

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO, BIOLÓGICO E QUIMIOSSISTEMÁTICO DO CAULE DE *Spathelia*
excelsa (RUTACEAE)**

*** ALINE CARVALHO DE FREITAS**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Química, área de concentração Química
de Produtos Naturais**

Orientadora: Dra. Maria da Paz Lima

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA/CPPN

*** Bolsista FAPEAM**

MANAUS

2008

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me concedido muitas bênçãos e uma delas é a concretização desse trabalho.
Por ter cuidado de mim e da minha família com todo o zelo e amor.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**, as aulas ministradas por seus doutores, contribuindo na minha formação.

À **FAPEAM**, pela bolsa de estudo concedida, fundamental na realização das minhas atividades e estudos.

À Dra. **MARIA DA PAZ LIMA**, minha orientadora, inicialmente por ter permitido a realização de estágio no seu laboratório, onde ingressei na área de fitoquímica, dando o conhecimento, com o qual obtive êxito no processo seletivo do Mestrado e pela dedicação durante a orientação, despertando em mim o interesse no isolamento e identificação de substâncias naturais de plantas.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação: **Lívia, Dominique, André, Darling, Caroline, Júnior, Zuany, Alex, Jaqueline, Diego, Orivaldo, Radamés, Fátima, Ercila, Dorian e Elson** que se dedicavam a fazer grupos de estudos a fim de concretizar as disciplinas ofertadas e na realização das pesquisas.

Aos colegas de laboratório da CPPN **Lyege, Loretta, Darlene, Willian, Wagner, Mauro e Elaine Cristina**.

Ao Dr. **Wanderly Tadei**, por ter cedido seus laboratórios para a realização de ensaios com *Aedes aegypti*.

À Dra. **Ana Cristina**, por ter me orientado nos ensaios inseticidas.

Ao Dr. **Antônio Gilberto**, pelos espectros realizados.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, que não mediram esforços para o bom desempenho das disciplinas.

Aos **amigos químicos da UFPA** que sempre me encorajaram a não desistir dos meus sonhos e em especial ao **Arlisson**.

Enfim, agradeço a Deus por me guiar e fortalecer, por ter colocado pessoas boas no meu caminho e por mais essa conquista na minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	.x
LISTA DE ESQUEMAS	xi
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DE RUTACEAE	1
1.2 POTENCIAL INSETICIDA DOS LIMONÓIDES DE RUTACEAE	2
1.3 POTENCIAL DE LIMONÓIDES PARA O CONTROLE DO DENGUE	7
1.4 GÊNERO <i>SPATHELIA</i>	11
1.4.1 ASPECTO BOTÂNICO E PAPEL ECONÔMICO DE <i>SPATHELIA EXCELSA</i>	19
2 OBJETIVOS	21
3 EXPERIMENTAL: PARTE 1	22
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	22
3.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	22
3.1.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	22
3.1.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS	23
3.1.3a FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE TSM-6	25
3.1.3b FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE TSM-8	27

3.1.3c FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE TSM-9	30
3.1.3d FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE TSM-11	34
4 EXPERIMENTAL- PARTE II	36
4.1 BIOENSAIOS COM LARVAS E A FASE ADULTA DO <i>AEDES AEGYPTI</i>	36
4.1.1 DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS E DOS INSETO S	36
4.1.2 PROCEDIMENTOS DOS TESTES BIOLÓGICOS	36
4.1.3 DETERMINAÇÃO DA CL ₅₀	39
4.2 TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	40
4.2.1 MÉTODO QUANTITATIVO ESPECTOFOTOMÉTRICO	40
5 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS	41
6 RESULTADOS E DISCURSÃO - PARTE 1	44
6.1 ESTUDOS QUÍMICOS	44
6.1.1 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	44
6.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 1	45
6.1.3 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 2	53
6.1.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 3	60
6.1.5 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 4	69
7. RESULTADOS E DISCURSSÃO - PARTE II	84
7.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	84
7.1.2. ENSAIO LARVICIDA EM <i>AEDES AEGYPTI</i>	85
8. CONCLUSÕES	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

RESUMO

A família Rutaceae ocorre nas regiões dos trópicos úmidos e temperados do planeta, compreendendo cerca de 1612 espécies distribuídas em 160 gêneros. No Amazonas, são catalogadas 61 espécies distribuídas em 25 gêneros, sendo os que apresentam maior número de espécies: *Zanthoxylum*, *Hortia*, *Esenbeckia*, *Raputia* e *Conchocarpus*. O gênero *Spathelia* é representado no estado pela espécie *Spathelia excelsa* (Krause) Cowan & Brizicky [sin. *Sohneoyia excelsa* K.] conhecida como Surucucumirá. Nos estudos prévios com folhas e raízes desta espécie, identificou-se substâncias de classes químicas com potencial inseticida como alcalóides e limonóides. A literatura mostra a retomada por fitoconstituintes com atividade inseticida como alternativa para o controle de insetos vetores de doenças, motivada pela baixa toxicidade em contraste aos inseticidas sintéticos, que além de danos ao meio ambiente, contribuem para o surgimento de formas resistentes dos insetos. Isso favorece as doenças reemergentes, como é o caso do dengue, cujo principal vetor no Brasil é o *Aedes aegypti*, que vem mobilizando as autoridades sanitárias em diversas regiões do país. Este trabalho visou contribuir para o conhecimento químico da espécie amazônica *S. excelsa* e a busca de princípios ativos como inseticida em *A. aegypti* além de antioxidante. Assim coletou-se partes do caule de um indivíduo ocorrente na Reserva Ducke e preparou-se extratos orgânicos. O fracionamento do extrato metanólico em coluna de sílica gel, tipo filtrante forneceu 16 frações. A fração 6 (TSM-6) filtrada em celulose, seguida por coluna de sílica gel e recristalização resultou no isolamento da mistura de esteróides, sitosterol (**1a**) e estigmaterol (**1b**), e do limonóide desacetilspatelinina (**2**). A fração 8 (TSM-8) fracionada em coluna de sílica gel forneceu o alcalóide 7,8-dimethoxiflindersina (**3**). As frações 11-15 foram reunidas (TSM-11) e filtradas em sephadex, seguida por coluna em sílica gel resultou no isolamento de um triterpeno do tipo glabretal com cadeia lateral 21,24-epóxi-21,23,25-trihidróxi, substituição β -angeloil em C-3 e α -hidróxi em C-7 (**4**). A sua caracterização foi através de análise espectrométricas como IV e RMN

(^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC). O limonóide (**2**) e o triterpeno (**4**) foram submetidos a testes larvicidas e apresentaram Cl_{50} de 69,0 e de 4,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O triterpeno também foi avaliado com insetos na fase adulta, no entanto não ocorreu letalidade durante os tempos iniciais do teste (30 min). Na avaliação da atividade antioxidante em DPPH, entre as frações testadas (TSM-6, TSM-7 e TSM-9), os melhores resultados foram obtidos em concentrações maiores (100 $\mu\text{L/mL}$) de TSM-7 (60%) e TSM-9 (61%). Estes resultados não foram promissores quando comparados ao padrão (rutina). Ressalta-se que desacetilspathelina (**2**) foi detectado como o constituinte predominante, sugerindo que este limonóide não apresenta potencial antioxidante. Os estudos com o extrato de *S. excelsa* levou ao isolamento de substâncias importantes para a quimiossistemática da família Rutaceae e forneceu um triterpeno com excelente atividade larvicida do inseto transmissor do dengue.

ABSTRACT

The family Rutaceae occurs in the areas of the humid and seasoned tropics of the planet includes about 1612 species distributed in 160 genus. In Amazon, 61 species are catalogued and distributed in 25 genus, ones that have larger number of species are *Zanthoxylum*, *Hortia*, *Esenbeckia*, *Raputia* and *Conchocarpus*. The genus *Spathelia* is represented in Amazon by the species *Spathelia excelsa* (Krause) Cowan & Brizicky [sin. *Sohnreyia excelsa* K.], known as Surucucumirá. In the previous studies with leaves and roots of this species were identified substances of chemical classes with insecticide potential as alkaloids and limonoids. The literature shows the return for fitoconstituents with insecticide activity as alternative for the control of vector insects of diseases due the low toxicity in contrast to the synthetic insecticides, that besides damages to the environment, they contribute to the appearance of resistant forms of the insects. This favors the reemerge diseases as the case of the dengue that have as main vector in Brazil the *Aedes aegypti*, which comes mobilizing the sanitary authorities in several areas of the country. This work aims to contribute for the chemical knowledge of the amazon's species *S. excelsa* and the search of active constituents as insecticide in *A. aegypti* besides antioxidant. Stems this species was collected in the Reserva Ducke and the organic extracts prepared. The extract methanolic was fractionated over in silica gel column to produce 16 fractions. The fraction 6 (TSM-6) filtered in cellulose, followed for silica gel column and then recrystallization resulted in isolation of the steroids mixture, sitosterol (**1a**) and stigmasterol (**1b**), and deacetylspathelin limonoid (**2**). The fraction 8 (TSM-8) fractioned in silica gel afforded the 7,8-dimethoxyflindersine alkaloid (**3**). The fractions 11-15 were grouped (TSM-11) and filtered in Sephadex, followed for silica gel column resulting in the isolation of triterpene glabretal-type with chain lateral 21,24-epoxi-21,23,25-trihydroxy, substitution β -angeloil at C-3 and α -hydroxy in C-7 (**4**). Their structures were established on the basis of spectral data of IV and NMR

(^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC). The limonoid (2) and the triterpene (4) were submitted to larvicidal assay and presented Cl_{50} 69,0 and of 4,8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The triterpene was also evaluated with insects adult however not occurred lethality during the initial times of test (30 minutes). In the evaluation of the antioxidant activity in DPPH, among tested fractions (TSM-6, TSM-7 and TSM-9), the best results were obtained in larger concentrations (100 $\mu\text{L/mL}$) of TSM-7 (60%) and TSM-9 (61%). These results were not promising when compared to the pattern (rutin). Considering that deacetylspathelin (2) was detected as the predominant constituent, this results suggest that this limonoid doesn't present antioxidant potential. The studies with the extract of *S. excelsa* afforded the isolation of important substances for the chemosystematics of the family Rutaceae and a triterpene with excellent activity larvicidal of the insect transmitter of the dengue.

ABREVIACES E SBOLOS

CPPN	Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DQ	Departamento de Química
DMSO	Dimetilsulfxido
AcOEt	Acetato de etila
Hex	Hexano
Me	Metila
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hertz)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC	Cromatografia em coluna
COSY	Correlation Spectroscopy
cm ⁻¹	Centímetros recíprocos
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>d</i>	Dubleto
<i>m</i>	Multipleteo
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
<i>dt</i>	Duplo tripleto

t	Tripleto
h	Altura
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
IV	Infravermelho
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFSCAR	Universidade Federal de São Carlos
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de <i>Spathelia excelsa</i> obtida na Reserva Ducke	20
Figura 2. Espectro na região do infravermelho de 1 em KBr	48
Figura 3. Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (400 MHz, CDCl_3)	49
Figura 3a. Ampliação dos picos de hidrogênios H-6 e H-3 (1a) e H-22 e H-23 (1b)	50
Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (100 MHz, CDCl_3)	51
Figura 4a. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C na região eM δ 28,18-11,86 da substância 1	52
Figura 5. Espectro na região do infravermelho da substância 2 em KBr	56
Figura 6. Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (400 MHz, CDCl_3)	57
Figura 6a. Ampliação de regiões do espectro de RMN- ^1H da substância 2 (400 MHz, CDCl_3)	58
Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (100 MHz, CDCl_3)	59
Figura 8. Espectro na região do infravermelho da substância 3 em KBr	64
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (400 MHz, CDCl_3)	65
Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (100 MHz, CDCl_3)	66
Figura 11. Espectro de HSQC da substância 3 (400/100 MHz, CDCl_3)	67
Figura 12. Espectros de HMBC da substância 3 (400/100 MHz, CDCl_3)	68
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	75
Figura 13a. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 4 (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	76
Figura 14. Espectro de COSY da substância 4 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	77
Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	78
Figura 15a. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 4	79
Figura 16. Espectro de HSQC da substância 4 (400/100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	80
Figura 16a. Ampliação do espectro de HSQC da substância 4	81
Figura 17. Espectro de HMBC da substância 4 (400/100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	82
Figura 17a. Ampliação do espectro de HMBC da substância 4	83
Figura 18. Limonóides com atividade larvicida frente <i>Aedes aegypti</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limonóides de ocorrência em Rutaceae com atividade inseticida	04
Tabela 2. Cromonas isoladas de <i>Spathelia</i>	16
Tabela 3. Coluna filtrante do extrato em metanol (16,6 g) do caule de <i>Spathelia excelsa</i>	24
Tabela 4. Sistema de eluentes de TSM-8	29
Tabela 5. Sistema de eluentes de TSM-8.12.15	29
Tabela 6. Sistema de eluentes de TSM-9	32
Tabela 7. Sistema de eluentes das subfrações de TSM-9.6.5	32
Tabela 8. Sistema de eluentes das subfrações de TSM-9.6.5.14	33
Tabela 9. Sistema de eluentes das subfrações de TSM-11	34
Tabela 10. Concentrações TSM-6.6A no ensaio larvicida com <i>A. aegypti</i>	38
Tabela 11. Concentrações de TSM-11.11.10A no ensaio larvicida com <i>A. aegypti</i>	38
Tabela 12. Dados de RMN ^{13}C de 1 (100 MHz, CDCl_3) e comparação com a literatura	46
Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 2 e comparação com a literatura	55
Tabela 14. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância 3	62
Tabela 15. Correlações observadas nos espectros de HSQC e HMBC da substância 3	63
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 4	72
Tabela 17. Correlações observadas no espectro de HMBC da substância 4	74
Tabela 18. Percentual da capacidade de descoloração de TSM-6, TSM-7 e TSM-9	85
Tabela 19. Porcentagem de mortalidade das larvas de <i>A. aegypti</i> frente as substâncias 2 e	88

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção dos extratos do caule de <i>Spathelia excelsa</i>	23
Esquema 2. Fracionamento cromatográfico de TSM-6	26
Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de TSM-8	28
Esquema 4. Fracionamento cromatográfico de TSM-9	31
Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de TSM-11	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Limonóides de Rutaceae com atividade inseticida	6
Quadro 2. Registro de casos de dengue no Brasil entre 1998 –2005	9
Quadro 3. Estruturas dos alcalóides de <i>Spathelia</i>	12
Quadro 4. Estrutura dos limonóides de <i>Spathelia</i>	14
Quadro 5. Cumarina, flavonóide e esteróides de <i>Spathelia excelsa</i>	17

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cálculo da CL ₅₀ pela regressão linear das concentrações da substância 2	88
Gráfico 1. Cálculo da CL ₅₀ pela regressão linear das concentrações da substância 4	89

1.INTRODUÇÃO

1.1.ASPECTOS GERAIS DE RUTACEAE

A diversidade vegetal, constitui importante fonte de riqueza, no entanto para entendê-la torna-se necessário o conhecimento das interações recíprocas dos organismos, especialmente nos processos que envolvem a comunicação química através dos seus metabólitos secundários. Estes metabólitos apresentam distribuição diferenciada entre os grupos taxonômicos e desempenha papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Os fatores bióticos são os principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por substâncias do metabolismo secundário que possuem papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes (Dewick, 2001). Estes metabólitos também constituem fonte de produtos químicos para aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos, agroquímicos, entre outros (Newall et al., 1998).

Rutaceae é uma das famílias que devido à diversidade dos metabólitos secundários tem gerado interesse na investigação sobre os aspectos químicos, biológicos, quimiossistemáticos e farmacológicos (Waterman, 1983). Esta família ocorre nas regiões dos trópicos úmidos e temperados do planeta, compreendendo cerca de 1600 espécies distribuídas em 160 gêneros. Alguns gêneros têm poucos representantes como *Adiscanthus*, *Erythrochiton*, *Murraya*, *Galipea*, *Leptothyrsa* e *Monniera* (Albuquerque, 1976a; Missouri Botanical Garden's, 2007).

No Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), estão catalogadas atualmente 61 espécies de Rutaceae no estado do Amazonas distribuídas em 25 gêneros, sendo o maior número de espécies verificado em *Zanthoxylum* (10), *Hortia* (6), *Esenbeckia* (5), *Raputia* (5) e *Conchocarpus* (5).

De forma geral, os metabólitos secundários mais característicos de Rutaceae são alcalóides e limonóides e estes são considerados marcadores quimiossistemáticos da família. Os limonóides mais característicos apresentam anéis A e D-seco e são conhecidos na literatura por sua atividade inseticida. Outras classes de metabólitos presentes em Rutaceae são triterpenos, lignanas, cromonas e cumarinas. As cromonas têm ocorrência restrita na família, apenas no gênero *Spathelia*. (Waterman, 1983).

1.2. POTENCIAL INSETICIDA DOS LIMONÓIDES DE RUTACEAE

Os limonóides são tetranortriterpenóides também conhecidos como meliacinas, cuja ocorrência é restrita às famílias pertencentes à ordem Rutales, principalmente em Meliaceae e Rutaceae. Tem ocorrência mais limitada em Cneoraceae e Simaroubaceae (apenas em *Harrisonia abyssinica*). Quanto a sua variação estrutural, os limonóides típicos de Rutaceae apresentam anéis A/D modificados enquanto que em Meliaceae ocorrem maior variação estrutural (Connolly, 1983; Dreyer, 1983).

O maior interesse nessas substâncias está na atividade contra insetos, atuando como inibidores da alimentação (antefeedant) ou interferindo no crescimento (Champagne et al., 1992). A tabela 1, mostra as concentrações efetivas de alguns limonóides (quadro 1) de ocorrência em Rutaceae nos ensaios com insetos da ordem Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Lepidoptera e Orthoptera, apresentando resultados promissores. Entre os limonóides, nomilina, limonina e obacunona foram testados em maior número de espécies de insetos para avaliação de inibição da alimentação e do crescimento, principalmente em lepidópteros. Nos ensaios realizados por Kubo e Klocke (1981;1986) com estes limonóides em *Spodoptera frugiperda* e *Heliothis zea*, foi verificado

que a nomilina e obacunona foram cerca de dez vezes mais ativas na inibição alimentar e crescimento que a limonina.

Nos ensaios de inibição do crescimento em *S. frugiperda* e *H. zea* utilizando-se desacetilnomilina, Kubo e Klocke (1986) verificaram que esta foi inativa sugerindo a importância do grupo acetato no anel A lactônico (nomilina) para atividade nas duas espécies de insetos.

Outros ensaios realizados com lepidópteros mostraram que a obacunona apresentou maior inibição da alimentação do que a limonina nas espécies *Eldana saccharina*, *Maruca testulalis*, *Spodoptera exempta* sugerindo a importância do anel A lactônico para atividade nestes insetos (Hassanali et al., 1986). Enquanto obacunona e nomilina também com anel A lactônico foram inativos para as espécies *Oncopeltus fasciatus* e *Peridroma saucia* (Champagne, 1992).

Alguns limonóides também foram submetidos a ensaios com insetos pertencentes às ordens Diptera e Coleoptera. Limonina, nomilina e obacunona demonstraram atividade na inibição alimentar em *Culex quinquefasciatus*, principal vetor da *Wuchereria bancrofti*, transmissor da filariose. A concentração efetiva de inibição alimentar da obacunona sobre este inseto foi $CE_{50} = 6,31$ o que representa uma atividade excelente, enquanto a nomilina e limonina esta concentração foi de $EC_{50} = 26,61$ e $EC_{50} = 59,57$, respectivamente. A obacunona que apresenta a função lactona no anel A de 7 membros, com insaturação é cerca de quatro vezes mais ativa que a nomilina e dez vezes mais ativa que a limonina. A diferença no aumento da atividade biológica da obacunona em relação a nomilina foi atribuída à ausência do grupo acetoxila no anel A da obacunona (Jayaprakasha et al., 1997).

Com relação aos insetos da ordem Coleoptera, a literatura registra a atividade do ácido isoobacunóico e limonina em *Leptinotarsa decemlineata*, conhecida como o besouro da batata do Colorado. Embora estes limonóides apresentem diferença estrutural significativa, neste ensaio observou-se a mesma inibição alimentar (Murray et al., 1999).

Conforme mostra a tabela 1, embora os limonóides de ocorrência em Rutaceae tenham potencial inseticida (inibidor de alimentação ou de crescimento), poucos ensaios foram realizados com insetos vetores de doenças indicando um vasto campo de estudo sobre o papel biológico desses metabólitos.

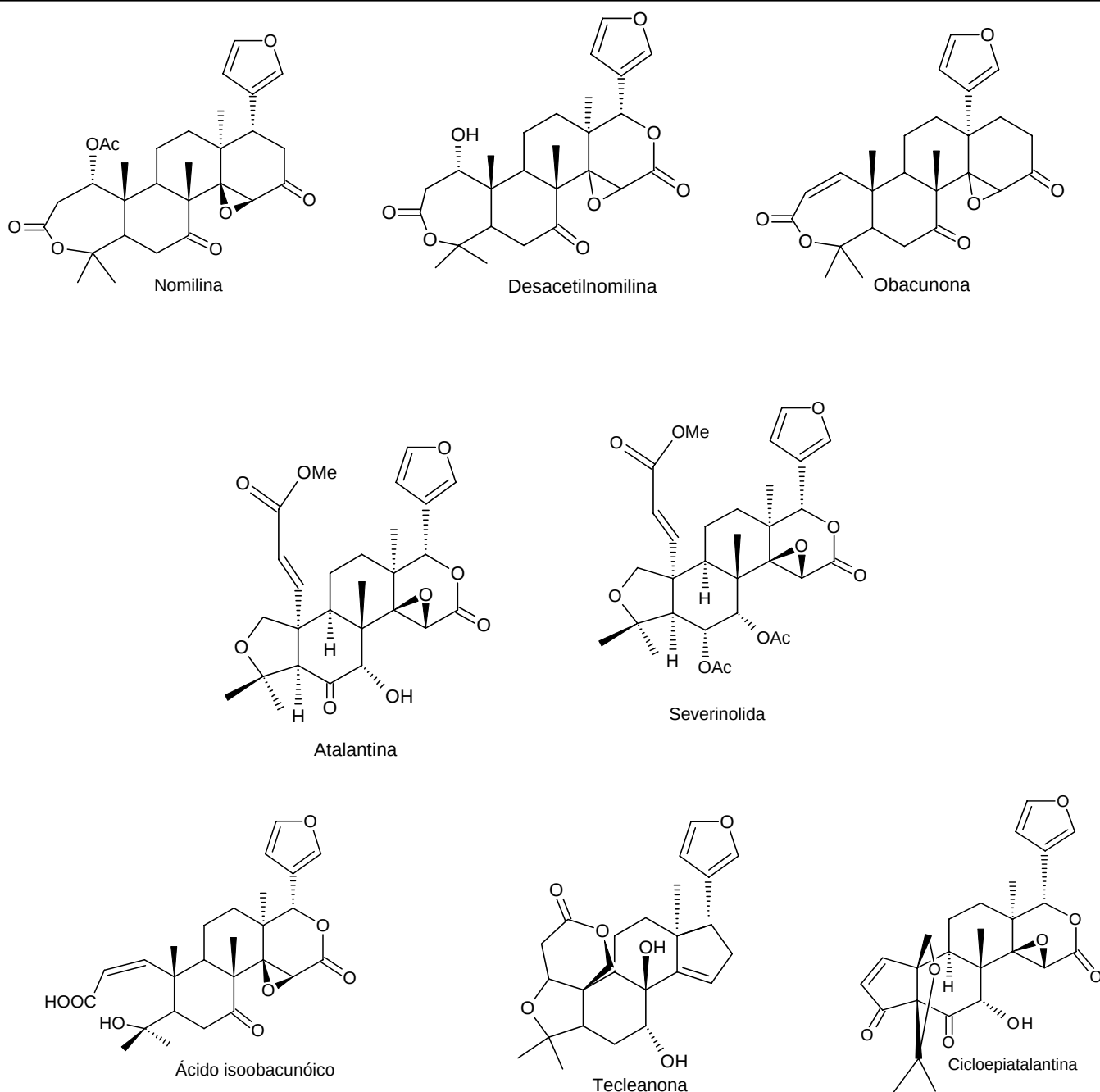
Tabela 1. Limonóides de ocorrência em Rutaceae com atividade inseticida

Limonóide	Inseto (Ordem)	Concentração efetiva		
		Inibição da alimentação	Inibição do crescimento	Inativo
Desacetilnomilina	<i>Heliothis zea</i> (L)			2000 ppm ¹
	<i>Pectinophora gossypiella</i> (L)		950 ppm ¹	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)			2000 ppm ¹
Limonina	<i>Choristoneura fumiferana</i> (L)			1000 ppm ²
	<i>Culex quinquefasciatus</i> (D)	EC ₅₀ 59,57 ³		
	<i>Eldana saccharina</i> (L)	61% (100g/disco) ⁴		
	<i>Heliothis zea</i> (L)	60,8 µg/disco ⁵	900 ppm ¹	
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (C)	30 µg/disco ¹²	8,3 µg/disco ⁶	
	<i>Maruca testulalis</i> (L)	58% (10g/disco) ⁴		
	<i>Spodoptera exempta</i> (L)			100 g/disco ⁴
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)	87% ⁷		
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)	6,12 µg/disco ⁵	756 ppm ¹	
	<i>Spodoptera litura</i> (L)	0,5% ⁸		
Nomilina	<i>Culex quinquefasciatus</i> (D)	EC ₅₀ 26,61 ³		
	<i>Earias insulana</i> (L)		64-0,05% ⁹	
	<i>Heliothis zea</i> (L)	6,6 µg/disco ⁵	95 ppm ¹	

	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (H)			50 µg/ninfa ¹⁰
	<i>Ostrinia nubilalis</i> (L)	50 ppm ¹¹		
	<i>Peridroma saucia</i> (L)			0,5 µmol/g/ dieta ¹⁰
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)	0,66 µg/disco ⁵	72 ppm ¹	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)	56% ⁷		
Obacunona	<i>Culex quinquefasciatus</i> (D)	EC ₅₀ 6,31 ³		
	<i>Eldana saccharina</i> (L)	79% (1 µg/disco) ⁴		
	<i>Heliotis zea</i> (L)	6,5 µg/disco ⁵	97 ppm ¹	
	<i>Maruca testulalis</i> (L)	61% (1 µg/disco) ⁴		
	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (H)			50 µg/ninfa ¹⁰
	<i>Peridroma saucia</i> (L)			0,5 µmol/g/ dieta ¹⁰
	<i>Spodoptera exempta</i> (L)	50% (100 g/disco) ⁴		
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)	68% ⁷		
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)	0,60 µg/disco ⁵	70 ppm ¹	
Rutaevina	<i>Heliothis zea</i> (L)	125 µg/disco ⁵		
Tecleanina	<i>Pectinophora gossypiella</i> (L)		210 ppm ¹	
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (L)		320 ppm ¹	
Ác isoobacunóico	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (C)	30 µg/disco ¹²		
Severinolida	<i>Plutella xylostella</i> (L)	21-40% ¹³		
Atalantina	<i>Plutella xylostella</i> (L)	41-60% ¹³		
Cicloepiatlantina	<i>Plutella xylostella</i> (L)	61-80% ¹³		

Fonte: 1.Kubo & Klocke,1986; 2.Alford & Bentley,1986; 3.Jayaprakasha et al., 1997; 4.Hassanali, et al, 1986 ; 5.Kubo & Klocke, 1981; 6.Yamasaki & Klocke, 1989; 7.Ruberto et al., 2002; 8.Koul, 1983; 9.Weissenberg et al, 1986; 10.Champagne,1992; 11. Arnason et al., 1987; 12.Murray et al., 1999; 13. Wu et.al.,1997.

Coleoptera (C), Diptera (D), Heteroptera (H), Lepidoptera (L) e Orthoptera (O)

Quadro 1. Limonóides de Rutaceae com atividade inseticida

1.3. POTENCIAL DE LIMONÓIDES PARA O CONTROLE DO DENGUE

A busca de novos inseticidas e o crescente estímulo às pesquisas que visam o uso de plantas como uma alternativa para o controle de mosquitos vetores de doenças, são motivados pela baixa toxicidade de várias substâncias naturais e pelo fato de serem biodegradáveis, evitando a contaminação do meio ambiente, em contraste com os inseticidas sintéticos, aos quais os insetos se tornam cada vez mais resistentes (Blumtritt, 2003).

A resistência apresentada pelos vetores é devido as frequentes aplicações dos inseticidas, dosagens crescentes, eficácia reduzida, alta toxicidade, danos ambientais e causando doenças, quando os vetores não podem ser controlados (Santiago et al., 2005). Assim, torna-se importante o estudo das plantas, pois elas co-evoluem com os insetos, são fontes de substâncias bioativas, produzidas em resposta a ataques patogênicos e podem auxiliar seguramente no controle dos insetos vetores (Grayer, 2001).

No Brasil, três espécies da ordem Diptera se destacam como vetores de doenças: *Anopheles darlingi* principal vetor da malária, o *Culex quinquefasciatus* da filariose bancroftiana e o *Aedes aegypti*, da dengue e febre amarela. Estes são capazes de sobreviver em temperaturas elevadas, estão presentes em diversas regiões do país e suas larvas têm alta resistência aos inseticidas químicos tradicionalmente utilizados como os organofosforados, carbamatos e piretróides (Campos e Andrade, 2001).

O dengue é uma doença infecciosa reemergente, causada por um arbovírus que vem mobilizando as autoridades sanitárias de todo o mundo em virtude de sua circulação nos cinco continentes e seu grande potencial para assumir formas graves e letais (Halstead, 1997). É

transmitida de uma pessoa doente para outra sadia através da picada do mosquito fêmea contaminado. No período entre 1955 e 1995 foram registrados cerca de 3 milhões de casos de febre hemorrágica do dengue e 58 mil mortes no mundo (Simas et.al, 2004). No Brasil, a doença tornou-se endêmica necessitando de programas mais eficientes para o combate ao vetor, pois conforme mostra o quadro 2, o número de casos no país entre os anos 1998-2005 tem aumentado consideravelmente nas regiões onde não houve controle efetivo.

A prevenção do dengue é difícil pela falta de vacinas e pelo fato do *Aedes aegypti* estar presente em grande número nas áreas urbanas. A melhor forma de prevenir é combater o mosquito, que se adapta muito bem em vários ambientes, o que dificulta a sua erradicação. No Brasil, o mosquito havia desaparecido em consequência das campanhas contra a febre amarela na primeira metade do século 20, mas em 1976, voltou a ser encontrado no país (Guzman, 1988). Assim as intervenções estão estritamente direcionadas para a eliminação do principal vetor desta enfermidade, o *Aedes aegypti* e diante da execução de três linhas de ações: saneamento do meio ambiente, atividades de educação que visam a redução dos criadouros potenciais deste mosquito e o seu combate direto por meio de agentes químicos, físicos e biológicos (Kllna,1995; OPS, 1995; Reiter, 1997).

Embora tenham surgido alguns avanços importantes no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle do dengue, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle integrado. Dessa forma, diversos casos de resistência têm sido registrados no mundo para espécies de mosquitos vetores (Sames et al., 1996). No Brasil os inseticidas mais utilizados nos programas de controle aos mosquitos são os organofosforados e os piretróides, no entanto embora o uso dos inseticidas fosforados para diversas pragas vem desde a década de 50, vários problemas tem sido detectados como a poluição ambiental além da resistência

adquirida pelas espécies-chave a estas substâncias, enquanto muitas espécies secundárias estão sendo exterminadas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o custo da resistência de insetos causado pelos inseticidas convencionais pode alcançar anualmente US\$ 1,4 bilhões nos Estados Unidos (Hemingway, J., 2000). Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente.

Quadro 2. Registro de casos de dengue no Brasil entre 1998 –2005

Região	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Norte	27.018	15.118	30.848	63.400	30.672	46.672	31.573	41.487
Nordeste	224.833	111.327	121.920	188.963	312.519	214.705	42.219	118.257
Sudeste	229.630	41.111	53.657	173.691	384.999	83.594	31.001	35.452
Sul	2.994	1.416	4.503	3.731	16.224	22.507	3.554	5.020
Centro-Oeste	20.552	14.115	17.197	34.529	68.690	36.164	15.528	41.800
Total	505.027	183.087	228.125	464.314	813.104	403.642	123.875	241.796

Fonte: OMS (Organização Mundial de Saúde)

A química sintética dos piretróides foi definida como uma das principais histórias de absoluto êxito no uso de produtos naturais, como matéria-prima para obtenção de derivados considerados não tóxicos ao homem. Originalmente as piretrinas utilizadas como inseticidas foram extraída das flores de crisântemos (espécies do gênero *Chrysanthemum*, Asteraceae). No entanto, a

partir da década de 50 tornaram-se superados devido a sua baixa estabilidade fotoquímica e térmica. Há mais de uma década as moléculas das piretrinas vem sendo modificadas para possibilitar a aplicação no campo e melhorar seu desempenho como inseticida denominadas como piretróides que recebem vários nomes comerciais. Atualmente estes dominam o mercado de inseticidas utilizados para fins residenciais devido sua baixa toxicidade e alta degradabilidade (Veiga-Júnior, 2003).

Entre os inseticidas de origem natural os limonóides são provavelmente os mais promissores e que apresentam mais estudos sobre a relação atividade-estrutura. A grande maioria de trabalhos se referem às atividades como inibidores ou retardadores de crescimento, danos na maturação, redução da capacidade reprodutiva e supressores de apetite (fagoinibidor), que levam os insetos predadores à morte por inanição ou toxicidade direta. O grande interesse na busca por substâncias supressoras de apetite de insetos é motivado pelos fagoinibidores que geralmente agem sobre o sistema nervoso central dos insetos e são específicos para determinadas espécies, ou seja, não exterminam indiscriminadamente insetos (Veiga-Júnior, 2003).

Apesar do potencial dos limonóides a maioria dos ensaios biológicos foram realizados com insetos herbívoros. No trabalho de revisão de atividade inseticida de limonóides publicado por Champanhe et al., (1992), verifica-se que dentre 78 limonóides testados como inseticidas apenas 3 relatos de ensaios para insetos da ordem Díptera, 2 limonóides foram testados para *Aedes aegypti* (atividade reguladora de crescimento) e 1 para *Musca domestica* (atividade supressores de apetite). A atividade supressores de apetite também foi relatada por Jayaprakasha et al., (1997) nos ensaios com *Culex quinquefasciatus*.

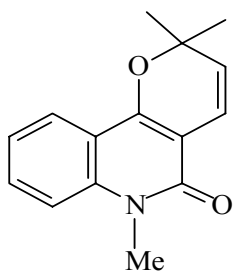
1.4.GÊNERO *SPATHELIA*

A classificação atual de *Spathelia* está de acordo com a sistemática de Engler (1931), ou seja, é o único gênero da subfamília Spathelioideae (Rutaceae), porém esse gênero também foi posicionado por Bentham & Hooker (1862) na família Simaroubaceae. O Missouri Botanical Garden (MOBOT, 2007) registra 15 espécies de *Spathelia* distribuídas principalmente na América do Sul e representada no Brasil por espécie *S. excelsa* de ocorrência no estado do Amazonas. Esta espécie é encontrada na Reserva Adolfo Ducke, em mata de terra firme, formando populações densas e numerosas em certas áreas da reserva.

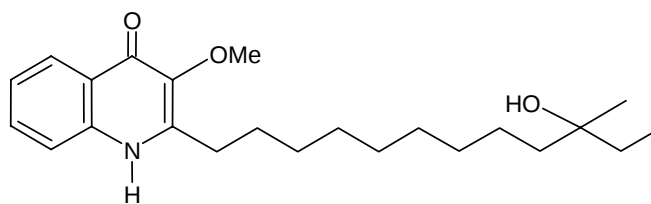
A espécie apresenta tronco delgado medindo cerca de 20 metros de altura, árvore com um tufo terminal de muitas folhas grandes (multifoliar), não ramificadas, folhetos distantes, simples e pinados, apresenta também uma grande inflorescência terminal paniculada, cujos folhetos oblongos ficam truncados na base. É muito peculiar a presença de dois frutos asados (Albuquerque, 1976b).

Quanto ao metabolismo secundário do gênero, a literatura relata estudos com cinco espécies, *Spathelia* sp., *S. sorbifolia*, *S. wrightii*, *S. glabrencia* e *S. excelsa*, evidenciando a presença de alcalóides, limonóides, cromanais, flavonóides, cumarinas e esteróides.

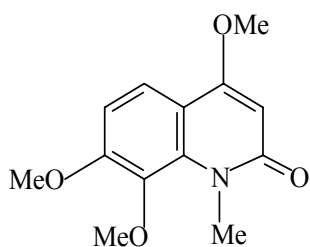
Os alcalóides identificados em *Spathelia* são derivados do ácido antranílico, dos tipos piranoquinolina. Assim os alcalóides 2 e 4-quinolonas, N-metil-4,7,8-trimetóxi-2-quinolona e N-metilflindersina foram registrados pela primeira vez em 1973 na espécie *S. sorbifolia* (Adams et al., 1973; Storer et al., 1973). Estudos mais recentes com *S. excelsa* mostram a identificação de seis alcalóides 4-quinolonas com diferentes cadeias laterais (longa e metil-butanol) em folhas (Lima et al., 2005) além 2-quinolona (casimiroina) nas raízes (Moreira, 2005) desta espécie (quadro 3).

Quadro 3. Estruturas dos alcalóides de *Spathelia*


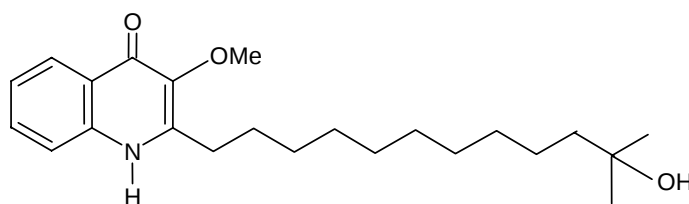
N-Metilflindersina



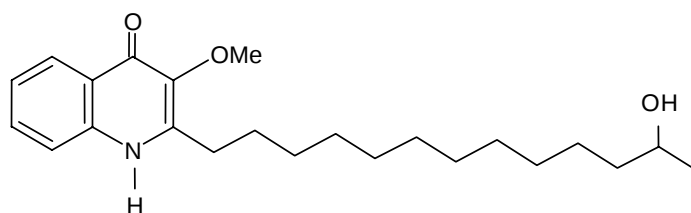
3-Metóxi-2-(10'-metil-dodecan-10'-ol)-4-quinolona



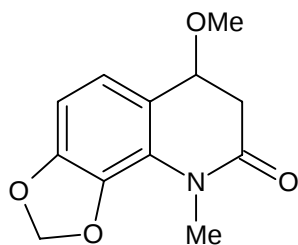
N-Metil-4,7,8-trimetóxi-2-quinolona



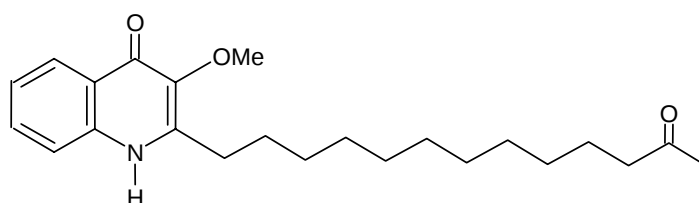
3-Metóxi-2-(11'-metil-dodecan-11'-ol)-4-quinolona



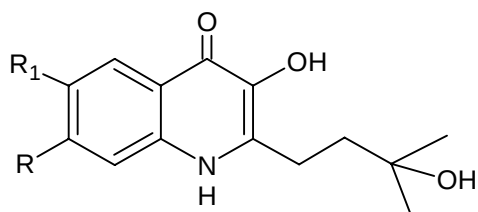
3-Metóxi-2-(tridecan-12'-ol)-4-quinolona



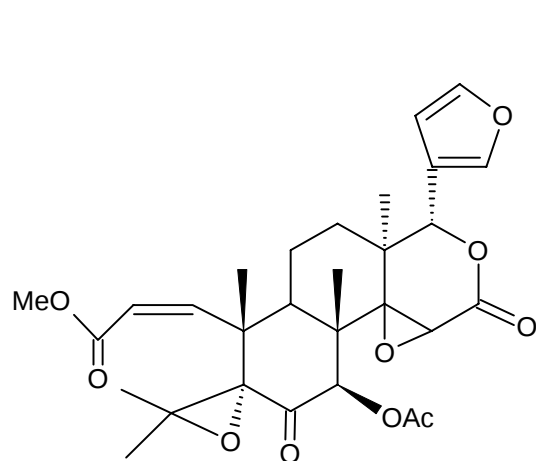
Casimiroina



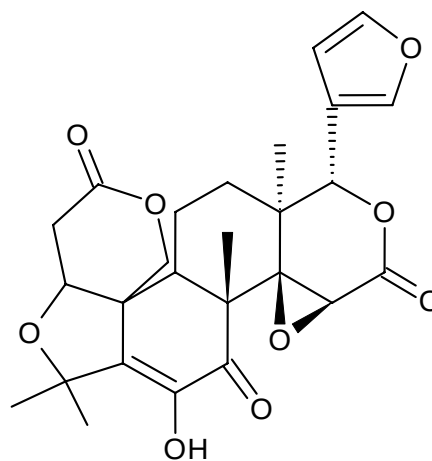
3-Metóxi-2-(tridecan-12'-ona)-4-quinolona

R₁=H; R=OH 7-hidroxi-2-(3'-metil-butan-3'-ol)-4-quinolonaR₁=OH; R=H 8-hidroxi-2-(3'-metil-butan-3'-ol)-4-quinolona

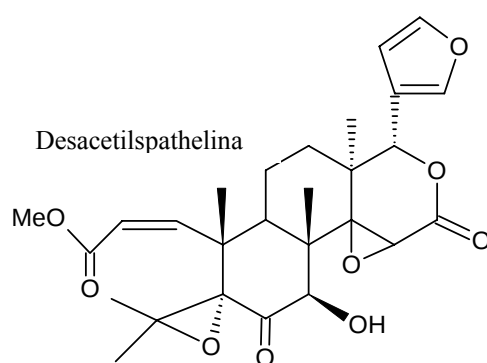
Os limonóides são metabólitos importantes em *Spathelia* (quadro 4) e o primeiro registro no gênero foi em 1968 com o isolamento de Spathelina em *S. sorbifolia*, nos estudos realizados por Burke & Colaboradores, assim contribuindo com a quimiossistemática de Rutaceae, pois a presença desse limonóide com anéis A e D modificados (característicos de Rutaceae), reforçou o argumento que o gênero estava mais relacionado com essa família do que com Simaroubaceae. Nos estudos mais recentes com *S. excelsa* identificou-se os limonóides com anéis A e D modificados, desacetilspathelina nas raízes (Moreira, 2005), perforatina, desacetilspathelina e limonina diosfenol nas folhas (Lima, 2000), reforçando esse posicionamento. Das folhas, também foi isolado o limonóide spathelinaexcelsa, este apresentando anéis A e C modificados e anel D intacto. O registro dessa substância não altera o argumento quimiotaxonômico discutido anteriormente. Além dos limonóides citados, foi isolado ainda um protolimonóide das folhas de *S. excelsa* (Lima, 2000).

Quadro 4. Estruturas dos limonóides de *Spathelia*

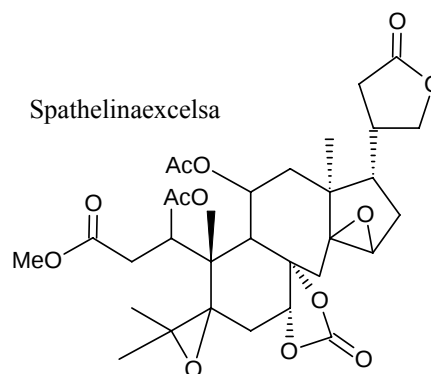
Spathelina



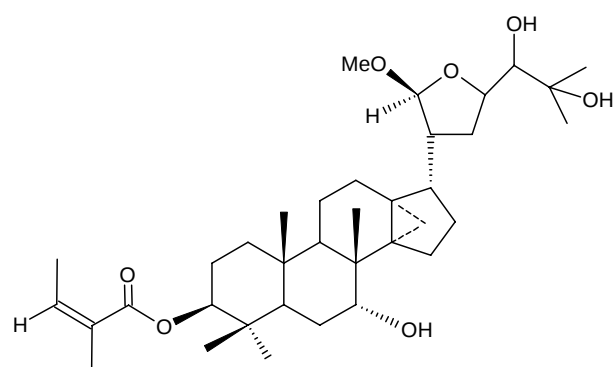
Limonina diosfenol



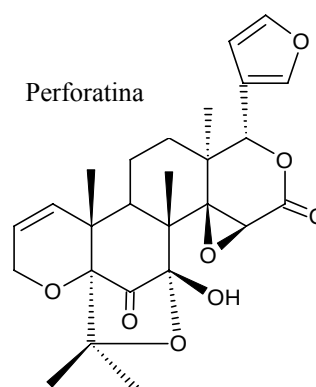
Desacetilspathelina



Spathelinaexcelsa

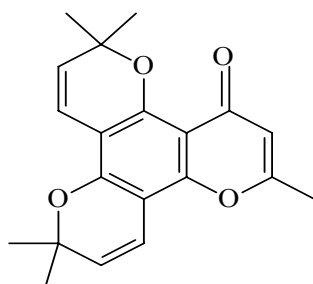


21,23S-epoxi-21β-metoxi-7α,24S, 25-trihidroxi-4α,4β,8β,10β-tetrametil-14-18ciclo-5α,13α,14α, 17α-colestano-3β-angeloil



Perforatina

As cromonas são relatadas como os metabólitos mais característicos do gênero *Spathelia*. Na família Rutaceae a ocorrência destes metabólitos está restrita à *Spathelia* sendo isolados em todas as espécies submetidas a estudos químicos (tabela 2). São principalmente piranocromonas dos tipos linear (II) ou angular (I e III). Também foi identificada uma mistura dos tipos angulares I e III, o spateliabiscromeno isolado em *S. glabrencens*, *S. sorbifolia* e *S. sp.*, (Box & Taylor, 1973; Taylor et al., 1977). A identificação de cromona em *S. excelsa* é recente e foi isolada do extrato diclorometânico das raízes de um espécimen amazônico (Moreira, 2005).



Spatheliabiscromeno

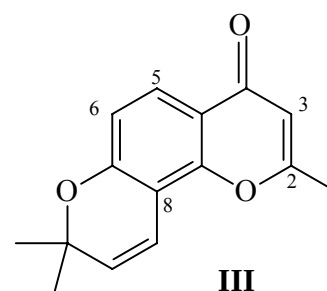
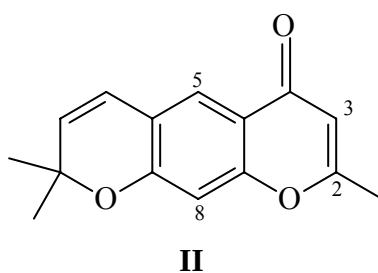
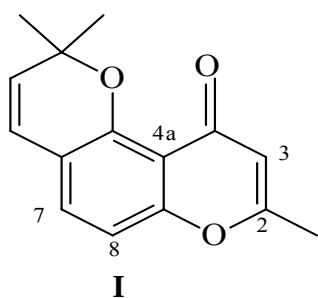


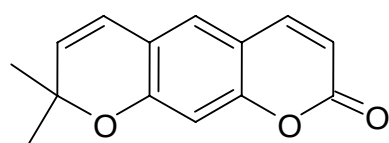
Tabela 2. Cromonas isoladas de *Spathelia*

Cromona	Tipo	Substituinte	Espécie
Metilisospateliacromeno	I	7-OMe	<i>S. sorbifolia</i> ¹
	I	7-OMe; 8-Pre ^c	<i>S. sorbifolia</i> ²
Spateliacromeno	II	5-OH	<i>S. sorbifolia</i> ¹
8-(3,3-Dimetilalil)-spateliacromeno	II	5-OH, 8-Pre ^a	<i>S. sorbifolia</i> ¹
	II	5-OH, 8-Pre ^b 5-OMe, 8-Pre ^b	<i>S. sorbifolia</i> ¹ <i>S. wrightii</i> ³
5-O-Metilneorumcromona K	II	5-OMe, 8-Pre ^c	<i>S. sorbifolia</i> ²
	II	5-OH, 8-Pre ^e	<i>S. sorbifolia</i> ²
	II	5-OH, 8-Pre ^f	<i>S. sorbifolia</i> ²
Alloptaeroxylin	III	5-OH	<i>S. grabrencens</i> ⁴ <i>S. sorbifolia</i> ¹
Alloptaeroxylin metil éter	III	5-OMe	<i>S. sorbifolia</i> ¹
	III	5-OH, 6-Pre ^a	<i>S. grabrencens</i> ⁴ <i>S. sorbifolia</i> ¹
Sorbifolina	III	5-OH, 6-Pre ^c	<i>S. grabrencens</i> ⁴ <i>S. sorbifolia</i> ¹
5-O-Metilsorbifolina	III	5-OMe, 6-Pre ^c	<i>S. sorbifolia</i> ^{1,2}
Anidrosorbifolina	III	5-OH, 6-Pre ^d	<i>S. sorbifolia</i> ¹
Lorettina	II	5-OH, 8-Pre ^g	<i>S. excelsa</i> ⁵
Pre ^a :CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂ ; Pre ^b :COCH=C(CH ₃) ₂ ; Pre ^c :CH=CHC(OH)(CH ₃) ₂ ; Pre ^d :CH=CHC(=CH ₂)CH ₃ ; Pre ^e :CH ₂ -CH(OH)C(OH)(CH ₃) ₂ ; Pre ^f :CH(OH)-CH(OH)C(OH)(CH ₃) ₂ ; Pre ^g : CH ₂ C H C(CH ₃) ₂ O			

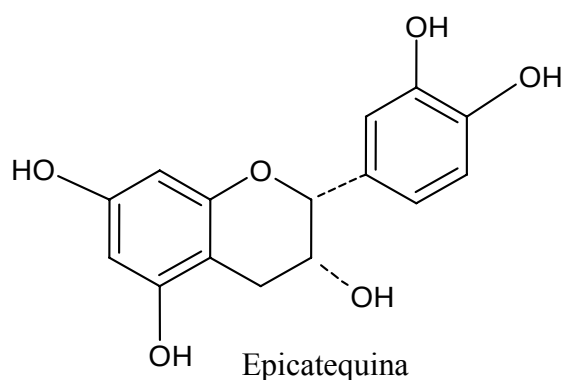
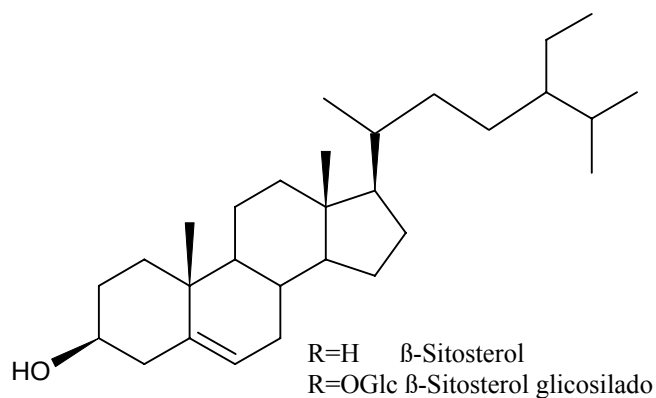
1. Taylor,1977; 2. Suwanborirux,1987; 3. Diaz,1983; 4. Box, 1973; 5. Moreira, 2005.

Outras substâncias identificadas no gênero (quadro 5) isoladas em *S. excelsa* foram a cumarina (xantiletina), flavonóide (epicatequina) e os esteróides β -sitosterol e β -sitosterol-glicosilado nas folhas (Lima 2000), além da mistura de β -sitosterol e estigmasterol nas raízes (Moreira, 2005).

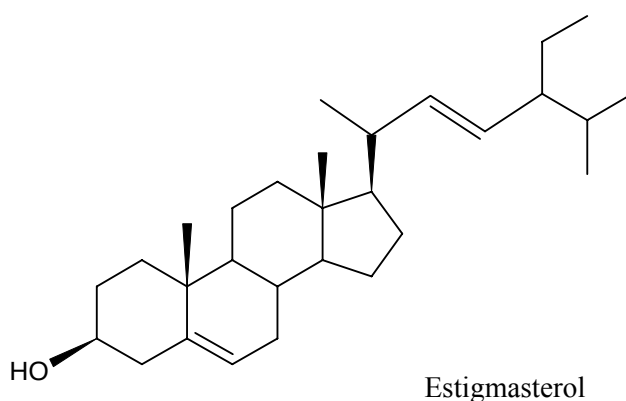
Quadro 5. Cumarina, flavonóide e esteróides de *Spathelia excelsa*



Xantiletina

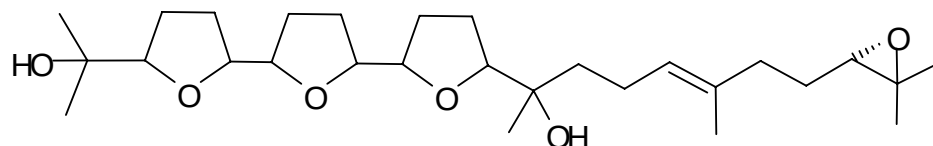
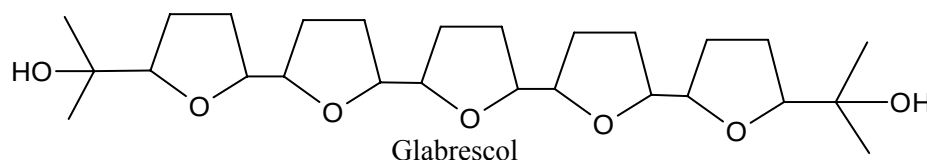


Epicatequina



Estigmasterol

A literatura também relata o isolamento dos derivados de esqualeno, glabrescol e epoxi- tri-THF diol nas folhas de *S. glabrengensis* (Harding et al., 1995; 2001).



Derivado do esqualeno epoxy tri-THF diol

Apesar dos diferentes tipos estruturais das substâncias identificadas no gênero *Spathelia*, poucos estudos biológicos foram efetuados e estes foram realizados com substâncias isoladas das raízes de *S. excelsa*, como a casimiroina (alcalóide 2-quinolona; quadro 3) e desacetilspathelina (limonóide; quadro 4) que apresentaram atividade leishmanicida moderada à 320 µg/mL contra *Leishmania brasilienses*. A cromona nomeada de lorettina (tabela 2) apresentou alto potencial tripanocida (IC₅₀ =11 µg/mL). Nos ensaios com fungos xilófagos por bioautografia, a casimiroina e lorettina exibiram atividade forte em 40 µg/mL em *Pycnoporus sanguineus* e 100 µg/mL para *Lenzites trabeae*. Para *L. trabea*, quando utilizou-se 50 e 40 µg/mL a atividade foi moderada (Moreira, 2005).

1.4.1. ASPECTO BOTÂNICO E PAPEL ECONÔMICO DE *SPATHELIA EXCELSA*

Cowan e Brizicky (1960), baseados na grande semelhança anatômica e morfológica entre *Spathelia*, *Diomma* e *Sohnreyia* constituíram a combinação *Spathelia excelsa* (Krause) Cowan & Brizicky, tornando-se assim, *Sohnroyia excelsa* K. como um simples sinônimo, conhecida vulgarmente como Surucucumirá. Apresenta porte elegante com cerca de 10-20 m de altura; suas folhas são compostas, esverdeadas e grandes, com aproximadamente 2,5 m de comprimento; apresenta inflorescência em grandes panículas terminais, com flores brancas que sobressaem no meio das folhas e apresenta sementes globosas de cerca de 8 mm de comprimento por 5 mm de largura (Rodrigues, 1962).

Essa espécie é heliófila, possui madeira moderadamente pesada e forte, cor de palha, grão regular, textura média e uniforme, produz sensação de queimadura na boca, possui brilho acetinado e pouca resistência ao apodrecimento. É muito ornamental devido ao seu aspecto semelhante a uma palmeira, apresentando o ápice do caule com tufo de longas folhas pinadas, congestionadas no ápice do estípite. Nesta espécie ocorre um fenômeno raro, hapaxantia, ou seja, a árvore morre após a frutificação, sendo que durante toda a sua vida ela floresce uma única vez, é uma planta monocárpica (Rodrigues, 1962).

O caule estipitado da *S. excelsa* não se ramifica e a partir das axilas folheares também surge inflorescência que ocorre no lugar do cone vegetativo, localizado no ápice do estípite. A floração aparece quando a árvore possivelmente atingiu o máximo de seu ciclo evolutivo. Alterações fisiológicas, então, devem ocorrer, que vão influir particularmente sobre o cone vegetativo formado de tecido meristemático, transformando todo o meristema vegetativo em floral. Essa transformação

deve ser a causa principal da morte inteira da árvore após a floração e a frutificação (Rodrigues, 1962).



Figura 1. Imagem de *Spathelia excelsa* obtida na reserva Ducke (Moreira, 2005)

Considerando a variedade de substâncias identificadas nas folhas e raízes dessa espécie além da importância do seu potencial biológico e na quimiosistemática, torna-se importante a avaliação do potencial químico e biológico dos extratos obtidos de *S. excelsa*, pois esta representa a única espécie do gênero no Brasil, com ocorrência na Amazônia. Nesse contexto o presente trabalho visou os objetivos descritos a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar os estudos químicos, biológicos e quimiossistemáticos dos extratos do caule de *S. excelsa* (Rutaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos do caule da espécie amazônica *S. excelsa*;
- ✓ Identificação dos constituintes isolados por técnicas espectroscópicas;
- ✓ Realização de ensaios biológico em *Aedes aegypti*;
- ✓ Avaliação de atividade antioxidante em DPPH
- ✓ Fornecer subsídios à quimiossistemática da família Rutaceae;

3. EXPERIMENTAL: PARTE I

3.1. Material botânico

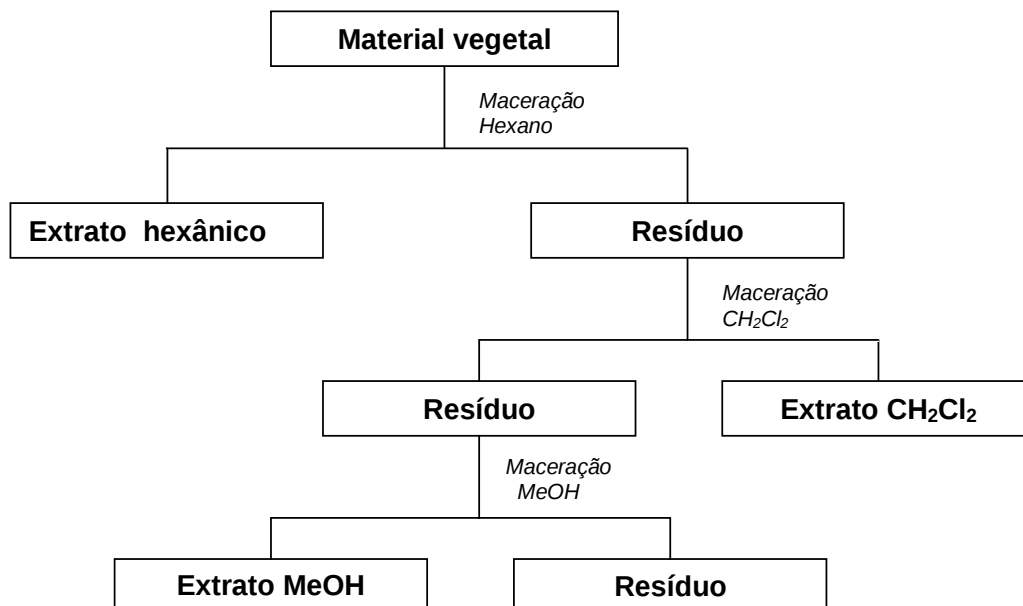
3.1.1. Coleta e identificação botânica

O caule de *Spathelia excelsa* foi coletado na Reserva Adolfo Ducke, situada no Km 26 da Rodovia AM-010 (Manaus-Itacoatiara). Esta espécie foi previamente mapeada e identificada pelo professor Dr. José Rubens Pirani do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, durante a execução do Projeto Flora da Reserva Adolfo Ducke.

3.1.2. Processamento do material vegetal e obtenção dos extratos

Os estudos fitoquímicos foram realizados na Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O material vegetal foi picotado, seco em estufa de circulação de ar (40°C) e posteriormente moído. Após essa etapa houve a maceração à frio utilizando solventes em ordem crescente de polaridade, durante 7 dias, fornecendo assim os extratos em hexano, diclorometano e em metanol (esquema 1).

Esquema 1. Obtenção dos extratos do caule de *Spathelia excelsa*



3.1.3. Fracionamento dos extratos vegetais

A avaliação em CCD do extrato em hexano indicou a presença de material graxo. Em estudos prévios realizados com o extrato obtido em diclorometano foram isoladas cromonas (Lima et al., 1999). Iniciou-se este trabalho com o fracionamento do extrato metanólico realizado em coluna de sílica gel resultando em 18 frações, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3. Coluna filtrante do extrato em metanol (16,6 g) do caule de *Spathelia excelsa*

Frações reunidas/Códigos	Eluentes	Massas (g)
1/ TSM-1	Hexano	----
2/ TSM-2	Hex:CH ₂ Cl ₂	0,013
3/ TSM-3	CH ₂ Cl ₂	0,060
4/ TSM-4 5/ TSM-5	CH ₂ Cl ₂ :MeOH Fr.4 (8:2) / Fr.5(7:3)	0,101
6/ TSM-6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)	0,472
7/ TSM-7	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)	1,830
8/ TSM-8	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)	0,690
9/ TSM-9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)	1,562
10/ TSM-10	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)	0,406
11-15/ TSM-11	CH ₂ Cl ₂ :MeOH Fr.11-13 (6:4) / Fr.14-15 (1:1)	6,502
16-18/ TSM-16	MeOH	1,770

Coluna de sílica gel (70-230 mesh), H= 23,0 cm e Ø= 4,5 cm

As frações TSM-6, TSM-8, TSM-9 e TSM-11 foram submetidas a novos fracionamentos cromatográficos conforme mostram os esquemas 2-5 respectivamente.

3.1.3a.Fracionamento cromatográfico de TSM-6

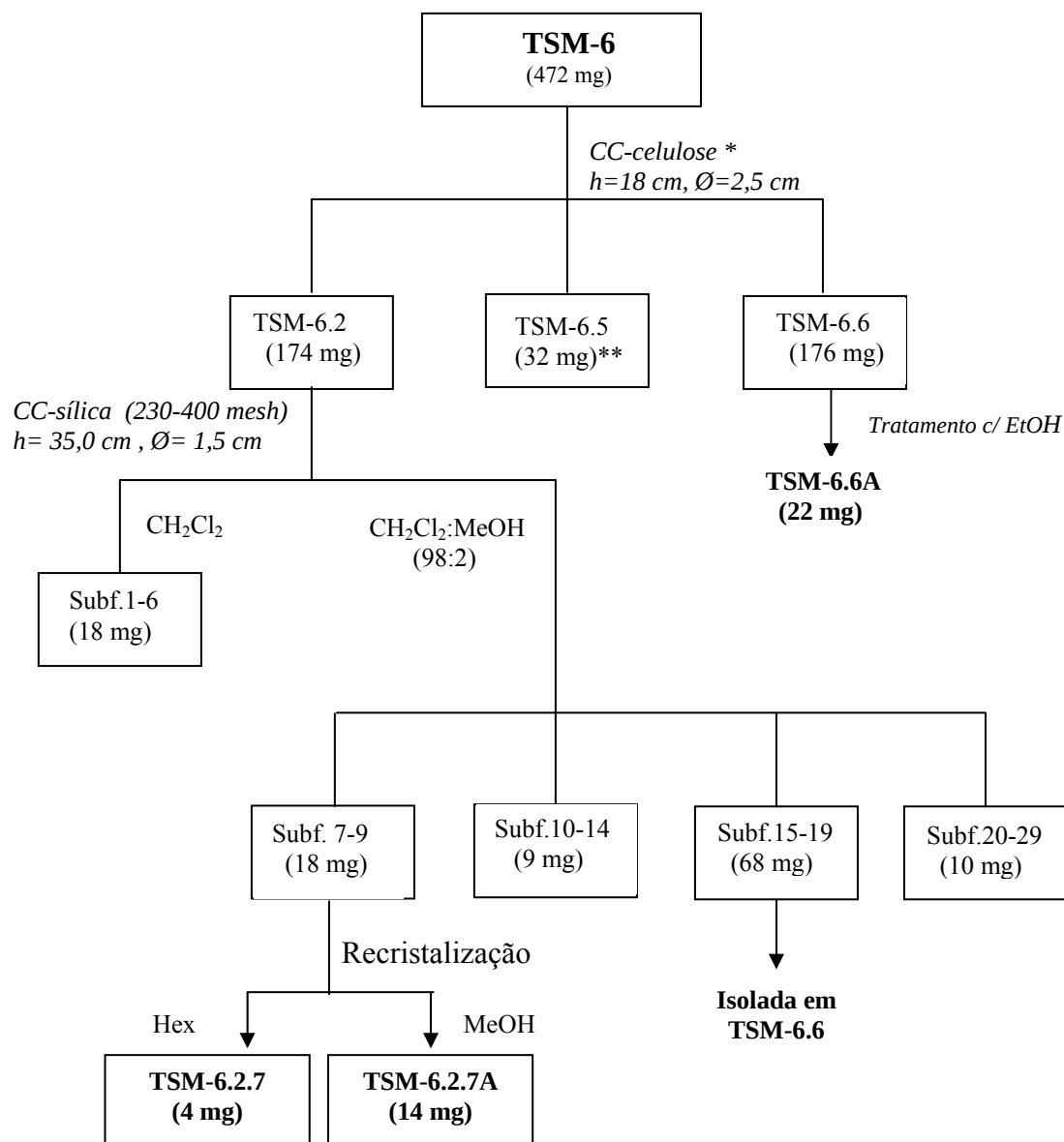
Utilizando coluna de celulose (esquema 2) a fração 6 (TSM-6; 472,0 mg) foi fracionada fornecendo 16 subfrações e as mais promissoras submetidas a novos fracionamentos ou tratamentos conforme descrito a seguir.

As subfrações 2-4 (TSM-6.2) com 174,0 mg foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel fornecendo 29 subfrações. Análises em CCD mostraram as subfrações 7-9 como as mais promissoras e estas após reunidas foram purificadas por recristalização inicialmente em hexano fornecendo **TSM-6.2.7** (4 mg), no entanto obteve-se muito sólido junto com o sobrenadante. Assim essa foi seca e submetida a recristalização em metanol fornecendo a mesma substância mas em maior quantidade **TSM-6.2.7 A** (14 mg).

A subfração 5 (TSM-6.5) mostrou-se promissora quando avaliada em CCD, no entanto optou-se em trabalhar as subfrações 6-9 (TSM-6.6), pois embora tenha se mostrado mais impura, apresentou a substância predominante em TSM-6.5, porém com maior quantidade de material. Assim, TSM-6.6 foi tratada com etanol resultando na substância pura **TSM-6.6A** (22,0 mg), esquema 2.

Na subfração 15-19 oriunda da fração TSM-6.2 (68 mg), verificou-se a predominância da substância isolada anteriormente (**TSM-6.6A**)

As subfrações 1-6 (18 mg), 10-14 (9 mg) e 20-29 (10 mg) não foram trabalhadas por não apresentarem material em quantidade suficiente.

Esquema 2. Fracionamento cromatográfico de TSM-6

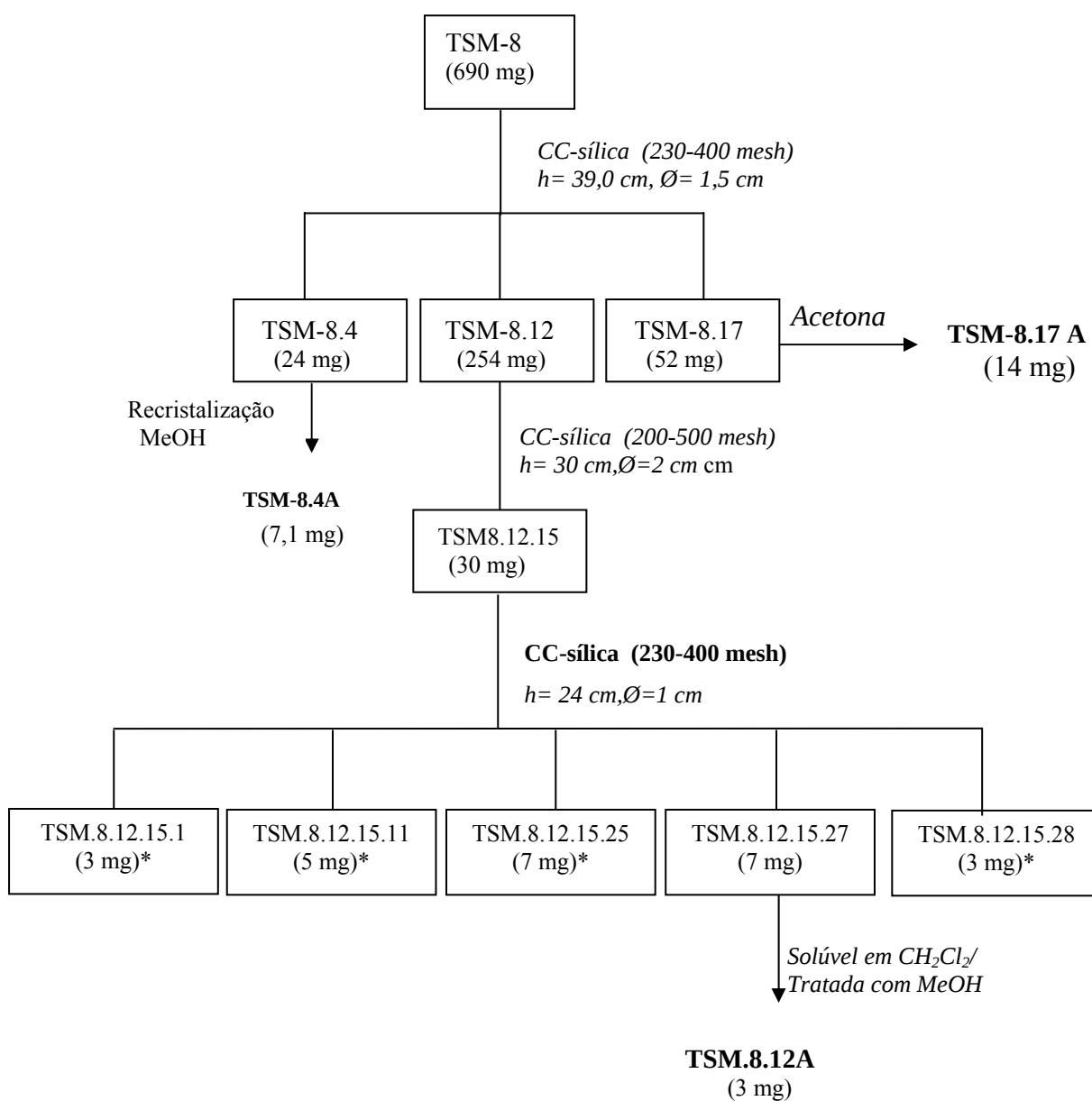
* frações de 1-9 foram eluídas em hexano e 9-16 em CH₂Cl₂

**substância predominante na TSM-6.6

3.1.3b. Fracionamento cromatográfico de TSM-8

A fração TSM-8 fracionada em coluna de sílica gel, eluída em CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ e MeOH forneceu 33 subfrações (esquema 3, tabela 4). As subfrações 1-3 e 9-11 foram descartadas por apresentarem pouco material. As frações 4-8 (TSM-8.4) por recristalização com metanol forneceram o isolamento de TSM-8.4A (7,1 mg). Na fração 17-24 (TSM-8.17) houve predominância da substância TSM-8.17A (14 mg), similar à TSM-8.4A.

Para o fracionamento das frações reunidas 12 à 16 (TSM-8.12), utilizou-se uma coluna de sílica gel (200-500 mesh) da qual foram obtidas 43 subfrações, eluídas a partir de hexano, hexano: acetato de etila (95:5 à 1:1), diclorometano e metanol. A subfração 15 (TSM-8.12.15), eluída em hexano: AcOEt (7:3) foi submetida a novo fracionamento em coluna de sílica (230-400 mesh), utilizando-se os eluentes conforme tabela 5, resultando em 31 subfrações, sendo que a subfração 27 foi purificada em metanol à quente, fornecendo o isolamento de **TSM-8.12A** (3 mg).

Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de TSM-8

* Frações com pequena quantidade de amostra e de pouco interesse avaliação em CCD.

Tabela 4. Sistema de eluentes de TSM-8

Frações	Sistema de eluente
1-5	CH ₂ Cl ₂
6-10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (99:1)
11-19	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98:2)
20-22	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (97:3)
23-28	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (1:1)
29-33	MeOH

Tabela 5. Sistema de eluentes de TSM-8.12.15

Frações	Sistema de eluente
0-4	CH ₂ Cl ₂
5-6	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (99:1)
7-9	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (98:2)
10-11	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (97:3)
12-15	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (95:5)
16-17	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (9:1)
18-19	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (85:15)
20	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (8:2)
21-22	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (7:3)
23-24	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt
25-29	AcOEt
30-31	MeOH

3.1.3c. Fracionamento cromatográfico de TSM-9

O fracionamento de TSM-9 (esquema 4) foi efetuado em coluna cromatográfica utilizando-se sílica comum (70-230 mesh) obtendo-se 22 frações, o sistema de eluentes usados nesse fracionamento consta na tabela 6. A fração TSM-9.4 (4-5) foi tratada com metanol a frio levando ao isolamento da substância TSM-9.4 s (9,0 mg). A TSM-9.6 (6-9) de massa 160,0 mg foi filtrada em sephadex LH-20 e das frações obtidas a mais promissora foi TSM-9.6.5 (fr. 5-26, 130 mg), eluída em AcOEt. Esta fração foi submetida a novo fracionamento em coluna cromatográfica contendo sílica gel (70-230 mesh), eluída gradiente de CH_2Cl_2 : AcOEt (tabela 7), fornecendo 72 subfrações. O refracionamento das subfrações 14-35 (TSM-9.6.5.14) obtidas desta coluna, forneceu o isolamento de **TSM-9.6.5A14** (15,0 mg), substância similar à TSM-6.6A isolada anteriormente, conforme esquema 2. O sistema de solvente utilizado na coluna constam na tabela 8.

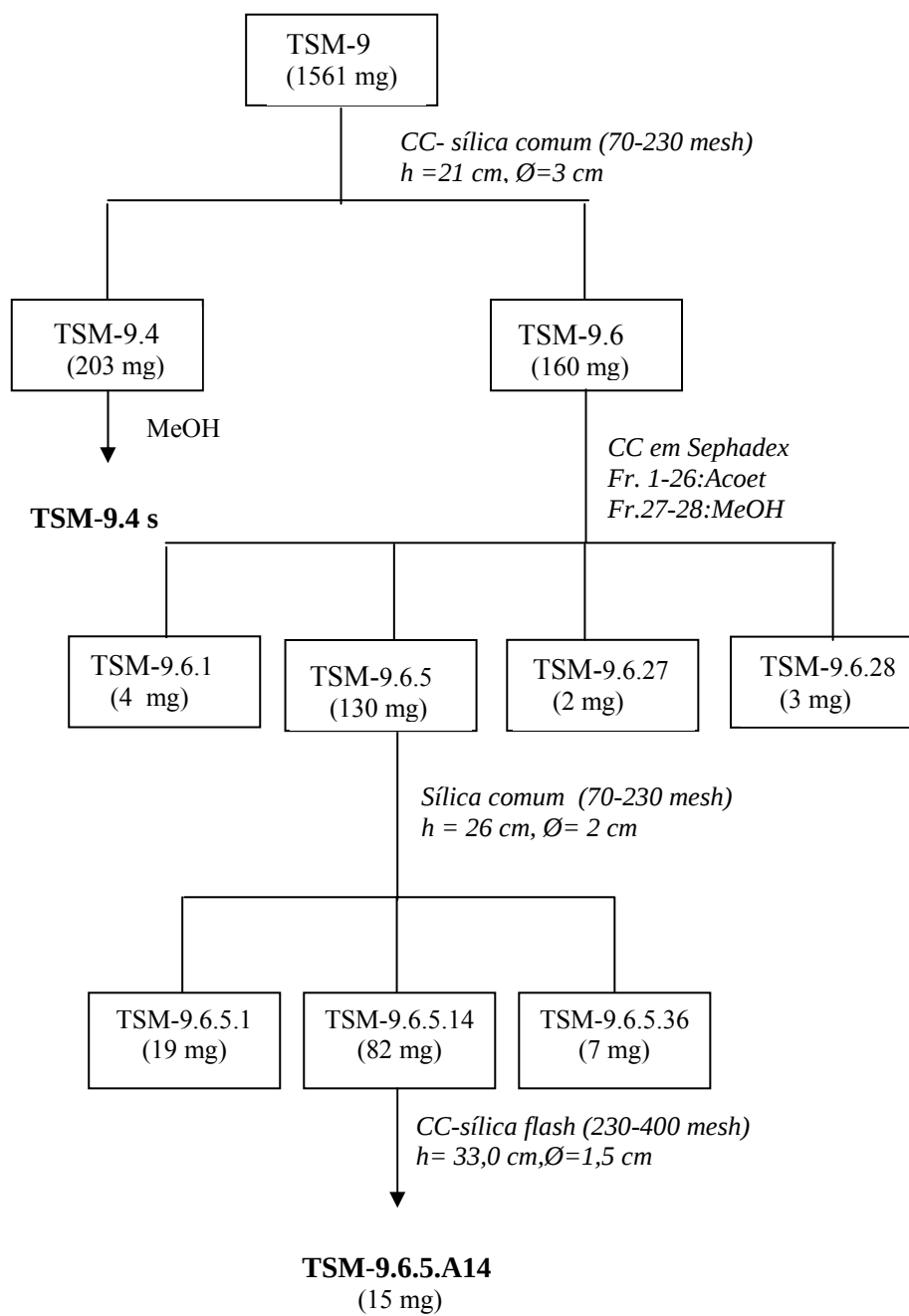
Esquema 4. Fracionamento cromatográfico de TSM-9

Tabela 6. Sistema de eluentes de TSM-9

Frações	Sistema de eluente
1	Hexano
2	Hex:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
3-7	CH ₂ Cl ₂
8-9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (98:2)
10-12	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (97:3)
13-14	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)
15-16	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)
17-18	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (8:2)
19	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)
20	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1)
21-22	CH ₂ Cl ₂ :MeOH

Tabela 7. Sistema de eluentes das subfrações de TSM-9.6.5

Frações	Sistema de eluente
1-30	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(98:2)
31-34	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(95:5)
35-36	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(9:1)
37-51	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(8:2)
52-55	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(7:3)
56-60	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(1:1)
61	AcOEt
62-72	MeOH

Tabela 8. Sistema de eluentes das subfrações de TSM-9.6.5.14

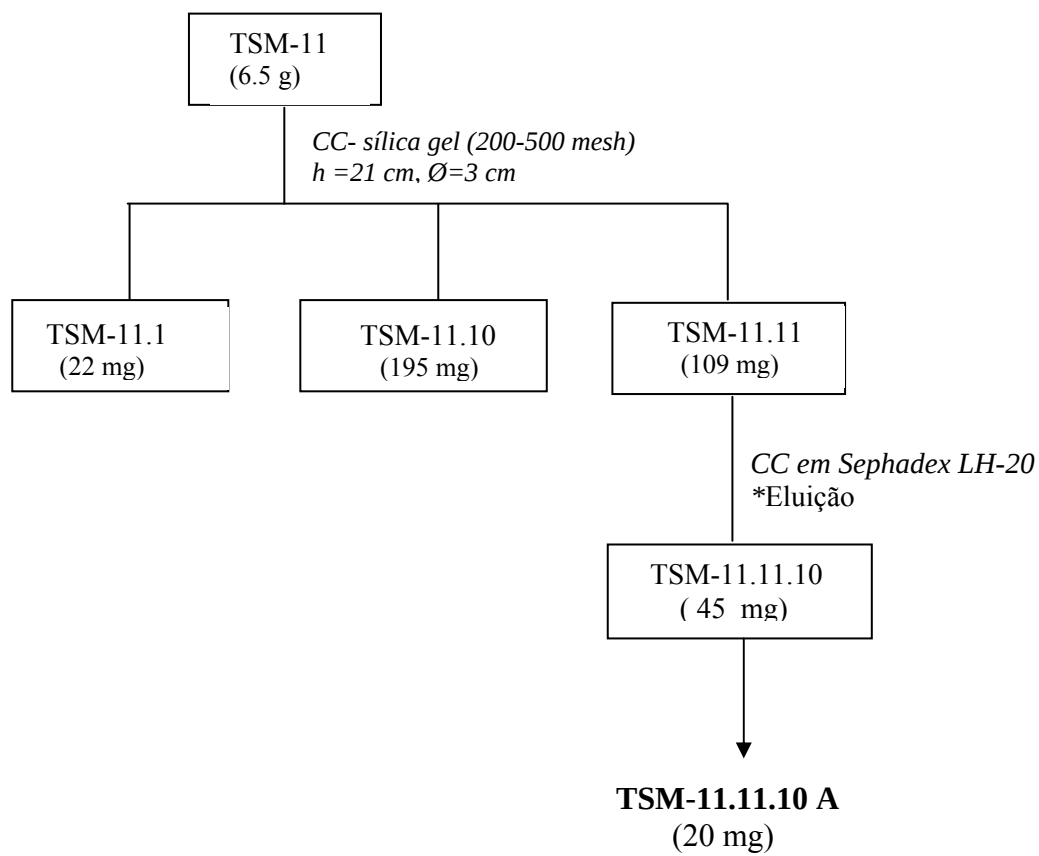
Frações	Sistema de eluente
1-2	CH ₂ Cl ₂
3-12	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(98:2)
13-15	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(95:5)
16-17	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(9:1)
18-20	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(8:2)
21-22	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(7:3)
23-24	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt(1:1)
25	AcOEt
26	MeOH

3.1.3d.Fracionamento cromatográfico de TSM-11

TSM-11 foi fracionada em coluna de sílica gel, eluída em CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 :Acetona e MeOH fornecendo 37 subfrações (tabela 9). A subfração 11-24 (TSM-11.11) foi filtrada em sephadex LH-20, fornecendo 39 subfrações que foram eluídas em CH_2Cl_2 :MeOH (1:1) e metanol, sendo as subfrações 10-13 (TSM-11.11.10) tratadas com acetona, resultando no isolamento de TSM-11.11.10A, conforme esquema 5.

Tabela 9. Sistema de eluentes das subfrações de TSM-11

Frações	Sistema de eluente
1-7	CH_2Cl_2
8-16	CH_2Cl_2 :Acetona (95:5)
17-19	CH_2Cl_2 :Acetona (9:1)
20-22	CH_2Cl_2 :Acetona (8:2)
23-25	CH_2Cl_2 :Acetona (1:1)
26-30	Acetona
31-37	MeOH

Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de TSM-11

*Fr. 1-37 eluídas em $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$

*Fr. 38-39 eluídas em MeOH

4. EXPERIMENTAL: PARTE II

4.1.BIOENSAIOS COM LARVAS E A FASE ADULTA DO *Aedes Aegypti*

4.1.1.DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS E DOS INSETOS

Os ensaios foram realizados no Insetário da Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde (CPCS) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os ovos de *A. aegypti* foram incubados em água potável por 3-4 dias à temperatura ambiente, até alcançar o 3º estágio larval utilizando-se como alimento, um composto constituído de farinha de peixe e pó de fígado bovino (Cepleanu et al., 1994). Em condições normais, os ovos maduros eclodem quando submersos no meio líquido e apresentam quatro estágios larvários, sendo que no ensaio larvicida foram selecionadas larvas de estágio 3 (Gadelha e Toda, 1985).

Nos ensaios biológicos realizados com os insetos (fase adulta) foi necessário aguardar a maturação completa das larvas, esse período durou cerca de uma semana. A seleção das fêmeas foi feita através da observação da anatomia das mesmas, que apresentam o corpo mais desenvolvido e antenas maiores que os insetos machos. Os insetos machos foram alimentados com solução de açúcar dissolvido em água disponível na gaiola, enquanto que as fêmeas, por serem hematófagas, preferiam alimentar-se de sangue de camundongos (cobaia).

4.1.2. PROCEDIMENTOS DOS TESTES BIOLÓGICOS

Para o ensaio larvicida, amostras das substâncias TSM-6.6A (3 mg) e TSM-11.11.10A (4 mg) foram solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido) em quantidades de solução pré-estabelecidas (3mg/mL e 4 mg/mL respectivamente). Retiraram-se alíquotas em quantidades apropriadas da solução estoque em diferentes concentrações (tabelas 10 e 11) para um volume final de 5,0 mL. Larvas de 3º estágio foram transferidas com auxílio de pipeta (Pasteur) para copos descartáveis (10 larvas/copo), acrescentando-se alíquotas da solução estoque, alimento (farinha de peixe) e água até

o volume final de 5 mL. Os testes dos ensaios larvicidas foram feitos em triplicata. Paralelamente foram efetuados testes em branco, utilizando-se DMSO e água. Para o controle positivo utilizou-se Temephós (25,0 ng/mL). Após 24 horas, à temperatura ambiente, as larvas mortas foram contadas e calculou-se a percentagem letal e posteriormente a CL_{50}

Na realização dos ensaios com insetos na fase adulta (teste biológico em frascos) uma solução estoque de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi preparada utilizando-se 1mg da substância TSM-11.11.10A e 4 mL de acetona. Em cada frasco (cilindro Schott) foi impregnado 1 mL da solução e após a completa evaporação do solvente, 15 insetos hematófagos foram confinados em cada frasco com auxílio de um capturador (tubo de vidro com mangueira, separado por tela). O teste foi realizado em triplicata e como controle um teste em branco (impregnação do frasco com acetona). Para avaliação da letalidade, a contagem dos insetos mortos foi verificada a cada 15 minutos, com a auxílio de cronômetro, durante 90 minutos.

Tabela 10. Concentrações TSM-6.6A no ensaio larvicida com *A. aegypti*

Concentração (µg/mL)	Volume utilizado (µL)
200 *	333,0
150	250,0
100	166,0
75	125,0
60	100,0
50 *	83,3
25	25,0

Tabela 11. Concentrações de TSM-11.11.10A no ensaio larvicida com *A. aegypti*

Concentração (µg/mL)	Volume utilizado (µL)
100 *	125,0
25,0 *	19,0
12,5	15,63
6,5	8,13
3,63	4,54
1,63	2,04

* concentrações (testes preliminares) para obtenção de faixas de respostas

4.1.3. Determinação da CL₅₀

A atividade larvicide foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 horas de incubação. A larva foi considerada morta quando apresentou ausência total de movimento (toque com pipeta de Pasteur).

Os valores de mortalidade obtidos foram convertidos em valores de Probit e plotados contra o log das concentrações. Após análise de regressão linear, o valor da CL₅₀ foi obtido por interpolação gráfica.

4.2. TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Extratos de plantas, em geral têm sido muito investigados afim de se detectar, isolar e determinar estruturalmente antioxidantes naturais. Para tal, é necessário o desenvolvimento de métodos práticos e rápidos para quantificar a ação destes extratos vegetais, sucos, frutos e substâncias puras. O ensaio com uso de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é o mais utilizado para avaliação dos antioxidantes pois é um dos poucos radicais orgânicos estáveis e comercialmente disponíveis, com absorção máximo no UV-VIS, em torno de 515 nm. Sua coloração violeta desaparece gradativamente sob redução, cuja reação é monitorada através do uso de espectrofotômetro.

4.2.1. MÉTODO QUANTITATIVO ESPECTROFOTOMÉTRICO

O ensaio de atividade capturadora de radicais livres com DPPH foi baseado no trabalho de Burda & Oleszek, (2001). Prepararam-se soluções à 0,1 mg/mL das frações TSM-6, TSM-8 e TSM-9, as quais foram diluídas para obtenção das concentrações de 1, 10 e 100 µL/mL. De cada diluição retiram-se alíquotas de 750 µL e em seguida 3,0 mL da solução de DPPH em metanol (0,002%) foram acrescentados, após agitação, os frascos foram deixados em repouso ao abrigo da luz. Os experimentos foram efetuados em triplicata. O metanol puro foi utilizado para corrigir a linha de base no espectrofotômetro. Após o tempo de reação (30 minutos), a leitura da absorbância foram verificadas à 517 nm. Durante a execução das medidas da absorbância utilizou-se metanol puro para a correção da linha da base no espectrofotômetro. O cálculo do percentual de inibição do DPPH (% da atividade antioxidante), ou seja, a capacidade de sequestrar o radical é dado pela fórmula:

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = 1 - A_a / A_b \times 100$$

Aa - absorbância da amostra; Ab - absorbância da solução de DPPH

5. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS

PARTE I

Suporte para Cromatografia em Coluna

Os fracionamentos do extratos foram efetuados em coluna de vidro utilizando-se os seguintes como suportes:

- Sílica gel (Merck) de 200-500 e 230-400 mesh
- Sephadex LH -20
- Celulose microcristalina (Avicel)

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises em camada fina foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 (Merck), suporte em alumínio, 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência . A detecção das substâncias foi feita por irradiação com lâmpada de UV (366 e 254 nm) e posterior revelação com vanilina sulfúrica e aquecimento.

Para avaliação do grau de pureza das substâncias baseou-se na presença de uma única e característica mancha, em sistemas de eluentes diferentes.

Solventes Utilizados

Para cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada utilizou-se solventes PA da Synth. Também utilizou-se solvente comercial, após tratamento por destilação e secagem em sulfato de sódio anidro.

Equipamentos e Acessórios

Evaporador rotatório, Yamato RE 500, modelo: BM 200, série: B3Z00061

Espectrofotômetro de UV, BioMate 3, SN 2J9H172001, CAT 335904

Chapa de aquecimento, Fisatom, modelo: 753 A, série: 319073

Balança analítica, Shimadzu Corporation Japan, modelo BL-320, capacidade 320 g

Manta aquecedora, Apparatus company, série: 237209

Gabinete com lâmpada de UV, Boitton, série: 0114

Os Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em aparelho Perkin Elmer, modelo Spectrum 2000 com transformada de Fourier. As análises foram realizadas utilizando-se pastilhas comprimidas de KBr anidro. Os máximos de frequência ($V_{m\acute{a}x.}$) das absorções estão expressos em cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de RMN 1H e ^{13}C , uni e bi dimensionais foram registrados em aparelho Burker da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), modelo DRX-400 nas 9,4 Tesla, operando a 400 MHz para RMN de 1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C , utilizados solventes deuterados da marca Merck e Aldrich.

PARTE II

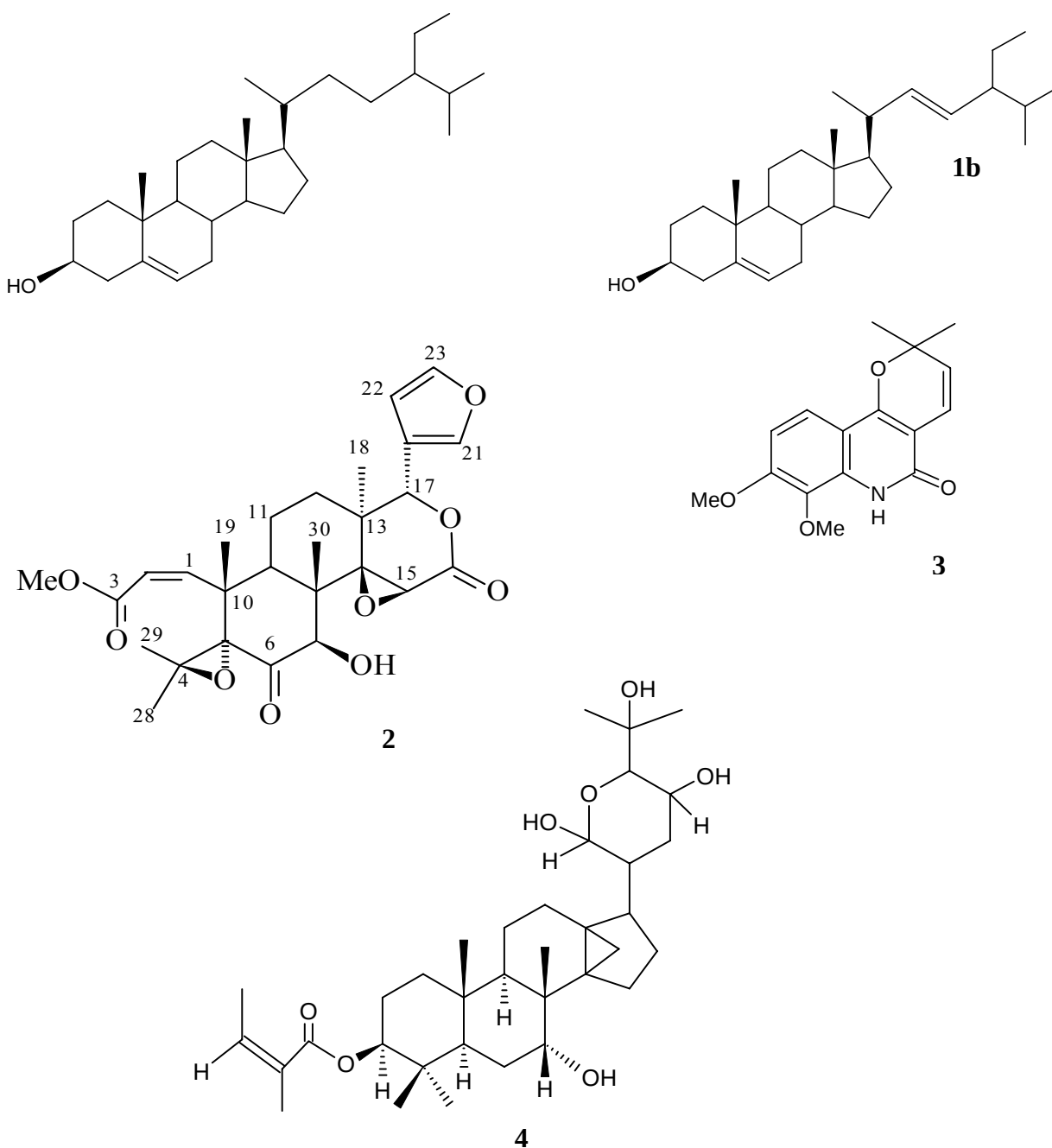
- Frascos para o ensaio inseticida: Área do cilindro, Schott com área total de 264,4 cm²
- Micropipetas automáticas BRAND 1000 µL, Eppendorf Research, Physio Care Concept 0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL (ensaios inseticida e antioxidante)
- Capturador de insetos (mangueira acoplada a um tubo de vidro)
- Copos descartáveis de 10 mL (ensaio inseticida)
- Balão volumétrico de 10 mL e 50 mL (ensaio antioxidante)
- Pipetas volumétricas de 5 mL (ensaio inseticida)
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (ensaio antioxidante)
- Higrômetro (Haar-Synth Hygro Germany) (ensaio inseticida)
- Cronômetro (Herweg) (ensaio inseticida)
- Cubetas de acrílico (ensaio antioxidante)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE 1

6.1. ESTUDOS QUÍMICOS

6.1.1. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

O estudo químico do extrato metanólico do caule de *S. excelsa* resultou no isolamento das substâncias **1 (a,b)** uma mistura de esteróides (TSM-6.2.7 e TSM-6.2.7A), o alcalóide **2** (TSM 8.12A), o limonóide **3** (TSM-6.6) e protolimonóide **4** (TSM-11.11.10A).



6.1.2. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 1

A substância **1** (TSM-6.2.7 e TSM-6.2.7A) isolada conforme o esquema 2 forneceu um sólido branco que em CCD apresentou uma mancha violeta (vanilina sulfúrica) com R_f 0,25 em eluição com hexano:AcOEt (7:3).

O espectro na região do infravermelho (figura 2, p. 48) apresenta bandas de OH em 3446 cm^{-1} , C-H alifático em 2926 cm^{-1} e C=C de olefina em 1653 cm^{-1} .

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (figura 3 e 3a, p. 49 e 50) verificou-se sinais característicos do β -sitosterol devido a presença de um dubleto largo em δ 5,35 (H-6), um multiplete na faixa δ 3,55-3,49 (H-3) e sinais de metilas na região de 0,60-1,00. A presença de hidrogênios olefínicos em dois duplos dubletos em intensidades menores, foi indicativo da presença do estigmasterol, com deslocamentos em δ 5,02 ($J = 15,2$ e $8,8\text{ Hz}$, H-22) e δ 5,16 ($J = 15,2$ e $8,4\text{ Hz}$, H-23).

No espectro de RMN ^{13}C (figuras 4 e 4a, p.51 e 52) também foi notável a presença dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol através dos sinais em δ 140,77 e δ 121,71, típicos dos carbonos olefínicos (C-5 e C-6) e os sinais com intensidades menores δ 138,30 e δ 129,29 (C-22 e C-23) atribuídos ao carbono da cadeia lateral do estigmasterol. O sinal em δ 71,82 foi atribuído ao carbono carbinólico (C-3) para ambos esteróides.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram identificar **1** como uma mistura de β -sitosterol (1a) e estigmasterol(1b). Os dados de RMN de ^{13}C (tabela 12) foram similares aos publicados para mistura destes esteróides obtida da raiz de *S. excelsa* (Moreira, 2005). O β -sitosterol também foi isolado nas folhas desta espécie (Lima, 2000).

Tabela 12. Dados de RMN ^{13}C de **1** (100 MHz, CDCl_3) e comparação com a literatura

C	δ		Literatura (Moreira, 2005)	
	1 ^a	1b	Sitosterol	Estigmasterol
1	37,26	37,26	37,22	37,22
2	31,68	31,68	31,62	31,62
3	71,82	71,82	71,79	71,79
4	42,32	42,32	42,29	42,29
5	140,77	140,77	140,72	140,72
6	121,71	121,71	121,72	121,72
7	31,91	31,91	31,87	31,87
8	31,91	31,91	31,87	31,87
9	50,15	50,15	50,08	50,08
10	36,50	36,50	36,48	36,48
11	21,09	21,09	21,06	21,06
12	39,78	39,78	39,74	39,74
13	42,32	42,32	42,26	42,26
14	56,78	56,78	56,73	56,73
15	24,30	24,30	24,29	24,29
16	28,24	28,24	28,24	28,24
17	56,07	56,07	56,00	56,00
18	11,98	12,23	11,85	11,85
19	19,81	19,81	19,39	19,39
20	36,15	40,47	36,13	39,74
21	18,78	21,09	19,00	21,06
22	33,96	138,30	33,90	138,00
23	26,11	129,29	25,99	129,00
24	45,86	51,24	45,78	51,20
25	29,18	31,91	29,08	31,87
26	19,04	21,09	18,76	19,00
27	19,39	19,39	19,22	19,00
28	23,08	25,39	23,04	25,99
29	11,86	11,86	11,97	12,26

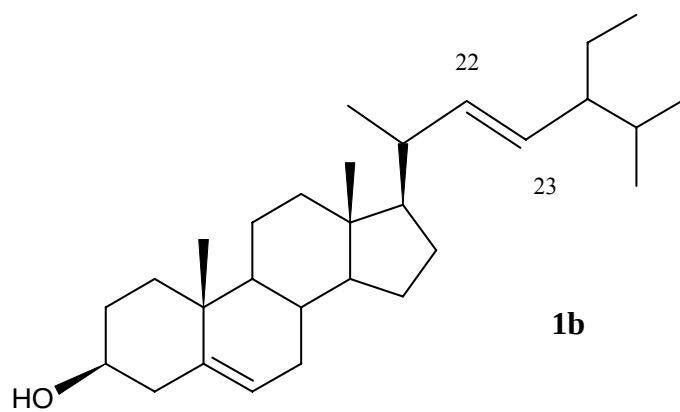
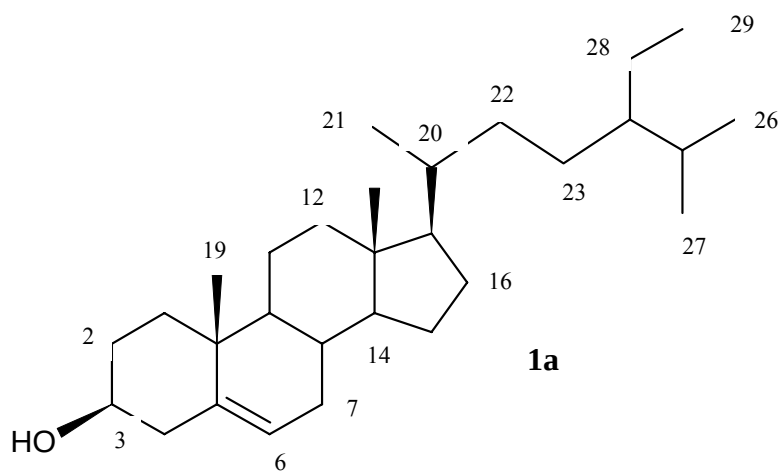


Figura 2. Espectro na região do infravermelho de **1** em KBr

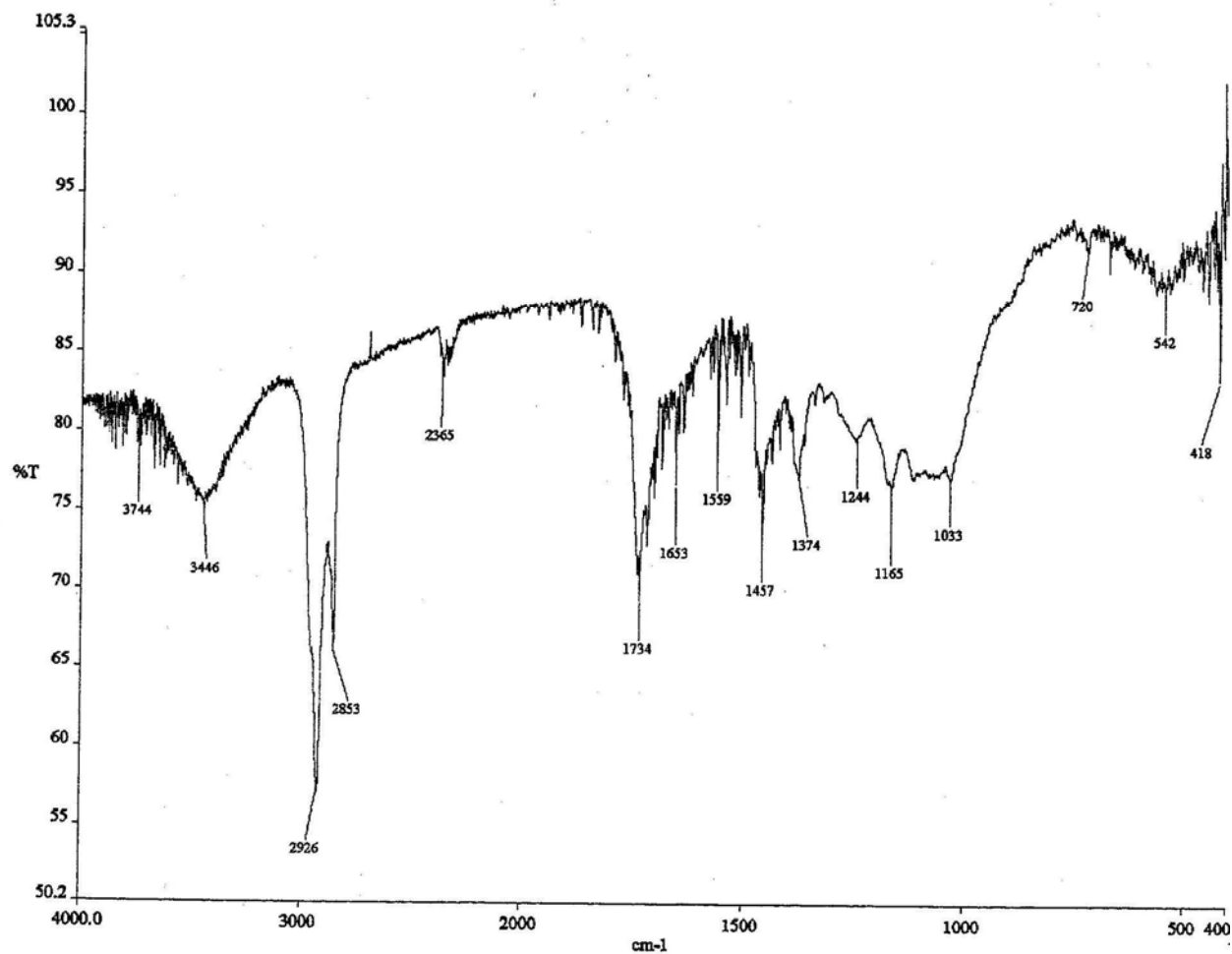


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (400 MHz, CDCl_3)

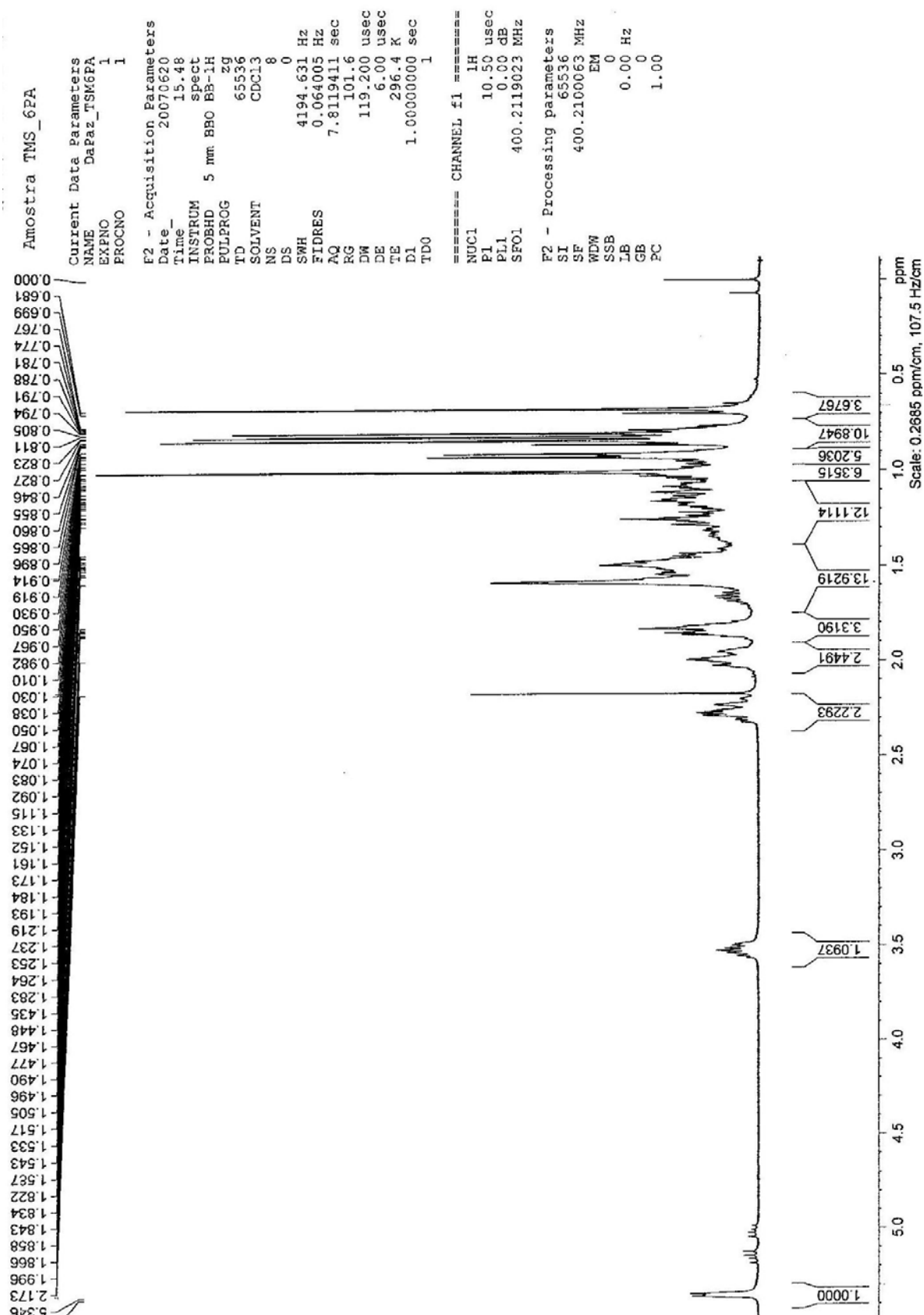


Figura 3a. Ampliação dos picos de hidrogênios H-6 e H-3 (**1a**) e do H-22 e H-23 (**1b**)

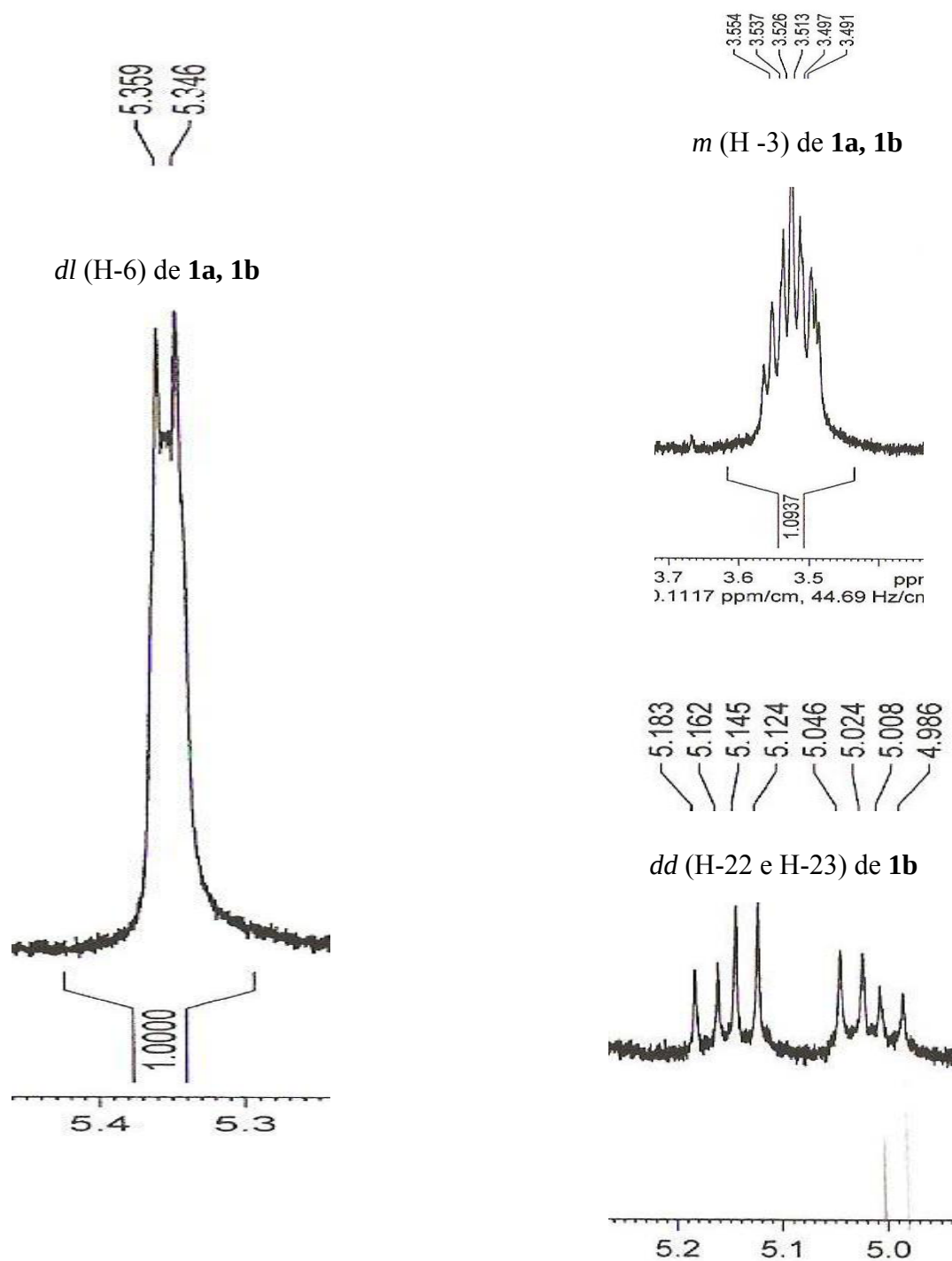


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (100 MHz, CDCl_3)

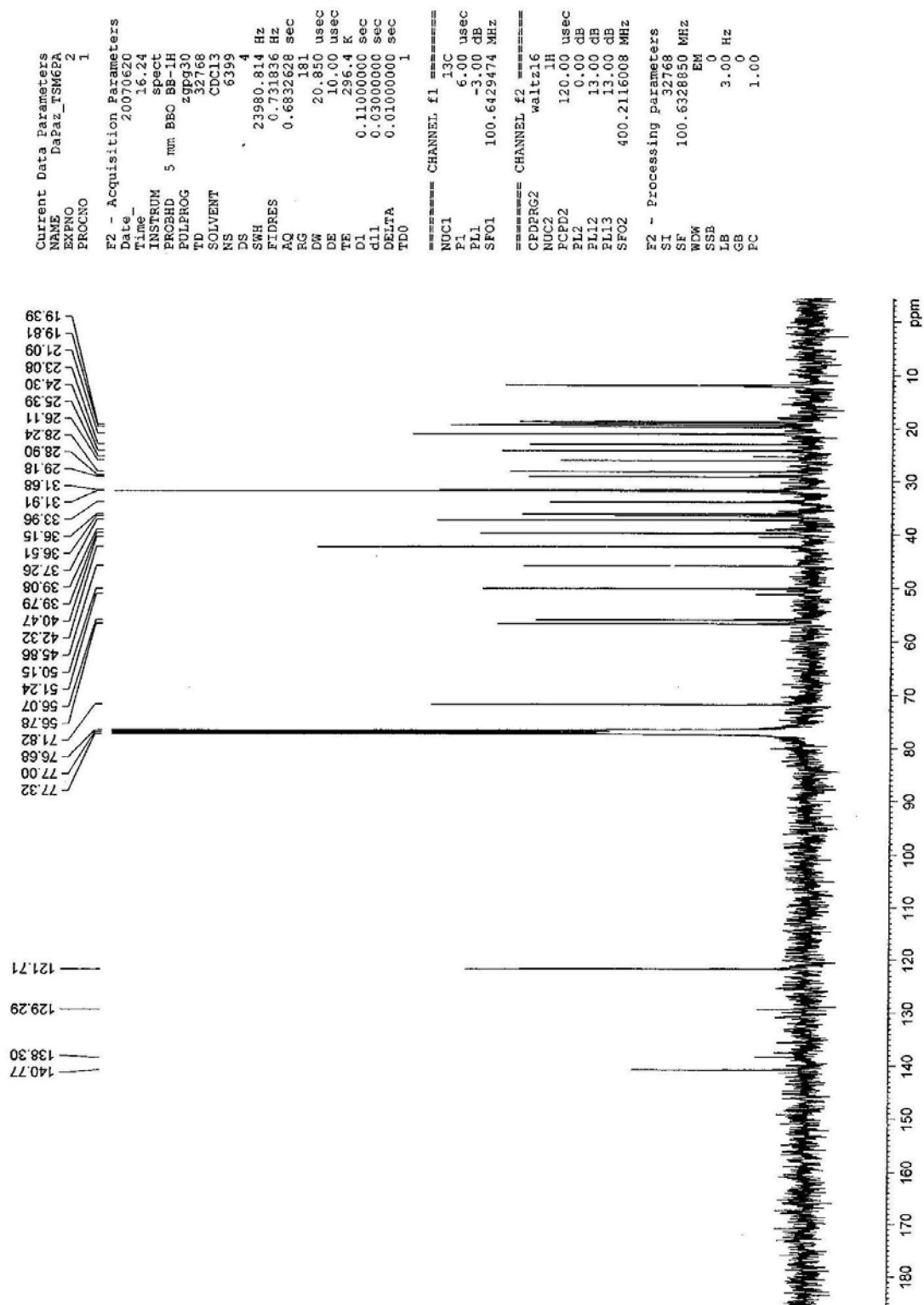
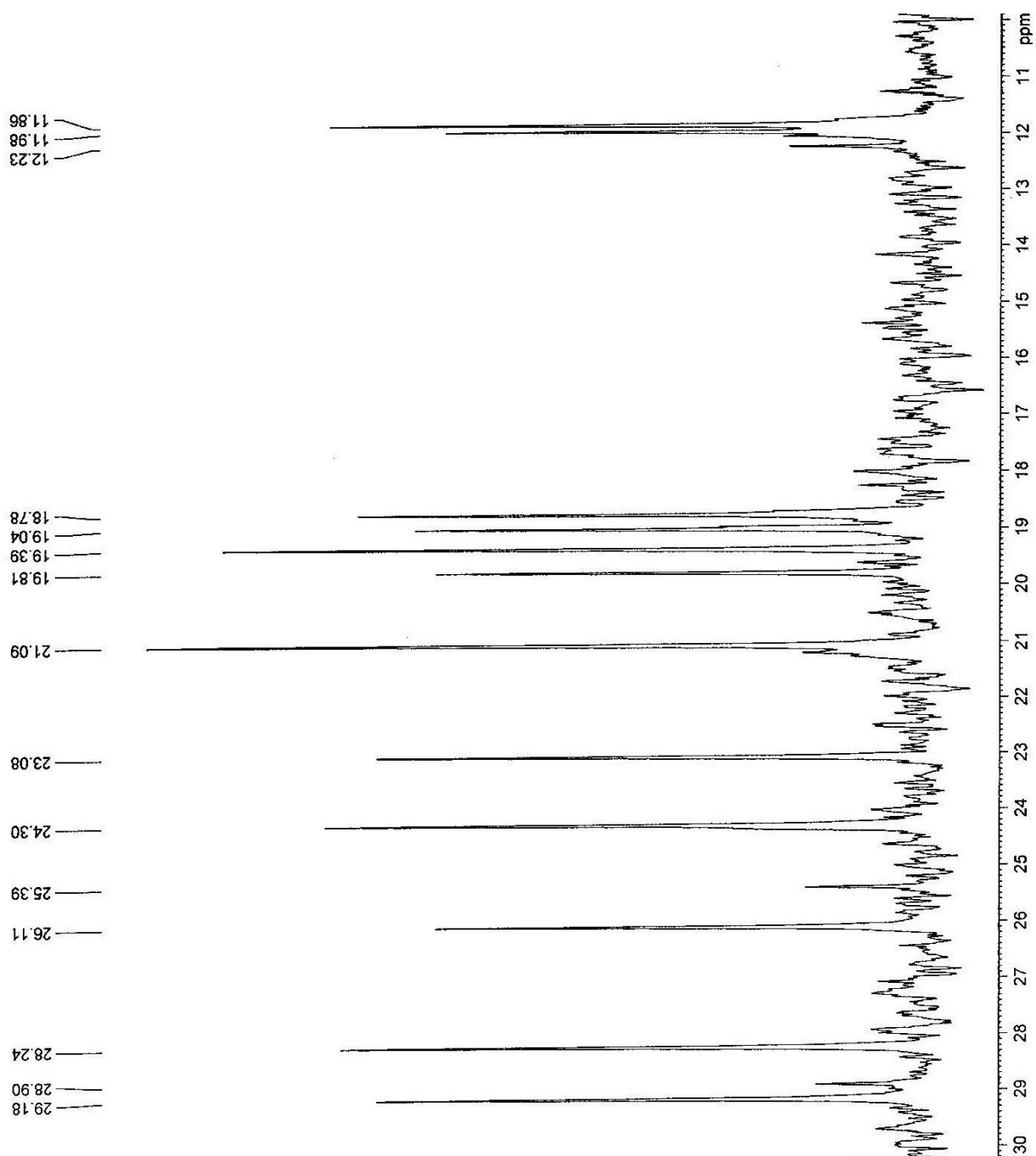


Figura 4a. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C na região entre δ 28,18-11,86 da substância **1**



6.1.3. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 2

A substância 2 (TSM-6.6A) com 22mg foi obtida após fracionamento da fração TSM-6 de acordo com o esquema 2. Apresentou Rf de 0,20 em eluição com hexano:AcOEt (7:3) e mancha de cor castanha quando revelado em vanilina.

O espectro na região do infravermelho (figura 5, p. 56) apresenta banda de OH em 3462 cm^{-1} e absorções intensas de carbonila de éster em 1743 cm^{-1} e de cetona em 1714 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H (figura 6 e 6a, p. 57 e 58) mostrou sinais do anel furano como multipletos em δ 7,40 (H-21), 6,37 (H-22) e 7,39 (H-23). A presença dos singletos em δ 5,48 (H-17) e δ 4,15 (H-15) são coerentes para os limonóides com anel 14,15-epoxi D lactona. Os sinais de δ 6,21 e δ 5,82 ($J= 12,4\text{ Hz}$) em dubletos sugerem a presença de dupla conjugada com a carbonila. Os sinais referentes à 4 grupos metílicos foram observados entre δ 1,30-1,21 além da metila em δ 0,68.

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 7, p. 59) foram verificados 27 átomos de carbono. Os deslocamentos químicos de carbonila foram observados em δ 167,33 da lactona no anel D; δ 165,98 da carbonila do metil éster e δ 208,04 que corresponde a cetona presente em C-6. Os sinais verificados em δ 163,00 e δ 118,81 são característicos do anel, sistema 1-eno-3-ceto éster. Os deslocamentos do anel anel furano foram verificados em δ 120,35 (C-20), δ 140,98 (C-21), δ 109,98 (C-22) e δ 142,98 (C-23).

A partir dos dados espectrais e da comparação com dados da literatura (tabela 13), verificou-se que a substância 2 se trata de um limonóide com anéis A e D modificados, típicos da família Rutaceae. Esse limonóide é conhecido como desacetilspathelina, isolada previamente das raízes e folhas de *S. excelsa* (Moreira, 2005; Lima, 2000) e dos frutos e galhos de *Dictyoloma vandellianum* (Vieira, 1988).

Ressalta-se que a substância **2** foi comparada em CCD com amostra da desacetilspathelina isolada das raízes de *S. excelsa* cuja caracterização foi efetuada por análise de dados de RMN em 1D (RMN- ^1H e ^{13}C) e 2D (HSQC e HMBC).

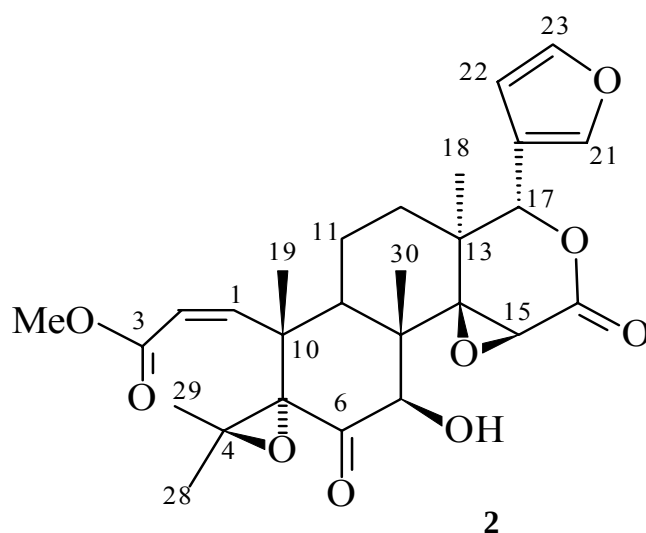


Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **2** e comparação com a literatura (Lima, 2000)

N ^o	RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)		RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)	
	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura
1	6,21 (<i>d</i> ; 12,4 Hz)	6,21 (<i>d</i> ; 12,3 Hz)	163,00	160,00
2	5,82 (<i>d</i> ; 12,4 Hz)	5,82 (<i>d</i> ; 12,3 Hz)	118,81	118,76
3			165,98	165,94
4			69,39	69,43
5			70,81	70,80
6			208,04	208,06
7	5,01 (<i>sl</i>)	5,01(<i>s</i>)	81,16	81,12
8			44,57	44,52
9	3,12 (<i>dl</i>)	3,09 (<i>dl</i>)	45,75	45,70
10			45,02	44,95
11	1,86-1,62 (<i>m</i>)	1,85-1,68 (<i>m</i>)	21,36	21,36
12	1,86-1,62 (<i>m</i>)	1,85-1,68 (<i>m</i>)	32,82	32,79
13			37,79	37,75
14			67,00	68,50
15	4,15 (<i>s</i>)	4,15 (<i>s</i>)	51,40	51,34
16			167,33	167,44
17	5,48 (<i>s</i>)	5,48 (<i>s</i>)	78,08	78,07
18	1,24 (<i>s</i>)	1,24 (<i>s</i>)	20,25	20,26
19	1,25 (<i>s</i>)	1,25 (<i>s</i>)	22,62	22,65
20			120,35	120,27
21	7,40 (<i>m</i>)	7,41 (<i>m</i>)	140,98	140,96
22	6,37 (<i>m</i>)	6,37 (<i>dd</i> ; 1,8 e 0,8 Hz)	109,98	109,97
23	7,39 (<i>m</i>)	7,39 (<i>m</i>)	142,98	142,98
28	1,21 (<i>s</i>)	1,21 (<i>s</i>)	28,98	29,06
29	1,30 (<i>s</i>)	1,30 (<i>s</i>)	19,69	19,65
30	0,68 (<i>s</i>)	0,68 (<i>s</i>)	12,45	12,47
OMe	3,66 (<i>s</i>)	3,66 (<i>s</i>)	51,82	51,87

Figura 5. Espectro na região do infravermelho da substância 2 em KBr

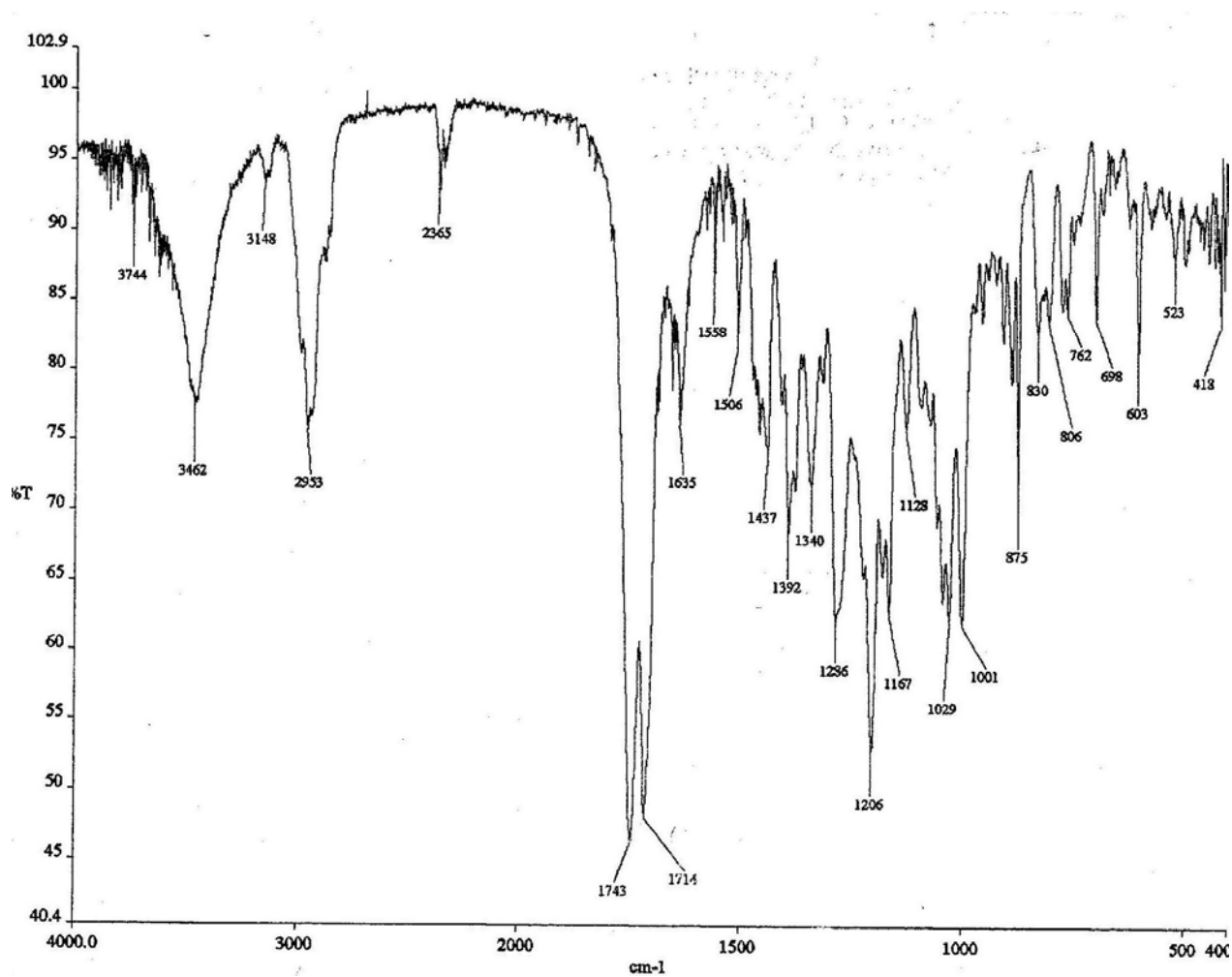


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (400 MHz, CDCl_3)

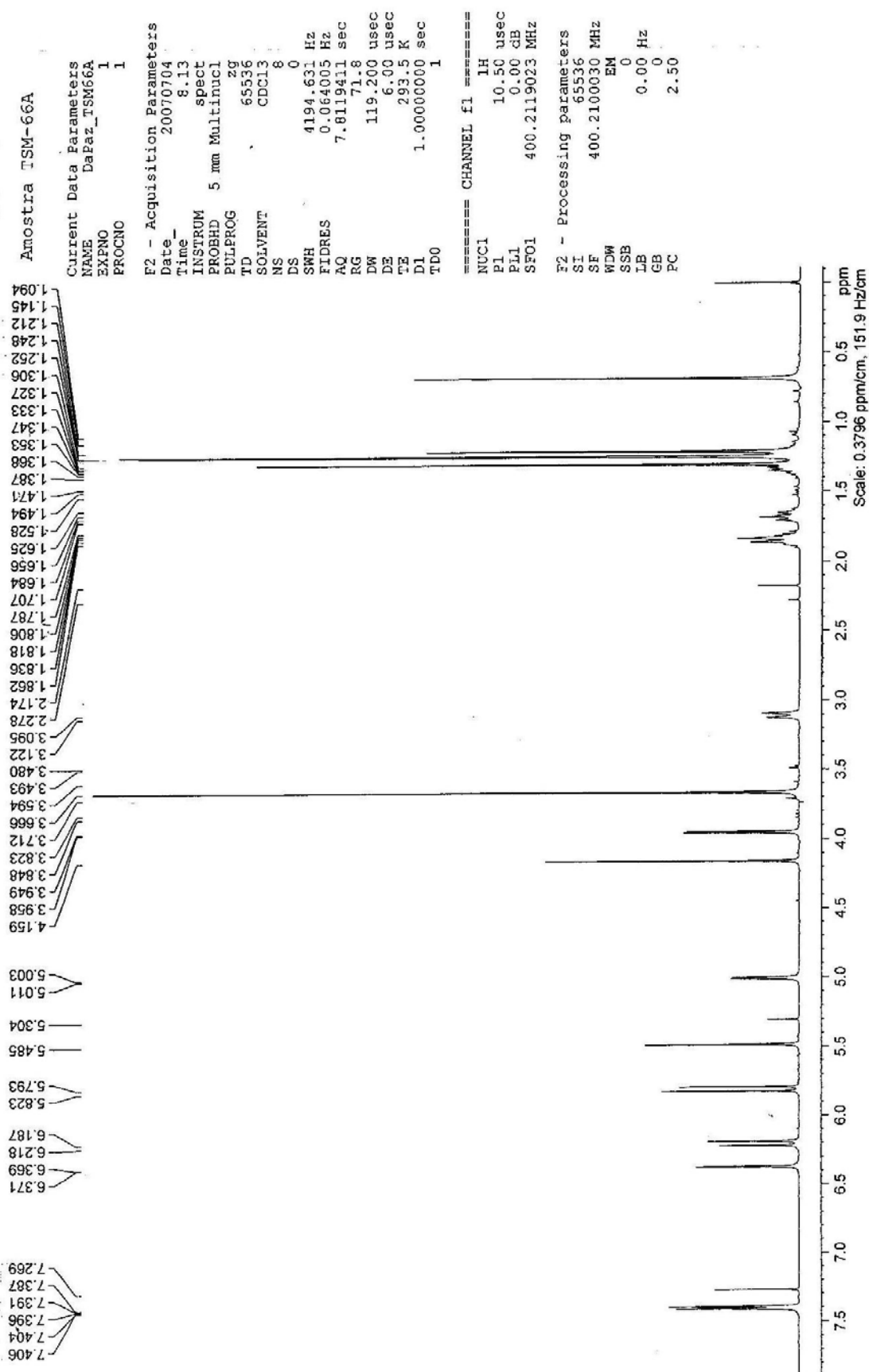


Figura 6a. Ampliação de regiões do espectro de RMN- ^1H da substância **2** (400 MHz, CDCl_3)

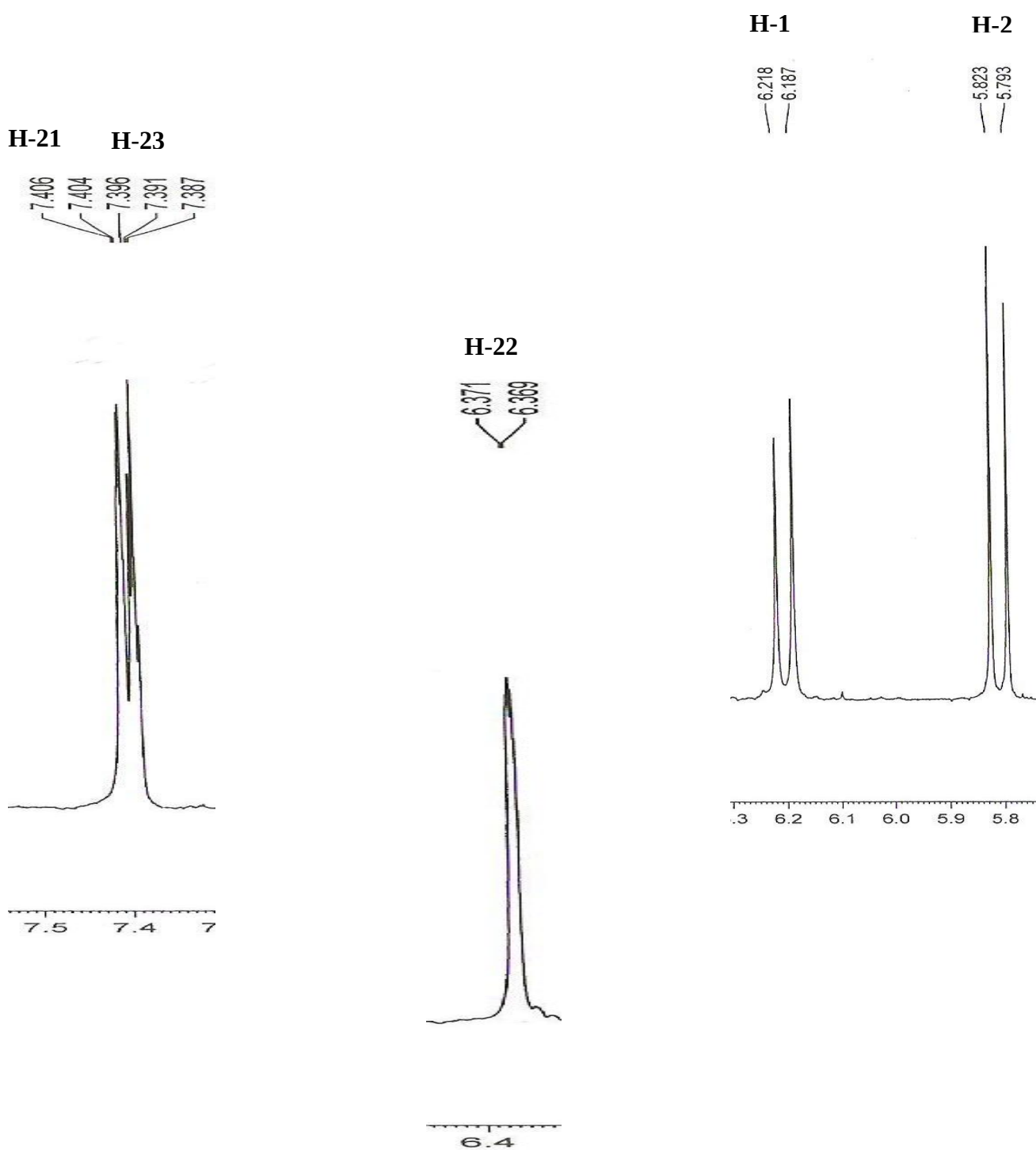
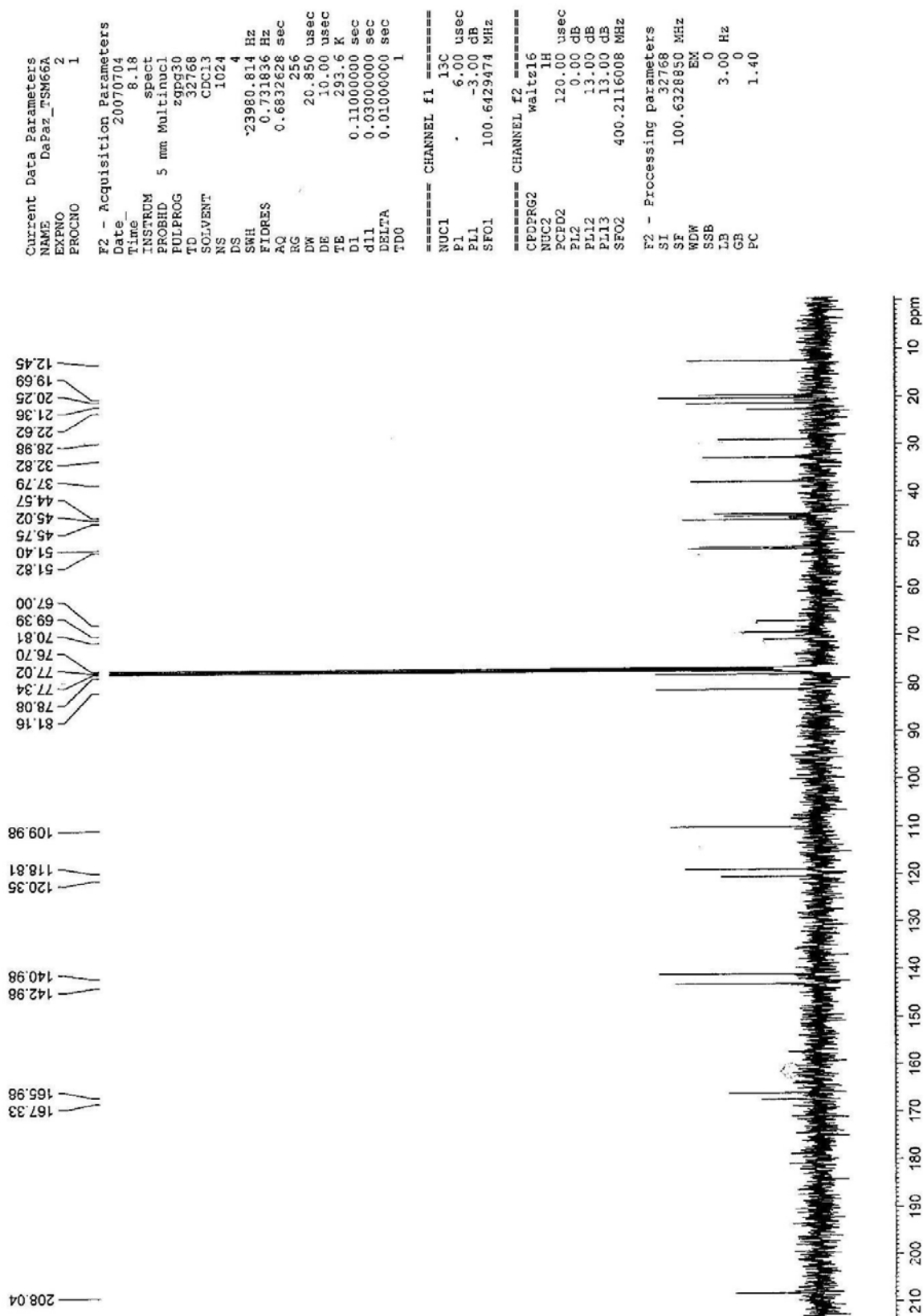


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (100 MHz, CDCl_3)



6.1.4. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 3

A substância **3** (3 mg) foi obtida por fracionamento de TSM-8 seguida por tratamento em metanol (esquema 3). Apresentou R_f de 0,75 em eluição com $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (95:5) e mancha de cor azul quando revelado em vanilina

O espectro na região do infravermelho (figura 8, p. 64) apresenta absorção em 3135 cm^{-1} de N-H, carbonila em 1644 cm^{-1} e de olefina em 1613 cm^{-1} . As bandas de C=C do anel aromático foram verificadas entre $1501\text{-}1462\text{ cm}^{-1}$.

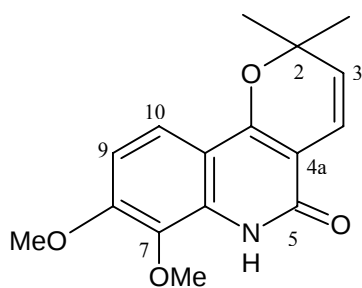
Através da análise do espectro de RMN de ^1H (figura 9, p. 65) verificou-se a presença de um par de dubletos em δ 6,84 (H-9) e δ 7,57 (H-10), com $J = 8,8\text{ Hz}$, indicativo de acoplamento em *orto*. Os dubletos em δ 5,50 e δ 6,68 ($J = 10,0\text{ Hz}$) foram atribuídos a dupla ligação do anel pirano (H-3 e H-4). Outros sinais observados no espectro foram os singletos em δ 1,49 e δ 1,53 (metilas ligadas à C-2); δ 3,93 e δ 3,95 (metóxilas ligadas à C-7 e C-8); δ 8,73 (H-N), conforme tabela 14.

A tabela 14 mostra os deslocamentos 16 átomos de carbonos observados no espectro de RMN de ^{13}C (figura 10, p. 66). O espectro de HSQC (figura 11, p. 67) confirmou a ligação dos hidrogênios aromáticos em δ 6,84 e δ 7,57 ($J = 8,8\text{ Hz}$) com os carbonos em δ 107,40 (C-9) e δ 118,51 (C-10), respectivamente. Neste experimento, o hidrogênio em δ 8,73 não mostrou correlação neste espectro sugerindo a sua ligação com nitrogênio.

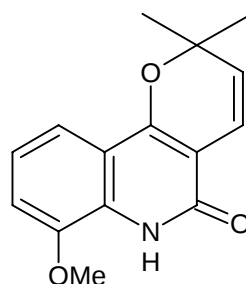
O espectro de HMBC (figura 12, p. 68) permitiu as seguintes observações dos hidrogênios aromáticos: O hidrogênio 9 correlaciona à J-2 com δ 153,19 (C-8) e J-3 com δ 133,60 (C-7) e δ 110,15 (C-10a). O hidrogênio 10 mostrou correlações à J-3 com δ 157,14 (C-10b), δ 153,19 (C-8), δ 132,03 (C-6a) e J-4 com δ 133,60 (C-7). As correlações à J-3 das metoxilas foram observadas; δ 3,93 com δ 133,60 (C-7) e 3,95 com δ 153,19 (C-8). Estes dados permitiram as atribuições corretas

do sistema aromático. Outras correlações importantes observadas no espectro desta substância estão disponíveis na tabela 15.

Os dados espectrais obtidos permitiram identificar a substância **3** como 7,8-dimetoxiflindersina, cujos deslocamentos de RMN foram similares aos reportados para 7-metoxiflindersina (Moraes, 2003). Os alcalóides do tipo piranoquinolinos são de ampla ocorrência em Rutaceae, incluindo a flindersina em espécies dos gêneros *Haplophyllum*, *Glycosmis* e *Zanthoxylum* (Cantrell et. al, 2005; Rahmani et. al, 2004 e Muñoz et. al., 1982). Os derivados de flindersina com metilações em diferentes posições do anel aromático são relatados em Rutaceae como 7-metoxiflindersina em *Vepris bilocularis* (Brader et. al., 1996) e *Myrtopsis macrocarpa* (Mester, 1973), 8-metoxiflindersina em *Neuraputia paraensis* (Moraes, 2003) e *Myrtopsis macrocarpa* (Hifnawya et. al., 1977). Em *Vepris louisii* foi isolado 7,8-dimetoxi-N-metilflindersina, conhecido como veprisina (Ayafor et. al., 1982). Apesar da ampla ocorrência dos derivados de flindersina na família o registro do alcalóide 7,8-dimetoxiflindersina não foi encontrado na literatura.



3



Modelo I

Tabela 14. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância **3**

Posição	RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)		RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)	
	Experimental	Modelo I (Moraes, 2003)	Experimental	Modelo I (Moraes, 2003)
2			79,08	79,10
3	5,50 (<i>d</i> ; 10,0 Hz)	5,52 (<i>d</i> ; 9,9 Hz)	125,32	126,20
4	6,69 (<i>d</i> ; 10,0 Hz)	6,71 (<i>d</i> ; 9,9 Hz)	117,29	117,30
4a			104,32	106,20
5			161,13	160,50
6a			132,03	127,90
7			133,60	145,50
8		6,94 (<i>dd</i> ; 8,0 e 1,0 Hz)	153,19	110,30
9	6,84 (<i>d</i> ; 8,8 Hz)	7,10 (<i>t</i> ; 8,0 Hz)	107,40	121,70
10	7,57 (<i>d</i> ; 8,8 Hz)	7,46 (<i>dd</i> ; 8,0 e 1,0 Hz)	118,51	122,60
10a			110,15	115,70
10b			157,14	157,10
OMe (C-7)	3,93 (<i>s</i>)	3,95 (<i>s</i>)	56,23	
OMe (C-8)	3,95 (<i>s</i>)		60,96	56,00
Me	1,53 (<i>s</i>)	1,52 (<i>s</i>)	28,26	28,10
Me	1,49 (<i>s</i>)	1,52 (<i>s</i>)	28,26	28,10
H-N	8,73 (<i>s</i>)	8,87 (<i>s</i>)		

Tabela 15. Correlações observadas nos espectros de HSQC e HMBC da substância **3**

H	HSQC	HMBC		
		J-2	J-3	J-4
H-3 (5,50)	125,32 (C-3)	79,08 (C-2)	104,32 (C-4a) 28,26 (Me-C ₂)	157,14 (C-10b)
H-4 (6,68)	117,29 (C-4)		161,13 (C-5) 157,14 (C-10b) 79,08 (C-2)	28,26 (Me-C ₂)
H-9 (6,84)	107,40 (C-9)	153,19 (C-8)	133,60 (C-7) 110,15 (C-10a)	
H-10 (7,57)	118,51 (C-10)		157,14 (C-10b) 153,19 (C-8) 132,03 (C-6a)	133,60 (C-7)
Me ₁ C-2 (1,49)	28,26 (Me-2)	79,08 (C-2)	28,26 (Me ₂ C-2) 125,32 (C-3)	117,29 (C-4)
Me ₂ C-2 (1,53)		79,08 (C-2)	28,26 (Me ₁ C-2) 125,32 (C-3)	117,29 (C-4)
OMe-7 (3,93)	56,23 (OMe-7)		133,60 (C-7)	
OMe-8 (3,95)	60,96 (OMe-8)		153,19 (C-8)	

Figura 8. Espectro na região do infravermelho da substância 3 em KBr

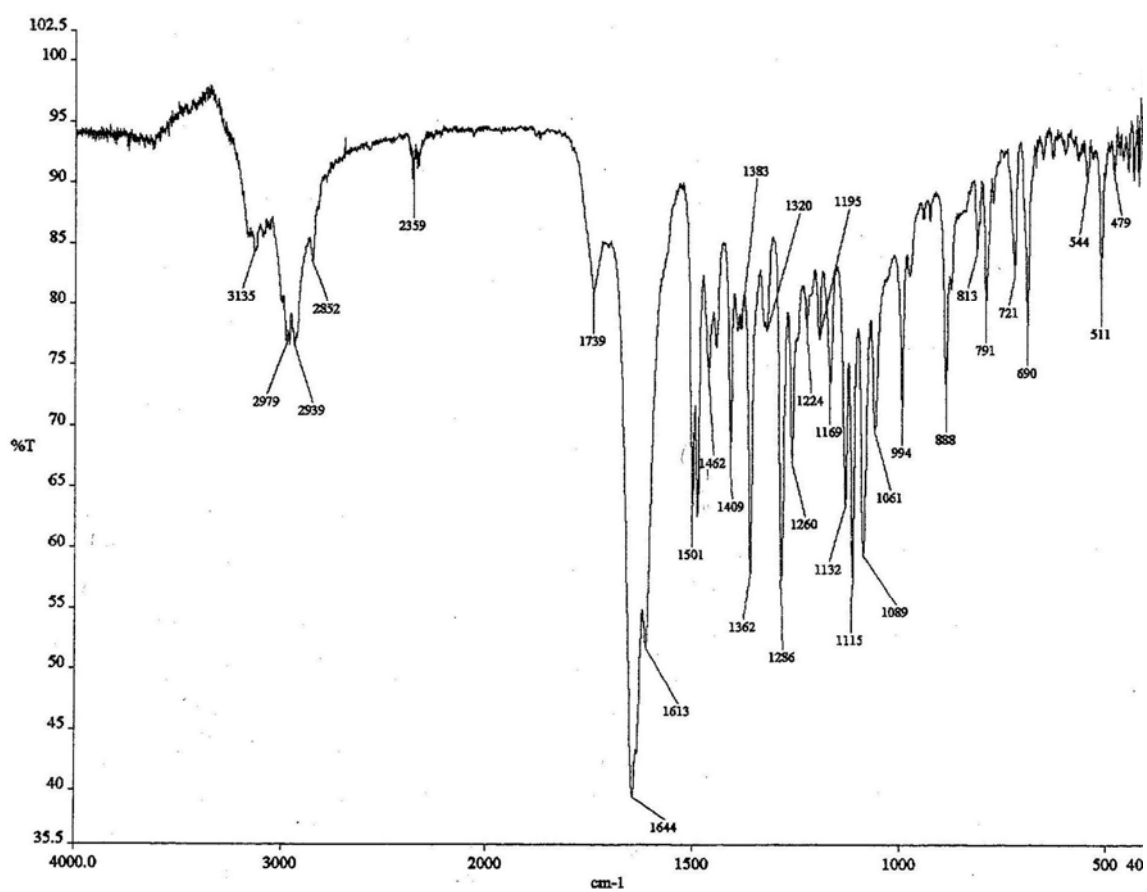


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (400 MHz, CDCl_3)

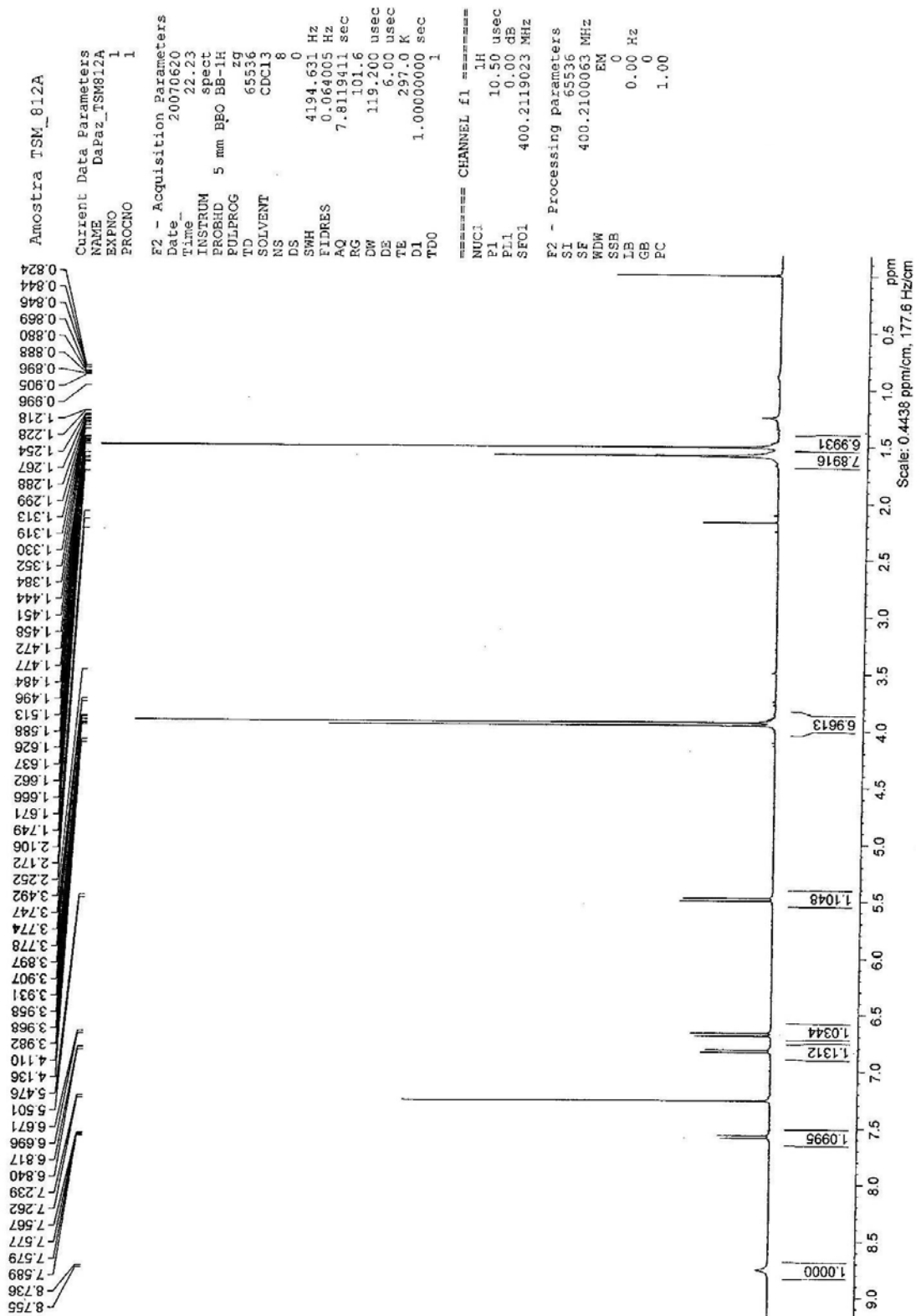


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (100 MHz, CDCl_3)

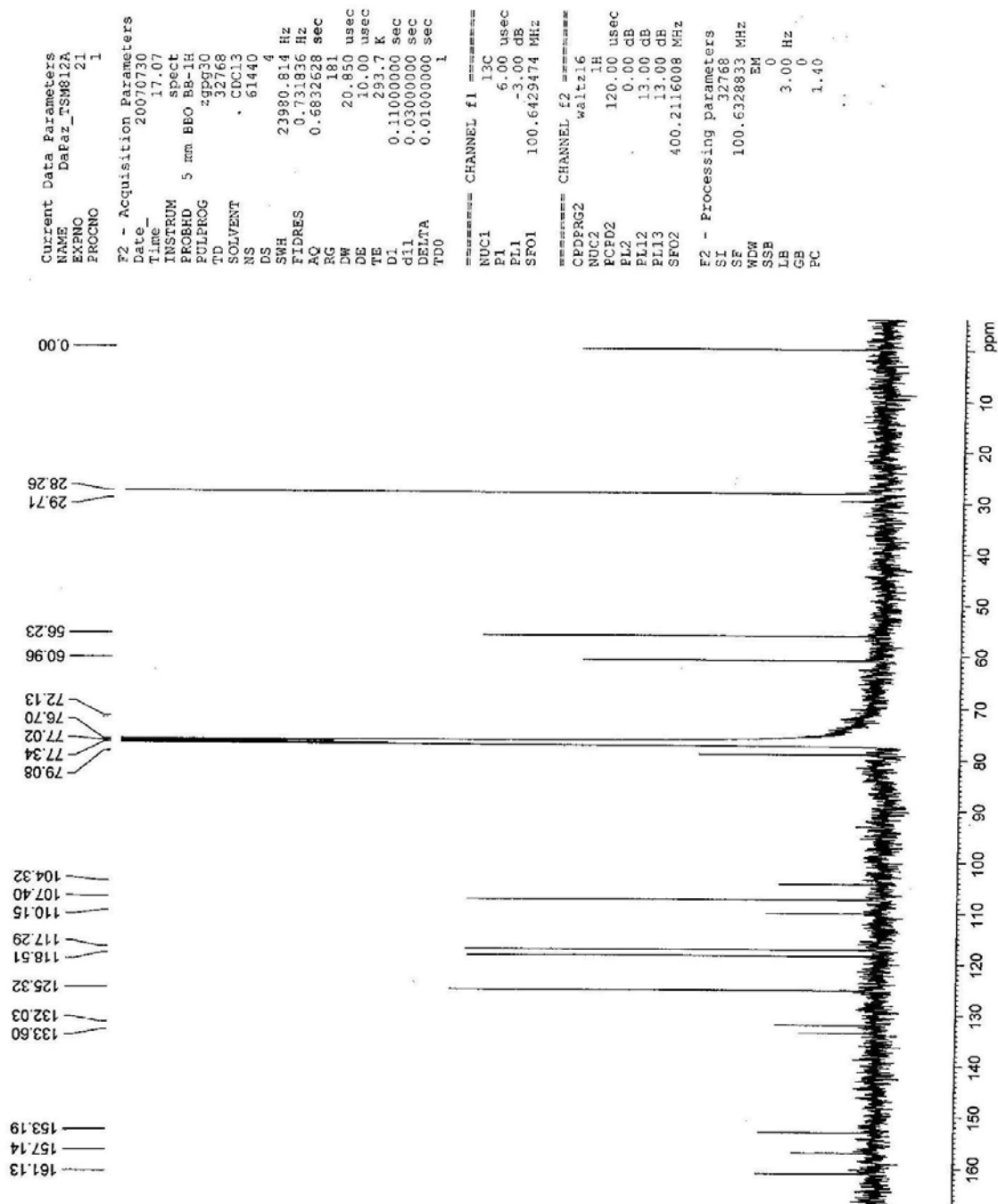


Figura 11. Espectro de HSQC da substância **3** (400/100 MHz, CDCl_3)

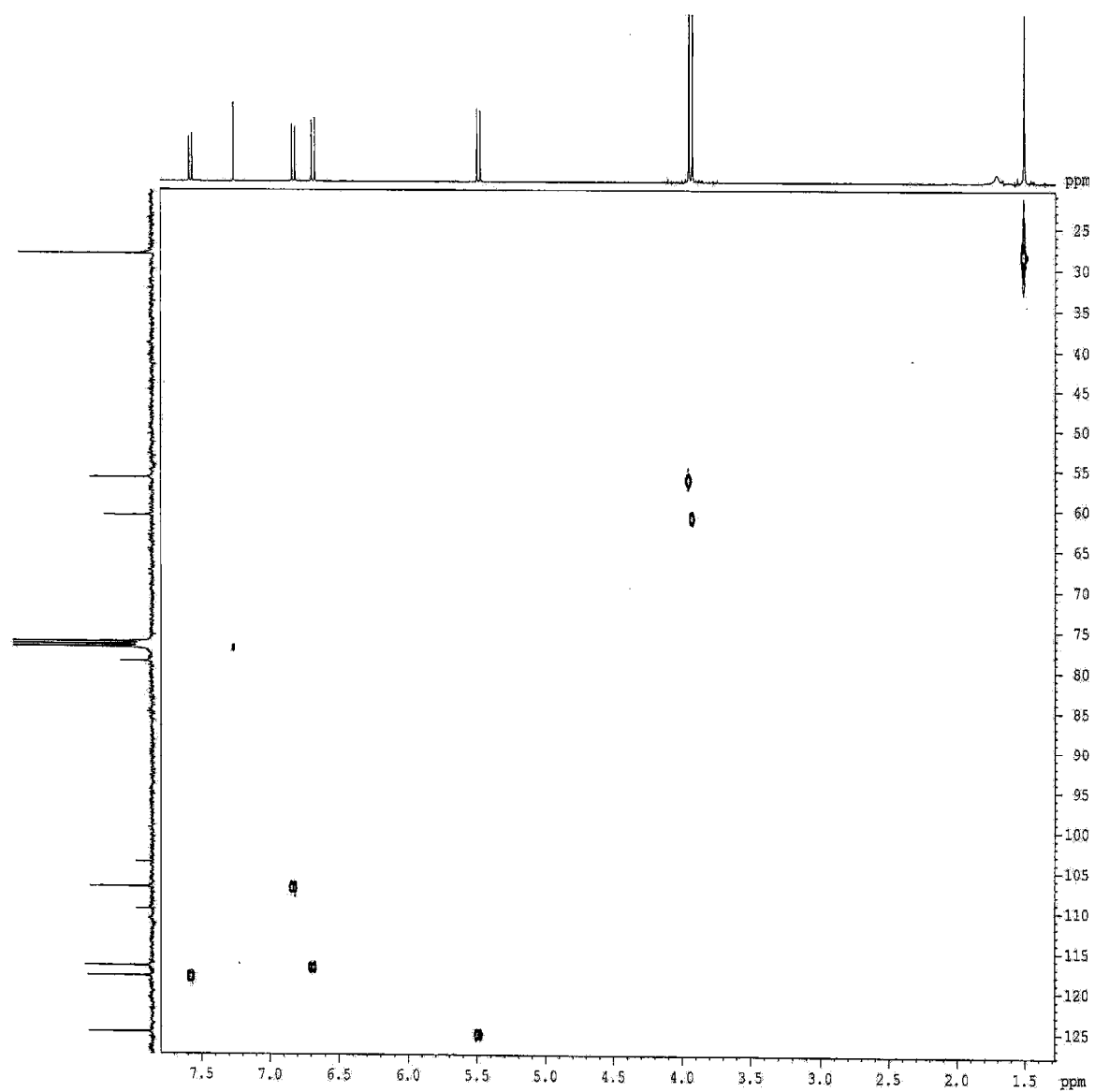
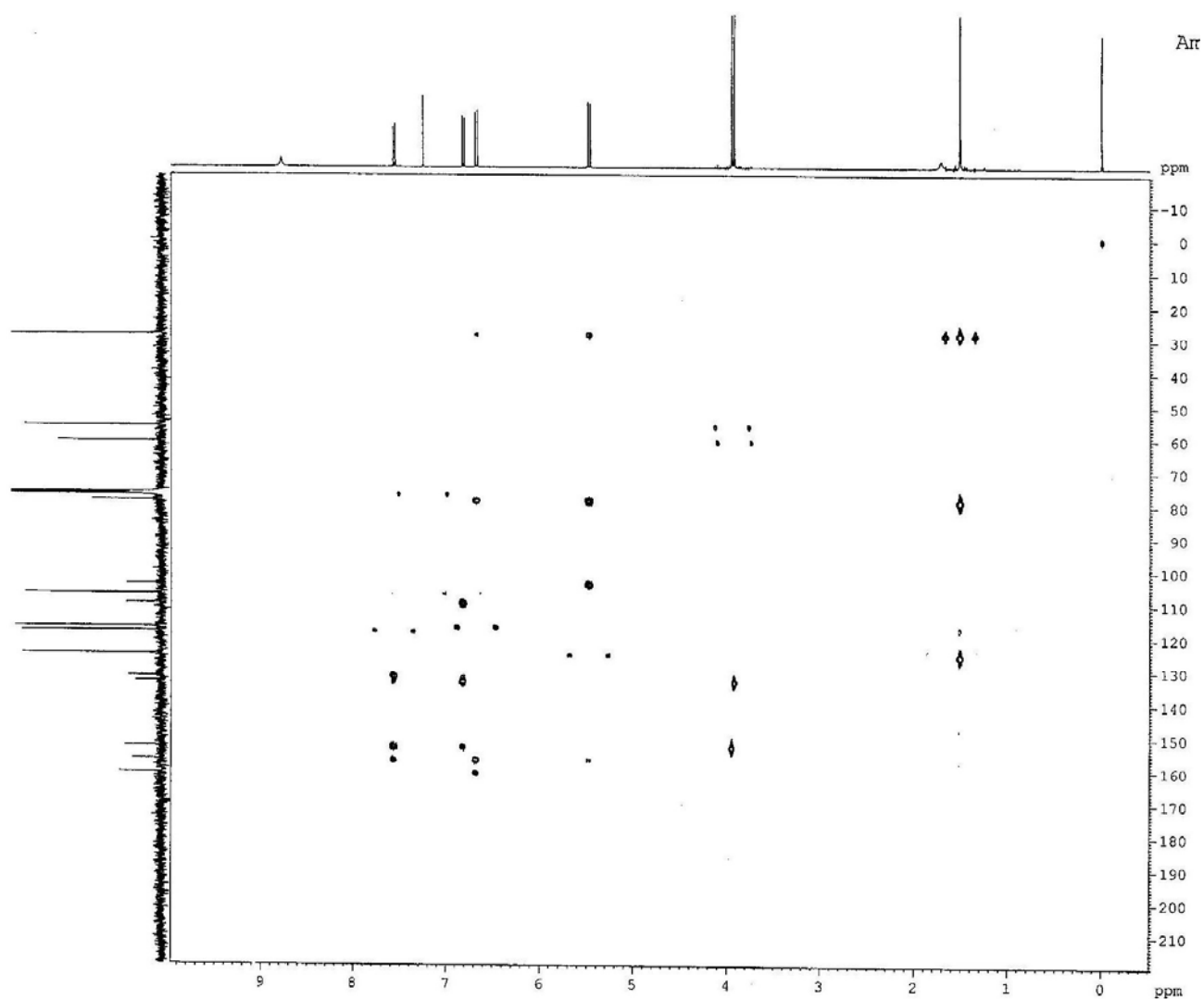


Figura 12. Espectros de HMBC da substância **3** (400/100 MHz, CDCl_3)



6.1.5. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 4

A substância **4** foi obtida (esquema 5) como um sólido branco aspecto amorfo, solúvel apenas em piridina, coloração castanho em CCD utilizando-se vanilina como revelador. O espectro de RMN de ^1H (figura 13 e 13a, p.75 e 76) mostrou sinais de hidrogênios oximetínicos em δ 4,85 (*dd*, H-3), δ 3,92 (*sl*, H-7), δ 4,10 (*sl*, H-24), 4,49 (*sl*, H-23). A presença do grupo angelato foi evidenciada em δ 5,98 (hidrogênio olefínico) e metilas em 2,06 e 1,95, conforme mostra a tabela 16

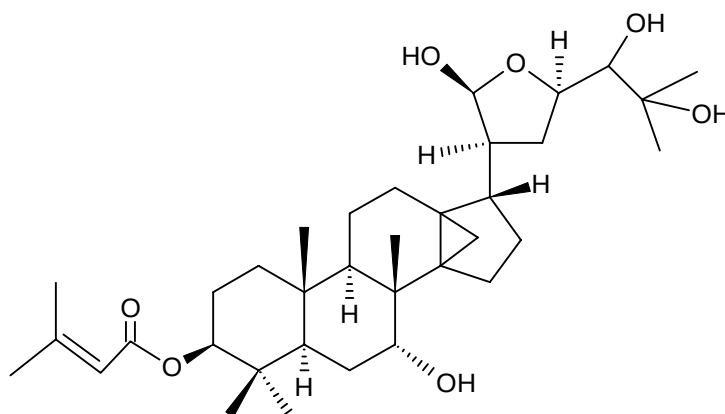
O espectro de COSY (figura 14, p.77) mostrou o acoplamento dos hidrogênios em δ 0,87 (H-18a) com 0,63 (H-18b) observados no espectro de RMN de ^1H como dois dubletos, indicando a presença do grupo ciclopropil metileno. Outros acoplamentos importantes no espectro de COSY foram de H-3' (δ 5,98) com H-5' (δ 2,06) e H-4' (δ 1,95); H-23 (δ 4,49) com H-24 (δ 4,10) além do acoplamento de H-21 (δ 5,86) com δ 7,81 (OH).

Os dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C (tabela 16, figura 15 e 15a, p.78 e 79) mostraram sinais compatíveis para triterpeno do tipo glabretal cujos deslocamentos foram similares aos reportados para o modelo II isolado em *Quassia multiflora* (Miller et al., 1995) e modelo III em *Dysoxylum muelleri* (Dulcie et al, 1996), exceto os carbonos da cadeia lateral e do substituinte em C-3. O espectro de correlação à J-1 (HSQC) conforme figura 16 e 16a mostra as seguintes correlações dos hidrogênios da cadeia lateral: δ 2,30 $\rightarrow$ δ 48,32 (C-20); δ 5,86 $\rightarrow$ δ 94,71 (C-21); δ 2,13 e δ 1,98 $\rightarrow$ δ 31,99 (C-22); δ 4,49 $\rightarrow$ δ 66,87 (C-23); δ 4,10 $\rightarrow$ δ 73,70 (C-24). O deslocamento em δ 73,80 não correlacionou com hidrogênio e foi atribuído ao C-25.

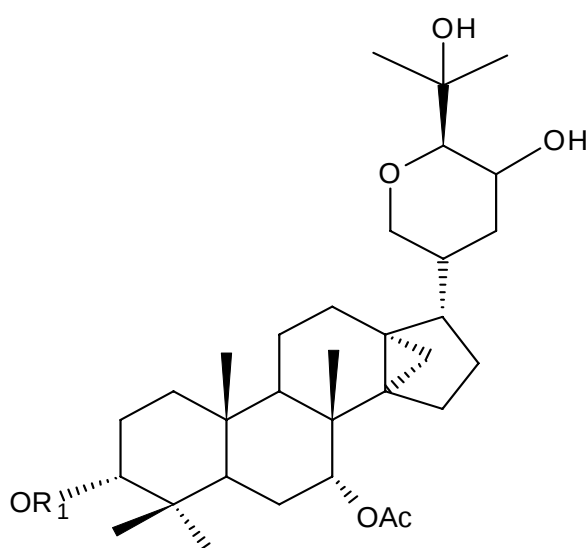
O grupo angeloil ligado em C- 3 da substância **4** foi evidenciado pelos sinais de hidrogênios em δ 5,98, δ 2,06 e δ 1,95 cujos deslocamentos dos carbonos foram observados em δ 137,76 (C-3'), δ 15,74 (Me-5'), δ 21,41 (Me-4'), além da carbonila em δ 168,08 (C-1').

No espectro de correlação à longa distância (HMBC) (tabela 17) o hidrogênio em δ 4,10 (H-23) correlaciona a J-2 com o carbono em 66,87 (C-23) e δ 73,80 (25) e à J-3 com 27,61 (C-26) e δ

94,71 (C-21). Observaram-se correlações em 0,63 (H-18a) à J-2 com os carbonos δ 28,19 e δ 39,42; também correlacionou à J-3 com os carbonos δ 28,58; δ 26,05 e δ 46,69 enquanto o H-18b correlacionou apenas à J-3 com o C-17 (δ 46,69). Outras correlações dos hidrogênios dos metilenos são observadas na região de δ 2,98 e 1,62 com carbonos entre δ 31,99-16,63, conforme figura 17.



Modelo II



Modelo III

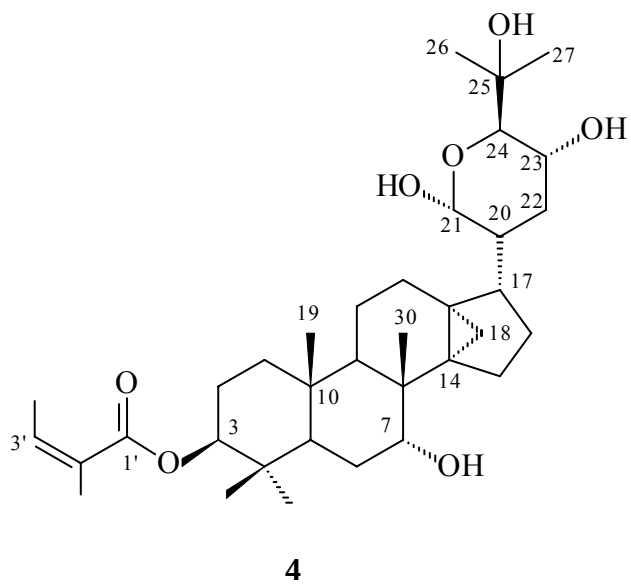


Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **4**

Posição	RMN ^1H	RMN ^{13}C		
	Experimental (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	Experimental (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	Modelo II (125 MHz, CDCl_3)	Modelo III (75 MHz, CDCl_3)
1	1,48	38,23	34,17	34,60
2	2,48 e 1,60	28,07	26,28	25,50
3	4,85 (<i>dd</i> ; 11,2 e 4,8 Hz)	81,34	78,14	78,90
4		37,78	36,55	37,30
5	2,51	39,81	41,26	42,40
6	1,74 e 1,68	24,58	24,21	24,40
7	3,92 (<i>sl</i>)	74,58	74,22	76,30
8		39,02	37,06	38,02
9	1,44	44,99	44,20	45,30
10		37,82	37,25	36,40
11	1,31	16,63	16,13	17,20
12	1,86 e 1,63	26,05	22,72	23,10
13		28,19	28,91	29,00
14		39,42	38,91	37,10
15	1,93 e 1,68	28,58	25,71	26,20
16	1,74	28,88	27,47	27,70
17	1,93 e 1,74	46,69	44,96	45,50
18	0,63 (<i>d</i> ; 5,2 Hz) 0,87 (<i>d</i> ; 5,6 Hz)	15,01	13,74	16,50
19	0,95 (<i>s</i>)	17,81	15,73	16,10
20	2,30	48,32	48,76	46,00
21	5,86 (<i>sl</i>)	94,71	97,53	70,80
22	2,13 e 1,93	31,99	29,48	36,80
23	4,49 (<i>sl</i>)	66,87	78,72	64,90
24	4,10 (<i>sl</i>)	73,70	74,99	75,20
25		73,80	73,50	73,20

26	1,54 (s)	27,61	26,74	28,90
27	1,54 (s)	28,58	26,73	28,00
28	0,99 (s)	26,90	27,86	29,10
29	0,86 (s)	16,42	21,82	21,50
30	1,05 (s)	20,66	19,56	19,60
1'		168,08	167,66	169,9
2'		129,42	129,26	118,8
3'	5,98 (dd; 5,6 e 1,6Hz)	137,76	136,62	144,3
4'	1,95 (dq; 7,2 e 1,6 Hz)	21,41	12,20	134,5
5'	2,06 (dq; 7,2 e 1,6 Hz)	15,74	14,42	129,4
OH C- 21	7,81 (s)			

Tabela 17. Correlações observadas no espectro de HMBC da substância **4**

H	J-2	J-3	J-4
H-3' (5,98)	21,42 (C-4')	15,74 (C-5'), 168,08 (C-1')	24,58 (C-6)
H-21 (5,86)		31,99 (C-22), 73,70 (C-24)	
H-3 (4,85)	28,07 (C-2)	16,42 (Me-29), 38,23 (C-1), 168,08 (C-1')	
H-24 (4,10)	66,87 (C-23), 73,80 (C- 25)	94,71 (C-21), 27,61 (C-26) 28,58 (C-27)	
H-7 3,92		44,99 (C-9)	
H-18 (0,63)	28,19 (C-13) 39,42 (C-14)	28,58 (C-15), 26,05 (C-12), 46,69 (C-17)	
H-18 (0,87)		46,69 (C-17)	
Me-19 (0,95)	37,82 (C-10)	38,23 (C-1), 44,99 (C-9)	
Me-26 (1,54)		28,58 (C-27), 73,70 (C-24)	
Me-27 (1,54)	73,80 (H-25)	73,70 (H-24), 27,61 (H-26)	
Me-28 (0,99)	37,78 (C-4)	16,42 (C-29), 81,34 (C-3)	21,41 (C-4')
Me-29 (0,86)	37,78 (C-4)	26,90 (C-28)	
Me-30 (1,05)	39,02 (C-8)	44,99 (C-9), 74,58 (C-7)	
H-5' (2,06)	129,42 (C-2')	168,08 (C-1'), 137,76 (C-3')	
H-4' (1,95)	137,76 (C-3')	129,42 (C-2')	
			168,08 (C-1')

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

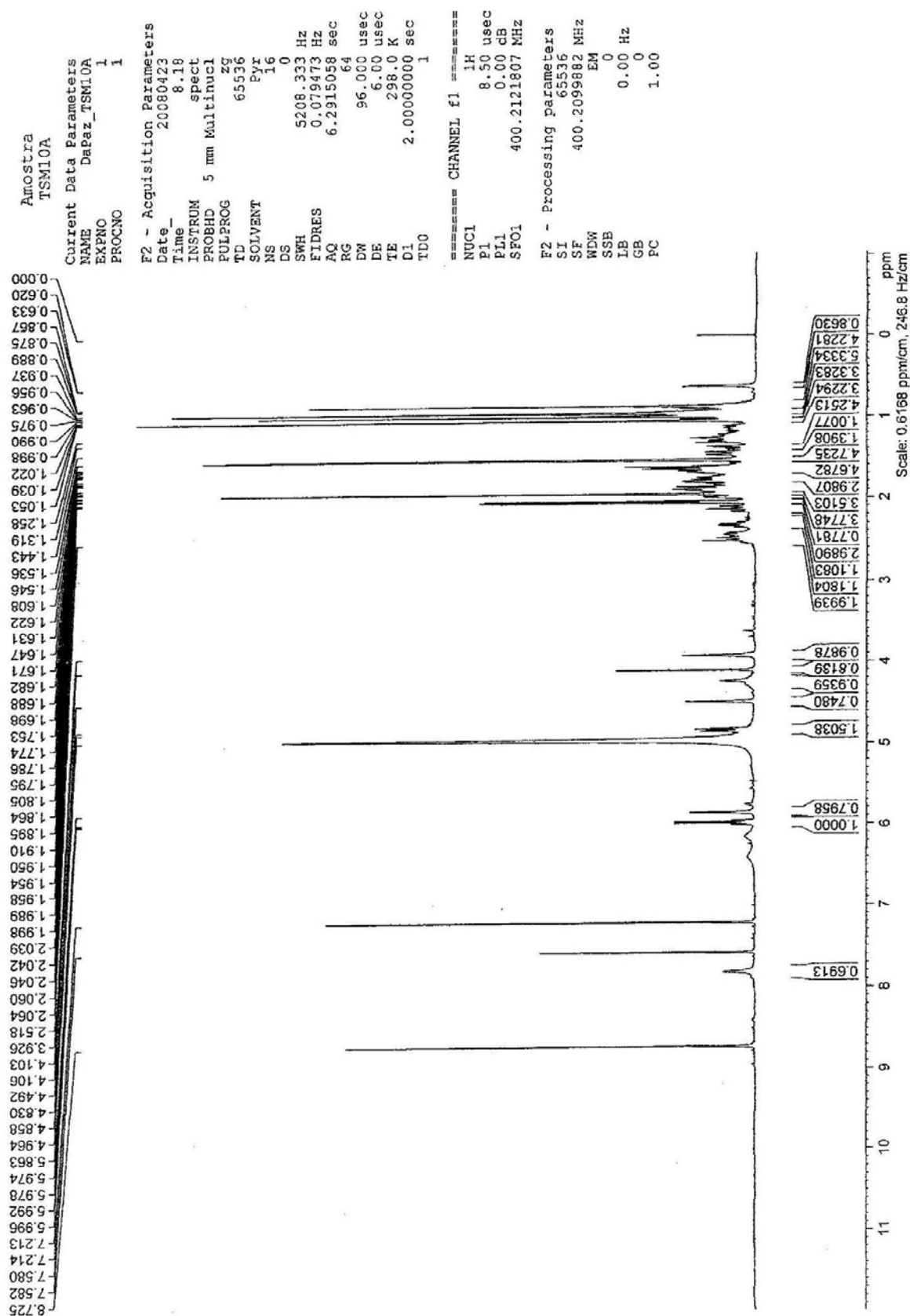


Figura 13a. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **4**

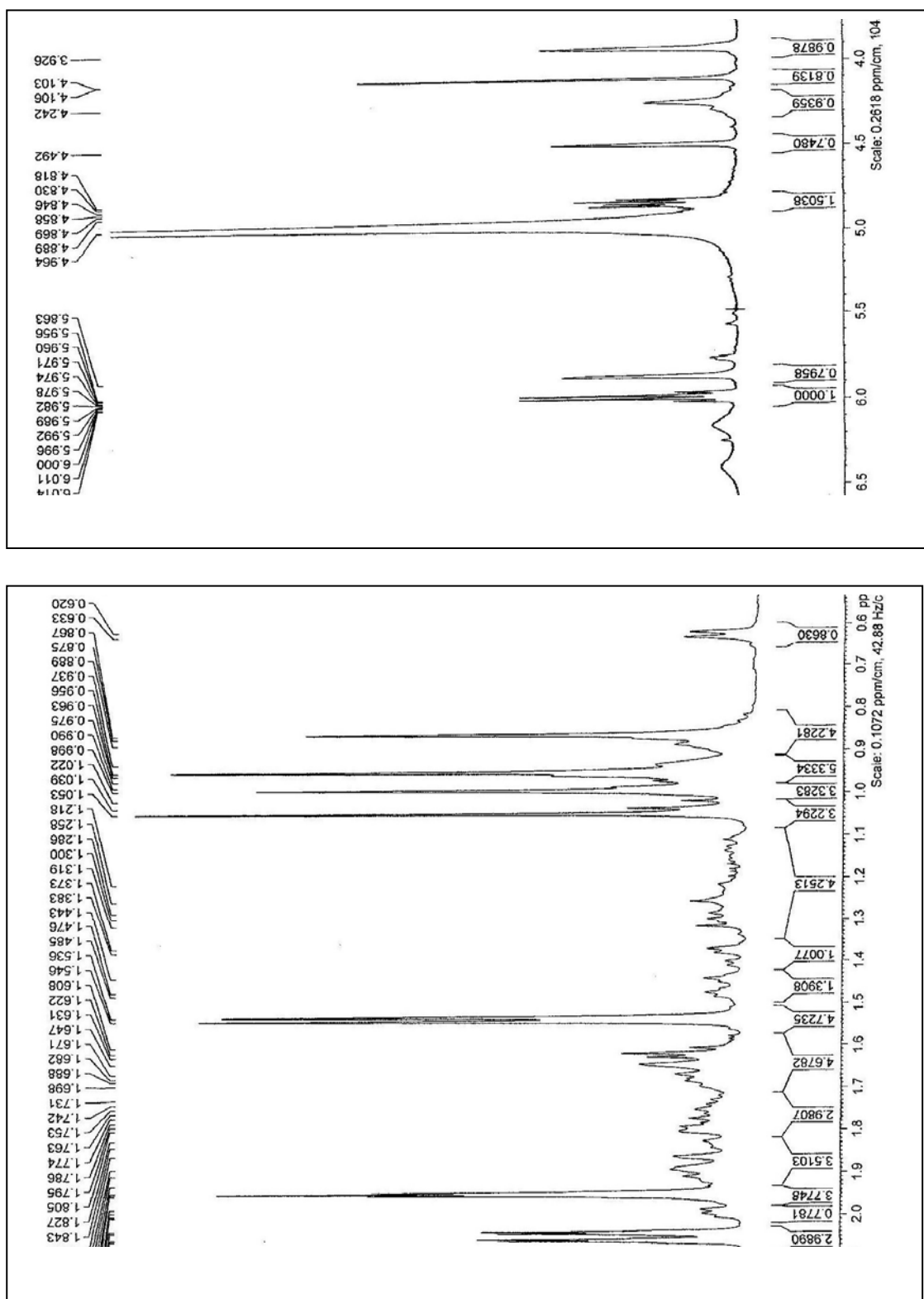


Figura 14. Espectro de COSY da substância **4** (100 MHz, C₅D₅N)

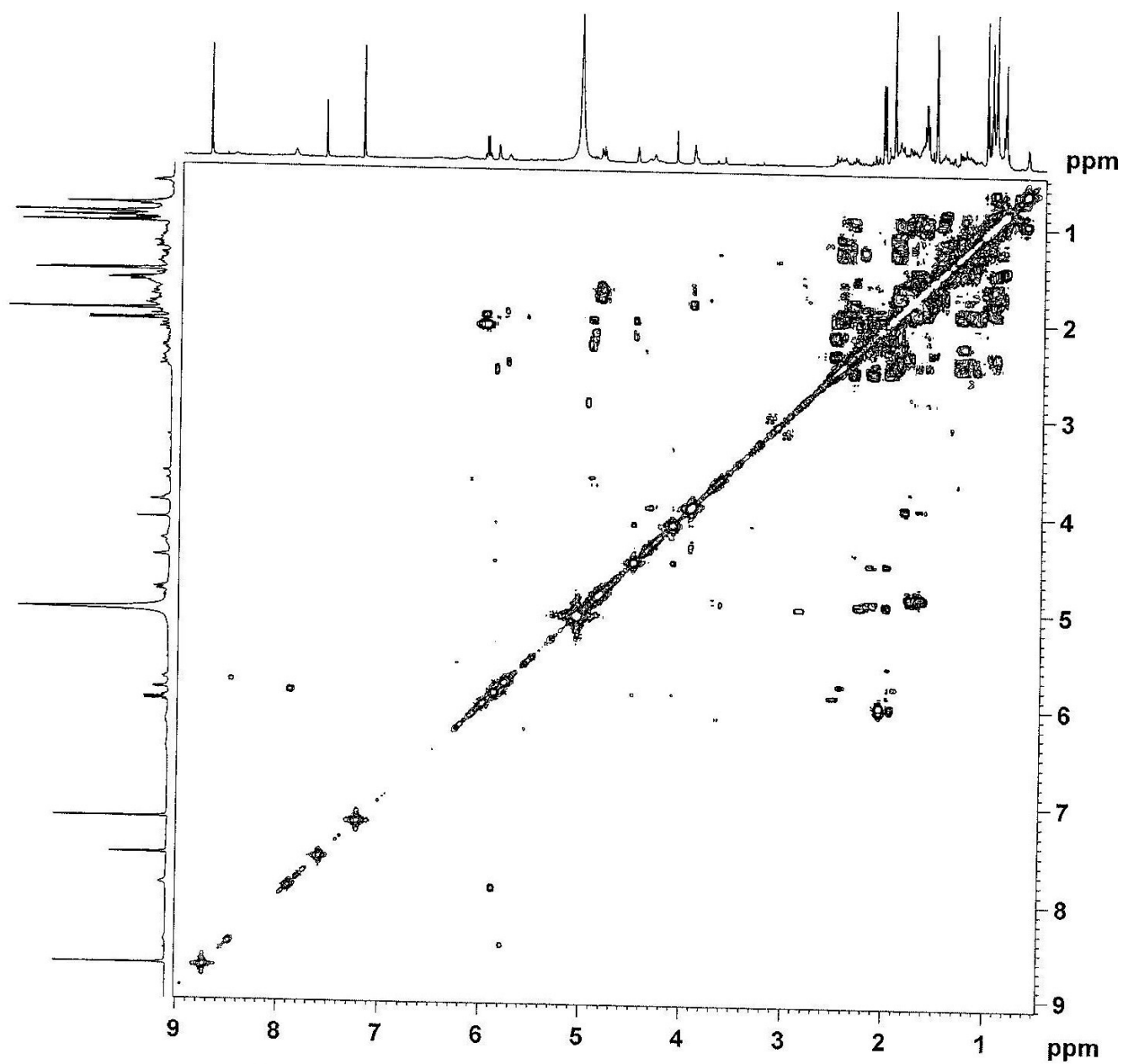


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

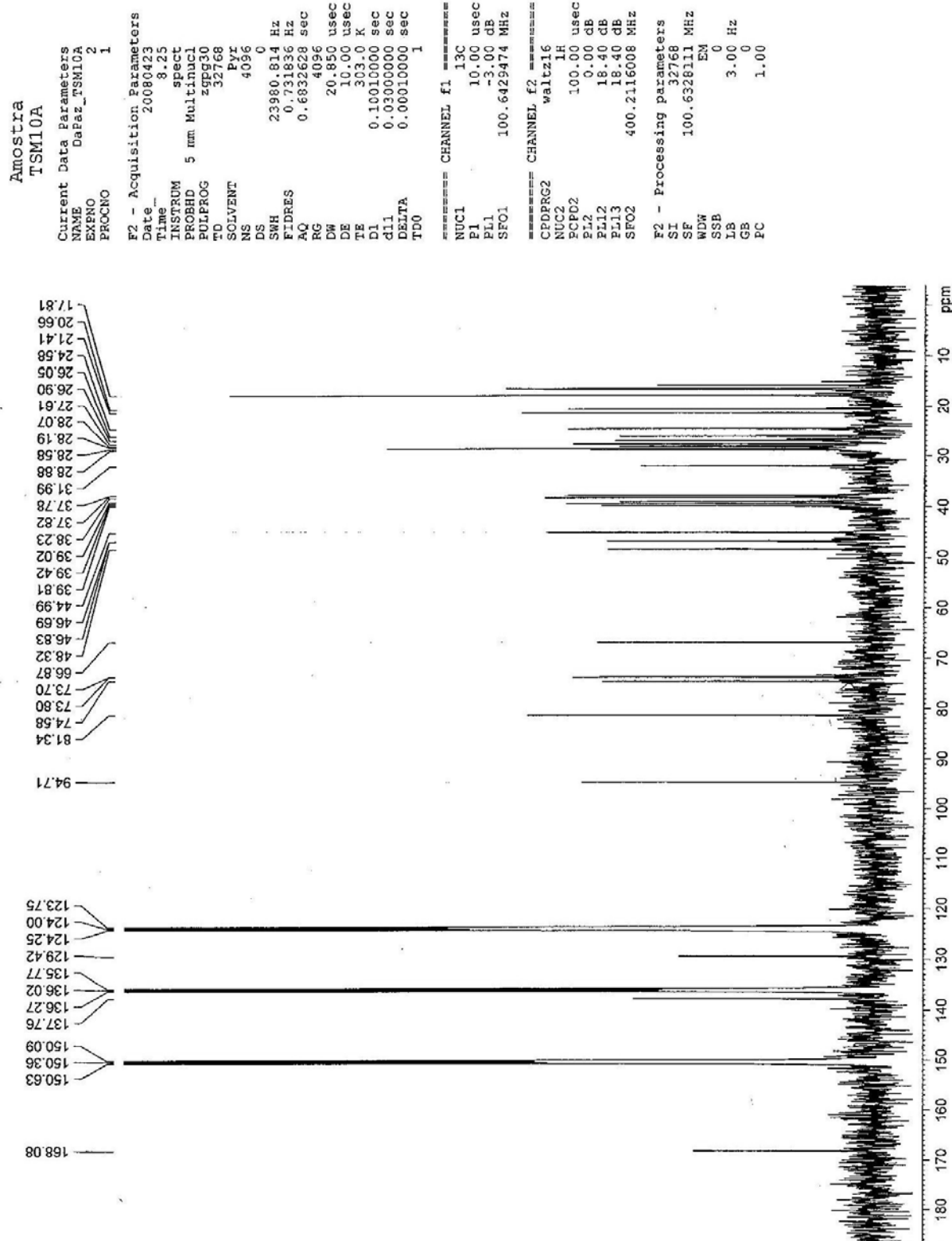


Figura 15a. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 4

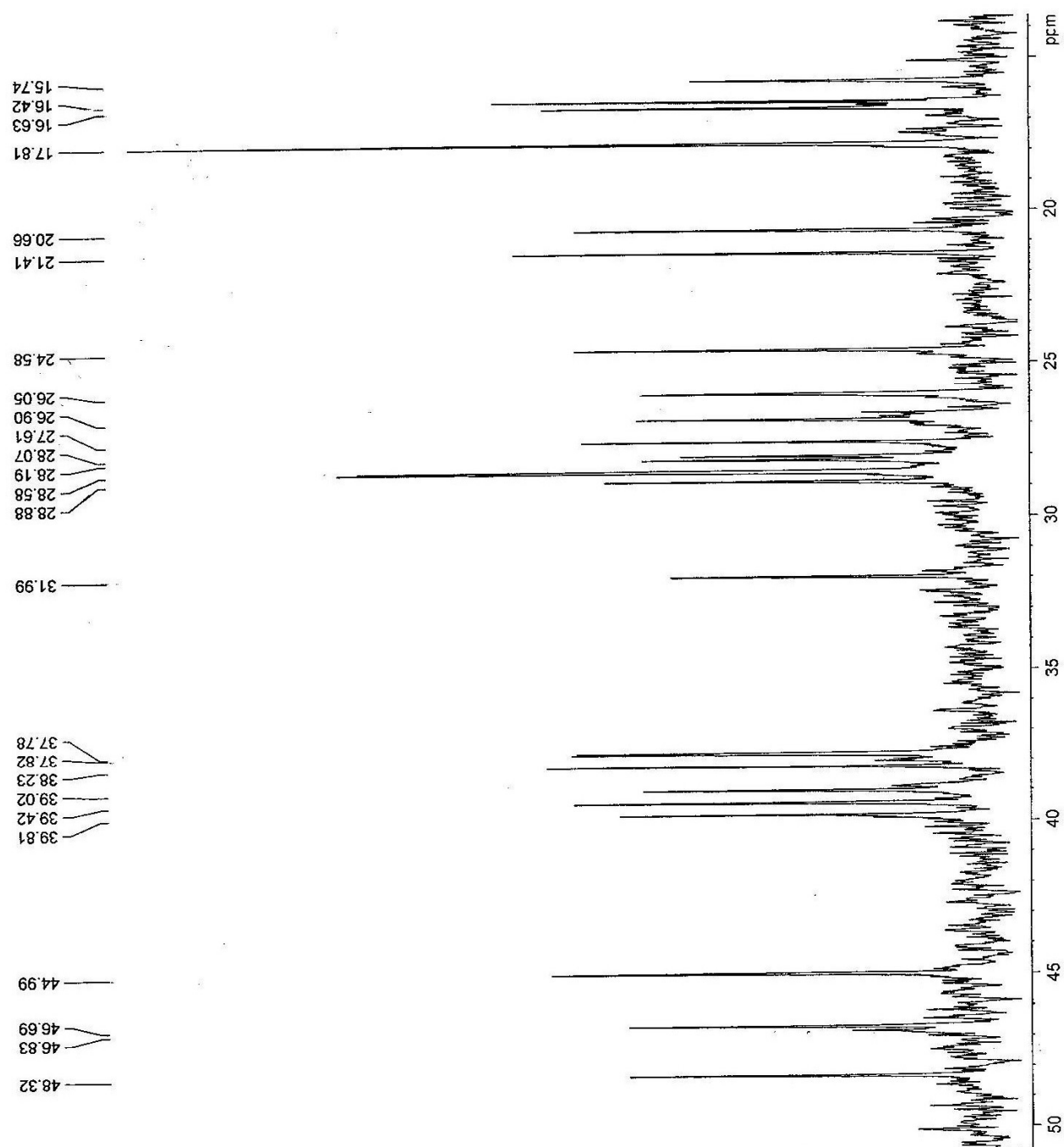


Figura 16. Espectro de HSQC da substância **4** (400/100 MHz, C₅D₅N)

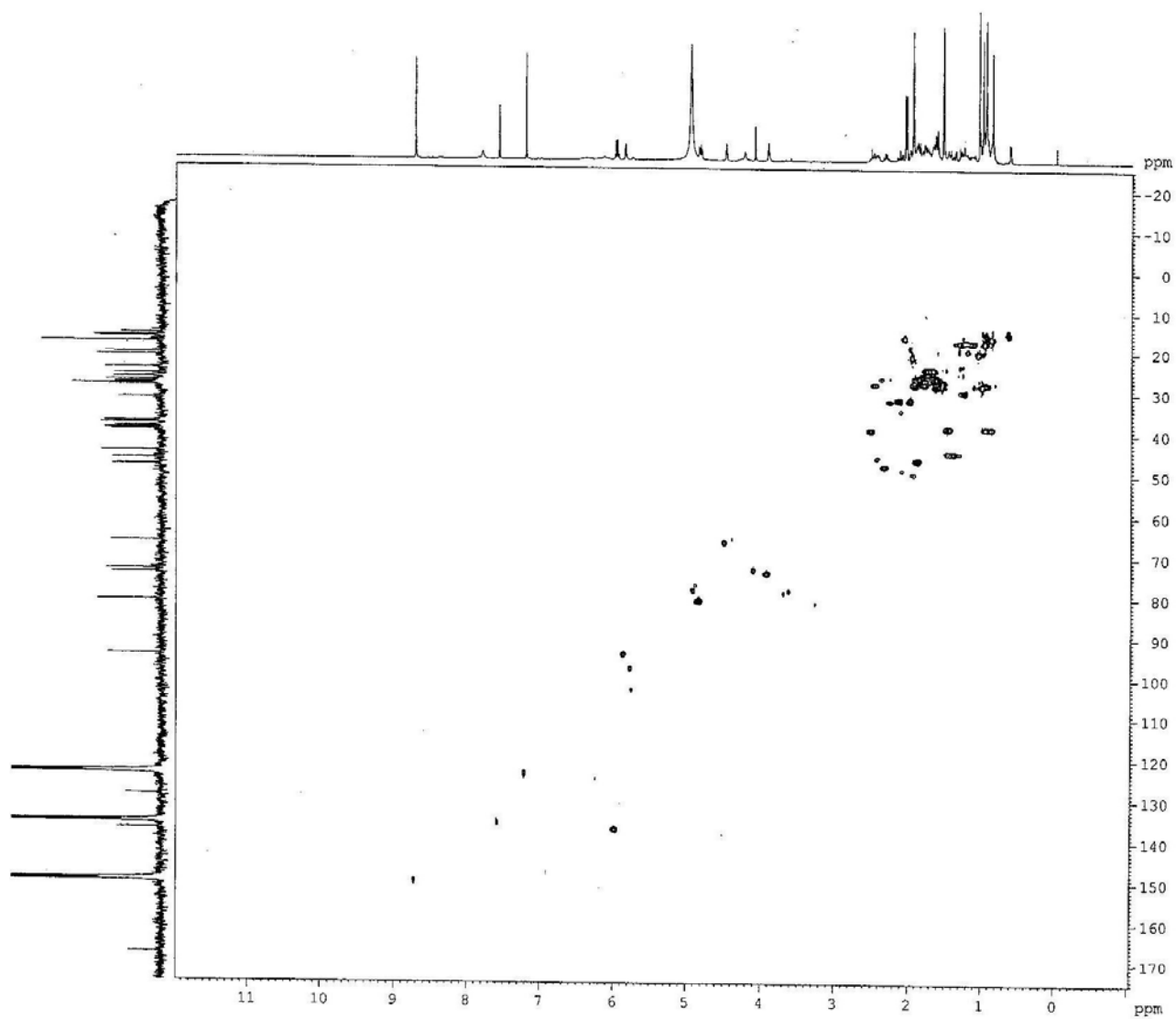


Figura 16a. Ampliação do espectro de HSQC da substância 4

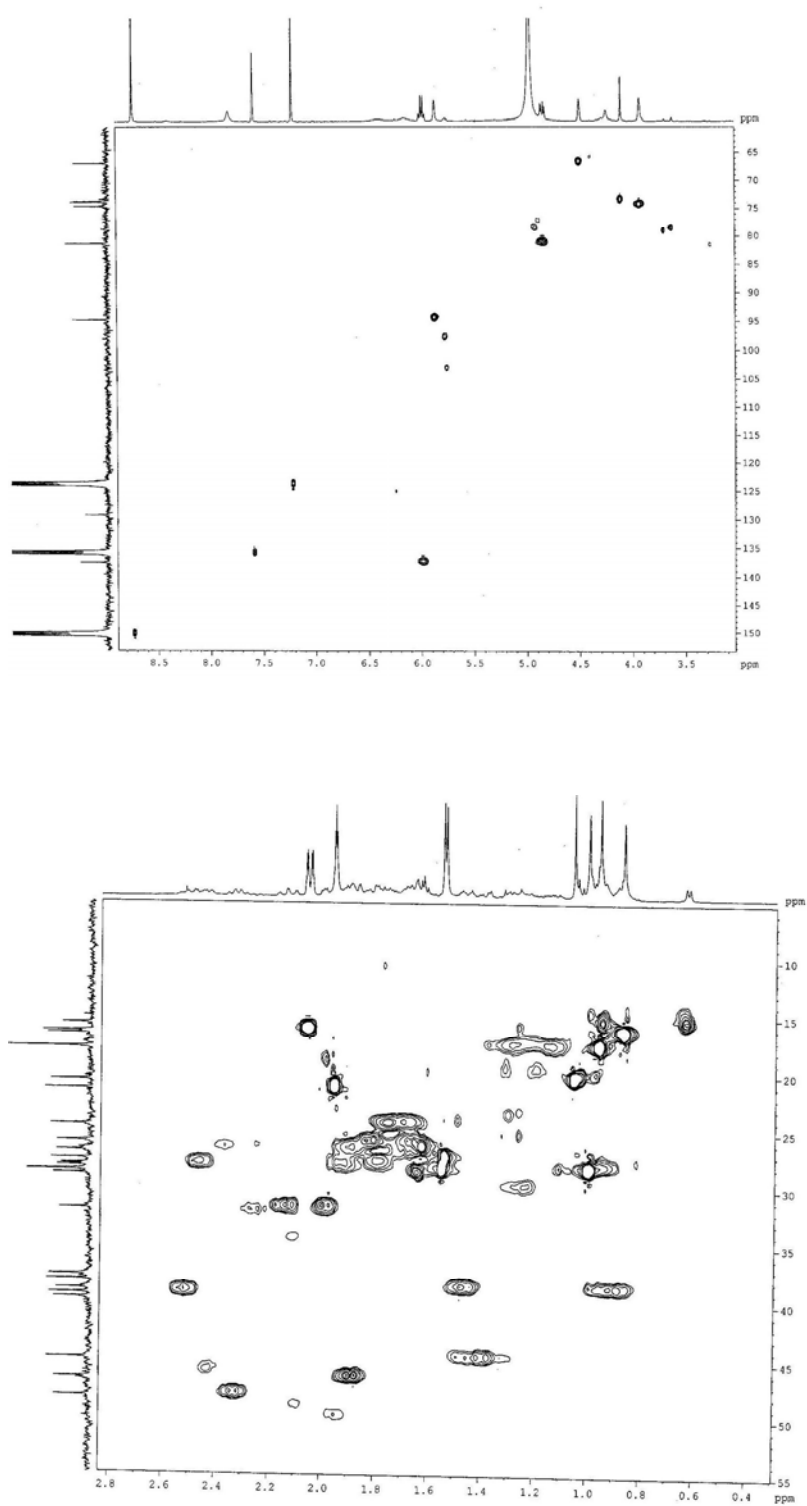


Figura 17. Espectro de HMBC da substância **4** (400/100 MHz, C₅D₅N)

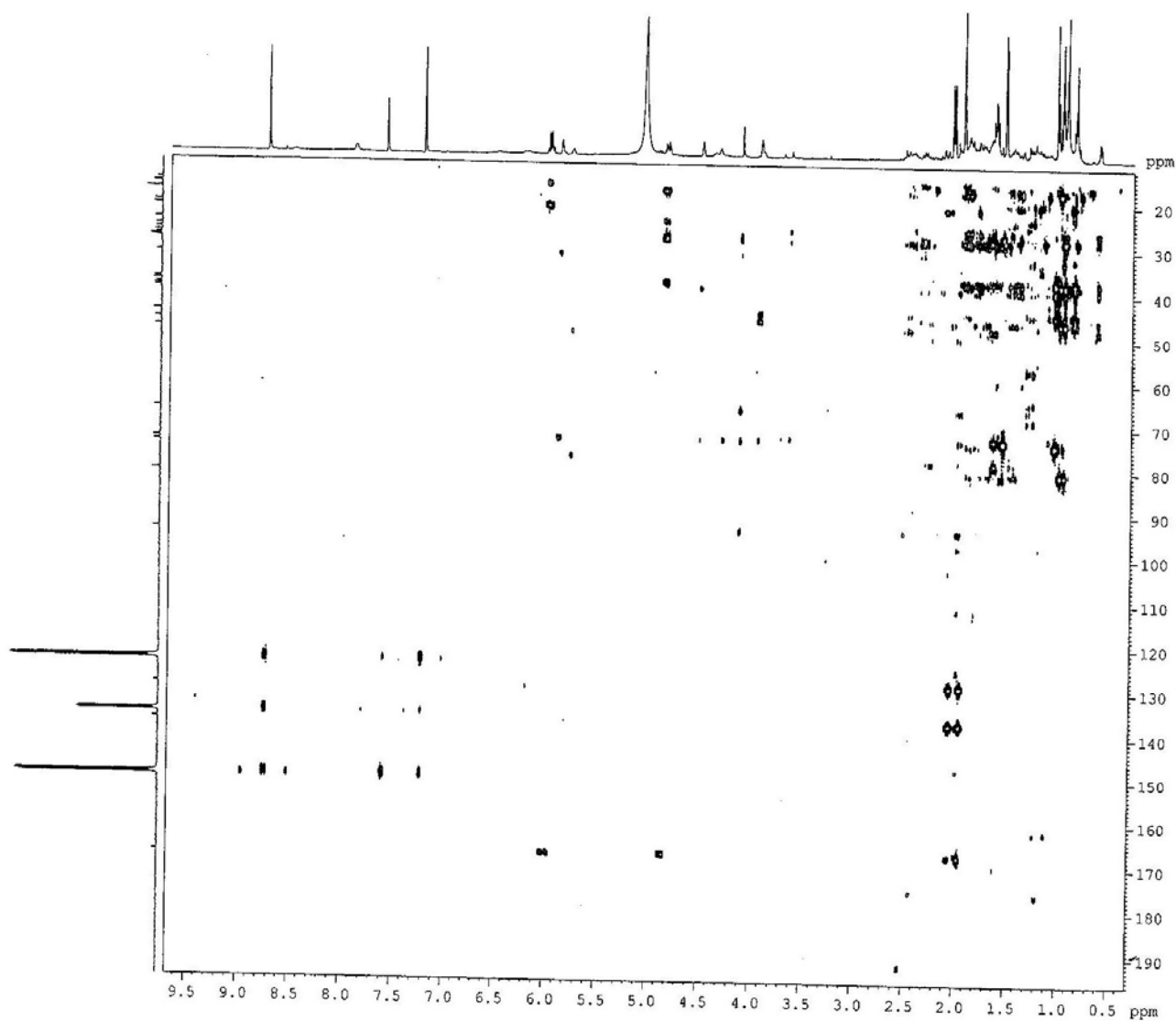
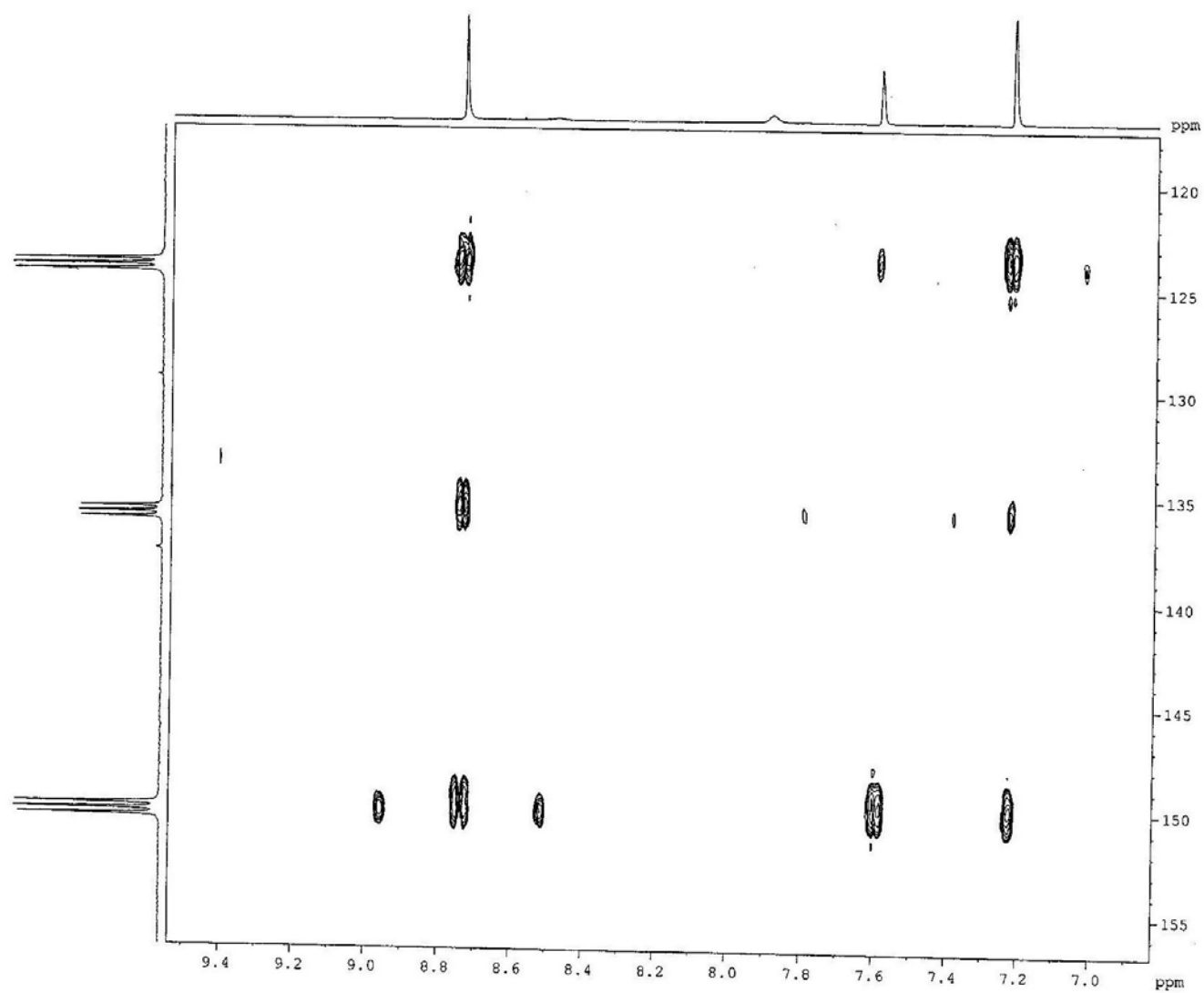


Figura 17a. Ampliação do espectro de HMBC da substância **4**



7. RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE II

7.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são substâncias capazes de reagir com os radicais livres e neutralizá-los, apresentando como efeitos benéficos o retardamento do processo de aterosclerose, a prevenção da obstrução das artérias e a redução do processo de morte celular em vários órgãos como o cérebro, rins, pulmões e pele (Huang et. al., 2005; Ramalho & Jorge, 2006). Uma das mais importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas com destaque aos flavonóides, no entanto outras classes de substâncias tem mostrado potencial no combate aos radicais livres. Alguns trabalhos tem mostrado os limonóides como nova fonte de antioxidantes, uma recente investigação mostrou a capacidade antioxidante de limonina, nomilina e limonina glucosilada isolados de *Citrus* (Rutaceae) (Manners, 2007; Sun et. al., 2005).

A avaliação de extrativos de plantas da Amazônia é importante na investigação do seu potencial biológico com intuito de descobrir novos sistemas antioxidantes naturais que possam vir a favorecer a vida do homem.

Os resultados da avaliação da capacidade de descoloração (% AA) das frações TSM-6, TSM-7 e TSM-9 nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/mL, determinada pelo ensaio do DPPH, estão apresentadas na tabela 14. As frações TSM-7 e TSM-9 foram as que apresentaram melhores resultados em 100 µg/mL. De acordo com os estudos fitoquímicos nestas frações predominam o limonóide identificado como desacetilspathelina (TSM-6.6).

Tabela 18. Percentual da capacidade de descoloração de TSM-6, TSM-7 e TSM-9

Fração	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
TSM-6	34	37	43
TSM-7	39	40	60
TSM-9	36	41	61
Rutina (padrão)	50	94	95

7.1.2. ENSAIO LARVICIDA EM *AEDES AEGYPTI*

No teste preliminar efetuado com a substância **2** (TSM-6.6A) em 200 µg/mL, observou-se 100% de mortalidade assim para a obtenção de faixas mais estreitas de respostas considerou-se a concentração inicial a de 150 µg/mL que também apresentou 100% de letalidade. Para a substância **4** (TSM-11.11.10A), a mortalidade de 100% foi observada em 100 e 25 µg/mL nos testes preliminares. Optou-se por iniciar os testes a partir da concentração 25 µg/mL.

Análise do percentual de mortalidade das duas substâncias testadas (tabela 19) permitiu verificar um grande potencial larvicida na substância **4** em relação à substância **2**. As concentrações letais para 50% das larvas de 3º instar de *A. aegypti* foram 4,8 µg/mL e 69,0µg/mL, respectivamente.

A literatura apresenta inúmeros registros de limonóides com atividade inseticida, mas poucos ensaios foram realizados com insetos pertencentes a ordem Diptera. Com relação aos ensaios com o mosquito *A. aegypti* (Diptera) a literatura registra ensaios com os limonóides calodendrolídeo, piroangolensolideo, harrisonina, pedonina, limonina e limonina diosfenol (figura 18). No entanto os limonóides degradados apresentaram melhor atividade biológica frente as larvas

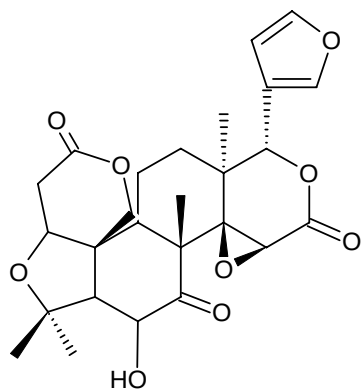
dos insetos, sendo o calodendrolídeo (com epóxido) com maior atividade (CL_{50} 13,2 $\mu\text{g/mL}$) que o piroangolensolideo (CL_{50} 16,6 $\mu\text{g/mL}$) (Kiprop et. al, 2005).

A harrisonina e a pedonina, ambos com anéis A e D modificados, com a presença de anel furano, epóxido em C-14,15 apresentaram atividade no combate as larvas de *Aedes aegypti*. A CL_{50} da harrisonina foi 28,1 $\mu\text{g/mL}$ e da pedonina 59,2 $\mu\text{g/mL}$. A maior atividade da harrisonina foi argumentada pelos autores devido a presença do anel A lactona de 7 membros também sugerem que a abertura do anel D influenciou na redução da atividade biológica.

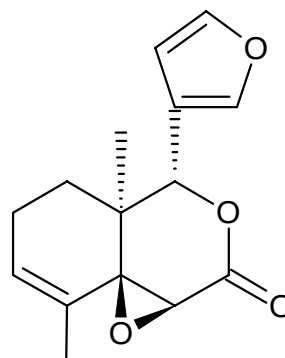
A atividade larvicida verificada na desacetilspathelina (TSM-6.6) foi $CL_{50}=69,0 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, embora esse limonóide apresente anel A de 7 membros foi inferior a harrisonina provavelmente a abertura deste anel tenha influenciado na atividade larvicida.

Quanto a atividade da substância **4** (TSM-10.11.11) isolada de *S. excelsa* não houve comparação com a literatura pois este parece ser o primeiro registro de ensaio de atividade larvicida em *Aedes aegypti* utilizando-se triterpeno do tipo glabretal.

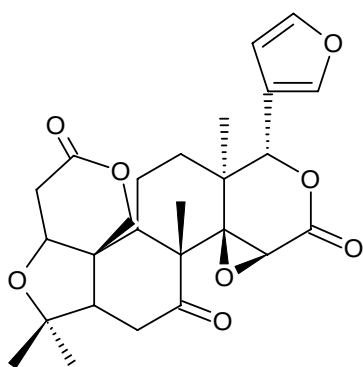
Figura 18. Limonóides com atividade larvica frente *Aedes aegypti*



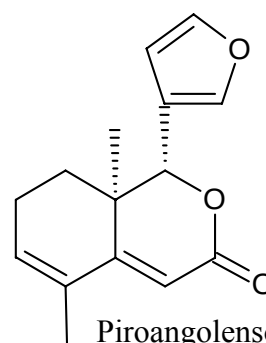
Limonina diosfenol



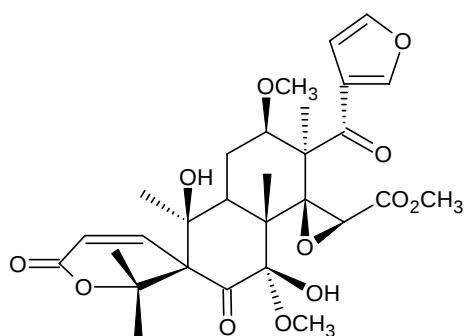
Calodendrolideo



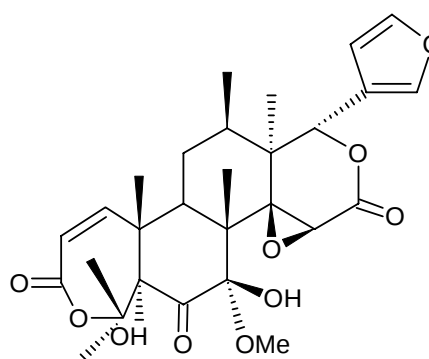
Limonina



Piroangolensolideo



Pedonina

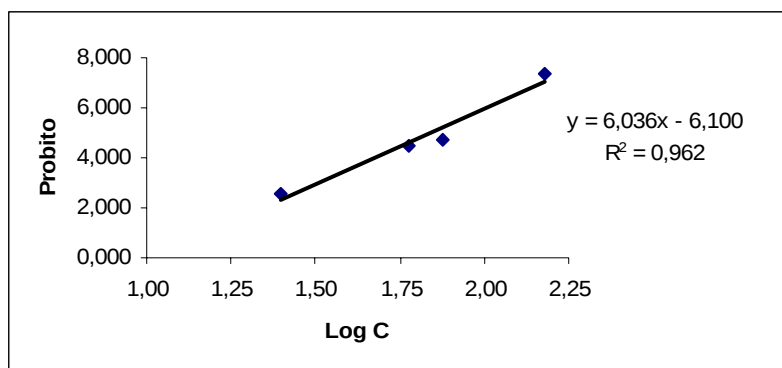


Harrisonina

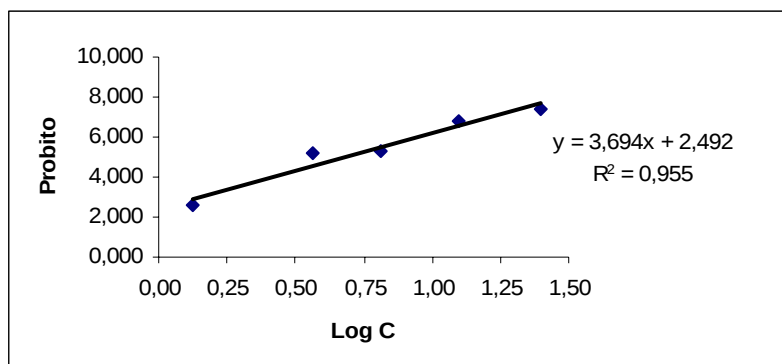
Tabela 19. Porcentagem de mortalidade das larvas de *A. aegypti*
frente as substâncias 2 e 4

Conc. (µg/mL)	2	4
150	100	
75	40	
60	30	
25	0	100
12,5		96
6,5		62
3,63		56
1,63		6

Gráfico 1. Cálculo da CL₅₀ pela regressão linear das concentrações da substância 2



$$CL_{50} = 69,0 \pm 1 \mu\text{g/mL}$$

Gráfico 2. Cálculo da CL₅₀ pela regressão linear das concentrações da substância 4

$$CL_{50} = 4,8 \pm 1 \mu\text{g/mL}$$

No ensaio realizado com insetos na fase adulta (hematófagos) o modo de ação da substância testada é por contato, ou seja, o tegumento do organismo alvo absorve o inseticida e em seguida ele morre. No decorrer do bioensaio foi observado que os insetos não morreram e portanto, o contato desses organismos com a substância não interferiu no seu metabolismo.

Quando o ensaio foi efetuado não ocorreu mudança no comportamento dos insetos que estavam confinados nos frascos de vidros, pois durante os tempos iniciais (30 min) o número de insetos vivos permaneceu constante.

8. CONCLUSÕES

O gênero *Spathelia*, subfamília Spathelioideae está representado no estado do Amazonas apenas por *S. excelsa* (Rutaceae) que apresenta hapaxantia, fenômeno raro em que a planta floresce e frutifica uma única vez e logo após morre. Nos estudos prévios com folhas e raízes desta espécie identificou-se entre outras substâncias, alcalóides e limonóides típicos da família Rutaceae. Estes dados foram importantes para a permanência do gênero nesta família, pois este já foi também posicionado em Simaroubaceae.

O presente estudo de investigação dos constituintes do caule de *S. excelsa* veio a contribuir com estudos realizados anteriormente em outras partes vegetativas, pois além da identificação dos esteróides, identificou-se metabólitos característicos de Rutaceae como o limonóide **2** (com anéis A e D modificados), o alcalóide derivado do ácido antranílico (**3**) além do triterpeno do tipo glabretal (**4**) o qual tem sido encontrado em espécies da ordem Rurales.

Apesar da ampla ocorrência dos derivados de flindersina na família Rutaceae, este é o primeiro registro do alcalóide **3** (7,8-dimetoxiflindersina) na literatura bem como do triterpeno glabretal **4**. Estas duas substâncias foram pela primeira vez submetidas a ensaios de atividade inseticida em *Aedes aegypti* detectando-se um excelente potencial larvicida no triterpeno **4** que apresentou CL₅₀ de 4,8 µg/mL, sugerindo portanto um promissor agente biológico no combate ao dengue.

Com relação a capacidade de descoloração utilizando o DPPH as frações testadas não apresentaram resultados satisfatórios, quando comparados a rutina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C. D., Taylor, D. R., Wagner, J. M., 1973. N-methylflindersine from *Spathelia sorbifolia*. *Phytochemistry*, 12 (6): 1359-1360.
- Albuquerque, B. W. P., 1976a. Revisão taxonômica das Rutaceae do Estado do Amazonas. Tese de Doutorado. In: LeCointe, P. 1947. Amazônia Brasileira III. Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimatadas). São Paulo, Brasil: Editora Nacional (2ªEd).
- Albuquerque, B. W. P., 1976b. Revisão taxonômica das Rutaceae do Estado do Amazonas. *Acta amazônica*, 6 (3): 1-67.
- Alford, A. R., Bentley, M. D., 1986. Citrus limonoids as potential antifeedants for the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 79 (1): 35-38.
- Arnason, J. T., Philogene, B. J. R., Donskov, N., Kubo, I., 1987. Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 43: 221-226.
- Ayafor, J. F., Sondengam, B. L., Ngadjui, B. T., 1982. Quinoline and indolopyridoquinazoline alkaloids from *Vepris lousii*. *Phytochemistry*, 21 (11): 2733-2736.
- Bentham, G. and Hooker, J. D., 1862. Genera plantarum, Reeve, Williams & Norgate, London, 1 (1): 195-213.
- Biavati, M. W., Vieira, P. C., Silva, M. F. G. F., Fernandes, J. B., Albuquerque, S., 2002. Triterpenoid constituents of *Raulinoa echinata*. *Journal of Natural Products*, 65: 562-565.
- Blumtritt, A., Silva, M. J., França, C. A., Silva, C. S. B., Silva, J. B. P., Shrivastava, R. M., Navarro, D. M. A. F., 2003. Estudo da atividade larvica de amidas derivadas de ácidos graxos frente às larvas do *Aedes aegypti*. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química .
- Box, V. G. and Taylor, D. R., 1973. Chromones from *S. glabrescens*. *Phytochemistry*, 12(4): 956.

- Brader, G., Bacher, M., Greger, H., Hofer, O., 1996. Pyranoquinolone and acridones from *Vepris bilocularis*. *Phytochemistry*, 42 (3): 881-884.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6): 2774-2779.
- Burke, B. A., Chan, W. R., Taylor, D. R., 1972. The structure and stereochemistry of spathelin, a new seco-ring A tetranortriterpenen from *Spathelia sorbifolia*. *Tetrahedron*, 28: 425-430.
- Campos, J., Andrade, C. F. S., 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 35 (3): 232-236.
- Champagne, D. E., Koul, O., Isman, M. B., Scudder, G. G., E., Towers, G. H. N., 1992. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31 (2): 377-394.
- Cantrell, C. L., Schrader, K. K., Mamonov, L. K., Sitpaeya, G. T., Kustoya, T. S., Dunbar, C., Wedge, D. E., 2005. Isolation and identification of antifungal and antialgal alkaloids from *Haplophyllum sieversii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20): 7741-7748.
- Connolly, J. D., 1983. Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae. In: Waterman, P.G., Grundon, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. London: Academic Press (eds), 175-213.
- Cowan, R. S., Brizick, G. K., 1960. Taxonomic relationship of “Diomma” Engler ex Harms. Mem. New York. Botanical Garden (separate), 10 (2): 58-64.
- Cepleanu, F., Hamburger, M. O., Sordat, B., Msonthi, J. D., Gupta, M. P., Saadou M., Hostettmann, K., 1994. Screenning of Tropical Medicinal plants for molluscicidal, larvicidal, fungicidal and citotoxic activities and brine shrimp toxicity. *International Journal of Pharmacognosy*, 32: 294-307.

- Dreyer, D. L., Harbone, J. B., 1983. Limonoids of the Rutaceae. *In*: Waterman, P. G., Grundon, M. F. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rurales. London: Academic Press, (eds), 301-317.
- Dewick, P. M., 2001. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Ltda. (2ª Ed.), 486 p.
- Diaz, M., Preiss, A., Meyer, H., Ripperger, H., 1983. 5-Methoxy-2,2,8-trimethyl-10-senecieryl-2H, 6H-benzol (1,2-b;5,4-b') dipyranyl-6-one from *Spathelia wrightii*. *Phytochemistry*, 22 (9): 2090-2092.
- Engler, A. Von Rutaceae, Simaroubaceae, Burseraceae. *In*: Engler A. Von & Prantl, K., 1931. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. (2ª Ed.), 19a, 187-456.
- Gadelha, D. P., Toda, A. T., 1985. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Malariologia de Doença Tropical*, 37: 29-36.
- Grayer, R. J., Kokubun, T., 2001. Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56 (3): 253-263.
- Gusman, M. G., 1988. Avances para la obtención de una vacuna contra el dengue. *Acta científica venezolana*, 49 (1): 38-45.
- Halstead, S. B., 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *In*: Gubler, D. J., Kuno, G. CAB International: New York (eds), 23- 44.
- Harding, W. W., Lewis, P. A., Jacobs, H., Mclean, S., Reynolds, W. F., Tay, L., Yang, J., 1995. Glabrescol. A unique squalene-derived penta-THF diol from *Spathelia glabrescens* (Rutaceae). *Tetrahedron Letters*, 36 (50):9137-9140.
- Harding, W. W., Simpson, D. S., Jacobs, H., McLean, S., Reynolds, W. F., 2001. A new squalene-derived epoxy tri-THF diol from *Spathelia glabrescens*. *Tetrahedron Letters*, 42: 7379-7381.

- Hassanali, A., Bently, M. D., Sitayo, E. N. O., Njoroge, P. E. W., Yatagai, M., 1986. Studies on limonoid insect antifeedants. *Insect Science and its Application*, 7 (4): 495-499.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45: 371-391.
- Hifnawya, M. S., Vaquettea, J., Sévenetc, T., Pousseta, L., Cavé, A., 1977. Produits neutres et alcaloides de *Myrtopsis macrocarpa*, *Myrtopsis myrtoidea*, *Myrtopsis novae-caledoniae* et *Myrtopsis selligii*. *Phytochemistry*, 16 (7): 1035-1039.
- Huang, D. and Prior, R. L., 2005. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Pereira, J., Sakariah, K. K., 1997. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. *Phytochemistry*, 44: 843-846.
- Kllna, G., 1995. Review af lhe raciais madulating dengue transmissian. *Epidemiologic Reviews*, 17 (2): 321-335.
- Kiprop, A. K., Rajab, M. S., Wanjala, F. M. E., 2005. Isolation and characterization of larvicidal components against mosquito larvae (*Aedes aegypti* Linn.) from *Calodendrum capense* Thunb. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 19 (1): 145-148.
- Koul, O., 1983. Feeding deterrence induced by plant limonoids in the larvae of *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 95: 166-171.
- Kubo, I., Klocke, J. A., 1981. Limonoids as insect control agents. In: Champagne, D. E., Koul, O., Isman, M. B., Scudder, G. G. E., Towers, G. H. N., 1992. Biological activity of limonoids from the. *Phytochemistry*, 31 (2): 377-394.

- Kubo, I. and Klocke, J. A., 1986. In: Green, M. B. and Hedin, P. A. Natural Resistance of Plants to Pests. Washington, DC (eds), ACS Symp. Ser. 296, p.206.
- Lima, M. P., Braga, P. A. C., Silva, M. F. G. F., Fernandes, J. B., Rodrigues-Filho, Vieira, P. C., 1999. Estudo fitoquímico do tronco de *Spathelia excelsa* (Rutaceae). In: 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de resumos, volume 2. Poços de Caldas - MG.
- Lima, M. P., 2000. Investigação fitoquímica e quimiosistemática de *Trattinickia burserifolia*, *Crepidosperrum rhoifolium*, *Trattinickia rhoifolia*, *Dacryodes* sp. (Burseraceae) e *Spathelia excelsa* (Rutaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP.
- Lima, M. P., Rosas, L. V., Silva, M. F. G. F., Ferreira, A. G., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., 2005. Alkaloids from *Spathelia excelsa*: their chemosystematic significance. *Phytochemistry*, 66 (13): 1560-1566.
- Maners, G. D., 2007. Citrus Limonoids: Analysis, bioactivity and biomedical prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8285-8294.
- Mester, I., 1983. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In: Waterman, P. G., Grundon, M. F. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. (Eds.). Londres: Academic Press, 31-90.
- Miller, S. L., Tinto, W. F., 1995. Isolation and characterization of a new glabretal triterpene from *Quassia multiflora*. *Journal of Natural Products*, 58 (10): 1640-1642.
- MOBOT (Missouri Botanical Garden's), www.mobot.org. Acessado em 20/06/07.
- Moreira, W. A. S., 2005. Estudos químicos e bioatividade de *Spathelia excelsa*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM.

Moraes, V. R. S., Tomazela, D. M., Ferracin, R. J., Garcia, C. F., Sannomiya, M., Soriano, M. P. C., Silva, M. F. G. F., Vieira P. C., Fernandes, J. B., Filho, E. R., Magalhães, E. G., Magalhães,

A. F., Pimenta, E. F., Souza, D. H. F., Oliva, G., 2003. Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline Alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (3): 380-387.

Muñoz, M., Torres, R., Bruce K. C., 1982. Aurapten and flindersine from *Zanthoxylum coco*. *Journal of Natural Products*, 45 (3): 367–369.

Murray, K. D., Hasegawa, S., Alford, A. R., 1999. Antifeedant activity of *Citrus* limonoids against Colorado potato beetle: comparison of aglycones and glucosides. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92: 331-334.

Newall, C. A., Anderson, L. A., Phillisson, J. D., 1998. Plantas Medicinais: guia para profissional de saúde. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 49-55.

OPS (Organização Panamericana de Saúde). Dengue y dengue hemorrágico en las Americas: guias para su prevención y control, 1995. Washington DC, nº 548.

Rahmani, M., ChewYean, L., Meon, S., Bebe, H., Aspollah, M. M. I., 2004. The antifungal activity of *Glycosmis calcicola* and *Glycosmis rupestris* extracts. *Pharmaceutical Biology*, 42 (6): 430-433.

Ramalho, V. C., Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química nova*, 29 (4): 755-760.

Reiter, P., Gubler, D. J., 1997. Surveillance and contrai of urban dengue vectors. *In*: Gubler D. I., Kuno, G., Dengue and dengue bemorrhagic level. New York: CAB International, 45-60.

Rodrigues, W. A., 1962. Árvore hapaxanta na flora amazônica. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Publicação nº 14, curso de Botânica.

- Ruberto, G., Renda, A., Tringali, C., Napoli, E. M., Simmonds, M. S., 2002. *Citrus* limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6766-6774.
- Sames, W. J., Bueno, Jr-R., Hayes, J., Olson, J. K., 1996. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12 (33): 487-490.
- Santiago, G. M. P., Viana, F. A., Pessoa, O. D. L., Santos, R. P., Pouliquen, Y. B. M., Arriaga, A. M. C., Andrade-Neto, M., Braz-Filho, R., 2005. Avaliação da atividade larvicida em saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.), Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15: 187-190.
- Simas, N. K., Lima, E. C., Conceição, S. R., Kuster, R. M., Oliveira-Filho, A. M., Lage, C. L. S., 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, 27 (1): 46-49.
- Storer, R., Young, D. W., Taylor, D. R., Warner, J. M., 1973. Isolation and synthesis of N-Methyl-4,7,8-trimethoxy-2-quinolone from *Spathelia sorbifolia*-L. *Tetrahedron Letters*, 29 (12): 1721-1723.

Sun, C., Chen, K., Chen, Y., Chen, Q., 2005. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chemistry*, 93 (4): 599-605.

Suwanborirux, K., Chang, C., Cassady, J. M., 1987. Novel chromones from *Spathelia sorbifolia*. *Journal of Natural Products*, 50 (1): 102-107.

Taylor, D. R., Warner, J. M., Writer, J.A., 1977. New chromones from *Spathelia sorbifolia* L. (Rutaceae); synthesis of the benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrone sorbifolin. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 1: 397-405.

Veiga-Júnior, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26 (3): 390-400.

Vieira, P. C., Lázaro, A. R., Fernandes, J. B., Silva, M. F. G. F., 1988. The chemosystematics of *Dictyoloma*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16 (6): 541-544.

Waterman, P. G., Grundon, M. F., 1983. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. (Eds.). Londres: Academic Press, 464 p.

Weissenberg, M., Klein, M., Meisner, J., Ascher, K. R. S., 1986. Larval growth inhibition of the spiny bollworm, *Earias insulana*, by some steroidal secondary plant compounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 42: 213-217.

Wu, T. S., Leu, Y. L., Chan, Y. Y., Wu, P. L., Kuoh, C. S., Wu, S. J., Wang, Y., 1997. Tetranortriterpenoid insect antifeedants from *Severinia buxifolia*. *Phytochemistry*, 45 (7): 1393-1398.

Yamasaki, R. B., Klocke, J. A., 1989. Structure-bioactivity relationships of salannin as antifeedant against the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37 (4): 1118-1124.