira rápida e eficiente. Abaixo são apresentados os resultados das avaliações dos compostos puros (**Figuras 188 e 189**) e dos óleos essenciais

(**Figuras 190 e 191**). Os padrões utilizados foram: Nistatina (P) nas concentrações de 10, 5, 2,5 e 1 μg para os compostos puros e Timol (PV) nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 μg para os óleos voláteis. As placas foram fotografadas sob luz branca em equipamento CAMAG Reprostar 3.

Figura 188 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos compostos puros contra *C. sphaerospermum* (1- paprazina, 2- moupinamida, 3- 7-metoxiflindersina, 4- flindersina, 5- γ -fagarina e 6- haplopina; P- nistatina).

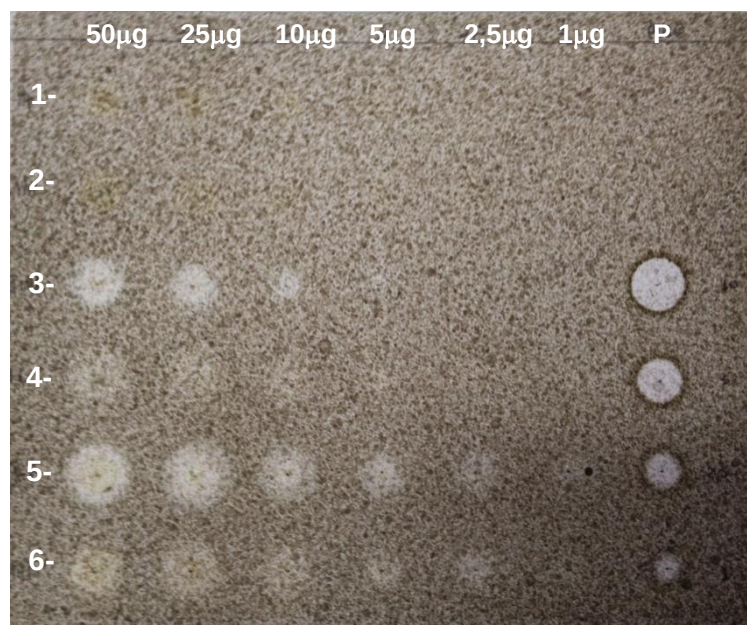


Figura 189 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos compostos puros contra *C. cladosporioides* (1- paprazina, 2- moupinamida, 3- 7-metoxiflindersina, 4- flindersina, 5- γ -fagarina e 6- haplopina; P- nistatina).

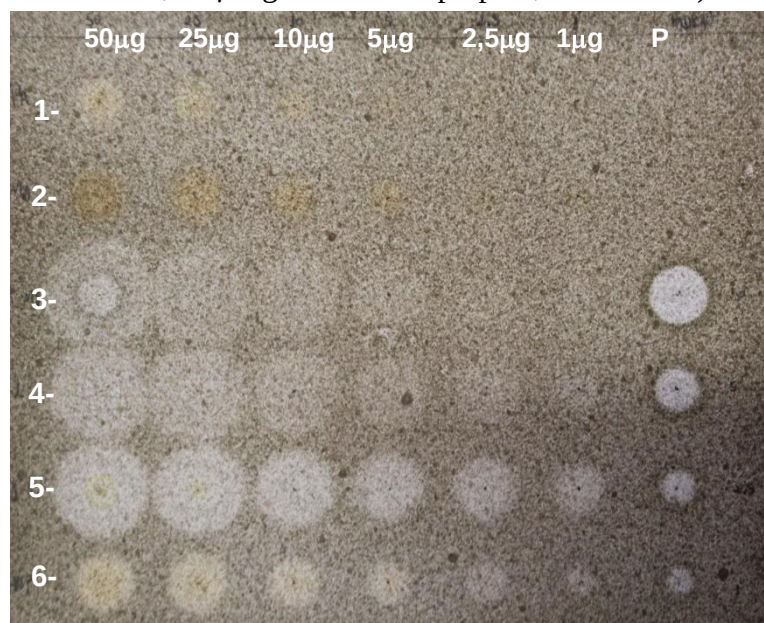


Figura 190 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis contra *C. sphaerospermum* (**A**- frutos Juréia; **B**- folhas Juréia; **C**- folhas Caraguatatuba; **PV**- padrão timol).

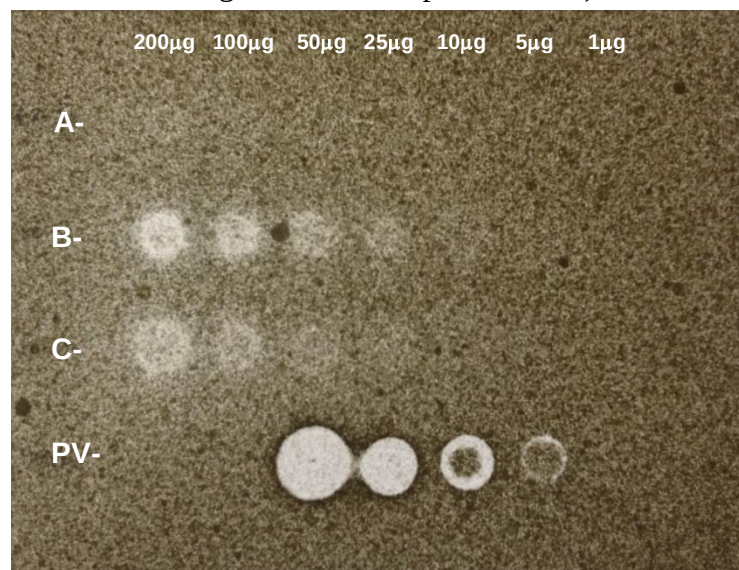


Figura 191 – TLC de avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis contra *C. cladosporioides* (**A**- frutos Juréia; **B**- folhas Juréia; **C**- folhas Caraguatatuba; **P**- padrão timol).



Após as revelações das placas cromatográficas com suspensão de esporos de conídios do fungo *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* podemos observar que duas substâncias não apresentaram atividade contra os fungos, as amidas paprazina e moupinamida (**Figuras 188 e 189**). Na avaliação contra o fungo *C. sphaerospermum* os compostos mais ativos foram

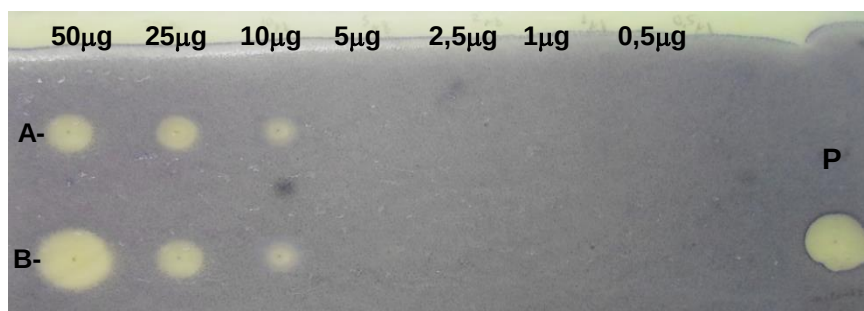
7-metoxiflindersina (**19**), γ -fagarina (**10**) e haplopina (**7**), apresentando limites de detecção (LD) de 10 μ g, 2,5 μ g e 2,5 μ g, respectivamente. Contra o fungo *C. cladosporioides* os compostos 7-metoxiflindersina (**19**), flindersina (**18**), γ -fagarina (**10**) e haplopina (**7**) apresentaram atividade, com seus limites de detecção de (LD) de 5 μ g, 5 μ g, 1 μ g e 1 μ g, respectivamente.

Os óleos voláteis (**Figuras 190 e 191**) apresentaram fraca atividade contra o fungo *C. cladosporioides*. No caso da avaliação contra o fungo *C. sphaerospermum* somente os óleos dos frutos (Juréia) não apresentaram atividade. As demais amostras avaliadas apresentaram atividade, com seus limites de detecção (LD) de 25 μ g para os óleos voláteis das folhas dos indivíduos da Juréia e 50 μ g para os óleos voláteis das folhas dos indivíduos de Caraguatatuba.

5.13.2. Avaliação contra *C.albicans*

O fracionamento bioguiado do extrato DCM dos ramos levou a localização, isolamento e identificação dos compostos com atividade contra o fungo *C. albicans*, em ensaio desenvolvido por Hostettmann (1991). Trata-se das substâncias 7-metoxiflindersina e flindersina, com seus limites de detecção (LD) de 10 μ g para cada.

Figura 192 – TLC de avaliação da atividade antifúngica contra o fungo *C.albicans* (**A**- flindersina; **B**- 7-metoxiflindersina; **P**- padrão miconazol, [1 μ g]).



Esta etapa do trabalho foi realizada durante o estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Genebra, em Genebra, Suíça.

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato dos ramos da espécie *C. fontanesinaus* permitiu a identificação de 23 substâncias, dentre estas 7 novos produtos naturais, 5 alcalóides do tipo

indolopiridoquinazolínicos (16, 20, 21, 22 e 23) e 2 triterpenos do tipo limonoide (14 e 17). Foram descritos pela primeira vez na família Rutaceae 4 substâncias: dimorfamida C (1), *N*-cis-feruloiltiramina (2), grossamida (11) e canabisina F (15). No gênero foram descritos pela primeira vez 6 substâncias: siringaresinol (5), aegelinol (6), haplopina (7), 10-hidroxirutaecarpina (12), flindersina (18) e 7-metoxiflindersina (19). Através dos dados gerados pelas técnicas de HPLC-DAD-ESI-MS e UPLC-TOF-MS, pode-se identificar a presença dos alcaloides 2-fenil-1-metil-4-quinolona e dictaminina, previamente já descritos no gênero *Conchocarpus*.

Algumas das substâncias isoladas foram avaliadas quanto ao potencial antifúngico contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Candida albicans*. Como resultado, foram encontrados diversos metabólitos com forte potencial antifúngico, os alcaloides derivados do ácido antranílico: haplopina (7), γ -fagarina (10), flindersina (18) e 7-metoxiflindersina (19). As avaliações da atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH e de inibição da lipoperoxidação (sistema β -caroteno/ác. linoleico) se mostraram métodos eficazes para descoberta de novas substâncias com potencial antioxidante, uma vez que duas foram avaliadas e tiveram resultados positivos em ambos os testes, a amida moupinamida (4) e o alcaloide haplopina (7).

As técnicas hífenadas (LC-MS, UPLC-TOF, LC-NMR) que conjugam instrumentos que separam e detectam substâncias em matrizes complexas, como extratos vegetais, de maneira rápida e eficaz, são importantes ferramentas no estudo da química de produtos naturais.

O microfracionamento bioguiado é uma importante ferramenta para a descoberta de maneira rápida e eficaz de novos compostos com atividades biológicas.

A descoberta dos 5 novos alcaloides e dos 2 novos limonóides abre uma janela de oportunidades para a continuidade de estudos com a espécie *C. fontanesianus*. Estes novos compostos são extremamente promissores, uma vez que é conhecido o potencial biológico do alcaloide rutaecarpina, o qual possui um núcleo indolopiridoquinazolínico, assim como também é conhecido o potencial dos triterpenos do tipo limonoide contra doenças como a malária.

Este trabalho químico realizado com esta espécie vem contribuir para ampliar o conhecimento da composição química do gênero *Conchocarpus* e reafirmar a importância quimiotaxonomica destes compostos em Rutaceae, além de auxiliar na compreensão das relações de afinidade aos níveis inter e infra-genérico.

7. REFERÊNCIAS

- Agripino, D.G., Lima, M.E.L., Silva, M.R., Meda, C.I., Bolzani, V.S., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Moreno, P.R.H.** 2004. Screening of Brazilian Plants for Antimicrobial and DNA-Damaging Activities. I. Atalntic Rain Forest – Ecological Station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica* 4: 1-15.
- Ahmad, S.** 1983. Flindersine from *Fagara heitzii*. *Journal of Natural Products* 47(2): 391-392.
- Akhmedzhanova, V.I., Bessonova, I.A., Yunusov, S.Y.** 1974. Flindersina from *Haplophyllum perforatum*. *Phytochemistry* 19: 262-263.
- Albarici, T.R., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F.** 2010. Cumarinas e Alcalóides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). *Química Nova* 33: 2130-2134.
- Alkahatib, R., Hennebelle, T., Roumy, V., Sahpaz, S., Süzgeç, S., Akalin, E., Meriçli, A.H., Bailleul.** 2009. Coumarins, caffeoil derivatives and a monoterpenoid glycoside from *Ferulago asparagifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 37:230-233.
- Alma, M.H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M. & Hirata, T.** 2003. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidante and antimicrobial activities of the essencial oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 1725-1729.
- Almahy, H.A., Alagimi, A.A.** 2012. Coumarins from the roots of *Cleme viscosa* (L.) antimicrobial and cytotoxic studies. *Arabian Journal of Chemitry* 5: 241-244.
- Al-Reahily, A.J., Ahmad, M.S., Muhammad, I., Al-Thukair, A.A., Perzanowski, H.P.** 2003. Furoquinoline alkaloids from *Teclea nobilia*. *Phytochemistry* 64: 1405-1411.
- Al-Shamma, A., Al-Douri, N.A., Phillipson, D.** 1979. Alkaloids of *Haplophyllum tuberculatum* from Iraq. *Phytochemistry* 18: 1417-1419.
- Al-Taweel, A. M.; Perveen, S.; El-Shafae, A. M.; Fawzy, G. A.; Malik, A.; Afza, N.; Iqbal, L.; Latif, M.** 2012. Bioactive phenolic amides from *Celtis Africana*. *Molecules*, v. 17, p. 2675-2682.
- Ambrozin, A.R.P., Mafezoli, J., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., da Silva, M.F.G.F., Ellena, J.A., Albuquerque, S.** 2005. New pyrone and quinoine alkaloid from *Almeidea rubra* and their trypanocidal activity. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16 (3a): 434-439.

- Ambrozin, A.R.P., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Fernandes, M.F.G.** 2008. Piroflavonas inéditas e atividades tripanomicidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. *Química Nova* 31: 740-743.
- Amaro, C.A.B., González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Román-Ramos, R., Aguilar-Santamaria, L., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E.** 2014. Hypoglycemic and hypotensive activity of root extract of *Smilax aristolochiifolia*, standardized on *N-trans-feruloyltyramine*. *Molecules* 19: 11366-11384.
- Anderson, D.** 1996. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research* 350(1): 103-108.
- Andrade, F.M.C. & Casali, V.W.D.** 1999. Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. Universidade Federal de Viçosa 139 p.
- Araújo, M.F., Braz-Filho, R., Carvalho, M.G., Vieira, I.J.C.** 2012. Other compounds isolated from *Simira glaziovii* and the ^1H and ^{13}C NMR chemical shift assignments of new 1-*epi*-castanopsol. *Química Nova* 35(11): 2202-2204.
- Bahia, M.V., Santos, J.B., David, J.P., David, J.M.** 2005. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society* 16(6b): 1402-1405.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P.** 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29(1): 113-123.
- Barreiro, E.J.** 2002. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova* 25(6B): 1172-1180.
- Barreiro, E.J. & Bolzani, V.S.** 2009. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova* 32(3): 679-688.
- Barroso, G.M.; Guimarães, E.F.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Peixoto, A.L. & Lima, H.C.** 1986. Sistemática de Angiospermas do Brasil. v.2. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa
- Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Magglio, A., Faraone, N., Rosselli, S.** 2009. Antimicrobial and antioxidante activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules* 14: 939-952.
- Bell, E.A.** 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: Conn, E.E. (ed.) *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press 7: 1-19.

- Bellete, B.S., de Sá, I.C.G., Mafezoli, J., Cerqueira, C.N, da Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Zukerman-Schpector, J., Pirani, J.R.** 2012. Fitoquímica e quimiossistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). Química Nova 35(11): 2132-2138.
- Berinzaghi, B., Muruzabal, A., Labriola, R., Deulofeu, V.** 1945. Studies on Argentine plants. VII. The structure of γ -fagarine. Journal of Chemistry 10(3): 181-183.
- Biavatti, M.W., Vieira, P.C., da Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B., Victor, S.R., Pagnocca, F.C., Albuquerque, S., Caracelli, I., Zukerman-Schepector, J.** 2002. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa achinata* and X-ray structure of flindersiamine. Journal of Brazilian Chemical Society 13 (1): 66-70.
- Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Furlan, M., Cavaleiro, A.J., Araújo, A.R., Silva, D.H., Lopes, M.N.** 1999. Search for Antifungal and Anticancer Compounds from Native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest. Anais da Academia Brasileira de Ciência 71: 181-189.
- Boulware, R., Stermitz, F.** 1981. Some alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum microcarpum* and *Z. procerum*. Journal of Natural Products 44(2): 200-205.
- Brader, G., Wurz, G., Greger, H., Hofer, O.** 1992. Novel prenylated 2-quinolinones from east asian *Zanthoxylum* species. Liebigs Ann. Chem.: 355-358.
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M.W., Fay, M.F., Reveal J.L., Soltis D.E., Soltis P.S., Stevens P.F.** 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of The Linnean Society.
- Brito, M.C.W. & Oliveira, L.R.C.N.** 2006. Plano de Manejo: Parque Estadual da Serra do Mar – ANEXO 1. Instituto Florestal do Estado de São Paulo.
- Cabral, R.S., Sartori, M.C., Cordeiro, I., Queiroga, C.L., Eberlin, M.N., Lago, J.H.G., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2011. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. Braz. J. Pharmacog. 22(2): 374-380.
- Calixto, J.B.** 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. J. of Ethnopharmacol. 100: 131-134.

- Challal, S., Queiroz, E. F., Kloeti, W., Debrus, B., Guillarme, D., Wolfender, J. L.** 2015. Rational and efficient preparative isolation of natural products by MPLC-UV-ELSD based on HPLC to MPLC gradient transfer. *Planta Med* Accepted.
- Chang, Y.C., Chen, C.Y., Chang, F.R., Wu, Y.C.** 2001. Alkaloids from *Lindera glauca*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 48: 811-815.
- Chase, M.W., Morton, C.M., Kallunki, J.A.** 1999. Phylogenetic Relationships of Rutaceae: A Cladistic Analysis of The Subfamilies Using Evidence From RBCL and ATPB Sequence Variation. *American Journal of Natural Products* 86: 1191-1199.
- Chatterjee, A., Sen, R. Ganguly, D.** 1977. Aegelinol, a minor lactonic constituent of *Aegle marmelos*. *Phytochemistry* 17: 328-329.
- Cheng, J.T., Chang, T.K., Chent, I.S.** 1994. Skimmianine and related furoquinolines function as antagonists of 5-hydroxytryptamine receptors in animals. *Journal of Autonomic Pharmacology* 14: 365-374.
- Collins, C. H. & Braga, G. L.** 1988. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 3^a ed. Editora da UNICAMP, Campinas.
- Colonna, A. & Gros, E.G.** 1971. Biosynthesis of skimmianine in *Fagara coco*. *Phytochemistry* 10: 1515-1521.
- Cortez, L.E.R., Cortez, D.A.G., Ferreira, A.G., Vieira, P.C., da Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B.** 2006. Constituintes químicos de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2): 164-169.
- Cortez, L.E.R., Cortez, D.A.G., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Ferreira, A.G., Silva, M.F.G.F.** 2009. New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles* 78: 1-7.
- Cragg, G.M., Newman, D.J.** 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 3670-3695.
- Crews, P., Rodrigues, J., Jaspar, M.** 1998. *Organic Structure Analysis*. Oxford University Press, New York.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O.** 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80: 1144-1152.
- Das, B., Venkataiah, B., Kashinatham, A.** 1999. (+)-Syringaresinol from *Parthenium hysterophorus*. *Fitoterapia* 70: 101-102.

- Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C.** 1998. Cromatografia: um breve ensaio. Química Nova na Escola. 7: 21-25.
- Dreyer, D.L. & Brenner, R.C.** 1980. Alkaloids of some Mexican *Zanthoxylum* species. Phytochemistry 19: 935-939.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I., Lajolo, F.M.** 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. Ciênc. Tecnol. Aliment. 26(2): 446-452.
- Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S.** 2009. Antibacterial and antifungal activity of flindersine from tradicional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. Journal of Ethnopharmacology 123: 494-498.
- Ee, G.C.L., Lim, C.M., Lim, C.K., Rahmani, M., Shaari, K., Bong, C.F.J.** 2009. Alkaloids from *Piper sarmentosum* e *Piper nigrum*. Natural Products Research 23(15): 1416-1423.
- El-Hassan, A., El-Sayed, M., Hamed, A.I., Rhee, I.K., Ahmed, A.A., Zeller, K.P., Verpoort, R.** 2003. Bioactive constituents of *Leptadenia arborea*. Fitoterapia 74: 184-187.
- Ernst, M., Silva, D.B., Silva, R.R., Vêncio, R.Z.N., Lopes, N.P.** 2014. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. Natural Products Reports 31: 784-806.
- Eugster, P. J.; Guillaume, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.; Carrupt, P. A.; Wolfender, J. L.** 2011. Ultra high pressure liquid chromatography for crude plant extract profiling. Journal of AOAC International, v. 94, p. 51-70.
- Falkenberg, M.B., Santos, R.I., Simões, C.M.O.** 1999. Introdução à análise fitoquímica. In: C.M.O. Simões, E.P. Sckenkel, G. Grosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS e UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 163-179.
- Farr, D. F.; Bills, G. F.; Chamuris, G. P.; Rossman, A. Y.** 1989. *Fungi on Plant and Plant Products in the United States*; American Phytopathological Society Press, 1252 pp.
- Fukuda, N., Yonemitsu, M., Kimura, T.** 1983. Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. I. N-trans and N-cis-feruloyltiramine, and a new phenolic glucoside, tinotuberide. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 31(1): 156-161.

- Ge, F.; Tang, C.; Ye, Y.** 2008. Lignanamides and sesquiterpenoids from stems of *Mitrephora thorelii*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 91, p. 1023-1030, 2008.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteudo de metabolitos secundarios. *Quimica Nova* 30: 374-381.
- Gottlieb, O. R., Kaplan, M, A.; Borin, M. R.** 1996. Biodiversidade um Enfoque Quimio-biológico. Editora UERJ, Rio de Janeiro.
- Gözler, B., Rentsch, D., Gözler, T., Ünver, N., Hesse, M.** 1996. Lignans, alkaloids and coumarins from *Haplophyllum vulcanicum*. *Phytochemistry* 42(3): 695-699.
- Grata, E., Boccard, J., Guillarme, D., Glauser, G., Carrupt, P.A., Farmer E.E., Wolfender, J.L., Rudaz, S.** 2008. UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Chromatography B* 871(2): 261.
- Groppo, M., Pirani, J.R., Salatino, M.L.F., Blanco, S.R, Kallunki, J.A.** 2008. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany* 95: 985-1005
- Guedes, M.L.S., Batista, M.A., Ramalho, M., Freitas, H.M.B., Silva, E.M.** 2005. Breve incursão sobre a biodiversidade da Mata Atlântica. *In: C.R. Franke, P.L.B. Rocha, W. Klein, S.L. Gomes (orgs.). Mata Atlântica e Biodiversidade*. Edufba, Salvador, pp. 37-92.
- Guillarme, D.; Grata, E.; Glauser, G.; Wolfender, J. L.; Veuthey, J. L.; Rudaz, S.** 2009. Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic and gradient modes using small particles size and ultra-high pressure. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 3232-3243.
- Gulcin I., Buyukokuroglu M.E., Oktay M., Kufrevioglu O.I.** 2002. On the in vitro antioxidant properties of melatonin. *Journal of Pineal Research* 33: 167-171.
- Hashimoto, T. & Yamada, Y.** 1994. Alkaloid Biogenesis: Molecular Aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 257-285.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. & Williamson, E.M.** 2004. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, 1ed. Churchill Livingstone, London.
- Henkel, T., Brunne, R.M., Müller, H., Reichel, H.** 1999. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie* 38(5): 643-647.

- Henriques, A.T., Limberger, R.P., Kerber, V.A., Moreno, P.R.H.** 1999. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: C.M.O. Simões, E.P. Sckenkel, G. Grosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS e UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 765-791.
- Hifnawy, M.S., Vaquette, J., Sévenet, T., Pousset, J-L., Cavé, A.** 1977. Produits et alcaloides de *Myrtopsis macrocarpa*, *M. myrtoidea*, *M. novae-caledoniae* et *M. selligii*. Phytochemistry 16: 1035-1039.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxi substances. Journal of Chromatography 51: 327-329.
- Hostettamn, K., Marston, A.** 2007. The search for new drugs from higher plants. Chimia 61: 322-326.
- Hostettmann, K., Potterat, O., Wolfender, J-L.** 1998. The potential of higher plants as a source of new drugs. Chimia 52: 10-17.
- Hostettmann, K., Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frek, E.** 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis 2: 199-203.
- Hostettamn, K., Terraux, C., Marston, A., Potterat, O.** 1997. The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. Journal of Planar Chromatography 10: 251-257.
- Hostettmann, K., Wolfender J.-L., Terreaux, C.** 2001. Modern screening techniques for plant extracts. Pharmaceutical Biology 39, 18–32.
- Hu, C. Q., Li, K. K., Yang, X. W.** 2012. New glycosidic alkaloid from the nearly ripe fruits of *Euodia rutaecarpa*. J Asian Nat Prod Res 14, 634-639.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem 53(6), 1841-1856.
- Huie, C.W.** 2002. A review of modern simple-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plantas. Analytical and Bioanalytical Chemistry 373: 23-30.
- Jackson, G.E., Campbell, W.E., Davidowitz, B.** 1990. Two dimensional NMR study of 8-methoxyflindersina, skimmianine and monocrotaline. Spectroscopy Letters 23(8): 971-982.

- Jadhav, H.R., & Bhulani, K.K.** 2002. Antioxidant properties of Indian medicinal plants. *Phytoterapy Research* 16: 771-773.
- Jansen, O., Akhmedjanova, V., Angenot, L., Balansard, G., Chariot, A., Ollivier, E., Tits, M., Frédérich, M.** 2006. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss for their cytotoxic properties. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 241-245.
- Jarmusch, A.K. & Cooks, R.G.** 2014. Emerging capabilities of mass spectrometry for natural products. *Natural Products Reports* 31: 730-738.
- Jeong, Y.H., Chung, S.Y., Han, A-R., Sung, M.K., Jang, D.S., Lee, J., Kow, Y., Lee, H.J., Seo, E-K.** 2007. P-glycoprotein inhibitory activity of two phenolic compounds (-)-syringaresinol and triclinic acid from *Saxifraga borealis*. *Chemistry & Biodiversity* 4: 12-16.
- Kallunki, J. & Pirani, J.R.** 1998. Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae). *Kew Bulletin* 53: 257-334.
- Karim, A., Fatima, I., Hussain, S., Malik, A.** 2011. Dimorphamides A – C, New polyphenolic amides from *Atriplex dimorphostegia*. *Helvetica Chimica Acta* 94: 528-533.
- Kaufmann, B. & Christen, P.** 2002. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis* 13: 105-113.
- Kelen, M. & Tepe, B.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99: 4096-4104.
- Kikvidze, I.M., Bessonova, I.A., Mudzhiri, K.S., Yunusov, S.Y.** 1971. Alkaloids of *Dictamnus caucasicus*. *Chemistry of Natural Compounds* 7(5): 659-660.
- Kim, K.H.; Moon, E.; Kim, S.Y.; Lee, K.R.** 2010. Lignans from the tuber-barks of *Colocasia antiquorum* var. *esculenta* and their antipigmentogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4779-4785.
- Kim, K.H.; Moon, E.; Kim, S.Y.; Choi, S.U.; Lee, K.R.** 2012. Lignan constituents of *Tilia amurensis* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 3680-3686.
- Kim, K.H.; Moon, E.; Kim, H.K.; Oh, J.Y.; Kim, S.Y.; Choi, S.U.; Lee, K.R.** 2012. Phenolic constituents from the rhizomes of *Acorus gramineus* and their biological

- evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, p. 6155-6159, 2012.
- Kim, Y., Han, M.S., Lee, J.S., Kim, J., Kim, Y.C.** 2003. Inhibitory Phenolic Amides on Lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells from *Beta vulgaris* var. *cicla* seeds. *Phytotherapy Research* 17: 983-985.
- Kim, S.S.; Hyun, C.; Choi, Y.H.; Lee, N.H.** 2013. Tyrosinase inhibitory activities of the compounds isolated from *Neolitsea aciculata* (Blume) Koidz. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 28, p. 685-689.
- King, R.R., Calhoun, L.A.** 2005. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochemistry* 66: 2468-2473.
- Kuo, W.L., Huang, Y.L., Wang, S.T., Ni, C.L., Shien, B.J., Chen, C.C.** 2007. Chemical constituents of *trema orientalis*. *Journal of Chinese Medicine* 18: 27-36.
- Kutchan, T.M.** 2001. Ecological arsenal and development dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* 125: 58-60.
- Lee, S.H., Son, J.K., Jeong, B.S., Jeong, T.C., Chang, H.W., Lee, E.S., Jahng, Y.** 2008. Progress in the studies on Rutaecarpine. *Molecules* 13: 272-300.
- Leite, M.P., Fassin, J., Bazilonni, E.M.F., Almeida, R.N., Mattei, R., Leite, J.R.** 2008. Behavioral Effects of Essential Oil of *Citrus aurantium* L. Inhalation in Rats. *Brazilian Journal of Farmacognosy* 18 (Supl.): 661-666.
- Lewinsonhn, T.M. & Prado, P.I.** 2002. Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual de conhecimento. 1^a ed. Editora Pinsky, São Paulo.
- Li, N., Wu, J., Hasegawa, T., SAKAI, J., Bai, L., Wang, L., Kakuta, S., Furuya, Y., Ogura, H., Kataoka, T.** 2007. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. *Journal of Natural Products* 70: 544-548.
- Liu, Z. Q.** 2010. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. *Chemical Reviews*. 110(10): 5675-5691.
- Mafezoli, J., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Albuquerque, S.** 2000. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 335-340.

- Mamede, M.C.H., Cordeiro, I., Rossi, L., Melo, M.M.R.F., Oliveira, R.J.** 2004. Mata Atlântica. In: O.A.V. Marques, W. Duleba (eds.). Estação Ecológica Jureia-Itatins. Ambiente Físico, Flora e Fauna. Holos, Ribeirão Preto, pp. 115-132.
- Mariano, A. F. S.; Freitas, P. A. A.; Ramalho, V. L. A.; Couto, J. A.** 2010. Cromatografia de aminoácidos em papel em aulas práticas de bioquímica. JEPEX 2010 – UFRPE: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. 18 a 22 de outubro.
- Marr, K.A., Carter, R.A., Crippa, F., Wald, A., Corey, L.** 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 34(7): 909–917.
- Marston, A., Hostettman, K.** 2009. Natural products over the last decades. *Planta Medica* 75: 672-678.
- Metz, T.O., Page, J.S, Baker, E.S., Tang, K., Ding, J., Shen, Y., Smith, R.D.** 2008. High Resolution Separations and Improved Ion Production and Transmission in Metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*. *TrAC* 27(3): 205-214.
- Miguel, M. G.** 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*. 25: 291–312.
- Mizuta, M., Kanamori, H.** 1985. Mutagenic activities of dictamnine and γ -fagarine from *Dictamni radices cortex* (Rutaceae). *Mutation Research* 144: 221-225.
- Molyneux, P.** 2004. The use of the stable free radical di-phenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
- Monteiro, M.C.M., Leptokarydis, I.H., Silva, G.H., da Silva, V.C., Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Lopes, M.N.** 2007. Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). *Ecletica Química* 32(3): 13-17.
- Moraes, V.R.S., Tomazela, D.M., Ferracin, R.J., Garcia, C.F., Sannomiya, M., Soriano, M.P.C., da Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Filho, E.R., Magalhães, E.G., Magalhães, A.F., Pimenta, E.F., Souza, D.H.F., Oliva, G.** 2003. Enzymatic studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinolone alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society* 14(3): 380-387.
- Mori, S.M., Boom, B.M., Prance, G.T.** 1981. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia* 33: 233-245.

- Montanari, C.A. & Bolzani, V.S.** 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova* 24(1): 105-111.
- Muñoz, M., Torres, R., Cassels, B.K.** 1982. Aurapten and flindersina from *Zanthoxylum coco*. *Journal of Natural Products* 45(3): 367-369.
- Muyard, F., Bevalot, F., Laude, B., Vaquette, J.** 1992. Alkaloids from stem bark of *Dutailleya baudouinii*. *Phytochemistry* 31(3): 1087-1089.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 430: 853-858.
- Nazrullaev, S.S., Bessonova, I.A., Akhmedkhodzhaeva.** 2001. Estrogenic activity as a function of chemical structure in *Haplophyllum* quiniline alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds* 37(6): 551-555.
- Newman, D.J., Cragg, G.M.** 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75: 311-335.
- Nguyen, D.T.T., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J.L.** 2006. Fast analysis in liquid chromatography using small particles size and ultra high pressure. *Journal of Separation Science* 29: 1836-1848.
- Nugroho, A.E., Riyanto, S., Sukari, M.A., Maeyama, K.** 2010. Effects of skimmianine, a quinolone alkaloid of *Aegle marmelos* correa roots, on the histamine release from rat mast cells. *Journal of Basic and Applied Sciences* 6(2): 141-148.
- Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Harries, D., Hale, A.L., Aliotta, G., Duke, S.O.** 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 890-896.
- Ong, E., Woo, S., Yong, Y.** 2002. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medical plants. *Journal of Chromatography A* 313: 57-64.
- Ouyang M.A., Wein, Y.S., Zhang, Z.K. Kuo, Y.H.** 2007. Inhibitory activity against Tobacco Mosaic virus (TMV) replications of pinoresinol and syringaresinol lignans and their glycosides from the root of *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. *Journal of Agricultural Chemistry* 55: 6460-6465.
- Park, B.Y., Oh, S.R., Ahn, K.S., Kwon, O.K., Lee, H.K.** 2008. (-)-Syringaresinol inhibits proliferation of human promyelocytic HL-60 leukemia cells via G1 arrest and apoptosis. *International Immunopharmacology* 8: 967-973.

- Petersson, P., Frank, A., Heaton, J., Euerby, M.R.** 2008. Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 31: 2346-2357.
- Pietta, P.G.** 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7) 1035-1042.
- Pinto, A.C., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Lopes, N.P., Epifanio, R.A.** 2002. Produtos Naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova* 25(1): 45-61.
- Pino, J.A., Marbot, R., Payo, A., Chao, D., Herrera, P.** 2006. Aromatic plants from western Cuba VII. Composition of the leaf oils of *Psidium wrightii* Krug et Urb., *Lantana involucrata* L., *Cinnamomum montanum* (Sw.) Berchtold et J. Persl. And *Caesalpinia violacea* (Mill.) Standley. *Journal of Essential oil Research* 18: 170-174.
- Pirani, J.R.** 2002. Conchocarpus J.C. Mikan. In: M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, A.M. Giulietti, T.S. Melhem, V. Bittrich, C. Kameyama (eds.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Hucitec, São Paulo, pp. 284-285.
- Pirani, J.R. & Groppo M.** 2010. Rutaceae in *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 1591-1593.
- Pompella, A.** 1997. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* 67(5): 289-297.
- Pratt, D.E., Miller, E. E.** 1984. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogaea*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61(6): 1064-1067.
- Rahman, A.U., Bhatti, M.K., Akhtar, F., Choudhary, M.I.** 1992. Alkaloids of *Fumarica indica*. *Phytochemistry* 31(8): 2869-2872.
- Rahman, M.M., Khan, M.A.** 2013. Anti-cancer potential of South Asian plants. *Natural Products Bioprospect* 3: 74-88.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.D., Ripoll, C., Yakoby, N., O'neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B.** 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20(12): 522-531.
- Rates, S.M.K.** 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-623.
- Razakova, D.M., Bessonova, A., Yunusov, S.Y.** 1983. The structure of perfamine. *Chemistry of Natural Compounds* 19(2): 245.

- Razavi, S.M., Imanzadeh, G., Jahed, F.S., Zarrini, G.** 2013. Pyranocoumarins from *Zosima absinthifolia* (Vent) Link Roots. Russian Journal of Biorganic Chemistry 39(2): 215-217.
- Ribeiro, C.V.C & Kaplan, M.A.C.** 2002. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em ANGIOSPERMAE. Química Nova 25: 533-538.
- Ribeiro, T.A.N., Ndiaye, E.A.S., Veloso, E.S., Vieira, P.C., Ellena, J., Júnior, P.T.S.** 2005. Limonoids from *Spirathera odoratissima* St. Hil. Journal of the Brazilian Chemical Society 16: 1347-1352.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L.** 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. Analytical Chemistry 68: 1033-1039.
- Roberson, A.V.** 1963. The proton magnetic resonance of furoquinoline alkaloids and related compounds. Aust. J. Chem. 16: 451-458.
- Rosselli, S., Maggio, A.M., Faraone, N., Spadaro, V., Morris-Natschke, S.L., Bastow, K.F., Lee, K.H., Bruno, M.** 2009. The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol. Natural Products Communications 4(12): 1701-1706.
- Rouhi, A.M.** 1997. Land mines: horrors begging for solutions. Chemistry & Engineering News 75(10): 14-22.
- Sable, C.A., Strohmaier, K.M., Codakewitz, J.A.** 2008. Advances in antifungal therapy. The Annual Review of Medicine 59: 361-379.
- Sakakibara, I., Ikeya, Y., Hayashi, K., Okada, M., Maruno, Masao.** 1995. Three acyclic bis-phenylpropane lignanamides from fruits of *Cannabis sativa*. Phytochemistry 38(4): 1003-1007.
- Sandra, P. & Bicchi, C.** 1987. Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Huething. New York.
- Santana, L.L.B., Cardoso, L.A., Druzian, J.I., Souza, V.F., Costa, T.A.C., Nóbrega, D.A., Hohlemwerger, S.V.A., Velozo, E.S.** 2006. Selectivity in the extraction of 2-quinolone alkaloids with supercritical CO₂. Brazilian Journal of Chemical Emgineering 23(4): 525-530.
- Santos, A.S., Alves, S.M., Figueiredo, F.J.C. & Neto, O.G.R.** 2004. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado técnico 99. Belem. Embrapa Amazonia Oriental.

- Santos, L.P.; Boaventura, M.A.D.; Oliveira, A.B.; Cassady, J.M.** 1996. Grossamide and *N-trans*-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* seeds. *Planta Medica*, v. 62, p. 76.
- Sarikaya, B.B.; Kaya, G.I.; Onur, M.A.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Some, N.U.** 2012. Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. *Phytochemistry Letters*, v. 5, p. 367-370, 2012.
- Schimmer, O., Leimeister, U.** 1989. The otency of the furoquinoline alkaloid, γ -fagarine, and γ -fagarine-containing tincture from *Rutae herba* in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 4(6): 467-470.
- Seca, A.M.L.; Silva, A.M.S.; Silvestre, A.J.D.; Cavaleiro, J.A.S.; Domingues, F.M.J.; Pascoal Neto, C.** 2001. Lignanamides and other phenolic constituents from the bark of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Phytochemistry* 58: 1219-1223.
- Shakirov, R., Telezhenetskaya, M.V., Bessonova, I.A., Aripova, S.F., Israilov, I.A., Sultankhodzhaev, N., Vinogradova, V.I., Akhmedzhanova, V.I., Tulyaganov, T.S., Salimov, B.T., Tel'nov, V.A.** 1996. Alkaloids. Plants, structures, properties. *Chemistry of Natural Compounds* 32(3): 386-512.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K.** 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113: 1202-1205.
- Song, S.; Li, Y.; Feng, Z.; Jiang, J.; Zhang, P.** 2010. Hepatoprotective constituents from the roots and stems of *Erycibe hainanesis*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 177-184.
- Souza, A.** 2009. Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Botânica). Universidade de São Paulo – Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, São Paulo, 351 p.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2008. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II. 2^a ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, pp. 485-490.
- Staudt, M. & Bertin, N.** 1998. Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment*. 21: 385-395.
- Stermitz, F.R. & Sharifi, I.A.** 1977. Alkaloids of *Zanthoxylum monophyllum* and *Z. punctatum*. *Phytochemistry* 16: 2003-2006.

- Stöcklin, W., De Silva, L.B., Geissman, T.A.** 1969. Constituents of *Holacantha emoryi*. *Phytochemistry* 8(8): 1565-1596.
- Strege, M.A.** 1999. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *Journal of Chromatography B* 725: 67-78.
- Sun, J., Zhang, F., Yang, M., Zhang, J., Chen, L., Zhan, R., Li, L., Chen, Y.** 2014. Isolation of α -glucosidase inhibitors including a new flavonol glycoside from *Dendroium devonianum*. *Natural Product Research* 28(21): 1900-1905.
- Sussel, A.A.B.** 2005. Caracterizacao de Isolados de Colletotrichum lagenarium, agente causal da antracnose das cucurbitaceas. Piracicaba, 68p. Dissertacao (Mestrado em Agronomia) Setor de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de Sao Paulo.
- Syu, W.J., Don, M.J., Lee, G.H., Sun, C.M.** 2001. Cytotoxic and novel compounds from *Solanum indicum*. *Journal of Natural Products* 64: 1232-1233.
- Tabopda, T.K., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine-Offer, A.C., Tanoli, S.A.K., Khan, S.N., Ali, M.S., Ngadjui, B.T., Tsamo, E., Lacaille-Dubois, M.A., Luu, B.** 2008. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry* 69: 1726-1731.
- Taveria, F.S.N., Andrade, E.H.A., Lima, W.N., Maia, J.G.S.** 2003. Seasonal Variation in the Essential Oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 27-31.
- Treeratanapiboon, L., Worachartcheewan, A. Suksrichavalit, T., Kiatfuengfoo, R., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V.** 2011. Bioactive 4-hydroxycinnamide and bioactivities of *Polyalthia cerasoides*. *Excli Journal* 10: 16-22.
- Tsai, I.L., Wu, S.J., Ishikawa, T., Seki, H., Yan, S.Y., Chen, I.S.** 1995. Evomerrine from *Melicope semecarpifolia*. *Phytochemistry* 40(5): 1561-1562.
- Ueng, Y.F., Yu, H.J., Lee, C.H., Peng, C., Jan, W.C., Ho, L.K., Chen, C.F., Don, M.J.** 2005. Identification of the microsomal oxidation metabolites of rutaecarpine, a main active alkaloid of the medicinal herb *Evodia rutaecarpa*. *Journal of Chromatography A* 1076: 103-109.
- Ueng, Y.F., Don, M.J., Jan, W.C., Wang, S.Y., Ho, L.K., Chen, C.F.** 2006. Oxidative metabolism of the alkaloid rutaecarpine by human cytochrome P450. *Drug Metabolism and Disposition* 34(5): 821-827.

- Ulubelen, A.** 1984. Alkaloids from *Haplophyllum suaveolens*. *Phytochemistry* 23(9): 2123-2124.
- Ulubelen, A., Mericli, A.H., Mericli, F., Sonmez, U., Ilarslan, R.** 1993. Alkaloids and coumarins from *Haplophyllum thesioides*. *Natural Product Letters* 1(4): 269-272.
- Verpoorte, R.** 2000. Secondary metabolism. In: Verpoorte, R. & Alfermann, A.W. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, London, pp.1-29.
- Viegas-Jr, C., Bolzani, V.S. & Barreiro, E.J.** 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova* 29(2): 326-337.
- Vieira, P.C., Kubo, I., Kujime, H., Yamagiwa, Y. & Kamikawa, T.** 1992. Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures, and synthesis. *Journal of Natural Products* 55: 1112-1117.
- Wang, H.M. Chou, Y.T., Hong, Z.L., Chen, H.A., Chang, Y.C., Yang, W.L., Chang, H.C., Mai, C.T., Chen, C.Y.** 2010. Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42: 204-211.
- Wang, Y.H.; Samoylenko, V.; Tekwania, B.L.; Khana, I.A.; Millerd, L.S.; Chaurasiya, N.D.; Rahmana, M.M.; Tripathia, L.M.; Khana, S.I.; Joshi, V.C.; Wiggera, F.T.; Muhammada, I.** 2010. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 662-671.
- Wansi, J.D., Mesaik, M.A., Chiozem, D.D., Devkota, K.P., Gaboriaud-Kolar, N., Lallemand, M.C., Wandji, J., Choudhary, M.I., Sewald, N.** 2008. Oxidative burst inhibitory and cytotoxic indoloquinazoline and furoquinoline alkaloids from *Oricia suaveolens*. *Journal of Natural Products* 71: 1942-1945.
- Wattanapiromsakul, C., Forster, P.I., Waterman, P.G.** 2003. Alkaloids and limonoids from *Bouchardatia neurococca*: systematic significance. *Phytochemistry* 64(2): 609-615.
- Waterman, P.G. & Grondon, M.F.** 1975. Alkaloids of the Rutaceae: Their Distribution and Systematic Significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 3: 149-180.
- Wheelwright, E.G.** 1974. *Medicinal Plants and their History*. Dover Publications, New York.

- Wolfender, J.L.; Guillaume, M.; Queiroz, E.F.** 2010. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. *Current Organic Chemistry*, v. 14, p. 1808-1832,
- Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hostettmann, K.** 2001. The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. *Phytochemical Analysis* 11: 1-22.
- Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hostettmann, K.** 2003. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A* 1000: 437-455.
- Wolfender, J.L., Rodriguez, S., Hostettmann, K.** 1998. Liquid chromatography coupled to mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plants constituents. *Journal of Chromatography A* 794: 299-316.
- Wondimu, A., Dagne, E., Waterman, P.G.** 1988. Quinoline alkaloids from the leaves of *Teclea simplicifolia*. *Phytochemistry* 27(3): 959-960.
- Wu, T.S.** 1987. Alkaloids and coumarins of *Skimmia reevesiana*. *Phytochemistry* 26(3): 873-875.
- Xavier, A.F., Bolzani, B.M., Jordão, S.** 2008. Unidades de Conservação da Natureza em São Paulo. In: R.R. Rodrigues, V.L.R. Bononi (orgs.). *Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 24-42.
- Yang, Z.D., Zhang, D.B., Ren, J., Yang, M.J.** 2012. Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Med. Chem. Res.* 21: 722-725.
- Yoshihara, T., Yamaguchi, K., Sakamura, S.** 1983. The relative configuration of grossamide and hordatines. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 47, p. 217-220.
- Yoshihara, T., Yamaguchi, K., Takamatsu, S., Sakamura, S.** 1981. A new lignan amide, grossamide, from bell pepper (*Capsicum annuum* var. grosswn). *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 45, p. 2593-2598.
- Yoshihara, T., Takamatsu, S., Sakamura, S.** 1978. Three new phenolic amides from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 42(3): 623-627.

- Yu, T.W., Anderson, D.** 1997. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research* 379(2): 201-210.
- Zhao, G., Hui, Y., Rupprecht, J.K., McLaughlin, Wood, K.** 1992. Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products* 55(3): 347-356.
- Zhua, J.; Guoa, X.; Fua, S.; Zhang X.; Liang, X.** 2010. Characterization of steroidal saponins in crude extracts from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 462-474.