



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

**CINARA VASCONCELOS DA SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:  
ALCALÓIDES BENZOFENANTRIDÍNICOS E OUTROS  
METABÓLITOS DO CAULE E FRUTOS DE *ZANTHOXYLUM*  
*TINGOASSUIBA* ST. HIL.**

Salvador  
2006

**CINARA VASCONCELOS DA SILVA**

**ALCALÓIDES BENZOFENANTRIDÍNICOS E OUTROS  
METABÓLITOS DO CAULE E FRUTOS DE *ZANTHOXYLUM*  
*TINGOASSUIBA* ST. HIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, área de concentração - Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Salvador  
2006

À minha família, meus colegas de trabalho e  
a Fábio por todo apoio e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

- À Deus.
- Ao Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo pela orientação e amizade.
- À todos os professores de graduação e pós-graduação que contribuíram para minha formação e em particular aos professores Silvio Cunha e Frederico Guaré.
- Aos meus amigos de bancada e de “sofrimento”: Lourenço, Iura, João e Magnólia.
- À Cássia e todos os outros estudantes que passaram pelo LAPEMM: Islane, Daiane, Ferdinando, Ana Paula, Elisângela, Fernanda e Nadja.
- Ao pessoal da farmácia: Elisângela, Elinaldo, Elizete, Claudioney, Marco, Carlos, Edna, Rosa, Eunira, Joana, Alba e Vanuza pelo apoio e amizade.
- À Welington pela compreensão e apoio.
- Aos meus amigos Mariluce, Swami e Sandra, porque a ciência não evolui sem diversão.
- À minha família e agregados, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos.
- Ao meu amor Fábio pela enorme paciência e compreensão.
- Ao CNPq pelo suporte financeiro em parte do mestrado.
- À todos que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

Quero escrever o borrão vermelho de sangue com as gotas e coágulos pingando de dentro para dentro.

Quero escrever amarelo-ouro com raios de translucidez.

Que não me entendam pouco-se-me-dá.

Nada tenho a perder.

Jogo tudo na violência que sempre me povoou, o grito áspero e agudo e prolongado, o grito que eu, por falso respeito humano, não dei.

Mas aqui vai o meu berro me rasgando as profundas entranhas de onde brota o estertor ambicionado.

Quero abarcar o mundo com o terremoto causado pelo grito.

O clímax de minha vida será a morte.

Quero escrever noções sem o uso abusivo da palavra.

Nada tenho mais a perder.

(Clarice Lispector)

## RESUMO

Este estudo teve por objetivo contribuir para caracterização da composição química do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil., espécie popularmente conhecida como casca preciosa, tinguaciba e limão-bravo; e utilizada na medicina popular, como antiespasmódico, relaxante muscular, analgésico, diurético e antiinflamatório.

Um espécime de *Z. tingoassuiba* foi coletado no distrito de Jaíba, município de Feira de Santana – BA e submetido às técnicas de extração convencionais como partição líquido-líquido e cromatografia em colunas de sílica-gel, obtendo-se 14 substâncias dos extratos orgânicos.

A partir dos extratos hexânico e metanólico do caule foram identificados: 2 alcalóides - norqueleritrina e arnotianamida, 1 lignana - sesamina e 4 terpenóides - lupeol,  $\alpha$ -bisabolol, acetato de citronelila e espatulenol.

A extração diclorometânica e metanólica dos frutos possibilitou a caracterização de 5 cumarinas - xanthotoxina, isopimpinina, prenilumbeliferona, imperatorina e aurapteno, 1 protoalcalóide - n-metil-antranilato de metila e 2 esteróides - estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

As estruturas dos compostos isolados ou obtidos em mistura foram determinadas por ultravioleta, espectrometria de massas e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , comparados com dados da literatura.

As cumarinas lineares e os alcalóides benzofenatrídínicos são freqüentemente associados com as Rutaceae mais primitivas, as proto-Rutaceae (os gêneros *Zanthoxylum*, *Phellodendron* e *Tetradium*) e podem ser considerados marcadores quimiotaxômicos deste grupo. O perfil químico da *Zanthoxylum tingoassuiba* estudada, portanto, se assemelha com outras espécies do gênero, bem como da família Rutaceae.

Palavras-chave: Rutaceae; *Zanthoxylum*, alcalóides benzofenatrídínicos, cumarinas

## ABSTRACT

The objective of this study was to contribute for characterization of the chemical composition of stems and fruits of *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil., species popularly known as precious bark, tinguaciba and lemon-brave; and it is used in the popular medicine as muscle relaxant, analgesic, diuretic, antispasmodic and antiinflammatory. A specimen of *Z. tingoassuiba* St. Hil. was collected in the district of Jaíba, city of Feira de Santana - BA and submitted to the conventional techniques of extraction as liquid-liquid partition and silica-gel column's chromatography, obtaining 15 substances of organic extracts. From hexanic and methanolic extracts of stem had been identified: 2 alkaloids - norchelerythrine and arnottianamide, 1 lignan - sesamin and 3 terpenoids - lupeol,  $\alpha$ -bisabolol, citronellyl acetate and espatulenol. The dichlorometanic and methanolic extraction of the fruits allowed the characterization of 5 coumarins - xanthotoxin, isopimpinelin, o-prenilumbelliferone, imperatorin and auraptin, 1 protoalkaloid - methyl N-methylanthranilate and 2 steroids - estigmasterol and  $\beta$  - sitosterol. The structures of the compounds were elucidated by ultraviolet, mass spectrometry and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, compared with data of literature. The linear coumarins and the benzophenantridines alkaloids are frequently associates with the Rutaceae most primitive, proto-Rutaceae (the genera *Zanthoxylum*, *Phellodendron* and *Tetradium*) and can be considered chemotaxonomics markers of this group. The chemical profile of the studied *Zanthoxylum tingoassuiba*, therefore, it is similar with other species of the genera, as well as of the Rutaceae family.

Keywords: Rutaceae; *Zanthoxylum*; benzophenantridines alkaloids; coumarins.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$	deslocamento químico
ATP	trifosfato de adenosina
°C	grau centígrado
CC	cromatografia em coluna
CLC	cromatografia líquida clássica
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
cm	centímetro
CTP	trifosfato de citosina
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAPP	difosfato de dimetilalila (pirofosfato de dimetilalila)
$E_2$	eliminação bimolecular
Enz	enzima
EPSP	ácido 3-fosfato-3-enolpiruvilchiquímico
Esq.	esquema
f.	folha
Fig.	figura
FPP	difosfato de farnesila
GPP	difosfato de geranila (pirofosfato de geranila)
g.	grama
grad.	Gradiente
HMG-CoA	$\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril coenzima A
HSCoA	coenzima A
IPP	difosfato de isopentenila (pirofosfato de isopentenila)
hex.	hexano
Hz	hertz
<i>J</i>	constante de acoplamento (em Hz)
Kg	quilograma
KI	iodeto de potássio
L-Gln	glutamato
L-Phe	fenilalanina
LPP	difosfato de linalila
L-Ser	serina
L-Trp	triptofano
L-Tyr	tirosina
<i>m</i>	multiplete
m/v	massa por volume
Me	metila
mg	miligrama
MHz	megahertz
min.	minutos
mL	mililitros
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro

MVA	ácido mevalônico
NAD	dinucleotídeo adenina nicotinamida
NADPH	fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (reduzido)
Nerolidil PP	difosfato de nerolidila
nm	nanômetro
NPP	difosfato de nerila
p.	página
PAL	fenilalanina amônia liase
PEP	fosfonolpiruvato
PLP	5-fosfato piridoxal
PP	difosfato
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
s	simpleto
SAM	S-adenosyl metionina
Si-60	sílica-gel 60
S <sub>N</sub> 2	substituição nucleofílica bimolecular
t	tripeto
Tab.	tabela
tiamina PP	difosfato de tiamina (pirofosfato de tiamina)
TMS	tetrametilsilano
T <sub>R</sub>	tempo de retenção
tt	triplo tripeto
v/v	volume por volume
μm	micrômetro
Z.	<i>Zanthoxylum</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig.</b>		<b>f.</b>
1	Exemplos de produtos naturais(1-3) e derivados de produtos naturais utilizados na indústria farmacêutica (4 e 5)	16
2	Diagrama de Dahlgren com a ordem Rutales em destaque (cinza)	23
3	Distribuição geográfica da família Rutaceae em destaque (vermelho)	24
4	Exemplos de estruturas isoladas do gênero <i>Zanthoxylum</i>	26
5	Estruturas já identificadas de estudos anteriores de <i>Z. tingoassuiba</i>	28
6	Formação do ácido corísmico a partir do ácido chiquímico	30
7	Formação do intermediário ácido prefênico a partir do ácido corísmico	30
8	Formação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, a partir do ácido prefênico	31
9	Formação do ácido antranílico, a partir do ácido corísmico	32
10	Formação do aminoácido triptofano, a partir do ácido antranílico	32
11	Exemplos de cumarinas isoladas de Rutaceae de ocorrência regional	33
12	Formação da cumarina umbeliferona, a partir do aminoácido fenilalanina	35
13	Formação do psoraleno (precursor das furanocumarinas)	35
14	Alcalóides isolados em Rutaceae de ocorrência regional	37
15	Formação da dopamina a partir da L-tirosina	40
16	Formação do 4-hidroxifenilacetaldeído a partir da L-tirosina	
17	Biossíntese da protoberberina a partir da dopamina e do 4-hidroxifenilacetaldeído	41
18	Biossíntese da dihidrosanguinarina a partir da protoberberina	42
19	Formação do álcool coniferílico a partir do ácido cinâmico	43
20	Oxidação do álcool coniferílico para a biossíntese de lignanas	44
21	Formação de lignanas a partir do álcool coniferílico oxidado	44
22	Formação de intermediários biossintéticos dos terpenóides -IPP e DMAPP- via ácido mevalônico	45
23	Via alternativa do 5 – fosfato de 1-deoxi-D-xilulose, para a formação do IPP e DMAPP	45
24	Formação de monoterpenos a partir do DMAPP e IPP	46
25	Formação de sesquiterpenos, a partir do intermediário FPP	47
26	Formação de triterpenos, a partir do difosfato de farnesila (FPP)	48
27	Formação de colesterol em vegetais, a partir do cicloartenol	49
28	Formação de estigmasterol e $\beta$ - sitosterol, a partir da molécula do colesterol	50
29	Mapa da Bahia destacando a microrregião de Feira de Santana	51
30	Mapa do município de Feira de Santana – BA	52
31	<i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> St. Hil	52

32	Exsicatas de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> St. Hil. n° 66983 e 67894: Herbário Alexandre Leal Costa (Instituto de Biologia – UFBA)	53
33	Constituintes químicos do extrato metanólico de caule identificados por CG/EM	70
34	Substâncias identificadas nos extratos de caule e frutos de <i>Z. tingoassuiba</i>	71
35	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>1</b>	88
36	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>1</b>	89
37	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>11</b> e <b>12</b>	91
38	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>11</b> e <b>12</b>	92
39	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>10</b>	93
40	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>13</b>	94
41	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>7</b>	96
42	Ampliações do espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>7</b>	97
43	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>8</b>	98
44	Espectro de DEPT-135° da substância <b>8</b>	99
45	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância majoritária <b>9</b> em mistura com <b>8</b>	101
46	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância majoritária <b>9</b> em mistura com <b>8</b>	102
47	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2</b>	103
48	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>2</b>	104
49	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>10</b>	105
50	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>10</b>	106
51	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>18</b> em mistura	107
52	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>3</b>	108
53	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>3</b>	109
54	Cromatograma de íons totais da fração ZTCM óleo (70 eV)	111
55	Espectro de massa da substância <b>6</b>	112

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esq.</b>		<b>f.</b>
1	Gêneros de Rutaceae, posição taxonômica proposta por Engler (1931)	22
2	Espécies de Rutaceae baianas estudadas no LAPEMM, posição taxonômica proposta por Engler (1931)	22
3	Fluxograma dos procedimentos realizados para a obtenção dos extratos hexânico e metanólico do caule de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	54
4	Fluxograma dos procedimentos realizados para a obtenção dos extratos diclorometânico e metanólico dos frutos de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	55
5	Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato hexânico do caule de <i>Z. tingoassuiba</i>	59
6	Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato metanólico de caule de <i>Z. tingoassuiba</i> por CG/EM	61
7	Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato metanólico de caule de <i>Z. tingoassuiba</i>	62
8	Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato diclorometânico de <i>Z. tingoassuiba</i>	64
9	Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato metanólico dos frutos de <i>Z. tingoassuiba</i>	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tab.</b>		<b>f.</b>
1	Inibição da enzima GAPDH pelos extratos de <i>Ertela bahiensis</i> L (%).	19
2	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> comparada da benzofenantridina isolada e o extrato metanólico da raiz	19
3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos do caule de <i>Zanthoxylum stelligerum</i> (Turcz)	20
4	Rendimento dos extratos de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	56
5	Frações do caule de <i>Z. tingoassuiba</i> e suas respectivas massas	56
6	Frações dos frutos de <i>Z. tingoassuiba</i> e suas respectivas massas	56
7	Substâncias e partes do vegetal em que foram extraídas	72
8	Substâncias e frações	72
9	Dados espectroscópicos RMN <sup>13</sup> C da Substância <b>1</b>	90
10	Dados espectroscópicos de RMN <sup>13</sup> C das Substâncias <b>11 e 12</b>	90
11	Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C das Substâncias <b>10 e 13</b>	95
12	Dados espectroscópicos RMN <sup>1</sup> H das Substâncias <b>7, 8 e 9</b>	100
13	Comparação dos dados de RMN da substância <b>3</b> com dados da literatura	110

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
I.1. Produtos Naturais – Algumas Considerações	15
I.2. Objetivos	21
I.2.1. Objetivos gerais	21
I.2.2. Objetivos específicos	21
I.3. Taxonomia de Rutaceae	21
I.4. A família Rutaceae e o gênero <i>Zanthoxylum</i>	24
I.5. <i>Zanthoxylum. tingoassuiba</i> St. Hil.	27
I.6. Biossíntese das principais classes de substâncias encontradas em <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	29
I.6.1. Via do Chiquimato	29
I.6.1.1. Cumarinas	33
I.6.1.2. Alcalóides	36
I.6.1.2.1. Alcalóides benzofenatridínicos	39
I.6.1.3. Lignanas	43
I.6.2. Via do Mevalonato	44
I.6.2.1. Monoterpenos	46
I.6.2.2. Sesquiterpenos	46
I.6.2.3. Triterpenos	47
I.6.2.4. Esteróides	50
<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
II.1. Coleta e identificação do material botânico	51
II. 2. Obtenção dos extratos	53
II.3. Isolamento de constituintes químicos de <i>Z. tingoassuiba</i>	57
II.3.1. Extrato hexânico do caule	57
II.3.2. Extrato metanólico do caule	60
II.3.3. Extrato diclorometânico dos frutos	63
II.3.4. Extrato metanólico dos frutos	65
II.3.5. Testes Biológicos dos extratos brutos e frações de <i>Z.</i>	

<i>tingoassuiba</i>	67
II.4. Reagentes e equipamentos utilizados	68
<b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
III.1. Identificação de substâncias isoladas ou determinadas do caule e frutos de <i>Z. tingoassuiba</i>	70
III.1.1. Terpenóides	73
III.1.2. Esteróides	74
III.1.3. Cumarinas	75
III.1.3. 1. Cumarinas o-preniladas	75
III.1.3. 2. Furanocumarinas	77
III.1.4. Lignanas	79
III.1.5. Alcalóides	80
III.2. Substâncias identificadas por CG/EM	84
III.3. Testes Biológicos	85
<b>IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>86</b>
<b>V. DADOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS</b>	<b>88</b>
V.1. Triterpenóides	88
V.2. Esteróides	91
V.3. Cumarinas	93
V.3.1. Cumarinas O-preniladas	93
V.3.2. Furanocumarinas	96
V.4. Lignanas	103
V.5. Alcalóides	105
V.5.1. Protoalcalóide	105
V.5.2. Alcalóides Benzofenantridínicos	107
V.6. Substâncias identificadas por CG/EM	111
<b>VI. REFERÊNCIAS</b>	<b>113</b>

## **INTRODUÇÃO**

### **I.1. Produtos Naturais – Algumas Considerações**

Há quase 120 anos, Ernst Stahl afirmou que as plantas haviam desenvolvido características morfológicas e químicas como maneira de garantir a sobrevivência das espécies no ecossistema. Três anos depois, Kossel (1891) introduziu os termos metabólitos primários e secundários (Baumann, 2006).

Atualmente, define-se como metabolismo vegetal o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células e pode ser dividido em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário, os processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila (Peres, 2004).

Considera-se como metabolismo secundário, a biossíntese de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides, encontradas em grupos específicos de organismos e que se constituem como uma expressão da individualidade das espécies. Estas substâncias funcionariam como agentes defensivos na luta contra predadores, a exemplo de microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros; ou ainda, como agentes atrativos para polinizadores (Alves, 2001 e Dewick, 2002).

Os metabólitos secundários despertam grande interesse, não somente pelas atividades biológicas produzidas em resposta ao meio ambiente, mas também pela gama de efeitos fisiológicos que exercem nos animais, especialmente mamíferos. São estes efeitos que conferem propriedades terapêuticas aos compostos extraídos de plantas (Alves, 2001 e Robbers, 1996). Devido a sua importância, uma área da química

orgânica foi dedicada ao estudo, a caracterização e isolamento destes metabólitos, denominada de Química de Produtos Naturais (Riveros, 1993).

A Química de Produtos Naturais tem contribuído de maneira significativa no fornecimento de moléculas com aplicações na indústria farmacêutica, de cosméticos, higiene pessoal, agroquímicos e alimentos. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína e cloroquina, ou de fármacos imprescindíveis como vimblastina, vincristina e taxol (Pinto et al, 2002).

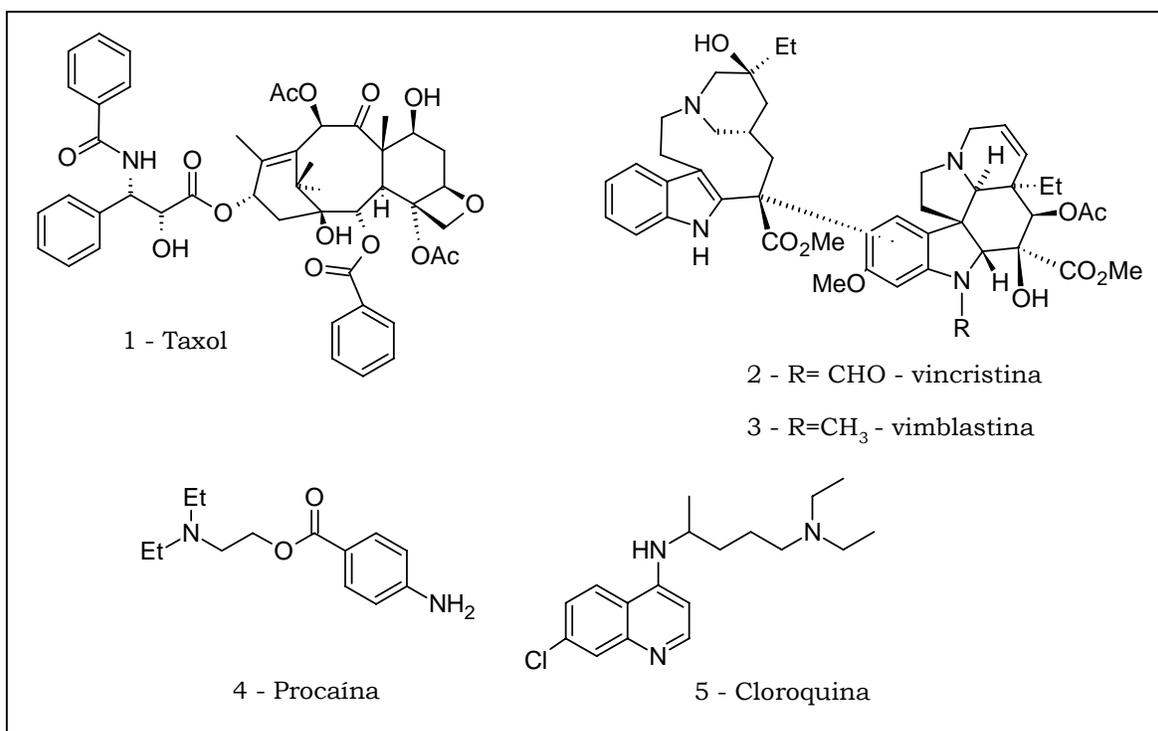


Figura 1- Exemplos de produtos naturais (1-3) e derivados de produtos naturais utilizados na indústria farmacêutica (4 e 5)

De acordo com Alves (2001), nos anos 80 do século XX, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas e vários deles estão incluídos no arsenal terapêutico dos países ocidentais.

No período 1983-1994, 6% dos medicamentos aprovados foram extraídos diretamente de espécies vegetais; outros 24% foram de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos através de modelagem molecular, onde as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores de processos de sínteses químicas. Atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal (Alves, 2001 e Riveros, 1993).

De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de novas drogas (Cragg et al., 1997) e este número não pára de crescer, estima-se que anualmente cerca de 4000 novos compostos de origem vegetal têm sido descritos (Maraschin e Verpoorte, 1999).

Quando se buscam substâncias com atividade biológica de origem natural, as plantas a serem investigadas são selecionadas levando-se em consideração alguns fatores fundamentais, a exemplo de: indicações etnobotânico-farmacológicas, abundância da planta (Filho, 2000) e dados quimiotaxonômicos (Hostettmann et al, 2003).

Entre os diferentes critérios de seleção, a quimiotaxonomia pode conduzir a informações importantes. Algumas classes de substâncias são características de uma família botânica ou de um gênero. Se um produto natural apresenta atividades terapêuticas interessantes, será possível encontrar substâncias análogas em uma espécie do mesmo gênero ou da mesma família (Hostettmann et al, 2003).

De acordo com Hegnauer (1986), a busca por novas fontes de compostos químicos é mais bem sucedida quando a fitoquímica é combinada com uma classificação vegetal adequada e deve-se estar atento para alguns aspectos em estudos quimiotaxonômicos como a variação da distribuição de alguns constituintes vegetais, os diversos papéis ecológicos dos metabólitos secundários e o grande número de ocorrências inesperadas de muitos produtos naturais (apud Freitas, 2001).

Do ponto de vista quimiotaxonômico, a diversidade de produtos naturais está ligada à evolução das plantas e por este motivo as

Angiospermas são detentoras de enorme variedade de metabólitos secundários com atividade biológica (Gottlieb, 1987).

Dentre as plantas floridas, muitos estudos têm sido realizados com Rutaceae, devido sua distribuição limitada, biogênese razoavelmente definida, além da diversidade de micromoléculas já descritas (Gray, 1983). Gibbs (1974) afirma que a família é muito bem caracterizada como um todo pela variedade de alcalóides e cumarinas que apresenta (apud Pirani, 1999), substâncias estas que apresentam potencial bioatividade.

Por estas razões, durante os últimos oito anos, várias espécies de Rutaceae de ocorrência no estado Bahia têm sido objeto de estudo no Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (LAPEMM) da Faculdade de Farmácia - UFBA, a exemplo de *Zanthoxylum stelligerum*, pertencente à sub-tribo Zanthoxylae e *Andreodoxa flava*, *Ertela bahiensis* e *Spirantera odoratissima*, pertencentes à sub-tribo Galipeineae. Destes vegetais, foram isolados e identificados alcalóides furoquinolínicos, acridônicos, 2-quinolônicos e benzofenantridínicos, além de cumarinas preniladas, esteróides, lignanas e terpenóides. Alguns destes extratos e substâncias puras tiveram suas propriedades biológicas avaliadas frente às cepas padrão e isolados clínicos de bactérias e fungos (Reis *et al*, 2002), além da avaliação na atividade inibitória da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi* (Lima *et al*, 1998).

Tabela 1 - Inibição da enzima GAPDH pelos extratos de *Ertela bahiensis* L (%).

Extratos	Concentração do extrato ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	100	200
Partes aéreas - $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	17,1	35,5
Raízes - $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	35,8	81,8
Caules - hexano	1,8	12,7
Partes aéreas - Hexano	11,0	0
Caules - $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	17,6	45,6
Raízes - MeOH	6,2	3,5
Partes aéreas - MeOH	15,8	5,2
Raízes - Hexano	45,2	97,3

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana *in vitro* comparada da benzofenantridina isolada e o extrato metanólico da raiz de *Zanthoxylum stelligerum* Turcz

Cepas	Diidroqueleritrina					Extrato metanólico da raiz				
	$\times 10^3$			Controle		$\times 10^3 \mu\text{g/disco}$			Controle	
	1	2	3	C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>	1	2	3	C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>
<i>Candida albicans</i> <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	9	12	13	18	-
<i>Candida albicans</i> <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	8	9	11	20	-
<i>Candida tropicalis</i> <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	12	14	16	17	-
<i>Candida guilhermondii</i> <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	8	10	12	18	-
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>1</sup>	16	17	17	30	-	10	12	14	31	-
<i>Micrococcus luteus</i> <sup>1</sup>	21	21	19	35	-	12	15	19	35	-
<i>Streptococcus mutans</i> <sup>2</sup>	10	12	12	37	-	-	7	8	36	-
<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>2</sup>	13	14	14	25	-	8	9	11	25	-
<i>Streptococcus Grupo C</i> <sup>2</sup>	9	9	10	8	-	-	-	-	-	-

<i>Rhodococcus equi</i> <sup>2</sup>	7	9	9	8	-	-	-	-	7	-
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	13	13	16	33	-	-	-	-	32	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>1</sup>	-	-	-	29	-	-	-	-	30	-
<i>Salmonella cholerae suis</i> <sup>1</sup>	-	-	-	30	-	-	-	-	31	-

**C<sup>+</sup> para bactérias: Tetraciclina e Gentamicina (100µg), ; C<sup>+</sup> para leveduras: Cetoconazol (1000µg); C<sup>-</sup> : solvente da solução teste (100µL/disco); (-) nenhum halo observado; 1 – Amostras ATCC; 2 – Isolados de material clínico; Resultados expressos em mm.**

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos do caule de *Zanthoxylum stelligerum* (Turcz)

Cepas	Extrato metanólico do caule					Extrato clorofórmico do caule				
	x10 <sup>3</sup>			Controle		x10 <sup>3</sup> µg/disco			Controle	
	1	2	3	C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>	1	2	3	C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>1</sup>	7	7	7	30	-	9	9	10	31	-
<i>Micrococcus luteus</i> <sup>1</sup>	-	-	-	36	-	-	-	-	36	-
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	-	-	-	33	-	-	-	-	33	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>1</sup>	-	-	-	30	-	-	-	-	30	-
<i>Salmonella cholerae suis</i> <sup>1</sup>	-	-	-	30	-	-	-	-	31	-

**C<sup>+</sup> : Tetraciclina e Gentamicina (100µg); C<sup>-</sup> : solvente da solução teste (100µL/disco); (-) nenhum halo observado; 1 – Amostras ATCC; Resultados expressos em mm**

## **I.2. OBJETIVOS DO ESTUDO**

### **I.2.1. Objetivos Gerais**

- Estudar a composição química das micromoléculas majoritárias presentes em espécies de Rutaceae nativas da Bahia;
- Contribuir para a quimiotaxonomia do gênero *Zanthoxylum*;
- Prospecção de substâncias bioativas.

### **I.2.2. Objetivos Específicos**

- Isolar, identificar e determinar a estrutura das substâncias presentes nos extratos de caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* St.Hil.;
- Comparar a composição química da *Z. tingoassuiba* baiana com estudos anteriores;
- Avaliar o potencial antioxidante e antibiótico dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas de *Z. tingoassuiba*.

## **I.3. Taxonomia de Rutaceae**

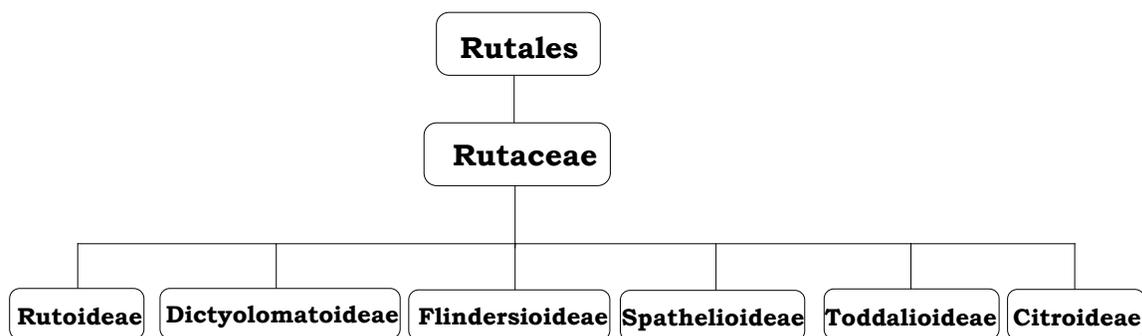
A primeira e mais completa classificação taxonômica, em relação à família das Rutaceae (Waterman, 1990), foi proposta por Engler em 1931 e apresenta os caracteres morfológicos, anatômicos, distribuição da família e divisão taxonômica.

Em 1964, o sistema formal proposto por Engler sofreu modificações por Scholz, baseadas nas estruturas morfológicas de flores e frutos, histologia e hábitos, além da divisão das famílias em subfamílias (Pirani, 1999).

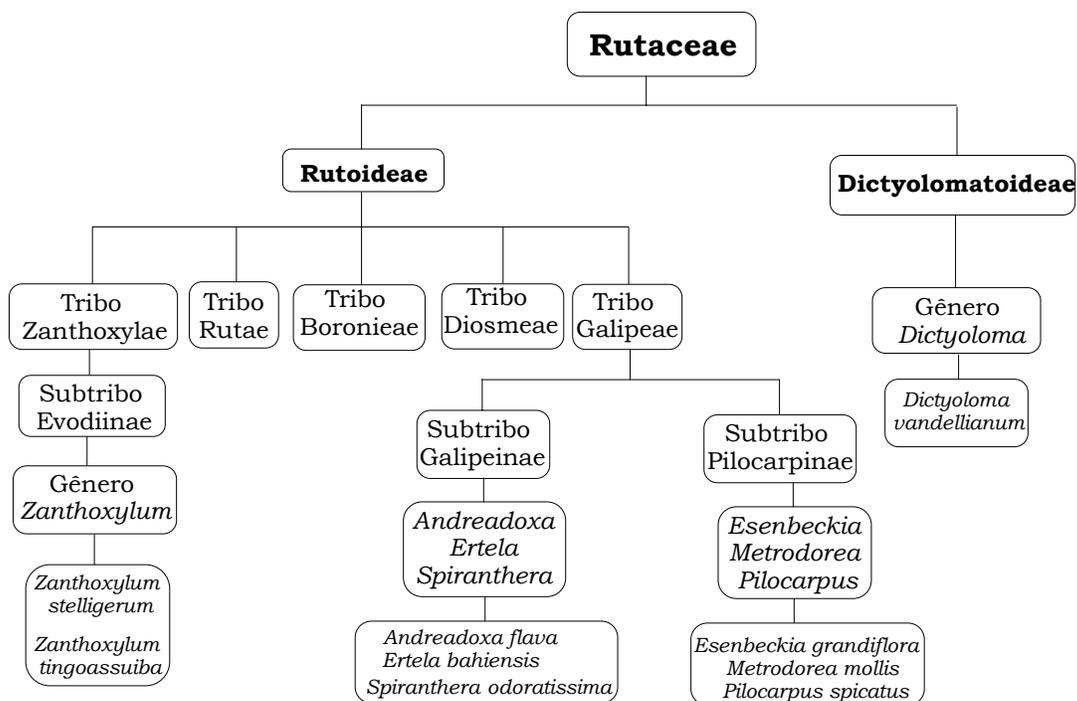
De acordo com Scholz, as Rutaceae encontram-se divididas em 6 subfamílias, das quais, as principais são: Rutoideae, a maior delas com cerca de 100 gêneros e 1209 espécies; Citroideae e Toddalioideae. A

subfamília Rutoideae apresenta 5 tribos: Zanthoxylae, Boronieae, Ruteae, Cusparieae e Diosmeae; e 17 subtribos (Pirani, 1999) (esquema 1).

Atualmente, o sistema de Dahlgren (figura 2) é considerado o sistema preferido pelos químicos de produtos naturais (Veloza, 1996) e classifica a família Rutaceae na superordem Rurales. Este sistema se baseia em características morfológicas, geográficas e químicas, como a distribuição dos alcalóides, cumarinas, flavonóides, lignanas e limonóides nos gêneros (Silva, M.F.G.F et al, 1988).



Esquema 1. Sub-famílias de Rutaceae, posição taxonômica proposta por Engler (1931)



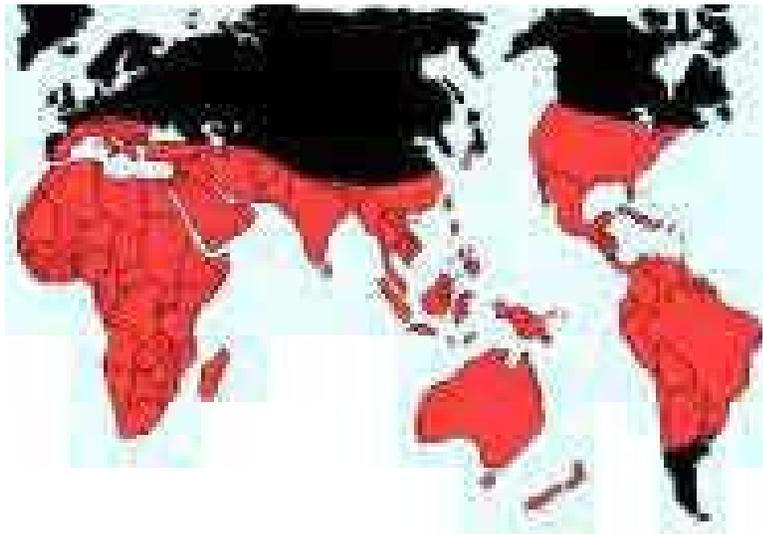
Esquema 2. Espécies de Rutaceae baianas estudadas no LAPEMM, posição taxonômica proposta por Engler (1931)



#### I.4. A família Rutaceae e o gênero *Zanthoxylum*

A família Rutaceae possui cerca de 150 gêneros com aproximadamente 1500 espécies largamente distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do mundo todo, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália. (Pirani, 1999). É considerada a mais primitiva da ordem Rurales, em relação a sua morfologia e composição química (Waterman, 1983) e, no Brasil, está representada por cerca de 29 gêneros e 182 espécies de acordo com Barroso *et al.* (1986) (apud Melo e Zickel, 2004).

As Rutaceae apresentam como principal característica morfológica, a presença de pontuações translúcidas decorrentes da produção de limonóides e óleos essenciais em cavidades excretoras distribuídas na casca do caule e no parênquima foliar (Pirani, 1982).



Fonte: < [www.arbolesornamentales.com/Rutaceae.htm](http://www.arbolesornamentales.com/Rutaceae.htm) >

Figura 3 – Distribuição geográfica da família Rutaceae em destaque (vermelho)

Dentre os gêneros mais heterogêneos da família, destaca-se *Zanthoxylum*, pertencente à subfamília Rutoideae, a tribo Zanthoxyloae e a subtribo *Evodiinae* (esquema 2, pg. 22), que compreende aproximadamente 200 espécies lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com perianto mono ou

diclamídeo. Variam de 6 a 18 metros de altura e possuem acúleos. São pantropicais e apenas poucas espécies estendem-se nas zonas temperadas. Ocorre em praticamente todo o Brasil, mas especificamente em florestas serranas e caatinga (Lorenzi, 1992; Melo e Zickel, 2004). A morfologia não especializada da flor e o sistema vascular sugerem uma posição primitiva dentro da família (Moore, 1936; Silva, M.F.G.F et al., 1988).

Durante muito tempo, houve um problema quanto à distinção entre *Zanthoxylum l.* e *Fagara l.* Anteriormente, baseados em estudos sobre a diferença de perianto, *Zanthoxylum* era tratada como gênero distinto de *Fagara* (Melo e Zickel, 2004).

Alguns trabalhos posteriores, como Waterman (1975), em análises de evidências quimiosistemáticas dos metabólitos secundários, e Guerra (1987), utilizando a estrutura nuclear como parâmetro taxonômico, sugerem que os dois gêneros podem ser fundidos devido à semelhança.

Os estudos químicos precedentes sobre o gênero apresentaram um grande número de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, em particular, alcalóides comuns entre *Zanthoxylum* e a ordem Ranales. A presença destas substâncias permitiu que Waterman (1983) denominasse o gênero como proto-Rutaceae com, provavelmente, o mais primitivo espectro de metabólitos secundários dentro da ordem Rurales.



### **I.5. *Zanthoxylum tingoassuiba* A.St. Hil**

A espécie *Zanthoxylum tingoassuiba* também identificada como *Zanthoxylum articulatum* Engl. ou com sua antiga denominação *Fagara tingoassuiba* Hoene (1920), foi primeiramente descrita por Saint Hilaire em 1825 e encontra-se distribuída nos estados da Bahia, Pernambuco, Maranhão, Amazonas, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás e São Paulo. Na Bahia, ocorre na região de Feira de Santana, Chapada Diamantina e Jacobina (Pirani, 1999).

É popularmente conhecida como casca preciosa, tinguaciba-da-restinga, tinguaciba, limão-bravo, laranjeira-do-mato, mamica-de-porca ou limãozinho (Machado, 1944), e a casca de seu caule é utilizada na medicina tradicional como antiespasmódico, antibiótico, relaxante muscular, analgésico, diurético e antiinflamatório (Sudam-Genamaz, 2000).

Esta planta está presente em associação com Abútua (*Chondrodendron platyphyllum* A. St. Hill. Miers) num medicamento fitoterápico denominado Uva do Mato®, registrado em 1923, pelo Laboratório Flora Medicinal J. Monteiro da Silva e indicado para cólicas abdominais, cólicas nefréticas, espasmos da musculatura estriada e mialgias.

Durante a apresentação de um trabalho sobre o estudo fitoquímico de *Z. stelligerum* no Simpósio de Plantas Medicinais da Bahia em Feira de Santana foi sugerido por um representante do Laboratório Flora Medicinal, o estudo da espécie *Z. tingoassuiba*, o que foi aceito pelo grupo.

Após coleta do material botânico, foi feito um levantamento bibliográfico e verificou-se que um espécime de *Z. tingoassuiba*, coletado no Rio de Janeiro, havia sido estudado fitoquimicamente pela primeira vez em 1959 por Antonaccio e Gottlieb, no qual descreveu-se a presença do triterpeno lupeol (1) e da lignana sesamina (2) (figura 5).

Em 1961, Riggs et al. identificaram o alcalóide aporfinico quaternário cloreto de 1- hidroxí - 2,9,10 - trimetoxi - N,N - dimetilaporfina (3) na casca do caule de *Z. tingoassuiba* e em 1978, Bernhard e Thiele, isolaram a tembamida (4) desta espécie.

Em 1987, foi estudado por Menezes e Pereira, o efeito biológico do alcalóide aporfinico (3) que apresentou atividade bloqueadora neuromuscular.

Este trabalho é o primeiro relato de estudo fitoquímico da espécie baiana.

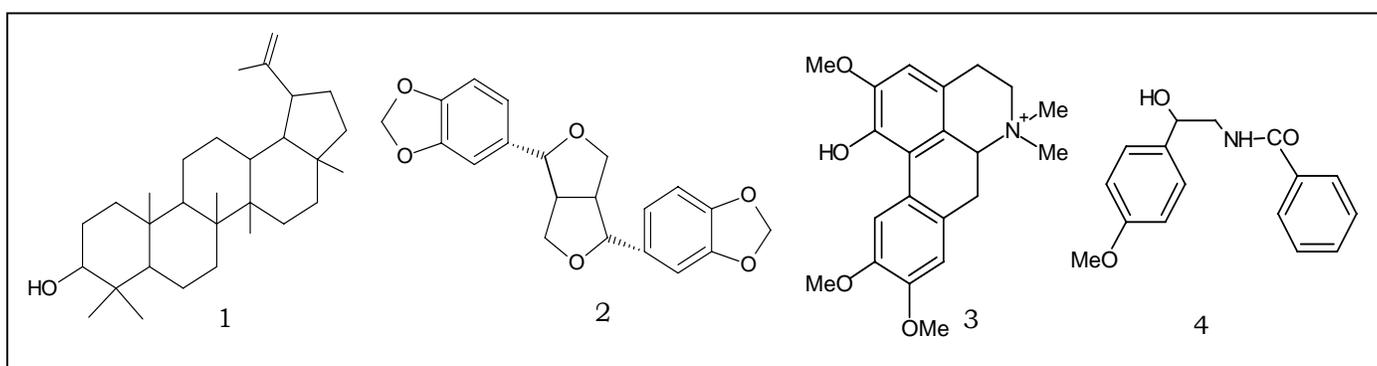


Figura 5 – Estruturas isoladas de estudos anteriores de *Z. tingoassuiba*

## **I.6. Biossíntese das principais classes de substâncias encontradas em *Zanthoxylum tingoassuiba***

O gênero *Zanthoxylum* é mencionado por Hoehne (1920) como detentor de alcalóides com efeito similar ao da pilocarpina, além dos óleos essenciais característicos da família. Atualmente, metabólitos como fenilpropanóides, flavonóides, alcalóides, alquilamidas e óleos essenciais compostos por mono e sesquiterpenos são relatados nas mais de 200 espécies descritas neste gênero (Silva, C.V. et al, 2002).

As principais rotas biossintéticas para estes compostos são derivadas de intermediários da acetil CoA, ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-desoxixilulose 5-fosfato (Dewick, 2002).

As substâncias encontradas em *Z. tingoassuiba* são derivadas de duas rotas principais: a via do chiquimato e a via do mevalonato.

### **I.6.1. Via do chiquimato**

A via do chiquimato é a rota biossintética de compostos aromáticos derivados dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, a exemplo das cumarinas, lignanas e alcalóides (Berg et al, 2002 e Herbert, 1989).

O ácido chiquímico, molécula-base destes aminoácidos, é originado de uma reação tipo condensação aldólica catalisada por uma enzima, entre a 4- fosfato de D-eritrose e o fosfoenolpiruvato (PEP), originando o ácido 3-dehidrochiquímico, que sofre uma desidratação e uma redução para então formar o ácido chiquímico (Dewick, 2002).

A partir da formação deste ácido, se produzirá o ácido corísmico (figura 6), com uma reação inicial de fosforilação ATP-dependente e logo após uma reação enzimática pela EPSP sintase, de incorporação de PEP na cadeia lateral do ácido 3-fosfochiquímico, formando o ácido 3-enolpiruvilchiquímico-3-fosfato (EPSP) (Robbers et al, 1997).

A transformação de EPSP em ácido corísmico ocorre através de uma eliminação 1,4, provavelmente não concertada (Dewick, 2002).

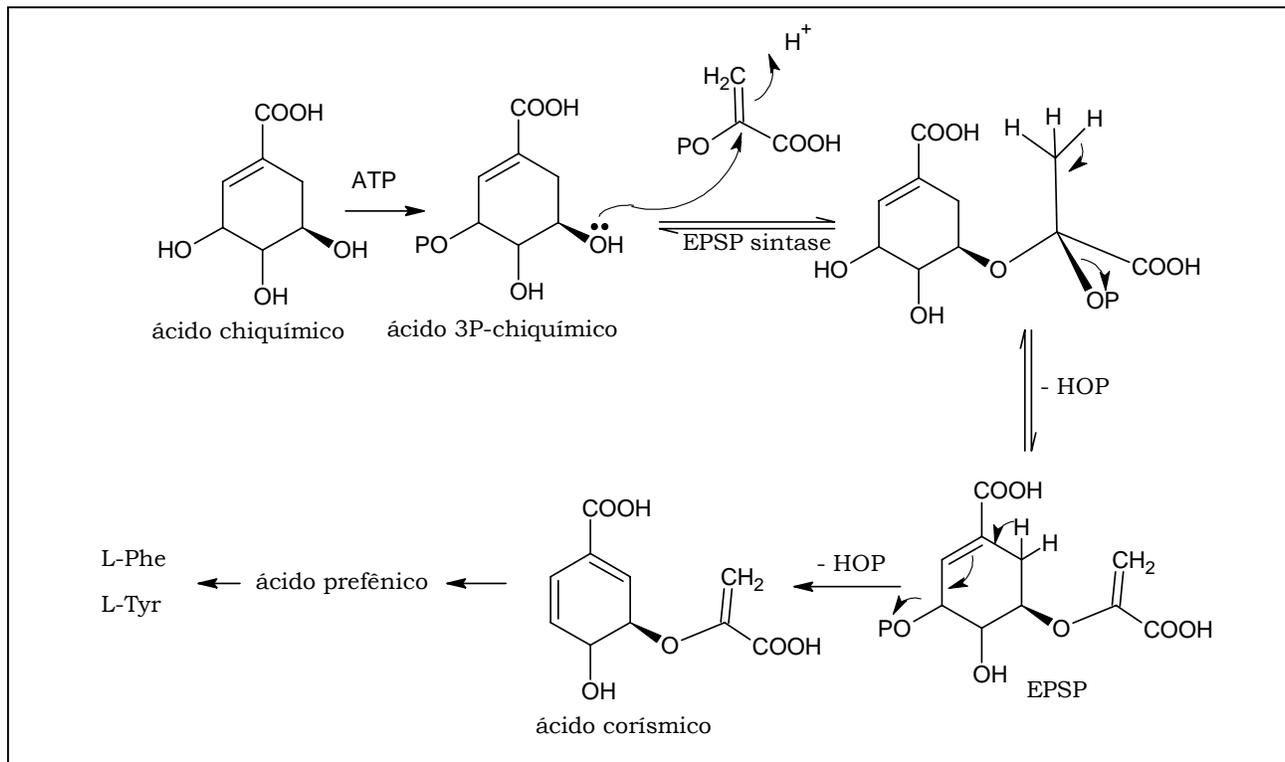


Figura 6 – Formação do ácido corísmico a partir do ácido chiquímico

Para a formação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, o ácido corísmico passa por um rearranjo de Claisen, promovido pela enzima corismato mutase que altera a conformação pseudoequatorial (mais estável) do ácido para a conformação pseudoaxial, favorecendo o rearranjo e a produção do ácido prefênico (Herbert, 1989 e Dewick, 2002).

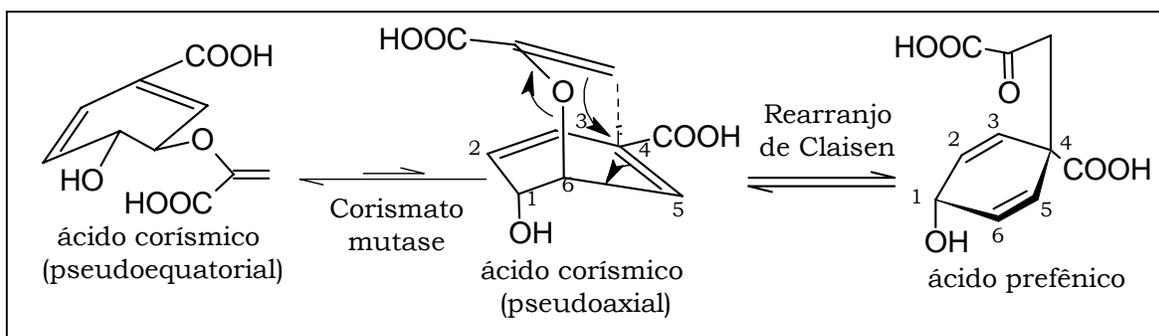


Figura 7 – Formação do intermediário ácido prefênico a partir do ácido corísmico

Na seqüência, três reações estão envolvidas: aromatização decarboxilativa, transaminação e no caso da tirosina, uma oxidação (Dewick, 2002).

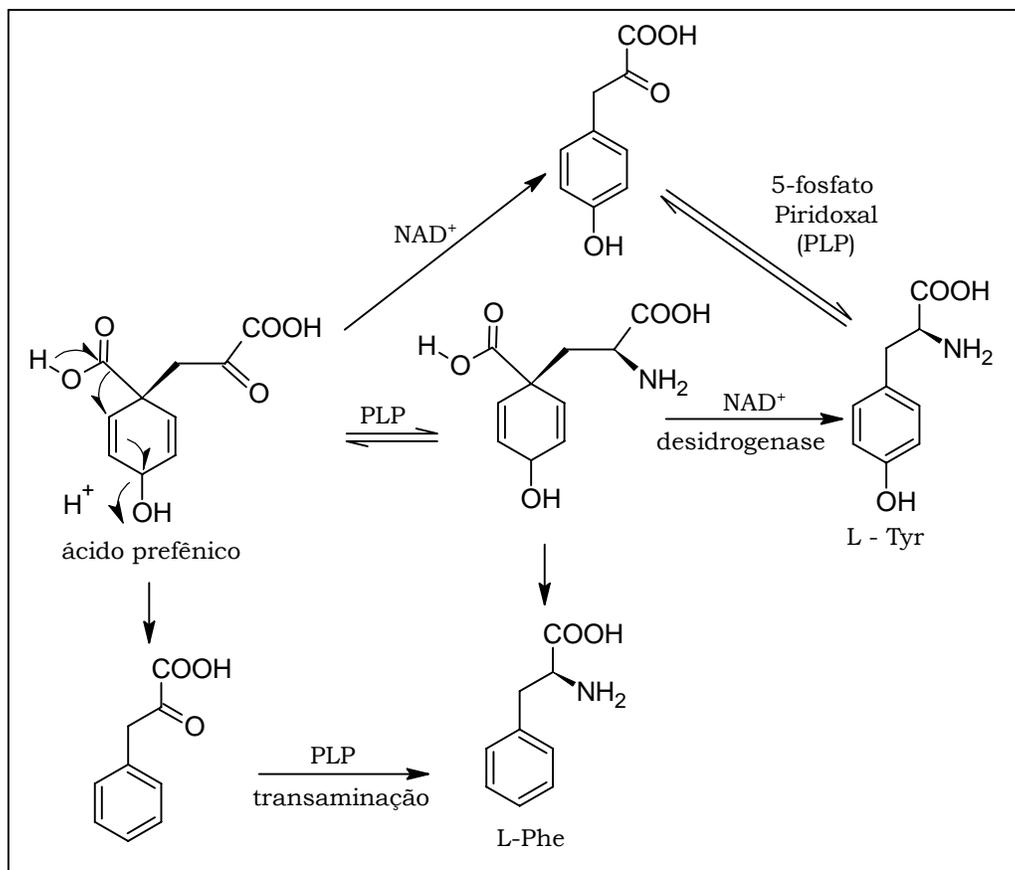


Figura 8 – Formação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, a partir do ácido prefênico

O processo de formação do aminoácido triptofano inicia-se com a aromatização do seu anel e uma aminação, utilizando para isto, uma molécula de um outro aminoácido como nucleófilo, o L-glutamina. Esta reação é intermediada pela enzima antranilato sintase. A seguir, uma molécula de ácido pirúvico é perdida, produzindo o ácido antranílico (Herbert, 1989 e Dewick, 2002).

O ácido antranílico formado incorpora dois carbonos de uma molécula de fosforibosil difosfato, sofre ciclização, formando um anel indólico e perde sua carboxila (Herbert, 1989).

Os carbonos remanescentes do ribosil são removidos pela enzima triptofano sintase, que se mantém ligada ao núcleo indólico até sua substituição pelo aminoácido L-serina (Dewick, 2002).

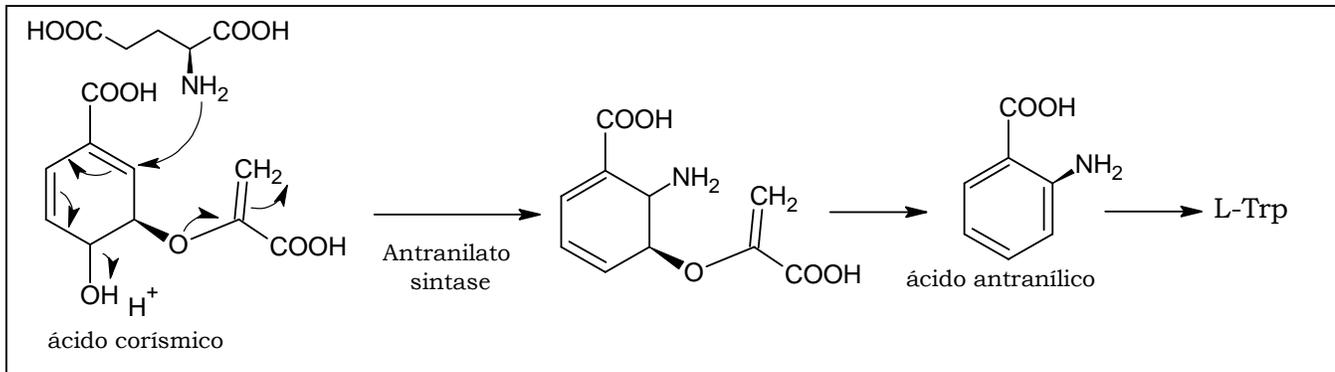


Figura 9 – Formação do ácido antranílico, a partir do ácido corísmico

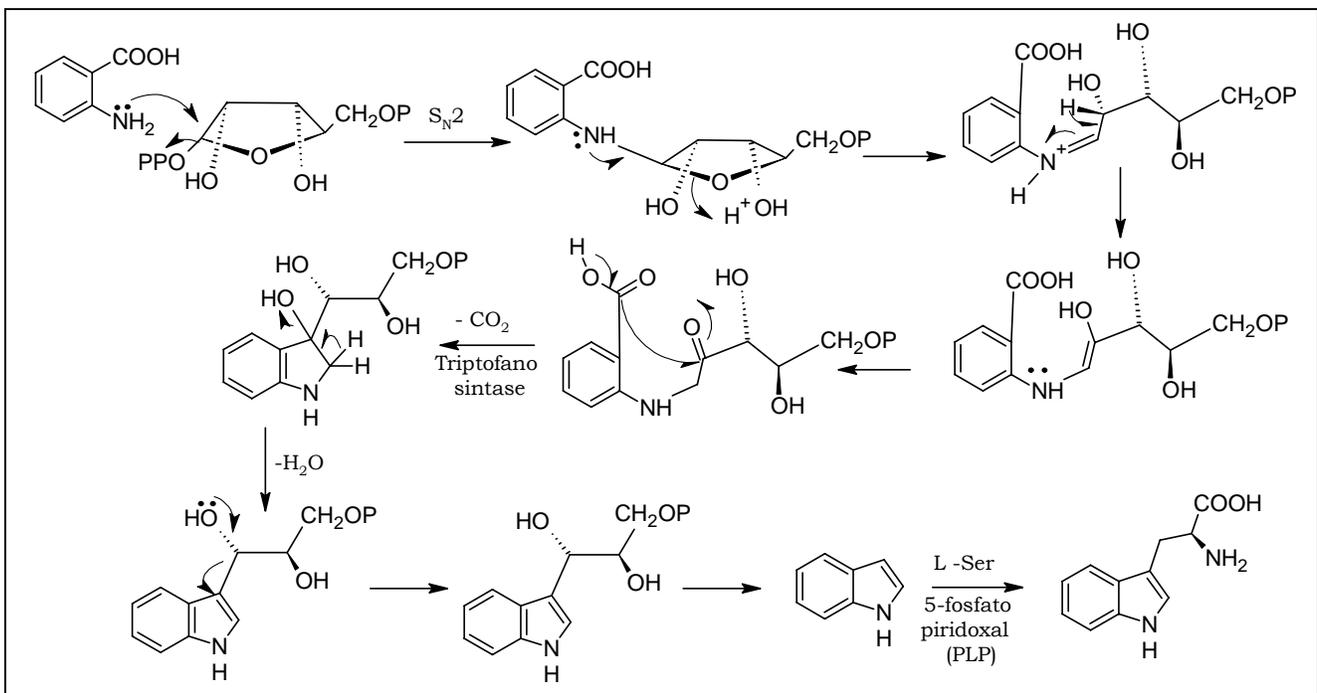


Figura 10 – Formação do aminoácido triptofano, a partir do ácido antranílico

### I.6.1.1. Cumarinas

As cumarinas são substâncias comumente encontradas na ordem Rutales. De acordo com Gray (1983), aproximadamente 200 espécies de cerca de 60 gêneros desta ordem foram pesquisadas, encontrando-se quase 300 cumarinas diferentes, com grandes variações de complexidade estrutural.

As cumarinas C- ou O-alkiladas, geralmente preniladas, são as mais comuns em Rutaceae (Murray,1982). Formas diméricas, furano e pirano-cumarinas são também encontradas.

A figura a seguir apresenta exemplos de cumarinas isoladas dos gêneros *Zanthoxylum*, *Metrodorea* e *Spiranthera*, estudados no LAPEMM.

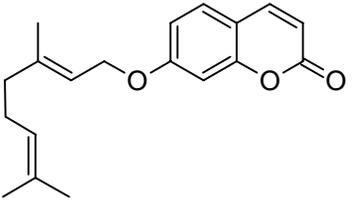
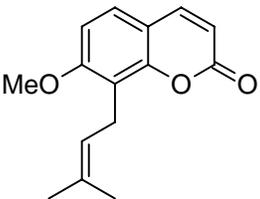
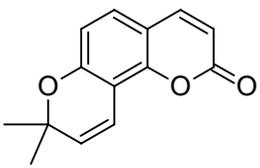
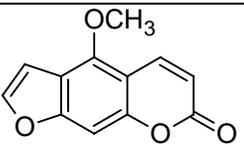
Cumarinas	Origem	Referência
	<i>Spiranthera odoratissima</i> (rizoma)	Freitas, 2001
	<i>Spiranthera odoratissima</i> (rizoma)	Freitas, 2001
	<i>Spiranthera odoratissima</i> (rizoma)	Freitas, 2001
	<i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> (folha)	Santana <i>et al.</i> , 2006

Figura 11 – Exemplos de cumarinas isoladas de Rutaceae de ocorrência regional

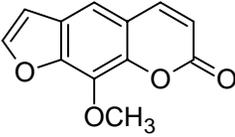
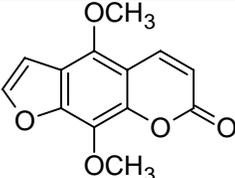
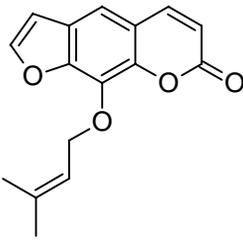
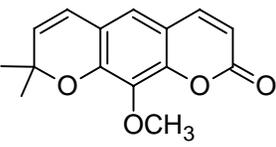
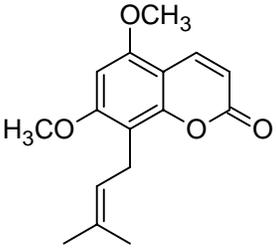
	<i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> (folha e raiz)	Hohlemwerger <i>et al.</i> , 2005 Santana <i>et al.</i> , 2006
	<i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> (folha e raiz)	Hohlemwerger <i>et al.</i> , 2005 Santana <i>et al.</i> , 2006
	<i>Zanthoxylum stelligerum</i> (raiz)	Silva <i>et al.</i> , 2002
	<i>Metrodorea mollis</i> (raiz)	Fonseca <i>et al.</i> , 2006
	<i>Metrodorea mollis</i> (raiz)	Fonseca <i>et al.</i> , 2006
	<i>Metrodorea mollis</i> (raiz)	Fonseca <i>et al.</i> <i>et al.</i> , 2006

Figura 11 – Continuação

A biossíntese de cumarinas (substâncias derivadas de fenilalanina) ocorre por eliminação de amônia (E2) deste aminoácido e formação do

ácido cinâmico, que sofre uma hidroxilação, seguida de uma isomerização e formação do anel lactônico (figura 12).

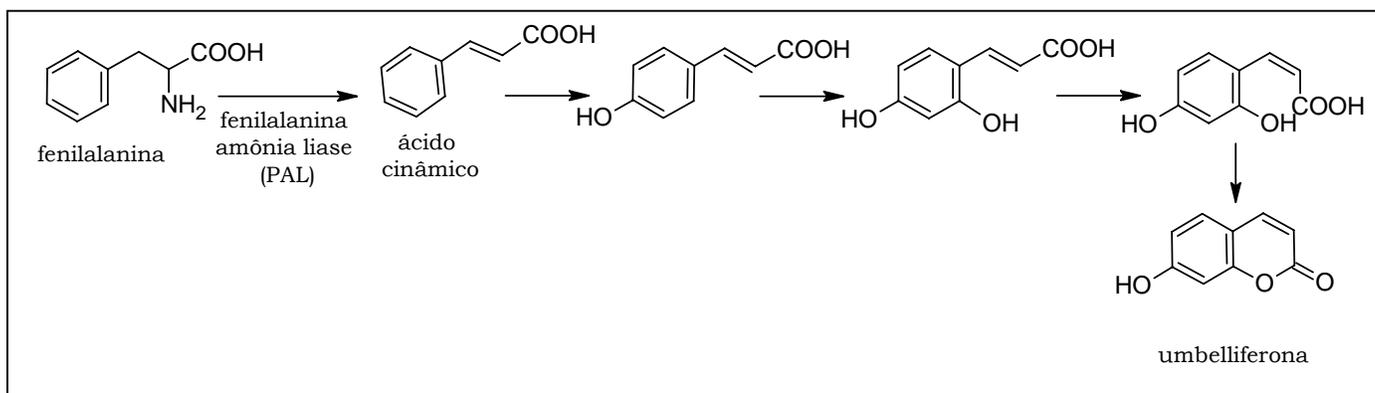


Figura 12 – Formação da cumarina umbeliferona, a partir do aminoácido fenilalanina

As cumarinas podem ser também originadas do ácido cinâmico hidroxilado na posição 4, dando a umbeliferona. O anel aromático é ativado com a presença de OH em *orto* e por isso é facilmente alquilado, no caso pelo difosfato de dimetilalila, que cicliza e forma a marmesina. Estas reações são promovidas por uma monooxigenase citocromo P450 – dependente e requer como co-fatores oxigênio e NADPH. Uma outra monooxigenase cliva o fragmento de hidroxisopropila, gerando o psoraleno, precursor das cumarinas lineares de *Z. tingoassuiba* (figura 13).

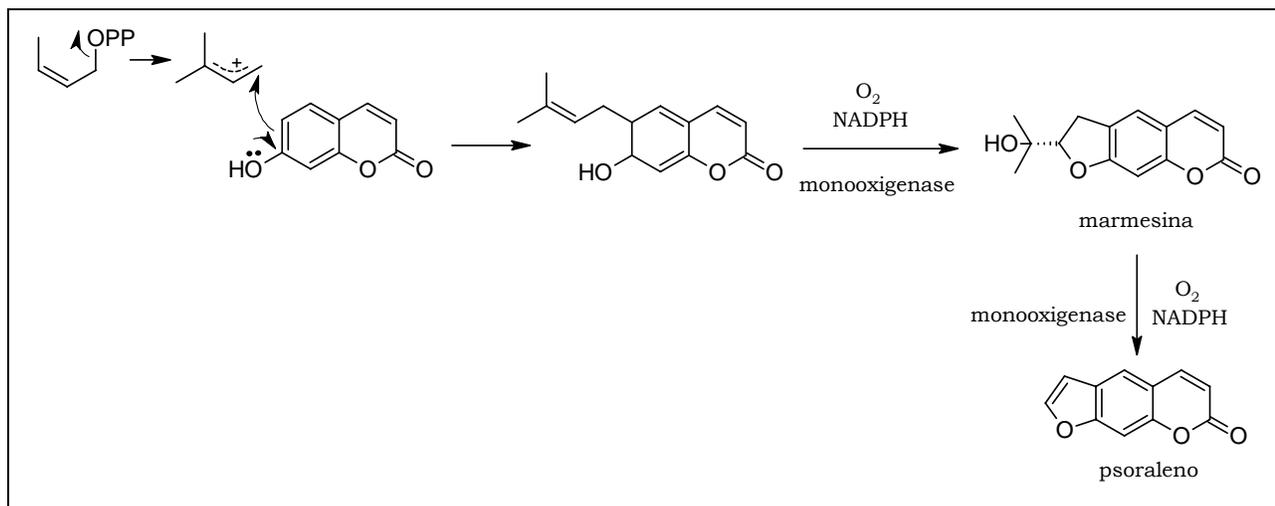


Figura 13 – Formação do psoraleno (precursor de furanocumarinas)

Por muitos anos, a ciclização foi postulada envolvendo um epóxido intermediário, que sofreria um ataque nucleofílico do grupo fenol e poderia formar tanto o furano com cinco membros como o pirano com seis membros, encontrados comumente em produtos naturais. Entretanto, epóxidos intermediários não têm sido demonstrados em nenhum sistema enzimático investigado e, portanto, algum mecanismo de ciclização oxidativa direta deve operar (Dewick, 2002).

### **I.6.1.2. Alcalóides**

Atualmente, são conhecidos cerca de 150.000 compostos isolados de plantas e animais terrestres (Granato et al., 2005), destes, cerca de 14 % são alcalóides (Maraschin e Verpoorte, 1999).

Os alcalóides são substâncias nitrogenadas derivadas de aminoácidos e classificam-se de acordo com o aminoácido precursor e sua forma estrutural (Dewick, 2002). Estes metabólitos são de especial interesse para os químicos de produtos naturais, devido à heterogeneidade química do grupo, à distribuição restrita na natureza e ao grande potencial bioativo (Robbers et al, 1997).

Na ordem Rutales, somente as famílias Rutaceae, Simaroubaceae e Meliaceae apresentam alcalóides. Das famílias citadas, a Rutaceae é a mais examinada para constituintes alcaloídicos (Mester, 1983).

Em Rutaceae, os alcalóides derivados do ácido antranílico são os mais amplamente distribuídos, ocorrendo em 64 dos 74 gêneros e em 5 das 7 subfamílias; os derivados do triptofano são mais limitados, somente ocorrem em 18 gêneros; têm sido reportado em 22 gêneros, alcalóides derivados de tirosina ou fenilalanina (Mester, 1983).

No LAPEMM, a maioria das substâncias encontradas pertence a classe química dos alcalóides (figura 14).

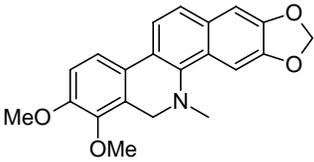
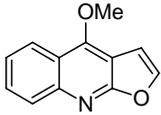
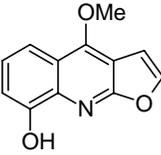
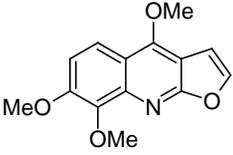
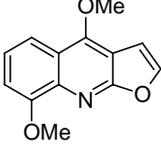
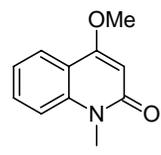
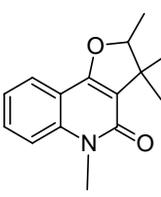
Alcalóides	Origem	Referência
	<i>Zanthoxylum stelligerum</i>	Silva, C.V. et al., 2002
	<i>Zanthoxylum stelligerum</i> <i>Andreadoxa flava</i> <i>Ertela bahiensis</i>	Silva, C.V. et al., 2002 Hohlemwenger, S.V.A., 2002 Silva, E.C., 1998
	<i>Zanthoxylum stelligerum</i>	Silva, C.V. et al., 2002
	<i>Spiranthera odoratissima</i>	Freitas, C.M.J., 2001
	<i>Zanthoxylum stelligerum</i> <i>Spiranthera odoratissima</i>	Silva, C.V. et al., 2002 Freitas, C.M.J., 2001
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002

Figura 14 – Alcalóides isolados em Rutaceae de ocorrência regional

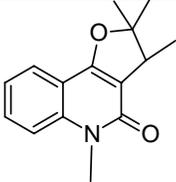
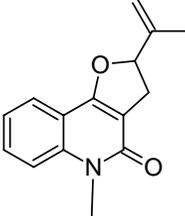
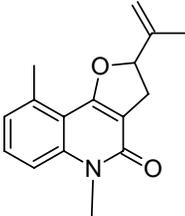
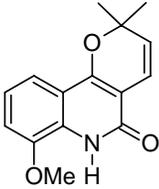
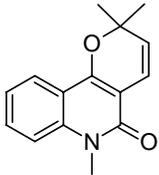
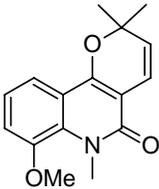
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002

Figura 14 – Continuação

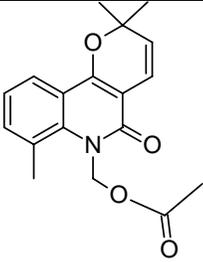
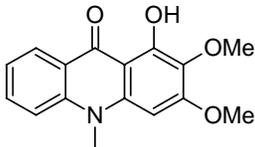
	<i>Andreadoxa flava</i>	Hohlemwenger, S.V.A., 2002
	<i>Ertela bahiensis</i>	Silva, E.C., 1998

Figura 14 – Continuação

No gênero *Zanthoxylum* foram encontrados cantin-6-onas, amidas, aminas (Ng et al, 1987), alcalóides furoquinolínicos e benziltetrahydroisoquinolínicos: aporfina e benzofenatridinas (Diehl, 2000). Estes últimos destacam-se por suas atividades: antileucêmica, antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana (Moura et al.,1997). Em 1975, Waterman propôs considerar os gêneros produtores deste tipo de alcalóides como os representantes mais primitivos dentro da família *Rutaceae* (Silva, M.F.G.F et al, 1988).

#### **I.6.1.2.1. Alcalóides benzofenatridínicos**

Duas moléculas de tirosina são necessárias para a produção de alcalóides benziltetrahydroisoquinolínicos, uma destas formará a dopamina por duas vias biossintéticas (figura 15) e a outra produzirá o 4-hidroxifenilacetaldeído (figura 16) (Dewick, 2002; Seigler, 1998; Zenk e Tanahashi, 1985).

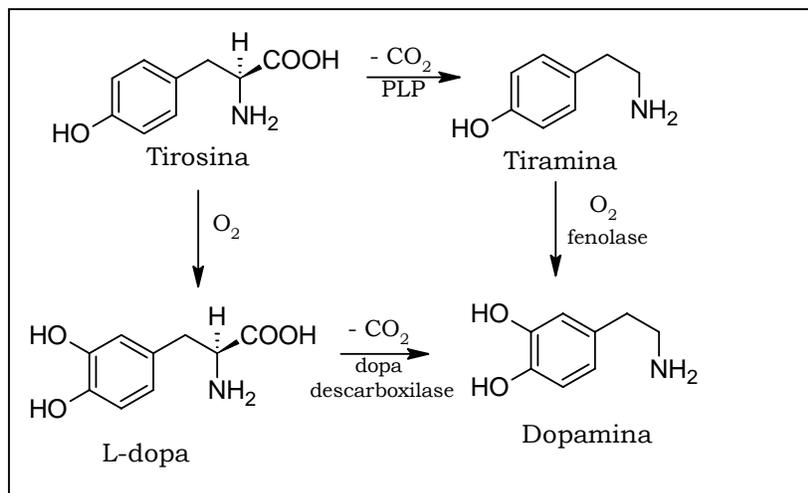


Figura 15 – Formação da dopamina a partir da L-tirosina

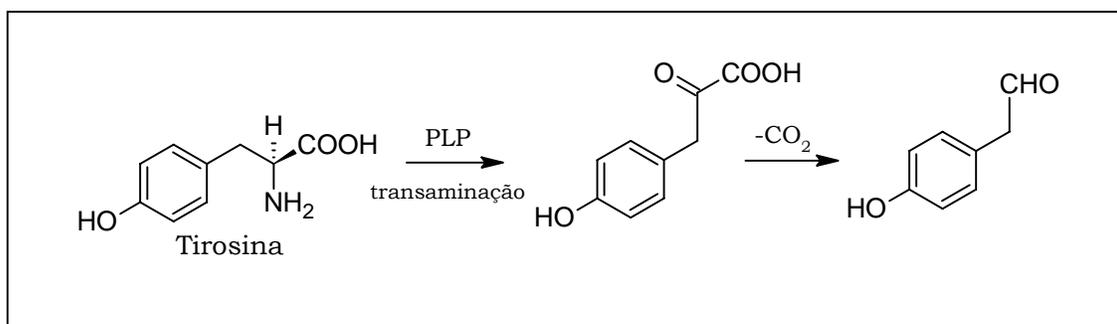


Figura 16 – Formação do 4-hidroxifenilacetaldeído a partir da L-tirosina

A dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído se condensarão pela ação da enzima (S)-norlaudanosolina sintetase com formação de uma base de Schiff seguida por fechamento do anel, através de uma reação tipo Mannich que produz um alcalóide (S).

O alcalóide é então modificado pela N-metiltransferase e pela enzima 4'-O-metiltransferase, dando origem a (S)-reticulina (Seigler, 1998; Zenk e Tanahashi, 1985).

Após uma seqüência de transformações, forma-se uma protoberberina (figura 17).

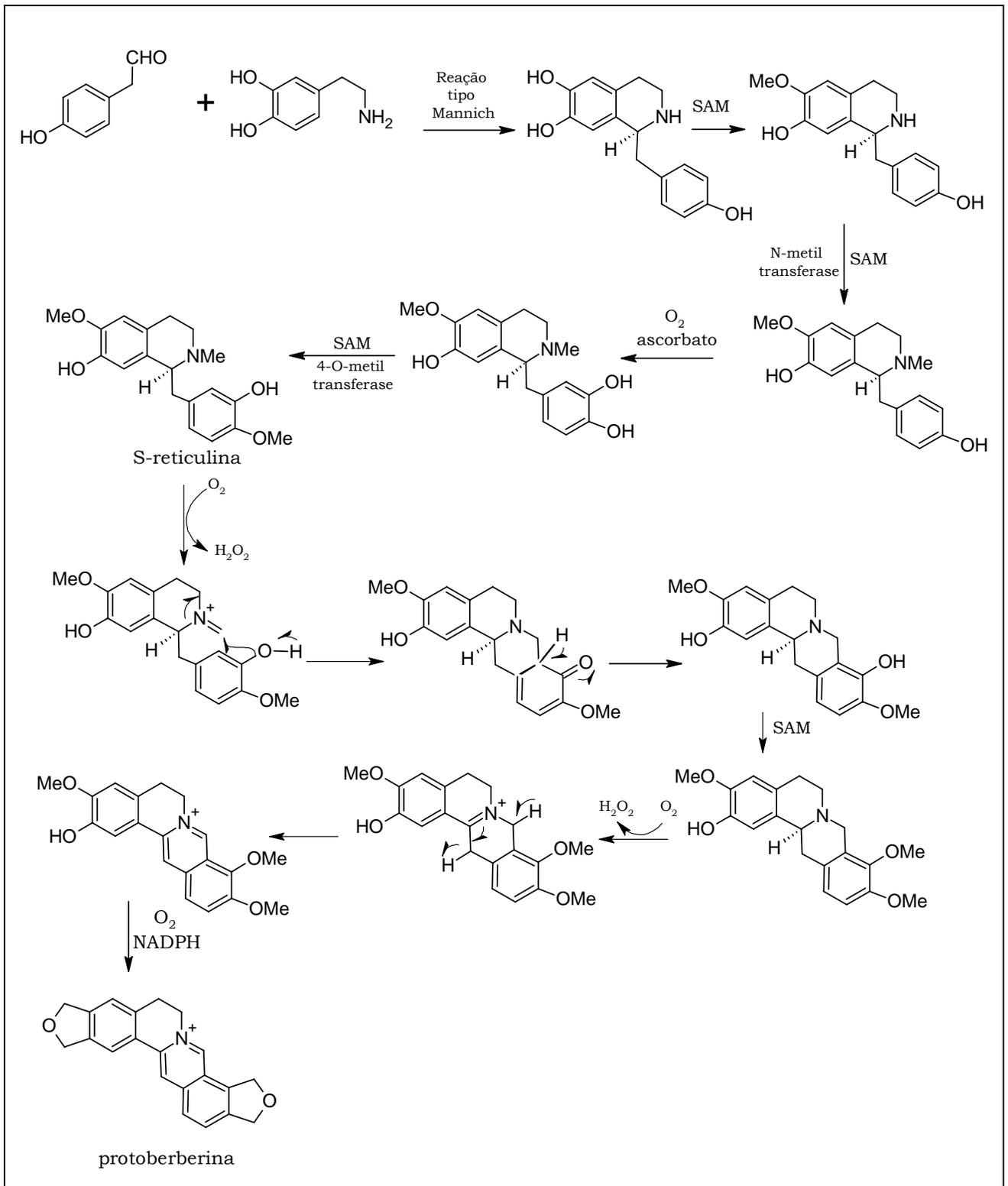


Figura 17 - Biossíntese da protoberberina a partir da dopamina e do 4-hidroxifenilacetaldeído

O sistema benzofenantridínico origina-se após o rompimento da ligação do carbono com o nitrogênio e posterior rotação (figura 18) (Seigler, 1998).

As etapas seguintes para a formação do esqueleto benzofenantridínico seguem um rearranjo espontâneo até a formação do alcalóide dihidrosanguinarina (Seigler, 1998; Zenk e Tanahashi, 1988).

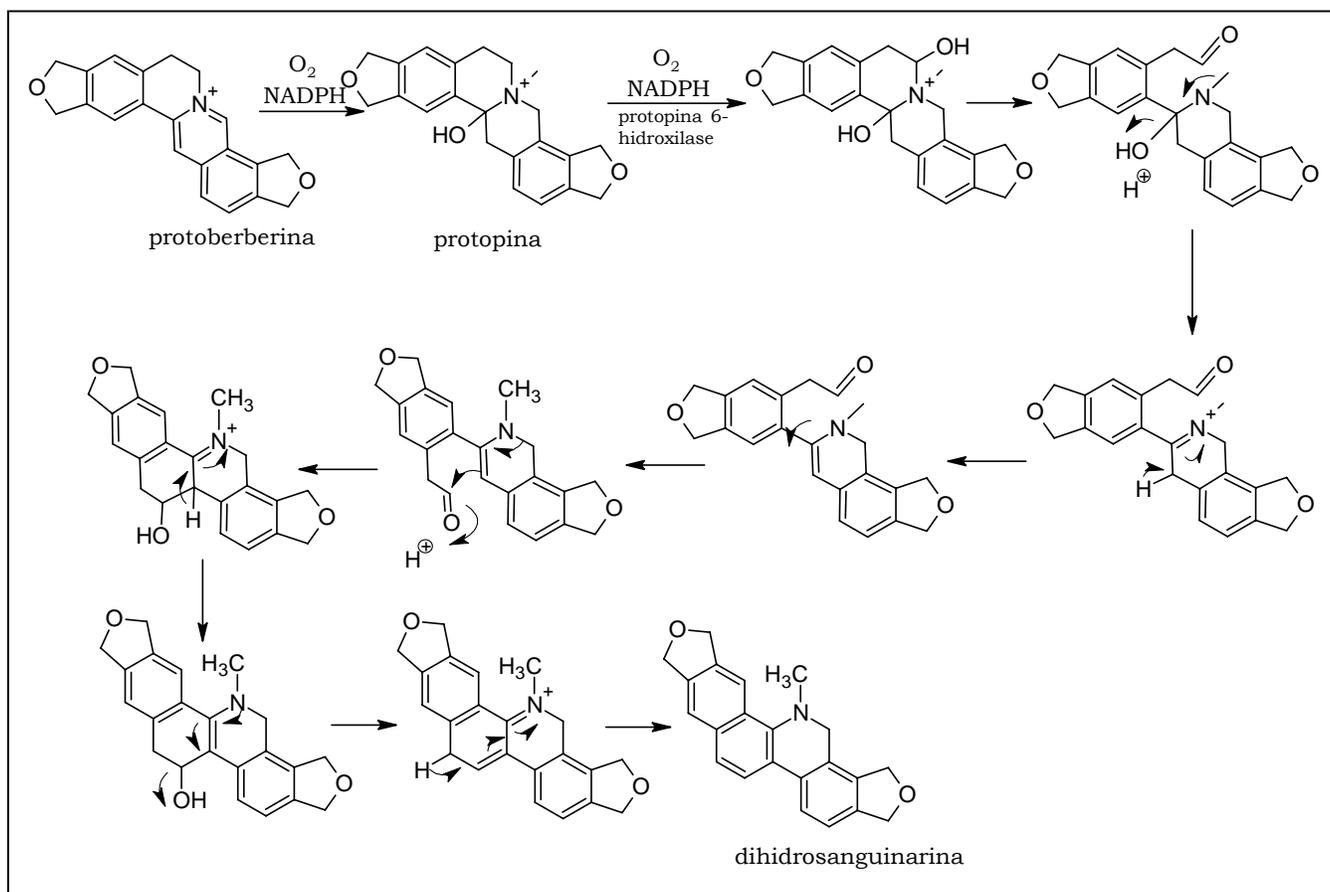


Figura 18 – Biossíntese da dihidrosanguinarina a partir da protoberberina

### I.6.1.3. Lignanas

As lignanas são dímeros formados por unidades de álcool coniferílico, uma substância derivada do ácido cinâmico. Esta reação ocorre a partir de duas oxidações consecutivas em presença de NADPH, uma metilação, uma esterificação e duas reduções: a primeira de éster de CoA para aldeído e a segunda redução, de aldeído para álcool, utilizando outra molécula de NADPH e é reversível (figura 19) (Dewick, 2002).

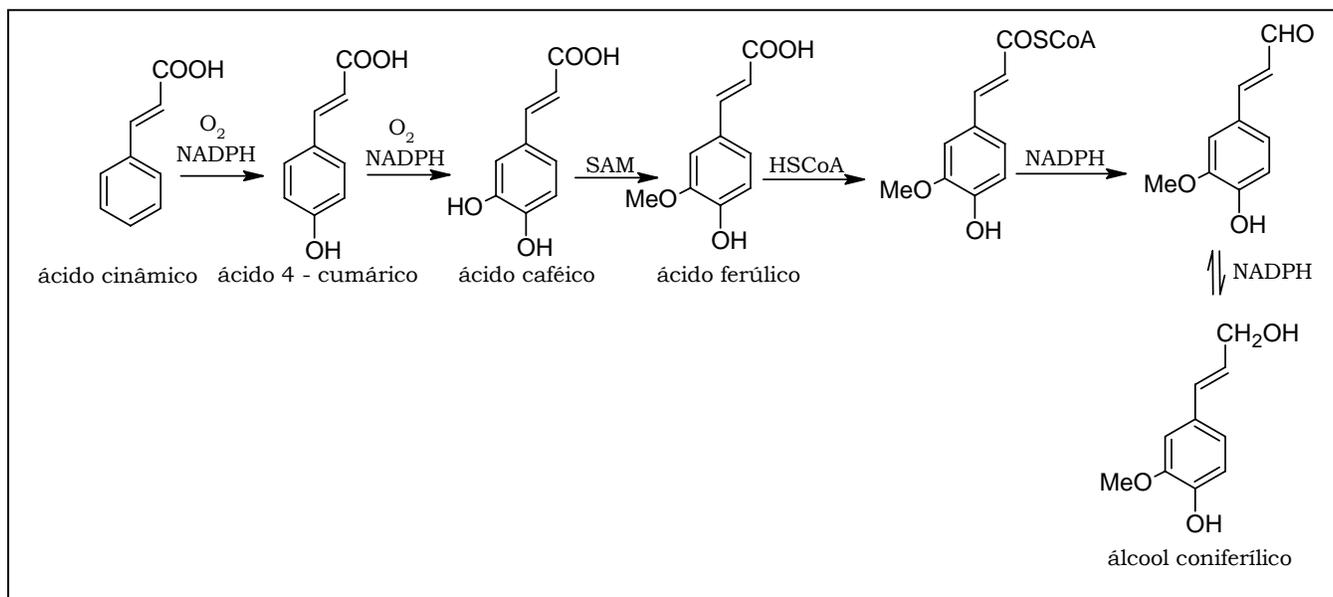


Figura 19 – Formação do álcool coniferílico a partir do ácido cinâmico

A enzima peroxidase realiza a oxidação de um elétron do grupo fenólico, que leva a deslocalização do elétron não emparelhado, gerando estruturas ressonantes inclusive na cadeia lateral (figura 20).

O álcool coniferílico oxidado sofre ataque nucleofílico por grupos hidroxila do mesmo sistema ou moléculas de água externas (figura 21) (Dewick, 2002).

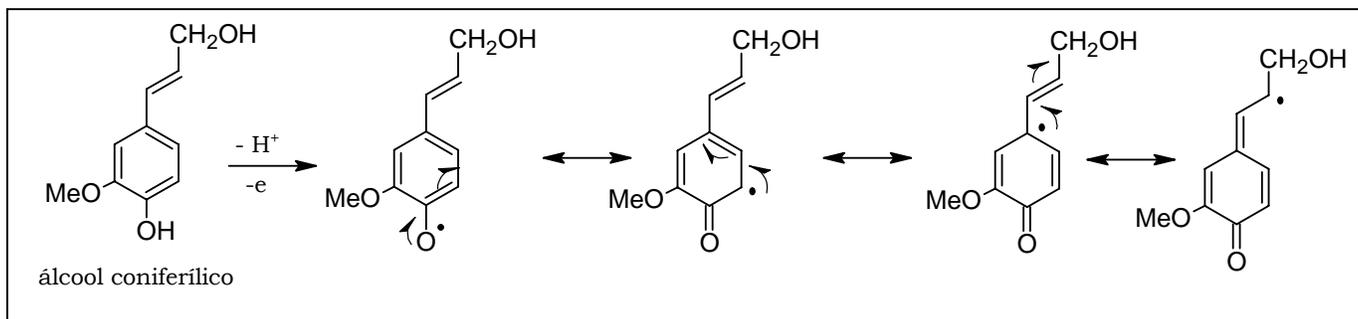


Figura 20 – Oxidação do álcool coniferílico para a biossíntese de lignanas

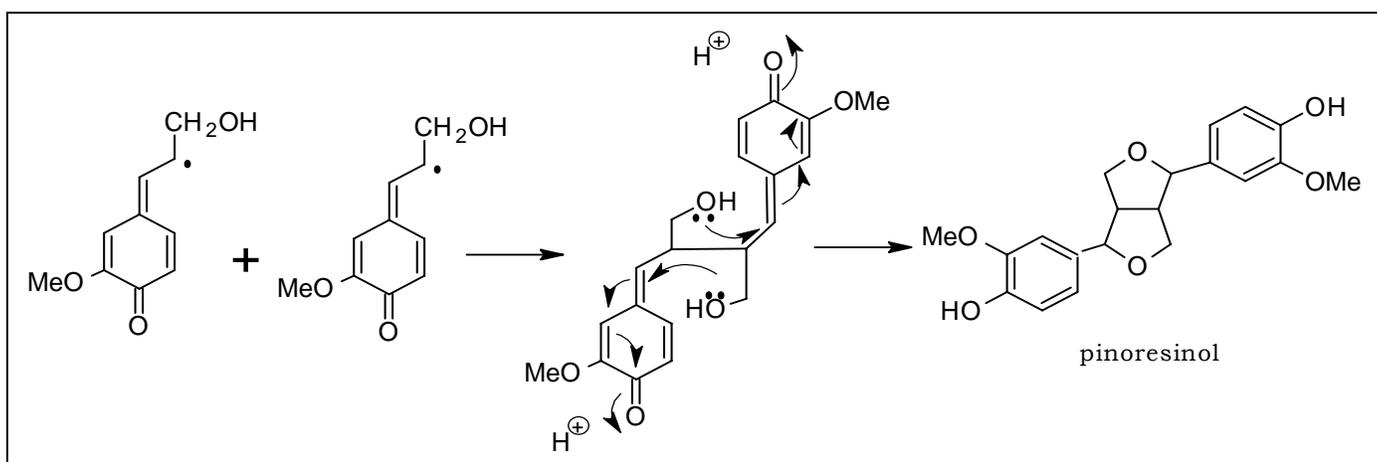


Figura 21 – Formação de lignanas a partir do álcool coniferílico oxidado

### I.6.2. Via do mevalonato

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e constituem o maior grupo de compostos identificados até o momento (Hegnauer, 1992 apud Maraschin e Verpoorte, 1999).

Estas substâncias têm papel proeminente nas discussões de ecologia química, pois desempenham funções importantes como fitoalexinas, hormônios, agentes de atração polínica e de defesa contra insetos e herbívoros (Robbers, 1997).

Os terpenóides são produtos naturais derivados de unidades de isopreno ( $C_5$ ) ligados através da extremidade superior e inferior (sistema cabeça-cauda), podem ser classificados em mono ( $C_{10}$ ), sesqui ( $C_{15}$ ), di ( $C_{20}$ ), tetra ( $C_{40}$ ) e triterpenos ( $C_{30}$ ) e são biossintetizados a partir de duas

rotas: a via do mevalonato (figura 22) e a via do 5-fosfato de 1-deoxi-D-xilulose (figura 23) (Dewick, 2002).

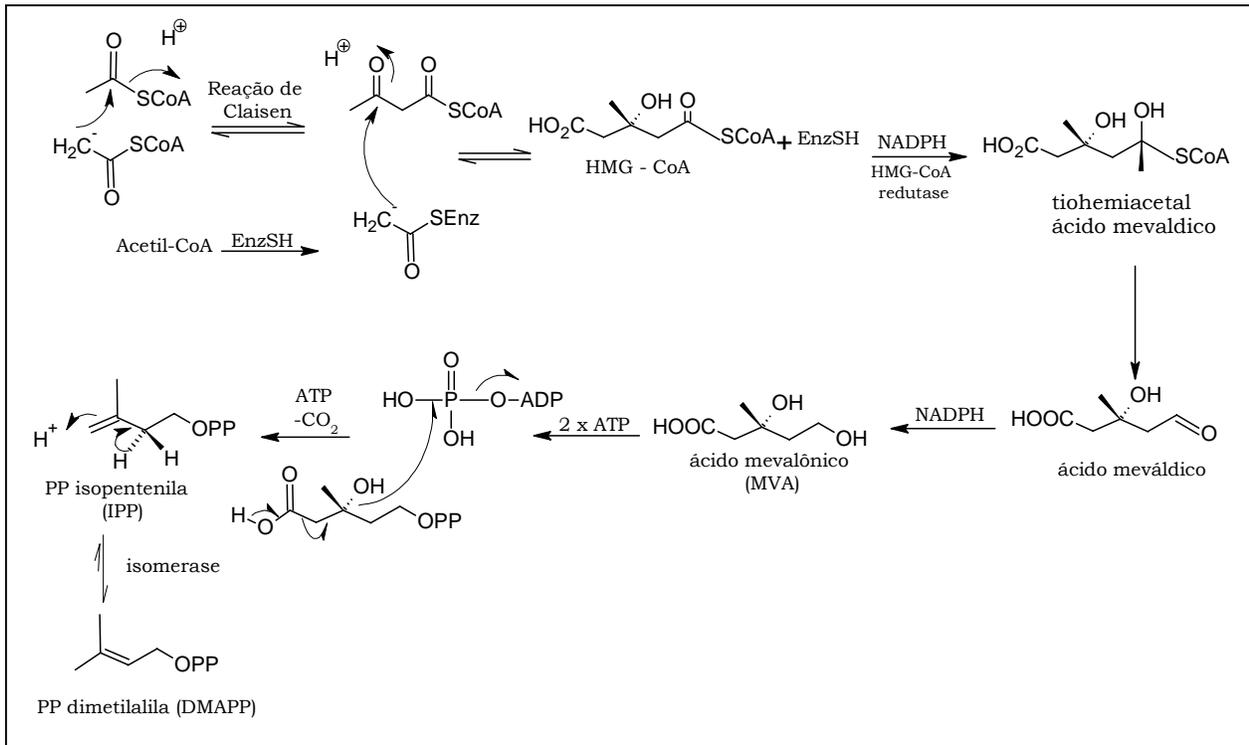


Figura 22 – Formação de intermediários biossintéticos dos terpenóides - IPP e DMAPP - via ácido mevalônico

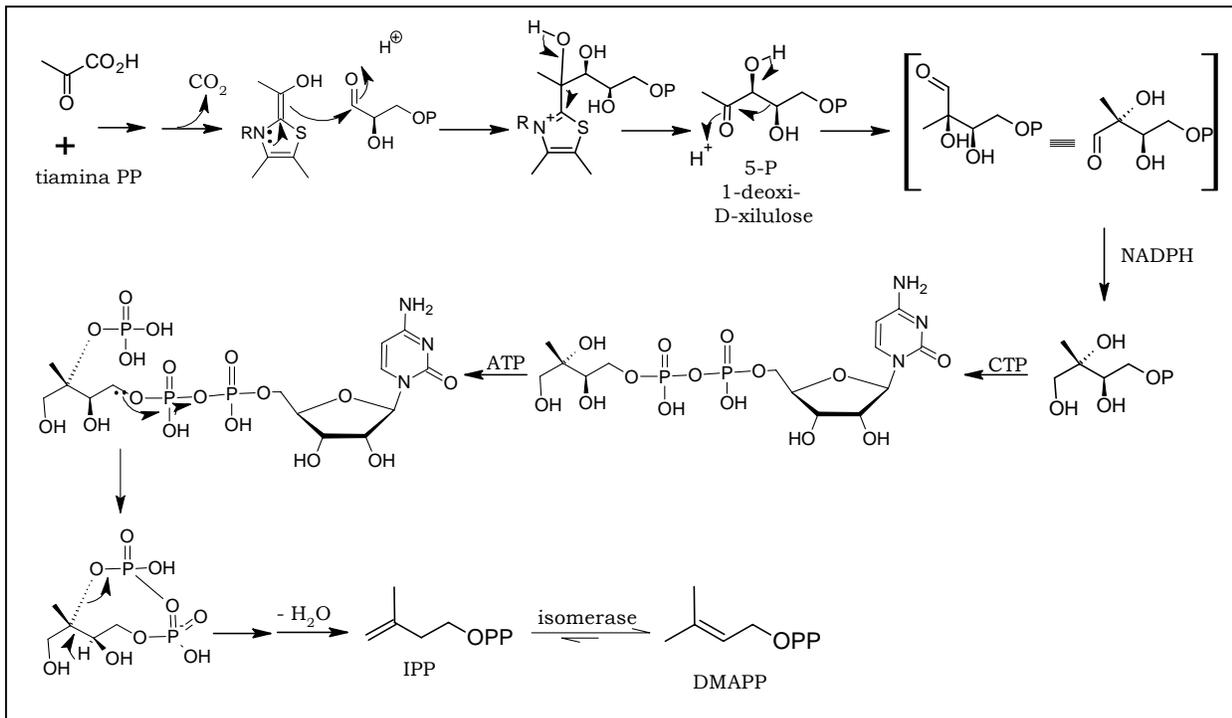


Figura 23 – Via alternativa do 5 – fosfato de 1-deoxi-D-xilulose, para a formação do IPP e DMAPP

### I.6.2.1. Monoterpenos (C<sub>10</sub>)

Os monoterpenóides são compostos com 2 unidades de isopreno e fórmula molecular: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>. Formam-se a partir da reação entre o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), catalisada pela enzima preniltransferase, resultando nos intermediários biossintéticos - difosfato de geranila (GPP) e seus dois isômeros, difosfato de nerila e difosfato de linalila (figura 24).

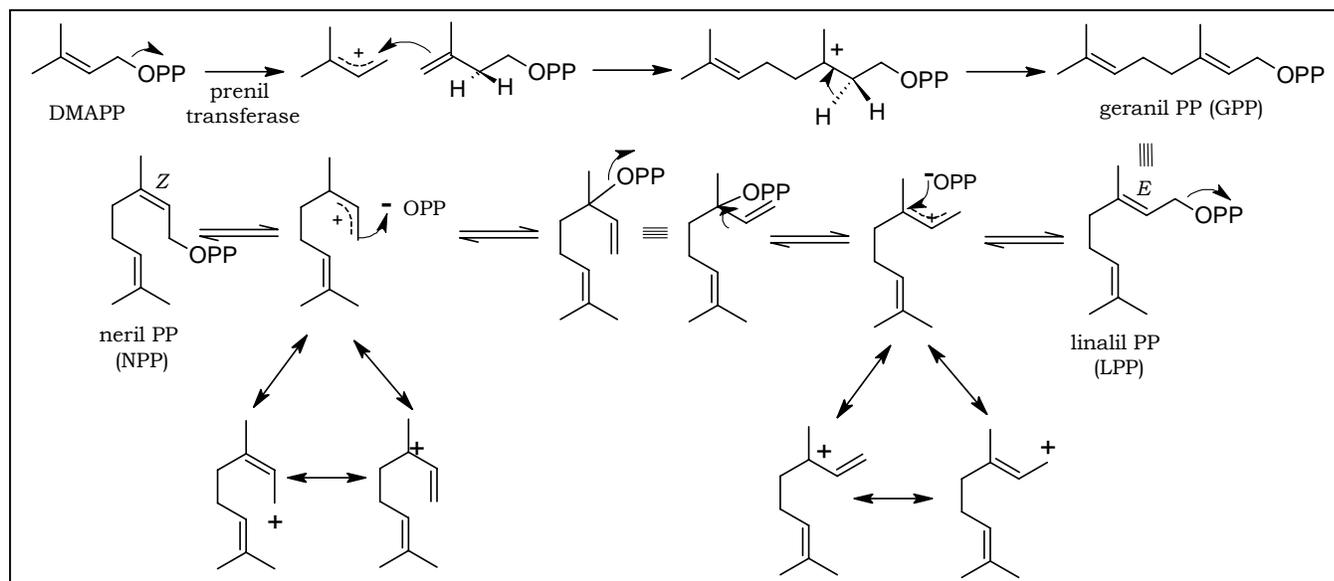


Figura 24 – Formação de monoterpenos a partir do DMAPP e IPP

Estes intermediários, depois das ciclizações, podem sofrer transformações enzimáticas como oxidações, reduções, isomerizações e hidratações, que levam a um grande número de compostos. Conhecidos por sua volatilidade e odor pungentes, os monoterpenos são utilizados comercialmente na perfumaria, na produção de especiarias e como flavorizantes na indústria de alimentos (Robbers, 1997).

### I.6.2.2. Sesquiterpenos (C<sub>15</sub>)

São terpenos que contém 3 unidades de isopreno, com fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>, formados a partir do acréscimo de uma unidade de

difosfato de isopentenila (IPP) no difosfato de geranila. Esta reação é promovida pela preniltransferase e leva ao precursor difosfato de farnesila (FPP), que dá origem aos sesquiterpenos lineares e cíclicos (Robbers,1997).

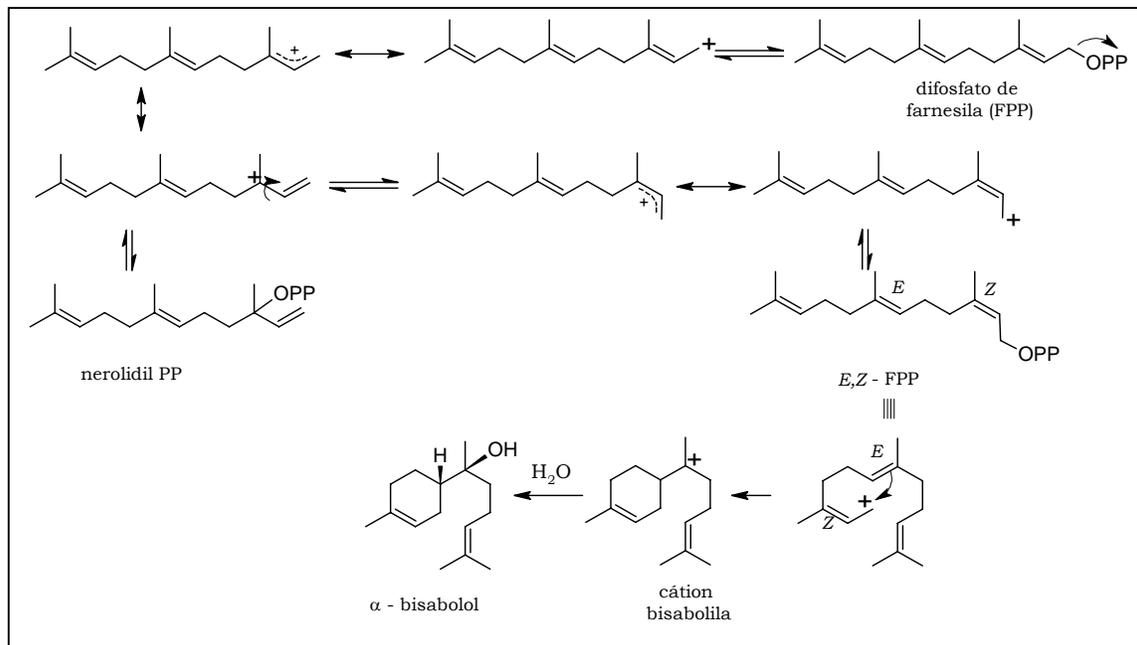


Figura 25 – Formação de sesquiterpenos, a partir do intermediário FPP

### I.6.2.3. Triterpenos (C<sub>30</sub>)

Os triterpenos são compostos com 6 unidades de isopreno, derivados de 2 moléculas de difosfato de farnesila (FPP), que se ligam por adição eletrofilica entre C1 de uma molécula e C2' do outro FPP. O cátion resultante é descarregado pela perda de um próton e um ciclopropano é formado, surgindo o intermediário presqualeno PP.

A seguir, o grupo difosfato é perdido, dando um cátion primário não favorável. Este cátion sofre um rearranjo 1,3 alquila de Wagner – Meerwein, produzindo um novo ciclopropano e um carbocátion mais estável. A ligação do anel é quebrada na posição C1-C2' e origina-se uma ligação dupla e um cátion alílico, que é neutralizado por um hidreto doado por uma molécula de NADPH, formando o esqualeno.

A ciclização do esqualeno é produzida em uma reação catalisada por uma flavoproteína dependente de O<sub>2</sub> e NADPH. As ciclizações são seguidas por uma seqüência concertada de migrações de Wagner – Meerwein de metilas e hidretos e são mediadas por carbocátions (Dewick, 2002).

Em vegetais, os triterpenóides são derivados do cicloartenol (Dewick, 2002).

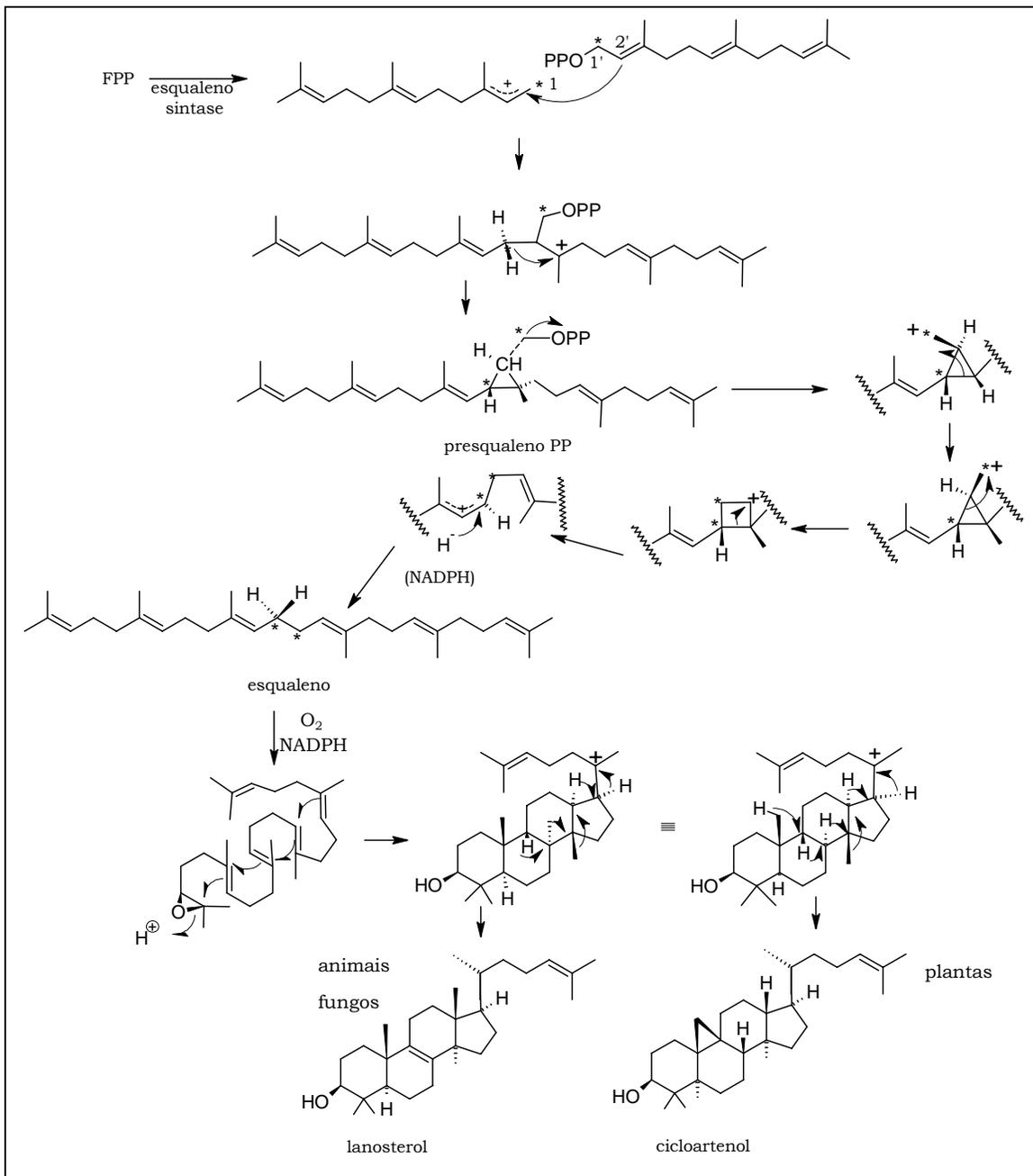


Figura 26 – Formação de triterpenos, a partir do difosfato de farnesila (FPP)

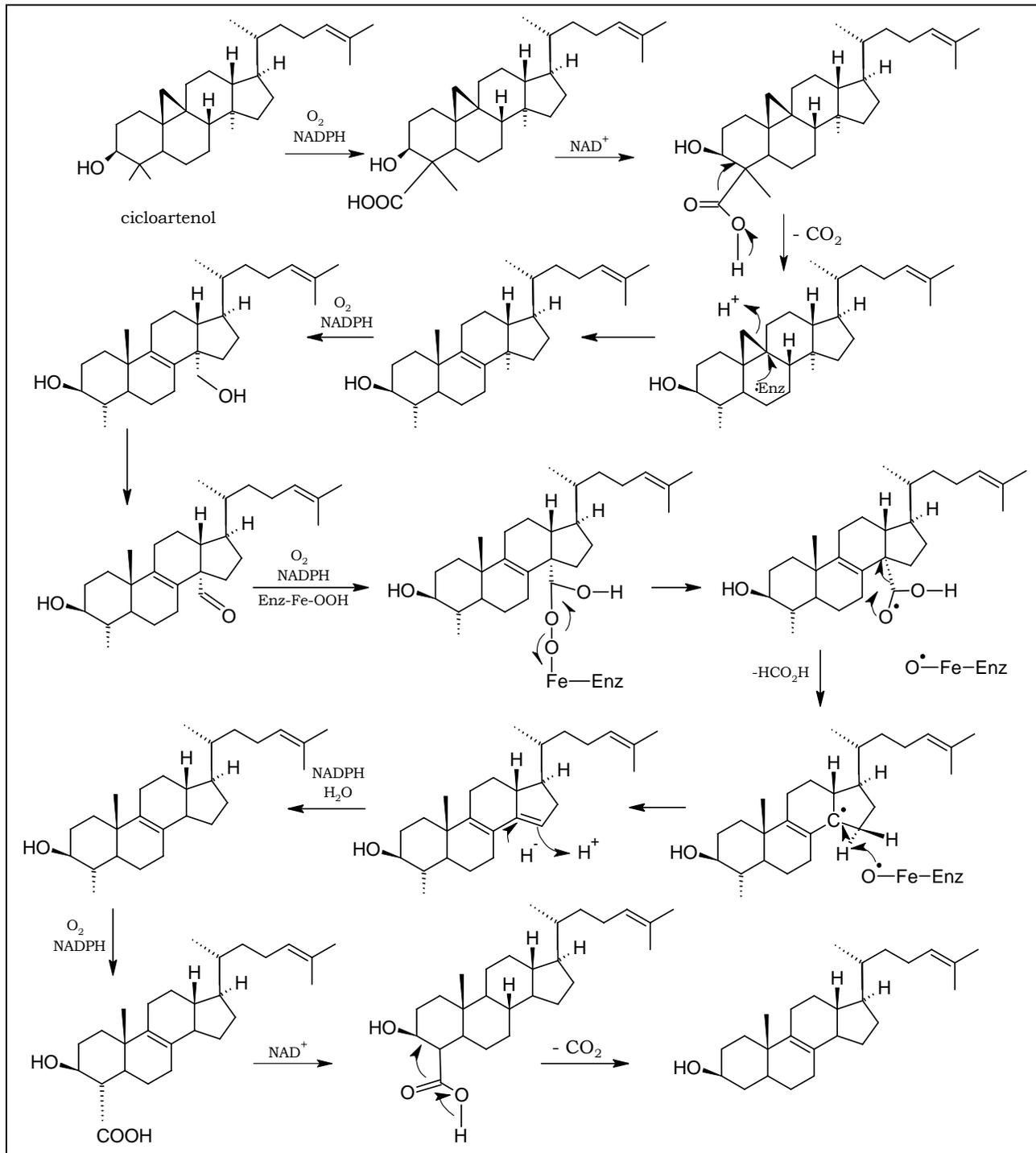


Figura 27 - Formação de colesterol em vegetais, a partir do cicloartenol

### I.6.2.4. Esteróides

Os fitoesteróides são triterpenóides são derivados de uma molécula de colesterol sem a presença das metilas de em C-4 e C-14 (figura 28). São caracterizados também pela presença de um carbono extra ou dois carbonos substituintes na cadeia lateral, ligados ao C-24. Estes esteróides são componentes estruturais das membranas das plantas e parecem ter um papel na proliferação celular (Robbers, 1997 e Dewick, 2002).

A figura 25 descreve a formação dos fitoesteróides mais comumente encontrados:  $\beta$  - sitosterol e o estigmasterol (Dewick, 2002).

Os carbonos substituintes da cadeia lateral têm como fonte a S-adenosilmetionina (SAM) (Berg, 2002).

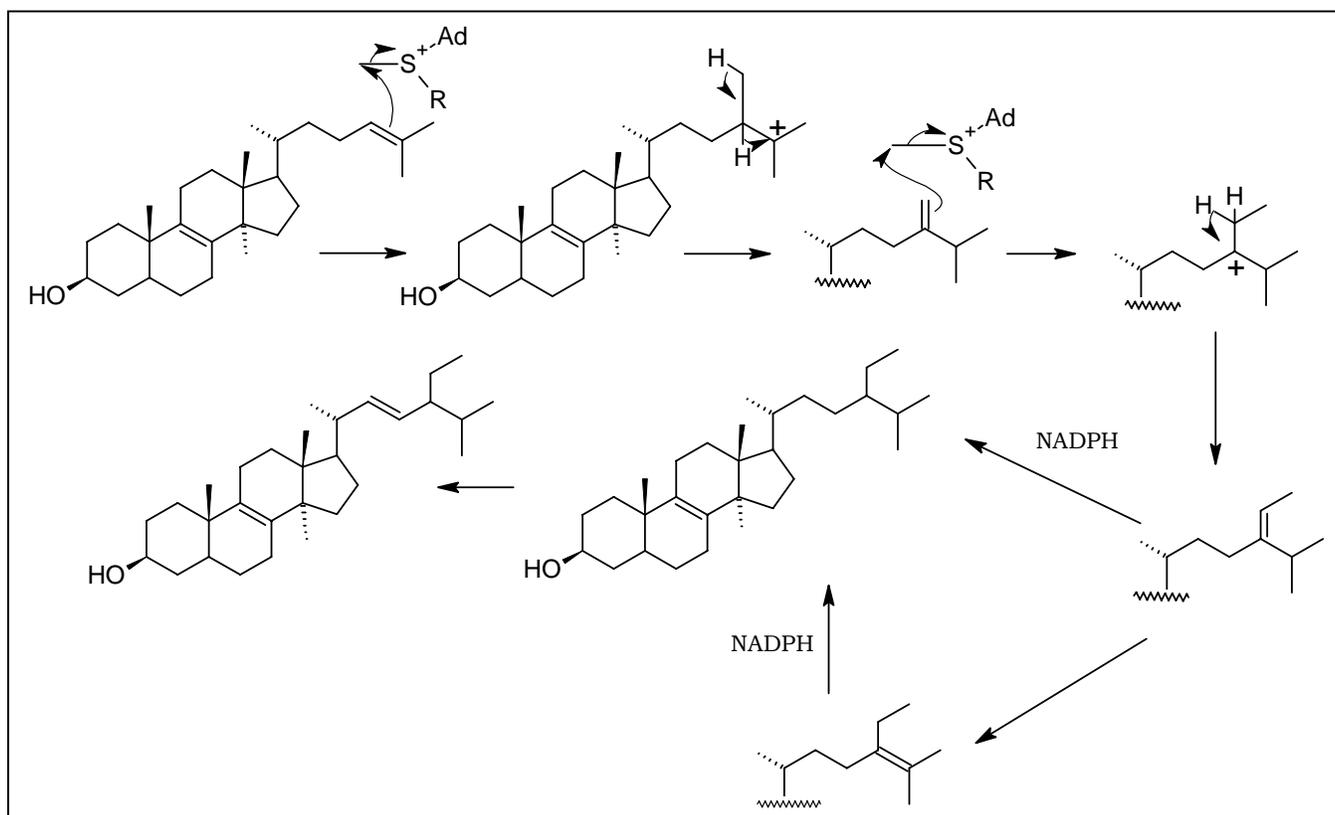
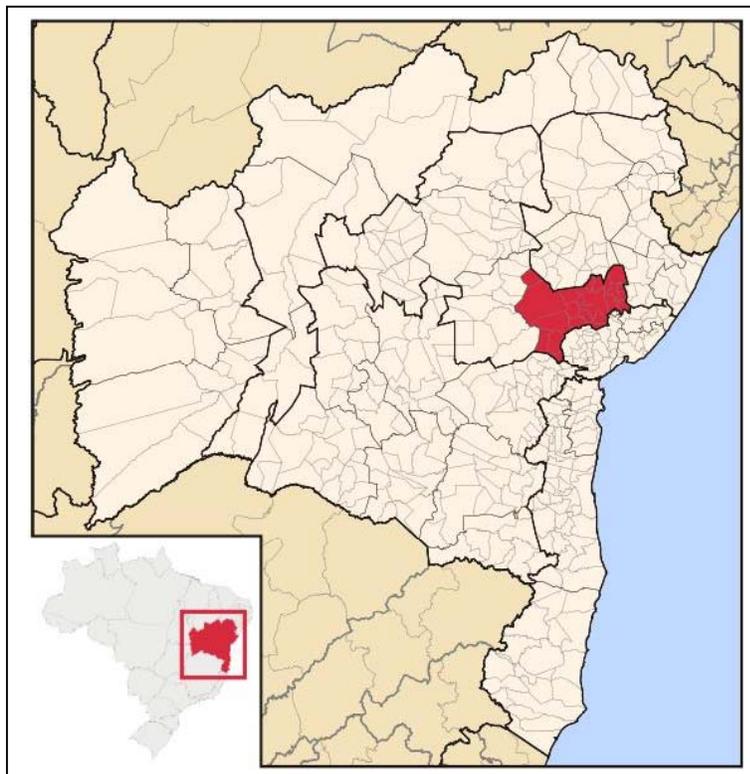


Figura 28 – Formação de estigmasterol e  $\beta$  - sitosterol, a partir da molécula do colesterol

## II. MATERIAL E MÉTODOS - *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil.

### II.1. Coleta e Identificação do Material Botânico

O caule de *Z. tingoassuiba* A. St. Hil. foi coletado no distrito de Jaíba em Feira de Santana – BA (figuras 29 e 30), no dia 8 de abril de 2004 e os frutos, no 12 de março de 2005 (figura 31), no mesmo local. Este material foi identificado pela Prof<sup>a</sup>. Maria Lenise da Silva Guedes, curadora do Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia; e suas exsicatas encontram-se catalogadas no ALCB, sob os números 66983 e 67894, respectivamente (figura 32).



Fonte: Wikipedia, 2006.

Figura 29 - Mapa da Bahia destacando a microrregião de Feira de Santana



Fonte: Silva, 2003. p.6

Figura 30 - Mapa do município de Feira de Santana - BA



Figura 31- *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil.



Figura 32 - Exsiccatas de *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil. n° 66983 e 67894; Herbário Alexandre Leal Costa (Instituto de Biologia – UFBA)

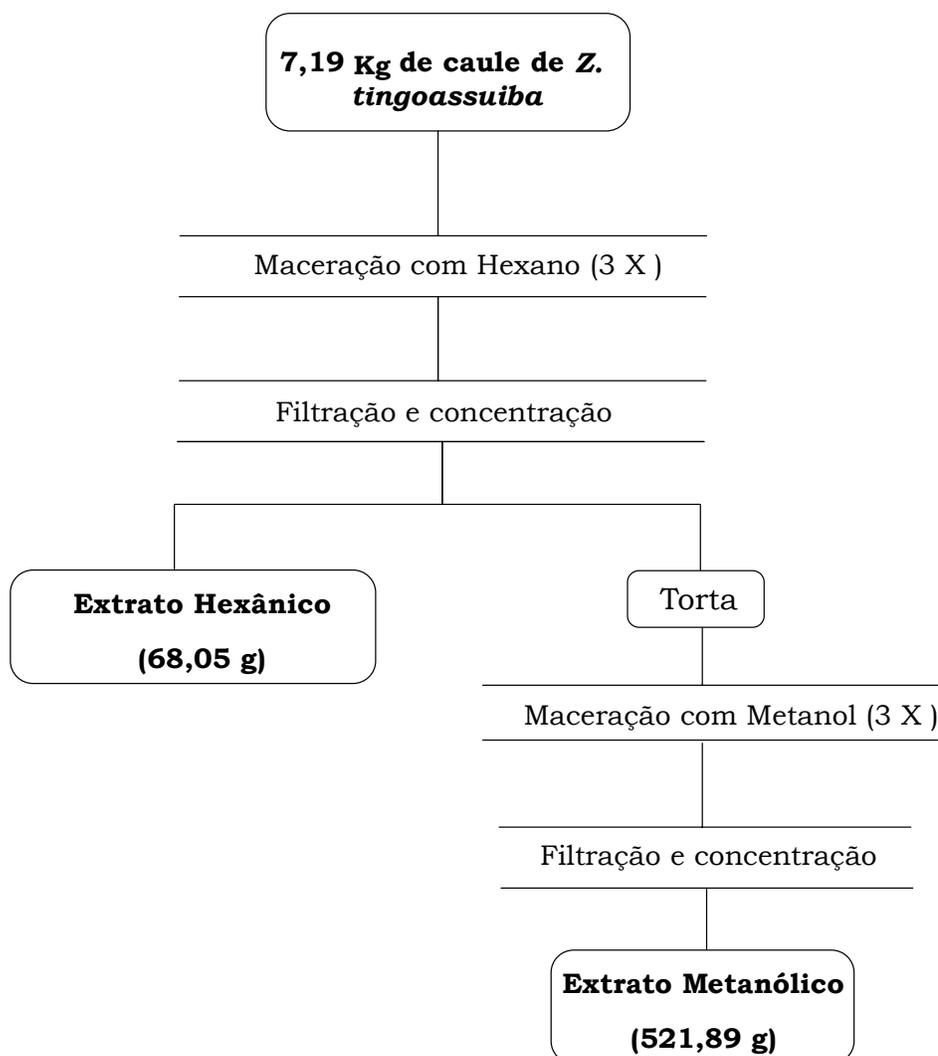
## II.2. Obtenção dos extratos

O caule de *Z. tingoassuiba* foi seco em estufa à temperatura de 30° C com circulação de ar, e triturado, obtendo-se uma massa de 7,19 Kg. O material moído foi submetido a três extrações sucessivas com cerca de 5,0L hexano e posteriormente, outras três extrações com 5,0L de metanol (esquema 3), objetivando a extração de substâncias mais polares.

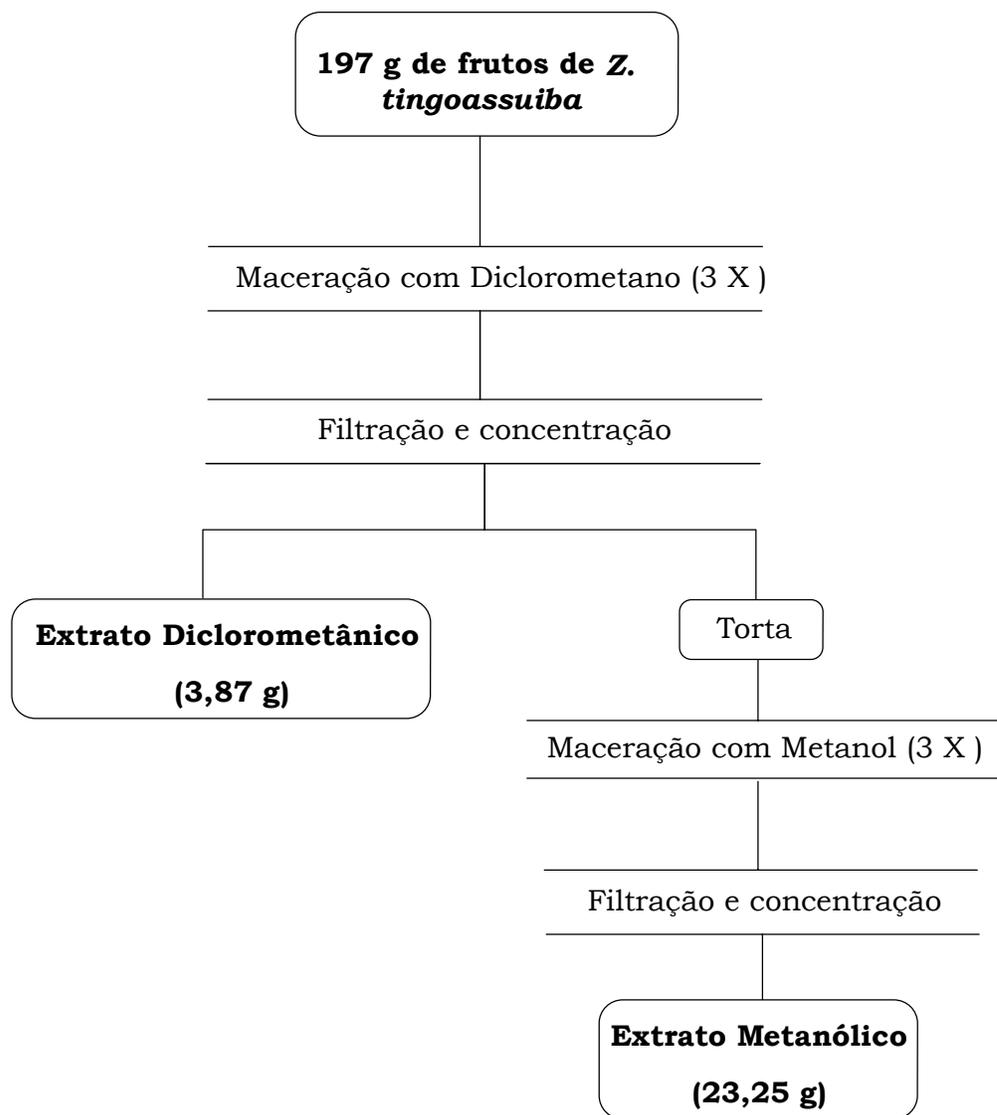
Os extratos dos frutos frescos imaturos de *Z. tingoassuiba* foram obtidos por maceração a frio, partindo-se de 197,0 g de material e utilizando como solventes extratores 1,5L de diclorometano e 1,5L de metanol (esquema 4).

Após filtração, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em rota evaporador e secos em capela e dessecador à vácuo até atingirem massas constantes.

Foi preparado também o extrato metanólico (com massa de 1,23 g) a partir de 100 g dos frutos imaturos, após estes serem submetidos ao processo de hidrodestilação. O extrato seco foi comparado com o extrato metanólico dos frutos frescos, através de CCDA e RMN de  $^1\text{H}$ . Ambos os extratos apresentaram mesmos resultados, escolhendo-se para trabalho o extrato dos frutos frescos por ter a maior massa.



Esquema 3. Fluxograma dos procedimentos realizados para a obtenção dos extratos hexânico e metanólico de caule de *Zanthoxylum tingoassuiba*



Esquema 4. Fluxograma dos procedimentos realizados para a obtenção dos extratos diclorometânico e metanólico dos frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba*

As tabelas 4, 5 e 6, a seguir, informam o rendimento dos extratos e massas das frações trabalhadas.

Tabela 4 – Rendimento dos extratos de *Zanthoxylum tingoassuiba*

<b>Extrato</b>	<b>Código</b>	<b>Material vegetal (g)</b>	<b>Massa Total de extrato</b>	<b>Rendimento</b>
Hexânico do Caule	CH	7.190,00 g	68,05 g	0,95 %
Metanólico do Caule	CM		521,89 g	7,26 %
Diclorometânico dos frutos	FRD	197,00 g	3,87 g	1,96 %
Metanólico dos frutos	FRM		23,25 g	11,80%

Tabela 5 – Frações do caule de *Z. tingoassuiba* e suas respectivas massas

<b>Frações</b>	<b>Massas</b>
<b>CH 2</b>	<b>4,09 g</b>
CH 2.13	471,60 mg
CH 2.21	78,70 mg
CH 2.26	226,60 mg
<b>CM</b>	<b>200,00 g</b>
CMH	820,00 mg
CMIC	1,05 g

Tabela 6 – Frações dos frutos de *Z. tingoassuiba* e suas respectivas massas

<b>FRAÇÕES</b>	<b>MASSAS</b>
<b>FRD</b>	<b>3,87 g</b>
FRD 3	165,90 mg
FRD 10	30,60 mg
FRD 11	116,78 mg
FRD 12	166,02 mg
FRD 13	716,83 mg
<b>FRM</b>	<b>29,97 g</b>
FRM 2	32,71 mg
FRM 5	75,69 mg
FRM 6	50,67 mg

FRM 10	19,74 mg
FRM 11	64,40 mg
FRM 12	46,11 mg
FRM 13	304,82 mg

### II.3. Isolamento de constituintes químicos de *Z. tingoassuiba*

#### II.3.1. Extrato hexânico do caule

Uma alíquota de 49,67 g do extrato hexânico do caule de *Z. tingoassuiba* (**CH**), obtido conforme o esquema 3, foi submetido a uma coluna filtrante, utilizando como eluentes os seguintes solventes, em ordem crescente de polaridade: Benzina de Petróleo, Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e Metanol (esquema 5).

Esta separação cromatográfica rendeu cinco frações: CH1, CH2, CH3, CH4 e CH5.

A fração hexânica (CH2), foi escolhida para trabalho a partir da análise das frações por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como agentes reveladores: UV, Dragendorff para detecção de alcalóides, cumarinas e flavonóides; KOH para confirmação da presença de cumarinas e Vanilina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – para álcoois com alto peso molecular, óleos essenciais, fenóis e esteróides. As frações também foram monitoradas por RMN de <sup>1</sup>H.

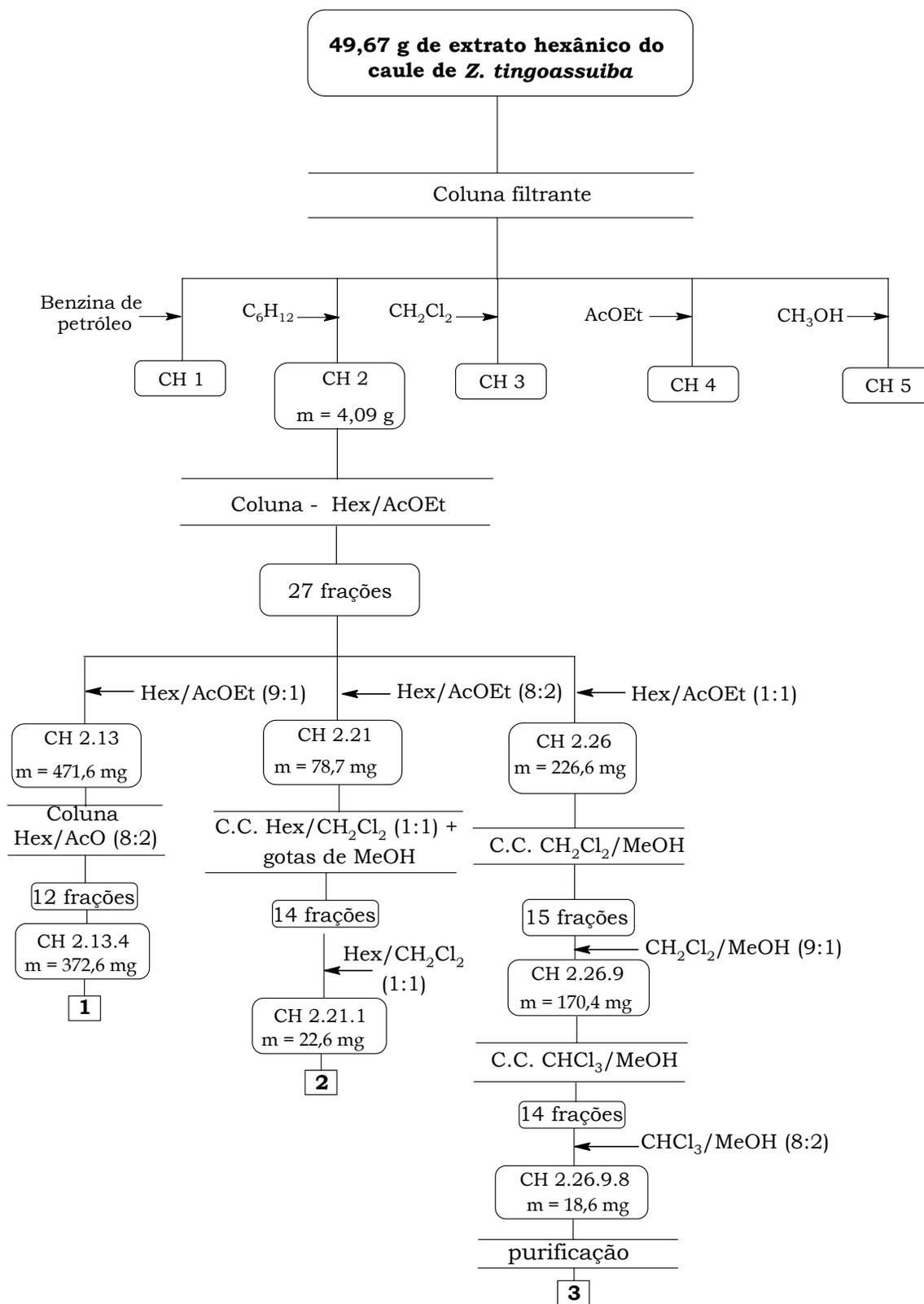
A fração CH2 foi separada por cromatografia em coluna clássica (CLC) e utilizou-se como eluente inicial Hexano puro, aumentando gradativamente a polaridade com o sistema Hexano/Acetato de Etila e até a eluição final com Acetato de Etila. Este procedimento resultou em 27 frações, após reunião por CCDA. Destas, as frações CH 2.13 obtida com Hex/AcOEt (9:1), CH 2.21 (8:2) e CH 2.26 (1:1) foram trabalhadas, com base em seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H.

A fração CH 2.13 foi submetida a uma cromatografia de coluna isocrática (Hex/AcOEt 8:2), obtendo-se 12 frações, após serem reunidas por CCDA. A quarta fração desta coluna foi identificada como o composto **1**.

Foi feita uma coluna para separar a fração CH 2.21, utilizando inicialmente Hexano/Diclorometano (1:1), com aumento de polaridade da mistura eluente com gotas de Metanol. Este procedimento resultou em 14 frações. A fração 01 retirada com Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) foi identificada como a substância **2**.

Foi realizada uma coluna da fração CH 2.26, o sistema eluente escolhido foi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH em gradiente de polaridade crescente, iniciando com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro e terminando com MeOH puro. Foram obtidas 15 frações. A fração 09 foi retirada da coluna com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) e submetida a uma nova separação por CLC com gradientes de CHCl<sub>3</sub>/MeOH, a fração 8 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 8:2) resultante deste processo foi purificada, utilizando-se CCD preparativa e resultou na substância **3** (com massa de 18,60 mg).

Todos os procedimentos com CH2 estão resumidos no esquema 5.



Esquema 5. Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato hexânico do caule de *Z. tingoassuiba*

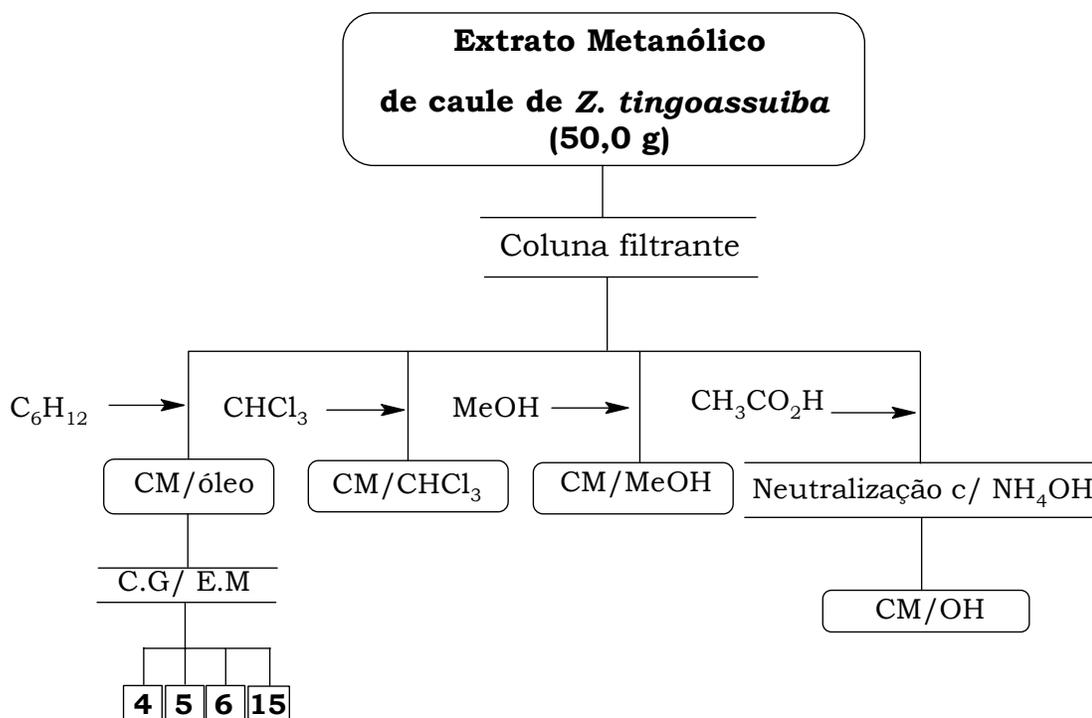
### II.3.2. Extrato metanólico do caule

Uma alíquota de aproximadamente 50 g do extrato metanólico (**CM**), obtido de acordo com o esquema 3 (p.54), foi particionada com os seguintes solventes: Hexano, Clorofórmio, Metanol e Ácido Acético, resultando em 4 frações: CM/óleo, CM/CHCl<sub>3</sub>, CM/MeOH e CM/OH.

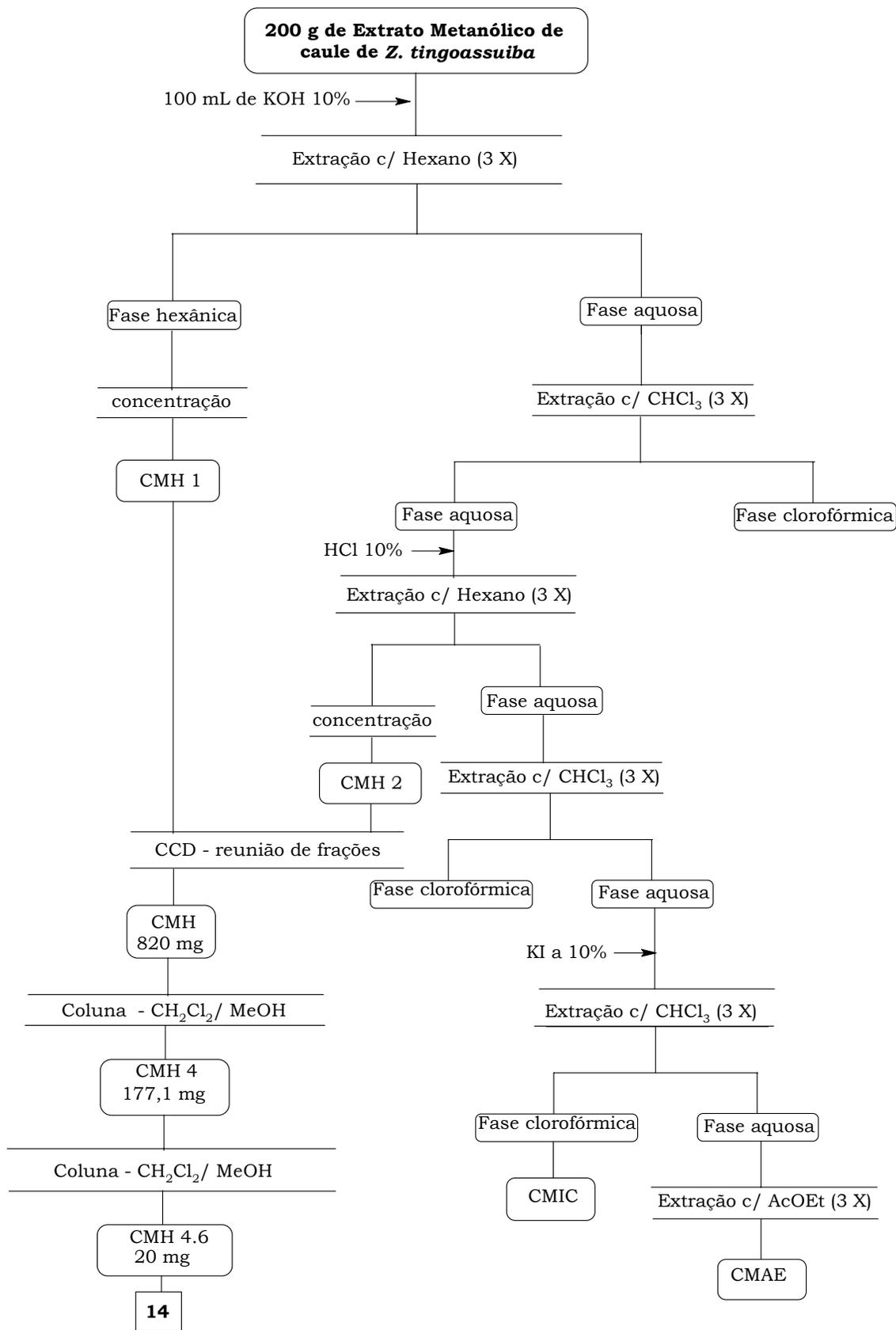
A fração hexânica CM/óleo, de massa 1,37 g, foi submetida a uma cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, obtendo-se três substâncias – **4**, **5**, **6** e **15** (esquema 6).

Com o objetivo de isolar alcalóides quaternários, uma alíquota deste extrato ( $\cong$  200 g) foi tratada com uma solução de 100 mL de KOH a 10% (p/v) e extraída com Hexano e Clorofórmio. A fase aquosa foi acidificada a pH 5-6 com HCl 10% (v/v) e novamente extraída com Hexano e Clorofórmio. Após acidificação da fase aquosa, acrescentou-se uma solução 100 mL de KI a 10% e houve uma nova extração com Clorofórmio e Acetato de Etila (esquema 7).

As frações hexânicas (CMH), obtidas no procedimento acima descrito, foram consideradas iguais através da comparação por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) e dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e foram reunidas, resultando em um resíduo de aproximadamente 820 mg, que foi submetido a uma cromatografia em coluna (C.C), utilizando inicialmente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro e aumentando a polaridade por acréscimo de metanol até finalizar com MeOH puro. As frações de 6 a 11 foram retiradas da coluna com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:1) e foram reunidas, formando a fração CMH4. Esta fração foi submetida novamente a uma coluna sob o mesmo sistema eluente. A fração 6 retirada com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2), com massa de 20 mg, desta coluna resultou na substância **14**.



Esquema 6. Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato metanólico do caule de *Z. tingoassuiba* por CG/E.M



Esquema 7. Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato metanólico do caule de *Z. tingoassuiba*

### II.3.3. Extrato diclorometânico dos frutos

O extrato diclorometânico de frutos (**FRD**) obtido através de procedimento descrito no esquema 4 (p.55), foi fracionado através de coluna cromatográfica clássica, utilizando misturas de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  em gradiente de polaridade, começando com Clorofórmio puro e terminando com MeOH puro como eluentes. Este procedimento resultou em 24 frações (esquema 8).

As frações trabalhadas foram escolhidas pelas massas (superiores a 20 mg) e pelos resultados da análise em CCDA com agentes reveladores como KOH, Dragendorff e U.V, além dos espectros RMN de  $^1\text{H}$ .

Mediante a estes critérios, foram selecionadas para trabalho as frações: FRD 3 (165,9 mg), FRD 8 (390,1 mg), FRD 10 (30,6 mg), FRD 11 (116,8 mg), FRD 12 (166,0 mg) e FRD 13 (716,8 mg).

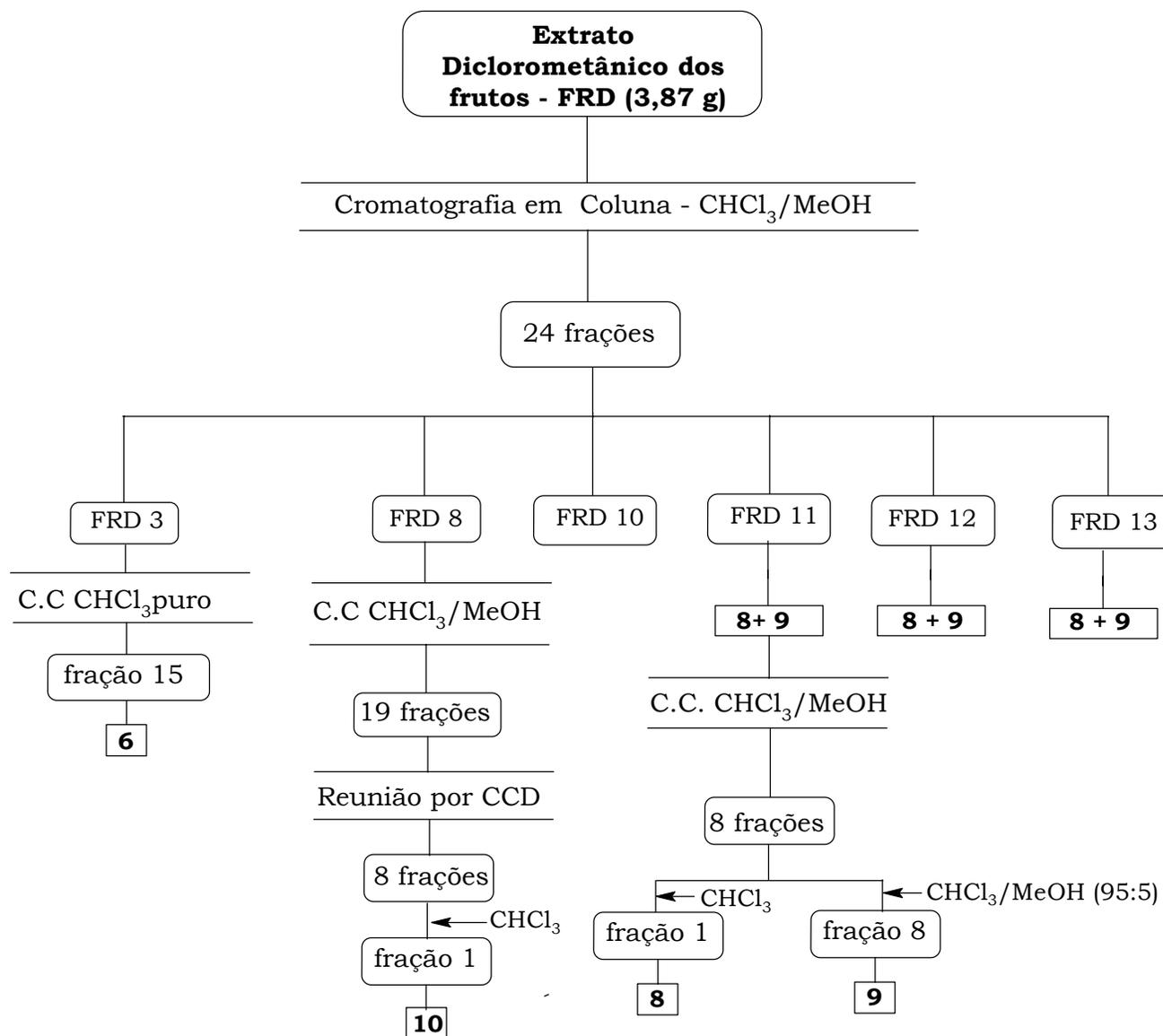
A fração FRD 3 foi purificada por C.C. isocrática, utilizando  $\text{CHCl}_3$  puro como eluente e a fração 15 (43,6 mg) da coluna foi identificada como a substância **6**.

A fração FRD 8 foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna, eluída inicialmente com Clorofórmio puro com aumento gradativo da polaridade por acréscimo de Metanol até a proporção 1:1 dos solventes. Sete frações foram obtidas, após reunião através de comparação por CCDA. A fração 1 retirada da coluna com Clorofórmio como eluente foi reconhecida como o composto **10** (26,7 mg).

As frações FRD 11, 12 e 13 foram identificadas através de RMN de  $^1\text{H}$  como uma mistura das substâncias **8** e **9**, numa variação quantitativa: as frações 11 e 12 tinham a substância **9** como majoritária e FRD 13 continha como composto principal **8**.

Uma coluna de média pressão eluída com uma mistura de  $\text{CHCl}_3$  e MeOH foi feita com FRD 11 e obteve-se 8 frações. A primeira fração desta coluna eluída com  $\text{CHCl}_3$  puro resultou na purificação da substância **9** (68

mg) e oitava fração retirada com Clorofórmio/Metanol (95:5) resultou em **8** (23,1 mg).



Esquema 8. Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato diclorometânico dos frutos de *Z. tingoassuiba*

#### II.3.4. Extrato metanólico dos frutos

O extrato metanólico de frutos (**FRM**), com massa de aproximadamente 23,25 g, foi submetido a uma separação cromatográfica em coluna de média pressão, utilizando como eluente a mistura de clorofórmio e metanol, em ordem crescente de polaridade, começando com Clorofórmio puro e terminando com MeOH puro como eluentes. Foram obtidas 28 frações, das quais, foram trabalhadas FRM 5 (99:1), FRM 6 (99:1), FRM 10 (98:2), FRM 11 (98:2), FRM 12 (98:2) e FRM 13 (98:2) (esquema 9), seguindo os mesmos critérios descritos para a obtenção das substâncias de FRD.

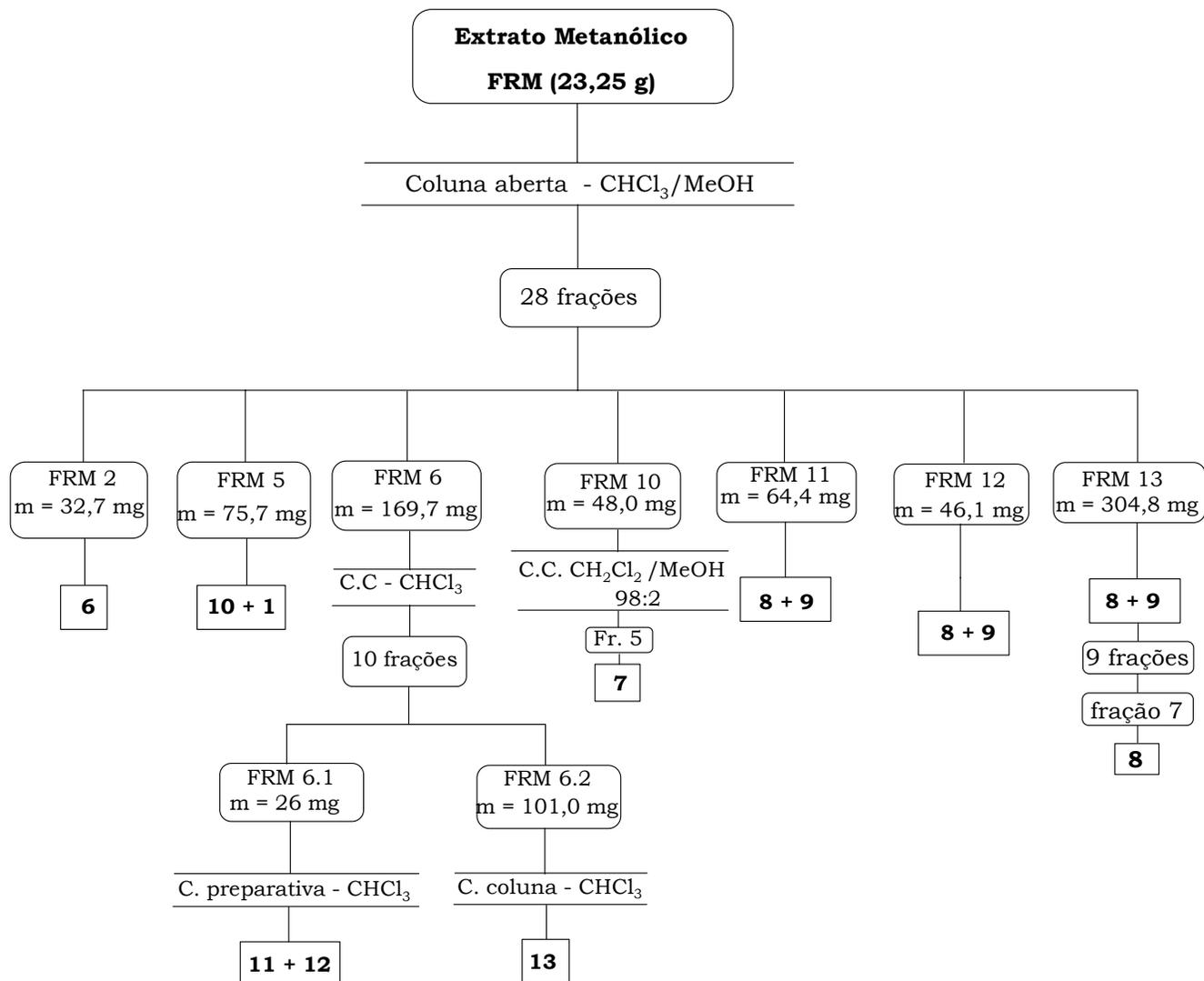
Identificou-se na fração FRM 5, a mistura das substâncias **1** e **10**.

A fração FRM 6 de massa 169,7 mg foi separada em coluna cromatográfica isocrática, eluída com clorofórmio. Foram obtidas 10 frações. A fração FRM 6.1 foi purificada através de cromatografia preparativa, resultando em uma mistura das substâncias **11** e **12** (22,9 mg). A fração FRM 6.2 foi reconhecida como sendo o composto **13** (20,4 mg).

A fração FRM 10 foi purificada através de uma coluna cromatográfica eluída com Diclorometano/ MeOH (98:2) e a fração 5 resultou em **7**.

As frações FRM 11, 12 e 13 apresentaram da mesma maneira que as frações FRD 11, 12 e 13 a mistura das substâncias **8** e **9**.

A fração FRM 13 foi escolhida para ser purificada através de coluna cromatográfica eluída com CHCl<sub>3</sub> e MeOH em mistura, iniciando a eluição com CHCl<sub>3</sub> puro e terminando MeOH puro. Este procedimento resultou em 9 frações, obtendo-se a substância **8** (33,1 mg), na sétima fração da coluna eluída com CHCl<sub>3</sub>/MeOH na proporção 95:5.



Esquema 9. Fluxograma do isolamento de substâncias do extrato metanólico dos frutos de *Z. tingoassuiba*

### II.3.5. Testes Biológicos de extratos brutos frações de *Z. tingoassuiba*

A atividade antimicrobiana foi avaliada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da UFBA por alunos de iniciação científica sob coordenação da Profa. Dra. Tânia Barros. Os ensaios foram realizados pelo método de difusão com discos padronizados pelo CLSI (antigo NCCLS), utilizando os seguintes microrganismos padrões: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835), *Micrococcus luteus* (ATCC9341), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC15442), *Salmonella cholerea suis* (ATCC 10708) e *Candida albicans* (ATCC 10231) (NCCLS, 2002).

Caso apresentassem resultados positivos, seriam testados também frente às amostras clínicas (isolados clínicos) obtidas em cooperação com o Hospital Santo Amaro (Fundação José Silveira), contendo: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus grupo C*, *Enterococcus faecalis*, *Rhodococcus equi*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii*.

Estudou-se também o comportamento do extrato metanólico do caule de *Zanthoxylum tingoassuiba* em células de glioblastoma humano para prever sua utilização em futuros estudos de proteção antioxidante. Empregou-se cultura de células GL-15 de glioblastoma humano para se testar a toxicidade desses extratos e suas atividades antioxidantes. A atividade citotóxica do extrato foi evidenciada pela mensuração de cristais de formazan por um leitor de microplacas, 72h após tratamento. Estes cristais são formados a partir do metabolismo do MTT pelas desidrogenases mitocondriais. Para se estudar a atividade antioxidante, induziu-se um estresse oxidativo nas células provocado pela ação do catecol e tratou-se as células com diferentes concentrações do extrato (Castigli, 2006; Pereira, 2004).

Esta etapa de testes foi realizada no laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA pela aluna de iniciação científica

Fernanda Antunes sob coordenação do prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá.

#### **II.4. Reagentes e equipamentos utilizados**

- Os solventes utilizados: Benzina de petróleo, Hexano, Acetato de etila, Clorofórmio, Diclorometano e Metanol foram das marcas Vetec, Quimex, Synth, CRQ, Qhemis e Merck, além de metanol cedido pela Metanor S/A; todos de grau analítico.
- Para obtenção dos espectros foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado da marca CIL com tetrametilsilano (TMS) e tubos do tipo Gold Label (5 mm) Aldrich.
- Os caules foram triturados no moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4.
- Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo da marca Fisatom.
- Para as cromatografias em camada delgada foram usadas placas plásticas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> 20 X 20 cm e sílica gel 60 PF<sub>254</sub> para cromatografia preparativa, ambas da marca Merck. As placas foram preparadas, espalhando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro.
- Nas cromatografias em camada delgada preparativa foram utilizadas placas de sílica LHP-KF, 20X10 cm (Whatman).
- Nas separações cromatográficas em coluna foram usadas sílica gel 60 (70-230 mesh/ 0,063-0,200 mm/ 40-63 µm) das marcas Merck e Vetec.
- Os cromatogramas foram revelados através de irradiação de lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm, vapores de iodo e reveladores químicos como Dragendorff e Vanilina/Ácido Sulfúrico.

- Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) e de DEPT 135° foram obtidos nos espectrômetros Varian Gemini 300 e Mercuri 300, localizados no Instituto de Química da UFBA e no Instituto de Ciências Exatas e da Terra da UFMT, respectivamente.
- Os espectros de massas foram obtidos, utilizando-se um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG), marca Perkin Elmer, equipado com uma coluna capilar com 30 metros de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C permanecendo assim durante 1 minuto. A seguir a temperatura foi elevada em 3°C por minuto até que atingisse 240°C e depois, aumentou-se a temperatura 10°C por minuto até 280°C. O tempo total da análise para cada amostra foi de aproximadamente 100 minutos. O aparelho encontra-se no Lapesca – Faculdade de Farmácia – UFBA.
- Os espectros de ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro marca FEMTO – 800XI no LAPEMM - Faculdade de Farmácia da UFBA.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### III. 1. Identificação de substâncias isoladas ou determinadas do caule e frutos de *Z. tingoassuiba*

O estudo da composição química de *Z. tingoassuiba* levou a identificação e/ou isolamento de 5 cumarinas, 3 alcalóides, 1 lignana, 4 terpenóides e 2 esteróides.

A identificação das substâncias fundamentou-se basicamente na análise dos dados espectroscópicos de UV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura. A determinação estrutural dos compostos em mistura foi possível, porque estes são conhecidos e típicos de espécies de Rutaceae, além de apresentarem sinais de RMN característicos.

A discussão sobre as substâncias a seguir será apresentada por classificação química dos metabólitos. (figuras 33 e 34).

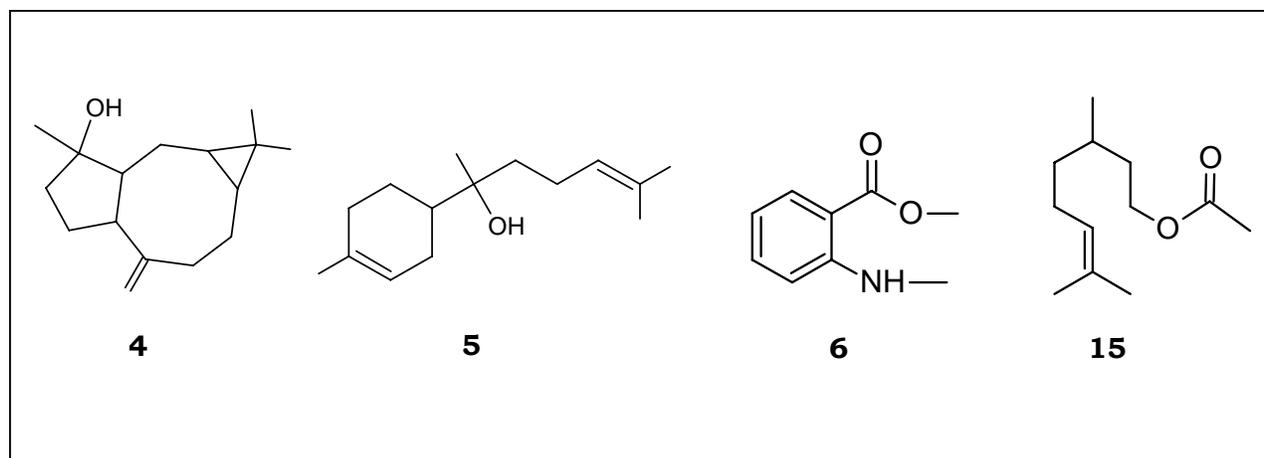


Figura 33 – Constituintes químicos do extrato metanólico de caule identificados por CG/EM

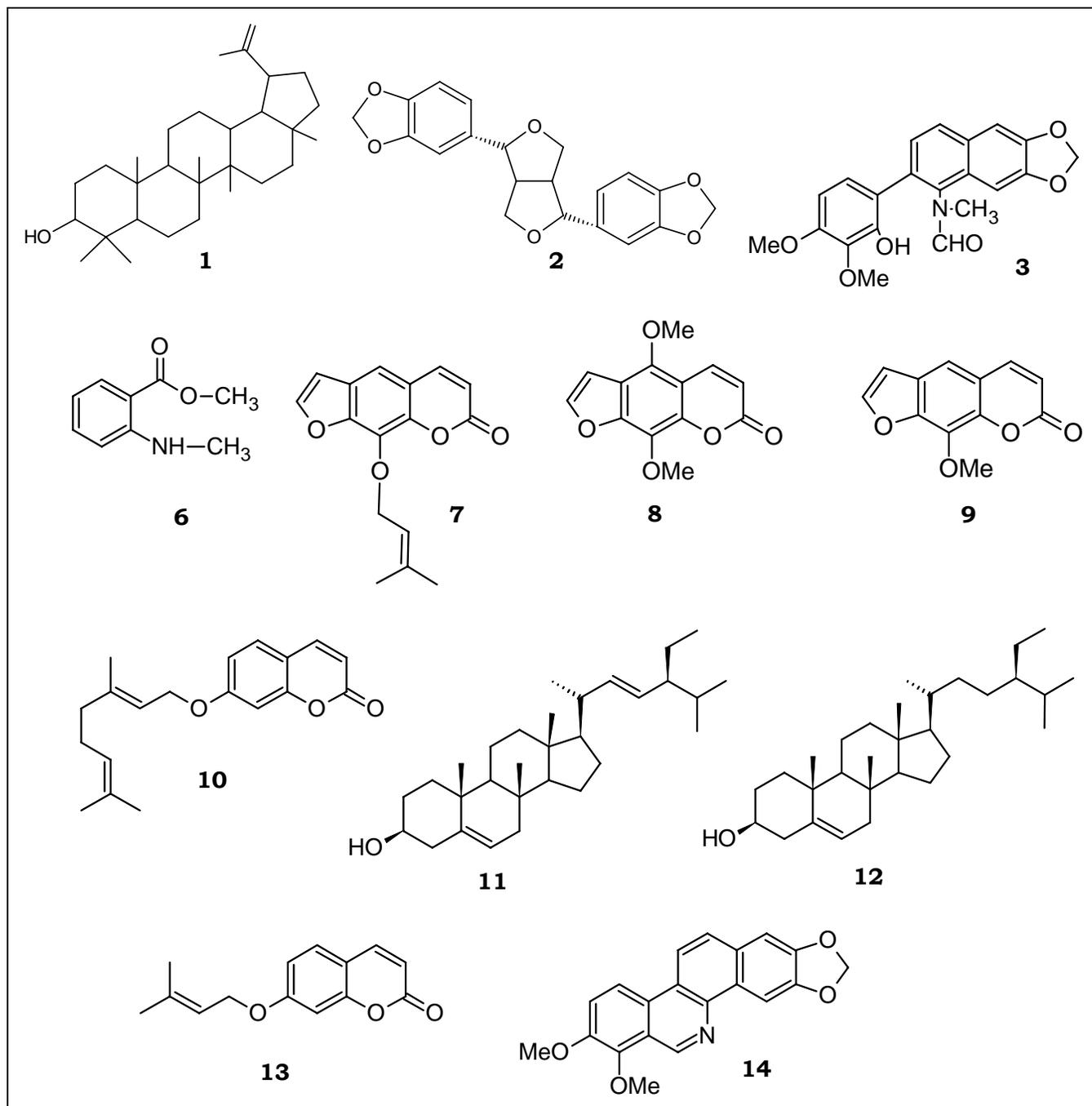
Figura 31 – Substâncias identificadas nos extratos de caule e frutos de *Z. tingoassuba*

Tabela 7 – Substâncias e partes vegetais em que foram extraídas

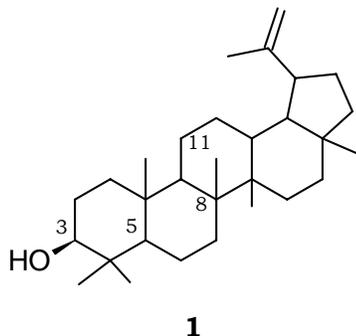
<b>Parte da Planta</b>	<b>Extrato</b>	<b>Códigos</b>	<b>Substâncias</b>
Caule	Hexânico	CH	1, 2, 3
Caule	Metanólico	CM	4, 5, 6, 14 e 15
Frutos	Diclorometânico	FRD	6, 7,8, 9, 10
Frutos	Metanólico	FRM	1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13

Tabela 8 – Substâncias e frações

<b>Fração</b>	<b>Substâncias</b>
CH 2.21	2
CH 2.13.4	1
CH 2.26.9.8	3
CM óleo	4, 5, 6, 15
FRD 3 e FRM 2	6
FRM 6.1	11, 12
FRM 6.2.4	13
FRD 8 e FRM 5	1, 10
FRD e FRM 11,12 e 13	8, 9
FRM 4, FRM 8 e FRM 10	1, 7, 8
CMH 4.6.2	14

### III.1.1. Terpenóides

#### Substância 1



A partir da fração CH 2.13.4 (esquema 5, p.59) foram obtidos 372, 6 mg da substância **1**, que cristaliza na forma de agulhas incolores.

Este composto também foi detectado em frações diclorometânica e metanólica dos frutos e no extrato metanólico do caule.

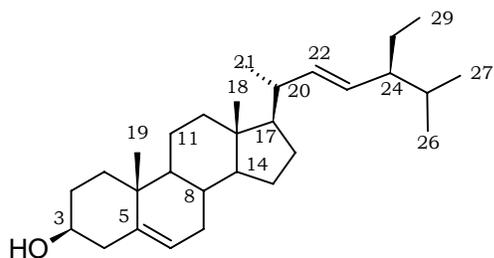
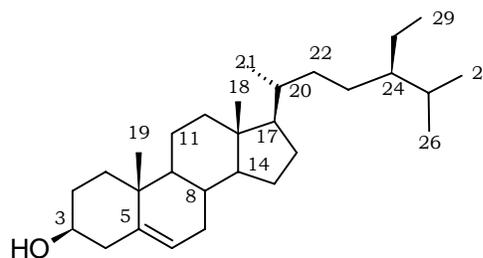
O composto foi identificado por RMN  $^1\text{H}$ , através de sinais característicos: dois simpletos em  $\delta$  4,68 e 4,69, referentes aos hidrogênios da dupla ligação terminal, um duplo duplete em  $\delta$  3,19 ( $J= 5,5$  e  $J= 10,95$ ) que indica a presença do hidrogênio ligado a um carbono carbinólico e a existência de sinais situados entre  $\delta$  0,5 e 2,0 referentes às metilas existentes, sendo que o simpleto em  $\delta$  1,67 com integral para três hidrogênios, é característico de grupo metílico ligado a dupla ligação.

De acordo com esses dados e comparação com a literatura, propôs-se para **1**, a estrutura do **lupeol**. (Siddiqui *et al.*, 1988 e Ferracin, 1992).

Entre as espécies de Rutaceae regionais estudadas, apenas em *Andreadoxa flava* não foi encontrado o lupeol. Esta substância apresenta ação antitumoral (Saleem *et al.*, 2005), antiinflamatória e antiartrítica (Agrawal e Rangari, 2003), além de apresentar ação inibitória contra o *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária (Facundo *et al.*, 2005).

### III.1.2. Esteróides

#### Substâncias 11 e 12

**11****12**

A fração FRM 6.1 obtida após procedimento descrito no esquema 9 (p.59), forneceu 13 mg de um sólido branco, que foi identificado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como sendo uma mistura binária de **11** e **12**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta uma grande quantidade de sinais intensos na região de  $\delta$  2,20 – 0,60, atribuídos aos grupos metílicos e metilênicos de esteróides. Um triplo tripleto em  $\delta$  3,51 ( $J=10,8$  e  $4,2$  Hz) indica um hidrogênio axial (H-3), ligado a um carbono carbinólico (C-3 do esqueleto ciclopentanoperihidrofenantreno). O duplete  $\delta$  5,35 ( $J=4,6$  Hz) foi atribuído ao H-6.

Os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  5,0 e 5,1 ( $dd$ ,  $J=8,4$  e  $J=15,1$  Hz) sugeriram a presença de uma ligação dupla di-substituída e foram atribuídos aos dois hidrogênios H-22 e H-23 de **11**.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  exibiu os sinais em  $\delta$  121,6 e  $\delta$  140,7 e também em  $\delta$  129,2 e 138,2 referentes às duplas ligações entre os carbonos C-6 e C-5 e C-23 e C-22 de **11**, respectivamente.

A análise destes dados e a comparação com a literatura permitiram identificar a presença dos fitoesteróides Estigmasterol (**11**) e  $\beta$ -Sitosterol (**12**) (Della Greca et al., 1990; Ferracin, 1992; Ahmad et al. 1992).

Estes esteróides ocorrem em todos os vegetais. Apresentam propriedades físicas e espectroscópicas muito semelhantes e por este motivo são de difícil separação (Januário, 1995).

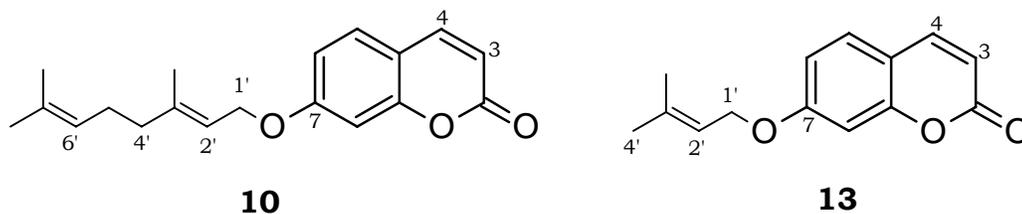
A tabela 10 (p. 90) apresenta os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  destas substâncias.

### III.1.3. Cumarinas

O fracionamento dos extratos metanólico e hexânico de frutos de *Z. tingoassuiba*, de acordo com os esquemas 9 e 10, resultou em 5 compostos (**7**, **8**, **9**, **10** e **11**).

As substâncias encontradas apresentam em seus esqueletos duas características comuns: a presença do oxigênio em C-7 e hidrogênios em C-3 e C-4 (anel não substituído), representados no espectro RMN  $^1\text{H}$  por dois dupletos, com  $J=9,5-10$  Hz em  $\delta$  6,1-6,4 e 7,5-8,3 referentes à H-3 e H-4, respectivamente (Steck e Mazurek, 1972).

#### III.1.3. 1. Cumarinas o-preniladas



#### Substâncias 10 e 13

Foram identificadas nas frações FRM 5 e FRM6.2, dos frutos de *Z. tingoassuiba*, as substâncias **10** e **13**, respectivamente (esquema 9, p.66).

A análise de seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  permitiu observar dois dupletos em  $\delta$  7,64 e 6,18 ( $J=9,3$  Hz) referentes aos hidrogênios da dupla ligação C-4 e C-3, respectivamente e, a presença de três sinais distintos na região aromática correspondentes aos hidrogênios H-5 ( $\delta$  7,35 *d*,  $J=9,5$  Hz), H-6 ( $\delta$  6,80 *dd*,  $J=8,4$  e  $2,1$  Hz) e H-8 ( $\delta$  6,77,  $J=2,1$  Hz).

Observa-se ainda o duplete em  $\delta$  4,51 (2H,  $J=6,7$  Hz), referente ao hidrogênio H-1' do carbono ligado ao oxigênio em C-7, além de sinais de H-2' ( $\delta$ 5,41 *t*,  $J=6,5$  Hz). A diferença entre as substâncias se evidencia na ausência do sinal de H6' ( $\delta$  5,05 *m*) em **13**.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabela 11) das substâncias **10** e **13** apresentaram semelhanças nos sinais. Destacam-se: os três sinais acima de  $\delta$  150,0 referentes aos carbonos quaternários ligados aos oxigênios de C-2 ( $\delta$  161,0), C-7 ( $\delta$  162,0) e C-8a ( $\delta$  155,5); os sinais de C-3 ( $\delta$ 112,0) e C-4 ( $\delta$ 144,0) e pode-se diferenciá-los pela ausência dos sinais  $\delta$  123,5 e 131,7 no espectro de **13**, referentes aos carbonos C-7' e C-6'.

A análise destas informações, juntamente com a comparação com os dados de literatura, permitiu propor para **10**, a estrutura do aurapteno (7-geraniloxicumarina) (Chen *et al.*, 1995; Januário, 1995 e Müller, 1994) e para **13**, a estrutura da o-prenilumbeliferona (7-preniloxicumarina) (Steck e Mazurek, 1972).

Apesar de ambas as substâncias serem bem descritas e comuns em Rutaceae, este é o primeiro relato da 7-preniloxicumarina (**13**) no gênero *Zanthoxylum*.

### III.1.3. 2. Furanocumarinas

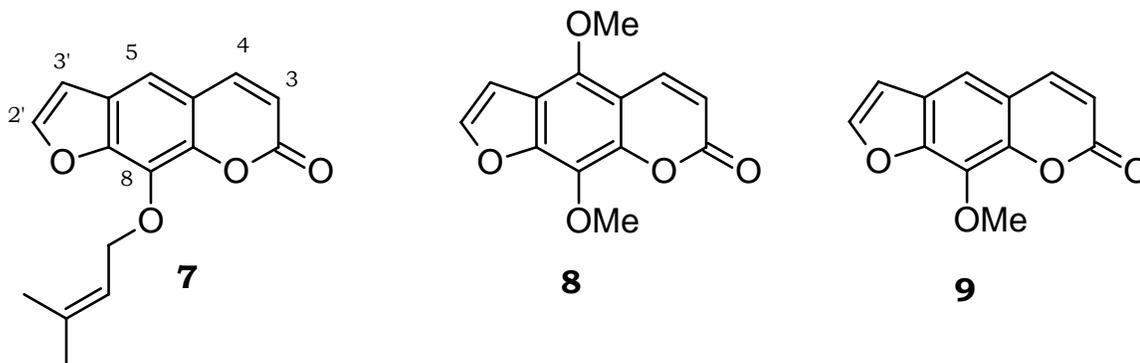
As furanocumarinas têm sido encontradas principalmente na família Rutaceae. Os tipos mais comuns são as furanocumarinas lineares, dentre elas, o bergapteno (5-metoxipsoraleno) e a xantotoxina (8-metoxipsoraleno) apresentam ocorrência bastante difundida (Gray, 1983) e possuem atividade larvicida (Stevenson *et al.*, 2003).

Estas substâncias também são conhecidas como psoralenos e são utilizadas na medicina associadas com raios UV-A para o tratamento de vitiligo e discromias da pele (Dewick, 2002).

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , as furanocumarinas são identificadas pelos dupletos decorrentes do acoplamento entre os hidrogênios H-2' ( $\delta$  7,5-7,7) e H-3' ( $\delta$  6,7-7,2) do anel furano ( $J=2,5$  Hz), enquanto H-2' praticamente não varia, H-3' pode fornecer informações importantes sobre os substituintes do anel aromático através dos efeitos de acoplamento a longa distância (Steck e Mazurek, 1972).

Nas furanocumarinas lineares, por exemplo, o H-3' encontra-se mais protegido, devido à eletronegatividade do oxigênio, enquanto que, nas angulares, os valores de deslocamento de H-3' estão sempre acima de  $\delta$  7,1, devido a interação com o orbital antiligante do oxigênio do anel lactônico.

A linearidade destas cumarinas ainda pode ser demonstrada pelo aumento dos valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e/ou metoxilas encontrados nas posições 5 e 8, que são mais desprotegidos em relação ao seus correspondentes angulares, devido aos efeitos estéricos na posição 5, repulsão dos pares de elétrons não-ligantes e eletronegatividade dos oxigênios em 8.



### Substâncias 7, 8 e 9

A substância **7** identificada na fração FRM 10, obtida através do procedimento descrito no esquema 9 (p.66), foi identificada por seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação cromatográfica com padrão isolado e purificado de *Z. stelligerum* (Silva, C.V. *et al.*, 2002)

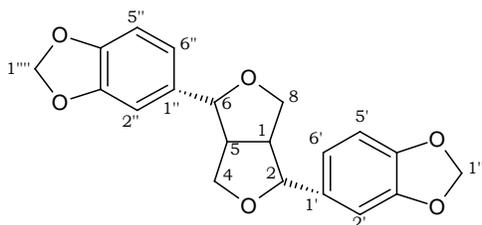
Além dos sinais tipo AX de H-3 e H-4 e AB de H-2' e H-3' característicos do anel furano, a imperatorina (**7**) pode ser identificada principalmente: pelo simpleto em  $\delta$  7,31 correspondente ao H-5, pelos hidrogênios da prenila: duplete em  $\delta$  4,32 ( $J=7,2$  Hz) referente ao H-1', triplete em  $\delta$  5,58 ( $J=7,2$ ) de H-2' e dois simpletos em  $\delta$  1,73 dos hidrogênios metílicos.

As cumarinas **8** e **9** foram obtidas, de acordo com os esquemas 8 (p.64) e 9 (p.66) e puderam ser reconhecidas inicialmente pelos sinais dos prótons das posições 3 e 4. Esta última, apresentou uma desproteção maior em **8**, indicando a presença de substituinte em C-5, o que foi confirmado por 1 simpleto em  $\delta$  4,10 correspondente aos hidrogênios de duas metoxilas. Os sinais de **9** que foram observados: um simpleto em  $\delta$  7,3, correspondente ao H-5 e um simpleto em  $\delta$  4,20 dos hidrogênios da metoxila em C-8, obtendo-se **9**.

Estas informações, em conjunto com os dados do RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, permitiram identificar inequivocadamente as estruturas como sendo a isopimpinellina (**8**) e a xantotoxina (**9**) (Müller, 1994).

### III.1.4. Lignanans

#### Substância 2



**2**

Uma massa de 78,7 mg da substância **2** foi obtida do extrato hexânico de caule, de acordo com o esquema 5 (p.55) e identificada por espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e ultravioleta comparados com dados da literatura (Hsieh et al., 2005).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu a observação dos sinais característicos: o simpleto em  $\delta$  6,85 (H-2' e H-2''), o duplete em 6,85 (H-6' e H-6'' e H-5' e H-5'') e o simpleto em  $\delta$  5,96, correspondente aos hidrogênios dos dois grupos metilenodioxí (H1''' e H1'''). Os sinais restantes:  $\delta$  3,05 (2H, dd, H-1 e H-5), 3,87 (2H, dd,  $J=8,4$  e  $4,0$  Hz; H-4 e H-8 axiais), 4,23 (2H, m, H-4 e H-8 equatoriais), 4,71 (2H, d,  $J=4,4$  Hz, H-2 e H-6) caracterizam uma lignana furofurânica com plano de simetria.

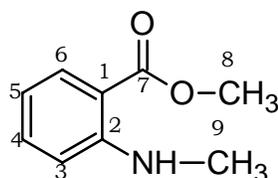
O espectro de UV da lignana foi obtido em EtOH e apresentou absorção  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $28 \times 10^{-6}$  mol/L) em: 204, 231 e 285 nm.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou os sinais: 148,2 (C-4', C-4''), 147,9 (C-3', C-3''), 135,2 (C-1', C-1''), 119,5 (C-6', C-6''), 108,4 (C-5', 5''), 106,7 (C-2', C-2''), 101,3 (OCH<sub>2</sub>O), 86,0 (C-4, C-8), 71,9 (C-2, C-6), 54,5 (C-1, C-5); confirmando a estrutura da sesamina (**3**).

A sesamina é a lignana mais comumente encontrada, além de ser conhecida pela sua alta resistência à oxidação, tem ação antiinflamatória e influência na diminuição da atividade de enzimas lipogênicas (Hsieh et al., 2005).

### III.1.5. Alcalóides

#### III. 1.5.1. Substância 6



**6**

O procedimento descrito nos esquemas 7, 9 e 10 (p.57, 58 e 59) resultou no isolamento de 198,6 mg de um cristal amarelo, que foi identificado como o composto **6**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta como sinais dos hidrogênios aromáticos atribuídos à: H-6 - um duplo duplete em  $\delta$  7,88 ( $J=$  6,8 e 1,8 Hz); H-5 - um tripleto em  $\delta$  6,58 ( $J=$  6,8 Hz); H-4 - um multiplete em  $\delta$  7,35 e H-3 - um duplete em  $\delta$  6,67 ( $J=$  8,7 Hz).

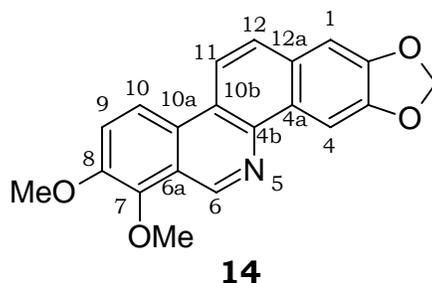
O simpleto encontrado em  $\delta$  3,84 corresponde aos três hidrogênios do carbono metílico (C-8). Já o simpleto em  $\delta$  2,90 é atribuído aos hidrogênios da N-metila.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  exibiu dois sinais: um em  $\delta$  168,9, referente ao carbono carboxílico (C-7) e o outro em  $\delta$  151,8 do carbono quaternário ligado ao grupamento N-metila (C-2). Foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-1, C-3, C-5, C-6 e C-4; os sinais:  $\delta$  109,8,  $\delta$  110,6,  $\delta$  114,2,  $\delta$  131,4,  $\delta$  134,5; respectivamente.

Os sinais correspondentes aos carbonos das metilas C-8 em  $\delta$  51,3 e C-9 em  $\delta$  29,5 são consistentes com os dados descritos para o **N-metilantranilato de metila** (Yuanzheng et al., 1993).

Esta substância é considerada responsável pelo sabor amargo e odor adocicado do óleo da casca e folhas de Rutaceae comestíveis do gênero *Citrus* como: tangerina (Lota et al., 2000), limão, grapefruit e laranja (Thomas e Bassols, 1992).

### III. 1.5.2. Substância 14



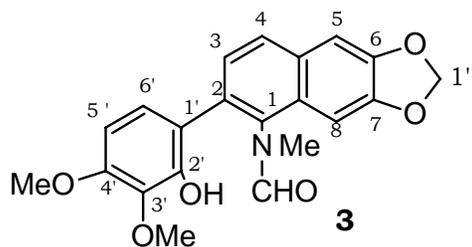
Após fracionamento do extrato hexânico CMH (esquema 6, p.56), obteve-se a fração CMH 4.6.2, um cristal amarelo com massa de 20 mg identificado em mistura com a substância **3**, como o composto **14**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **14** observa-se na região aromática, a presença dos seguintes sinais: um simpleto em  $\delta$  9,77, que integra para um hidrogênio  $\alpha$  ao nitrogênio (H-6); um simpleto em  $\delta$  8,77 referente ao hidrogênio H-4 e 4 dupletos, que integram para 4 hidrogênios (H-9 e H-10; H-11 e H-12) com constantes de acoplamento  $J=9,0$  Hz. Estas constantes indicam que estes átomos mantêm uma posição relativa *orto* entre si. A análise do espectro revela ainda a presença de um grupamento metilenodioxí, através de um simpleto (2H) em  $\delta$  6,17, além de metoxilas em  $\delta$  4,15 (s, 3H) e  $\delta$  4,13 (s, 3H).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou os seguintes sinais: 149,4 (C-8); 148,1 (C-2); 147,9 (C-3); 146,5 (C-6); 129,7 (C-12a); 129,1 (C-4a); 128,1

(C-6a); 127,0 (C-12); 125,2 (C-10a); 122,0 (C-10b); 120,8 (C-11); 120,1 (C-9); 119,3 (C-7); 117,8 (C-10); 104,6 (C-1); 102,2 (C-4); 101,0 (OCH<sub>2</sub>O); 62,0 (OCH<sub>3</sub>); 56,8 (OCH<sub>3</sub>) e, em conjunto com o espectro de ultravioleta, que apresentou como absorções principais em  $\lambda_{\text{máx}}$  (EtOH, 29X 10<sup>-6</sup> mol/l): 242, 256 e 274 nm; confirmando a estrutura proposta da **O-metildecarina (norqueleritrina)**, benzofenantridina encontrada em outras espécies de *Zanthoxylum* (Ng et al, 1987).

### III. 1.5.3. Substância 3



O procedimento descrito no esquema 5 (p.55), possibilitou o isolamento da substância **3**, classificado como um N-formil-N-metil-1-amino-2-fenilnaftaleno. Os amino-fenilnaftalenos são considerados metabólitos das benzo[c]fenantridinas e tem co-ocorrência com este tipo de alcalóides (Mester, 1983).

A observação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **3** permitiu verificar a presença de sinais, na região aromática, comuns com as benzofenantridinas: quatro dupletos com acoplamento *orto* ( $J= 8,4$  Hz),  $\delta$  7,33 (H-4) e 7,80 (H-3),  $\delta$  6,56 (H-5') e 6,82 (H-6'); dois simpletos de hidrogênios acoplados em *para*  $\delta$  7,21 (H-8) e 7,08 (H-5), além de um simpleto em  $\delta$  6,18 dos dois hidrogênios ligados ao carbono do metilenodioxí.

A presença de um simpleto em  $\delta$  8,16 caracteriza o hidrogênio ligado a carbonila de um aldeído e na região de  $\delta$  3,9, pode-se observar dois

simpletos que integram para 3H cada um, confirmando duas metoxilas. Em  $\delta$  3,00, verifica-se um simpleto referente aos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou  $\delta$ 164,6 (-CHO), 135,8 (C-1), 133,9 (C-2), 127,4 (C-3), 125,0 (C-4), 104,3 (C-5), 147,3 (C-6), 148,1 (C-7), 99,8 (C-8), 129,0 (C-9), 131,2 (C-10), 119,6 (C-1'), 147,3 (C-2'), 152,0 (C-4'), 103,9 (C-5'), 127,3 (C-6'), 101,4 (-OCH<sub>2</sub>O-) 31,9 (N-Me), 55,8 (4'-OMe), 61,1 (3'-OMe).

Estes dados foram comparados com a literatura (Krane et al, 1984 e Hsiao e Chiang, 1995), confirmando a estrutura da **arnotianamida** (tabela 13).

### **III.2. Substâncias identificadas por CG/massa**

#### **Mono e sesquiterpenos de caule de *Z. tingoassuiba***

O fracionamento do extrato metanólico de caule forneceu a fração CM óleo (esquema 7, p. 57). Esta fração foi analisada por CG/EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Três substâncias pertencentes à classe de mono e sesquiterpenos, que já haviam sido identificadas nas folhas de *Z. tingoassuiba* (resultados em fase de publicação) – espatulenol (**4**), o  $\alpha$ -bisabolol (**5**) e o acetato de citronelila (**15**) foram novamente detectadas (figura 29, p. 60), bem como, o protoalcalóide N-metilantranilato de metila (**6**), já isolado nos frutos (figura 49, p.96).

Nesta fração, um grande número de substâncias não foram determinadas. A identificação individual dos componentes acima foi baseada na comparação dos índices de retenção em CG, comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados nas bibliotecas de espectros e com outros espectros de massas da literatura, nas condições de Adams.

### **III.3. Resultados dos testes biológicos com *Z. tingoassuiba***

Os testes microbiológicos realizados com o extrato bruto hexânico de caule e as cumarinas isopimpinelina (**8**) e xanthotoxina (**9**) encontradas em mistura na fração ZTFRD13, frente às cepas bacterianas padrão não apresentaram qualquer inibição da proliferação das bactérias.

Para os testes de atividade antioxidante, o extrato metanólico de caule apresentou crescimento celular em astrócitos e células GL-15 nas concentrações entre 1 µg/mL e 20 µg/mL e não apresentou atividade antioxidante.

#### IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou a identificação de metabólitos relatados pela primeira vez na espécie *Zanthoxylum tingoassuiba*, a exemplo de: N-metilantranilato de metila, a cumarina o-prenilada: aurapteno e as furanocumarinas: isopimpineline, xantotoxina e imperatorina. Este também foi a primeira descrição da cumarina o-prenilumbeliferona no gênero *Zanthoxylum*.

Em comum com os estudos químicos anteriores com espécimes de *Z. tingoassuiba* coletados nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, foram encontrados a lignana sesamina e o triterpeno lupeol.

As furanocumarinas lineares e alcalóides benzofenatrídínicos são freqüentemente associados com as Rutaceae mais primitivas, as proto-Rutaceae, denominação dos gêneros *Zanthoxylum* (o único encontrado no Brasil), *Phellodendron* e *Tetradium*, e podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos deste grupo. O perfil químico da *Zanthoxylum tingoassuiba* estudada, portanto, se assemelha com outras espécies do gênero, bem como da família Rutaceae.

Contudo, a pesquisa da composição química dos espécimes não está encerrada, outras partes da planta estão sendo investigadas e uma alternativa para as técnicas fitoquímicas convencionais, como a extração com fluido supercrítico, pode ser utilizada e otimizada para obtenção seletiva de alcalóides e cumarinas nos extratos de caule de *Z. tingoassuiba*.

Os ensaios biológicos com extratos, frações e substâncias isoladas de *Z. tingoassuiba* podem ratificar a utilização desta espécie na medicina tradicional e, apesar de até o momento, não apresentarem resultados positivos em relação ao presente trabalho, ainda estão longe de serem conclusivos, uma vez que os outros extratos, frações e substâncias identificadas estão em fase de testes. Outra sugestão para continuidade do trabalho é a modificação estrutural dos compostos isolados que forem

potencialmente ativos, para otimização das atividades antimicrobiana e antioxidante.

## V. DADOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS

### V.1. Triterpenóide (1)

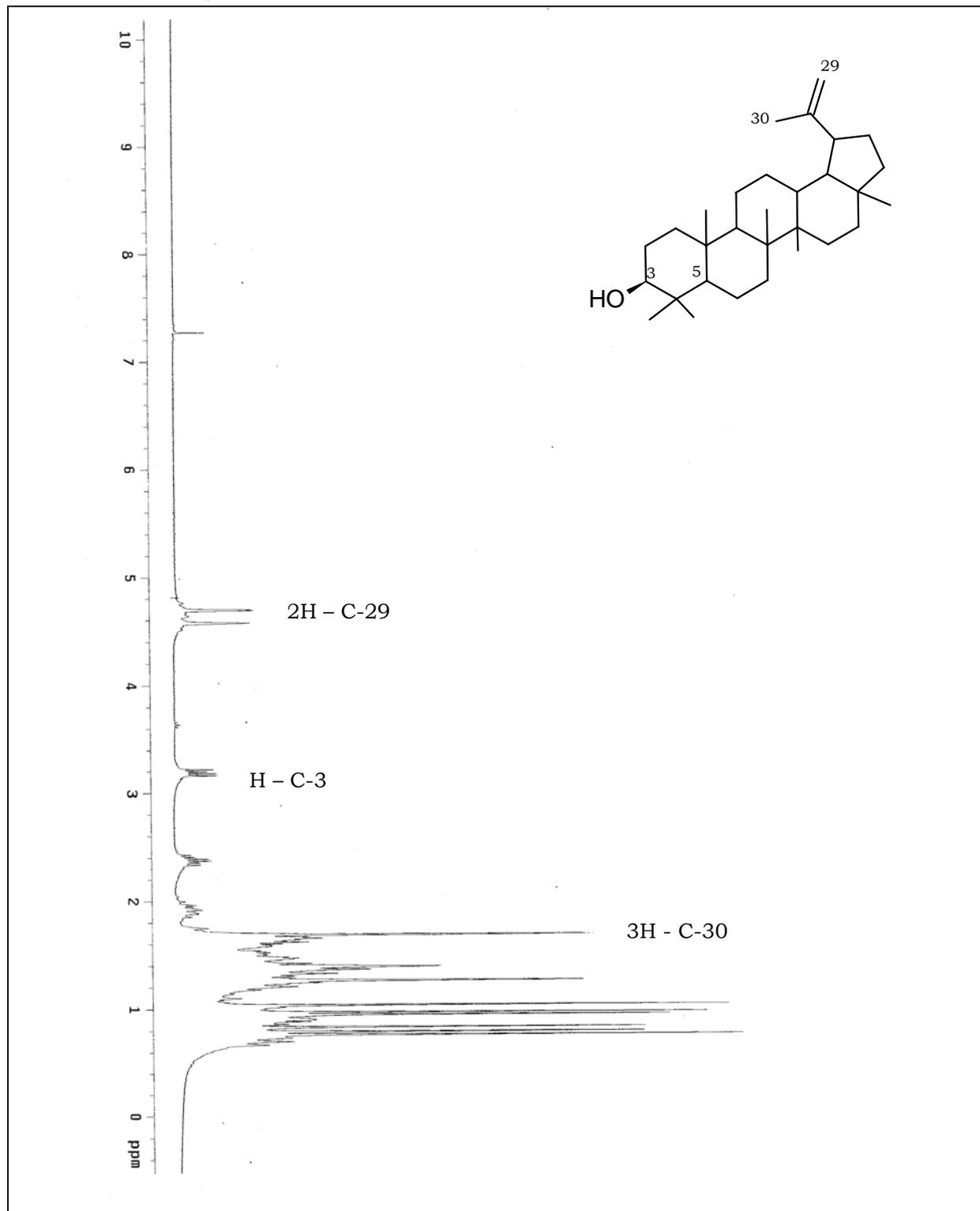


Figura 35 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **1**

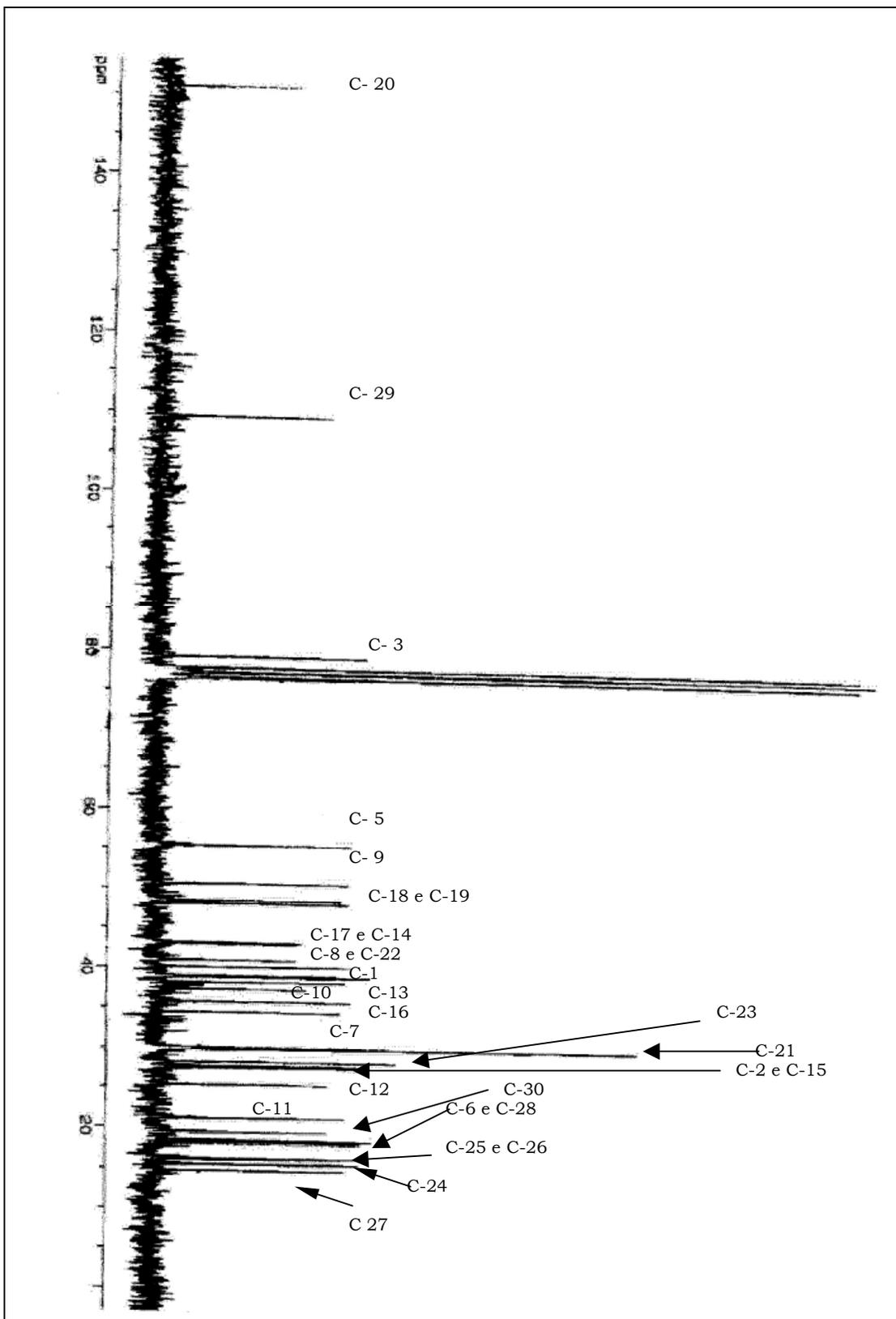


Figura 36 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **1**

Tabela 9 - Dados espectroscópicos RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **1**

<b>Posição</b>	$\delta^{13}\text{C}$	<b>Posição</b>	$\delta^{13}\text{C}$
<b>C-1</b>	38,8	<b>C-16</b>	35,9
<b>C-2</b>	27,6	<b>C-17</b>	43,2
<b>C-3</b>	79,1	<b>C-18</b>	48,5
<b>C-4</b>	38,9	<b>C-19</b>	48,2
<b>C-5</b>	55,5	<b>C-20</b>	151,0
<b>C-6</b>	18,5	<b>C-21</b>	29,9
<b>C-7</b>	34,5	<b>C-22</b>	39,1
<b>C-8</b>	40,2	<b>C-23</b>	28,2
<b>C-9</b>	50,6	<b>C-24</b>	15,5
<b>C-10</b>	37,2	<b>C-25</b>	16,3
<b>C-11</b>	21,0	<b>C-26</b>	16,2
<b>C-12</b>	25,2	<b>C-27</b>	14,7
<b>C-13</b>	38,3	<b>C-28</b>	18,2
<b>C-14</b>	42,9	<b>C-29</b>	109,5
<b>C-15</b>	27,5	<b>C-30</b>	19,5

Tabela 10 - Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **11** e **12**

<b>Posição</b>	$\delta^{13}\text{C}$ 11/12	<b>Posição</b>	$\delta^{13}\text{C}$ 11/12	
<b>C-1</b>	37,2	<b>C-16</b>	28,1	
<b>C-2</b>	31,6	<b>C-17</b>	56,7	
<b>C-3</b>	71,7	<b>C-18</b>	11,8	
<b>C-4</b>	42,2	<b>C-19</b>	19,3	
<b>C-5</b>	140,7	<b>C-20</b>	36,0	
<b>C-6</b>	121,6	<b>C-21</b>	18,9	
<b>C-7</b>	31,8	<b>C-22</b>	138,2	33,9
<b>C-8</b>	31,8	<b>C-23</b>	129,2	26,1
<b>C-9</b>	50,1	<b>C-24</b>	51,3	
<b>C-10</b>	36,6	<b>C-25</b>	31,9	
<b>C-11</b>	21,2	<b>C-26</b>	21,2	
<b>C-12</b>	39,8	<b>C-27</b>	19,0	
<b>C-13</b>	42,2	<b>C-28</b>	25,4	
<b>C-14</b>	56,9	<b>C-29</b>	12,0	
<b>C-15</b>	24,3	<b>C-30</b>	-	

## V.2. Esteróides

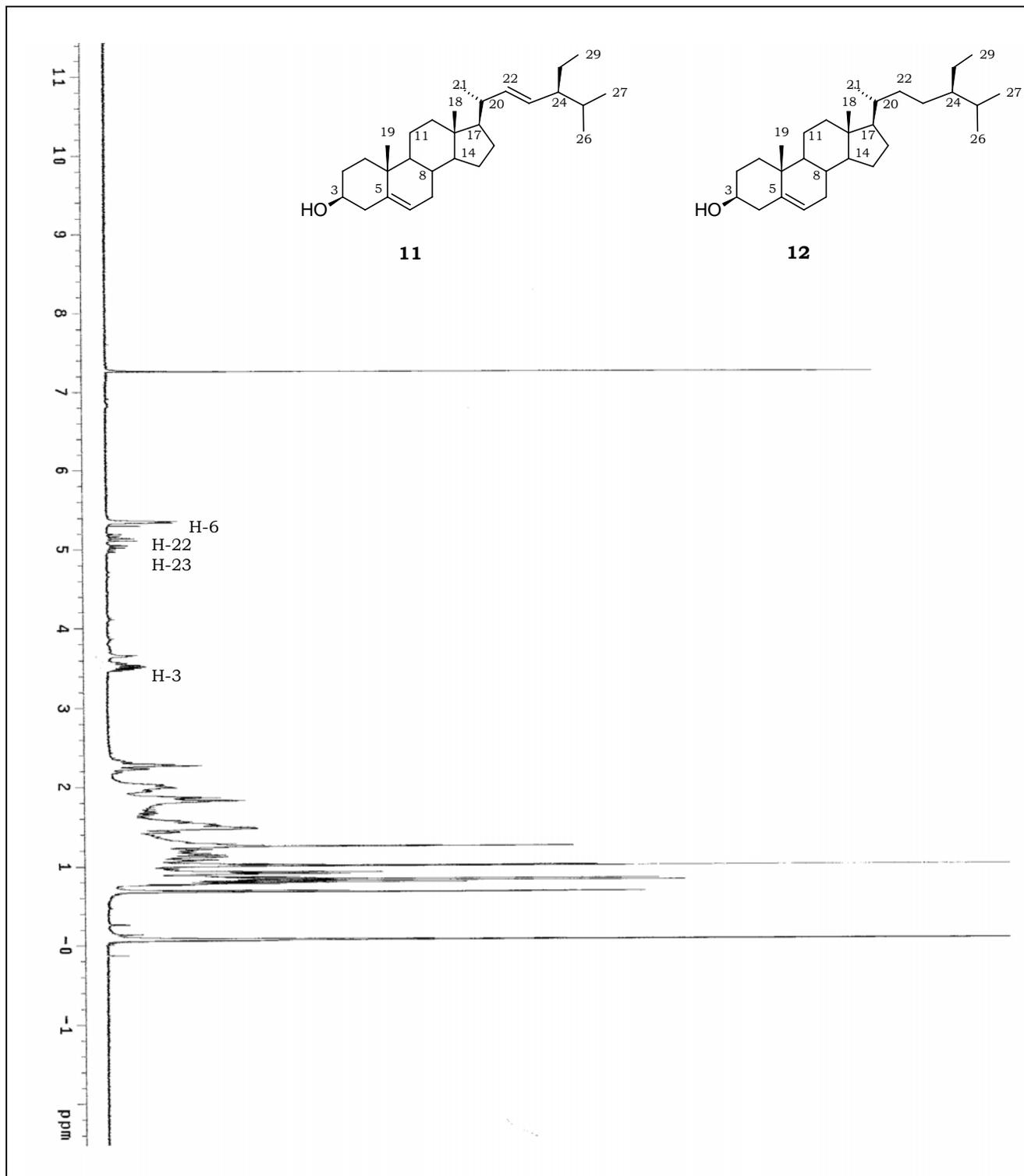


Figura 37 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **11** e **12**

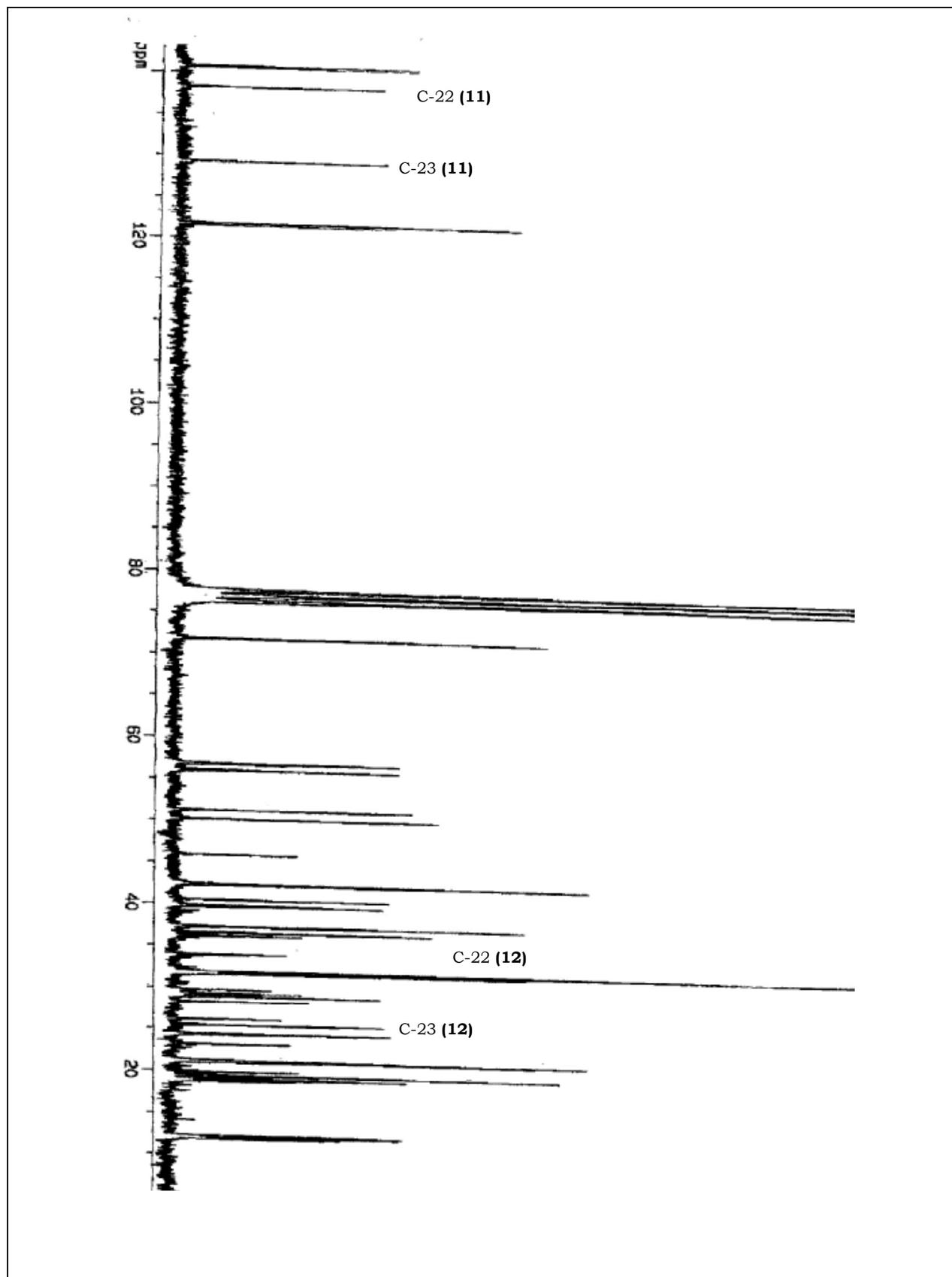


Figura 38 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **11** e **12**

### V.3. Cumarinas

#### V.3.1. Cumarinas o-preniladas - Aurapteno (10)

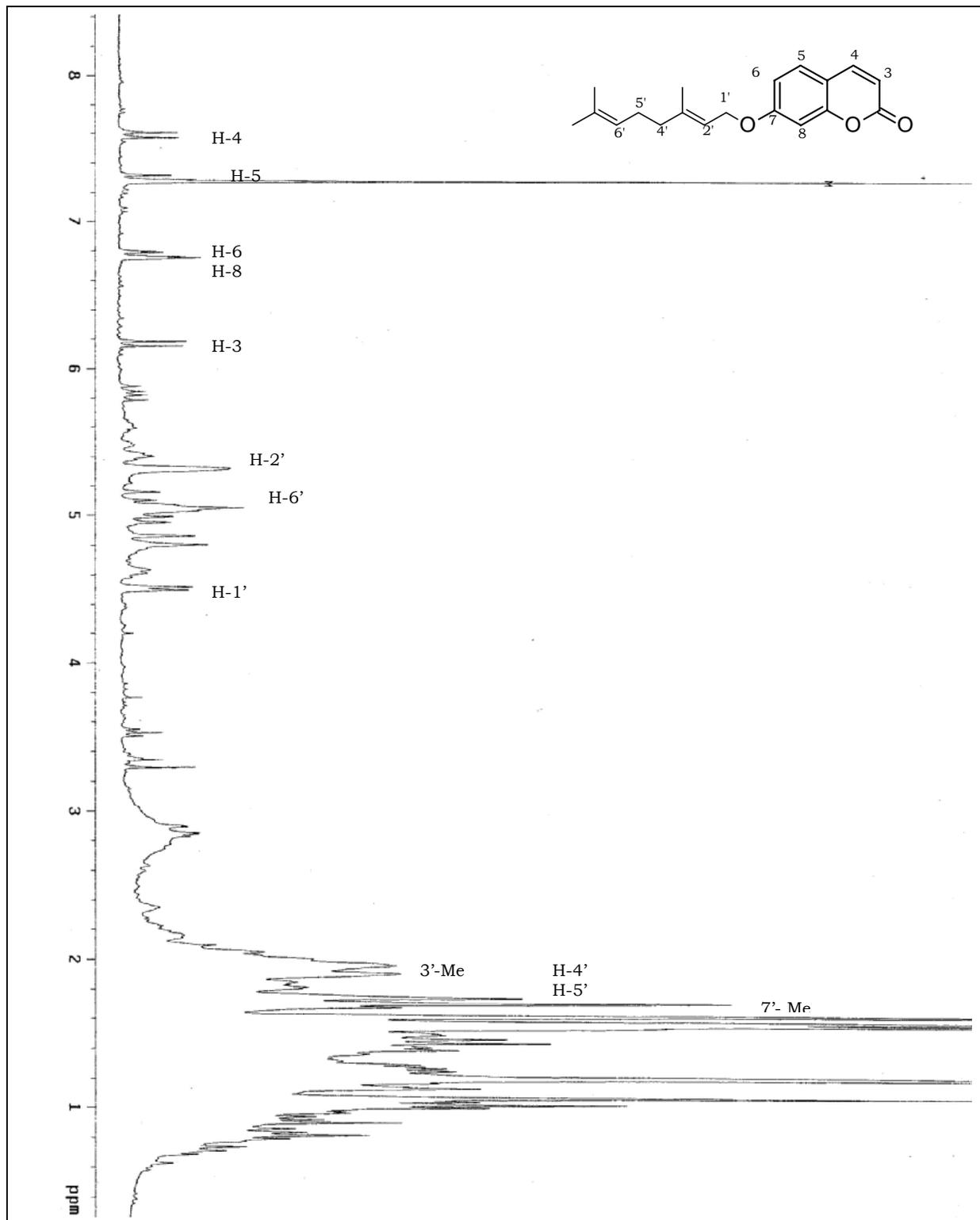


Figura 39 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **10** em mistura com **1**

**O-prenilumbeliferona (13)**

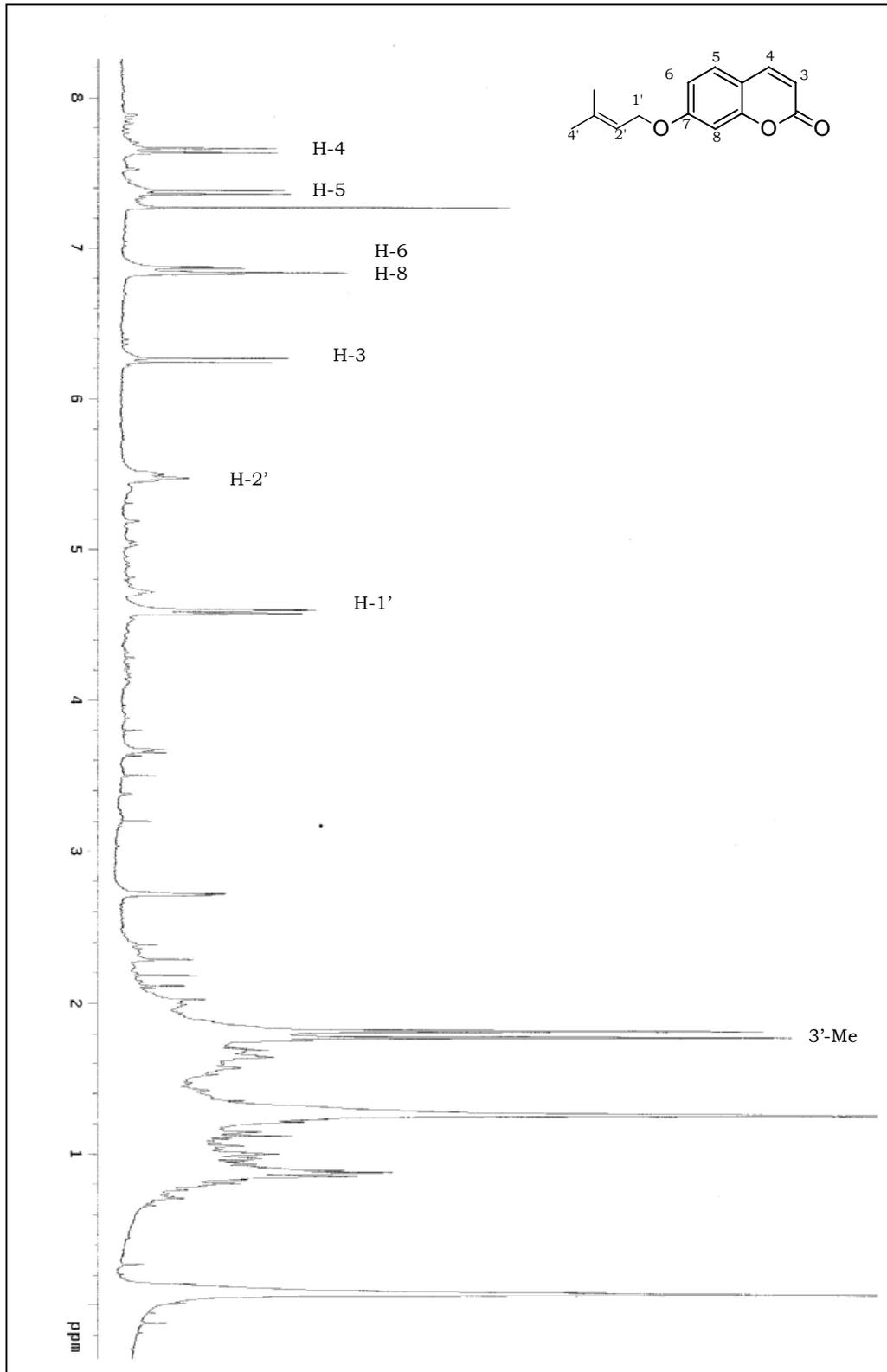


Figura 40 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **13**

Tabela 11 – Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C das substâncias **10** e **13**

<b>Posição</b>	<b>δ <sup>1</sup>H de 10</b>	<b>δ <sup>13</sup>C de 10</b>	<b>δ <sup>1</sup>H de 13</b>	<b>δ <sup>13</sup>C de 13</b>
<b>2</b>	-	161,0	-	161,2
<b>3</b>	6,18 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,3)	112,0	6,25 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,3)	112,3
<b>4</b>	7,64 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,3)	144,0	7,65 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,3)	144,8
<b>4a</b>	-	112,2	-	112,5
<b>5</b>	7,35 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,5)	128,5	7,37 <i>d</i> ( <i>J</i> =8,1)	128,7
<b>6</b>	6,80 <i>dd</i> ( <i>J</i> = 2,1 e 8,4)	113,1	6,85 <i>dd</i> ( <i>J</i> =2,7 e 8,4)	113,3
<b>7</b>	-	162,0	-	162,4
<b>8</b>	6,77 <i>d</i> ( <i>J</i> =2,1)	101,5	6,85 <i>d</i> ( <i>J</i> =2,4)	101,7
<b>8a</b>	-	155,5	-	155,9
<b>1'</b>	4,51 <i>d</i> ( <i>J</i> =6,7)	65,4	4,58 <i>d</i> ( <i>J</i> = 6,7)	65,6
<b>2'</b>	5,41 <i>t</i> ( <i>J</i> =6,7)	118,2	5,48 <i>t</i> ( <i>J</i> =6,7)	118,5
<b>3'</b>	-	142,1	-	143,4
<b>4'</b>	2,00 <i>m</i>	39,4	1,80 <i>s</i>	25,8
<b>5'</b>	2,00 <i>m</i>	26,1	1,80 <i>s</i>	-
<b>6'</b>	5,05 <i>m</i>	123,5	-	-
<b>7'</b>	-	131,7	-	-
<b>8'</b>	-	25,6	-	-
<b>7' - Me</b>	1,60 <i>s</i>	16,4	-	-
<b>3' - Me</b>	1,76 <i>s</i>	17,3	1,80 <i>s</i>	17,8

### V.3. 2. Furanocumarinas

#### Imperatorina (7)

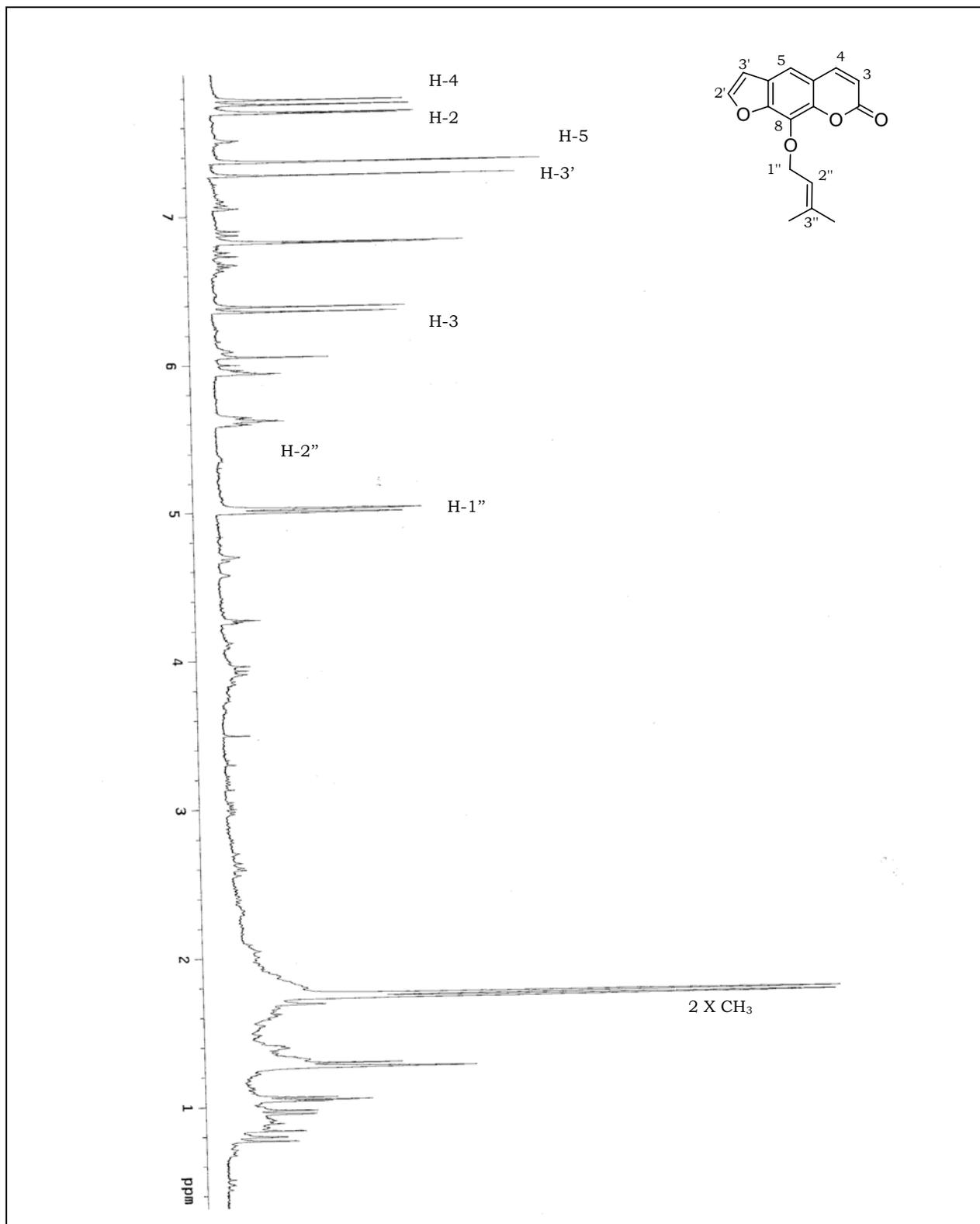


Figura 41 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **7**

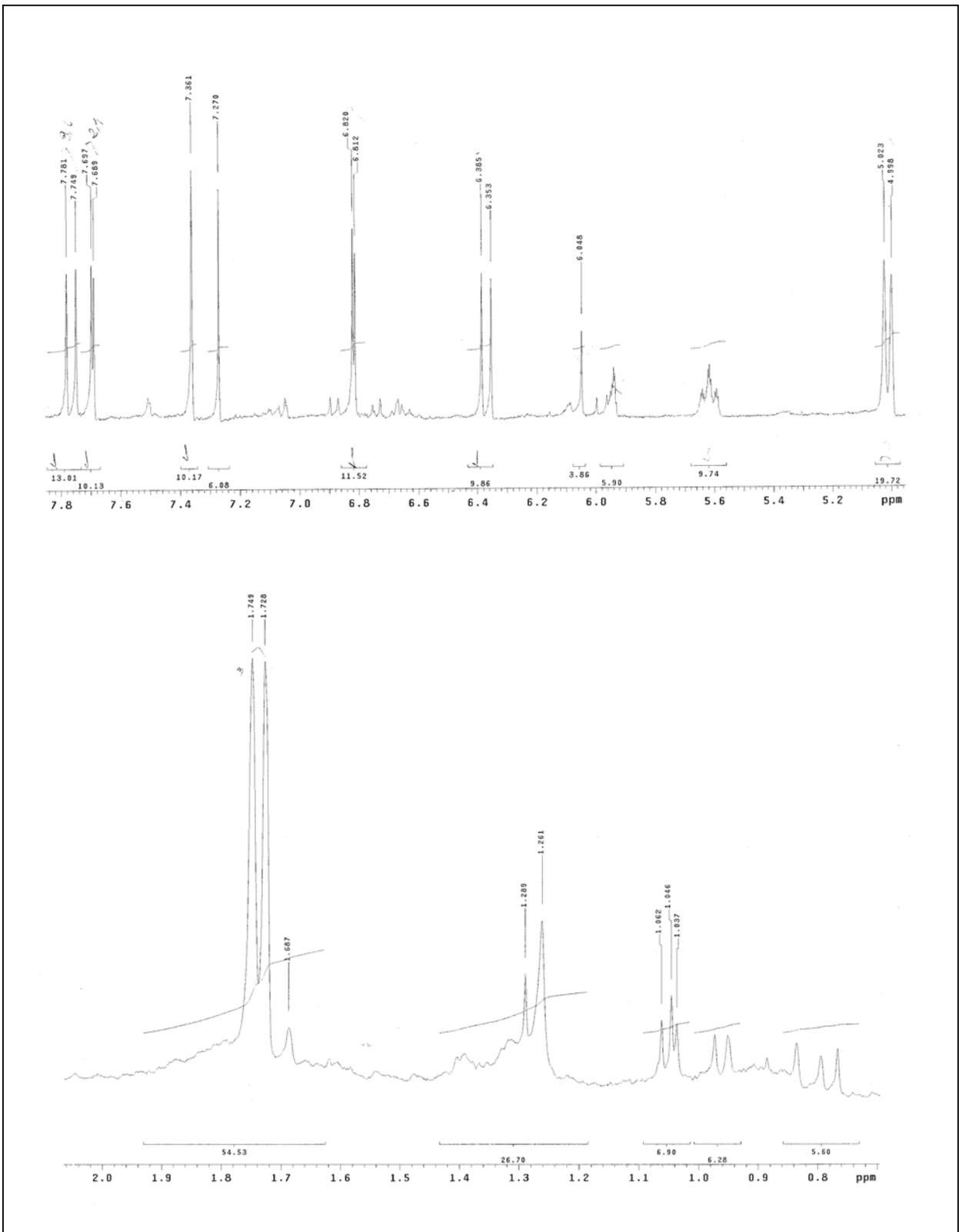


Figura 42 – Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **7**

**Isopimpinina (8)**

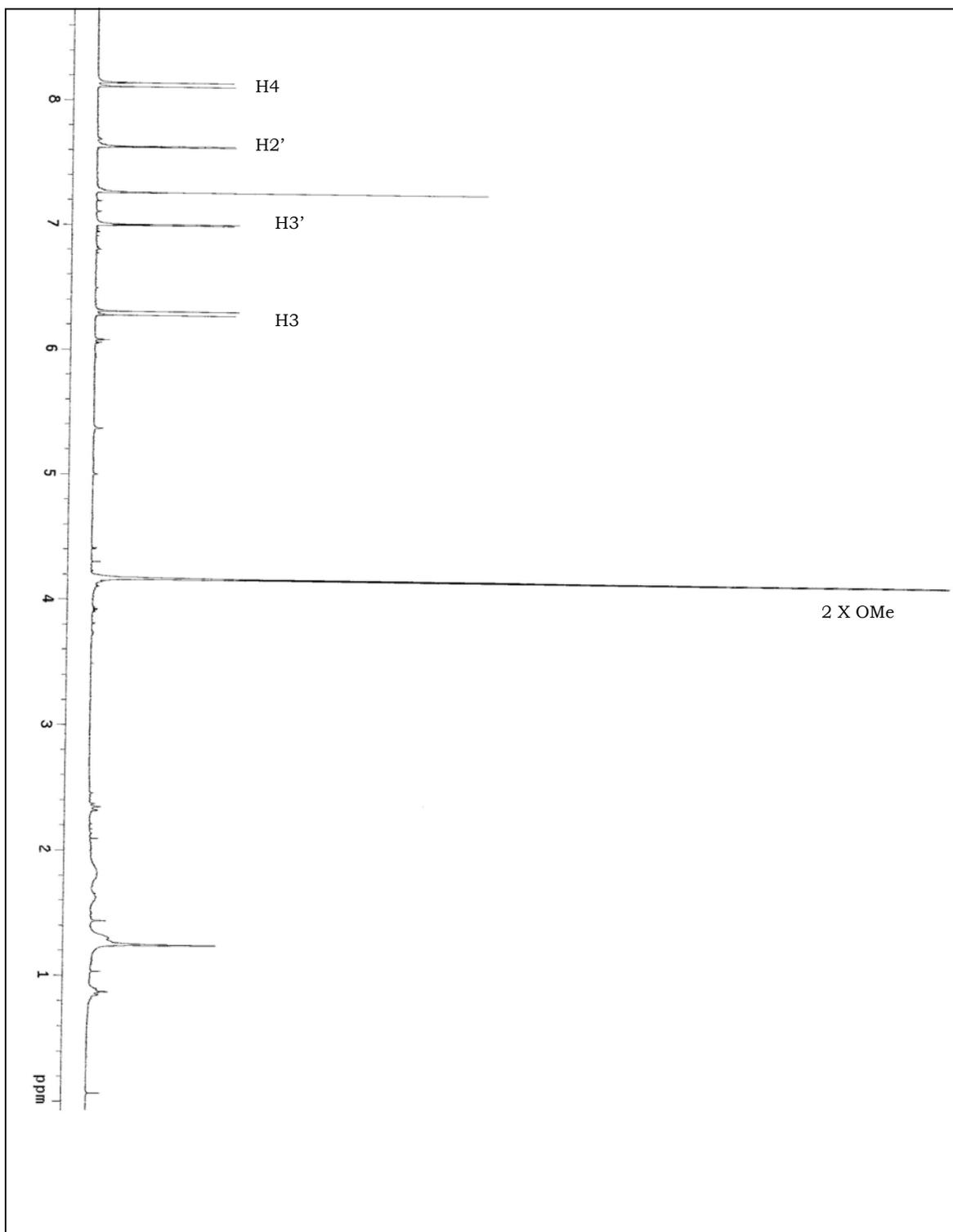


Figura 43 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **8**

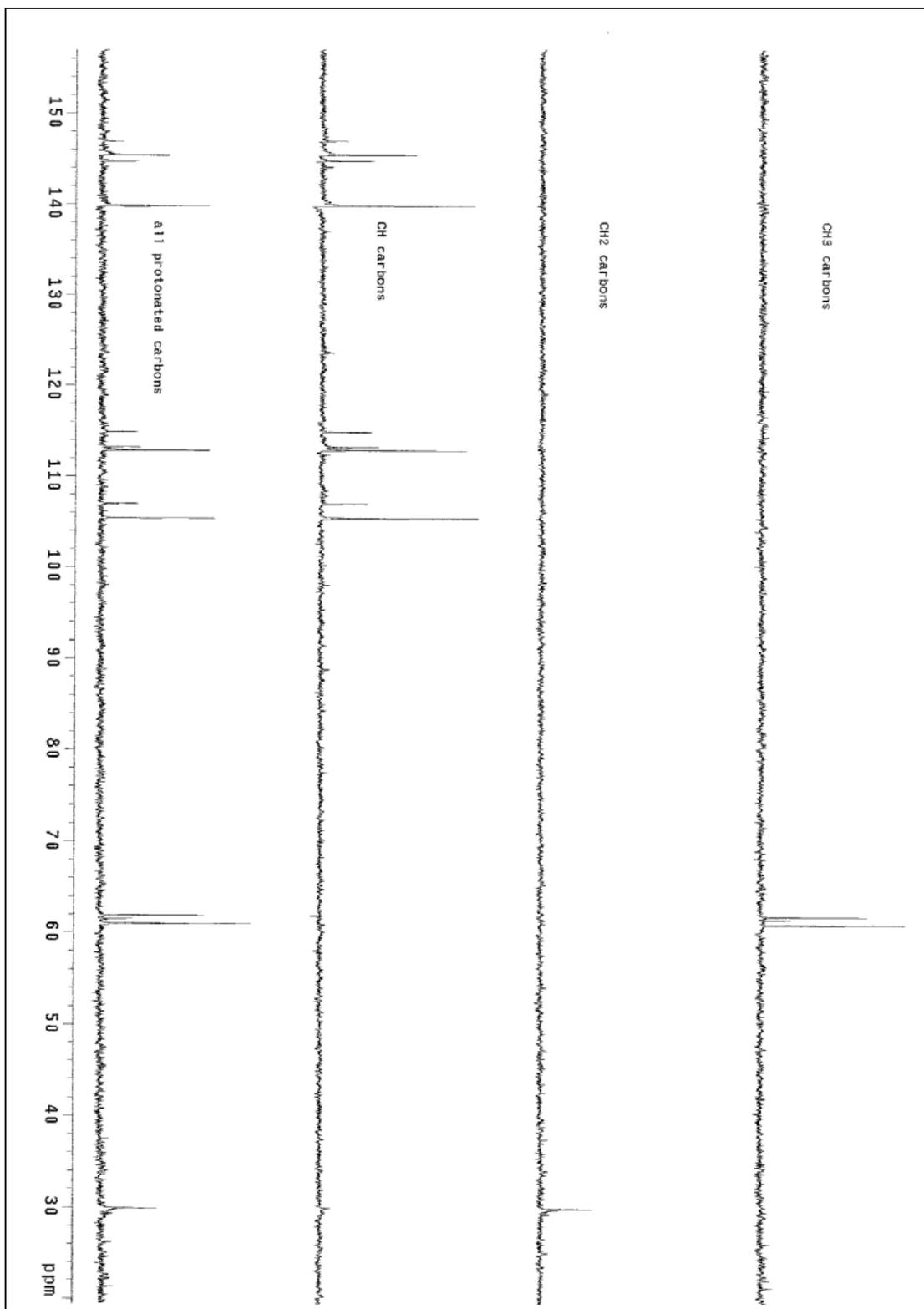


Figura 44 - Espectro de DEPT-135° (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **8**

Tabela 12 - Dados espectroscópicos RMN de  $^1\text{H}$  das cumarinas **7**, **8** e **9**

<b>Posição</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>H-3</b>	6,36 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,6)	6,27 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,6)
<b>H-4</b>	7,75 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,6)	8,11 <i>d</i> ( <i>J</i> =9,6)
<b>H-5</b>	7,31 <i>s</i>	-
<b>H-6</b>	-	-
<b>H-8</b>	-	-
<b>H-1'</b>	-	-
<b>H-2'</b>	7,75 <i>d</i> ( <i>J</i> =2,4)	7,62 <i>d</i> ( <i>J</i> =2,4)
<b>H-3'</b>	6,99 <i>d</i> ( <i>J</i> =2,4)	6,99 <i>d</i> ( <i>J</i> =2,4)
<b>H-4'</b>	-	-
<b>H-5'</b>	-	-
<b>H-6'</b>	-	-
<b>H-1''</b>	4,32 <i>d</i> ( <i>J</i> =7,2)	-
<b>H-2''</b>	5,58 <i>t</i> ( <i>J</i> =7,2)	-
<b>H-3''</b>	-	-
<b>OMe</b>	-	<b>5-</b> 4,10 <i>s</i>
<b>OMe</b>	<b>3'-Me</b> - 1,73 <i>s</i>	<b>8-</b> 4,10 <i>s</i>

**Xantoxina (9) + Isopimpinina (8)**

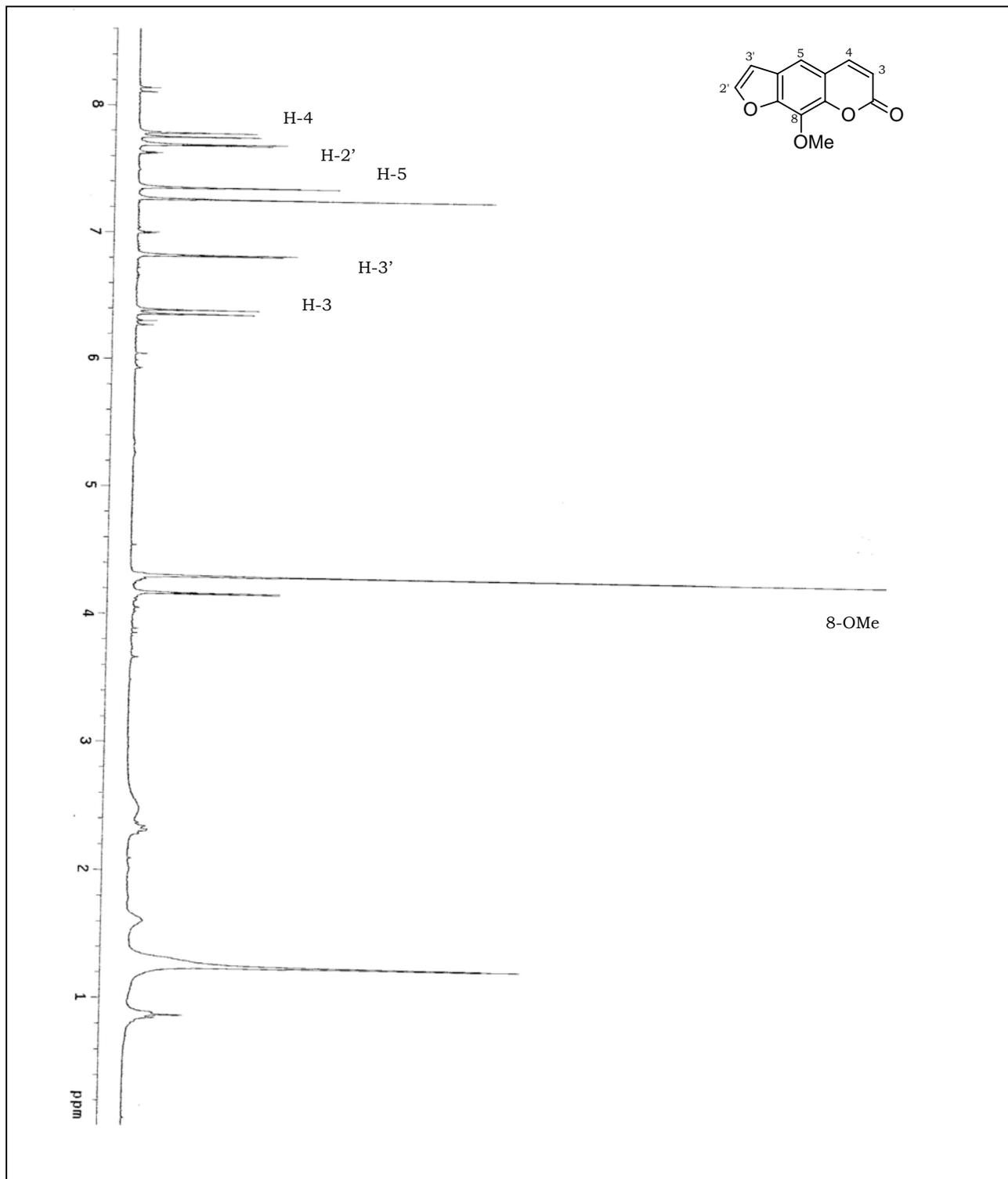


Figura 45 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância majoritária **9** em mistura com **8**

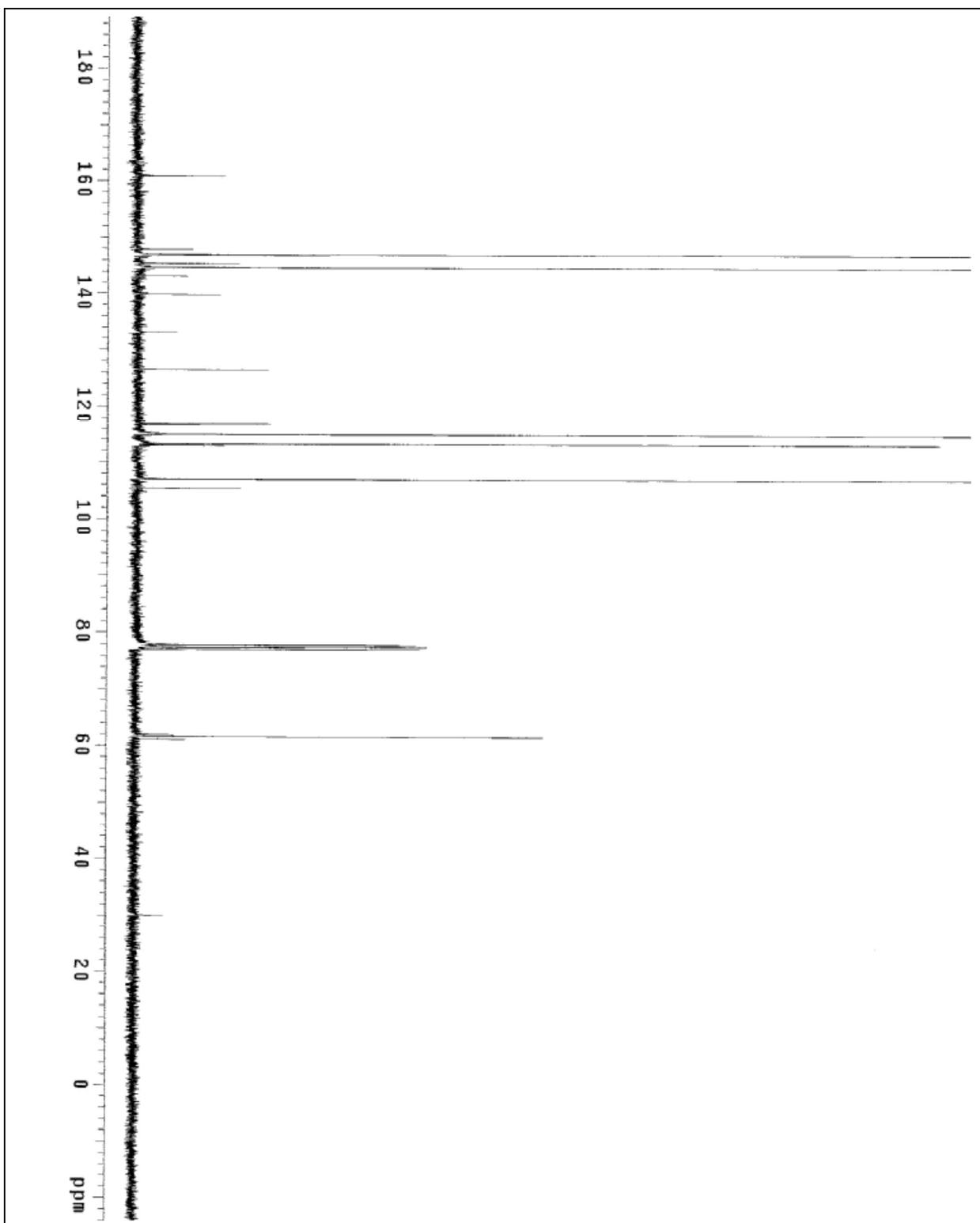


Figura 46 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância majoritária **9** em mistura com **8**

## V.4. Lignanas

### Sesamina (2)

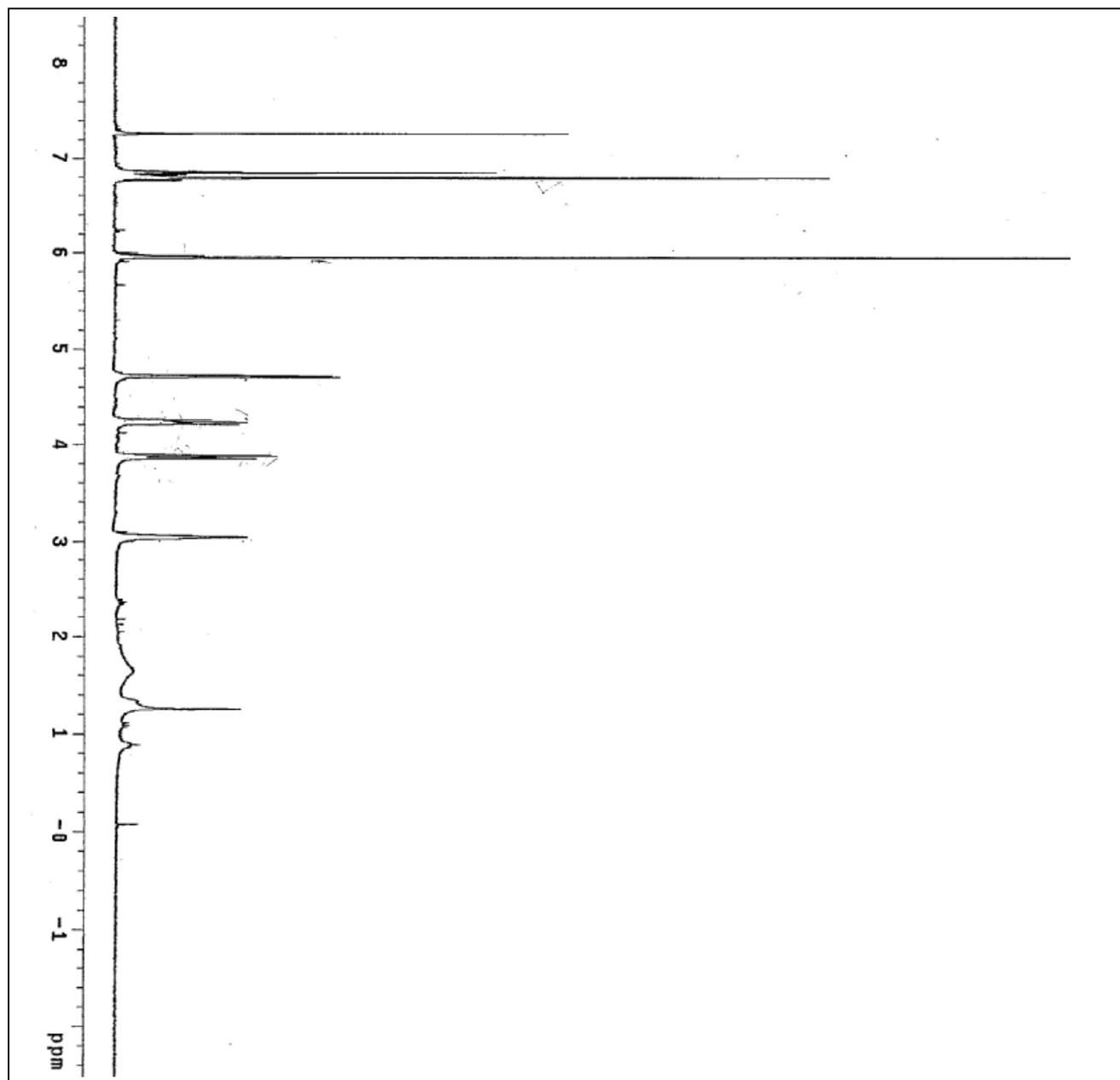


Figura 47 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **2**

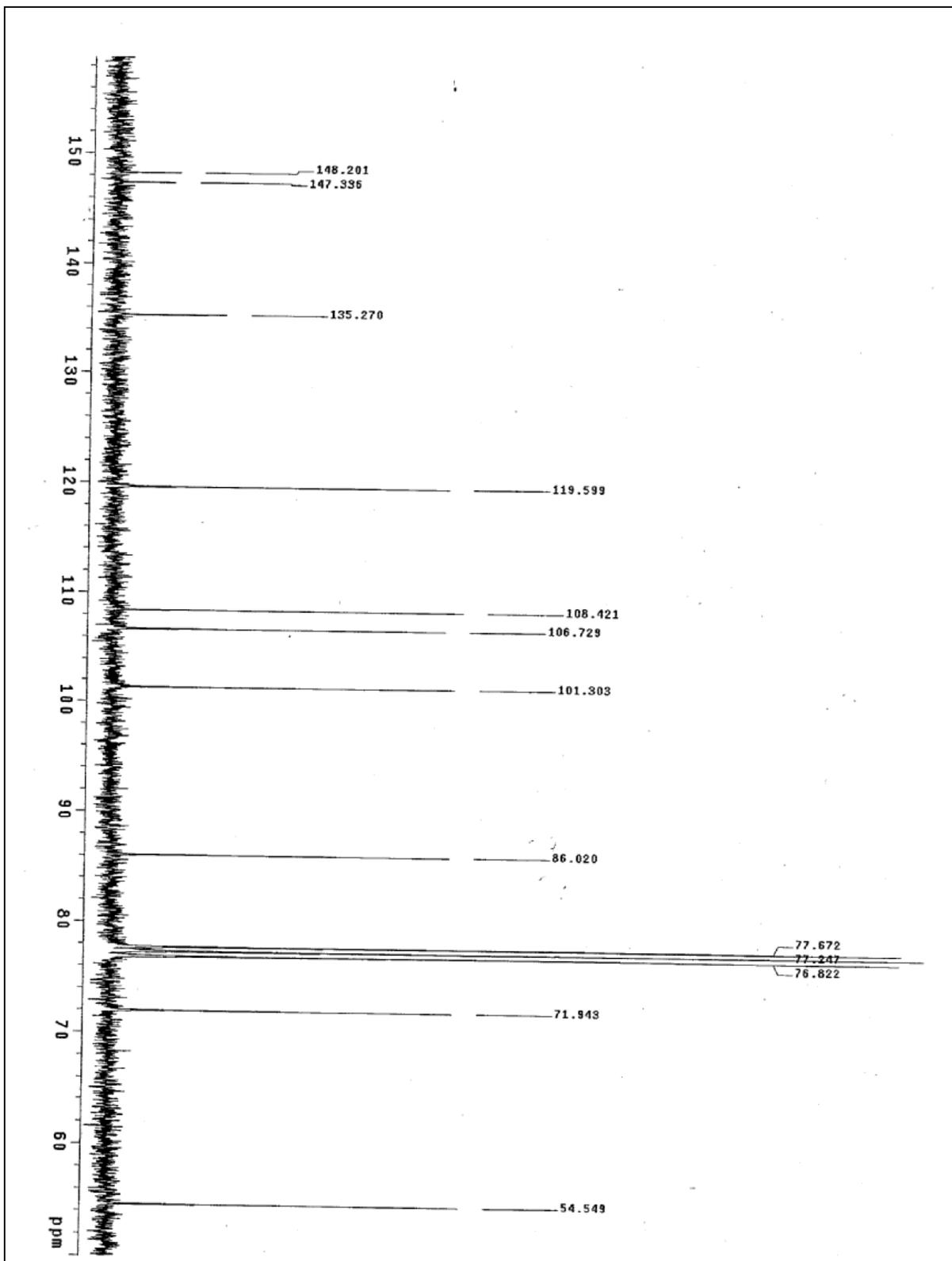


Figura 48 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **2**

## V.5. Alcalóides

### V.5.1. Protoalcalóide

#### N-metilantranilato de metila (6)

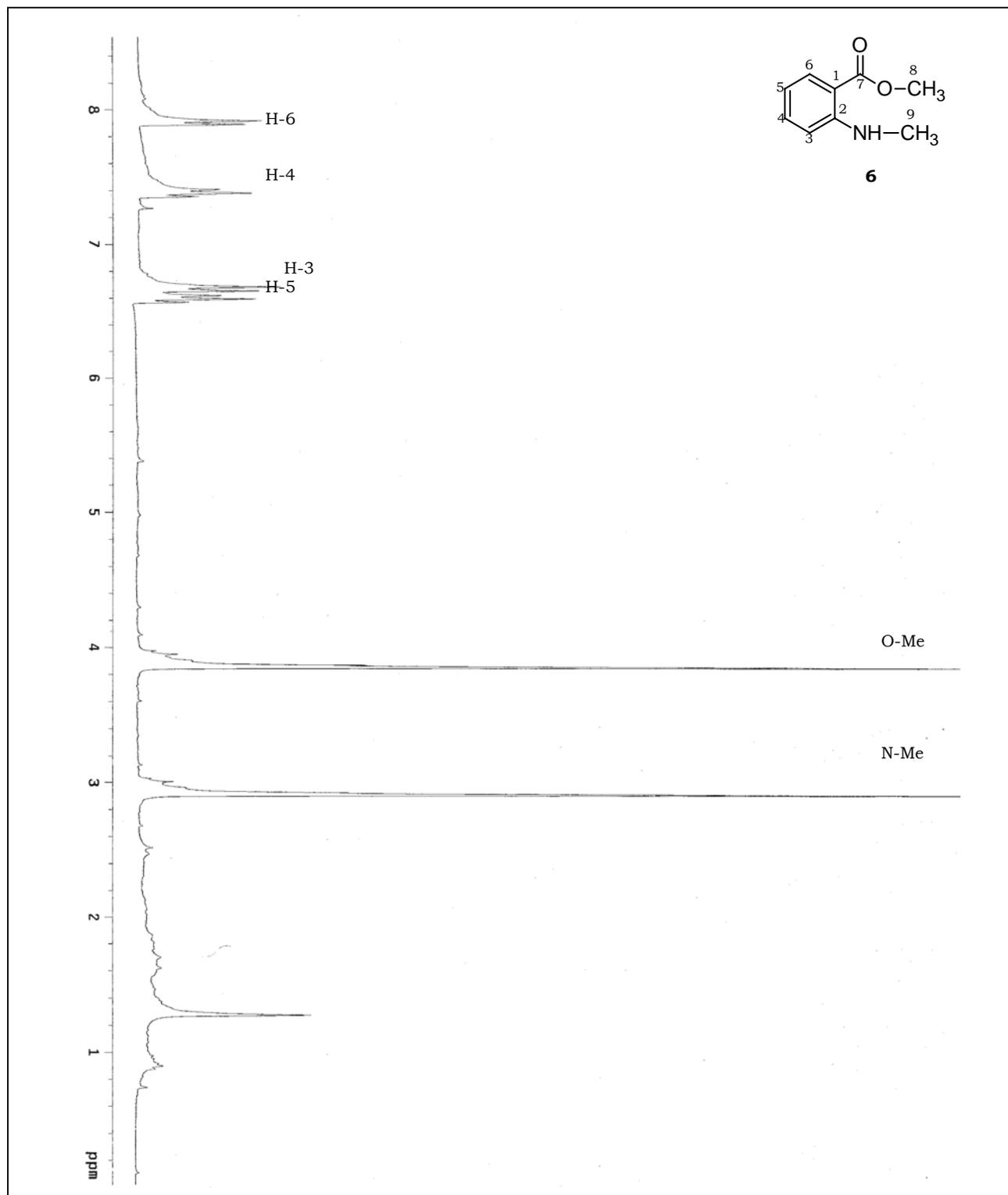


Figura 49 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **6**

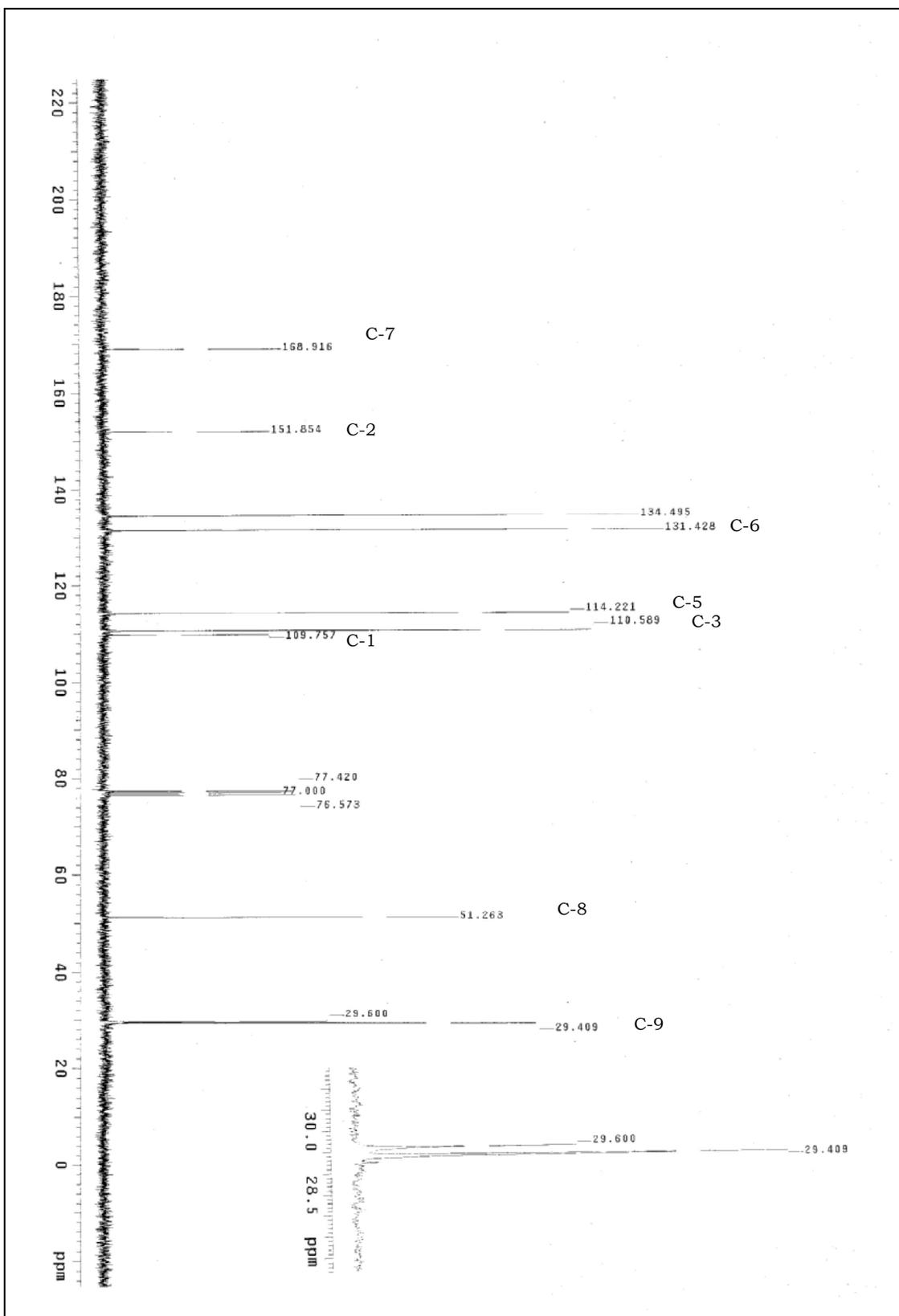


Figura 50 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **6**

## V.5.2. Alcalóides Benzofenantridínicos

### V.5.2.1. O-metildecarina (norqueleritrina) (14) + Sesamina (2)

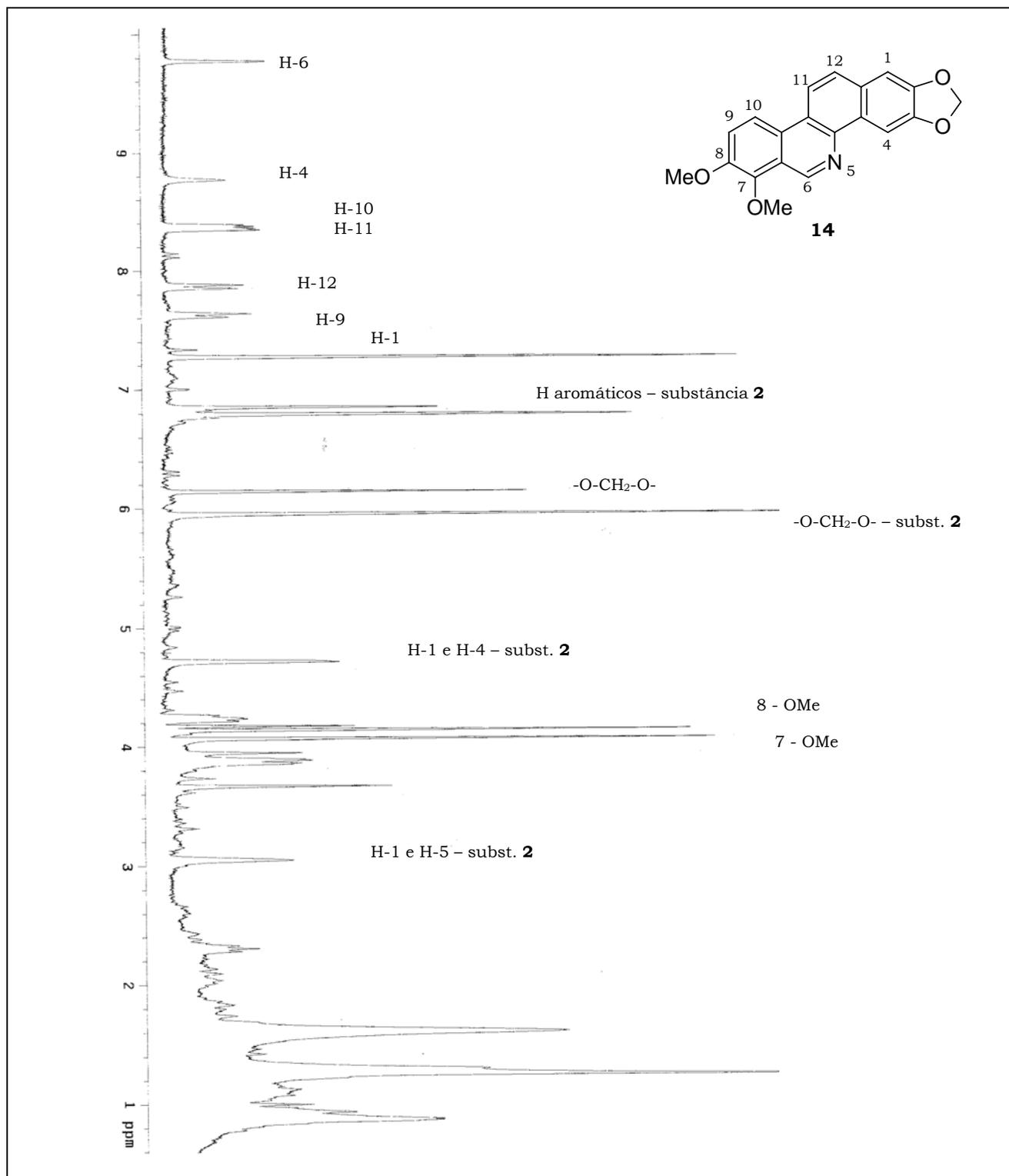


Figura 51 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **14** em mistura com a substância **2**

### V.5.2.2. Arnotianamida

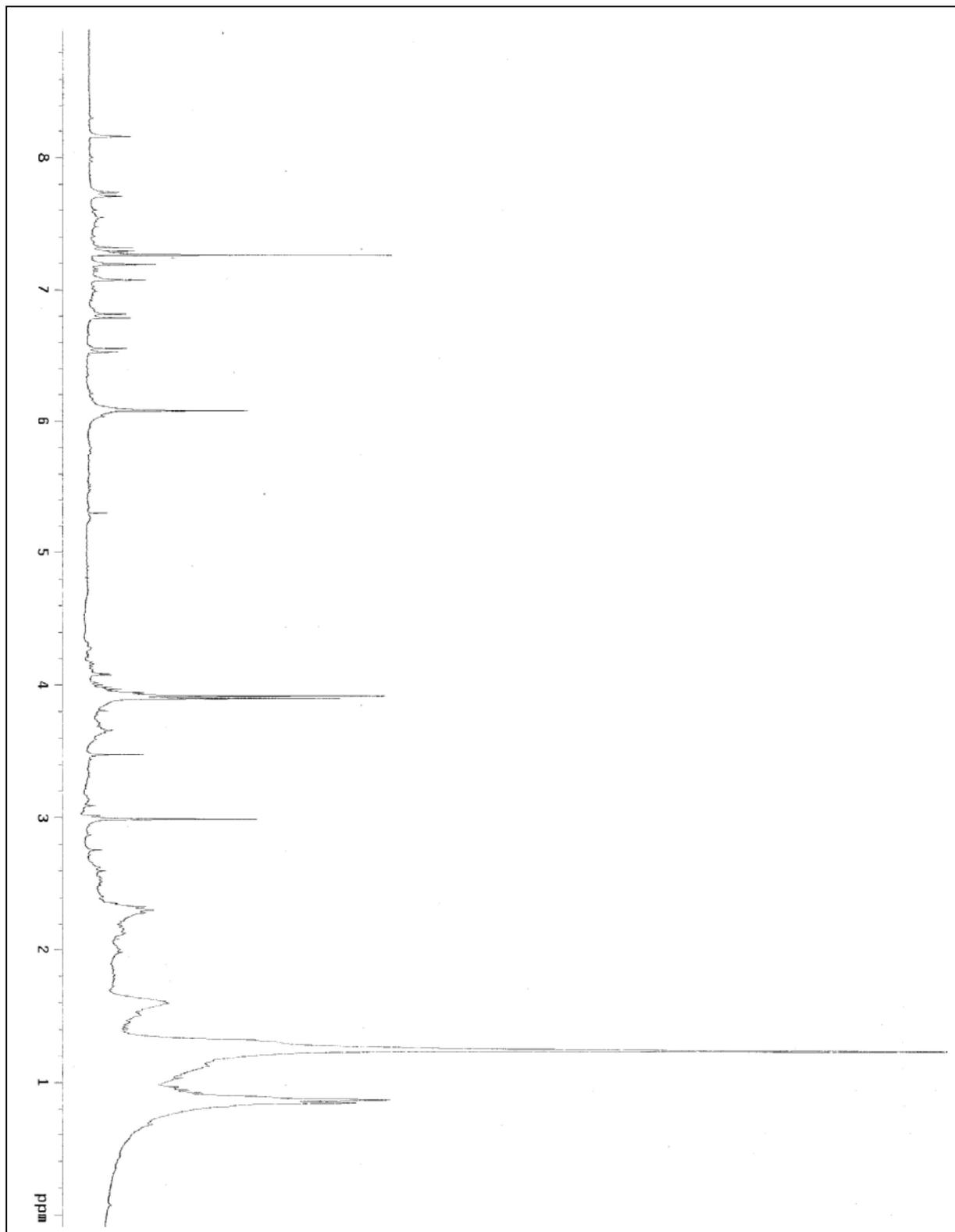


Figura 52 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **3**

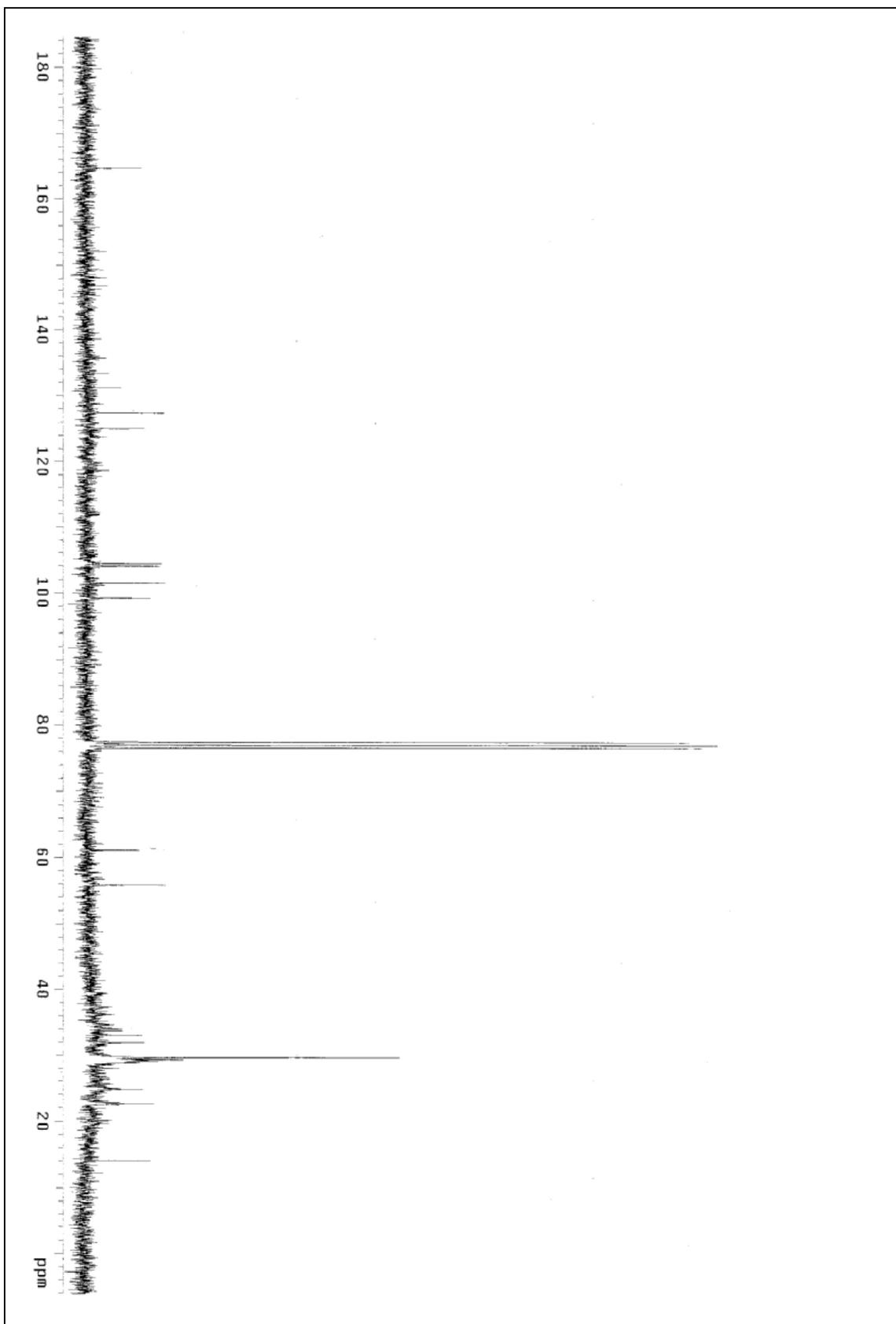


Figura 53 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **3**

Tabela 13 – Comparação dos dados de RMN da substância **3** com dados da literatura

<b>Posição</b>	<b><math>\delta</math> H observado</b>	<b><math>\delta</math> H (CDCl<sub>3</sub>) (Krane et al, 1984)</b>	<b><math>\delta</math> H (DMSO-d<sub>6</sub>) (Hsiao e Chiang, 1995)</b>	<b><math>\delta</math> C observado</b>	<b><math>\delta</math> C (Hsiao e Chiang, 1995)</b>
<b>1</b>	-	-	-	135,8	135,3
<b>2</b>	-	-	-	133,9	134,3
<b>3</b>	7,31 (d, J= 8,4 Hz)	7,28 (d, J= 8,5 Hz)	7,23 (d, J=8,3 Hz)	127,4	127,6
<b>4</b>	7,73 (d, J=8,4 Hz)	7,74 (d, J= 8,5 Hz)	7,8 (d, J= 8,3 Hz)	125,0	126,9
<b>5</b>	7,08	7,03	7,01	104,3	104,1
<b>6</b>	-	-	-	148,1	147,8
<b>7</b>	-	-	-	148,8	148,9
<b>8</b>	7,20	7,28	7,45	99,8	98,6
<b>9</b>	-	-	-	129,0	128,0
<b>10</b>	-	-	-	131,2	130,6
<b>1'</b>	-	-	-	119,6	119,8
<b>2'</b>	-	-	-	147,3	147,6
<b>3'</b>	-	-	-	-	136,2
<b>4'</b>	-	-	-	152,0	152,4
<b>5'</b>	6,54(d, J= 8,4 Hz)	6,43(d, J= 8,5 Hz)	6,56 (d, J=8,8 Hz)	103,9	103,1
<b>6'</b>	6,80(d, J= 8,4 Hz)	6,66(d, J= 8,5 Hz)	6,73 (d, J=8,8 Hz)	125,0	124,7
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,08	6,09	6,18	101,4	101,6
<b>CHO</b>	8,16	8,10	7,96	164,5	163,2
<b>N-Me</b>	2,99	2,97	2,89	29,7	32,7
<b>3'-OMe</b>	3,91	4,04	3,35	61,1	60,3
<b>4'-OMe</b>	3,96	4,09	3,69	55,8	55,6

## V.6. Substâncias identificadas por CG/massa

### Mono e sesquiterpenos de caule de *Z. tingoassuiba*

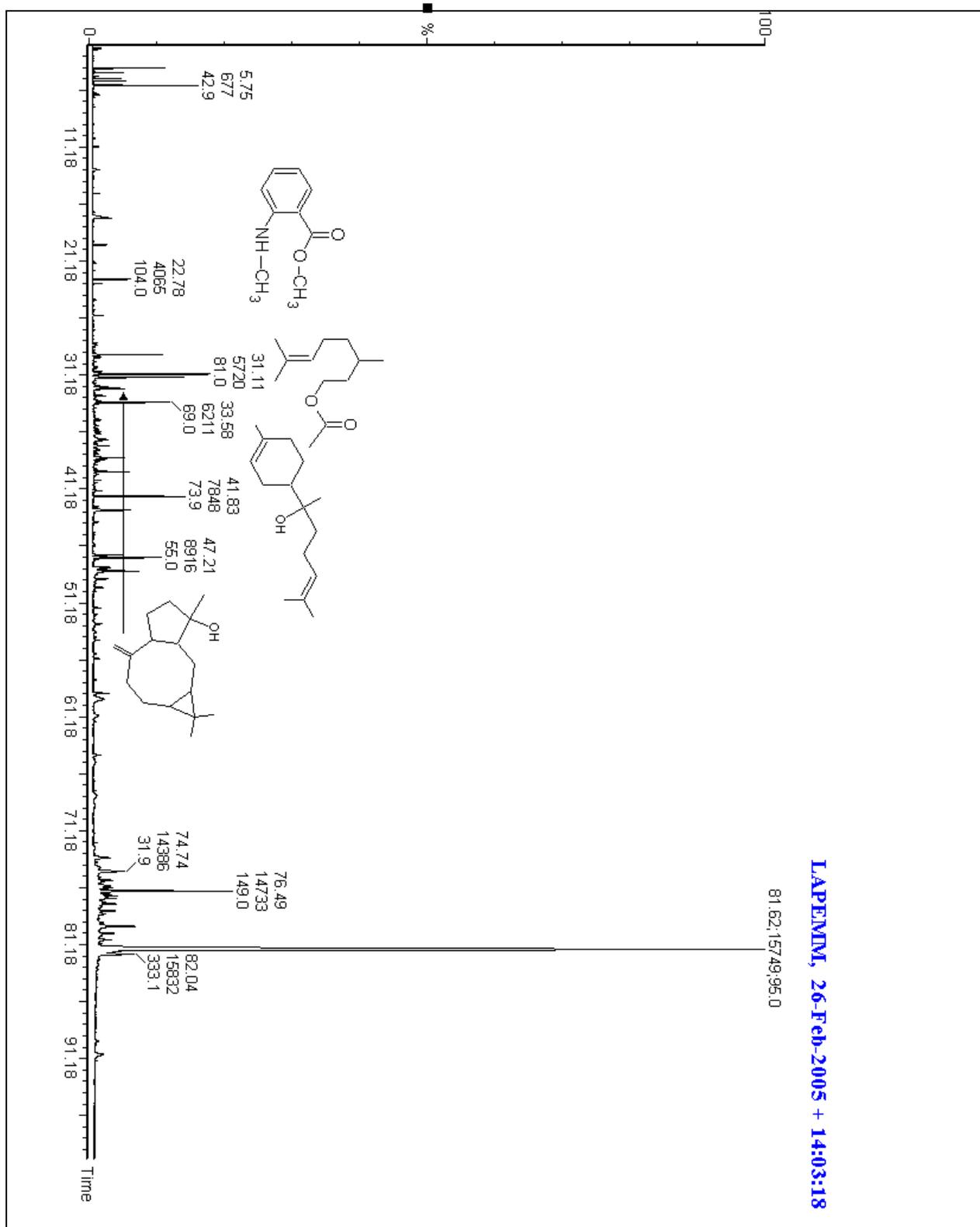


Figura 54 – Cromatograma de íons totais da fração ZTCM óleo (70 eV)

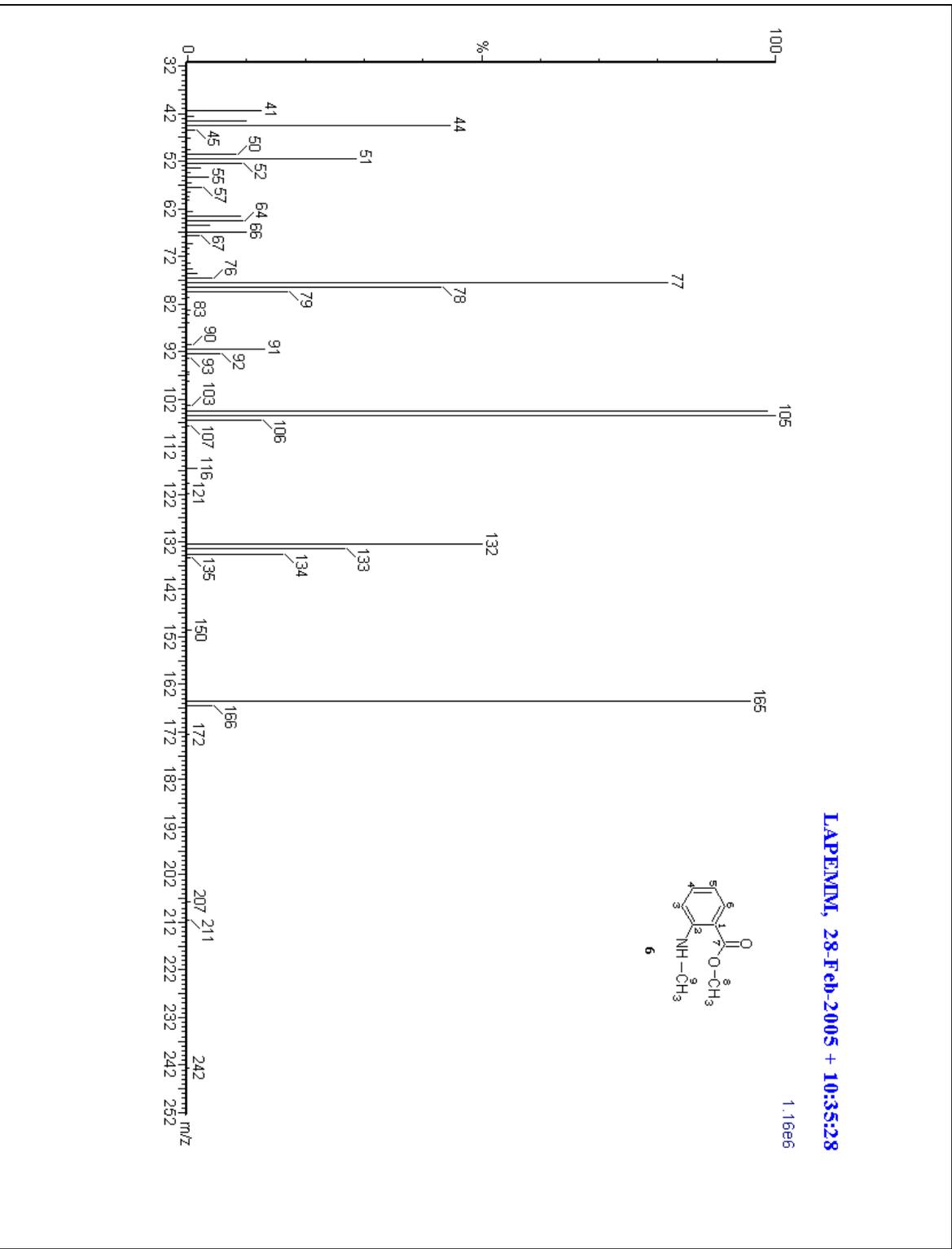


Figura 55 – Espectro de massas da substância **6** (N-metilantranilato de metila)

**REFERÊNCIAS**

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, 1995.
- AGRAWAL, R.B.; RANGARI, V.D. Antiinflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19a-h lupeol isolated from *Strobilanthes callosus* and *Strobilanthes ixiocephala* roots. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 35, 384-387, 2003.
- AHMAD, M.U. *et al.* A sterol glycoside form marine green algae *codium iyengarii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 04, p. 1429-1431, 1992.
- AHMAD, M.U. *et al.* Alkaloids of *Zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, v.74, n. 01, p. 191-193, 2003.
- AHSAN, M. *et al.* Constituents and cytotoxicity of *Zanthoxylum rhesta* stem bark. **Fitoterapia**, v. 71, n. 06, p. 697-700, 2000.
- ALVES, H.de M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 03, p. 10-15, 2001.
- ANTONACCIO, L.D., GOTTLIEB, O.R. Sesamina e lupeol na casca de duas Fagaras brasileiras. **Anais da Associação Brasileira de Química**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 183-184, 1959.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023 - Informação e documentação – Referências – Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520 - Informação e documentação – Citações em documentos – Apresentação**. Rio de Janeiro, 2002. 7p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724 - Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – Apresentação**. Rio de Janeiro, 2005. 9p.

BAUMANN, T. W. Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee – and a glimpse of metabolite profiling. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.01, p.243-251, 2006.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1059 p.

BERNHARD, H.O., THIELE, K. solierung von ( $\pm$ )-Tembamid aus *Zanthoxylum tingoassuiba* L. (Rutaceae). **Helvetica Chemica Acta**, v.61, n.06, p. 2269-2272, 1978.

CASTIGLI, E. *et al.* GL-15 and U251 glioblastoma-derived human cell lines are peculiarly susceptible to induction of mitotic death by very low concentrations of okadaic acid. **Oncology Reports**, n. 15, p.463-470, 2006.

CHEN, I. *et al.* Dimeric 2-quinolone alkaloid and antiplatelet aggregation constituents of *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 01, p.237-239, 1994.

CHEN, I., *et al.* Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 05, p.1091-1097, 1995.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n.52, p. 52-60, 1997.

CUCA, L.E.; MARTINEZ, J.C.; MONACHE, F.D. 7-9'- Epoxy lignan and other constituents of *Zanthoxylum culantrillo*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 07, p.1437-1439, 1998.

DAHLGREN, GERTRUDE. 1989. **Diagrama de Dahlgren modificado**. Disponível em: <[http://felix.ib.usp.br/bib304/AULA\\_2\\_arquivos/frame.htm](http://felix.ib.usp.br/bib304/AULA_2_arquivos/frame.htm)> Acesso: 15 fev. 2006.

DELLA GRECA, M.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Sterosterols from *Typha latifolia*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 06, p. 1430-1435, 1990.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed., London: John Wiley & Sons, 2002. 517p.

DIEHL, E.E.; POSER, G.L.V.; HENRIQUES, A.T. Constituents of *Zanthoxylum rugosum* St.-Hil & Tul. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 275-277, 2000.

DJILANI, A. *et al.* New extraction technique for alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 03, p. 518-520, 2006.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE RUTACEAE. Disponível em: <[www.arbolesornamentales.com/Rutaceae.htm](http://www.arbolesornamentales.com/Rutaceae.htm)> Acesso em: 29 jul. 2006.

FACUNDO, V.A. *et al.* Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) Alain. **Química Nova**, v. 28, n.02, p. 224-225, 2005.

FERRACIN, R.J. **Estudo Fitoquímico de *Hortia arborea*: uma contribuição à quimiosistemática de Cusparieae**. 1992. 135p. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.

FILHO, V.C. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n.05, p. 680-685, 2000.

- FONSECA, M.R. *et al.* Estudo fitoquímico de *Metrodorea mollis*. In: **XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2006, Salvador. Anais do XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2006.
- FREITAS, C. M.J. *et al.* Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 805-807, 2003.
- FREITAS, C.M.J. **Estudo Fitoquímico de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae)**. 2001. 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia). Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, UFBA.
- GOTTLIEB, O. R. Evolução química vegetal. **Ciência e Cultura**, v. 39, p. 357-360, 1987.
- GRANATO, A.C. *et al.* Produtos naturais da *Ascídia botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v.28, n.02, p.192-198, 2005.
- GRAY, A.I. Coumarins e Chromones in the Rutales. In: WATERMAN, P.G.; GRUDON, M.F. (Org). **Chemistry and chemical taxonomy of Rutales**. London: Academic Press, 1983. p. 97-142.
- HERBERT, R.B. **The Biosynthesis of secondary metabolites**. 2. ed., London: Chapman & Hall, 1989. 231p.
- HOHLEMWERGER, S.V.A. **2-Quinolonas de *Andreodoxa flava* Kalunki: Uma nova espécie de Rutaceae da Bahia – Brasil**. 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Instituto de Química, UFBA.
- HOHLEMWERGER, S.V.A. *et al.* Estudo comparativo da composição de micromoléculas em ceras epicuticulares de folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba*. In: **28ª. Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. 2005, Poços de Caldas. 28ª. Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCAR, 2003. 152p.

HSIAO, J.J.; CHIANG, H.C. Lignans from the wood of *Aralia bipinnata*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 04, p. 899-902, 1995.

HSIEH, T.J.; LU, L.H.; SU, C.C. NMR spectroscopic, mass spectroscopic, X-ray crystallographic, and theoretical studies of molecular mechanics of natural products: farformolide B and sesamina. **Biophysical Chemistry**, v.114, p.13–20, 2005.

JANUÁRIO, A. H. **Estudo Fitoquímico de *Esenbeckia grandiflora* e *Almeidea rubra***. 1995. 200f. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.

KRANE, B. *et al.* The benzophenanthridine alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 1-43, 1984.

LIMA, M.S. *et al.* Constituintes químicos das partes aéreas e atividade biológica da raiz de *Monniera bahiensis* L. (Rutaceae). In: **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1998, Águas de Lindóia. Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p. 144, 1998.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 360p.

LOTA, M.L. *et al.* Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 61-78, 2000.

LUBISCO, N.M.L.; VIEIRA, S.C. **Manual de estilo acadêmico: monografias, dissertações e teses**. 2. ed. rev. e ampl. Salvador: EDUFBA, 2003. 145p. il.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do Metabolismo Secundário. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 02 , n. 10, p. 24-28, 1999.

MELO, M. de F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v.18, n.01, p. 73-90, 2004.

MENEZES, M.M.DE M; PEREIRA, N. A. Isolation of pharmacologically active alkaloids from Tinguaciba (*Fagara tinguassuiba*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 68, n.04, p. 71-77, 1987.

MESTER, I. Structural Diversity and Distribution of Alkaloids in the Rutales. In: WATERMAN, P.G.; GRUDON, M.F. (Org). **Chemistry and chemical taxonomy of Rutales**. London: Academic Press, 1983. p.31-142.

MESTER, I. The occurrence of the alkaloids in Rutaceae. **Fitoterapia**, v.44, p. 123-152, 1973.

MOORE, J.A. Floral Anatomy and phylogeny in the Rutaceae. **New Phytology**, v. 35, p. 318-322, 1936.

MORIYASU, M. *et al.* (R) – (+) – Isotembetarine, a quaternary alkaloid from *Zanthoxylum nitidum*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 03, p. 299-301, 1997.

MOURA, N.F. *et al.* Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 08, p. 1443-1446, 1997.

MÜLLER, A.H. **Constituintes Químicos de *Metrodorea* e *Pilocarpus*: Contribuição à Quimiosistemática de *Pilocarpineae***. 1994. 187f. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.

MURRAY, D.H. MENDEZ, J.; BROWN, S.A. **The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry**. Chichester: John Wiley, 1982. p.21.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS): **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, (approved Standard M2-A4). Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS): **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**, (approved Standard M2-A4). Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

NG, K.M.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Benzophenanthridine Alkaloids form the stem bark of a *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3251-3254, 1987.

NISSANKA, A.P.K. *et al.* Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 08, p. 857-861, 2001.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 2.ed. Philadelphia: Harcourt College Pub., 1996. 511p.

PEREIRA, M.R.G. *et al.* Cytotoxicity of catechol towards human glioblastoma cells via superoxide and reactive quinines generation. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 40, n.04, p. 280-285, 2004.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>> Acesso em: 21 jul. 2006.

PINTO, A.C. *et al.* Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIRANI, J.R. **A ordem de Rutales na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1982. 31p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIRANI, J.R. **Estudos Taxonômicos em Rutaceae: Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae). Análise cladística de Pteleinae. Sinopse de Rutaceae do Brasil**. Tese de Livre Docência. 197p. 1999. Universidade de São Paulo, São Paulo.

REIS, A.L.V. Atividade Antimicrobiana de *Zanthoxylum stelligerum* (TURCZ). In: **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2002, Cuiabá. Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, FT316, 2002.

RIGGS, N. V.; ANTONACCIO, L.; MARION, L. A new quaternary aporphine from *Fagara tinguassoiba* hoehne. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, p. 1330-1335, 1961.

RIVEROS, J.M. Uma Visão Atual da Química no Brasil. In: **Ciência e Tecnologia no Brasil: Uma Nova Política para um mundo global**, FGV, São Paulo, 1993. Disponível em: <[www.schwartzman.org.br/simon/scipol/pdf/quimica.pdf](http://www.schwartzman.org.br/simon/scipol/pdf/quimica.pdf)>. Acesso: 03 mai. 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. e TYLER, V. E. **Farmacognosia & Farmacobiocotecnologia**. São Paulo: Editora Premier, 1997. 372p.

SALEEM, M. *et al.* Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. **Carcinogenesis**, v. 26, n.11, p.1956-1964, 2005.

- SANTANA, L.L.B. *et al.* Estudo Fitoquímico de folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba*. In: **XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006, Salvador. Anais do XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006.
- SEIGLER, D.S. **Plant secondary metabolism**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998, 759p.
- SIDDIQUI, S. *et al.* Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 02, p. 229-233, 1988.
- SILVA, C. V.; *et al.* Micromoléculas de *Zanthoxylum stelligerum* (TURCZ). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 05, n. 1, p. 75-78, 2002.
- SILVA, E.C. Estudo fitoquímico de *Monnieria bahiensis* (Rutaceae) e *Peperomia pellucida* (Piperaceae). **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1998, Águas de Lindóia. Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p. 144, 1998.
- SILVA, M.F.G.F, GOTTLIEB, O.R., EHRENDORFER, F.  
Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more taxonomy and evolutionary interpretation of the family. **Plant Systematics and Evolution**, v. 161, p. 97-134, 1988.
- SILVA, N. M. B. da; ARAÚJO, O.; SANTOS, R. L. **Cartografia digital dos solos de Feira de Santana (Ba) e elaboração de um SIG agro-pedológico**. Disponível em: < [www.cartografia.org.br/xxi\\_cbc/092-SG28.pdf](http://www.cartografia.org.br/xxi_cbc/092-SG28.pdf) > Acesso em: 21 jul. 2006.
- STECK, W.; MAZUREK, M. Identification of Natural Coumarins by NMR Spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v. 35, n. 4, p.414-439, 1972.
- STEVENSON, P. C. *et al.* Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 41-46, 2003.

STERMITZ, F.R.; CAOLO, M.A.; SWINEHART, J.A.. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. **Phytochemistry**, v.19, p. 1469-1472, 1980.

STERMITZ, F.R.; SWINEHART, J.A. Bishordeninyl terpene alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum culantrillo* and *Z. corianceum*. **Phytochemistry**, v.19, p. 1219-1223, 1980.

SUDAM E GENAMAZ. **Estudo do potencial de mercado de fármacos (medicamentos e cosméticos) fitomedicamentos, bancos de extratos e compostos e serviços de patenteamento e certificação: relatório final**. Belém, 2000, 133p.

SUKARI, M.A. *et al.* Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. **Fitoterapia**, v. 70, n.02, p. 197-199, 1999.

THOMAS, A. F.; BASSOLS, F. Occurrence of Pyridines and Other Bases in Orange Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2230-2243, 1992.

VAQUETTE, J. *et al.* Alcaloides de *Zanthoxylum decaryi*: La decarine, nouvel alcaloïde dérivé de la benzophenanthridine. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1257-1259, 1974.

VELOZO, E. da S. **Fitoquímica comparada dos gêneros *Angostura*, *Almeidea* e *Rauia* (Rutaceae)**. 1996.127f. Tese de Doutorado – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos- SP.

WATERMAN, P.G.; GRUDON, M.F. (Org). **Chemistry and Chemical taxonomy of Rutales**. London: Academic Press, 1983. 460p.

WATERMAN, P.G. Chemosystematics of the Rutaceae: comments on the interpretation of da Silva & al. **Plant Systematics and Evolution**, v. 173, p. 39-48, 1990.

WIKIPÉDIA. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation. Apresenta conteúdo enciclopédico. **Mapa de Feira de Santana – BA**. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Feira\\_de\\_Santana&oldid=2570207](http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Feira_de_Santana&oldid=2570207)>. Acesso em: 21 jul. 2006.

XIONG, Q. *et al.* Alkylamides from pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. . **Phytochemistry**, v. 46, n. 06, p. 1123-1126, 1997.

YANG, Y.P. *et al.* Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 05, p. 567-572, 2002.

YUANZHENG, H. *et al.* Studies on the chemical components of the essential oil from the leaves of *Citrus junos* (SIEB). **Chemistry and Industry of Forest Products**, v. 13, n.2, p. 165-168, 1993.

ZENK, M.H.; TANAHASHI, T. Isoquinoline alkaloids from cell suspension cultures of *Fumaria capreolata*. **Plant Cell Reports**, v. 4, n. 2, p.96-99, 1985.

ZENK, M.H.; TANAHASHI, T. One step enzymatic synthesis of dihydrosanguinarine from protopine. **Tetrahedron letters**, v. 29, n. 44, p. 5625-5628, 1988.

ZENK, M.H.; The formation of benzophenanthridine alkaloids. **Pure & Applied Chemistry**, v. 66, n. 10/11, p. 5625-5628, 1994.