



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

E SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

SARA ALVES LUCENA MADEIRO

**Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas
espécies de Rutaceae da flora paraibana**

João Pessoa – PB

2016

SARA ALVES LUCENA MADEIRO

Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas espécies de Rutaceae da flora paraibana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa – PB

2016

M181c Madeiro, Sara Alves Lucena.
 Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de
 duas espécies de Rutaceae da flora paraibana / Sara Alves
 Lucena Madeiro.- João Pessoa, 2016.
 187f. : il.
 Orientador: Josean Fachine Tavares
 Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
 1. Produtos naturais. 2. Rutaceae. 3. *Metrodorea mollis*.
 4. *Pilocarpus spicatus*. 5. Validação. 6. Atividade
 antibacteriana.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

SARA ALVES LUCENA MADEIRO

**Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas
espécies de Rutaceae da flora paraibana**

Tese aprovada em 02/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Universidade Federal da Paraíba

(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Zucolotto Langassner

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

(Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Elisangela Afonso de Moura Mendonça

Universidade Federal da Paraíba

(Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Universidade Federal da Paraíba

(Examinador Interno)

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Universidade Federal da Paraíba

(Examinador Interno)

A minha mãe Maria Elizier Alves (in memorian), por ter me dedicado um amor infinito. Amor esse que permanece firme em minha memória e em meu coração por mais que a ausência tente me fazer esquecer. Ela sempre será o meu maior exemplo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da minha vida, por todas as bênçãos que recebi no decorrer da minha caminhada, por todo seu amor e misericórdia.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Josean Fechine Tavares** pela confiança, orientação e amizade. Muito obrigada por toda a atenção e por estar sempre presente.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Sobral** por todos os ensinamentos e ajuda.

Ao professor **Dr. Raimundo Braz Filho** pelo auxílio na elucidação do triterpeno inédito presente neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Pinto Siqueira Júnior** e a aluna **Nathalie Helen** pela ajuda na execução dos testes antimicrobianos.

À **Elisana Afonso** pela colaboração no estudo de validação e pela amizade construída ao longo deste ano.

Aos **Técnicos de laboratório**, pelos ensinamentos e por sua valiosa contribuição para elaboração deste trabalho.

Aos **Amigos da pós-graduação** e da **Turma de Doutorado 2012** pela companhia e amizade, por dividir seus conhecimentos, por todo auxílio e pela excelente convivência.

Ao aluno de Iniciação Científica, **Pedro Thiago**, pelo seu empenho e dedicação.

À **Prof^a. Dr^a. Luzineide Wanderley Tinoco**, do Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRJ, pela obtenção de alguns dos espectros de RMN.

Ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**, do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da USP-RP, pela obtenção do espectro de massas em alta resolução.

À minha mãe **Maria Elizier Alves** (*in memorian*) que, contra tudo e contra todos, me deu à vida. Agradeço por todas as privações em nome da minha formação. A você, o meu amor e a minha gratidão serão eternos.

À minha família, meu pai **João Glaudion**, minha madrastra **Francisca Devani**, meus irmãos **Marcos Antônio**, **Dandara** e **Glaudion Filho**, minha avó **Zenite Lucena** e meus tios e primos, pelo apoio e amor a mim dedicados.

Ao meu noivo **Wendell Martins**, pelo amor, compreensão, paciência, ajuda e por aceitar a minha ausência quando necessário.

Aos **Amigos** por todo apoio, confiança e incentivo. Sua presença, amizade e companheirismo tornam os meus dias mais leves e alegres.

Aos **Professores da Pós-graduação** pelos ensinamentos transmitidos.

À **Comissão Examinadora** pela disponibilidade e contribuição para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao **Programa Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**.

À **Universidade Federal da Paraíba**.

Ao **CNPq** e **CAPES** pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que acreditaram e me ajudaram nesta caminhada, o meu sincero e eterno MUITO OBRIGADA!

Sara Alves Lucena Madeiro

RESUMO

MADEIRO, S. A. L. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas espécies de Rutaceae da flora paraibana** 2016. 186p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Rutaceae é uma família, predominantemente tropical e subtropical, constituída por cerca de 160 gêneros, dentre eles os gêneros *Metrodorea* e *Pilocarpus*, que possuem importantes propriedades medicinais e ecológicas. Esta família também merece atenção por apresentar uma grande diversidade de metabólitos secundários. Diante disso, este trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento químico e biológico sobre a família Rutaceae através do estudo das espécies *Metrodorea mollis* Taub. e *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra. As partes aéreas das espécies em estudo foram submetidas a processos de extração, particionamento e isolamento dos seus constituintes químicos, que posteriormente foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, além de comparação com dados com a literatura. Do extrato hexânico de *M. mollis* foram isoladas as substâncias: xantotoxina, isopimpinellina, hinoquinina, savinina, lupeol e β -sitosterol. Da fase hexânica de *P. spicatus* foram identificadas: xantotoxina, bergapteno, imperatorina, asarinina, acetato de taraxerol e brazoxido A, sendo este último relatado pela primeira vez na literatura. As cumarinas xantotoxina e imperatorina foram selecionadas como marcadores químicos de *P. spicatus* e uma metodologia analítica foi desenvolvida e validada para quantificar, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, o teor das mesmas no Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *P. spicatus*. A metodologia proposta mostrou-se seletiva, linear, exata, precisa e robusta. Além disso, foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* do EEB de *P. spicatus* e das cumarinas isoladas (bergapteno, xantotoxina, isopimpinellina, imperatorina). O EEB e as cumarinas não apresentaram atividade antibacteriana relevante. Entretanto, no ensaio da modulação da resistência a drogas, a isopimpinellina reduziu em até 4 vezes a CIM da eritromicina, e a imperatorina apresentou o melhor resultado, com redução da CIM dos antibióticos tetraciclina (até 2 vezes), eritromicina (até 4 vezes) e norfloxacino (até 4 vezes). Ao reduzir a CIM do brometo de etídio, a imperatorina é considerada de fato como inibidor putativo do sistema de efluxo em bactéria. Os resultados obtidos no presente estudo se mostraram promissores, podendo estimular futuras pesquisas sobre o uso de produtos naturais.

Palavras-chave: Rutaceae, *Metrodorea mollis*, *Pilocarpus spicatus*, validação, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

MADEIRO, S. A. L. **Contribution to the phytochemical and biological knowledge of two species of Rutaceae of Paraíba flora** 2016. 186p. Thesis – Graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive. Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa.

Rutaceae is a family, mostly tropical and subtropical, comprising about 160 genera, including *Metrodorea* and *Pilocarpus*, having important medicinal and ecological properties. This family also requires attention for presenting a wide variety of secondary metabolites. This study aimed to expand the chemical and biological knowledge of the Rutaceae family by studying the species *Metrodorea mollis* Taub. and *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra. The aerial parts of the species were submitted to extraction processes, partitioning and isolation of their chemical constituents, which were then characterized by spectroscopic techniques of IR, MS and one- and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR, and compared to literature data. From the hexane extract of *M. mollis* were isolated the substances: xanthotoxin, isopimpinellin, hinokinin, savinin, lupeol and β -sitosterol. From the hexane phase of *P. spicatus* were identified: xanthotoxin, bergapten, imperatorin, asarinin, taraxerol acetate and brazoxido A, this last compound has been reported by the first time in the literature. The xanthotoxin and imperatorin coumarins were selected as chemical markers of *P. spicatus* and an analytical methodology was developed and validated to quantify by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) the content of them in the Crude Ethanolic Extract (CEE) of *P. spicatus*. The proposed methodology showed to be selective, linear, accurate, precise and robust. Furthermore, it was investigated the evaluation of the antibacterial activity by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the drug resistance modulator in *Staphylococcus aureus* of *P. spicatus* CEE and isolated coumarins (bergapten, xanthotoxin, isopimpinellin, imperatorin). The CEE and coumarins presented no significant antibacterial activity. However, in the drug resistance modulation assay, the isopimpinellin reduced up to 4 times the MIC of erythromycin, and imperatorin showed the best results, with a MIC reduction of the antibiotics tetracycline (up to 2-fold), erythromycin (up to 4-fold) and norfloxacin (up to 4 times). By reducing the MIC of ethidium bromide, imperatorin is considered in fact as a putative inhibitor of the efflux system in bacteria. The results obtained in this study were promising and may encourage further research on the use of natural products.

Keywords: Rutaceae, *Metrodorea mollis*, *Pilocarpus spicatus*, validation, antibacterial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angstroms
AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	<i>Attached Proton Test</i>
BrEt	Brometo de Etídio
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CHCl₃	Clorofórmio
CH₂Cl₂	Diclorometano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CV	Coeficiente de Variação
<i>d</i>	Dubleto
DBM	Departamento de Biologia Molecular
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio Padrão Relativo
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
g	Grama
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IES	Ionização por eletronspray

IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
kJ	quilojoule
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrila
MHz	Megahertz
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanômetro
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
q	quarteto
QPN	Química de Produtos Naturais
RE	Resolução
R_f	Fator de retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Triplete
td	Triplete de dubleto
tdd	Triplo duplo dubleto
Tr	Tempo de retenção
UNICAL	Unidade de Caracterização e Análise
δ	Deslocamento químico em ppm

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Obtenção dos extratos hexânico, diclorometano, acetato de etila e metanólico de <i>M. mollis</i>	52
Esquema 2- Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de <i>M. mollis</i>	55
Esquema 3- Obtenção e partição líquido-líquido do EEB de <i>P. spicatus</i>	56
Esquema 4- Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição geográfica da família Rutaceae no mundo, representada pelas áreas em verde.	29
Figura 2- Algumas substâncias isoladas de espécies da família Rutaceae.	30
Figura 3- Distribuição geográfica do Gênero <i>Metrodorea</i> no mundo, representada pelas áreas em verde.	32
Figura 4- <i>Metrodorea mollis</i> Taub.	35
Figura 5- Distribuição geográfica da espécie <i>Metrodorea mollis</i> no Brasil.	36
Figura 6- Distribuição geográfica do Gênero <i>Pilocarpus</i> no mundo, representada pelas áreas em verde.	37
Figura 7- Algumas substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Pilocarpus</i>	38
Figura 8- <i>Pilocarpus spicatus</i> subsp. <i>aracatensis</i> Kaastra.	39
Figura 9- Distribuição geográfica da espécie <i>Pilocarpus spicatus</i> no Brasil.	40
Figura 10- Substâncias isoladas de <i>Pilocarpus spicatus</i> (ANDRADE-NETO et al., 1994).	40
Figura 11- Cromatograma da fração 74-78 de C1 em 200 nm.	54
Figura 12- Cromatograma da fração 88-90 de C1 em 200 nm.	55
Figura 13- Estrutura química de <i>Mm-1</i> : lupeol.	69
Figura 14- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-1</i>	71
Figura 15- Espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-1</i>	71
Figura 16- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-1</i> na região de 59 -13 ppm.	72
Figura 17- Estrutura química de <i>Mm-2</i> : xantotoxina.	74
Figura 18- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Mm-2</i>	75
Figura 19- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-2</i>	76
Figura 20- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-2</i> na região de 7,9-6,3 ppm.	76
Figura 21- Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-2</i>	77
Figura 22- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-2</i>	77
Figura 23- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Mm-2</i> na região de (7,8-6,3 ppm) x (150-105 ppm).	78

Figura 24- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-2</i>	78
Figura 25- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-2</i> na região de (8,0-6,2 ppm) x (170-95 ppm).....	79
Figura 26- Estrutura química de <i>Mm-3</i> : isopimpinellina.	80
Figura 27- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Mm-3</i>	81
Figura 28- Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i>	82
Figura 29- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i> na região de 8,3-6,0 ppm.	82
Figura 30- Espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i>	83
Figura 31- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i>	83
Figura 32- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i> na região de (8,2-5,5 ppm) x (160-100 ppm).....	84
Figura 33- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i>	84
Figura 34- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-3</i> na região de (8,2-6,0 ppm) x (170-90 ppm).....	85
Figura 35- Estrutura química de <i>Mm-4</i> : β-sistosterol.....	86
Figura 36- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-4</i>	88
Figura 37- Espectro de RMN ¹³ C APT (50 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-4</i>	88
Figura 38- Estrutura química de <i>Mm-5</i> : (-) hinoquinina.	91
Figura 39- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Mm-5</i>	92
Figura 40- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i>	93
Figura 41- Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de 7,3-5,8 ppm.	93
Figura 42- Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de 4,3-1,9 ppm.	94
Figura 43- Espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i>	94
Figura 44- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i>	95
Figura 45- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de (7,1-5,6 ppm) x (135-85 ppm).....	95
Figura 46- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de (7,1-5,6 ppm) x (135-85 ppm).....	96
Figura 47- Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i>	96
Figura 48- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de (6,8-5,8 ppm) x (150-30 ppm).....	97

Figura 49- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de (3,9-2,2 ppm) x (75-30 ppm).....	97
Figura 50- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-5</i> na região de (4,4-1,5 ppm) x (190-100 ppm).....	98
Figura 51- Estrutura química de <i>Mm-6</i> : (-) savinina.	99
Figura 52- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Mm-6</i>	100
Figura 53- Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i>	101
Figura 54- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i> na região de 7,6-5,7 ppm.	101
Figura 55- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i> na região de 4,5-1,4 ppm.	102
Figura 56- Espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i>	102
Figura 57- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i>	103
Figura 58- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i> na região de (8,2-4,7 ppm) x (160-95 ppm).....	103
Figura 59- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i> na região de (5,8-2,2 ppm) x (80-28 ppm).....	104
Figura 60- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i>	104
Figura 61- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i> na região de (7,9-5,8 ppm) x (180-30 ppm).....	105
Figura 62- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Mm-6</i> na região de (4,3-2,4 ppm) x (180-40 ppm).....	105
Figura 63- Possibilidades de configurações relativas das lignanas do tipo furofurânicas.....	108
Figura 64- Estrutura química de <i>Ps-1</i> : (-) asarinina.....	108
Figura 65- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Ps-1</i>	109
Figura 66- Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i>	110
Figura 67- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i> na região de 7,1-5,7 ppm.	110
Figura 68- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i> na região de 4,9-2,7 ppm.	111
Figura 69- Espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i>	111
Figura 70- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i>	112

Figura 71- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i> na região de (7,7-5,5 ppm) x (95-135 ppm).....	112
Figura 72- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i> na região de (4,9-2,6 ppm) x (95-45 ppm).....	113
Figura 73- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i>	113
Figura 74- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i> na região de (7,2-4,0 ppm) x (160-80 ppm).....	114
Figura 75- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-1</i> na região de (5,6-2,4 ppm) x (35-95 ppm).....	114
Figura 76- Estrutura química de <i>Ps-2</i> : acetato de taraxerol.	115
Figura 77- Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-2</i>	117
Figura 78- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-2</i> na região de 5,9-4,1 ppm.	117
Figura 79- Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-2</i> na região de 2,2-0,6 ppm.	118
Figura 80- Espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-2</i>	118
Figura 81- Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-2</i> na região de 57-35 ppm.	119
Figura 82- Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-2</i> na região de 35-14 ppm.	119
Figura 83- Estrutura química de <i>Ps-3</i> : bergapteno.....	121
Figura 84- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Ps-3</i>	122
Figura 85- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i>	123
Figura 86- Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i> na região de 8,3-6,9 ppm.	123
Figura 87- Espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i>	124
Figura 88- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i>	124
Figura 89- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i> na região de (8,3-6,0 ppm) x (150-90 ppm).....	125
Figura 90- Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i>	125
Figura 91- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i> na região de (7,7-6,0 ppm) x (124-99 ppm).....	126
Figura 92- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de <i>Ps-3</i> na região de (8,2-6,0 ppm) x (167-144 ppm).....	126

Figura 93- Estrutura química de <i>Ps-4</i> : imperatorina.....	128
Figura 94- Espectro de massas em baixa resolução de <i>Ps-4</i>	129
Figura 95- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-4</i>	130
Figura 96- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-4</i> na região de 7,9-4,6 ppm.	130
Figura 97- Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-4</i>	131
Figura 98- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-4</i>	131
Figura 99- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-4</i> na região de (8,6-4,8 ppm) x (150-90 ppm).....	132
Figura 100- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-4</i> na região de (6,2-1,0 ppm) x (75-10 ppm).....	132
Figura 101- Estrutura química de <i>Ps-5</i> : xantotoxina.	133
Figura 102- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-5</i>	133
Figura 103- Estrutura química do triterpeno 3- <i>epi</i> -flindissol.	134
Figura 104- Estrutura química de <i>Ps-6</i> : 23 α ,21 α -21,23-diepoxi-tirucala-7,24-dieno (Brazoxido A).....	136
Figura 105- Modelagem molecular. As setas pretas indicam a distância em angstroms entre os hidrogénios H-3 e H-21: a) 3,04 Å e b) 3,03 Å. A menor geometria energia dos confórmeros: a) -3,468,111.12 kJ / mol e b) -3,468,119.71 calculado pelo DFT-B3LYP / 6,311 + G **.	136
Figura 106- Espectro de massas em alta resolução de <i>Ps-6</i>	138
Figura 107- Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>Ps-6</i>	138
Figura 108- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Ps-6</i>	139
Figura 109- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-6</i> na região de 5,7-3,1 ppm.	139
Figura 110- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-6</i> na região de 2,5-0,4 ppm.	140
Figura 111- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da acetilação <i>Ps-6</i>	140
Figura 112- Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps-6</i>	141
Figura 113- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Ps-6</i> na região de 148-92 ppm.	141
Figura 114- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Ps-6</i> na região de 83-42 ppm.	142

Figura 115- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Ps</i> -6 na região de 42-10 ppm.	142
Figura 116- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6.....	143
Figura 117- Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (6,1-3,1 ppm) x (140-50 ppm).....	143
Figura 118- Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (2,6-0,4 ppm) x (60-10 ppm).....	144
Figura 119- Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6.....	144
Figura 120- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (5,7-2,8 ppm) x (200-10 ppm).....	145
Figura 121- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (4,2-2,9 ppm) x (105-10 ppm).....	145
Figura 122- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (2,2-0,0 ppm) x (220-0 ppm).....	146
Figura 123- Espectro COSY (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6.....	146
Figura 124- Expansão do espectro COSY (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (5,7-0,0 ppm) x (6,0-0,0 ppm).....	147
Figura 125- Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6.....	147
Figura 126- Expansão do espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (7,0-0,0 ppm) x (6,5-0,0 ppm).....	148
Figura 127- Expansão do espectro NOESY (400, CDCl_3) de <i>Ps</i> -6 na região de (5,7-3,2 ppm) x (3,5-5,7 ppm).....	148
Figura 128- Cromatogramas do EEB de <i>P. spicatus</i> , obtidas durante o desenvolvimento do método.....	150
Figura 129- Análise da seletividade do método para xantotoxina e imperatorina. (A) Cromatograma do EEB de <i>P. spicatus</i> ; (B) Cromatograma dos marcadores.	151
Figura 130- Análise da seletividade do método para xantotoxina (à esquerda) e imperatorina (à direita). (A) Espectro de ultravioleta (B) Curva de pureza (peak purity) (C) Similaridade.....	152
Figura 131- Curva padrão da xantotoxina.	153
Figura 132- Curva padrão da imperatorina.	153
Figura 133- Gráficos dos resíduos dos dados de linearidade do marcador xantotoxina, obtidos a partir da curva média de calibração.....	154

Figura 134- Gráficos dos resíduos dos dados de linearidade do marcador imperatorina, obtidos a partir da curva média de calibração.	154
Figura 135- Cromatogramas da mistura dos padrões a 30 µg/mL. (A) amostra não submetida à degradação básica e (B) amostra submetida à degradação básica.	159
Figura 136- Estrutura química das cumarinas testadas.	162

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Espécies que compõe o gênero <i>Metrodorea</i>	31
Quadro 2- Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Metrodorea</i>	32
Quadro 3- Espécies que compõe o gênero <i>Pilocarpus</i>	36
Quadro 4- Evidências de produtos naturais com atividade antimicrobiana.	44
Quadro 5- Fracionamento cromatográfico sob CLMP do extrato hexânico de <i>M. mollis</i>	53
Quadro 6- Fracionamento cromatográfico da fração 44-46 do extrato hexânico de <i>M. mollis</i>	54
Quadro 7- Fracionamento cromatográfico sob CLMP da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	57
Quadro 8- Fracionamento cromatográfico da fração 7-11 da coluna da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	58
Quadro 9- Fracionamento cromatográfico da fração 14-22 da coluna da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	58
Quadro 10- Fracionamento cromatográfico da subfração 6-9 (fração 14-22) da coluna da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	59
Quadro 11- Fracionamento cromatográfico da subfração 14-16 (fração 14-22) da coluna da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	59
Quadro 12- Fracionamento cromatográfico da fração 34-36 da coluna da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	59
Quadro 13- Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método em CLAE-DAD.	62
Quadro 14- Parâmetros avaliados para a determinação da robustez do método.	64
Quadro 15- Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método em CLAE-DAD.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Mm-1</i> (200 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^1H e ^{13}C do lupeol (500 MHz, CDCl_3) (BURNS et al., 2000) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	70
Tabela 2- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Mm-2</i> (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da xantotoxina (400 MHz, CDCl_3) (CAI et al., 2012) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	75
Tabela 3- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Mm-3</i> (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da isopimpinellina (400 MHz, CDCl_3) (DINCEL et al., 2013) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	81
Tabela 4- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Mm-4</i> (200 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C do β -sitosterol (600 MHz, CDCl_3) (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).	87
Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Mm-5</i> (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da hinoquinina (200 MHz, CDCl_3) (FRANÇA et al., 2005) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	92
Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Mm-6</i> (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da savinina (400 MHz, CDCl_3) (TAKAKU et al., 2001) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	100
Tabela 7- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Ps-1</i> (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da asarinina (600 MHz, CDCl_3) (CAO et al., 2013) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).	109
Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Ps-2</i> (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C do acetato de taraxerol (300 MHz, CDCl_3) (ABD-ALLA et al., 2014) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).	116
Tabela 9- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Ps-3</i> (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da bergapteno (700 MHz, CDCl_3) (SANDOVAL-MONTEMAYOR et al., 2012) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).	122
Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Ps-4</i> (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da imperatorina (500 MHz, CDCl_3) (WEI; ITO, 2006) (δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	129

Tabela 11- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de <i>Ps-6</i> (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C do modelo 3- <i>epi</i> -flindissol (300 MHz, CDCl_3) (KAMPERDICK et al., 2003) (δ em ppm, J em Hz).	137
Tabela 12- Resultados da curva média de calibração dos marcadores xantotoxina e imperatorina.	153
Tabela 13- Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método na determinação do teor de xantotoxina no EEB de <i>P. spicatus</i>	155
Tabela 14- Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método na determinação do teor do marcador imperatorina no EEB de <i>P. spicatus</i>	155
Tabela 15- Precisão Intra-dia (repetibilidade) dos estudos por CLAE para as cumarinas xantotoxina e imperatorina no EEB de <i>P. spicatus</i>	156
Tabela 16- Precisão Inter-dia (precisão intermediária) dos estudos por CLAE para as cumarinas xantotoxina e imperatorina no EEB de <i>P. spicatus</i>	156
Tabela 17- Resultados da exatidão inter-dias para a xantotoxina e imperatorina.	157
Tabela 18- Avaliação da robustez do método.	158
Tabela 19- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEB de <i>P. spicatus</i> , das cumarinas e dos antibióticos em $\mu\text{g/mL}$ em cepas bacterianas da espécie <i>S. aureus</i> que superexpressam bombas de efluxo.	160
Tabela 20- Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos tetraciclina, eritromicina e norfloxacino na ausência e na presença de concentração subinibitória do EEB de <i>P. spicatus</i> , cumarinas e clorpromazina (controle positivo).	161
Tabela 21- Concentração inibitória mínima (CIM) do BrEt na presença e ausência da cumarina imperatorina frente a linhagem de <i>S. aureus</i> SA-1199B (NorA).	162

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	29
2.1. A Família Rutaceae	29
2.2. O Gênero <i>Metrodorea</i> Saint-Hilaire e a espécie <i>Metrodorea mollis</i> Taub.	31
2.3. O Gênero <i>Pilocarpus</i> e espécie <i>Pilocarpus spicatus</i> subsp. <i>aracatensis</i> Kaastra	36
2.4. Validação de métodos analíticos	41
2.5. Atividade antibacteriana de produtos naturais	43
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo Geral.....	47
3.2. Objetivos Específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Métodos Cromatográficos.....	49
4.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	50
4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	50
4.4. Espectrometria de Massas (EM).....	50
4.5. Ponto de Fusão	51
4.6. Modelagem molecular.....	51
4.7. Estudo Fitoquímico	51
4.7.1. Local da Pesquisa	51
4.7.2. Material botânico	51
4.7.3. Obtenção dos Extratos de <i>Metrodorea mollis</i>	52
3.7.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Metrodorea mollis</i> : Processamento cromatográfico do extrato hexânico	53

4.7.5. Obtenção e Particionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de <i>Pilocarpus spicatus</i>	56
4.7.6. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Pilocarpus spicatus</i> : Processamento cromatográfico da fase hexânica do EEB	57
4.8. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos marcadores no EEB de <i>Pilocarpus spicatus</i> por CLAE	60
4.8.1. Local da Pesquisa	60
4.8.2. Preparo das Amostras	60
4.8.2.1. Extrato	60
4.8.2.2. Marcadores.....	61
4.8.3. Desenvolvimento do Método Cromatográfico	61
4.8.4. Validação do método analítico	62
4.8.4.1. Seletividade	62
4.8.4.2. Linearidade	62
4.8.4.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	63
4.8.4.4. Precisão.....	63
4.8.4.5. Exatidão.....	63
4.8.4.6. Robustez.....	64
4.8.5. Degradação básica.....	64
4.8.6. Análise Estatística.....	65
4.9. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em <i>Staphylococcus aureus</i>	65
4.9.1. Local da Pesquisa	65
4.9.2. Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	65
4.9.3. Substâncias testadas.....	66
4.9.4. Avaliação da atividade antibacteriana.....	66
4.9.5. Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69

5.1. Substâncias Isoladas de <i>Metrodorea mollis</i>	69
5.1.1. Determinação estrutural de <i>Mm-1</i>	69
5.1.2. Determinação estrutural de <i>Mm-2</i>	72
5.1.3. Determinação estrutural de <i>Mm-3</i>	79
5.1.4. Determinação estrutural de <i>Mm-4</i>	85
5.1.5. Determinação estrutural de <i>Mm-5</i>	89
5.1.6. Determinação estrutural de <i>Mm-6</i>	98
5.2. Substâncias isoladas de <i>Pilocarpus spicatus</i>	106
5.2.1. Determinação estrutural de <i>Ps-1</i>	106
5.2.2. Determinação estrutural de <i>Ps-2</i>	115
5.2.3. Determinação estrutural de <i>Ps-3</i>	120
5.2.4. Determinação estrutural de <i>Ps-4</i>	127
5.2.5. Determinação estrutural de <i>Ps-5</i>	133
5.2.6. Determinação estrutural de <i>Ps-6</i>	134
5.3. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos marcadores no EEB de <i>Pilocarpus spicatus</i> por CLAE	149
5.3.1. Desenvolvimento do Método Cromatográfico	149
5.3.3. Linearidade	152
5.3.4. Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	155
5.3.5. Precisão	155
5.3.6. Exatidão	156
5.3.7. Robustez.....	157
5.3.8. Degradação básica	158
5.3.9. Quantificação dos marcadores xantotoxina e imperatorina no EEB de <i>Pilocarpus spicatus</i>	159
5.4. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em <i>Staphylococcus aureus</i>	159
5.4.1. Concentração inibitória mínima (CIM).....	159

5.4.2. Atividade moduladora da resistência a drogas	160
6. CONCLUSÕES	165
REFERÊNCIAS	167

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de melhorar as condições de vida na terra, o homem encontrou nas espécies vegetais importantes propriedades terapêuticas e, com isso, passou a utilizá-las no tratamento de diversas doenças, a partir da observação de que nas plantas existem substâncias que atuam na recuperação da saúde humana. O conhecimento das propriedades curativas destas plantas foi adquirido de forma totalmente empírica, e transmitido através do tempo, como a única forma de conhecimento disponível sobre as suas propriedades medicinais (SILVEIRA et al., 2009; SALVAGNINI et al., 2008).

Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é limitada, de modo que a medicina popular surge como uma solução alternativa para problemas de saúde, estando bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na América Latina, África e Ásia (TANGJITMAN et al., 2015; DUARTE, 2006).

Para sobreviver, as plantas produzem diversas substâncias, conhecidas como metabólitos secundários, que possuem muitas funções, como defesa contra herbívoros, parasitas e doenças. As atividades biológicas que as plantas medicinais apresentam, geralmente, são atribuídas a esses metabólitos (FERREIRA; PINTO, 2010; MCGAW; ELOFF, 2008).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, cabendo ao reino vegetal a maior parcela da diversidade química registrada na literatura (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). As plantas representam uma fonte de substâncias estruturalmente complexas, sendo, portanto, um alvo extremamente atraente para estudos químicos e farmacológicos (BUGER et al., 2014).

Além de serem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes farmacológicos, as plantas medicinais fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, como matéria-prima para a síntese de novos candidatos a fármaco (BRAZ FILHO, 2010).

As pesquisas com propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar fitoterápicos já existentes, vêm reassumindo papel importante nos últimos anos, e a Química de Produtos Naturais (QPN) vem atuando de forma bastante efetiva nesse cenário (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; FERREIRA; PINTO, 2010).

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com plantas medicinais, por ter a mais rica biodiversidade do planeta (NOLDIN et al., 2006). Nossas plantas são tidas como a principal fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, devido à relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável e, principalmente, pela biodiversidade (BRAZ FILHO, 2010).

Assim, percebendo todo o potencial químico e farmacológico da nossa flora, em especial da família Rutaceae, o presente trabalho apresenta um estudo das espécies *Metrodorea mollis* e *Pilocarpus spicatus*, cujos estudos químicos e farmacológicos ainda são pouco conhecidos.

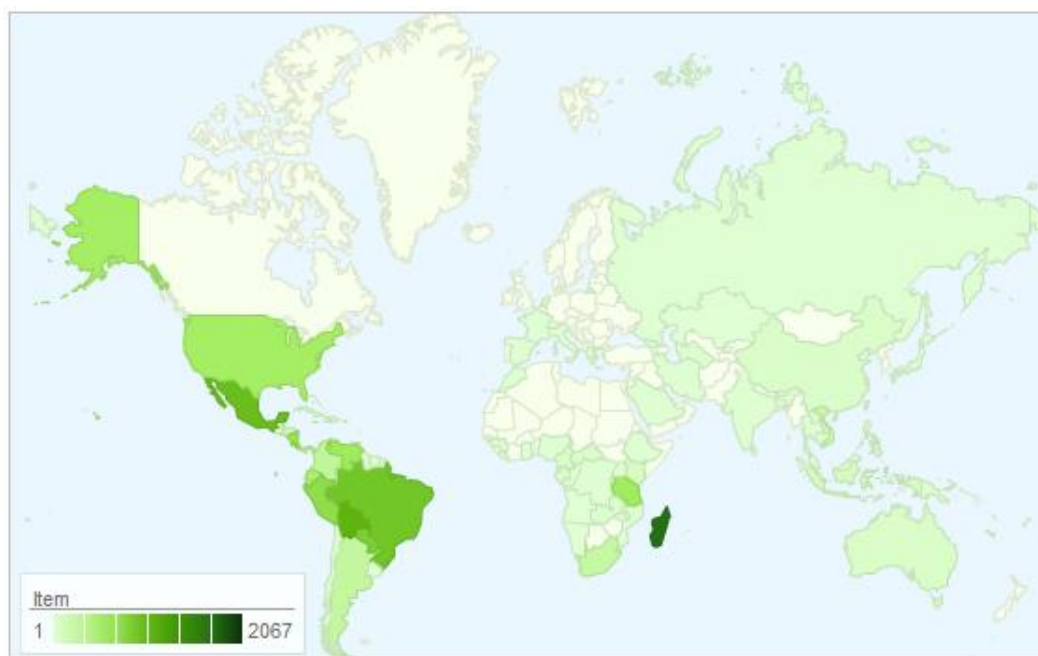
Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A Família Rutaceae

Rutaceae é uma família, predominantemente tropical e subtropical, constituída por cerca de 160 gêneros e 1.900 espécies com maior abundância na América Tropical e Sul da África (NOGUEIRA et al., 2014; GROPPPO et al., 2008; GROPPPO et al., 2012) (Figura 1). No que se refere ao Brasil, são descritos para esta família 33 gêneros (5 endêmicos) e 194 espécies (106 endêmicas) (PIRANI; GROPPPO, 2015).

Figura 1- Distribuição geográfica da família Rutaceae no mundo, representada pelas áreas em verde.



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2015.

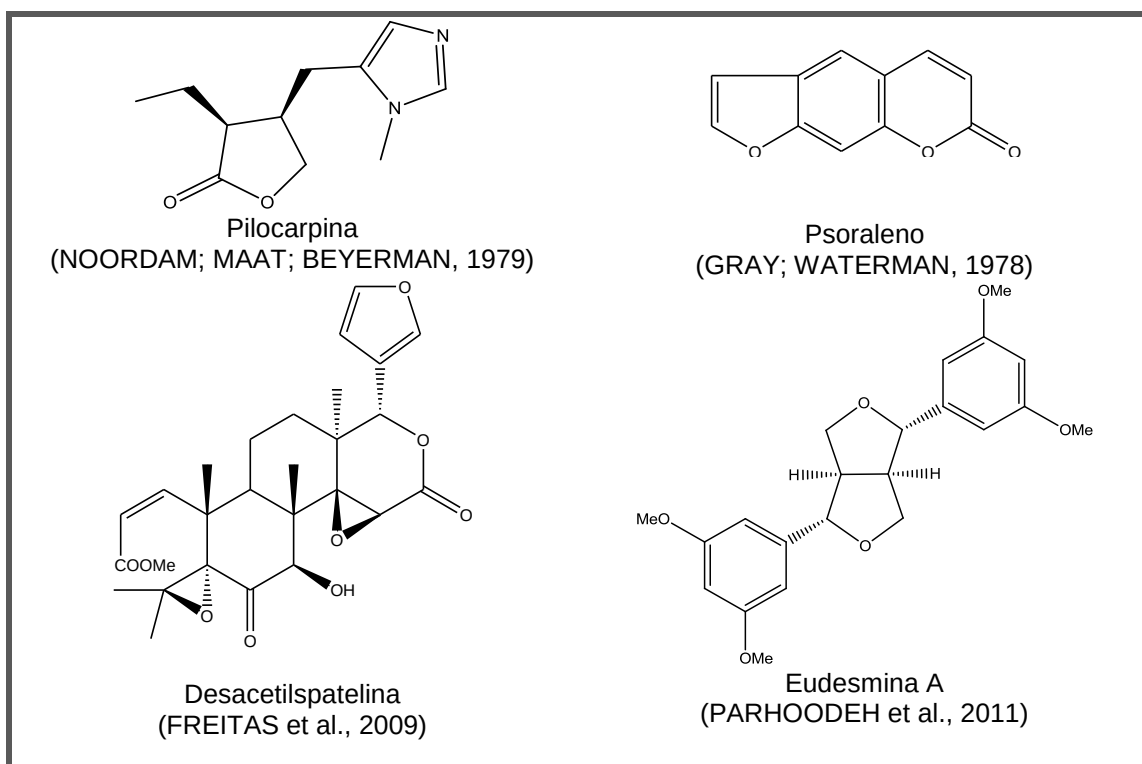
Muitos dos membros de Rutaceae possuem importância econômica e ecológica (JANUÁRIO et al., 2009). As espécies do gênero *Citrus* são conhecidas por apresentar uma grande variedade de frutos comestíveis (laranjas, limões, tangerinas, etc), além de fonte de óleos essenciais juntamente com espécies dos gêneros *Boronia* e *Ruta* (GROPPPO et al., 2012). Espécies dos gêneros *Zanthoxylum*, *Balfourodendron*, *Flindersia* e *Euxylophora* são bastante utilizadas na indústria madeireira, já as espécies dos gêneros *Boronia*, *Ravenia*, *Choisya*, *Correa*, *Murraya*, *Triphasia*, entre outras, são

utilizadas como ornamentais em várias partes do mundo (CHASE; MORTON; KALLUNK, 1999; GROPPPO et al., 2012; PIRANI, 1999).

Além das importâncias acima mencionadas, sua relevância se dá também devido a representantes de valor medicinal, tendo como exemplo espécies do gênero *Pilocarpus*, fonte de pilocarpina (alcaloide utilizado no tratamento de glaucoma) e a espécie *Ruta graveolens*, fonte de rutina (flavonoide antiespasmódico) (ABREU et al., 2005; YILDIZOGLU-ARI et al., 1991).

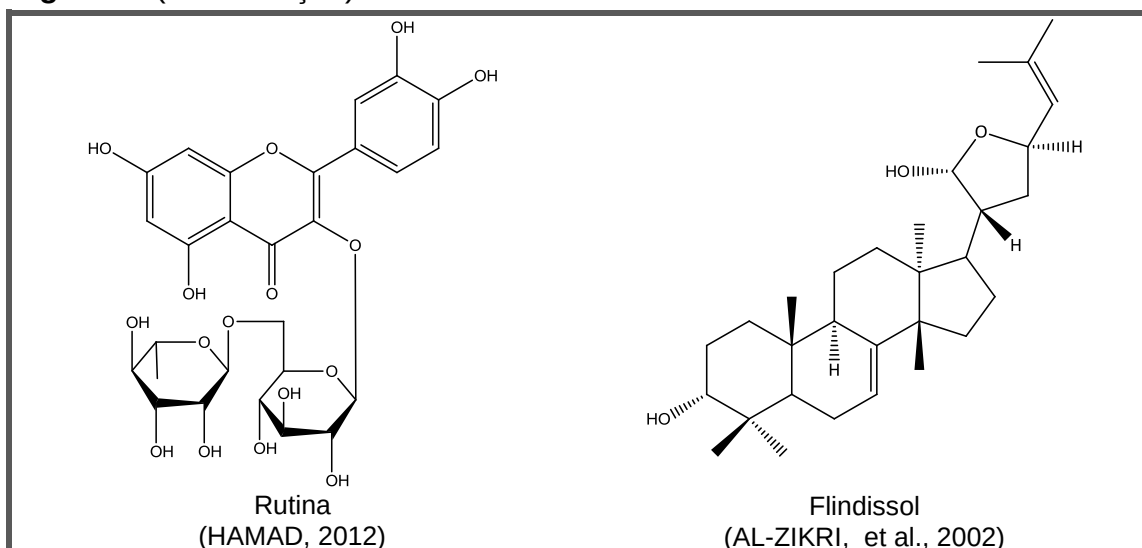
Esta família também merece atenção por apresentar uma grande diversidade de metabólitos secundários, tendo destaque as classes dos alcaloides, cumarinas, lignanas, terpenos, flavonoides e limonoides (SAWAYA et al, 2011, COSTA et al., 2010) (Figura 2). Dessa forma, considerando esta vasta variedade de metabólitos, Rutaceae é tida como uma das famílias mais versáteis em termos de produtos naturais, o que acaba por fornecer substâncias com diversas atividades biológicas (GROPPPO, 2008).

Figura 2- Algumas substâncias isoladas de espécies da família Rutaceae.



Continua...

Figura 2- (Continuação).



2.2. O Gênero *Metrodorea* Saint-Hilaire e a espécie *Metrodorea mollis* Taub.

O gênero *Metrodorea* Saint-Hilaire é um dos quatro gêneros que formam a subtribo neotropical Pilocarpinae, tribo Cusparieae, subfamília Rutoideae e família Rutaceae (BAETAS et al., 1996; MARTINS; TEIXEIRA; GROppo, 2008; DIAS; UDULUTSCH; PIRANI, 2013). Com ocorrência apenas na América do Sul, esse gênero é composto por seis espécies e possui sua diversidade concentrada no Brasil, onde todas as espécies são encontradas (Quadro 1) (Figura 03) (PIRANI, 2015a; CRUZ et al., 2015). Das seis espécies descritas, cinco são endêmicas e apenas *M. flavida* é encontrado fora do território brasileiro (PIRANI, 2015a; SANTOS et al., 2011).

Quadro 1- Espécies que compõe o gênero *Metrodorea*.

Espécies do gênero <i>Metrodorea</i>
<i>Metrodorea concinna</i> Pirani & P. Dias
<i>Metrodorea flavida</i> K. Krause
<i>Metrodorea maracasana</i> Kaastra
<i>Metrodorea mollis</i> Taub.
<i>Metrodorea nigra</i> A. St.-Hil.
<i>Metrodorea stipularis</i> Mart.

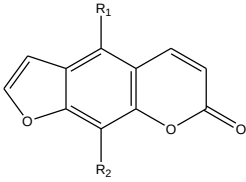
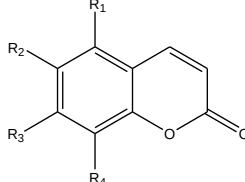
Figura 3- Distribuição geográfica do Gênero *Metrodorea* no mundo, representada pelas áreas em verde.



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2015.

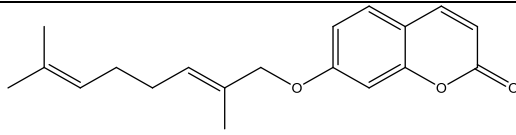
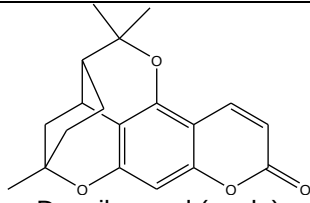
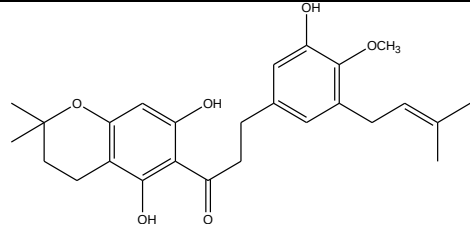
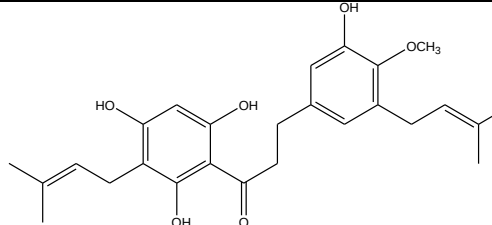
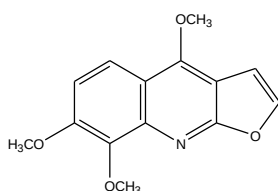
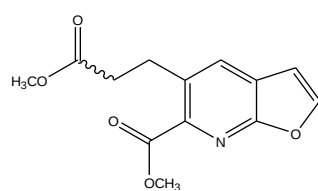
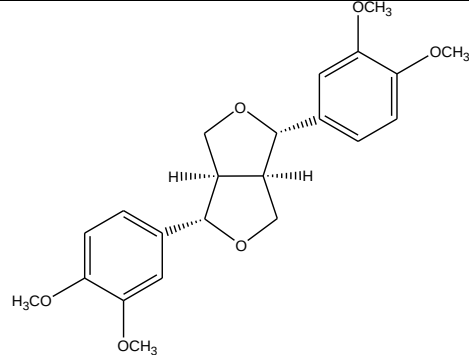
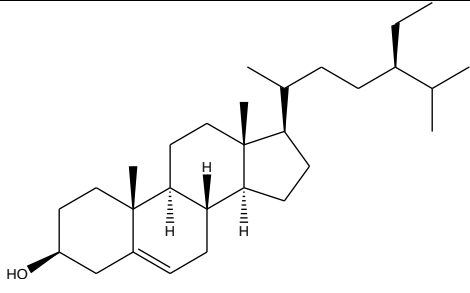
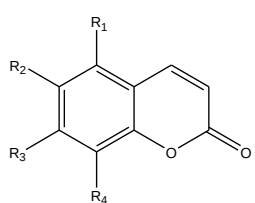
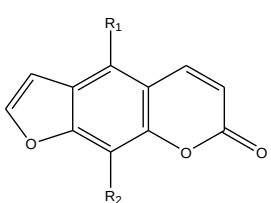
Em estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero foram relatados a presença de cumarinas, dihidrochalconas, alcaloides, lignanas e esteroides (Quadro 2) (BAETAS et al., 1999; BAETAS et al., 1996).

Quadro 2- Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Metrodorea*.

<i>Metrodorea nigra</i> (MÜLLER et al., 1995)				
				
	R₁	R₂	R₁	R₂
1	H	OCH ₃	1	OCH ₃
2	OCH ₃	H	2	H
3	OCH ₃	OCH ₃	3	H
4	H	OCH ₂ CH=(CH ₃) ₂	4	OCH ₃
5	OCH ₂ CH=(CH ₃) ₂	H		OCH ₃
6	OCH ₂ CH(OH)C=(CH ₂)(CH ₃)	H		H
Xantotoxina (1) (caule e folhas) Bergapteno (2) (caule e folhas) Isopimpineline (3) (caule e folhas) Imperatorina (4) (caule) Isoimperatorina (5) (folhas) Isogosferol (6) (caule)		Limitina (1) (caule e folhas) Umbeliferona (2) (caule) 8-metoxilimetina (3) (caule e folhas) Scopoletina (4) (caule)		

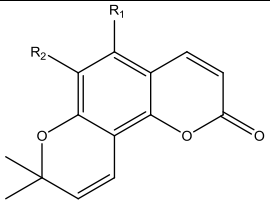
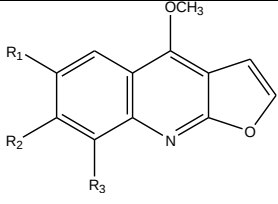
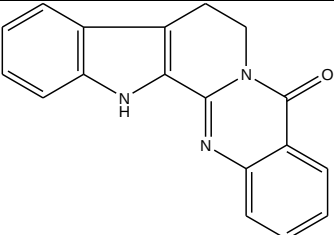
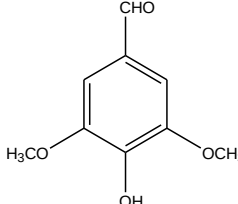
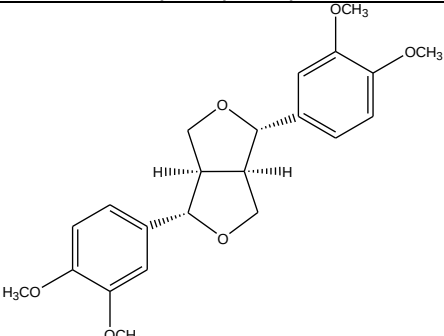
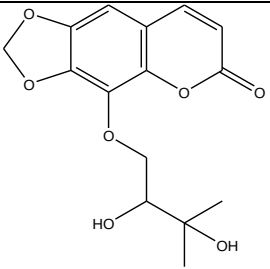
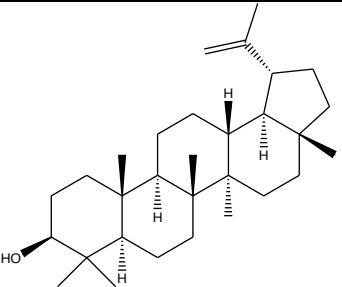
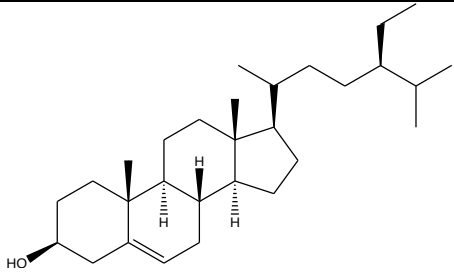
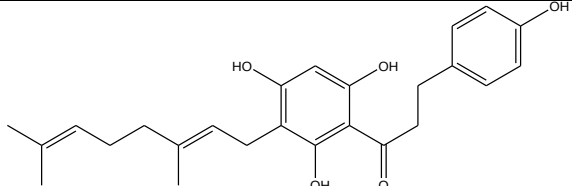
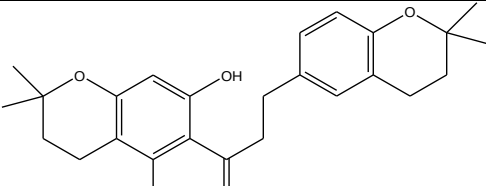
Continua...

Quadro 2- (Continuação).

																																																	
Aurapteno (caule e folhas)	Deoxibruceol (caule)																																																
																																																	
2',3,6'-triidroxi-4-metoxi-5-(3,3-dimetilalil)-3',4'-(2'',2''-dimetilidropirano)-dihidrochalcona (fruto)	2',3',4',6'-tetrahidroxi-4-metoxi-3'5-di-(3,3-dimetilalil)-dihidrochalcona (fruto)																																																
																																																	
Skimmianina (caule e folhas)	Roifolinato de dimetila (caule)																																																
																																																	
Eudesmina (folhas)	β-sitosterol (caule e folhas)																																																
Metrodorea flavida (BAETAS et al., 1996; BAETAS et al., 1999; PERNIN et al., 1999)																																																	
																																																	
<table><tr><td></td><td>R₁</td><td>R₂</td><td>R₃</td><td>R₄</td></tr><tr><td>1</td><td>OCH₂O</td><td>OCH₂O</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>2</td><td>H</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td><td>H</td></tr><tr><td>3</td><td>H</td><td>OCH₂O</td><td>OCH₂O</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>4</td><td>OCH₃</td><td>H</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>5</td><td>OCH₃</td><td>OCH₂O</td><td>OCH₂O</td><td>OCH₃</td></tr></table>		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	1	OCH ₂ O	OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃	2	H	OCH ₃	OCH ₃	H	3	H	OCH ₂ O	OCH ₂ O	OCH ₃	4	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	5	OCH ₃	OCH ₂ O	OCH ₂ O	OCH ₃	<table><tr><td></td><td>R₁</td><td>R₂</td></tr><tr><td>1</td><td>H</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>2</td><td>OCH₃</td><td>H</td></tr><tr><td>3</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>4</td><td>H</td><td>OCH₂CH=(CH₃)₂</td></tr><tr><td>5</td><td>H</td><td>OCH₂CH(OH)C(CH₃)₂(OH)</td></tr></table>		R ₁	R ₂	1	H	OCH ₃	2	OCH ₃	H	3	OCH ₃	OCH ₃	4	H	OCH ₂ CH=(CH ₃) ₂	5	H	OCH ₂ CH(OH)C(CH ₃) ₂ (OH)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄																																													
1	OCH ₂ O	OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃																																													
2	H	OCH ₃	OCH ₃	H																																													
3	H	OCH ₂ O	OCH ₂ O	OCH ₃																																													
4	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃																																													
5	OCH ₃	OCH ₂ O	OCH ₂ O	OCH ₃																																													
	R ₁	R ₂																																															
1	H	OCH ₃																																															
2	OCH ₃	H																																															
3	OCH ₃	OCH ₃																																															
4	H	OCH ₂ CH=(CH ₃) ₂																																															
5	H	OCH ₂ CH(OH)C(CH ₃) ₂ (OH)																																															
5,6-metilenedioxi-7,8-dimetoxicumarina (1) (caule) Escoparona (2) (caule) 6,7-metilenodioxi-8-metoxicumarina (3) (caule) 5,7,8-trimetoxicumarina (4) (raízes) Sabandina (5) (raízes)	Xantotoxina (1) (caule, folhas e raízes) Bergapteno (2) (folhas) Isopimpinellina (3) (caule e raízes) Imperatorina (4) (caule e raízes) Heraclenol (5) (folhas)																																																

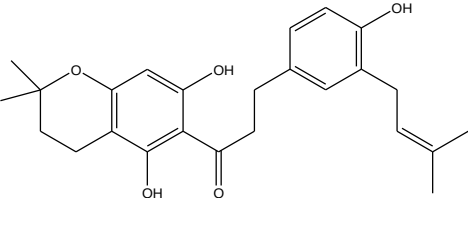
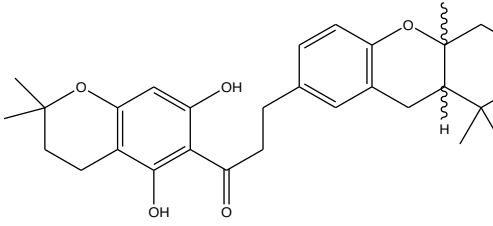
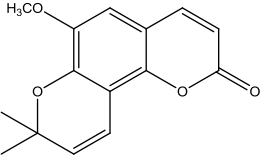
Continua...

Quadro 2- (Continuação).

 R₁ R₂ 1 H OCH₃ 2 OH H Brailina (1) (caule e raízes) 5-hidroxiseselina (2) (raízes)	 R₁ R₂ R₃ 1 H H OCH₃ 2 OCH₃ OCH₃ H 3 OCH₂O OCH₂O H γ-fagarina (1) (caule) Kokusaginina (2) (caule) Maculina (3) (caule)
 Rutaecarpina (caule)	 Aldeído siringico (caule)
 Eudesmina (folhas)	 8-(2,3-diidroxi-3-metilbutioxi)-6,7-metilenodioxycumarina (folhas)
 Lupeol (caule)	 β-sitosterol (caule)
<i>Metrodorea stipularis</i> (BURGER et al., 2014)	
 1-[3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-2,4,6-trihidroxifenil]-3-(4-hidroxifenil)propan-1-ona (caule)	 1-(5,7-dihidroxi-2,2-dimetilcroman-6-il)-3-(2,2-dimetilcroman-6-il)propan-1-ona (caule)

Continua...

Quadro 2- (Continuação).

 1-(5,7-dihidroxi-2,2-dimetilcroman-6-il)-3-[4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)-fenil]propan-1-ona (caule)	 1-(5,7-dihidroxi-2,2-dimetilcroman-6-il)-3-(1,1,4a-trimetil-2,3,4,4a,9a-hexahidro-1H-xanten-7-il)propan-1-ona (caule)
<i>Metrodorea mollis</i> (SALES, 2012)	
 Brailina (raízes)	

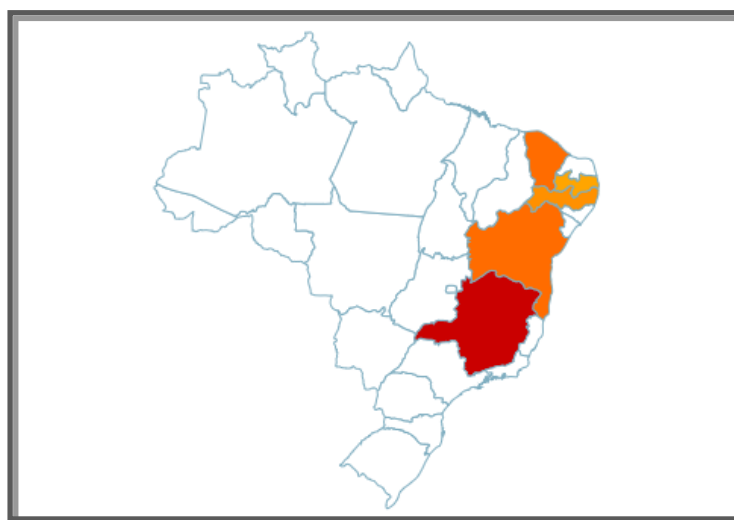
A espécie *Metrodorea mollis* Taub., conhecida popularmente como “avoação”, apresenta-se como um arbusto (Figura 4) e pode ser encontrada nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Ceará e Minas Gerais (Figura 5) (PIRANI, 2015b; LIMA et al., 2012). Apesar disso, em levantamento bibliográfico realizado nos principais bancos de dados, apenas um estudo fitoquímico envolvendo esta espécie foi encontrado, no qual foi relatado o isolamento da cumarina brailina a partir das raízes (SALES, 2012). Não foram encontrados estudos farmacológicos nem relatos de uso popular.

Figura 4- *Metrodorea mollis* Taub.



Fotos: Josean Fechine Tavares, 2011.

Figura 5- Distribuição geográfica da espécie *Metrodorea mollis* no Brasil.



Adaptado de: PIRANI, 2015b.

2.3. O Gênero *Pilocarpus* e espécie *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra

O gênero *Pilocarpus*, da mesma forma que *Metrodorea*, está inserido na subtribo Pilocarpinae, tribo Cusparieae, subfamília Rutoideae e família Rutaceae (SKOPURA, 1996). É um gênero neotropical de plantas arbóreas e arbustivas, compreendendo dezessete espécies, distribuídas em grande parte do continente Americano, especialmente na América do Sul (Figura 6) (Quadro 3). Quatorze espécies ocorrem no Brasil, sendo onze delas endêmicas (PIRANI, 2015c; SAWAYA et al.; 2011). A maioria das espécies é encontrada no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil (SKORUPA, 2003; SKOPURA, 1996).

Quadro 3- Espécies que compõe o gênero *Pilocarpus*.

Espécies do gênero <i>Pilocarpus</i>	
<i>P. alatus</i> C.J.Joseph ex Skorupa	<i>P. pennatifolius</i> Lem.
<i>P. carajaensis</i> Skorupa	<i>P. peruvianus</i> Kaastra
<i>P. demerarae</i> Sandwith	<i>P. racemosus</i> Vahl
<i>P. giganteus</i> Engl.	<i>P. riedelianus</i> Engl
<i>P. grandiflorus</i> Engl.	<i>P. spicatus</i> A. St.-Hil.
<i>P. jaborandi</i> Holmes	<i>P. sulcatus</i> Skorupa
<i>P. manuensis</i> Skorupa	<i>P. trachyllophus</i> Holmes
<i>P. microphyllus</i> Stapf ex Wardlew	<i>P. trifoliolatus</i> Skorupa & Pirani
<i>P. pauciflorus</i> A. St.-Hil.	

Figura 6- Distribuição geográfica do Gênero *Pilocarpus* no mundo, representada pelas áreas em verde.

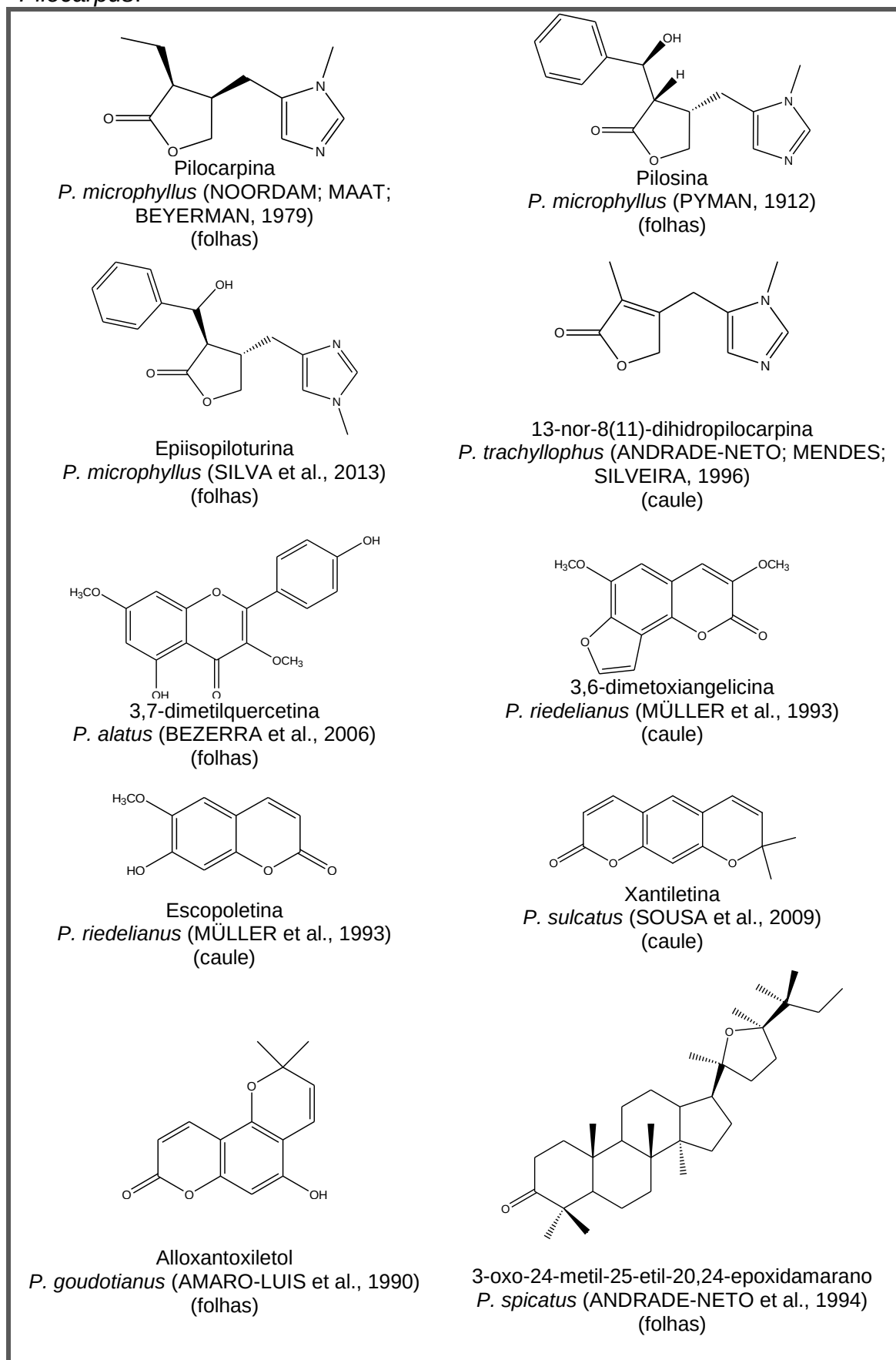


Fonte: Missouri Botanical Garden, 2015.

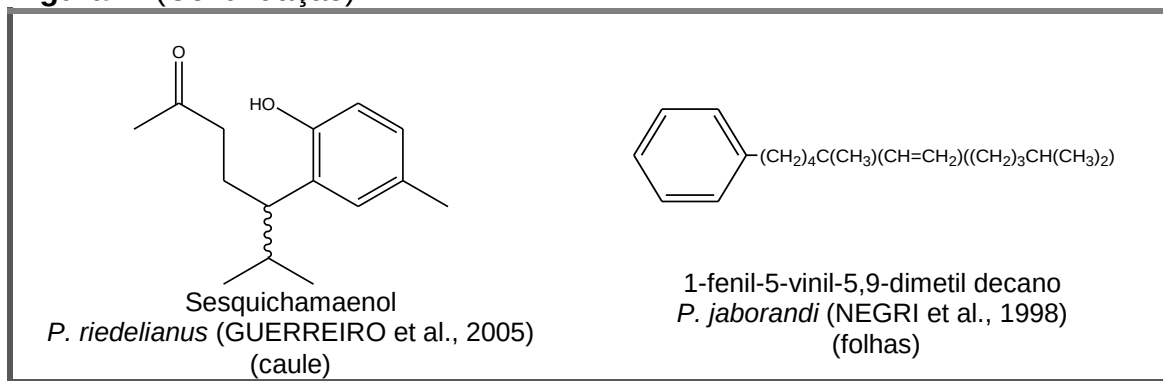
Atualmente, a grande importância de *Pilocarpus* spp. (especialmente *P. microphyllus*) se deve à extração do alcaloide pilocarpina (SILVA et al., 2013; SKORUPA; SALATINO; SALATINO, 1998). Desde a sua descoberta, esta substância é comumente usada no tratamento do glaucoma e contra a xerostomia, que é a redução da produção de saliva devido à quimioterapia ou radioterapia (SANTOS et al., 2004; PINHEIRO, 1997; NEGRI et al., 1998; MÜLLER et al., 1993). A colheita de folhas de espécies de jaborandis (como o gênero é conhecido popularmente) por populações nativas é uma prática comum, o que traz um risco de extinção da espécie (SAWAYA et al., 2011; SKORUPA; SALATINO; SALATINO, 1998).

Revisão bibliográfica sobre as investigações químicas realizadas neste gênero revelou a presença de diferentes tipos de metabolitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides, cumarinas, hidrocarbonetos, terpenoides e óleos voláteis (ANDRADE-NETO; MENDES; SILVEIRA 1996; WATERMAN, 1975) (Figura 7).

Figura 7- Algumas substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Pilocarpus*.



Continua...

Figura 7- (Continuação).

Pilocarpus spicatus subsp. *aracatensis* Kaastra (Figura 8) é uma espécie endêmica do Brasil, podendo ser encontrada em todo o sudeste e em grande parte do nordeste (Figura 9). Apresenta-se sob a forma de um arbusto e é conhecida popularmente como “arengueiro”, “catinga-de-porco”, “jaborandi-da-restinga” ou “pimentinha” (PIRANI, 2015c).

Figura 8- *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra.

Fotos: Josean Fachine Tavares, 2011.

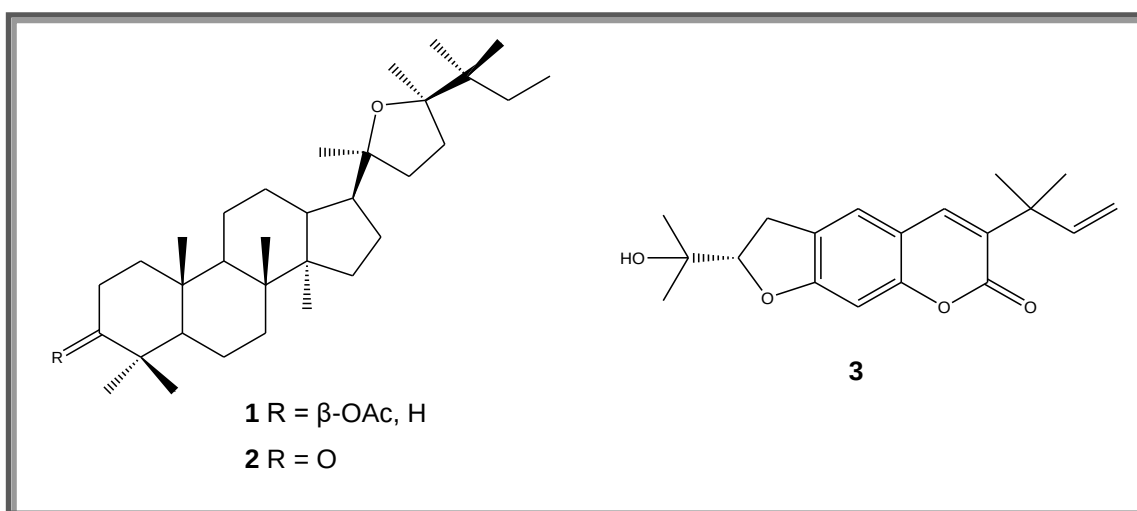
Figura 9- Distribuição geográfica da espécie *Pilocarpus spicatus* no Brasil.



Adaptado de: PIRANI, 2015d.

Em estudos fitoquímicos anteriores realizados com esta espécie, foi relatada a presença de dois triterpenos, 3- β -O-acetil-24-metil-25-etil-20,24-epoxidamarano (**1**) e 3-oxo-24-metil-25-etil-20,24-epoxidamarano (**2**), e uma cumarina, chalepina (**3**) isolados a partir do extrato etanólico das suas folhas (ANDRADE-NETO et al., 1994; PAVÃO et al., 2002) (Figura 10).

Figura 10- Substâncias isoladas de *Pilocarpus spicatus* (ANDRADE-NETO et al., 1994).



O óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* mostrou interessantes atividades biológicas, como: a inibição no desenvolvimento de ninfas de *Rhodnius prolixus*, atividade anti-bacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e

Staphylococcus aureus e também indução de edema em pata de rato (MELLO et al., 2007; SANTOS et al., 1997; SILVA; RAO, 1992). Os extratos hexânico e diclorometano do caule apresentaram potente atividade contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (MAFEZOLI et al., 2000).

2.4. Validação de métodos analíticos

O uso de extratos padronizados obtidos de plantas vem demonstrando sucesso em suas aplicações (REIS, 2013; REFSIO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006). Durante a produção de extratos a partir de matéria prima vegetal, pode-se considerar a padronização como uma condição em que a eficácia do produto é garantida através da constância no teor de princípios ativos.

Um passo fundamental no desenvolvimento de fitoterápicos é a caracterização química dos extratos vegetais e a obtenção de marcadores ou padrões de referência. Um marcador nada mais é do que uma substância ou classe de substâncias (ex.: cumarinas, terpenos, alcaloides, etc.) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014).

Para análise e controle de qualidade do material vegetal, assim como a monitorização das etapas de desenvolvimento do fitoterápico, a validação de métodos analíticos torna-se uma ferramenta imprescindível no processo de padronização (BRASIL, 2014).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez adequadas à análise (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004; RAVICHANDRAN et al., 2010).

A seletividade implica na capacidade do método em identificar e distinguir um analito de interesse em uma mistura complexa sem interferência

dos outros componentes. Garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto desejado (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

A linearidade é a habilidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuada na mesma amostra. Pode ser demonstrada através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo este superior a 5%. Esse parâmetro pode ser considerado no nível de repetitividade, de precisão intermediária e de reprodutividade. A repetibilidade (precisão intra-dia) refere-se à dispersão dos resultados do método, operando num curto intervalo de tempo e nas mesmas condições (mesma amostra, analista, equipamento, método, laboratório, etc.) (BRASIL, 2003; GREEN, 1996). A precisão intermediária (precisão inter-dia) expressa as variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos (BRASIL, 2003; RAVICHANDRAN et al., 2010). A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) está relacionada com a dispersão de resultados de um método obtida com estudos realizados em diferentes laboratórios (BRASIL, 2003).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012; RAVICHANDRAN et al., 2010).

Outros parâmetros avaliados na validação são o limite de detecção e o limite de quantificação. O primeiro refere-se a menor concentração do analito que pode ser estatisticamente detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o segundo indica a menor concentração de analito que pode ser determinada com adequada precisão e exatidão em

determinadas condições operacionais (BRASIL, 2003; RAVICHANDRAN et al., 2010).

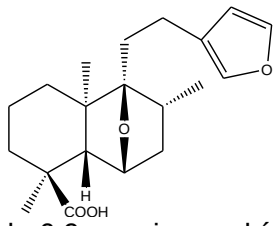
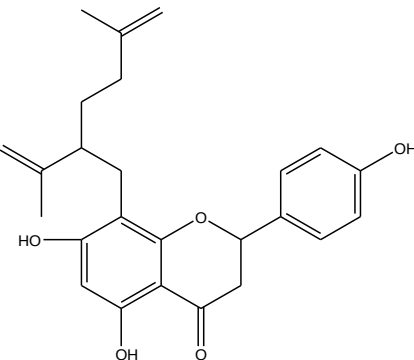
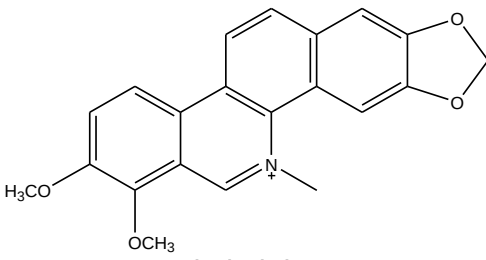
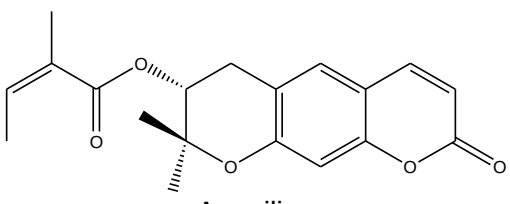
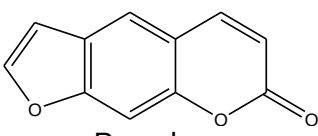
A robustez de um método analítico mede a capacidade que este apresenta em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003). Para examinar as causas de variabilidade dos resultados, vários fatores devem ser avaliados. Em análises realizadas por CLAE, por exemplo, alguns dos itens avaliados são as variações da composição da fase móvel, do fluxo, da temperatura, da coluna cromatográfica, dos fabricantes de equipamentos, entre outros (BRASIL, 2003; RAVICHANDRAN et al., 2010). Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse método quanto à sua precisão (BRITO, et al., 2003).

2.5. Atividade antibacteriana de produtos naturais

O desenvolvimento e a utilização de antibióticos em meados do século XX revolucionou o tratamento médico, reduzindo acentuadamente a taxa de mortalidade humana causada por infecções além de evitar a ocorrência de várias doenças (SILVA et al., 2010; PUTMAN; VEEN; KONINGS, 2000). No entanto, o surgimento e disseminação de micro-organismos resistentes fizeram com que muitos antibióticos atualmente disponíveis se tornassem ineficazes (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

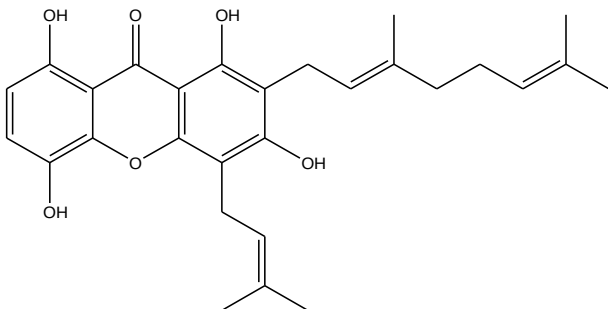
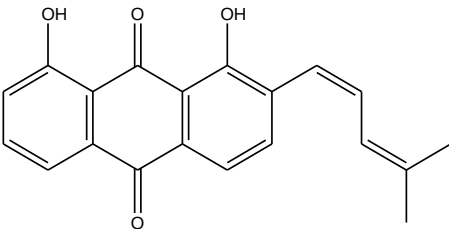
Tendo em vista o problema da resistência das bactérias a múltiplos antimicrobianos, a busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas a partir de fontes naturais vem ganhando grande importância nos últimos anos (SNEL et al. 2014; DE BONA, et al. 2014). O interesse pelas plantas é devido em parte, à grande variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabolitos secundários, tais como terpenoides, cumarinas, flavonoides e alcaloides muitos dos quais, possuem potente atividade antimicrobiana já demonstrada por pesquisas (STAVRI; PIDDOCK; GIBBONS, 2007; GIBBOONS, 2004) (Quadro 4).

Quadro 4- Evidências de produtos naturais com atividade antimicrobiana.

Produto Natural	Microorganismo	Referência
 Ácido 6,9-epoxi marrubínico (<i>Saraca indica</i>)	<i>G. candidum</i>	HAWAS et al., 2015
 Remangiflavanona A (<i>Physena madagascariensis</i>)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Enterococcus sp.</i>	DENG et al., 2000.
 Cheleritrina (<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>)	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i>	TAVARES et al., 2014.
 Agasilina (<i>Ferulago campestris</i>)	<i>S. aureus</i> <i>S. typhi</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i>	BASILE et al., 2009.
 Psoraleno (<i>Feronia limonia</i>)	<i>E. coli</i>	RAHMAN; GRAY, 2002.

Continua...

Quadro 4- Continuação.

Produto Natural	Micróbio	Referência
 4-prenil-2-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-1,3,5,8-tetrahidroxi-xantona (<i>Garcinia nobilis</i>)	<i>E. coli</i> <i>E. aerogenes</i> <i>M. tuberculosis</i>	FOUOTSA et al., 2013.
 8-dihidroxi-2-[(z)-4-metilpenta-1,3-dien-1-il]antraquinona (<i>Rhamnus cathartica</i> L.)	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>	HAMED; REFAHY; ABDEL-AZIZ, 2015.

Os compostos isolados de produtos naturais são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (LIMA, 2001).

Além da atividade antibacteriana direta, os produtos naturais têm sido estudados também como agentes moduladores da atividade antibiótica, aumentando a atividade de antibióticos contra bactérias resistentes a estas drogas. O desenvolvimento desses agentes moduladores representa uma estratégia bastante atrativa para reduzir a disseminação da resistência bacteriana a drogas, uma vez que poderiam facilitar a reciclagem dos antibióticos, que são muitas vezes mais baratos e menos tóxicos do que novos antimicrobianos (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; MAIA et al., 2011).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da família Rutaceae enfatizando os aspectos fitoquímico e biológico das espécies *Metrodorea mollis* Taub e *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Estudar fitoquimicamente as espécies *Metrodorea mollis* Taub. e *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra por meio do isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos;
- ✓ Desenvolver e validar um método analítico que quantifique simultaneamente os marcadores químicos, xantotoxina e imperatorina, no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Pilocarpus spicatus*;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* do extrato etanólico bruto de *P. spicatus* e das cumarinas isoladas.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Métodos Cromatográficos

O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos foram realizados utilizando métodos cromatográficos como: cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida de média pressão (CLMP), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

Para as CC utilizou-se sílica gel (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm), tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

Para a CLMP utilizou-se o cromatógrafo da Büchi® com um sistema de bomba e injetor de solventes automático, equipado com dois módulos de bombas (C-601 e C-605), módulo controlador (C-615) e coluna empacotada com sílica gel 60 (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm).

Na CLAE foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu constituído de duas bombas de alta pressão LC-10ADvp, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14a e injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (analítico) e 200 µL (semi-preparativo). As colunas cromatográficas (analítica e semi-preparativa) foram as da marca ACE C18, com 5 µm de tamanho de partícula e dimensões de 250 x 4,6 mm (analítica) e 250 x 10 mm (semi-preparativa). Na preparação das soluções utilizou-se filtros para seringa em PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro e diâmetro 30mm (Allcrom) além de aparelho de banho de ultrassom (Unique-USC-1600).

O monitoramento das frações obtidas por CC e CLMP foi realizado por CCDA. Para isso, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel (Whatman), em camadas de 0,25 mm de espessura sobre suporte de alumínio (20x20 cm).

As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (aparelho de marca Boitton) como também impregnação das placas em cubas de vidro, saturadas por vapor de iodo. O monitoramento das substâncias através do fator de

retenção (Rf) na CCDA foi o método adotado para reunir as frações coletadas durante a cromatografia em coluna.

Os solventes orgânicos empregados para eluição foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (Química Moderna e Vetec). Em CLAE, foram empregados solventes de grau cromatográfico (Tedia) e água ultrapura tipo I (Elga Labwater Purelab Option-Q).

4.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

O espectro na região do IV (4000 a 400 cm^{-1}) foi obtido em espectrômetro FTIR (modelo IRPrestige-21) da Shimadzu, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza-UFPB, utilizando $2\mu\text{g}$ de amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros VARIAN-SYSTEM 400 e 500 MHz, do Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRJ (IPPN-UFRJ), e VARIAN-SYSTEM (500 MHz) e VARIAN-MERCURY (200 MHz), do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB (IPeFarM-UFPB). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em clorofórmio deuterado da marca Cambridge Isotope Laboratories. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Os espectros de RMN também foram otimizados para as seguintes técnicas bidimensionais: HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) e COSY (Correlation Spectroscopy).

4.4. Espectrometria de Massas (EM)

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker, modelo Microtof II e Ion Trap-Amazonx, respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray (modo positivo (ESI+)), o primeiro localizado no

Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da USP-RP e o segundo no IPeFarM-UFPB.

4.5. Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão, modelo 431D da Fisatom, em microscópio óptico e com variação de temperatura de 50-300 °C, localizado no IPeFarM-UFPB.

4.6. Modelagem molecular

Para desenhar as estruturas foi utilizado o programa Marvin 6.0.1, 2012, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). O programa Standardizer, JChem 6.0.0, 2013, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) foi utilizado para canonizar a estrutura, adicionar hidrogênios, limpar o gráfico molecular em três dimensões e salvá-los no formato .sdf.

A otimização da geometria e análise conformacional foi realizada utilizando o programa Spartan para Windows 10, método de procura Monte Carlos, examinando no máximo 100 confôrmeros e selecionando os 10% de menor energia pelo método de mecânica molecular MMFF. Os confôrmeros de menor energia foram selecionados utilizando a abordagem DFT (density functional theory) em B3LYP / 6-31G** (BECKE, 1988; VEREECKEN; PIERLOOT; PEETERS, 1998).

4.7. Estudo Fitoquímico

4.7.1. Local da Pesquisa

O estudo fitoquímico das espécies *M. mollis* e *P. spicatus* foi realizado no Laboratório Químico de Produtos Naturais II, do IPeFarM-UFPB.

4.7.2. Material botânico

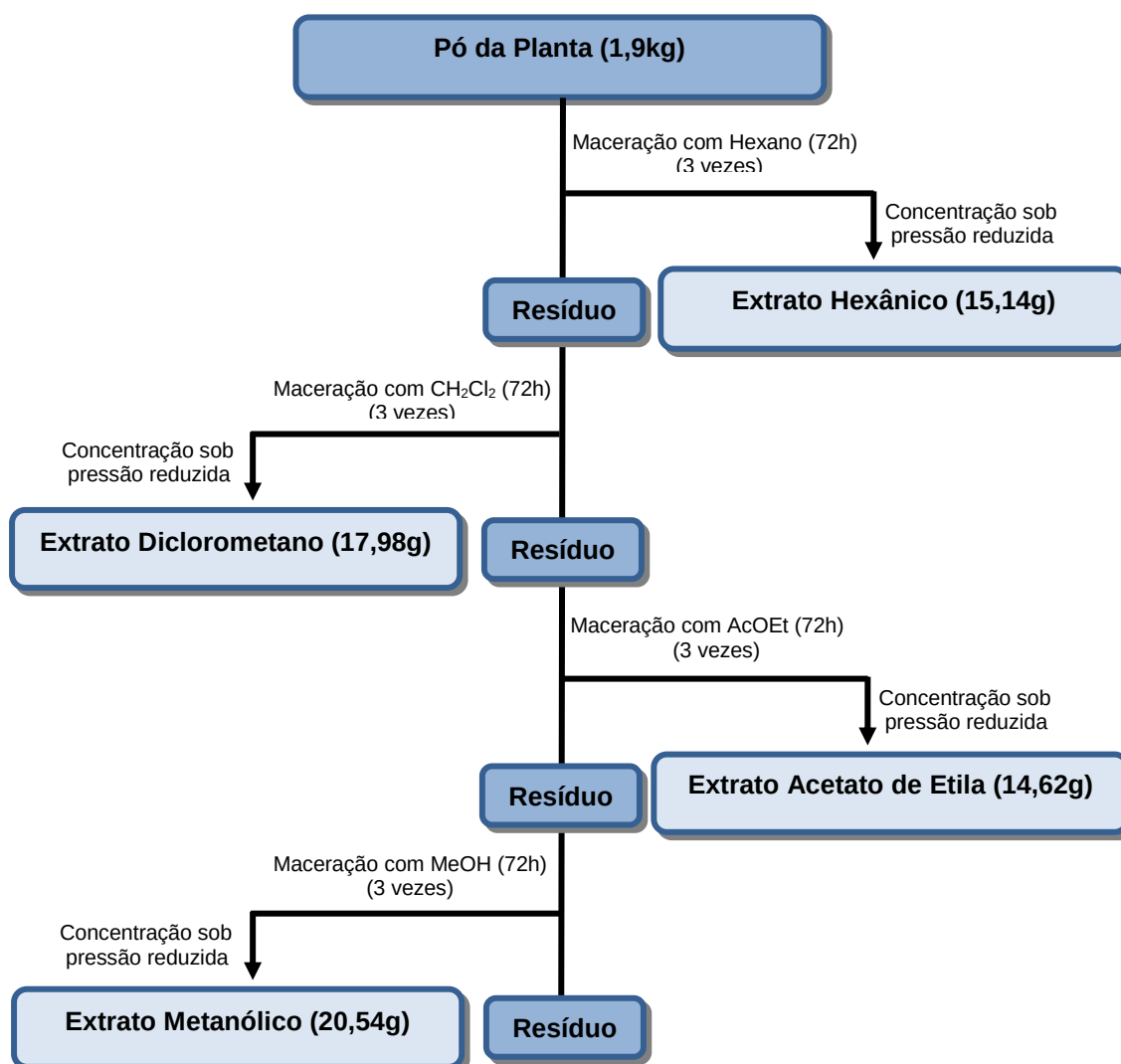
Os materiais botânicos (partes aéreas) de *M. mollis* e *P. spicatus* foram coletados no Município de Maturéia – PB, em Junho de 2011, identificados pela Prof^a. Dra. Maria de Fátima Agra, sendo uma exsicata depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, com número de exsicata 7449 e 7428, respectivamente.

4.7.3. Obtenção dos Extratos de *Metrodorea mollis*

O material botânico fresco foi desidratado em estufa com ar circulante, durante 72 horas, a temperatura média de 45 °C, sendo, em seguida, reduzido a pó com auxílio de moinho mecânico, fornecendo 1,9 Kg do pó da planta.

Os constituintes químicos do pó da planta foram então extraídos sequencialmente com os solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH sob maceração por 72 horas, sendo este processo repetido por três vezes para cada solvente. As soluções obtidas foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida a 40 °C para obtenção dos extratos hexânico (15,14 g), diclorometano (17,98 g), acetato de etila (14,62 g) e metanólico (20,54 g) (Esquema 1).

Esquema 1- Obtenção dos extratos hexânico, diclorometano, acetato de etila e metanólico de *M. mollis*.



3.7.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Metrodorea mollis*: Processamento cromatográfico do extrato hexânico

O extrato hexânico (7 g) foi submetido à CLMP, coluna empacotada com sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm), utilizando o fluxo de 30 mL/min e como fase móvel os solventes hexano, CH₂Cl₂ e MeOH, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 115 frações de 150 mL cada (Quadro 5). As frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos.

A fração 34-40 (534,4 mg), 47-63 (32,6 mg) e 79-87 (110,3 mg) apresentaram-se puras após análise por RMN, sendo então codificadas, respectivamente, de **Mm-1**, **Mm-2** e **Mm-3**.

Quadro 5- Fracionamento cromatográfico sob CLMP do extrato hexânico de *M. mollis*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
1-15	Hexano	1-6; 7-11; 12-15
16-21	Hex: CH ₂ Cl ₂ (9:1)	16-20
22-42	Hex: CH ₂ Cl ₂ (8:2)	21-26; 27-33; 34-40
43-50	Hex: CH ₂ Cl ₂ (7:3)	41-43; 44-46
51-71	Hex: CH ₂ Cl ₂ (6:4)	47-63; 64-73
72-83	Hex: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	74-78; 79-87
84-96	Hex: CH ₂ Cl ₂ (4:6)	88-90
97-104	Hex: CH ₂ Cl ₂ (2:8)	91-104
105-111	CH ₂ Cl ₂	105-115
112-115	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)	

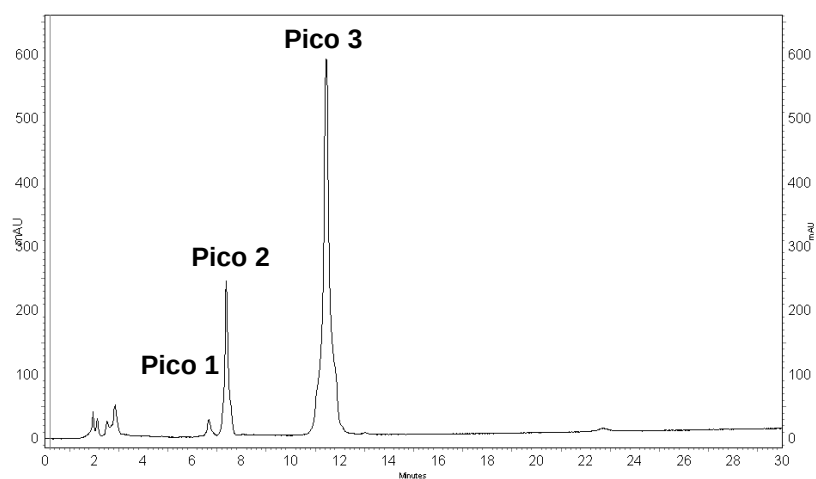
A fração 44-46 (489,1 mg) foi submetida à CC utilizando sílica gel 60 (0,04 – 0,063 mm) e como eluentes os solventes hexano e AcOEt e MeOH, obtendo 25 frações de 25 mL cada (Quadro 6) que foram analisadas por CCDA, e da subfração 11-15 foi obtido o composto **Mm-4** (162,5 mg).

A fração 74-78 (41,7 mg), por sua vez, foi submetida à análise cromatográfica em CLAE- Shimadzu LC (fase móvel: MeCN:H₂O (45:55); fluxo 4 mL/min; tempo de corrida: 30min; coluna ACE-250 x 10 mm C-18; comprimento de onda 200 nm), fornecendo 3 frações (Figura 11). A análise dos espectros de RMN ¹H dos picos 1 (5,3 mg), 2 (7,7 mg) e 3 (9,4 mg) (tempo de retenção 6,66, 7,39, 11,46 min, respectivamente) possibilitou verificar que o pico 1 era igual a **Mm-2** e o pico 2 igual a **Mm-3**, o pico 3 foi codificado de **Mm-5** (Esquema 2).

Quadro 6- Fracionamento cromatográfico da fração 44-46 do extrato hexânico de *M. mollis*.

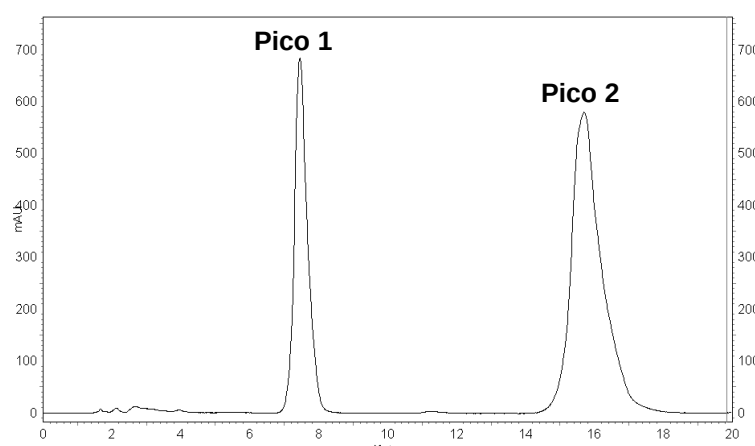
Frações	Solvente	Frações Reunidas
1	Hexano	1-3
2-4	Hex:AcOEt (9,6:0,4)	
5-7	Hex:AcOEt (9,4:0,6)	4-6
8-11	Hex:AcOEt (9:1)	7-10
12-17	Hex:AcOEt (8,5:1,5)	11-15
18-19	Hex:AcOEt (8:2)	16-21
20-22	Hex:AcOEt (7,5:2,5)	22-25
23-25	Hex:AcOEt (7:3)	

Figura 11- Cromatograma da fração 74-78 de C1 em 200 nm.

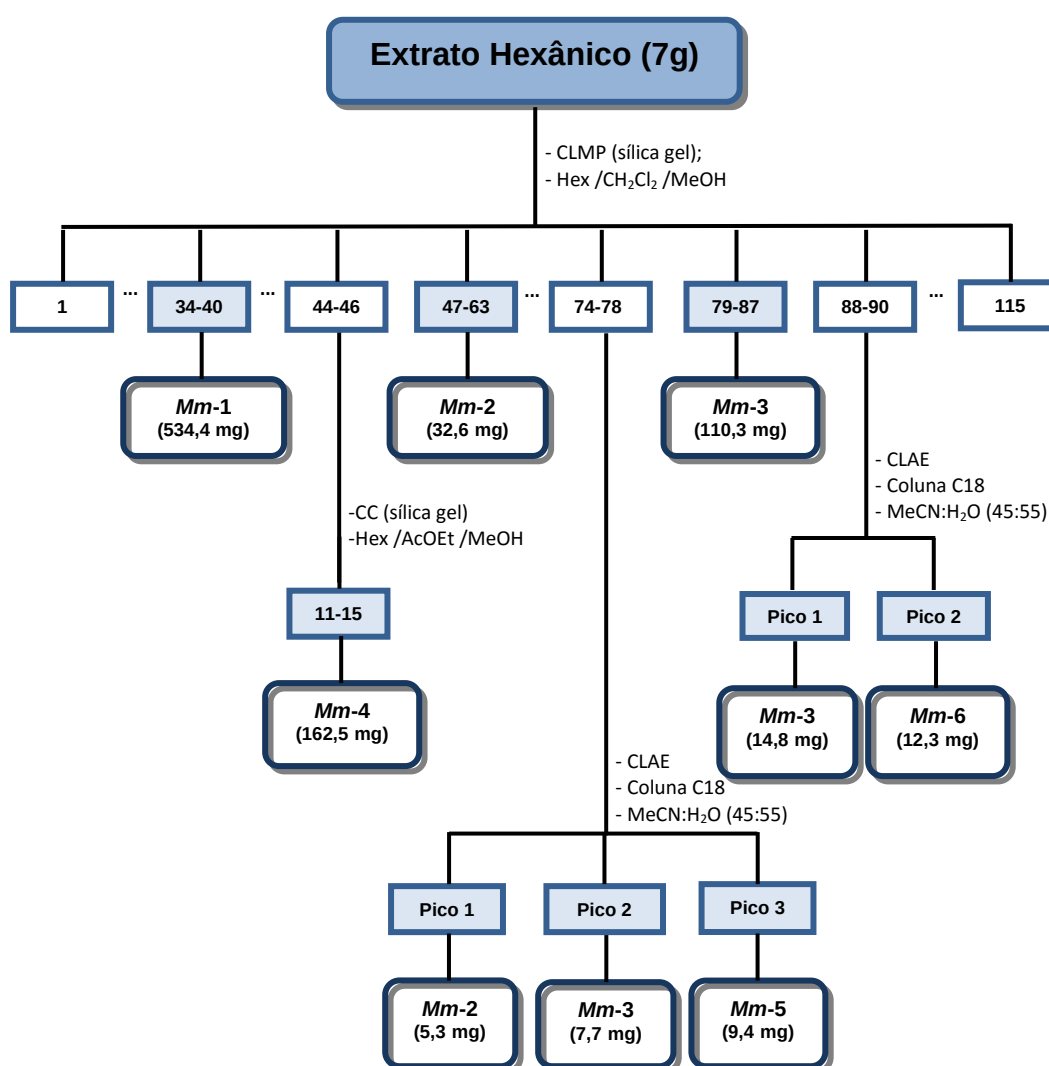


A fração 88-90 (37,2 mg) também foi submetida à análise cromatográfica em CLAE (fase móvel: MeCN:H₂O (45:55); fluxo 4 mL/min; tempo de corrida: 20 min; coluna ACE-250 x 10 mm C-18; comprimento de onda 200 nm) conduzindo ao isolamento do composto **Mm-6** (Pico 2; Tr 15,71 min; 12,3 mg), além do reisolamento do composto **Mm-3** (Pico 1; Tr 7,45 min; 14,8 mg) (Figura 12).

Figura 12- Cromatograma da fração 88-90 de C1 em 200 nm.



Esquema 2- Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de *M. mollis*.



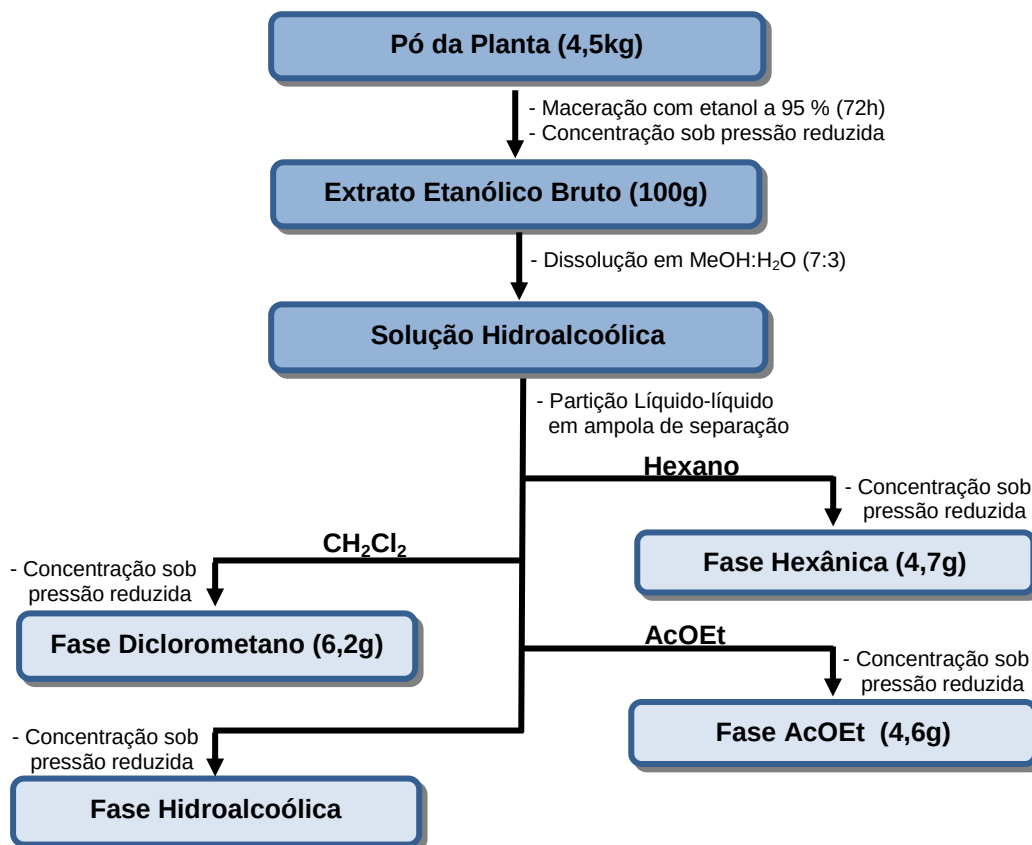
4.7.5. Obtenção e Particionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Pilocarpus spicatus*

Da mesma forma que o material botânico de *M. mollis*, as partes aéreas de *P. spicatus* foram desidratadas em estufa com ar circulante, durante 72 horas, a temperatura média de 45 °C, sendo, em seguida, reduzidas a pó com auxílio de moinho mecânico, fornecendo 4,5 Kg do pó da planta.

Os constituintes químicos do pó da planta foram então extraídos com etanol (EtOH) a 95 % sob maceração por 72 horas, sendo este processo repetido por quatro vezes (Esquema 3). A solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C, fornecendo 474,5 g de EEB.

Parte deste extrato (100,0 g), foi suspenso em uma solução MeOH:H₂O (7:3) e particionado com os solventes hexano, CH₂Cl₂ e EtOAc. As soluções obtidas foram concentradas sob pressão reduzida para obtenção das fases hexânica (4,7 g), diclorometano (6,2 g) e acetato de etila (4,6 g) (Esquema 3).

Esquema 3- Obtenção e partição líquido-líquido do EEB de *P. spicatus*.



4.7.6. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Pilocarpus spicatus*: Processamento cromatográfico da fase hexânica do EEB

A fase hexânica (4 g) foi submetida à CLMP, coluna empacotada com sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm), utilizando o fluxo de 35 mL/min e como fase móvel os solventes hexano e EtOAc e MeOH, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 48 frações de 200 mL cada (Quadro 7). As frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos. A fração 12-13 (39,2 mg) apresentou-se pura, sendo codificada de **Ps-1**.

Quadro 7- Fracionamento cromatográfico sob CLMP da fase hexânica de *P. spicatus*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
1-4	Hexano	1-6
5-6	Hex:AcOEt (9,5:0,5)	
7-8	Hex:AcOEt (9:1)	7-11
9-20	Hex:AcOEt (8:2)	12-13; 14-22
21-29	Hex:AcOEt (7:3)	23-27
30-34	Hex:AcOEt (6:4)	28-33
35-36	Hex:AcOEt (1:1)	34-36
37-39	Hex:AcOEt (4:6)	37-42
40-41	Hex:AcOEt (3:7)	
43-44	Hex:AcOEt (2:8)	43-48
45	AcOEt	
46-47	AcOEt:MeOH (9,5:0,5)	
48	AcOEt:MeOH (9:1)	

A fração 7-11 (247,6 mg) foi submetida à CC utilizando como adsorvente sílica flash (0,04-0,063 mm) e como eluentes hexano, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade (Esquema 4). Dessa coluna, foram coletadas 26 frações de 50 mL cada, analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus R_f's (Quadro 8). A fração 2 (4,8 mg) foi submetida a espectroscopia de RMN e codificada como **Ps-2**.

Quadro 8- Fracionamento cromatográfico da fração 7-11 da coluna da fase hexânica de *P. spicatus*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
-	Hexano	
1-8	Hex:AcOEt (9,9:0,1)	1; 2; 3-7
9-12	Hex:AcOEt (9,8:0,2)	8-14
13-15	Hex:AcOEt (9,7:0,3)	15-16
16-17	Hex:AcOEt (9,5:0,5)	
18-20	Hex:AcOEt (9,3:0,7)	17-23
21-22	Hex:AcOEt (9:1)	
23-24	Hex:AcOEt (8,5:1,5)	24-26
25-26	Hex:AcOEt (8:2)	

A fração 14-22 (1,83 g) foi submetida a processo cromatográfico semelhante ao descrito para coluna anterior, sendo coletadas 22 frações de 100 mL cada (Quadro 9). A subfração 10-12, após análise espectral foi codificada de **Ps-3** (74,4 mg). A subfração 6-9 (235,7 mg) foi submetida a uma nova CC utilizando sílica flash e como eluentes hexano, AcOEt e MeOH, recolhendo 13 frações de 10 ml cada (Quadro 10); da subfração 5-8 desta coluna obteve-se o composto codificado como **Ps-4** (81,1 mg). A subfração 14-16 (316,6 mg) também passou por processos cromatográficos semelhantes (Quadro 11) resultando no isolamento do composto **Ps-5** (88,7mg) advindo da subfração 6-8 dessa coluna.

Quadro 9- Fracionamento cromatográfico da fração 14-22 da coluna da fase hexânica de *P. spicatus*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
-	Hexano	
1-4	Hex:AcOEt (9,5:0,5)	1-5
5-13	Hex:AcOEt (9:1)	6-9; 10-12; 13
14-15	Hex:AcOEt (8,5:1,5)	14-16
16-18	Hex:AcOEt (8:2)	17-20
19-20	Hex:AcOEt (7:3)	
21	Hex:AcOEt (6:4)	21-22
22	Hex:AcOEt (1:1)	

Quadro 10- Fracionamento cromatográfico da subfração 6-9 (fração 14-22) da coluna da fase hexânica de *P. spicatus*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
-	Hexano	
-	Hex:AcOEt (9,5:0,5)	
1-8	Hex:AcOEt (9,3:0,7)	1-3; 4
9-11	Hex:AcOEt (9:1)	9-10
12-13	Hex:AcOEt (8,5:1,5)	11-13
14	Hex:AcOEt (7:3)	14-15
15	Hex:AcOEt (1:1)	

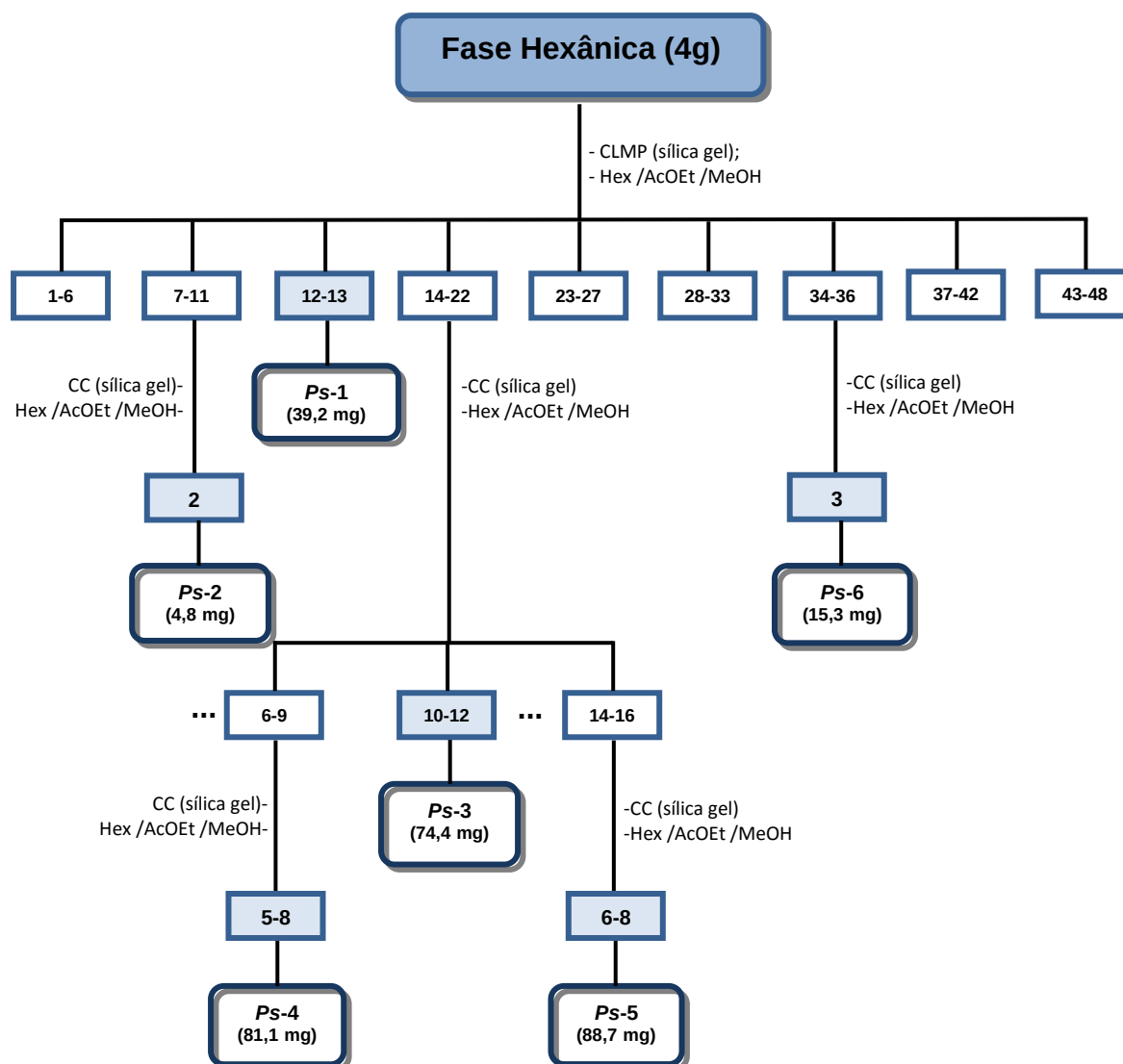
Quadro 11- Fracionamento cromatográfico da subfração 14-16 (fração 14-22) da coluna da fase hexânica de *P. spicatus*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
-	Hexano	
-	Hex:AcOEt (9,5:0,5)	
-	Hex:AcOEt (9,3:0,7)	
1-9	Hex:AcOEt (9:1)	1-5; 6-8
10-13	Hex:AcOEt (8,5:1,5)	9-12; 13
14	Hex:AcOEt (8:2)	14-15
15	Hex:AcOEt (7:3)	

A fração 34-36 de C1 (221,5 mg) foi submetida à CC utilizando sílica flash (0,04-0,063 mm) e como eluentes os solventes hexano e EtOAc e MeOH, obtendo 18 frações de 15 mL cada que foram analisadas por CCDA (Quadro 12). Da subfração 3 foi obtido o composto **Ps-6** (15,3 mg).

Quadro 12- Fracionamento cromatográfico da fração 34-36 da coluna da fase hexânica de *P. spicatus*.

Frações	Solvente	Frações Reunidas
-	Hexano	
-	Hex:AcOEt (9:1)	
-	Hex:AcOEt (8,5:1,5)	
1-11	Hex:AcOEt (8:2)	1-2; 3; 4-6; 8-12
12-14	Hex:AcOEt (7:3)	13-14
15-16	Hex:AcOEt (6:4)	15-18
17	Hex:AcOEt (1:1)	
18	Hex:AcOEt (3:7)	

Esquema 4- Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de *P. spicatus*.

4.8. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos marcadores no EEB de *Pilocarpus spicatus* por CLAE

4.8.1. Local da Pesquisa

Para o estudo de validação foi utilizada às dependências da Unidade de Caracterização e Análise (UNICAL), localizada no IPeFarM-UFPB.

4.8.2. Preparo das Amostras

4.8.2.1. Extrato

Uma solução-estoque foi preparada a partir do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Pilocarpus spicatus* dissolvendo-se 100 mg do extrato em 20 mL de

MeCN:H₂O (1:1), sonicadas por 15 minutos, obtendo-se uma solução na concentração de 5 mg/mL. A partir desta, foi preparada a solução a 1 mg/mL, que foi filtrada utilizando filtros para seringa em PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro e diâmetro 30 mm (Allcrom).

4.8.2.2. Marcadores

As amostras utilizadas como marcadores foram as frações codificadas como *Ps-4* e *Ps-5*, previamente identificadas como sendo as cumarinas imperatorina e xantotoxina, respectivamente.

Uma solução-estoque com a mistura dos marcadores foi preparada em MeCN:H₂O (1:1), na concentração de 1mg/mL. Uma outra solução-estoque a 100 µg/mL foi preparada a partir de diluição da solução a 1 mg/mL e filtrada utilizando filtros para seringa em PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro e diâmetro 30mm (Allcrom).

4.8.3. Desenvolvimento do Método Cromatográfico

O desenvolvimento do método foi realizado em um Cromatógrafo Líquido Alta Eficiência (CLAE) modelo Shimadzu LC- 20AD Prominence, equipado com duas bombas de alta pressão (modelo LC-20AD), detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A vp, degaseificador (modelo DGU-20A₃), uma interface modelo (CBM-20A) e injetor automático modelo SIL-20A. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna analítica C18 Phenomenex Kinetex com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm de tamanho de partícula e pré-coluna Phenomenex® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). Foi utilizado o fluxo de 1,0 mL/min, comprimento de onda de análise de 250 nm e volume de injeção de 20 µL.

Para a fase móvel, foi utilizada água ultrapura tipo I (Elga Labwater Purelab Option-Q) e acetonitrila grau HPLC (Tedia). Foram avaliadas as eluições no modo gradiente e isocrático. As condições cromatográficas testadas estão descritas no quadro abaixo.

Quadro 13- Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método em CLAE-DAD.

Método*	Fase móvel	Tempo (min)
1	MeCN:H ₂ O (05:95)→MeCN:H ₂ O (95:05)	0.00 a 60.00
2	MeCN:H ₂ O (40:60)	0.00 a 30.00
3	MeCN:H ₂ O (45:55)	0.00 a 30.00
4	MeCN:H ₂ O (40:60) MeCN:H ₂ O (60:40)	0.00 a 15.00 15.01 a 30.00
5	MeCN:H ₂ O (40:60) MeCN:H ₂ O (55:45)	0.00 a 15.00 15.01 a 30.00

*Para todos os métodos o comprimento de onda utilizado foi 250 nm, volume de injeção 20 µL e fluxo de 1,0 mL/min.

4.8.4. Validação do método analítico

O método foi validado através dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação de acordo com a RE nº 899 de 2003, Guia de Validação de Métodos Analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4.8.4.1. Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método, uma amostra com a mistura dos marcadores xantotoxina e imperatorina a 30 µg/mL e uma amostra do extrato bruto na concentração de 1mg/mL foram analisados por CLAE-DAD. A presença do marcador foi definida ao compararem-se os picos registrados nos cromatogramas. A seletividade do método analítico foi avaliada através da pureza dos picos das amostras e do índice de similaridade entre os picos dos marcadores em solução e no EEB.

4.8.4.2. Linearidade

Para avaliar a linearidade do método é recomendado que sejam analisadas, no mínimo, 5 concentrações diferentes (BRASIL, 2003). No presente estudo, a linearidade foi determinada a partir da análise de três curvas autênticas para cada marcador nas concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 µg/mL. As amostras foram preparadas a partir da solução estoque a 100 µg/mL, injetadas no cromatógrafo através do injetor automático e as áreas dos picos cromatográficos foram utilizadas para a construção das curvas de calibração e avaliação de linearidade mediante a análise de regressão linear.

Verificou-se a adequação do modelo através da avaliação da normalidade dos valores dos resíduos.

4.8.4.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para calcular o LD e o LQ da xantotoxina e imperatorina foram feitas as suas estimativas baseadas nas curvas de calibração obtidas no estudo da linearidade e calculado matematicamente utilizando as equações presentes na RE nº 899/2003 da ANVISA:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde: DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo dos Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao limite de quantificação.

IC = inclinação da curva de calibração.

4.8.4.4. Precisão

Para avaliar a repetibilidade (precisão intra-dia) do método foram efetuadas 6 determinações da solução-amostra na concentração de 1 mg/mL no mesmo dia. Enquanto que a precisão intermediária (precisão inter-dia) foi realizada em três dias consecutivos com 6 determinações da solução-amostra em cada dia.

Os resultados de precisão foram expressos pelo coeficiente de variação (CV%) conforme recomenda a RE nº 899 de 2003 da ANVISA, sendo o método considerado preciso se o coeficiente de variação para cada dia, separadamente, não for maior que 5%.

4.8.4.5. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através da adição dos marcadores xantotoxina e imperatorina. Foram preparadas amostras do EEB (1mg/mL), na qual foram adicionadas quantidades pré-determinadas dos marcadores nas concentrações de 2,0, 15,0 e 30,0 µg/mL. Foram realizadas três determinações de cada concentração.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente, frente ao padrão, e a concentração teórica correspondente, conforme a equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

O método foi considerado exato se o percentual de recuperação para as concentrações, individualmente, estivesse entre 85 e 115% (BRASIL, 2012).

4.8.4.6. Robustez

Para determinação da robustez do método, foram efetuadas variações no fluxo, proporção da fase orgânica e coluna (Quadro 17). Para o estudo, utilizou-se a amostra do EEB de *P. spicatus* a 1 mg/mL.

Quadro 14- Parâmetros avaliados para a determinação da robustez do método.

Fluxo (mL/min)	0,8	1,2
% Acetonitrila	38 e 53	42 e 57
Coluna	ACE 5 C18 – 250 x 4,6 mm	

O perfil cromatográfico e a resposta dos marcadores foram avaliados e medida o coeficiente de variância. O método foi considerado robusto se as quantificações dos marcadores não apresentassem variações superiores a 5% do valor nominal.

4.8.5. Degradação básica

Para realização da degradação básica foi utilizado o hidróxido de sódio (NaOH). A metodologia utilizada foi adaptada da descrita por Singh e Bakshi (2000).

Em 60 µL da solução dos marcadores padrões (1 mg/mL) foi adicionado 100 µL de NaOH 0,1 M e 840 µL de fase móvel (MeCN:H₂O 1:1). Esta solução foi levada para estufa a uma temperatura de 40°C durante 8h. Após esse

período, a solução foi diluída para concentração de 30 µg/mL, filtrada e injetada no cromatógrafo. O cromatograma dos marcadores, após degradação forçada, foram avaliados frente a solução dos marcadores recém preparada, na mesma concentração, quanto a presença de picos cromatográficos resultantes da degradação dos marcadores e a pureza dos picos.

4.8.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de validação foi feita utilizando os softwares Excel, versão 2010, e Minitab®17. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e a comparação entre grupos feita através de ANOVA fator único.

4.9. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*

4.9.1. Local da Pesquisa

Os estudos para avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência foram realizados no Laboratório de Genética de Micro-organismos, do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciência Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB.

4.9.2. Linhagens de *Staphylococcus aureus*

Para avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a drogas foram usadas as seguintes linhagens fornecidas pelo Dr. Simon Gibbons (University of London): SA-1199B, que possui o gene *norA* superexpresso, codifica a proteína de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas (KAATZ et al., 1993; KAATZ; SEO, 1995); RN-4220 que possui o plasmídeo pUL5054, o qual, carrega o gene que codifica a proteína MsrA, para efluxo de macrolídeos (ROSS et al., 1989) e IS-58, que possui a proteína de efluxo para tetraciclina (TetK) (GIBBONS; UDO, 2000). Todas estas linhagens foram mantidas em meio de cultura Agar sangue base (*Blood Agar Base* – BAB, Difco) inclinado. Antes de serem utilizadas, as células foram inoculadas e crescidas em caldo nutritivo de infusão (*Brain and Heart Infusion* - BHI, Difco) por 18-24hs a 37°C.

4.9.3. Substâncias testadas

Para os testes foram utilizadas soluções-estoque do EEB de *P. spicatus* e das cumarinas isoladas, dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido), em seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 5120 µg/mL e 2560 µg/mL, respectivamente.

4.9.4. Avaliação da atividade antibacteriana

Os estudos para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram realizados por meio da técnica de microdiluição, utilizando uma suspensão de c.a. 10^5 ufc/mL em solução salina a 0,9% de NaCl e com concentrações variando de 256 a 4 µg/mL (cumarinas) ou 512 a 8 µg/mL (EEB) em diluições seriadas em caldo nutritivo BHI - *Brain and Heart Infusion* (SMITH et al., 2005). Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões tetraciclina, eritromicina, norfloxacino e clorpromazina (Sigma-Aldrich) cujas concentrações finais variaram entre 256 a 4 µg/mL ou 128 a 0,125 µg/mL. As CIMs foram definidas como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano após 24h, visualizada com o uso da solução de resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich), um indicador de crescimento bacteriano. A mudança de coloração azul para rosa, devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano (JAVADPOUR et al., 1998), auxiliando assim a visualização da CIM. O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

4.9.5. Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas

Para avaliar a atividade do EEB e das cumarinas como agentes modificadores (inibidores da bomba de efluxo) da atividade de antibióticos sintéticos, foi determinada a CIM dos antibióticos e do brometo de etídio, na presença e na ausência das substâncias testes, em cepas de *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo específicas (GIBBONS et al., 2003). A concentração da substância teste foi a correspondente a $\frac{1}{4}$ de sua CIM, considerada uma concentração subinibitória, de modo a não interferir diretamente na atividade antibacteriana (STAVRI et al., 2007). A clorpromazina, um inibidor de bomba de efluxo, foi usada como controle positivo para as cepas IS-58 (TetK) e SA-1199B (NorA). Após 24h de incubação a 37°C, foi realizada

a visualização da presença/ausência de crescimento bacteriano, com o uso da solução (0,01%) de resazurina (Sigma-Aldrich).

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Substâncias Isoladas de *Metrodorea mollis*

5.1.1. Determinação estrutural de *Mm-1*

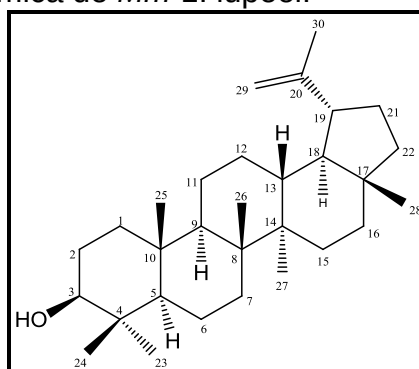
A substância codificada como *Mm-1* apresentou-se sob a forma de cristais brancos, com ponto de fusão de 218,2-219,7 °C (lit. 218-220 °C) (BORGATI, 2013) e massa de 534,4 mg ($28,13 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada).

No espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) (Figuras 15 e 16) verificou-se a presença de 30 sinais. Os sinais em δ_{C} 150,95 e 109,31 são característicos de triterpenos pentacíclicos da série lupano com insaturação entre C-20 e C-29, sendo o sinal em δ_{C} 79,00 atribuído ao carbono oximetínico C-3 (BURNS et al., 2000).

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 14) apresentou um envelope de sinais entre δ_{H} 1,88-0,63 característico de esqueleto triterpênico ou esteroidal (KOJIMA et al., 1990), corroborando com os dados de RMN ^{13}C . Foi observado ainda um duplodoubleto em δ_{H} 3,15 ($J = 5,2$ e $5,6$ Hz), atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3, além do doubleto em δ_{H} 4,65 ($J = 2,4$ Hz) e um duplodoubleto em δ_{H} 4,54 ($J = 1,4$ e $2,4$ Hz) atribuídos a hidrogênios olefínicos H-29 que fortaleceram a proposta de triterpeno pentacíclico da série lupano.

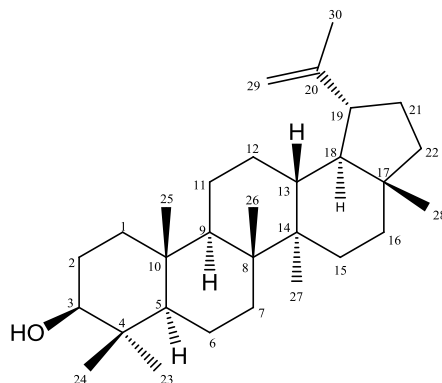
A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com os valores obtidos na literatura (BURNS et al., 2000) (Tabela 1), permitiu identificar *Mm-1* como sendo o triterpeno lupeol (Figura 13), relatado pela primeira vez em *M. mollis*, porém já isolado em outras espécies do gênero *Metrodorea* (BAETAS et al., 1996; BAETAS et al., 1999)

Figura 13- Estrutura química de *Mm-1*: lupeol.



O lupeol ocorre em diversas famílias de plantas, incluindo espécies do gênero *Metrodorea* (BAETAS et al., 1996; BAETAS et al., 1999), e inúmeras atividades farmacológicas são atribuídas a esse composto dentre elas antitumoral, antiprotozoária e anti-inflamatória (GALLO; SARACHINE, 2009).

Tabela 1- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de *Mm-1* (200 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^1H e ^{13}C do lupeol (500 MHz, CDCl_3) (BURNS et al., 2000) (δ em ppm, J em Hz).



<i>Mm-1</i>			Lupeol (BURNS et al., 2000)	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	38,67		38,72	
2	27,54		27,43	
3	79,00	3,15 (dd, $J=5,2$ e $10,4$)	79,02	3,19
4	38,83		38,87	
5	55,24		55,31	
6	18,30		18,33	
7	34,24		34,29	
8	40,78		40,84	
9	50,39		50,35	
10	37,13		37,18	
11	20,90		20,94	
12	25,09		25,16	
13	38,00		38,07	
14	42,79		42,85	
15	27,41		27,46	
16	35,55		35,60	
17	42,97		43,01	
18	48,25		48,32	
19	47,96	2,37 (td, $J=5,0$, $10,6$ e $11,2$)	48,00	2,38
20	150,95		150,98	
21	29,81		29,86	
22	39,98		40,02	
23	27,98	0,94 (s)	28,00	0,97
24	15,39	0,73 (s)	15,38	0,76
25	16,12	0,80 (s)	16,13	0,83
26	15,98	1,00 (s)	15,99	1,03
27	14,53	0,92 (s)	14,56	0,94
28	18,00	0,76 (s)	18,02	0,79
29	109,31	4,54 (dd, $J=1,4$ e $2,4$)	109,32	4,56
		4,65 (d, $J=2,4$)		4,69
30	19,31	1,65 (s)	19,32	1,68

Figura 14- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de *Mm*-1.

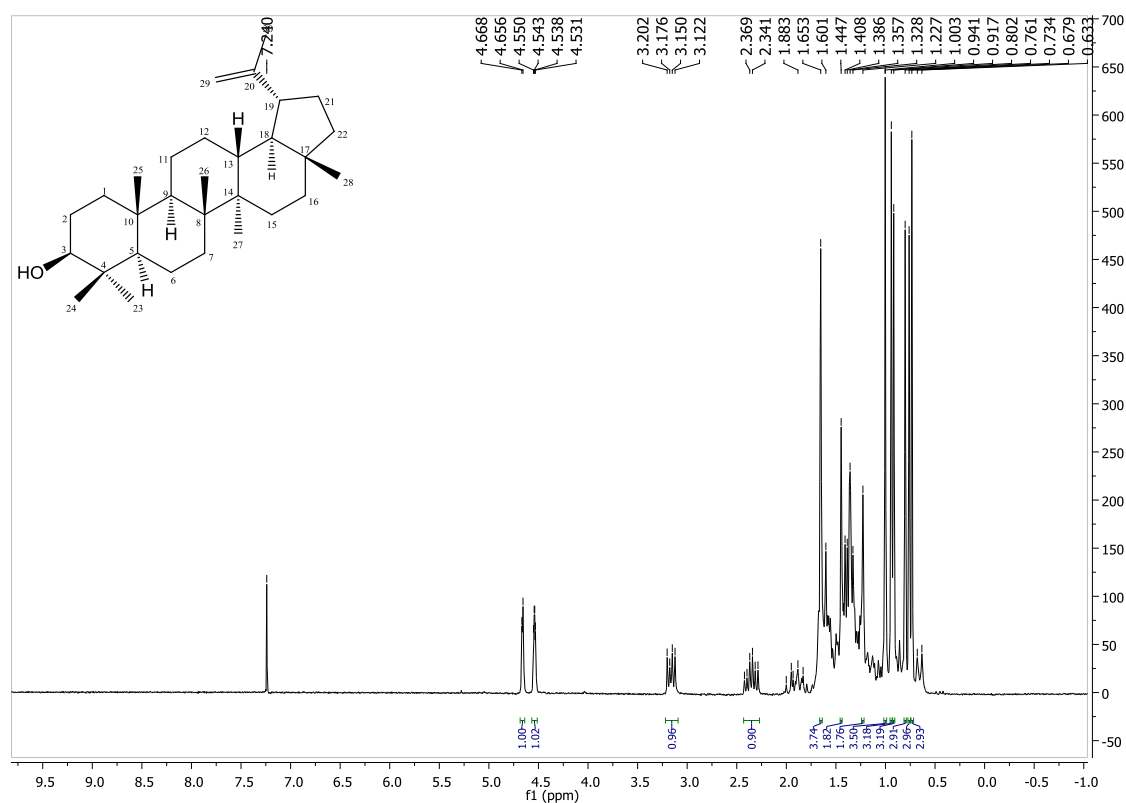


Figura 15- Espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) de *Mm*-1.

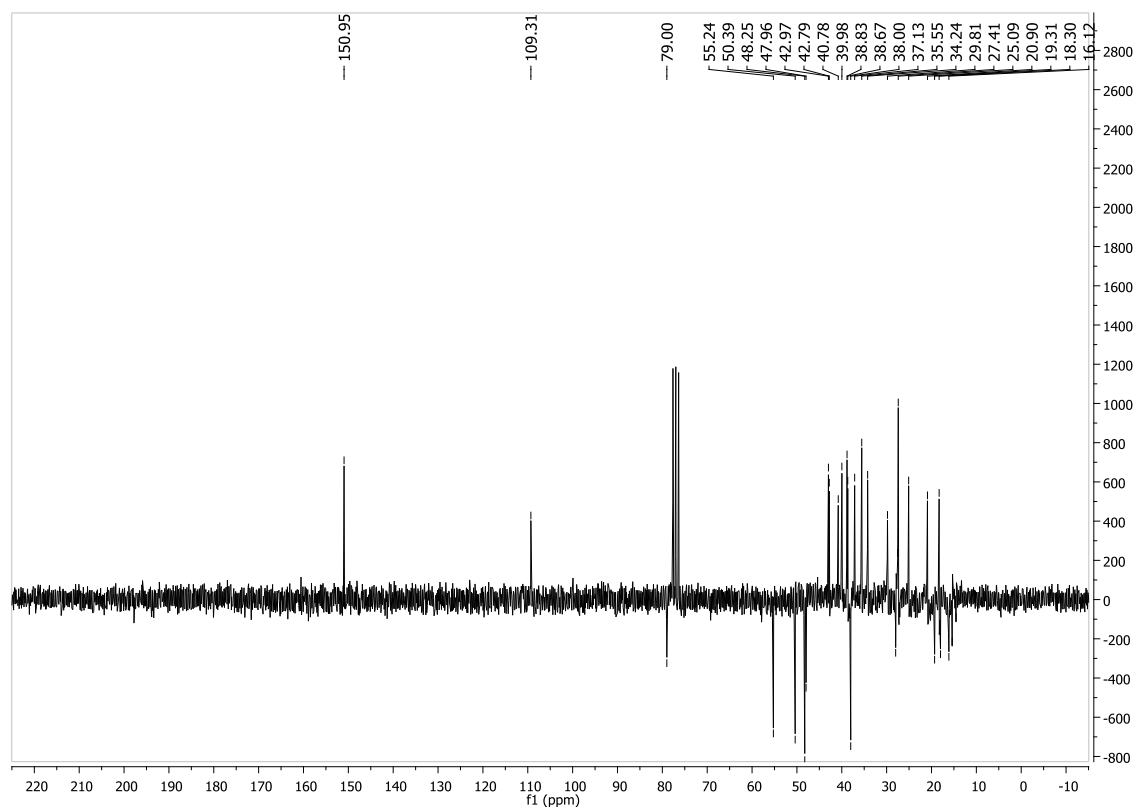
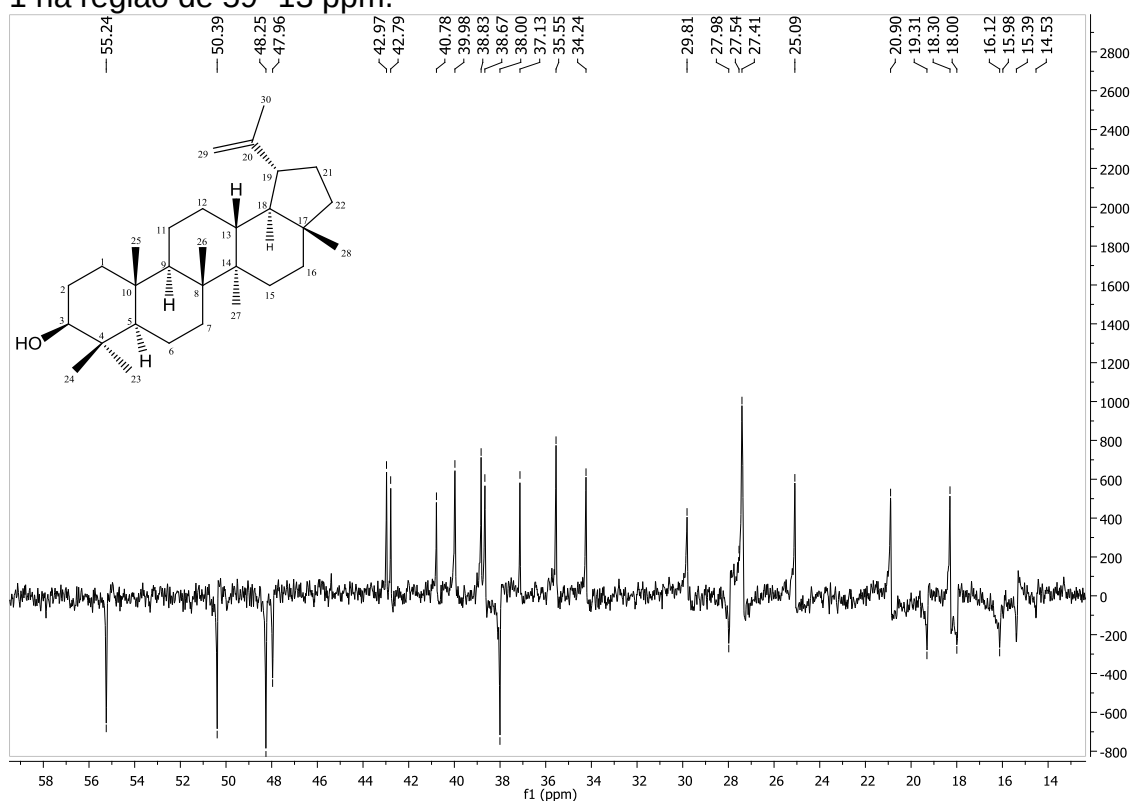


Figura 16- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) de *Mm*-1 na região de 59 -13 ppm.

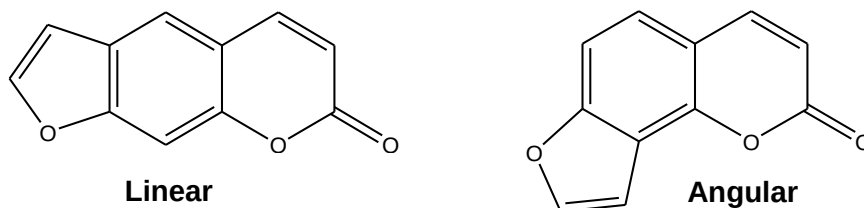


5.1.2. Determinação estrutural de *Mm*-2

A substância *Mm*-2 foi isolada na forma de cristais incolores, com ponto de fusão de 144,8-146,6 °C (lit. 145-146 °C) (DINCEL et al., 2013) e massa de 32,6 mg ($1,71 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-EM (Figura 18) mostrou um pico em 239,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ (calc. 216,0).

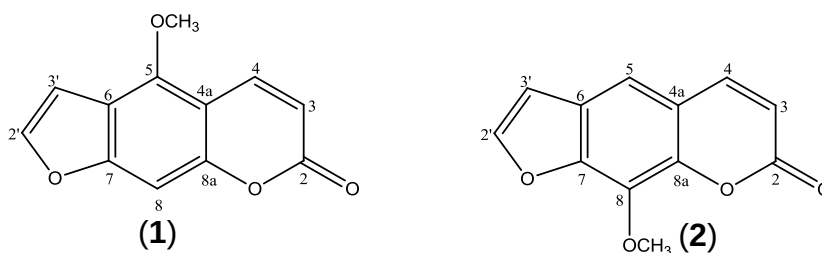
No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e em sua expansão (Figuras 19 e 20) foram observados sinais compatíveis com substâncias que apresentam esqueleto cumarínico, ou seja, um par de dubletos acoplando entre si em δ_{H} 6,35 ($J = 9,5$ Hz) e 7,74 ($J = 9,5$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, do anel δ -lactônico α,β -insaturado (CAI et al., 2012; CHEN et al., 2006). A presença do anel furânico foi evidenciada pelos sinais característicos em δ_{H} 7,67 (d , $J = 2,0$ Hz) e 6,80 (d , $J = 2,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente, nos permitindo inferir que *Mm*-2 tratava-se de uma furanocumarina.

De acordo com o posicionamento do anel furânico, as furanocumarinas podem ser classificadas como lineares ou angulares.



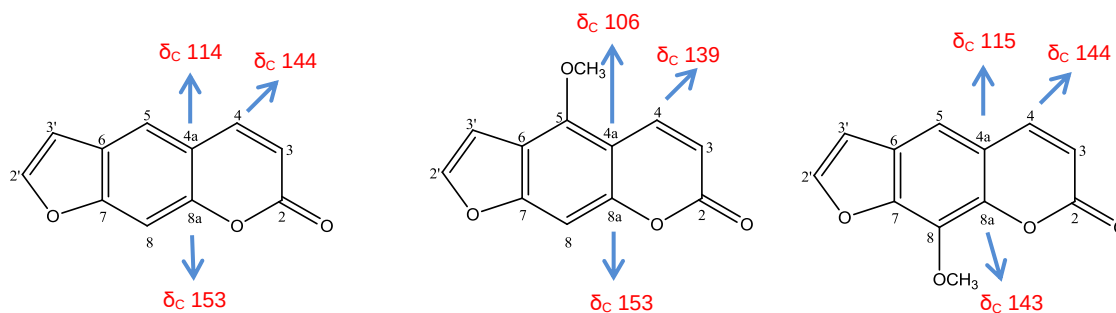
Deslocamentos químicos de grupos metoxilas com valores maiores que δ_H 4,15 indicam linearidade nas furanocumarinas e quando menores que δ_H 4,15 caracterizam as angulares (MURRAY; JORGE, 1984; O'NEILL et al., 2013). Sendo assim, o singlete em δ_H 4,28, com integral pra três hidrogênios, condizente com o grupo metoxila, nos permitiu sugerir uma furanocumarina do tipo linear para *Mm-2*.

Dessa forma, sugeriu-se duas possibilidades estruturais para *Mm-2*, com a metoxila inserida nos carbonos C-5 (**1**) ou C-8 (**2**) do anel aromático da cumarina:



No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 21) observou-se a presença de 12 sinais, correspondentes a 6 carbonos não hidrogenados, 5 carbonos metínicos e 1 carbono metoxílico, corroborando com os dados apresentados no espectro de RMN de ^1H para uma furanocumarina com substituição de um dos hidrogênios aromáticos por uma metoxila.

Segundo a literatura, quando há substituinte oxigenado em C-5, os carbonos C-4a e C-4 sofrem proteção e apresentam deslocamentos químicos em aproximadamente δ_C 106,0 e 139,0, respectivamente (O'NEILL et al., 2013; SANDOVAL-MONTEMAYOR et al., 2012; RAZDAN et al., 1987). Enquanto que ocorrendo oxigenação em C-8, o carbono C-8a sofre proteção e seu deslocamento químico passa ser, aproximadamente, δ_C 143,0 (O'NEILL et al., 2013; CAI et al., 2012).

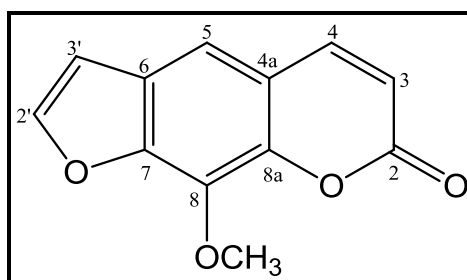


A presença, no espectro de RMN ^{13}C -APT, dos sinais em δ_c 116,49, 143,00 e 144,30 sugeriram que a metoxila estaria inserida em C-8.

Esta hipótese foi confirmada através da análise dos espectros de RMN bidimensionais, onde se observou no espectro HMBC (Figuras 24 e 25), uma correlação a três ligações (J^3) entre o hidrogênio em δ_H 7,74 (H-4) com o sinal em δ_c 112,88 (C-5), somado a correlação no HMQC (Figuras 22 e 23) entre o hidrogênio em δ_H 7,33 (H-5) e o sinal em δ_c 112,88 (C-5). As demais correlações encontram-se compiladas na Tabela 2.

Após total análise espectroscópica, bem como comparação com dados da literatura (CAI et al., 2012) (Tabela 2), foi possível identificar *Mm*-2 como sendo a furanocumarina xantotoxina (Figura 17), isolada anteriormente em outras espécies do gênero *Metrodorea* (MÜLLER et al., 1995; BAETAS et al., 1996; PERNIN et al., 1999), porém, relatada pela primeira vez para a espécie *M. mollis*.

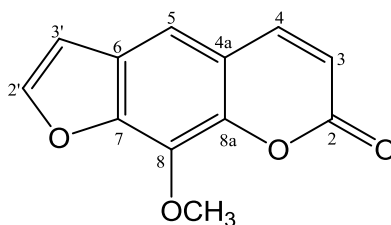
Figura 17- Estrutura química de *Mm*-2: xantotoxina.



Farmacologicamente, a xantotoxina foi estudada no que diz respeito à atividade antitumoral (SUMIYOSHI et al., 2014; DIWAN e MALPATHAK, 2009; XIU-JUAN et al., 2014; ASENSI et al., 2011), imunomodulatória (CHERNG;

CHIANG; CHIANG, 2008) e antimicrobiana (BARROS e SIQUEIRA-JUNIOR, 2002; SILVA et al., 2014).

Tabela 2- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Mm-2* (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da xantotoxina (400 MHz, CDCl_3) (CAI et al., 2012) (δ em ppm, J em Hz).



$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC		Xantotoxina (CAI et al., 2012)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
2	160,43		H-3	H-4	160,4	
3	114,76	6,35 (<i>d</i> , $J=9,5$)			114,6	6,32 (<i>d</i> , $J=9,6$)
4	144,30	7,74 (<i>d</i> , $J=9,5$)			144,3	7,74 (<i>d</i> , $J=9,6$)
4a	116,49			H-3	116,4	
5	112,88	7,33 (<i>s</i>)		H-4	112,9	7,31 (<i>s</i>)
6	126,11		H-3'	H-2'	126,1	
7	147,69			H-5; H-2'; H-3'	147,6	
8	132,81			OCH ₃	132,6	
8a	143,00			H-4; H-5	142,9	
2'	146,62	7,67 (<i>d</i> , $J=2,0$)			146,6	7,66 (<i>d</i> , $J=2,0$)
3'	106,71	6,80 (<i>d</i> , $J=2,0$)	H-2'	H-5	106,7	6,79 (<i>d</i> , $J=2,4$)
OCH ₃	61,33	4,28 (<i>s</i>)			61,2	4,25 (<i>s</i>)

Figura 18- Espectro de massas em baixa resolução de *Mm-2*.

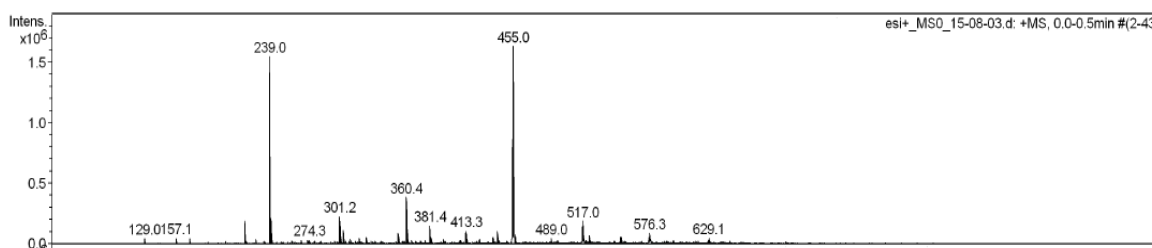


Figura 19- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-2*.

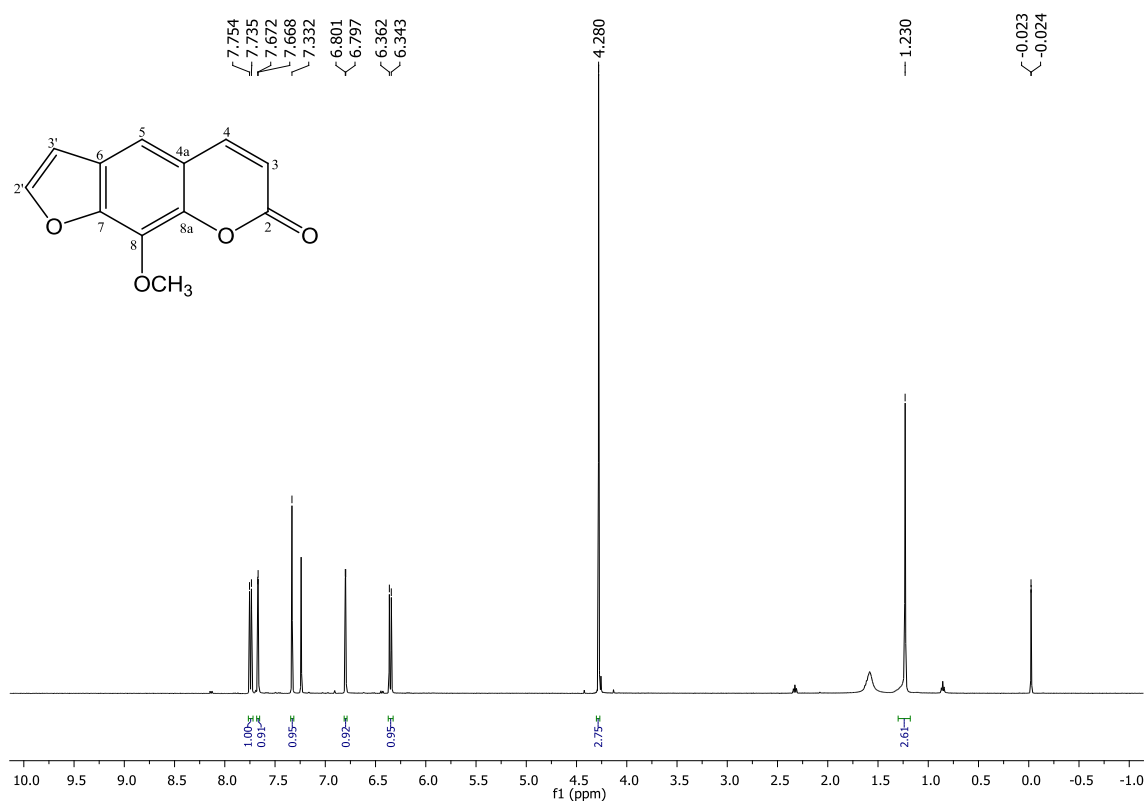


Figura 20- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-2* na região de 7,9-6,3 ppm.

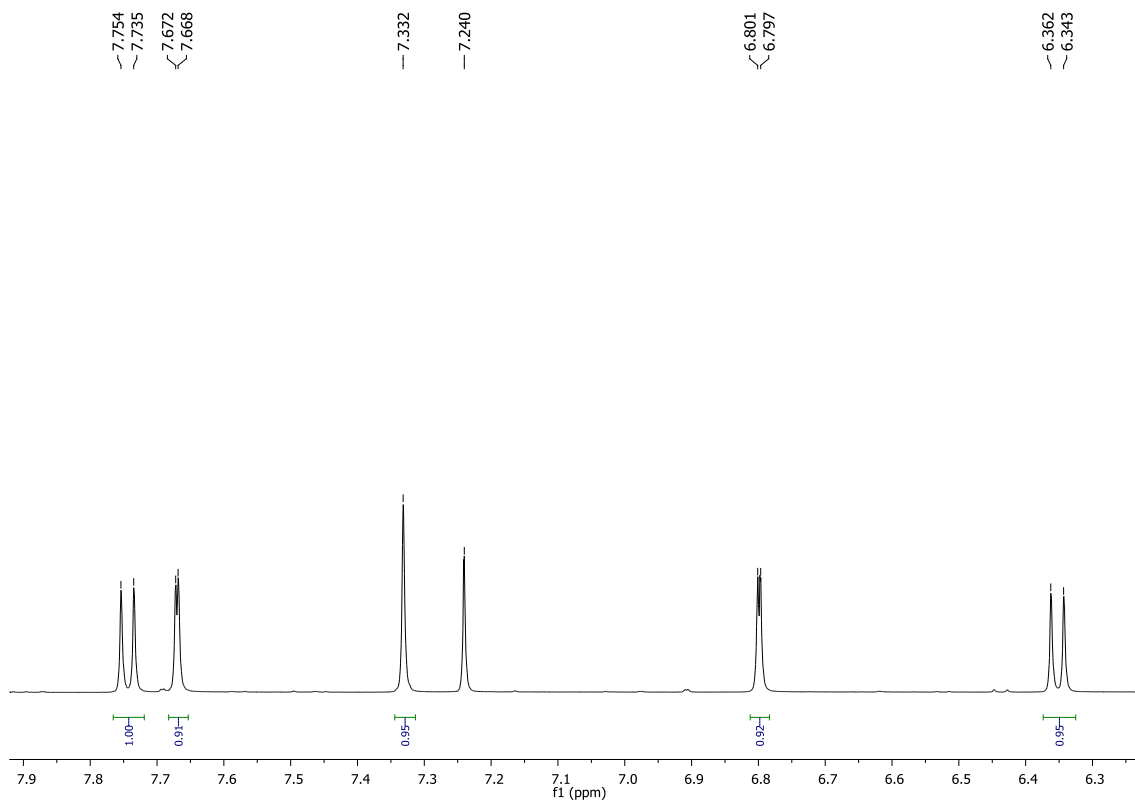


Figura 21- Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, CDCl_3) de *Mm-2*.

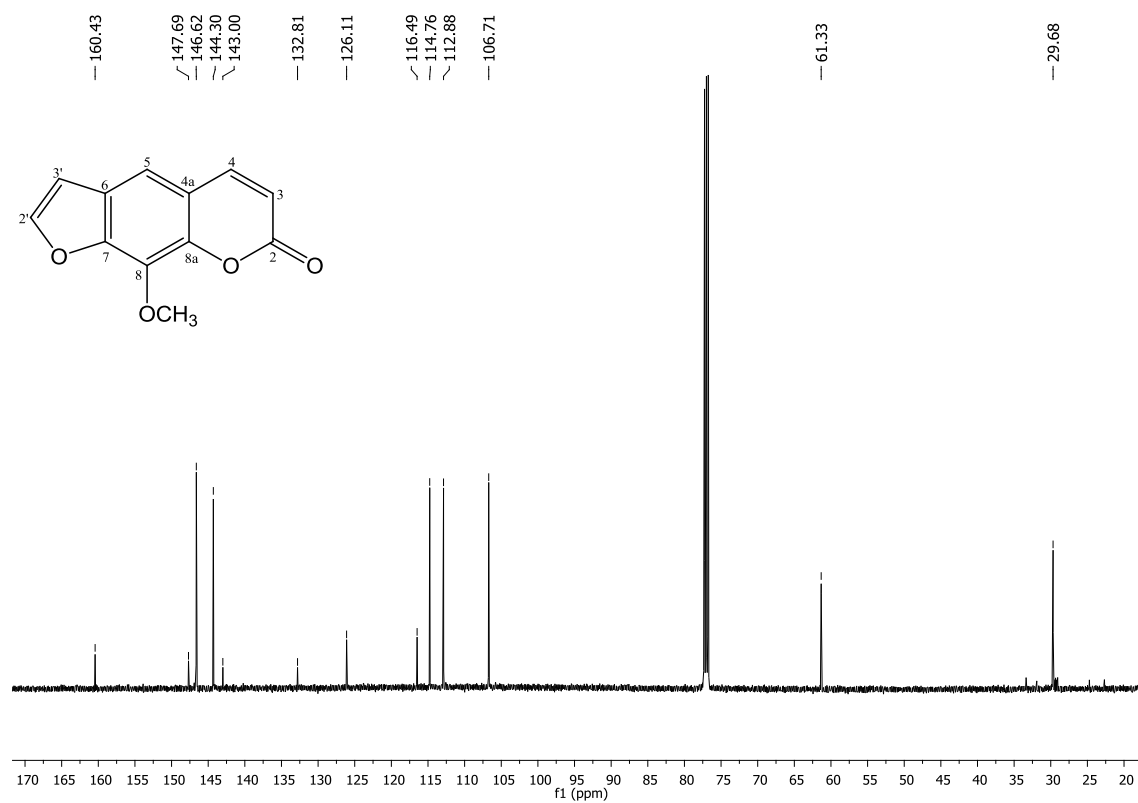


Figura 22- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-2*.

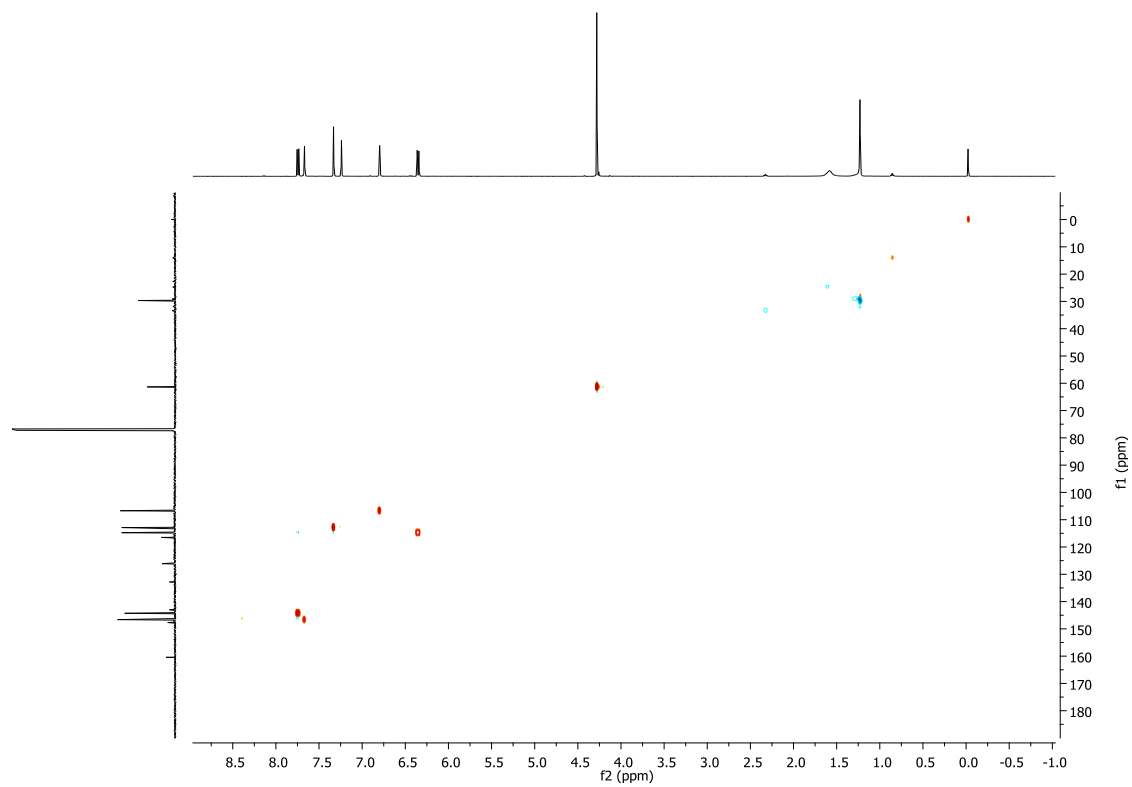


Figura 23- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-2* na região de (7,8-6,3 ppm) x (150-105 ppm).

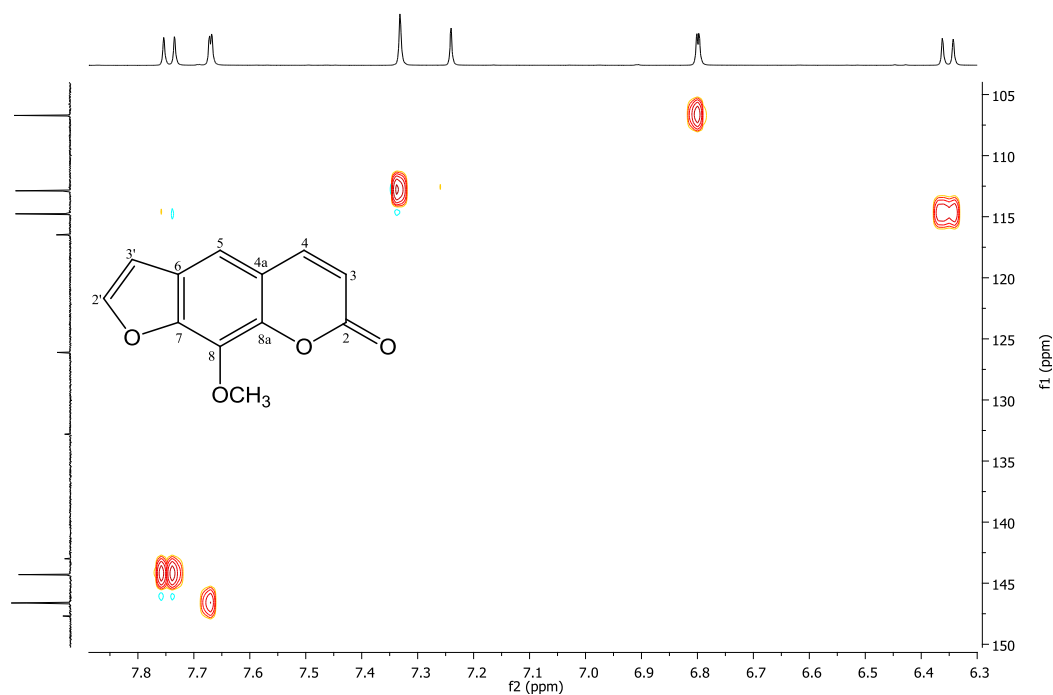


Figura 24- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-2*.

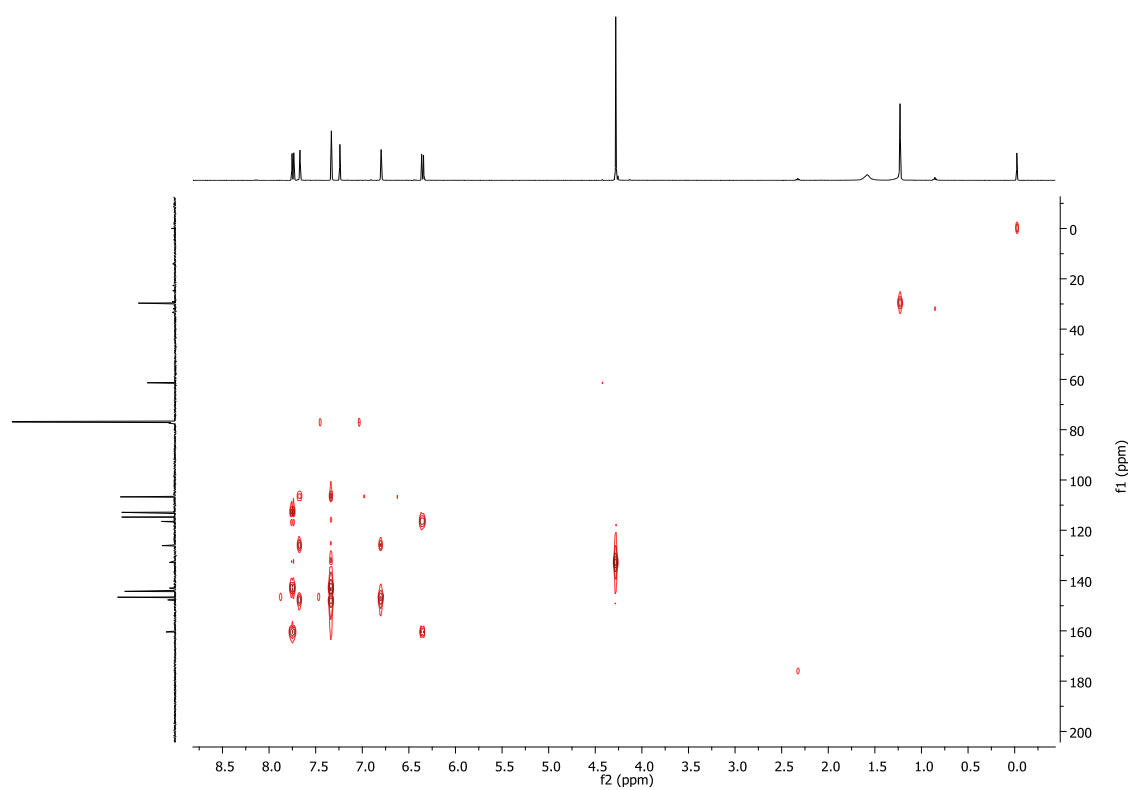
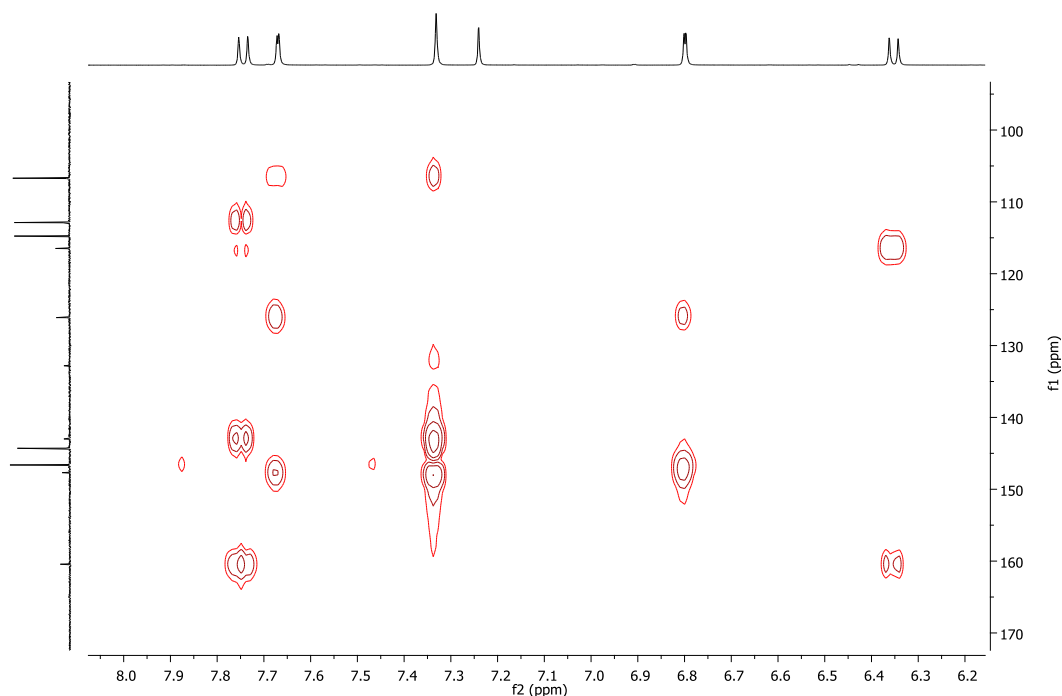


Figura 25- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-2* na região de (8,0-6,2 ppm) x (170-95 ppm).



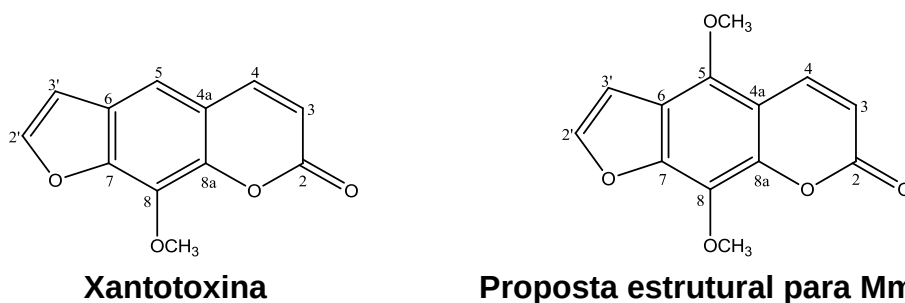
5.1.3. Determinação estrutural de *Mm-3*

A substância *Mm-3* foi isolada na forma de um pó amarelo esverdeado, com ponto de fusão de 148,9-151,5 °C (lit. 152 °C) (RAZDAN et al., 1987) e massa de 110,3 mg ($5,8 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-MS (Figura 27) mostrou um pico em 269,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_5$ (calc. 246,0).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CDCl_3) de *Mm-3* (Figuras 28, 29 e 30) mostraram sinais bastante semelhantes aos observados para xantotoxina (*Mm-2*) (pág. 72), sugerindo que a substância em questão também tratava-se de uma furanocumarina linear.

No espectro de RMN ^1H (Figuras 28 e 29) de *Mm-3* foram observados os dubletos em δ_{H} 6,25 ($J = 10,0$ Hz) e 8,09 ($J = 10,0$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, do anel δ -lactônico α,β -insaturado, bem como os sinais em δ_{H} 7,59 (d , $J = 2,5$ Hz) e 6,97 (d , $J = 2,5$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3', do anel furânico. Diferente da xantotoxina, não foi observado o sinal em δ_{H} 7,33 atribuído ao hidrogênio H-5 do anel aromático, em contrapartida, o espectro de *Mm-3* mostrou dois

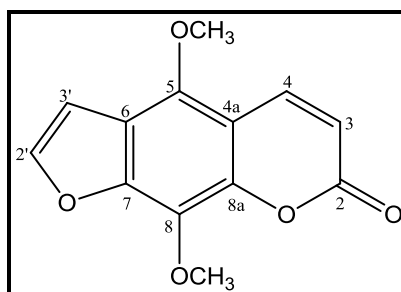
singletos, com integral para três hidrogênios cada, em δ_H 4,14 e 4,15, sugerindo que em *Mm-3* o hidrogênio 5 também fora substituído por uma metoxila. Essa proposta foi fortalecida pelo espectro de massas (Figura 27), no qual observamos o acréscimo de 30 unidades de massas quando comparado com o espectro obtido para xantotoxina.



A estrutura proposta foi confirmada através da análise do espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 30), onde foi observado o sinal em δ_C 144,27, atribuído a C-5, bem como dos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) (Figuras 31, 32, 33 e 34). Dentre as correlações observadas no espectro de HMBC, temos a correlação entre o hidrogênio H-4 (δ_H 8,09) e os hidrogênios da metoxila (δ_H 4,15) com o carbono em δ_C 144,27 (C-5), confirmando, assim, a inserção da metoxila nesse carbono. As demais correlações encontram-se compiladas na Tabela 3.

Sendo assim, após as análises espectrais de *Mm-3*, bem como a comparação com os dados apresentados por *Mm-2* e os dados citados por Dincel e colaboradores (2013) permitiram identificá-la como sendo a furanocumarina, isopimpineline (Figura 26).

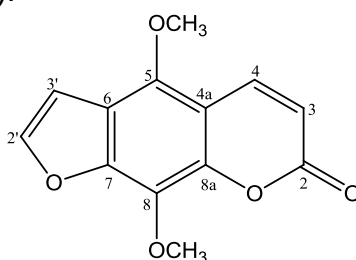
Figura 26- Estrutura química de *Mm-3*: isopimpineline.



A isopimpineline está sendo relatada pela primeira vez para a espécie *M. mollis*, embora já tenha sido isolada em outras espécies do gênero (MÜLLER et

al., 1995; BAETAS et al., 1996; PERNIN et al., 1999). Quanto ao efeito farmacológico, foram encontrados relatos de atividades antioxidante e anticolinesterásica (DINCEL et al., 2013), antiplasmódica e larvicida (NYAHANGA et al., 2013), antifibrótica (SHIN et al., 2011), fototóxica (RAQUET; SCHRENK, 2014), citotóxica (AUTORE et al., 2015), inseticida (WANG et al., 2012) e antitumoral (KLEINER; REED; DIGIOVANNI, 2003) para a isopimpinellina.

Tabela 3- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Mm-3* (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da isopimpinellina (400 MHz, CDCl_3) (DINCEL et al., 2013) (δ em ppm, J em Hz).



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC		Isopimpinellina (DINCEL et al., 2013)	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
2	160,44		H-3	H-4	160,46	
3	112,84	6,25 (<i>d</i> , $J=10,0$)			112,89	6,22 (<i>d</i> , $J=9,8$)
4	139,37	8,09 (<i>d</i> , $J=10,0$)			139,38	8,06 (<i>d</i> , $J=9,8$)
4a	107,62			H-3	107,67	
5	144,27			H-4; 5-OCH ₃	144,01	
6	114,79		H-3'	H-2'	114,83	
7	149,99			H-2'; H-3'	150,03	
8	128,20			8-OCH ₃	128,22	
8a	143,67				143,01	
2'	145,10	7,59 (<i>d</i> , $J=2,5$)			145,12	7,56 (<i>d</i> , $J=2,3$)
3'	105,07	6,97 (<i>d</i> , $J=2,5$)	H-2'		105,07	6,93 (<i>d</i> , $J=2,3$)
5-OCH ₃	61,69	4,14 (<i>s</i>)			61,71	4,10 (<i>s</i>)
8-OCH ₃	60,82	4,15 (<i>s</i>)			60,83	4,11 (<i>s</i>)

Figura 27- Espectro de massas em baixa resolução de *Mm-3*.

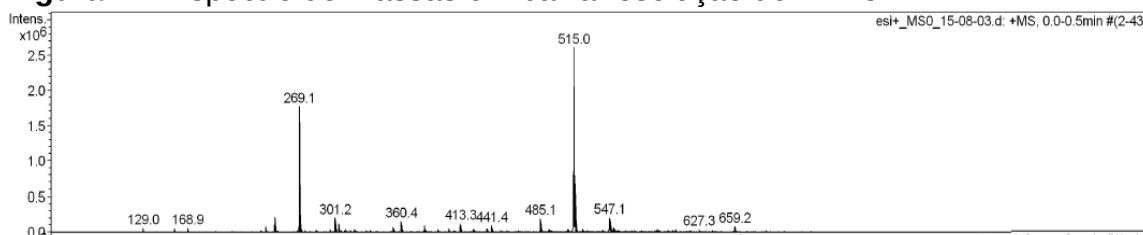


Figura 28- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-3*.

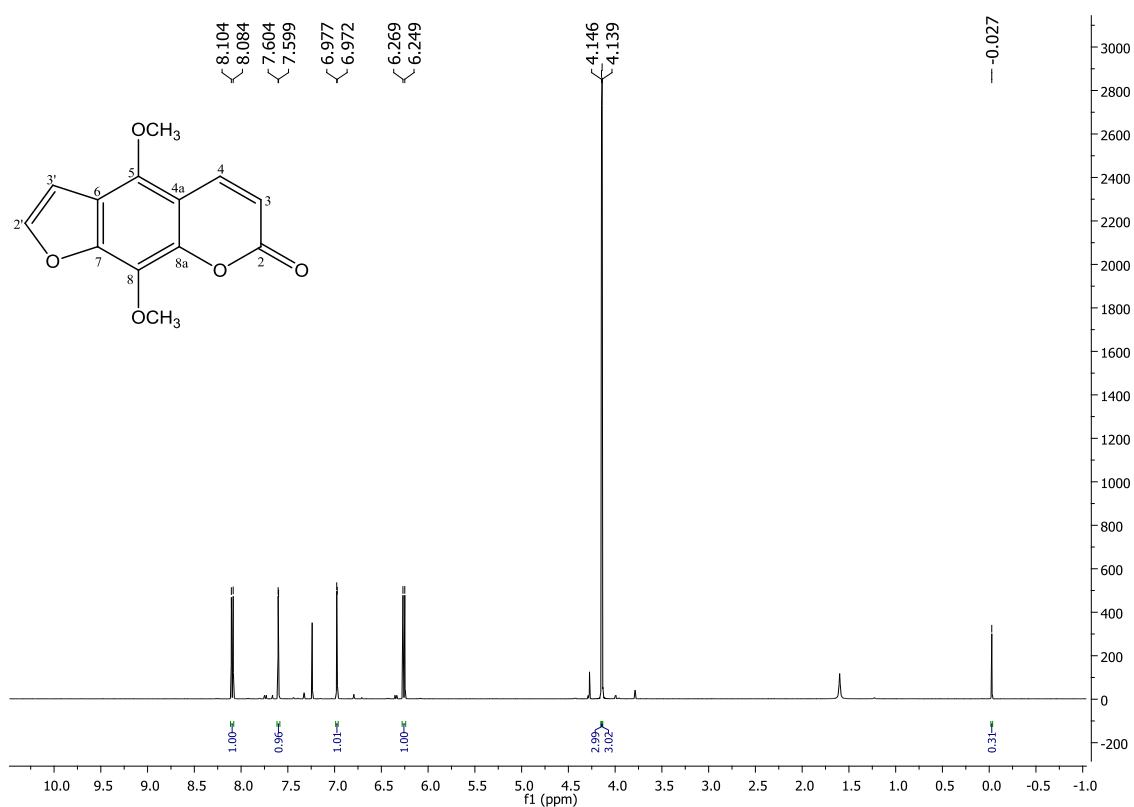


Figura 29- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-3* na região de 8,3-6,0 ppm.

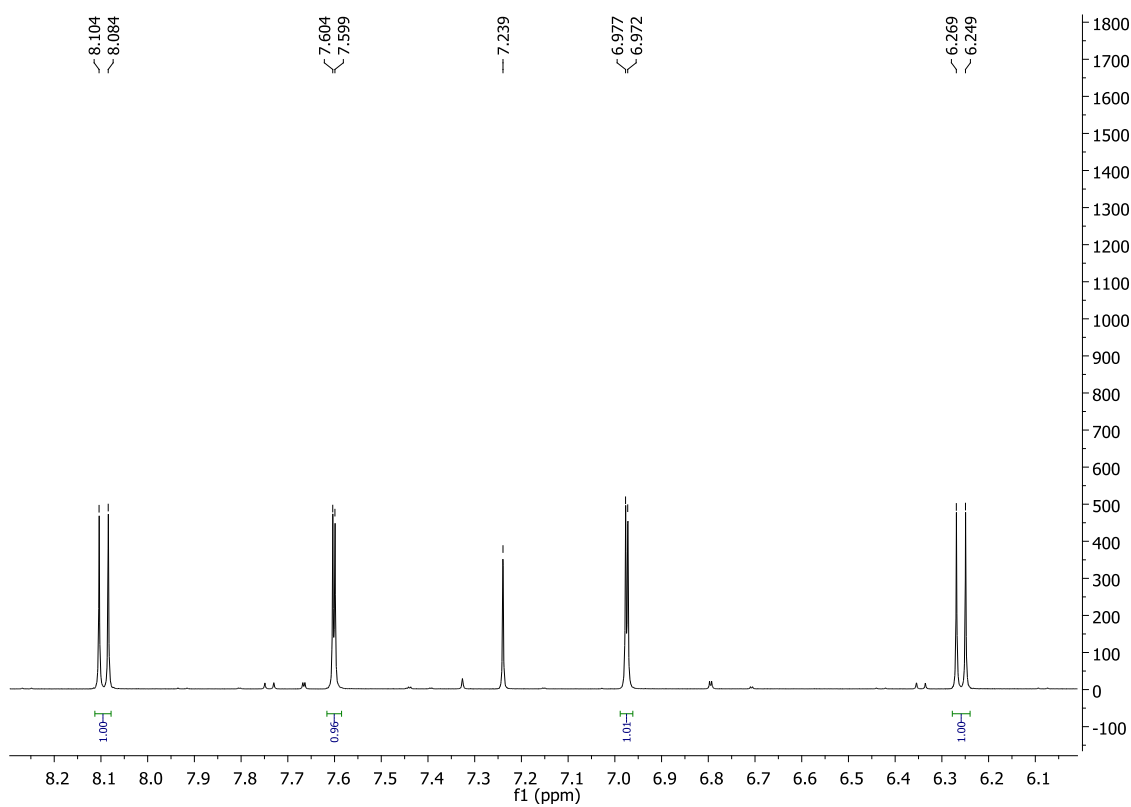


Figura 30- Espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de *Mm-3*.

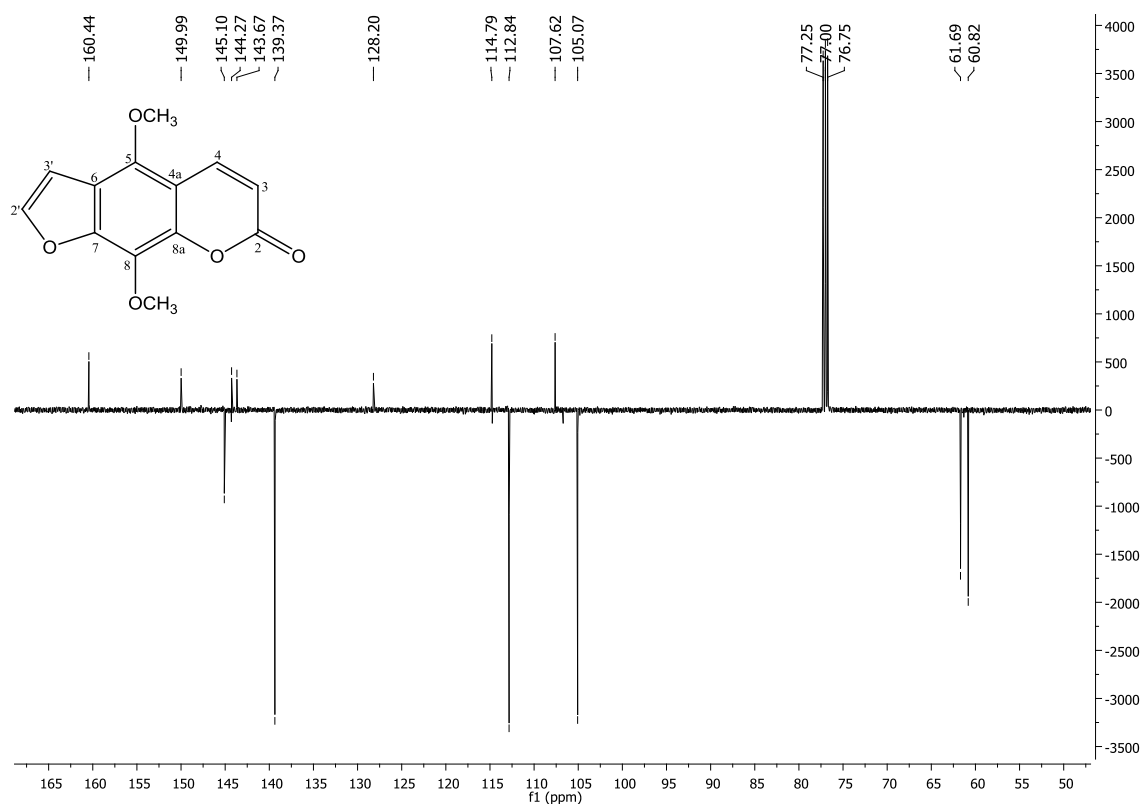


Figura 31- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-3*.

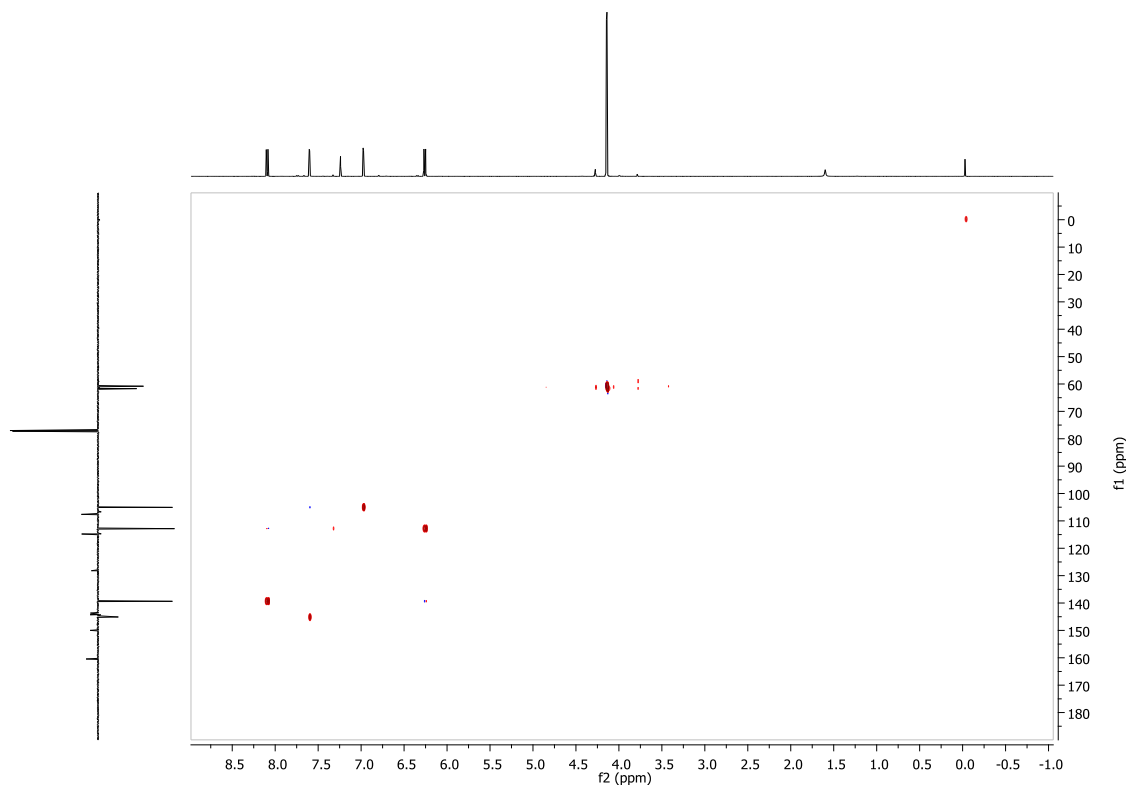


Figura 32- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-3* na região de (8,2-5,5 ppm) x (160-100 ppm).

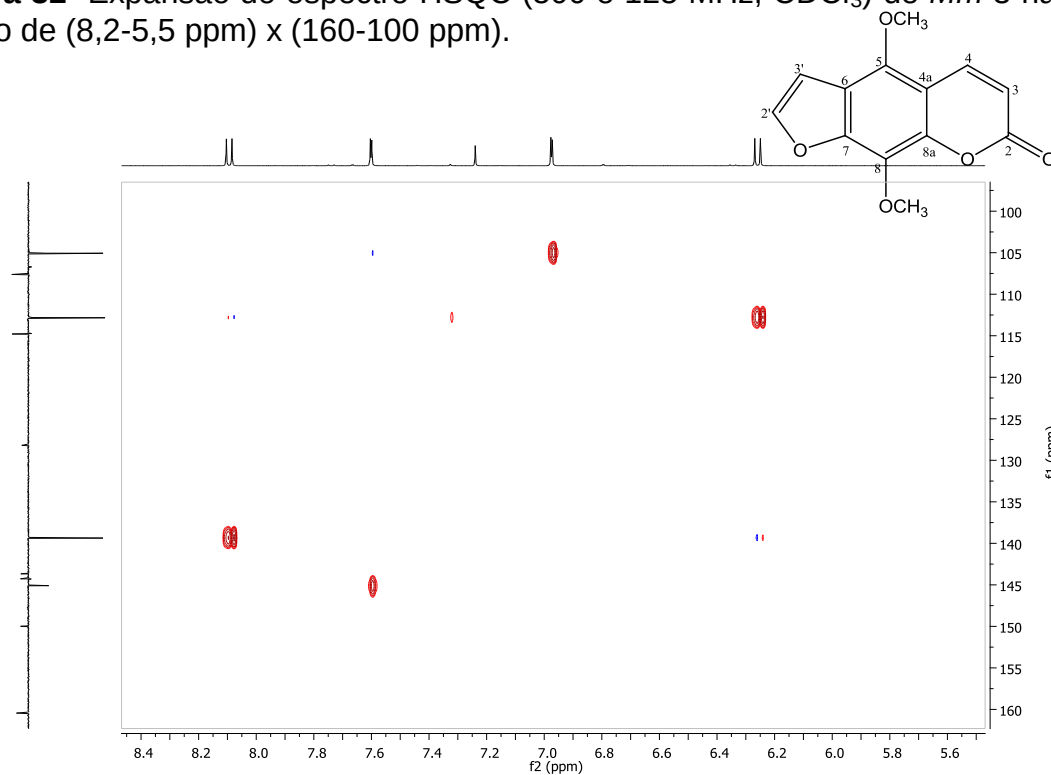


Figura 33- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-3*.

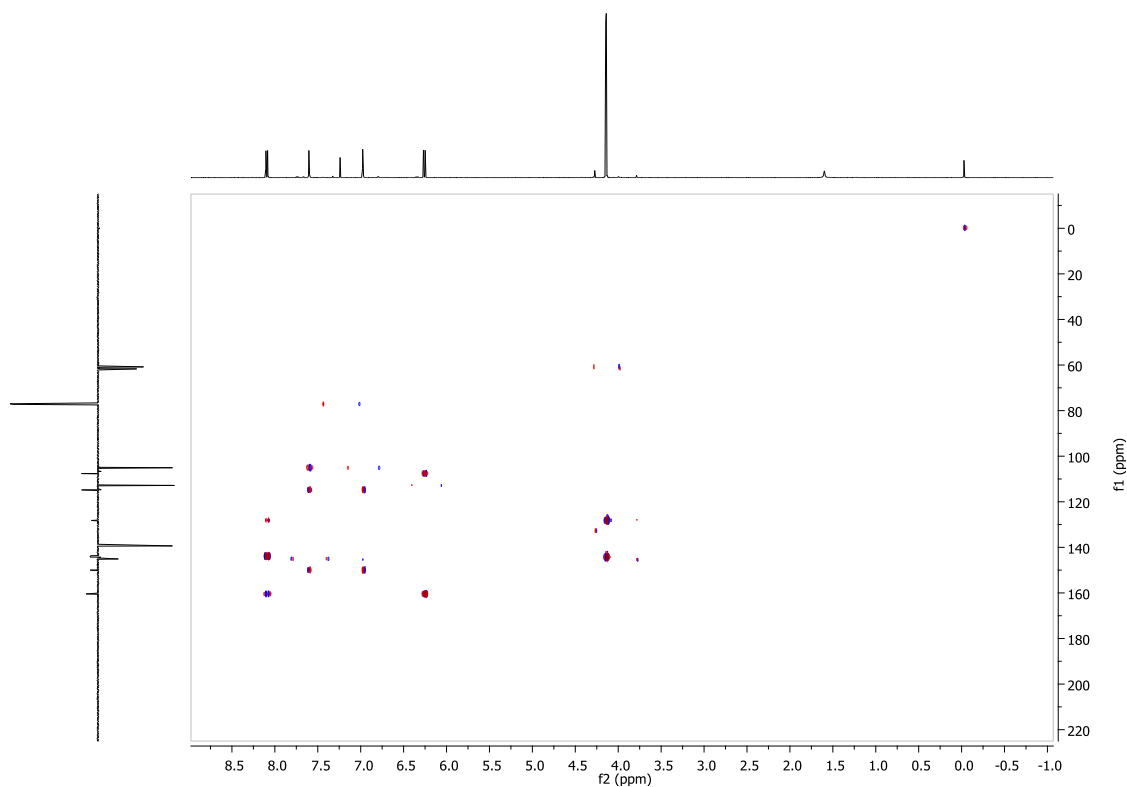
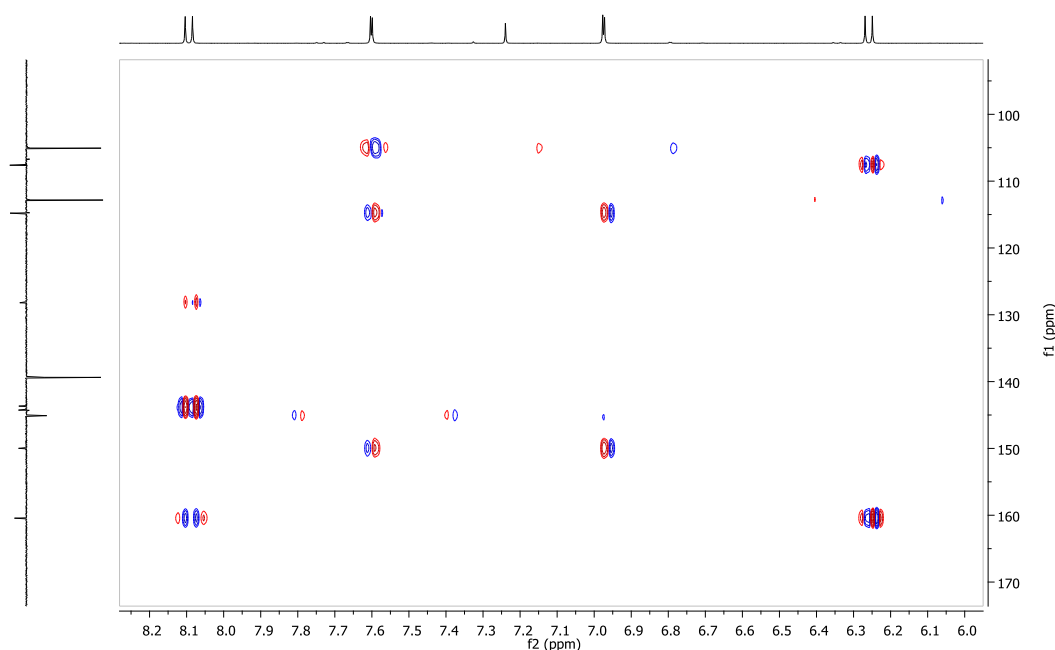


Figura 34- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-3* na região de (8,2-6,0 ppm) x (170-90 ppm).



5.1.4. Determinação estrutural de *Mm-4*

A substância codificada como *Mm-4* foi obtida na forma de cristais incolores, com ponto de fusão de 139,3-141,8 °C (lit. 137-139 °C) (GUNATILAKA et al., 1982) e massa de 162,5 mg ($8,55 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada).

No espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 36) observou-se um conjunto de sinais entre δ_{H} 0,65-2,26 que juntamente com os 29 sinais observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 37) foi possível sugerir que *Mm-4* tratava-se de uma substância com núcleo esteroidal do tipo estigmasteno (KOJIMA et al., 1990).

O sinal em δ_{C} 71,79 e o duplete de tripleto em δ_{H} 3,48, permitiram sugerir a presença de função álcool em C-3 (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012).

Os sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 121,70 e não hidrogenado em δ_{C} 140,72 são compatíveis com dupla ligação localizada em C-5 e C-6, sendo o duplete em δ_{H} 5,32 ($J = 4,4$ Hz) atribuído a H-6.

Mediante aos dados espectrais observados e em comparações com os apresentados por Chaturvedula e Prakash (2012) (Tabela 4) pode-se concluir

que *Mm-4* se tratava do β -sistosterol (Figura 35). Composto já relatado no gênero *Metrodorea* (BAETAS et al., 1996; MÜLLER et al., 1995) e descrito pela primeira vez para a espécie *M. mollis*.

Figura 35- Estrutura química de *Mm-4*: β -sistosterol.

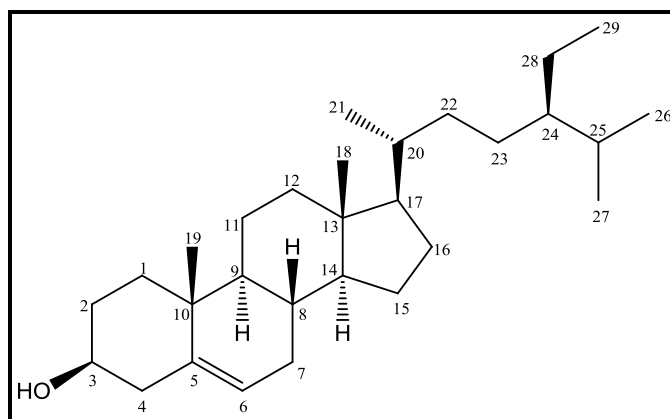
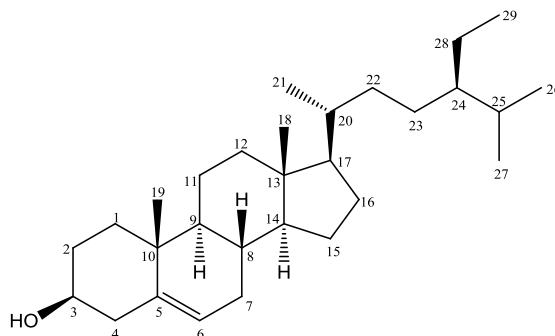


Tabela 4- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *Mm-4* (200 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C do β -sitosterol (600 MHz, CDCl_3) (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012) (δ em ppm, J em Hz).



<i>Mm-4</i>			β -sitosterol (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012)	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,23		37,5	
2	31,62		31,9	
3	71,79	3,48 (dt, $J=5,6$; 5,6 e 10,6)	72,0	3,53 (tdd, $J=4,5$; 4,2 e 3,8)
4	42,29		42,5	
5	140,72		140,9	
6	121,70	5,32 (d, $J=4,4$)	121,9	5,36 (d, $J=6,4$)
7	31,87		32,1	
8	31,87		32,1	
9	50,09		50,3	
10	36,48		36,7	
11	21,07		21,3	
12	39,75		39,9	
13	42,29		42,6	
14	56,73		56,9	
15	24,29		26,3	
16	28,24		28,5	
17	56,02		56,3	
18	36,13		36,3	
19	19,39		19,2	
20	33,91		34,2	
21	26,02		26,3	
22	45,79		46,1	
23	23,04		23,3	
24	11,97		12,2	
25	29,11		29,4	
26	19,82		20,1	
27	19,02		19,6	
28	18,77		19,0	
29	11,85		12,0	

Figura 36- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de *Mm-4*.

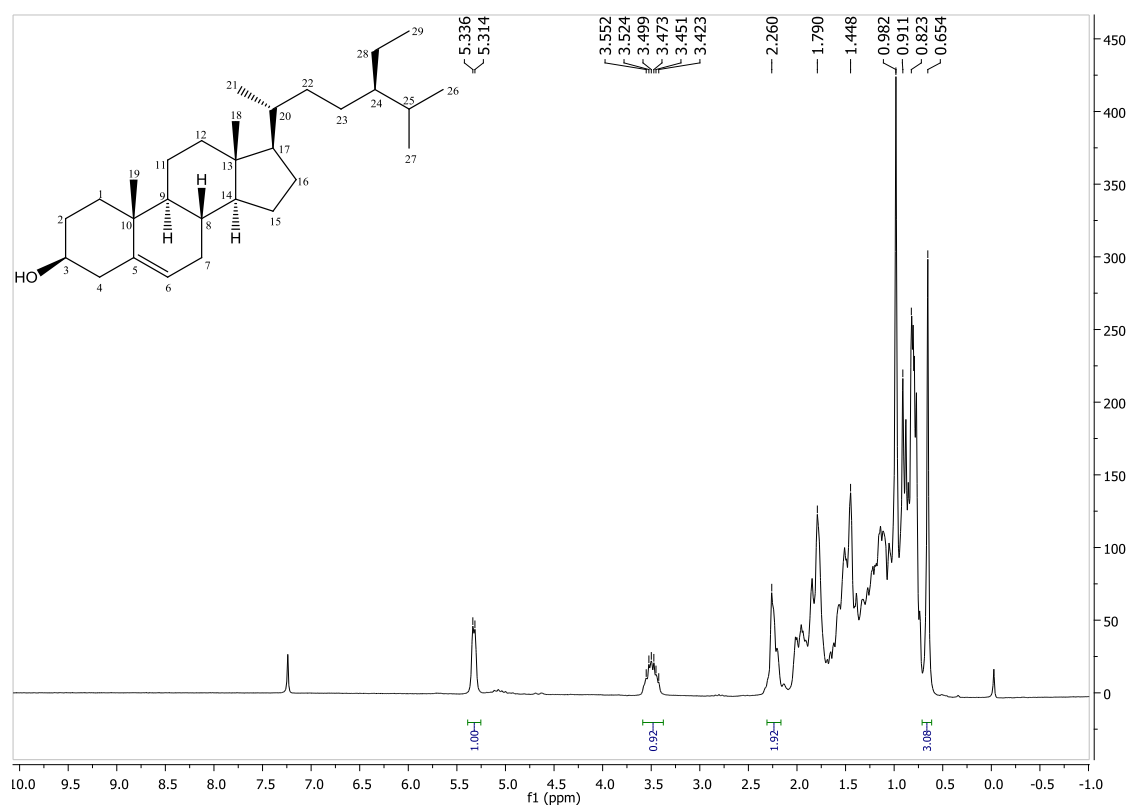
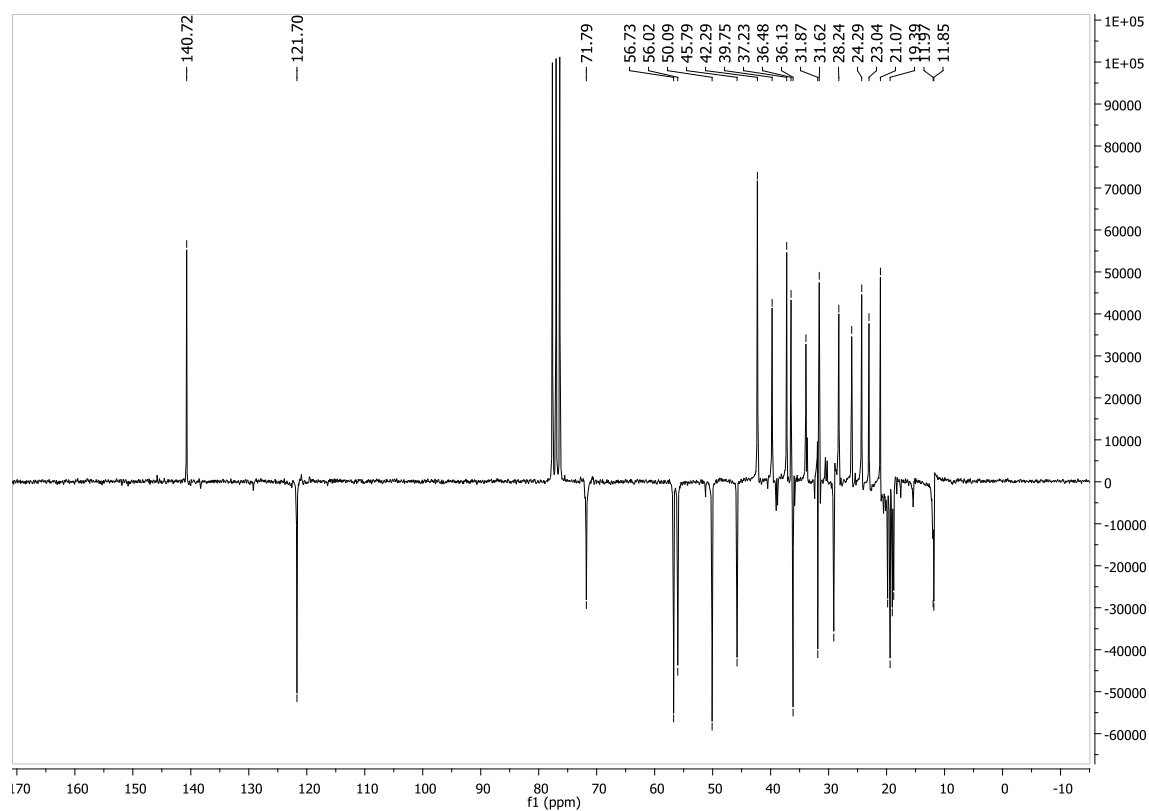


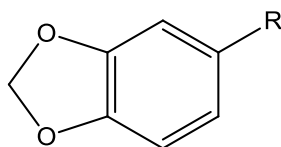
Figura 37- Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de *Mm-4*.



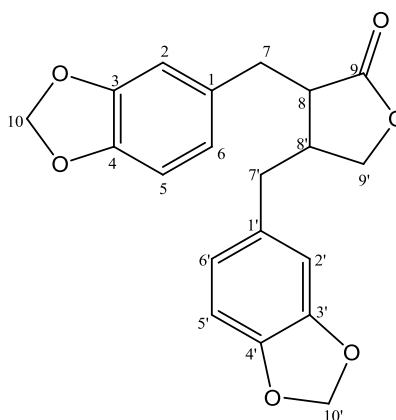
5.1.5. Determinação estrutural de *Mm-5*

A substância codificada como *Mm-5* foi isolada na forma de um óleo amarelo, com massa de 9,4 mg ($0,5 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). A rotação óptica, obtida em polarímetro Jasco (modelo P-2000) foi $[\alpha]_D^{22} = -13,9$ (c 0,1, CHCl_3). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-MS (Figura 39) mostrou um pico em 377,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ (calc. 354,1).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Figura 43) observou-se a presença de 17 sinais correspondentes a 20 átomos de carbonos. Destes, 7 sinais foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 8 sinais a carbonos metínicos e 5 a carbonos metilênicos. Os sinais em δ_{C} 101,0, característicos de grupo metilenodióxi, bem como os sinais em δ_{C} 108,27, 108,34, 108,76, 109,41, 121,52 e 122,21 indicaram a presença de dois grupos arila tri-substituídos (TAKAKU et al., 2001; FRANÇA et al., 2005).



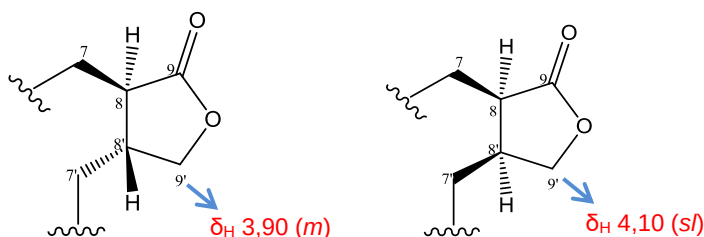
Ainda no espectro de RMN ^{13}C -APT, foram observados os sinais para carbono não hidrogenado em δ_{C} 178,44, característico de lactona em anel de cinco membros, e em δ_{C} 71,14, característico de carbono oximetilênico, bem como os sinais para carbonos metilênicos em δ_{C} 34,82 e 38,36 permitiram inferir para essa substância o esqueleto básico de uma lignana dibenzilbutirolactônica (FRANÇA et al., 2005).



Proposta estrutural para *Mm-5*

No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) (Figuras 40, 41 e 42) observou-se um singlete em δ_{H} 5,92, com integral para quatro hidrogênios, corroborando com os dados de RMN de ^{13}C para a presença do grupo metilenodióxi. Observou-se ainda, na região de hidrogênios em sistemas aromáticos, a presença de sinais referentes a seis hidrogênios, caracterizando os dois sistemas aromáticos trissubstituídos. Esses dados em comparação com dados da literatura (FRANÇA et al., 2005) nos levaram a sugerir que a estrutura em questão se tratava da lignana dibenzilbutirolactônica hinoquinina.

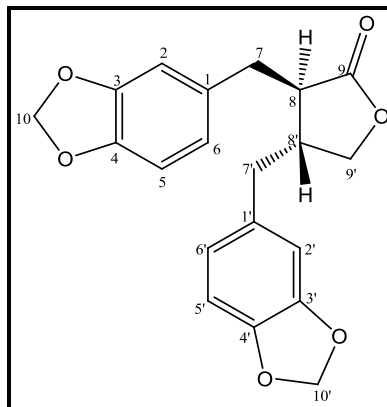
O espectro de RMN de ^1H , também apresentou dois duplodubletos, um em δ_{H} 3,84 e outro em δ_{H} 4,11, indicando que esta lignana possui configuração relativa do tipo *trans*. Uma vez que, segundo dados da literatura, quando os hidrogênios H-8 e H-8' encontram-se na posição *cis*, os hidrogênios H-9' tornam-se equivalentes e geram um singlete largo em δ_{H} 4,10. Quando H-8 e H-8' são *trans*, os hidrogênios H-9' não são equivalentes e aparecem como multiplete em δ_{H} 3,90 (FRANÇA et al., 2005).



Todos esses assinalamentos foram confirmados através da análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 44, 45 e 46) e HMBC (Figuras 47, 48, 49 e 50). No espectro HMBC, observou-se correlações entre os sinais em δ_{H} 2,96 (H-7) e 6,67 (H-5) com o sinal δ_{C} 131,56 (C-1) e entre o sinal em δ_{H} 4,11 (H-9') com os em δ_{C} 178,44 (C-9) e 41,27 (C-8'). As demais correlações estão descritas na Tabela 5.

Mediante ao que foi exposto e em comparação com os dados da literatura (FRANÇA et al., 2005) (Tabela 5), foi possível identificar Mm-5 como sendo a lignana (-) hinoquinina (Figura 38).

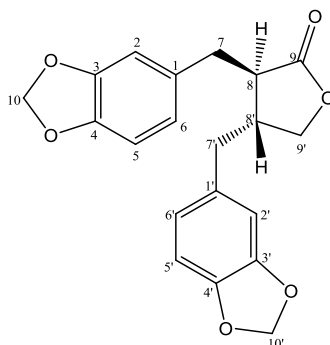
Figura 38- Estrutura química de Mm-5: (-) hinoquinina.



Essa substância já foi relatada em outros gêneros da família Rutaceae (CHENG et al., 2005; CHEN et al., 2004; CUCA et al., 1998; ADESINA et al., 1997), no entanto, trata-se do primeiro relato no gênero *Metrodorea*.

De acordo com a literatura, a hinoquinina apresenta diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, as atividades anti-inflamatória, citotóxica, antimicrobiana e anti-tripanosoma (MARCOTULLIO; PELOSI; CURINI, 2014).

Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Mm-5* (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da hinoquinina (200 MHz, CDCl_3) (FRANÇA et al., 2005) (δ em ppm, J em Hz).



$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$					Hinoquinina	
HMQC					(FRANÇA et al., 2005)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	131,56		H-2	H-5; H-7	131,5	
2	108,27	6,71 (d , $J=4,8$)		H-6; H-7	108,2	6,70 (d , $J=1,6$)
3	147,86		H-2	H-5	147,8	
4	146,44				146,3	
5	108,34	6,67 (d , $J=8,0$)			108,3	6,68 (d , $J=8,2$)
6	121,52	6,44 (m)		H-7	121,5	6,45 (dd , $J=8,2$ e 1,6)
7	34,82	2,96 (dd , $J=14,0$ e 4,8) 2,82 (dd , $J=14,0$ e 7,2)			34,8	
8	46,47	2,49 (m)	H-7	H-7'	46,5	
9	178,44		H-8	H-7; H-9'	178,3	
10	101,01	5,92 (s)			101,0	5,92 (s)
1'	131,28		H-7'	H-8'	131,2	
2'	109,41	6,59 (m)		H-7'	109,4	6,60 (d , $J=1,6$)
3'	147,86			H-5'	147,8	
4'	146,44			H-2'; H-6'	146,4	
5'	108,76	6,44 (m)			108,7	6,42 (d , $J=8,0$)
6'	122,21	6,59 (m)		H-2'; H-5'; H-7'	122,2	6,58 (dd , $J=8,0$ e 1,6)
7'	38,36	2,49 (m)		H-2'; H-6'; H-9'	38,3	
8'	41,27	2,49 (m)	H-7'; H-9'	H-7	41,3	
9'	71,14	4,11 (dd , $J=9,2$ e 7,2) 3,84 (dd , $J=9,2$ e 7,2)		H-7'	71,1	3,90 (m)
10'	101,01	5,92 (s)			101,0	5,91 (s)

Figura 39- Espectro de massas em baixa resolução de *Mm-5*.

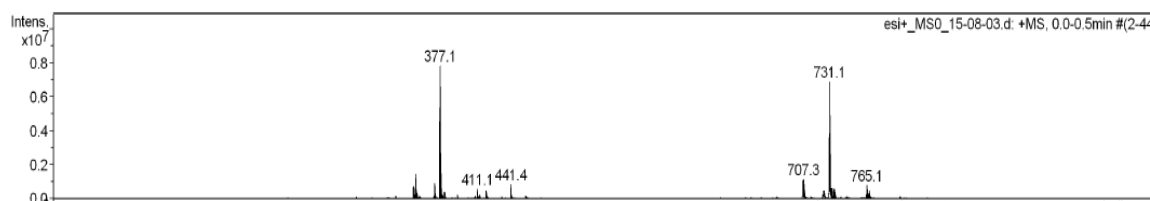


Figura 40- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Mm-5*.

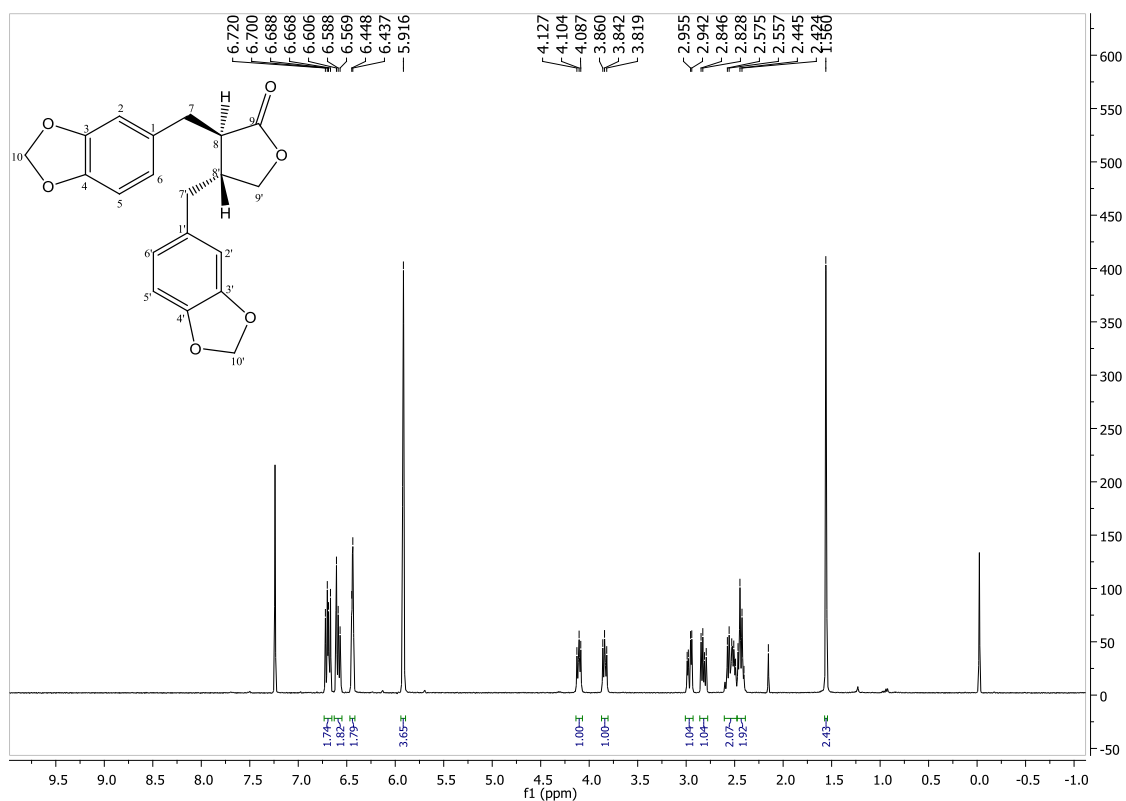


Figura 41- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Mm-5* na região de 7,3-5,8 ppm.

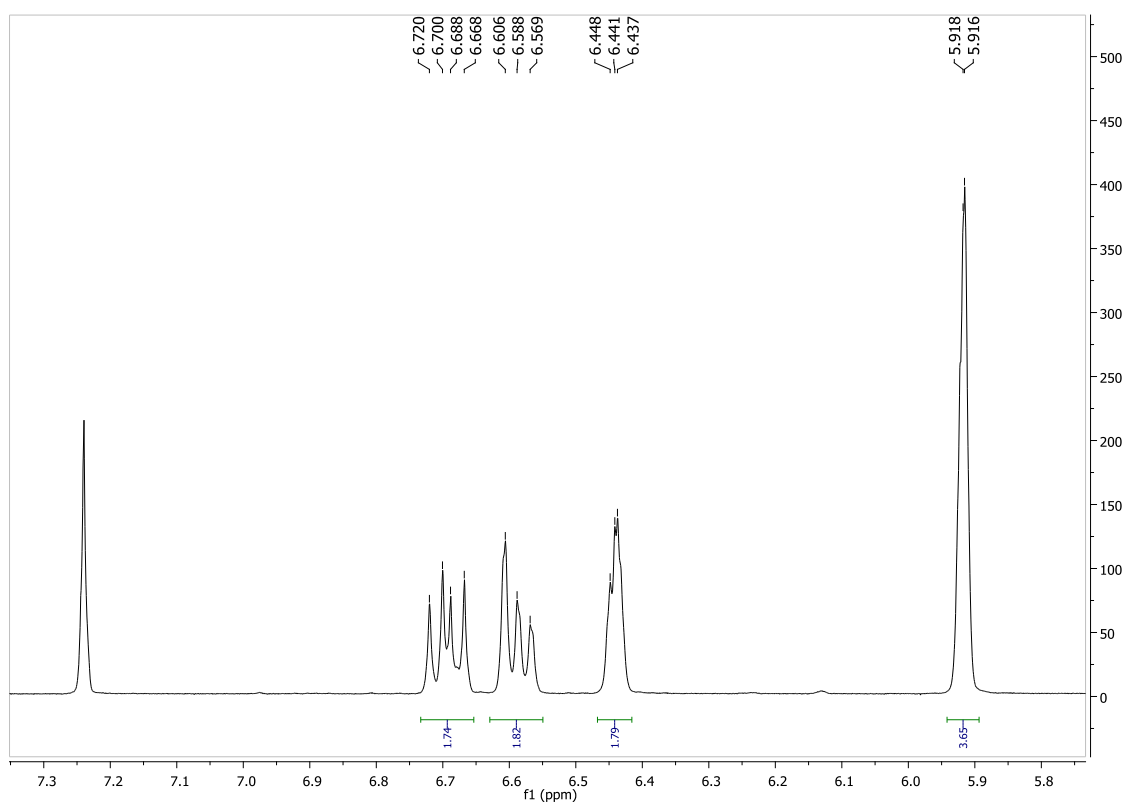


Figura 42- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Mm-5* na região de 4,3-1,9 ppm.

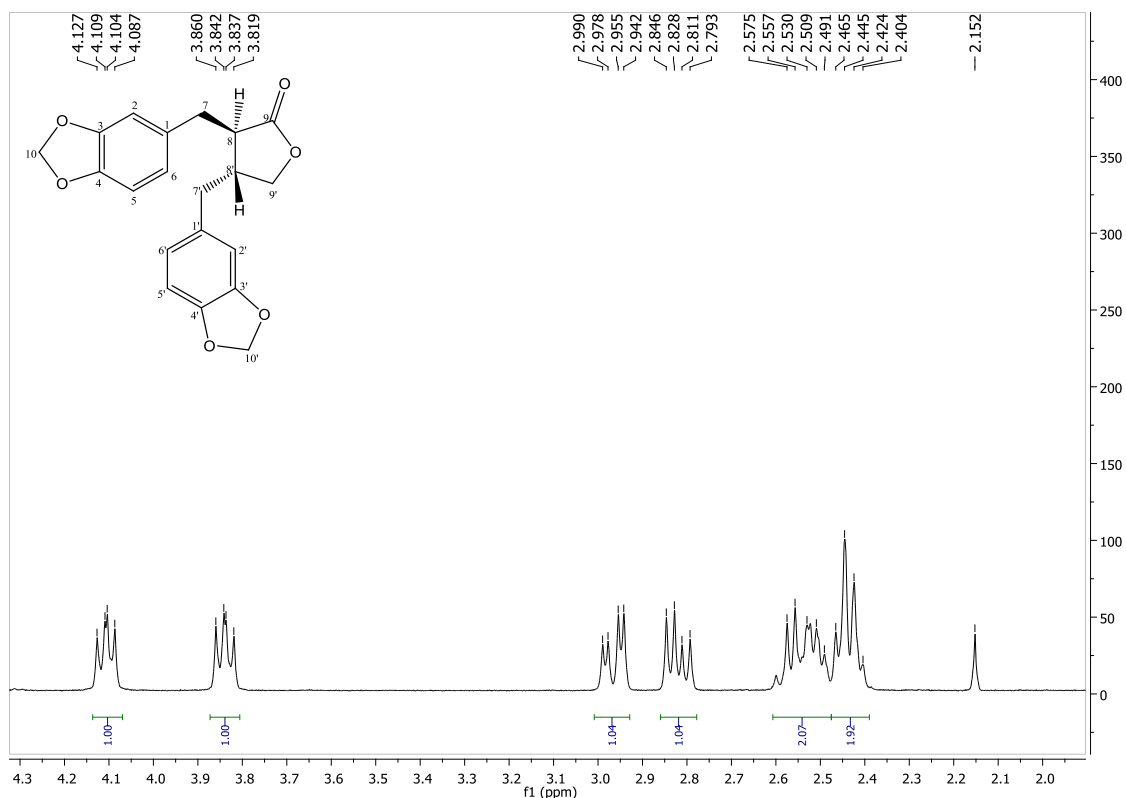


Figura 43- Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz, CDCl_3) de *Mm-5*.

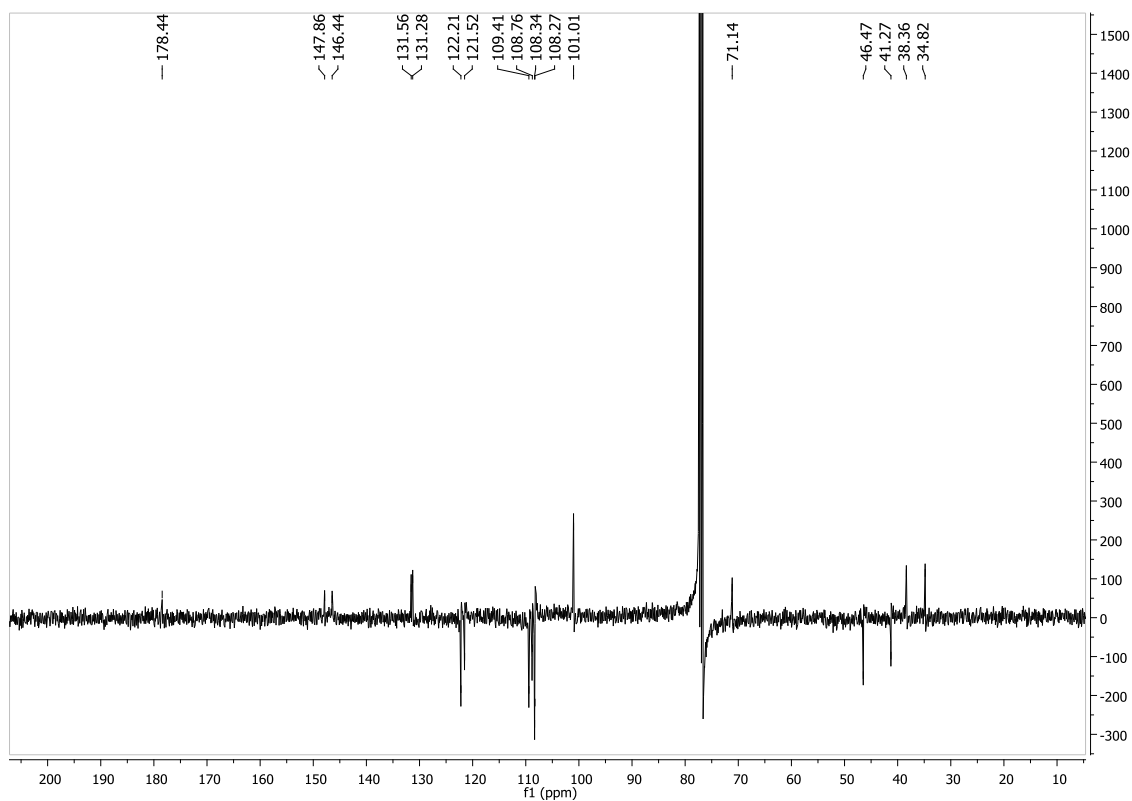


Figura 44- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm-5*.

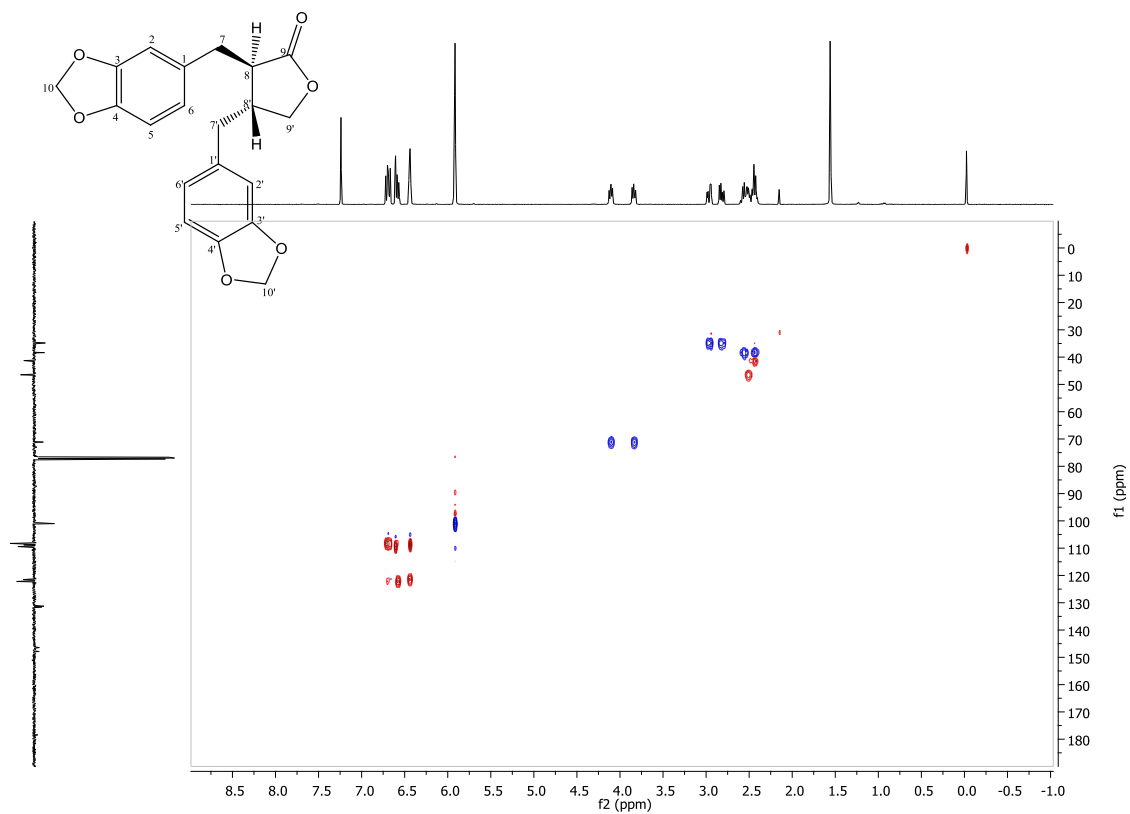


Figura 45- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm-5* na região de (7,1-5,6 ppm) x (135-85 ppm).

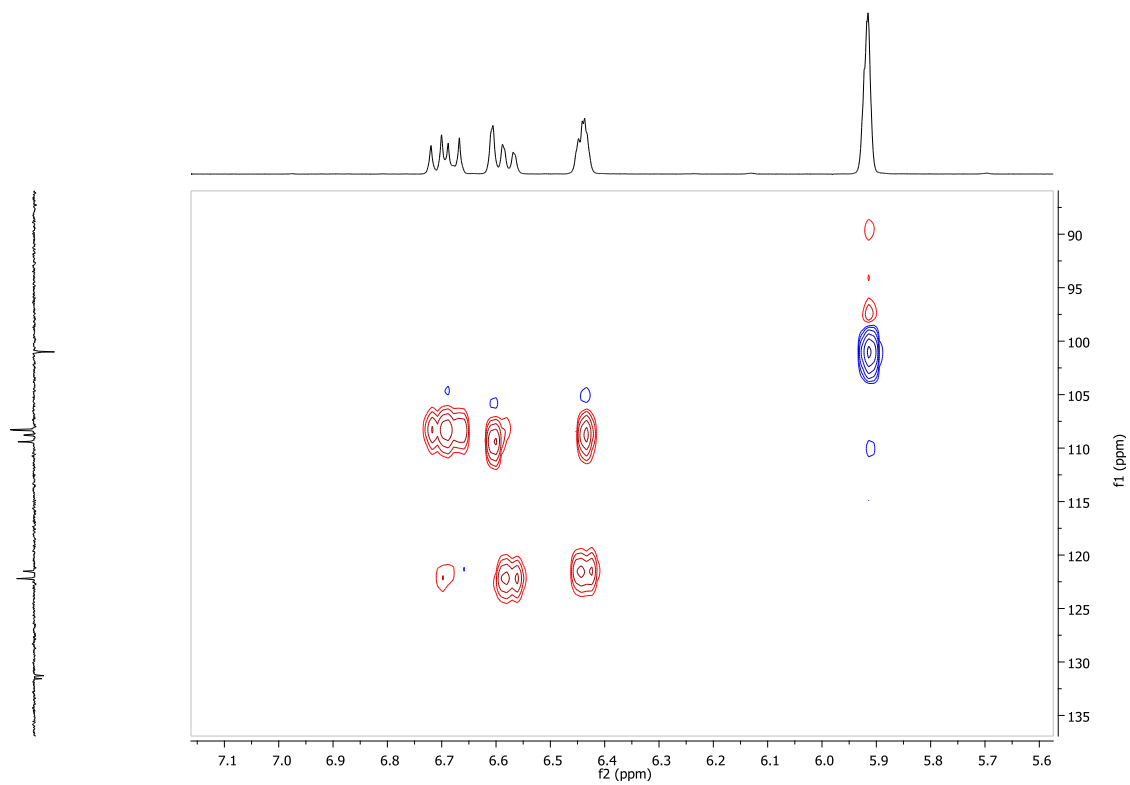


Figura 46- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm*-5 na região de (7,1-5,6 ppm) x (135-85 ppm).

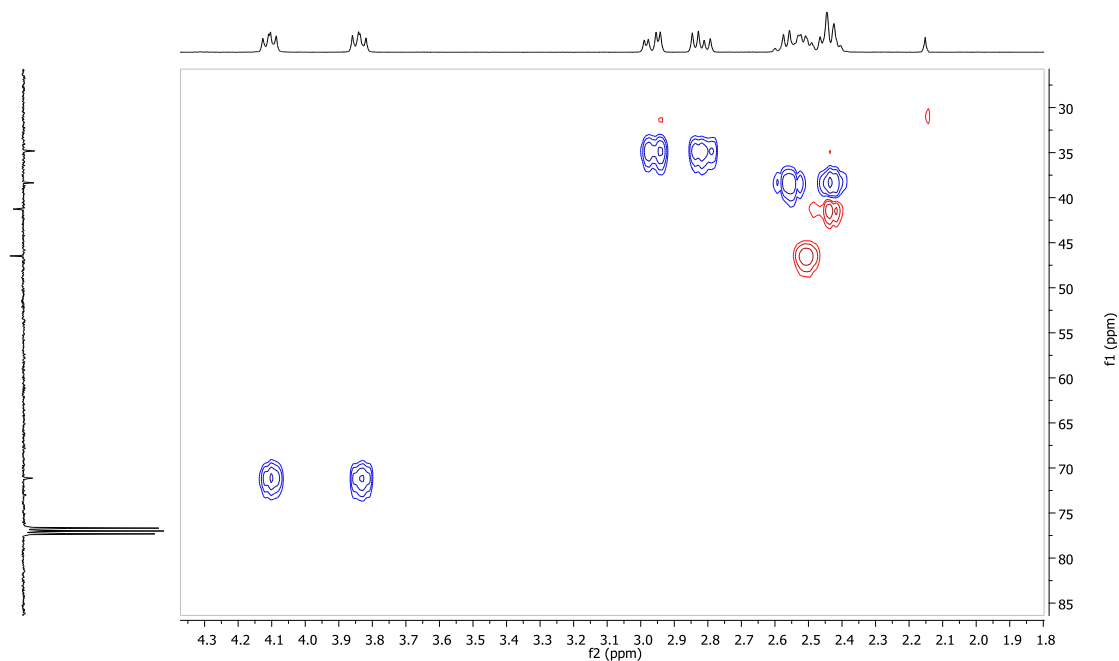


Figura 47- Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm*-5.

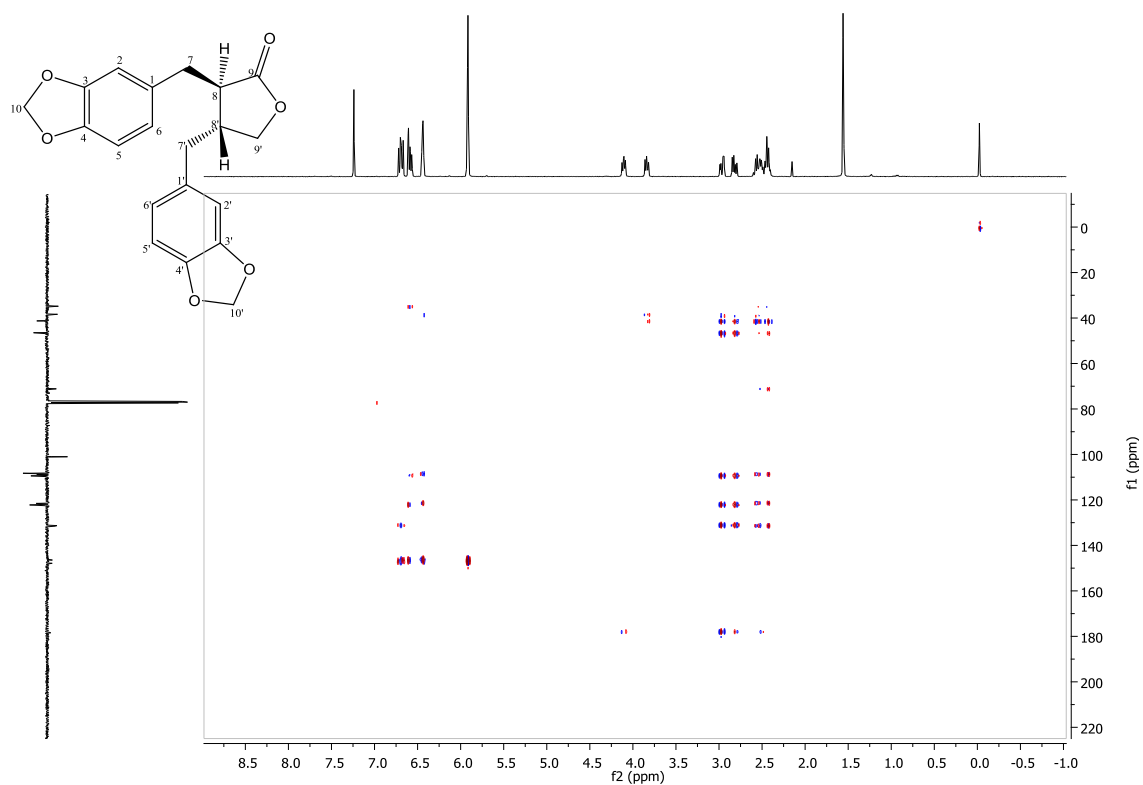


Figura 48- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm-5* na região de (6,8-5,8 ppm) x (150-30 ppm).

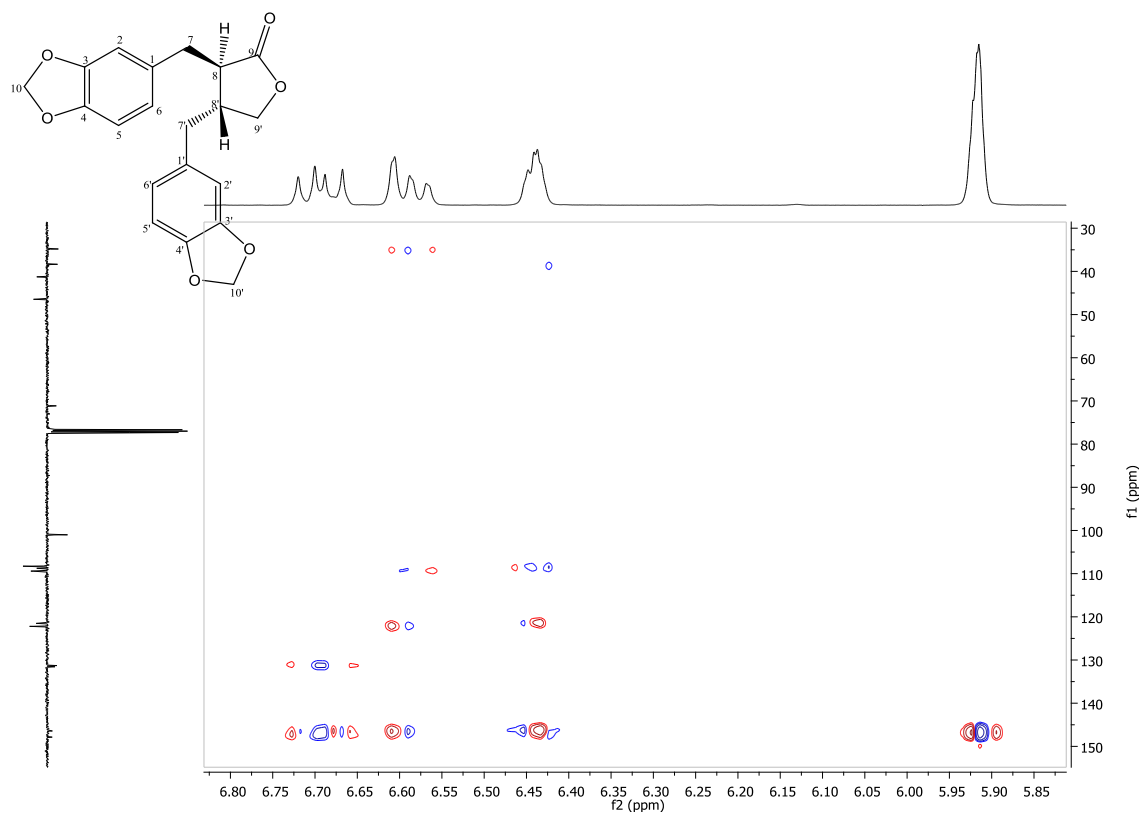


Figura 49- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm-5* na região de (3,9-2,2 ppm) x (75-30 ppm).

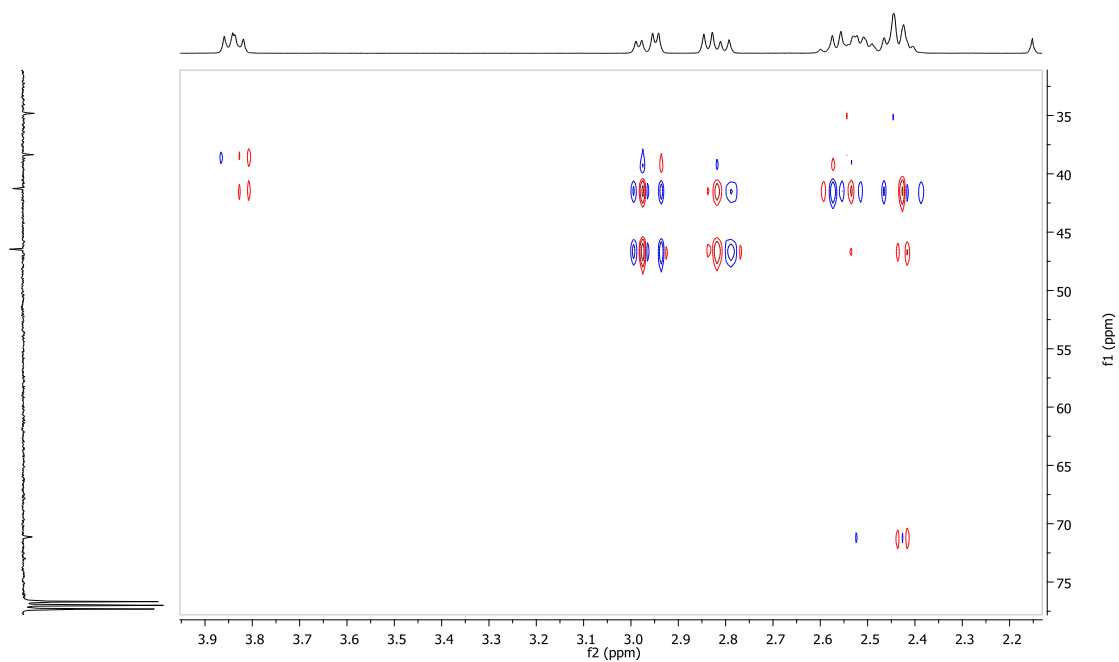
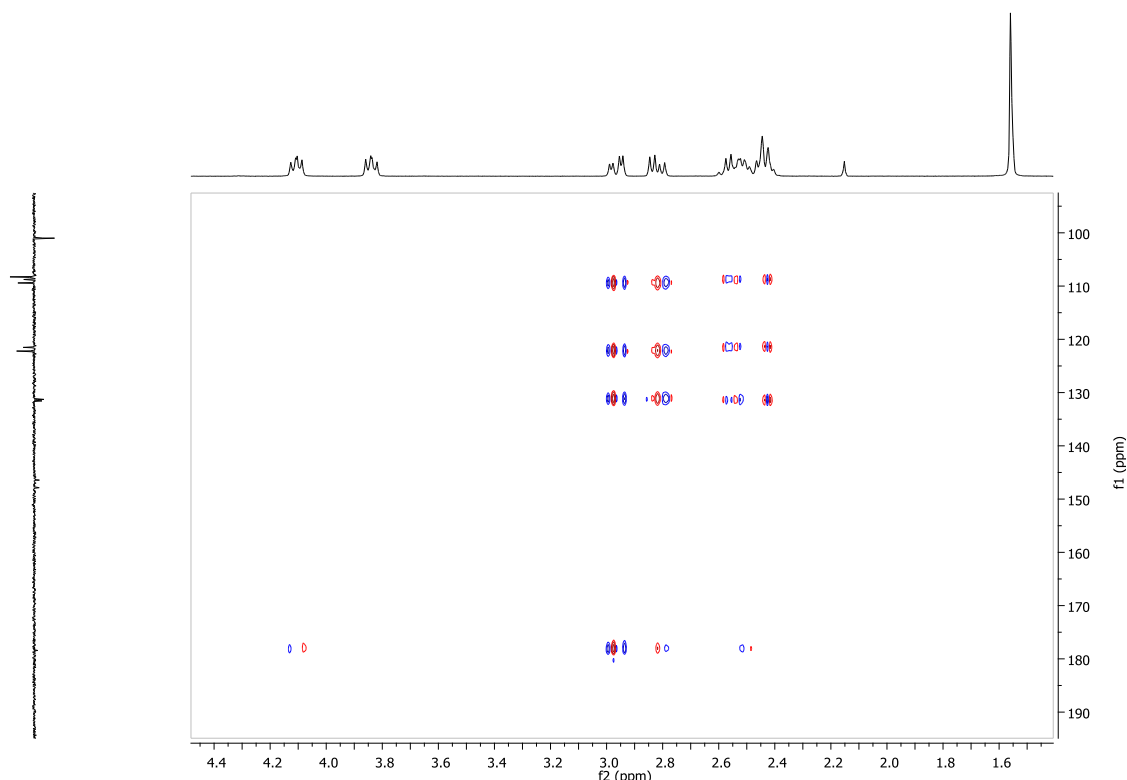


Figura 50- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Mm-5* na região de (4,4-1,5 ppm) x (190-100 ppm).



5.1.6. Determinação estrutural de *Mm-6*

A substância *Mm-6* foi isolada na forma de cristais amarelo e massa de 12,3 mg ($0,65 \times 10^{-3} \%$ em relação à massa da planta seca e pulverizada). A rotação óptica, obtida em polarímetro Jasco (modelo P-2000) foi $[\alpha]_D^{22} = -8,3$ (c 0,1, CHCl_3). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-MS (Figura 52) mostrou um pico em 375,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ (calc. 352,1).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 56) observou-se a presença de 20 sinais, correspondentes a 8 carbonos não hydrogenados, 8 carbonos metínicos e 4 carbono metilênicos.

A semelhança dos espectros de RMN ^{13}C e de ^1H da substância *Mm-6* com os de *Mm-5* (hinoquinina) (pág. 89) nos levou a sugerir que ambas possuíam o mesmo esqueleto, ou seja, o esqueleto básico de uma lignana dibenzilbutirolactônica.

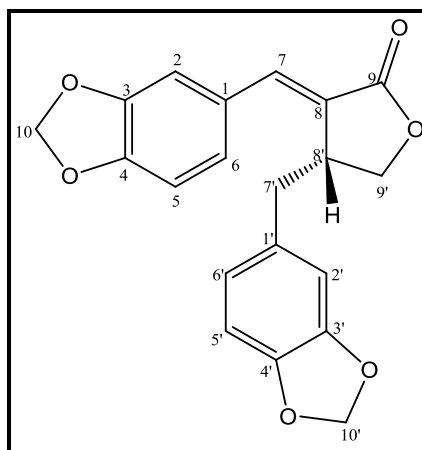
Comparando-se o espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 56) de *Mm-6* com o da hinoquinina (*Mm-5*) (Figura 43), observamos a ausência dos sinais em δ_{C}

34,82 e 46,47, atribuídos, respectivamente, ao carbono metilênico sp^3 C-7 e ao carbono metínico sp^3 C-8 da hinoquinina. Em *Mm-6* esses sinais foram substituídos pelos sinais em δ_C 125,80 (C-8) para carbono não hidrogenado e em δ_C 137,29 (C-7) para carbono metínico sp^2 .

Esses dados somados ao singlete largo em δ_H 7,48 observado no espectro de RMN ^1H (Figuras 53, 54 e 55), atribuído ao H-7 de *Mm-6*, como também a redução de duas unidades de massas (Figura 52) quando comparado com o espectro de massas de *Mm-5* (pág 92) nos permitiu inferir que *Mm-6* possuía uma dupla ligação entre os carbonos C-7 e C-8.

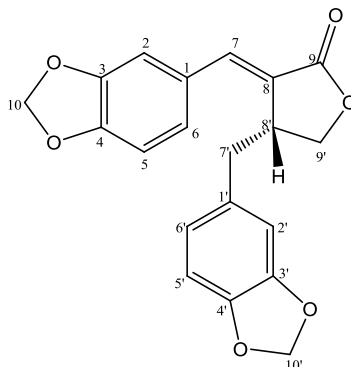
A estrutura foi confirmada através das correlações diretas observadas no espectro de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 57, 58 e 59) e no espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 60, 61 e 62) e estão de acordo com os descritos na literatura para a lignana (-) savinina (Figura 51) (TAKAKU et al., 2001). Na Tabela 6 estão compilados os deslocamentos químicos e as correlações observadas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais para *Mm-6*.

Figura 51- Estrutura química de *Mm-6*: (-) savinina.



Da mesma forma que a hinoquinina, savinina já foi isolada em outros gêneros da família Rutaceae (MORA et al., 2011; MBAZE et al., 2009; BADAWI et al., 1981), entretanto, está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Metrodorea*. Dentre as atividades biológicas relatadas para esta lignana, destacam-se as atividades antioxidante (MBAZE et al., 2009), antitumoral (CHO et al., 2001), antiviral (WEN et al., 2007) e citotóxica (LUO et al., 2013).

Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Mm-6* (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da savinina (400 MHz, CDCl_3) (TAKAKU et al., 2001) (δ em ppm, J em Hz).



$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC			Savinina (TAKAKU et al., 2001)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	
1	128,16		H-7	H-5	128,27		
2	108,65	7,02 (s)		H-6; H-7	108,76	7,03 (d, $J=1,7$)	
3	148,33			H-5; H-10	148,04		
4	149,17			H-2; H-6	149,45		
5	108,48	6,86 (d, $J=8,2$)			108,59	6,87 (d, $J=8,1$)	
6	126,08	7,06 (d, $J=8,2$)		H-2; H-7	126,19	7,07 (dd, $J=1,7$ e 8,1)	
7	137,29	7,48 (sl)		H-2; H-6	137,38	7,48 (d, $J=2,0$)	
8	125,80			H-7'	125,91		
9	172,53			H-7	172,63		
10	101,72	6,02 (s)			101,83	6,03 (s)	
1'	131,46			H-5'	131,58		
2'	109,14	6,63 (m)		H-6'; H-7'	109,25	6,65 (d, $J=1,5$)	
3'	147,93			H-5'; H-10'	148,45		
4'	146,54			H-2'; H-6'	146,65		
5'	108,80	6,71 (d, $J=8,0$)			108,91	6,72 (d, $J=7,8$)	
6'	122,06	6,63 (m)		H-2'; H-7'	122,18	6,62 (dd, $J=1,8$ e 7,9)	
7'	37,53	2,56 (dd, $J=10,0$ e 14,2) 2,97 (dd, $J=4,5$ e 14,2)		H2'; H-6'	37,63	2,58 (dd, $J=10,1$ e 14,3) 2,98 (dd, $J=4,4$ e 14,1)	
8'	39,90	3,72 (m)	H-7'	H-7; H-9'	40,00	3,70-3,76 (m)	
9'	69,49	4,23 (m)		H-7'	69,60	4,21-4,27 (m)	
10'	101,03	5,91 (dd, $J=0,5$ e 2,5)			101,59	5,92 (dd, $J=1,5$ e 3,7)	

Figura 52- Espectro de massas em baixa resolução de *Mm-6*.

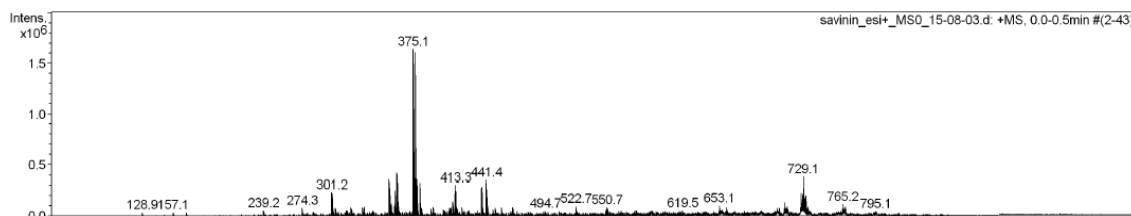


Figura 53- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-6*.

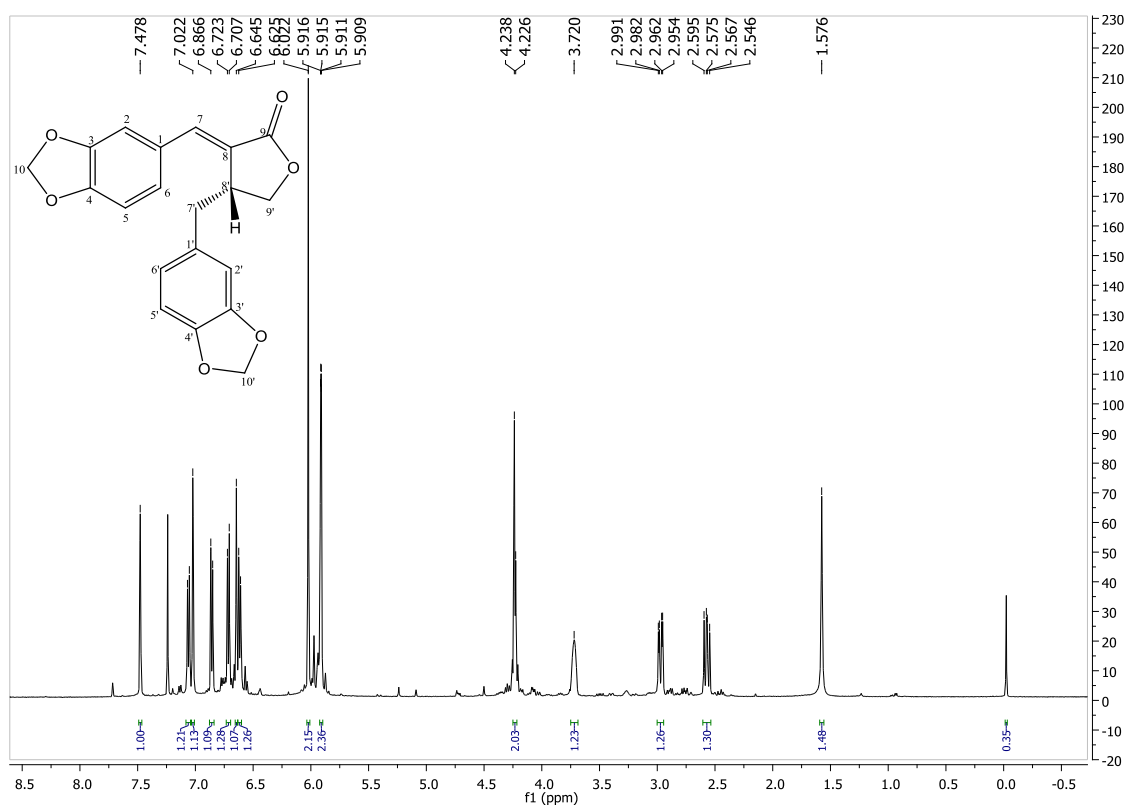


Figura 54- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-6* na região de 7,6-5,7 ppm.

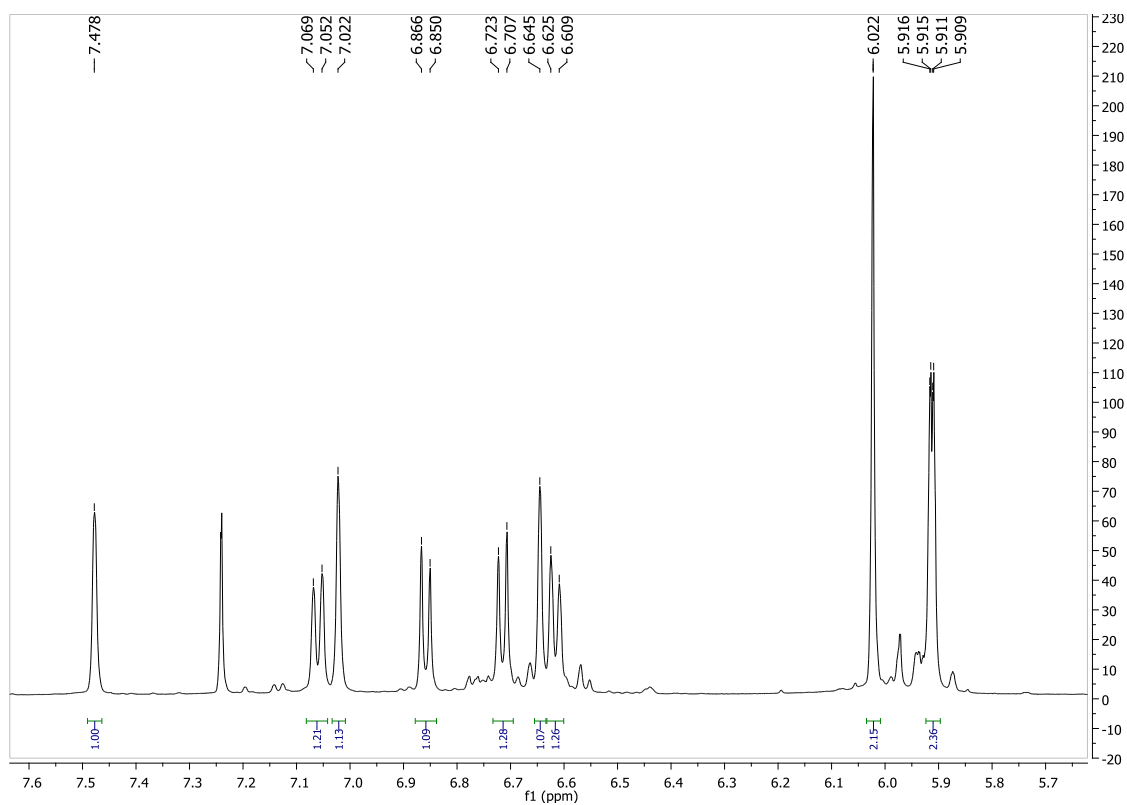


Figura 55- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Mm-6* na região de 4,5-1,4 ppm.

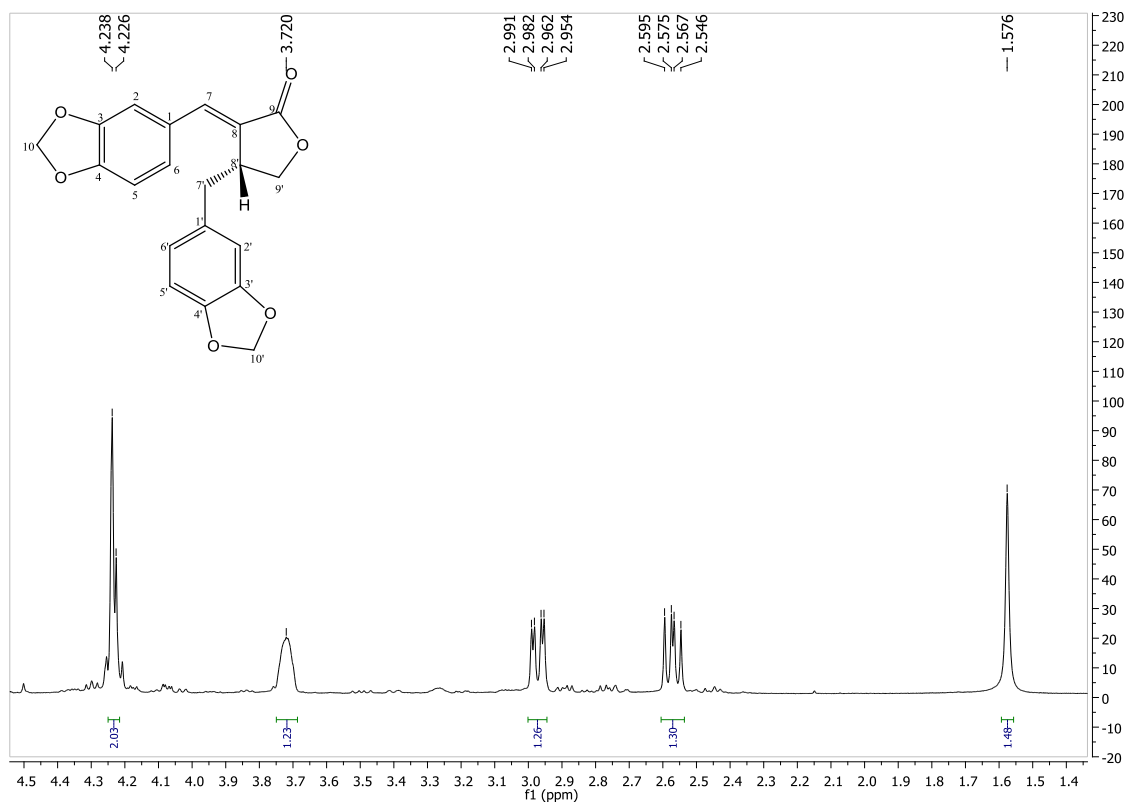


Figura 56- Espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6*.

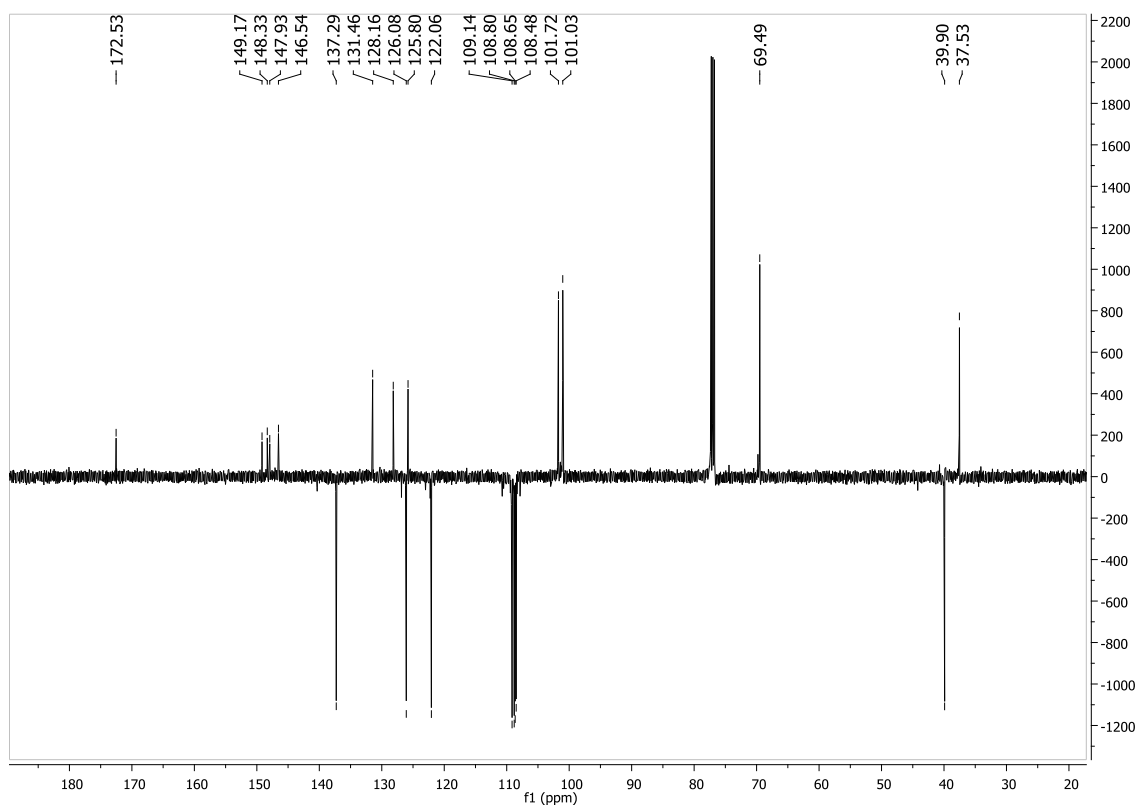


Figura 57- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6*.

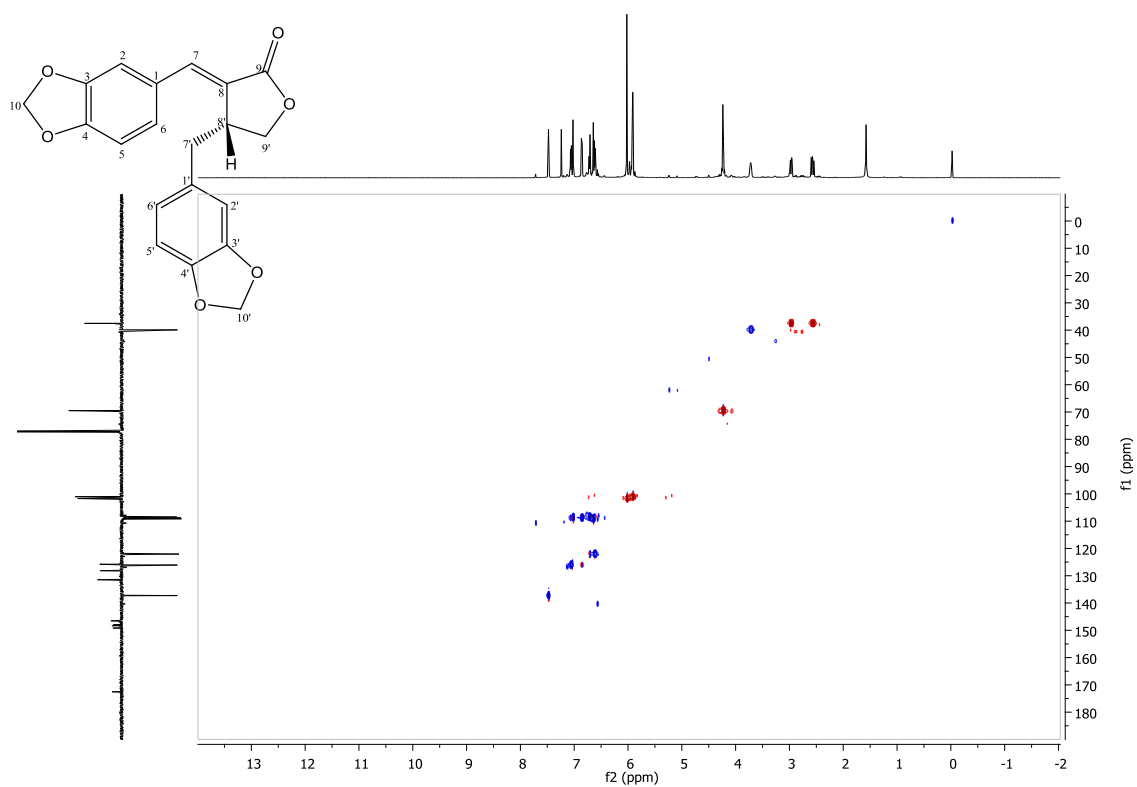


Figura 58- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6* na região de (8,2-4,7 ppm) x (160-95 ppm).

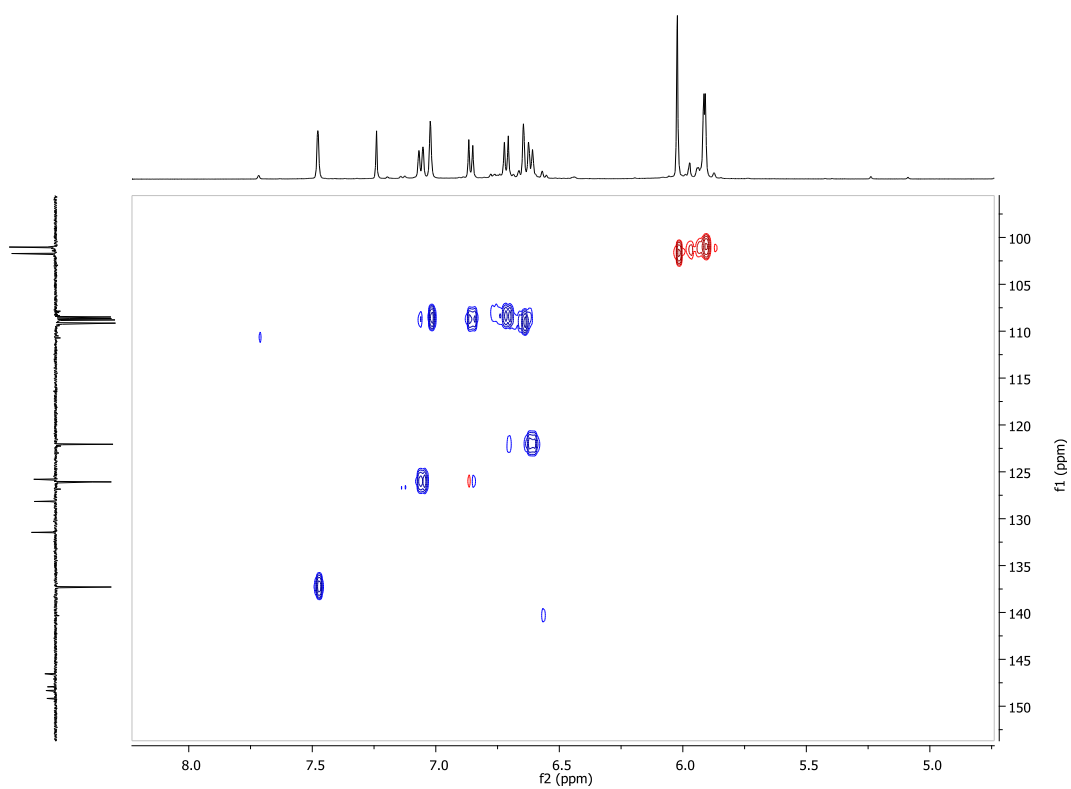


Figura 59- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6* na região de (5,8-2,2 ppm) x (80-28 ppm).

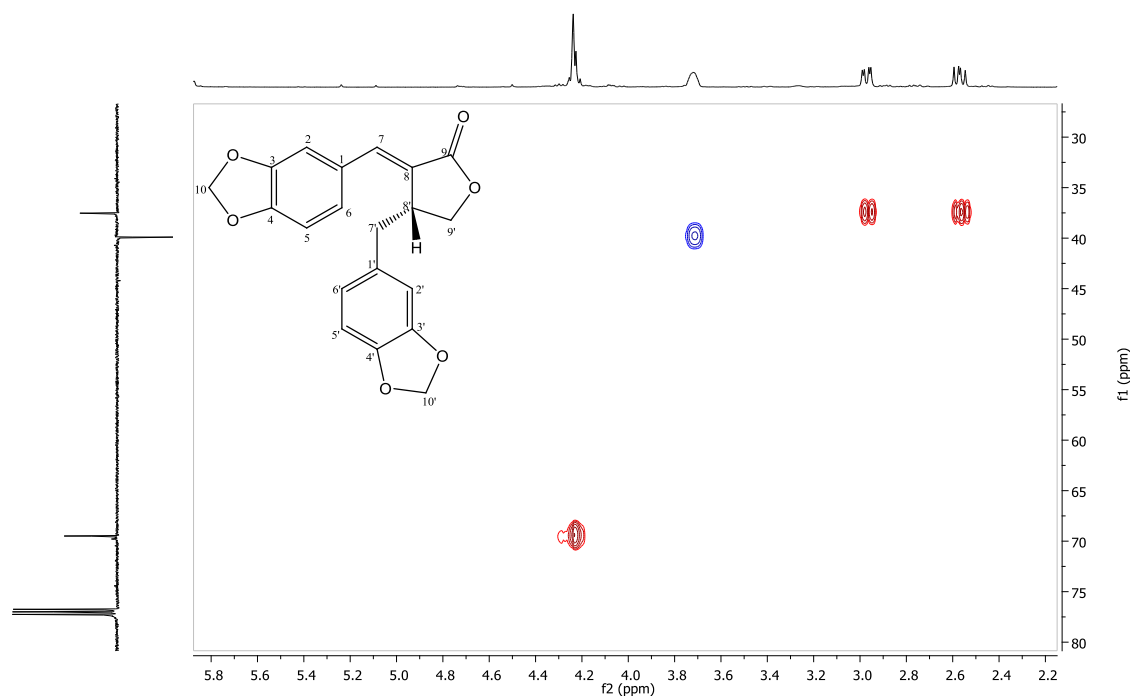


Figura 60- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6*.

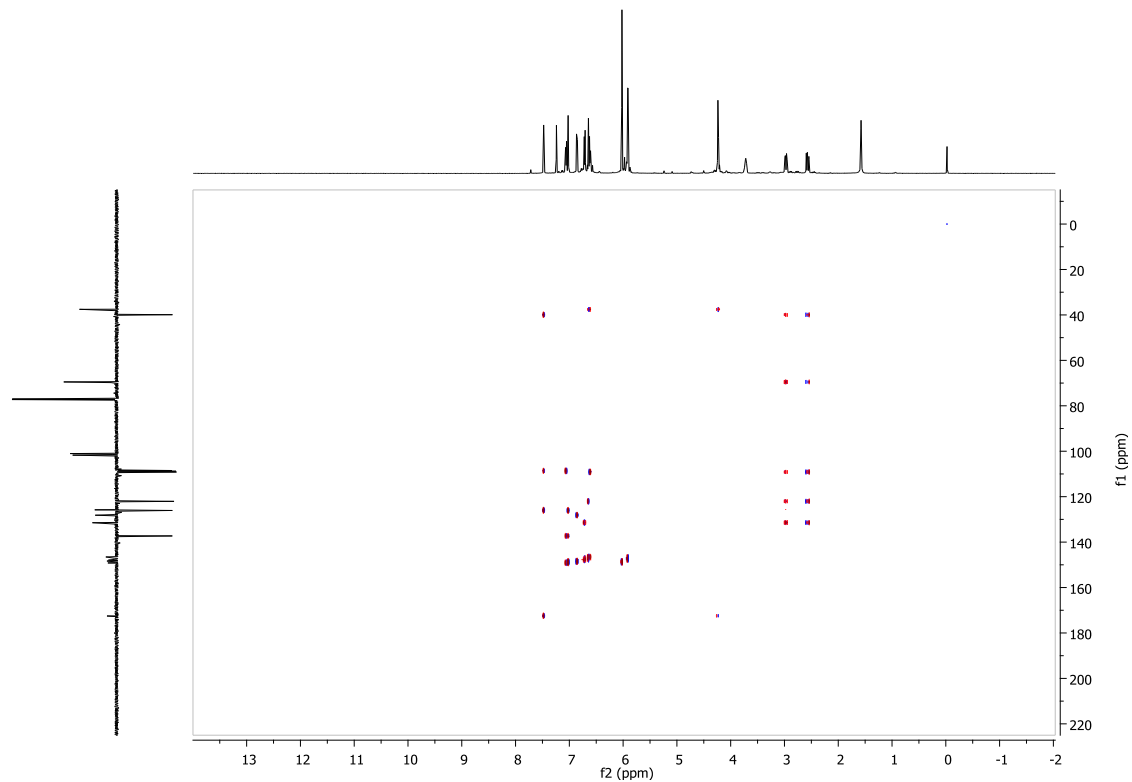


Figura 61- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6* na região de (7,9-5,8 ppm) x (180-30 ppm).

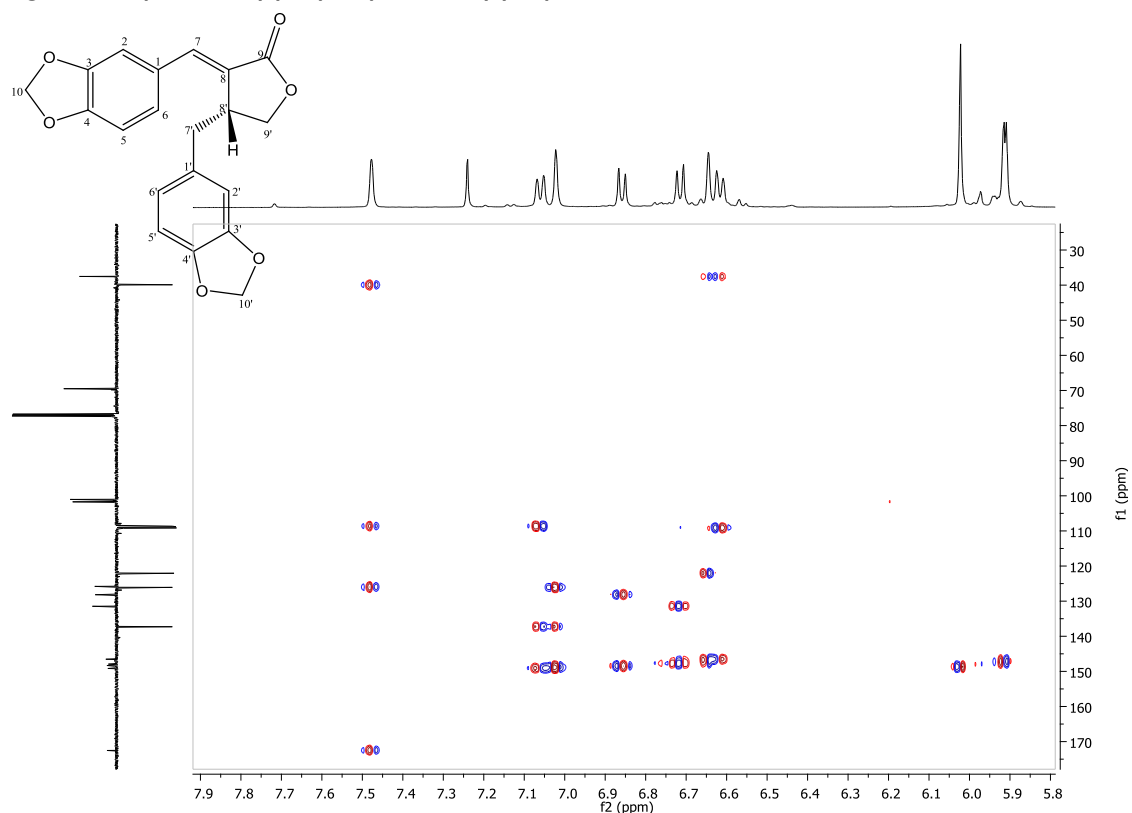
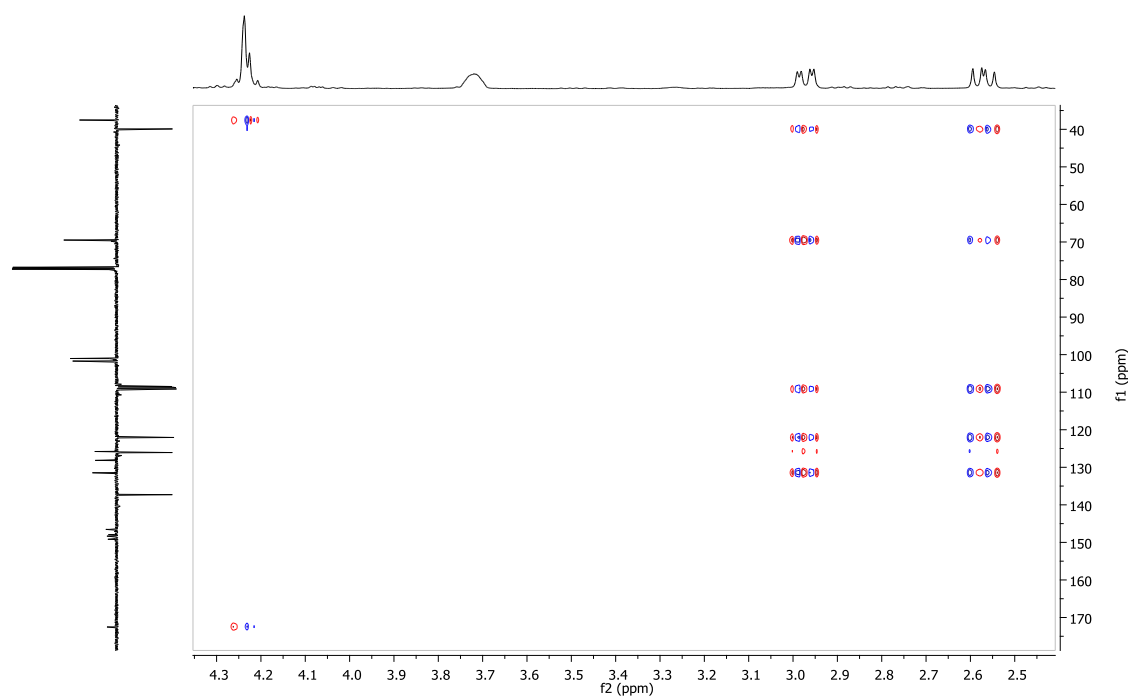


Figura 62- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Mm-6* na região de (4,3-2,4 ppm) x (180-40 ppm).

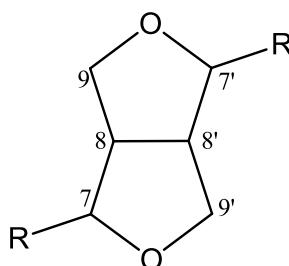


5.2. Substâncias isoladas de *Pilocarpus spicatus*

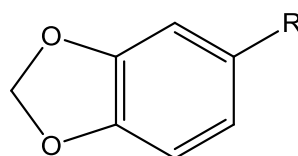
5.2.1. Determinação estrutural de *Ps-1*

A substância *Ps-1* foi isolada na forma de cristais amarelos, com ponto de fusão de 120,3-122,4 °C (lit. 120-122 °C) (GUNATILAKA et al., 1982) e massa de 39,2 mg ($0,087 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). A rotação óptica, obtida em polarímetro Jasco (modelo P-2000) foi $[\alpha]_D^{22} = -11,6$ (c 0,1, CHCl₃). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-MS (Figura 65) mostrou um pico em 377,1 [M+Na]⁺ compatível com a fórmula molecular C₂₀H₁₈O₆ (calc. 354,1).

No espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) e em suas expansões (Figuras 66, 67 e 68), pode-se observar a presença dos seguintes sinais: δ_H 4,37 (*d*, *J*=7,0 Hz) (H-7), 4,80 (*d*, *J*=5,5 Hz) (H-7'), 2,83 (*q*) (H-8), 3,28 (*m*) (H-8'), 4,07 (*d*, *J*=9,5 Hz) (H-9) e 3,81 (*m*) (H-9'). Esses sinais são característicos de sistemas furofurânicos (WANG et al., 2009).



Na região de hidrogênios em sistemas aromáticos, observou-se multipeto em δ_H 6,80, com integral para seis hidrogênios, que somado a presença dos singletos em δ_H 5,92 e 5,93, característicos de hidrogênios metilênicos dioxílicos, nos permitiu inferir para *Ps-1* a presença de dois anéis aromáticos trissubstituídos (CAO et al., 2013).



No espectro de RMN ¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) (Figura 69) observou-se a presença de 20 sinais, correspondentes a 6 carbonos não hidrogenados, 10 carbonos metínicos e 4 carbono metilênicos, que somado aos dados

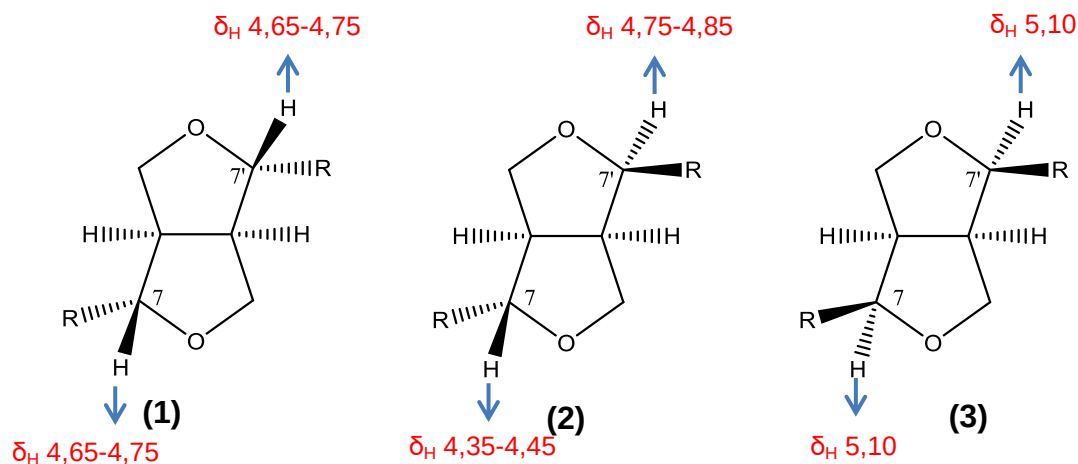
apresentados no espectro de RMN de ^1H permitiram sugerir que *Ps-1* tratava-se de uma lignana furofurânica.

O espectro de HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) (Figura 70) e suas expansões (Figuras 71 e 72) mostraram as correlações dos sinais em δ_{H} 4,37 (H-7) com δ_{C} 87,58 atribuído ao C-7, em δ_{H} 2,84 (H-8) com δ_{C} 54,58 atribuído ao C-8, em δ_{H} 4,80 (H-7') com δ_{C} 81,96 atribuído ao C-7' e em δ_{H} 3,28 (H-8') com δ_{C} 50,09 atribuído ao C-8'. As demais correlações diretas estão compiladas na Tabela 7.

No espectro de HMBC (Figuras 73, 74 e 75) observou-se as correlações do singlete em δ_{H} 5,92 (H-10') com os carbonos não hidrogenados em δ_{C} 147,57 e 146,50, atribuindo esses sinais a C-3' e C-4', respectivamente, e do singlete em δ_{H} 5,93 (H-10) com os carbonos não hidrogenados em δ_{C} 147,89 e 147,14, atribuídos a C-3 e C-4, respectivamente. Também foi observada a correlação entre o dubleto em δ_{H} 4,80 (H-7'), com o carbono não hidrogenado em δ_{C} 132,19, atribuindo esse deslocamento a C-1', e com os carbonos metínicos em δ_{C} 106,34 e 118,62, atribuídos a C-2' e C-6'. De maneira semelhante, o dubleto em δ_{H} 4,37 (H-7) correlacionou-se com o carbono não hidrogenado em δ_{C} 135,05, atribuindo o a C-1, e com os carbonos metínicos em δ_{C} 106,49 e 119,52, atribuídos a C-2 e C-6, respectivamente. As demais correlações diretas estão compiladas na Tabela 7.

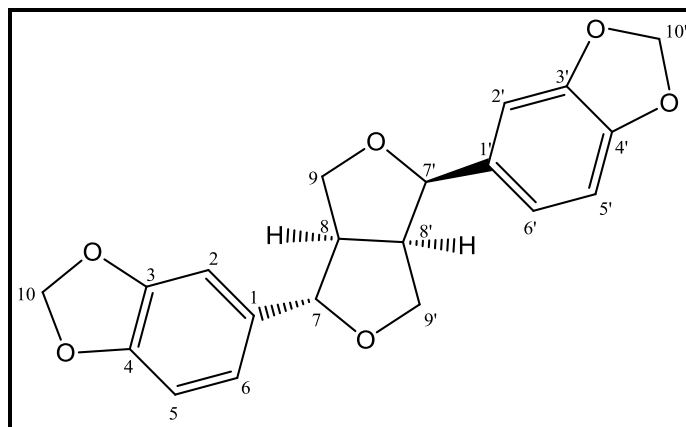
A determinação da configuração relativa foi baseada na análise do espectro de RMN ^1H . A junção dos anéis das lignanas do tipo furofurânica é sempre *cis*, de modo que existem três possibilidades de configurações relativas (Figura 63), que podem ser diferenciadas entre si através do valor do deslocamento químico dos hidrogênios carbinólicos H-7 e H-7'. Quando estão em posição pseudo-axiais, esses hidrogênios apresentam deslocamento químico em δ_{H} 4,65-4,75 (**1**); se possuírem configurações distintas entre si, aparecem como dois dubletos em δ_{H} 4,75-4,85 e 4,35-4,45 (**2**) e quando estão em posição pseudo-equatoriais tornam-se mais desprotegidos absorvendo em torno de δ_{H} 5,10 (**3**) (RAO, 1979). Sendo assim, *Ps-1* apresenta a configuração relativa do modelo (**2**).

Figura 63- Possibilidades de configurações relativas das lignanas do tipo furofurânicas.



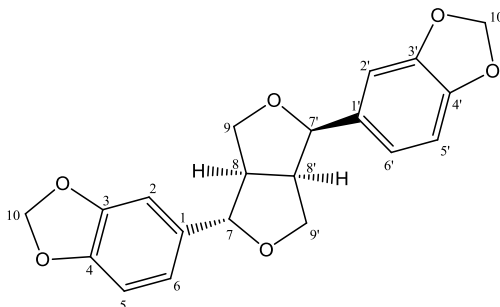
A análise dos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) em comparação com os valores obtidos na literatura (CAO et al., 2013) (Tabela 7), permitiu identificar *Ps-1* como sendo a lignana furofurânica (-) asarinina (Figura 64).

Figura 64- Estrutura química de *Ps-1*: (-) asarinina.



A asarinina está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus* e estudos biológicos realizados com essa lignana revelaram atividade antimicrobiana (BUSSEY et al., 2014), citotóxica (HIRANO; GOTOH; OKA, 1994) e larvica (PERUMALSAMY et al., 2010).

Tabela 7- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Ps-1* (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da asarinina (600 MHz, CDCl_3) (CAO et al., 2013) (δ em ppm, J em Hz).



$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC					$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC		Asarinina (CAO et al., 2013)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}		
1	135,05		H-2; H-6; H-7	H-5	136,0			
2	106,49	6,80 (m)		H-6; H-7	106,5	6,94 (d, $J=1,2$)		
3	147,89		H-2	H-5; H-10	148,0			
4	147,14		H-5	H-2; H-6; H-10	147,1			
5	108,09	6,80 (m)	H-6		107,9	6,85 (d, $J=7,8$)		
6	119,52	6,80 (m)		H-2; H-7	119,6	6,91 (dd, $J=1,2$ e 2,4)		
7	87,58	4,37 (d, $J=7,0$)	H-8	H-2; H-6; H-9; H-9'	87,5	4,85 (d, $J=6,0$)		
8	54,58	2,84 (q)	H-7; H-9; H-8'	H-9'	54,6	3,19 (t)		
9	70,85	4,07 (d, $J=9,5$)		H-7; H-8'	70,8	4,13 (d, $J=9,6$)		
		3,81 (m)				3,84 (dd, $J=6,0$ e 6,6)		
10	100,98	5,93 (s)			101,4	6,01 (s)		
1'	132,19		H-2'; H-6'	H-5'; H-7'	133,1			
2'	106,34	6,80 (m)		H-6; H-7'	106,4	6,92 (d, $J=1,2$)		
3'	147,57		H-2'	H-5'; H-10'	147,7			
4'	146,50		H-5'	H-2'; H-6'; H-10'	146,6			
5'	108,08	6,80 (m)			107,9	6,83 (d, $J=7,8$)		
6'	118,62	6,80 (m)		H-2'; H-7'	118,9	6,90 (dd, $J=1,2$ e 2,4)		
7'	81,96	4,80 (d, $J=5,5$)		H-8; H-2'; H-6'; H-9'	81,8	4,41 (d, $J=7,2$)		
8'	50,09	3,28 (m)	H-7'; H-9'; H-8	H-7; H-9	50,0	2,85 (m)		
9'	69,61	3,81 (m)		H-7'; H-8	69,3	3,79 (dd, $J=8,4$ e 9,0)		
		3,28 (m)				3,43 (m)		
10'	100,92	5,92 (s)			101,3	6,00 (s)		

Figura 65- Espectro de massas em baixa resolução de *Ps-1*.

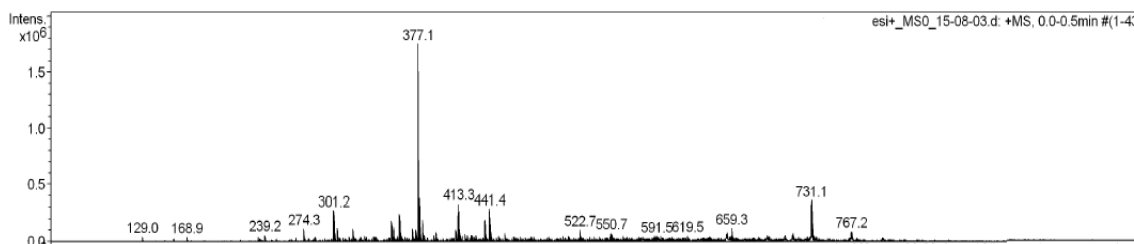


Figura 66- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-1*.

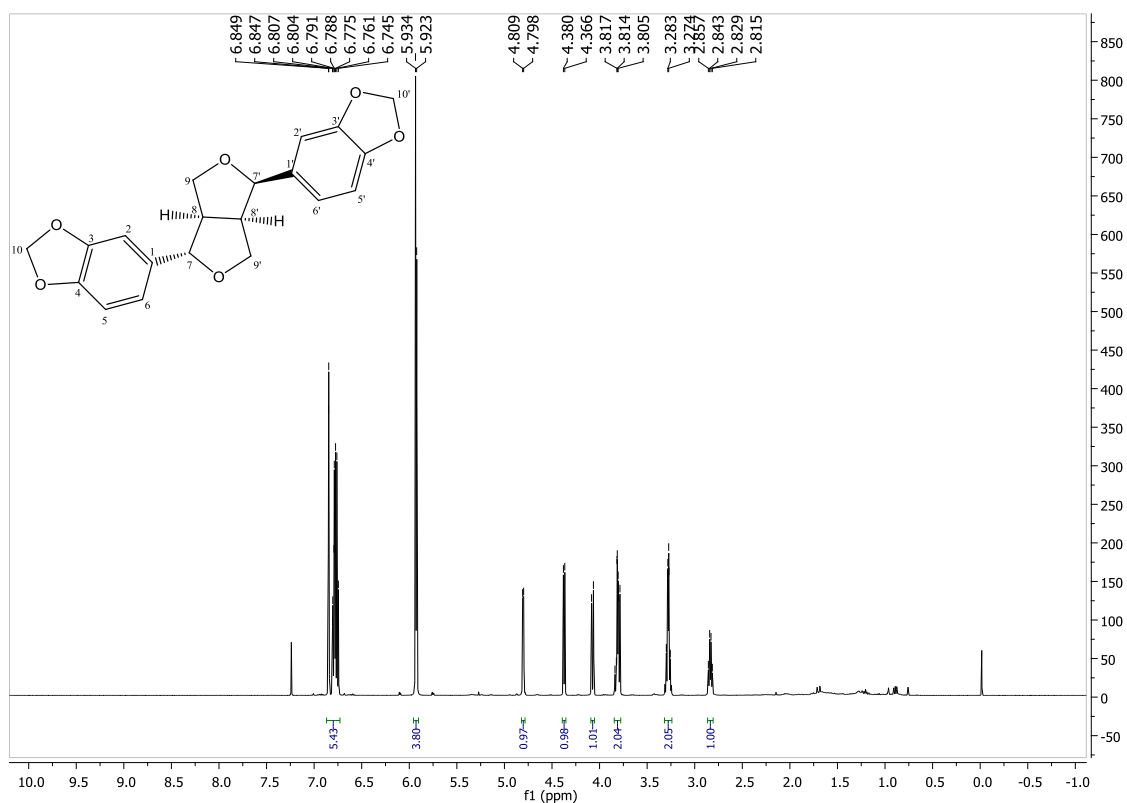


Figura 67- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-1* na região de 7,1-5,7 ppm.

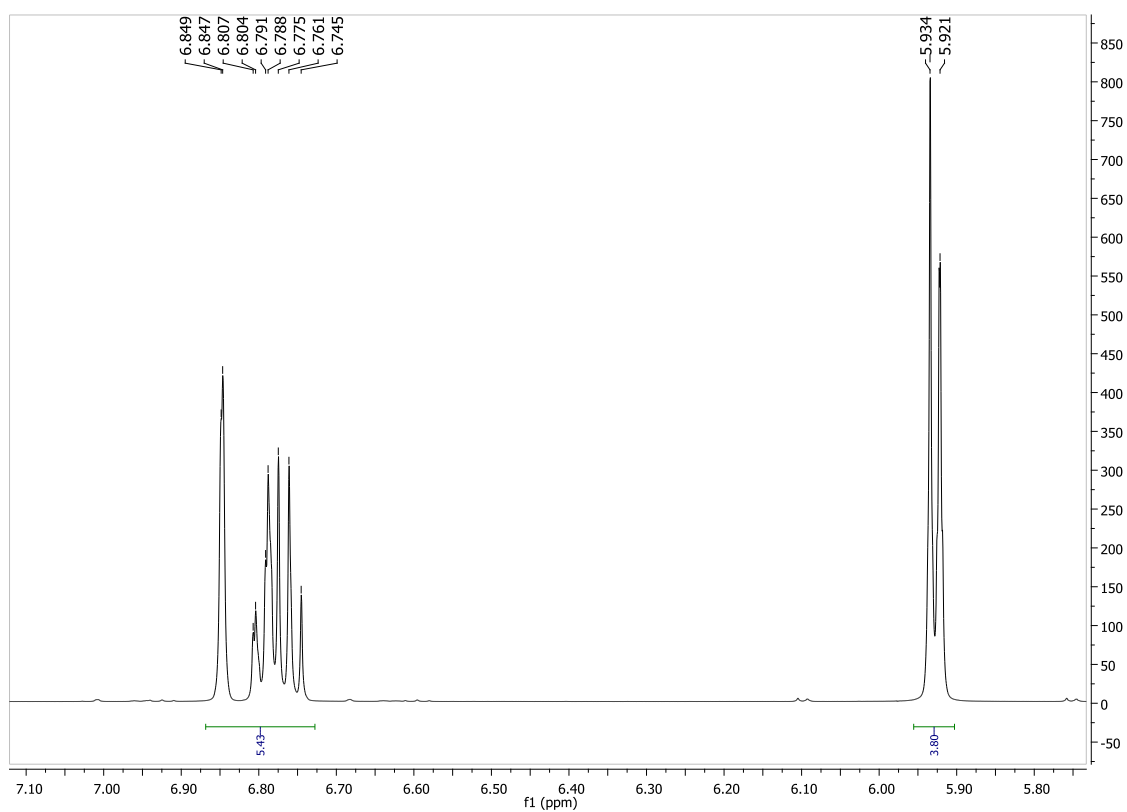


Figura 68- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-1* na região de 4,9-2,7 ppm.

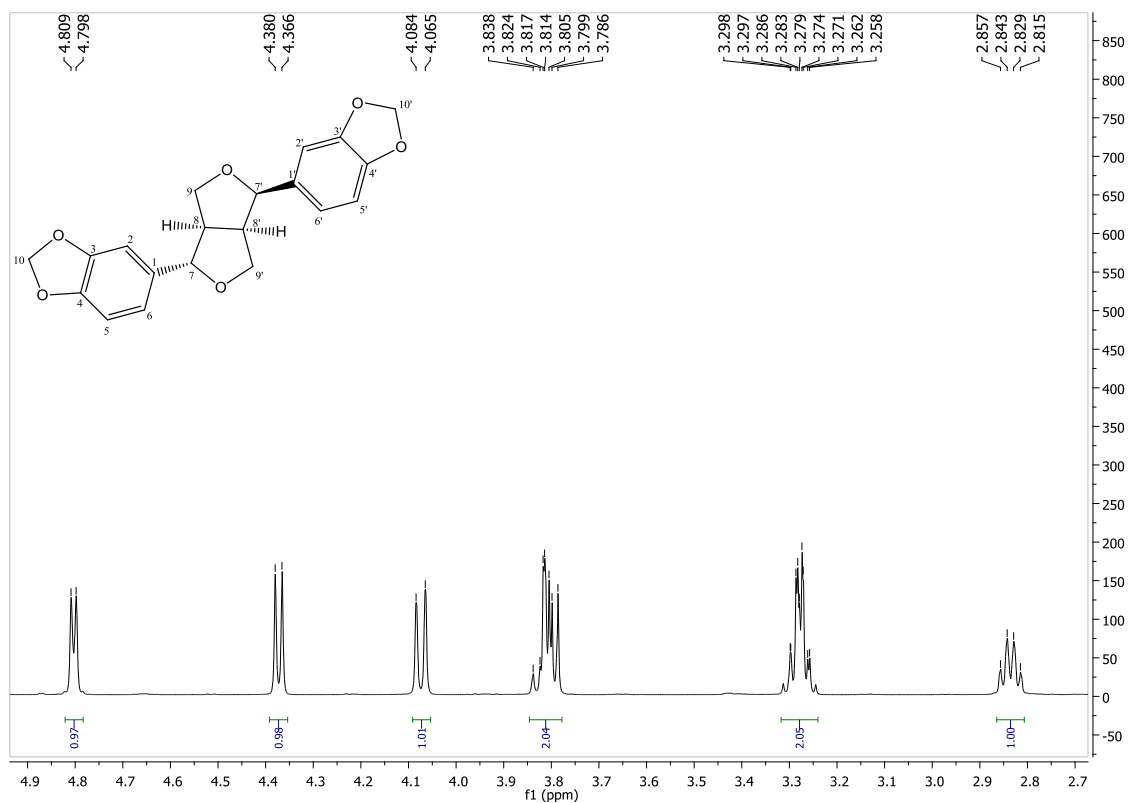


Figura 69- Espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1*.

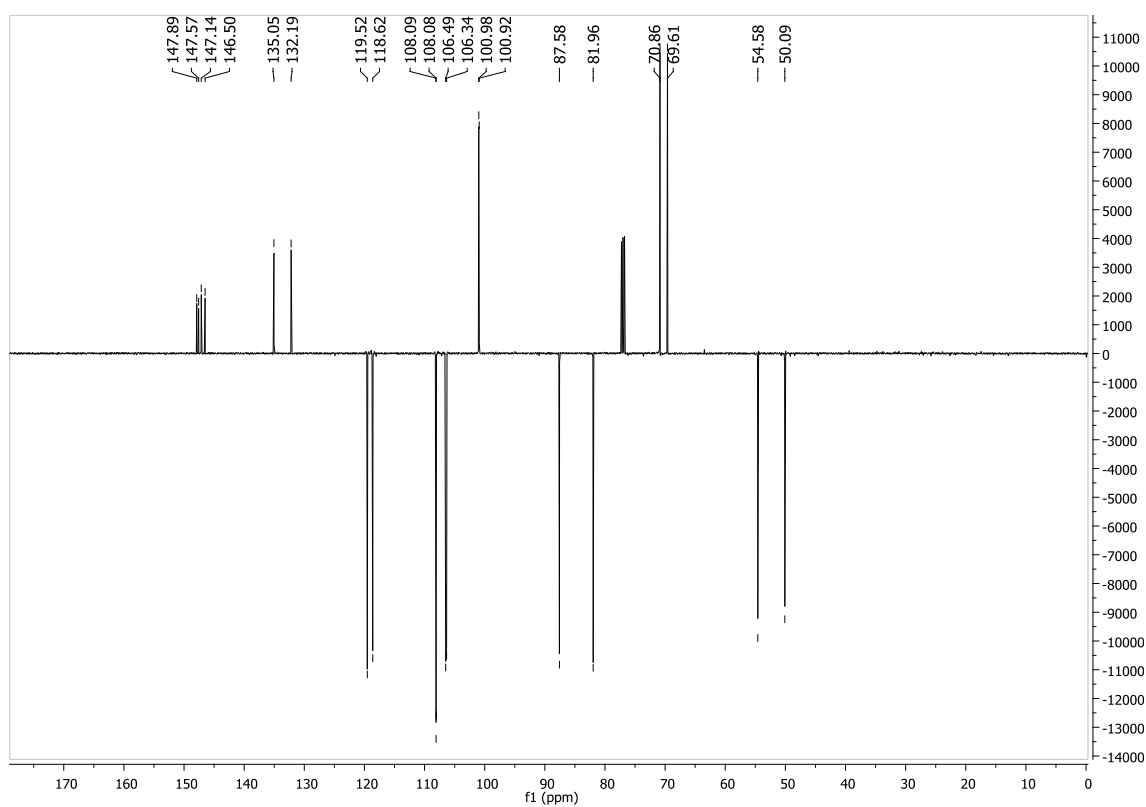


Figura 70- Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1*.

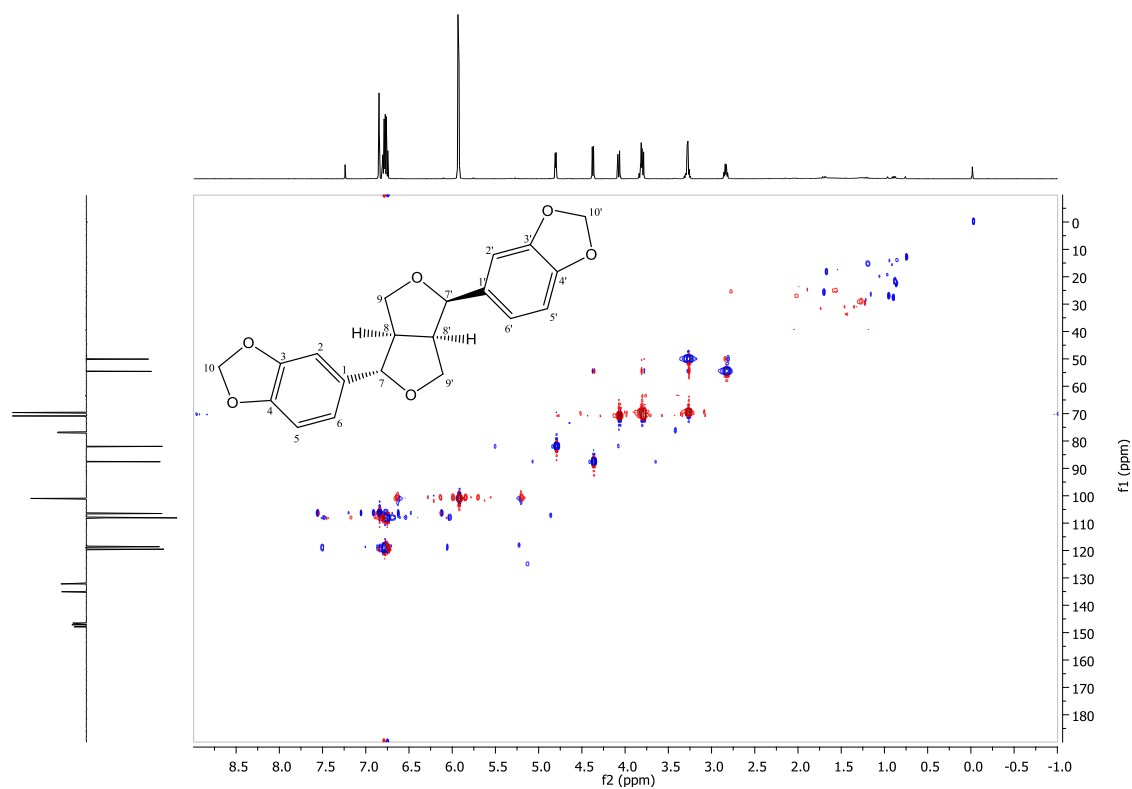


Figura 71- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1* na região de (7,7-5,5 ppm) x (95-135 ppm).

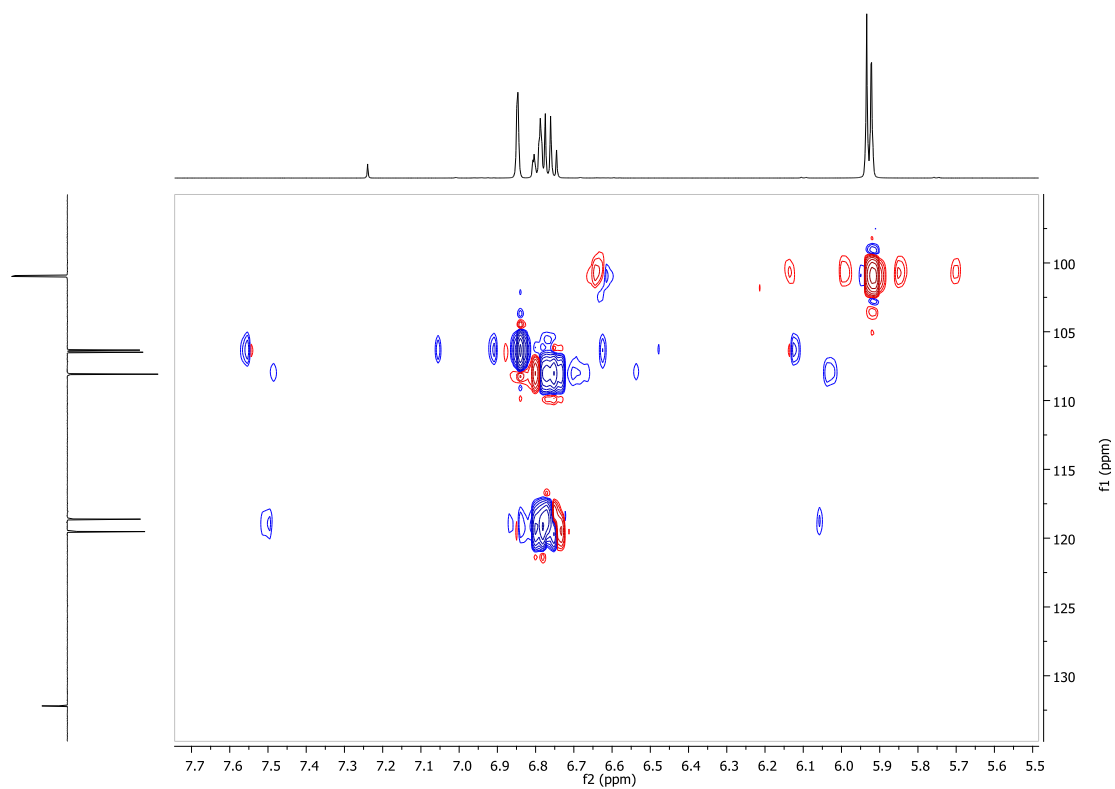


Figura 72- Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1* na região de (4,9-2,6 ppm) x (95-45 ppm).

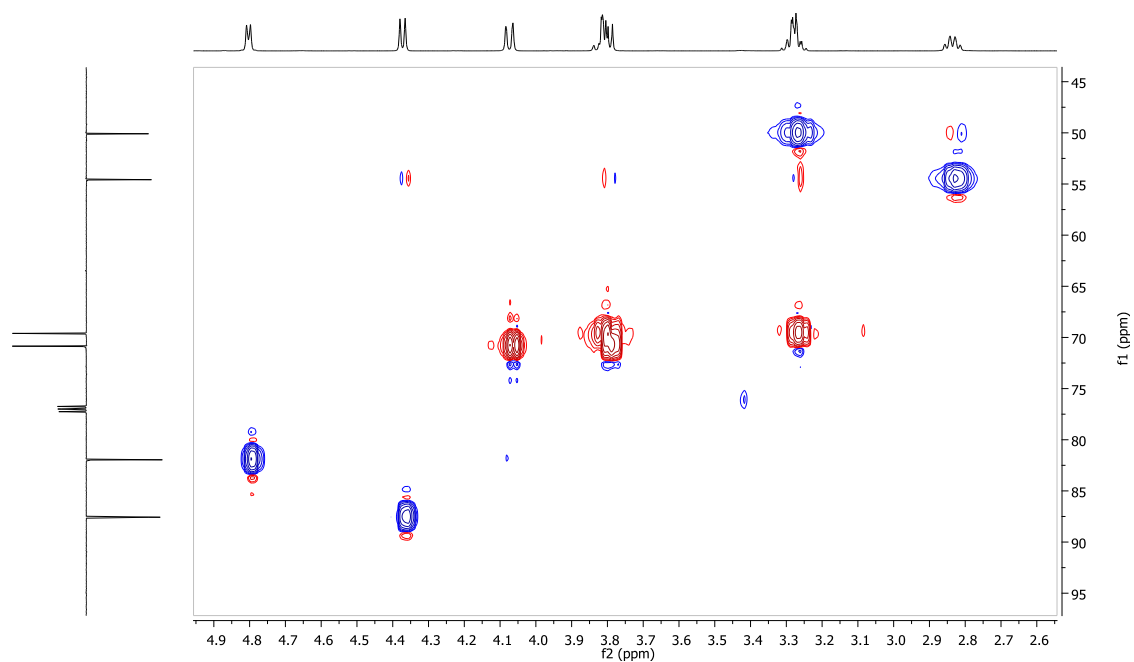


Figura 73- Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1*.

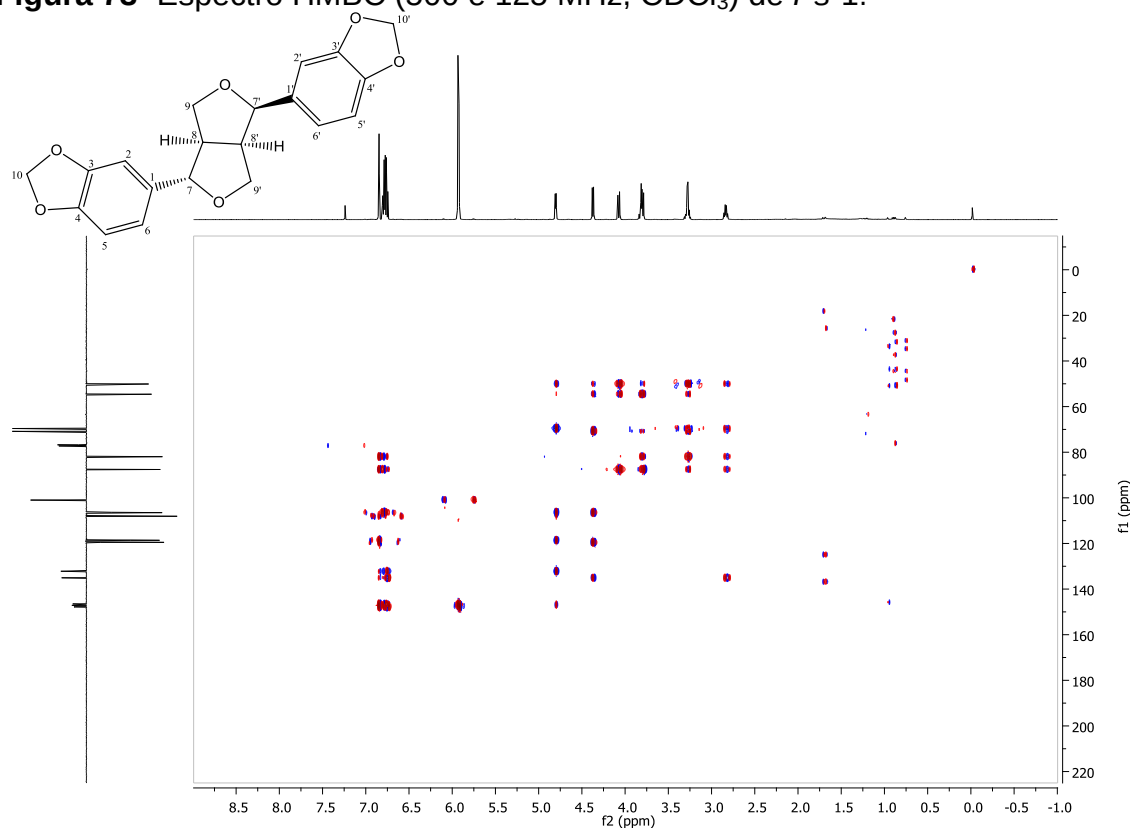


Figura 74- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1* na região de (7,2-4,0 ppm) x (160-80 ppm).

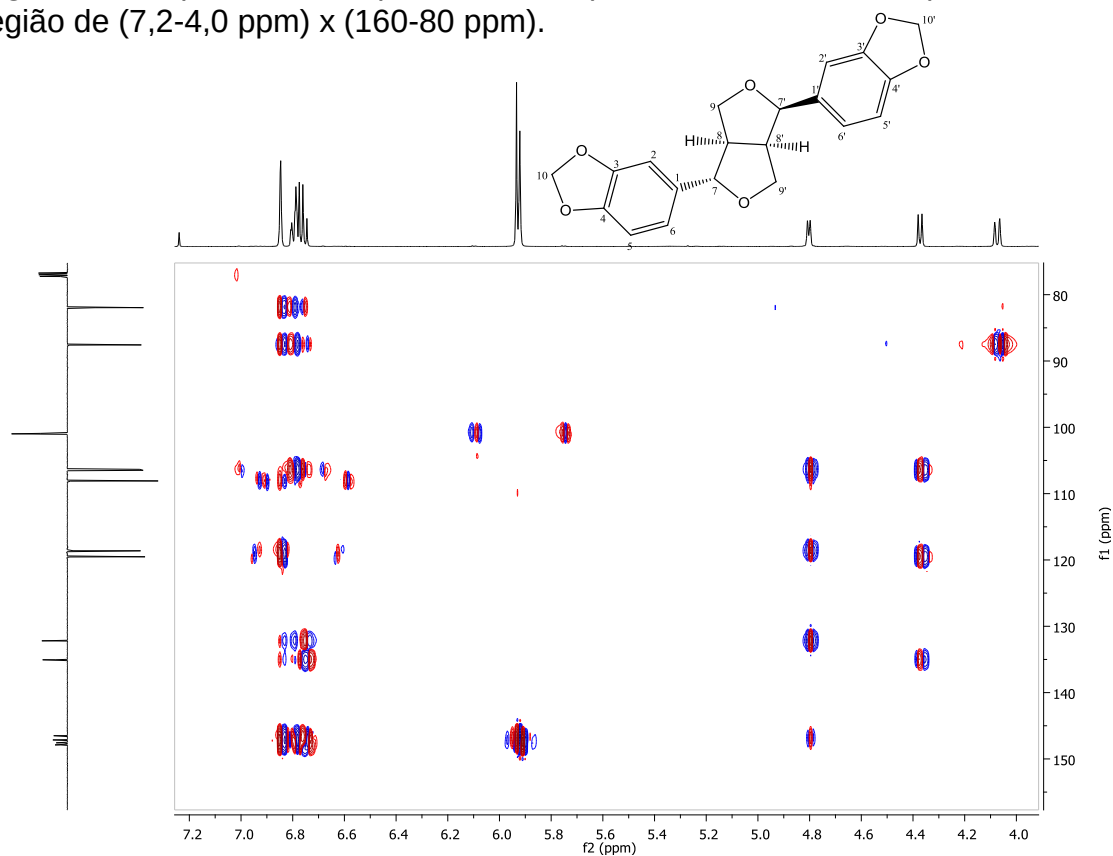
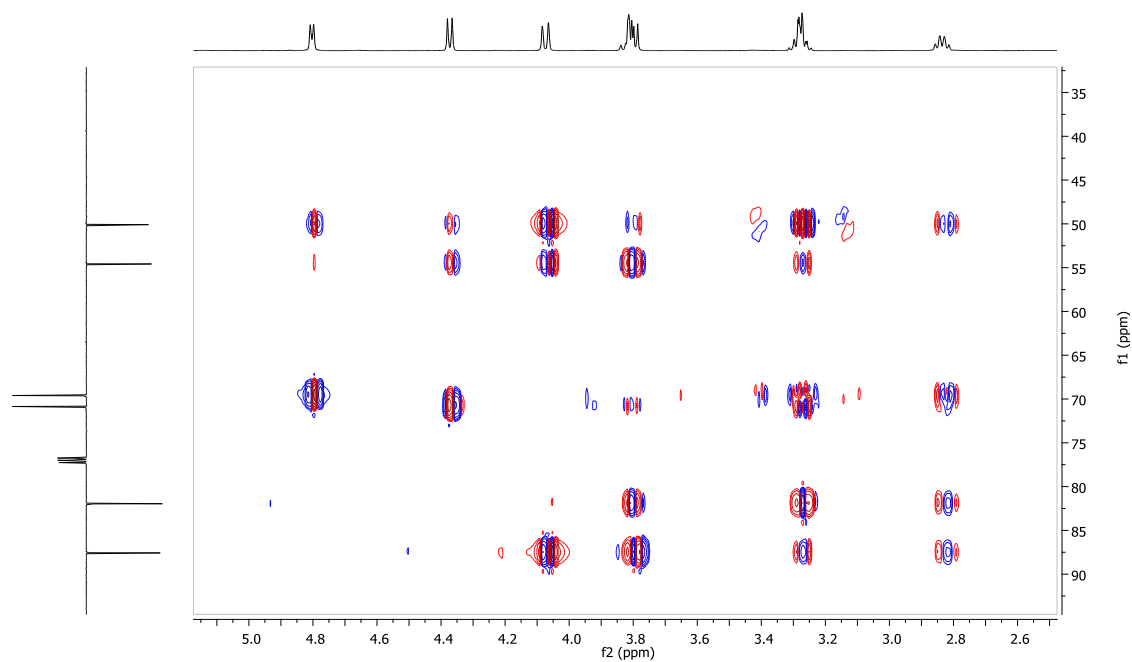


Figura 75- Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Ps-1* na região de (5,6-2,4 ppm) x (35-95 ppm).



5.2.2. Determinação estrutural de *Ps-2*

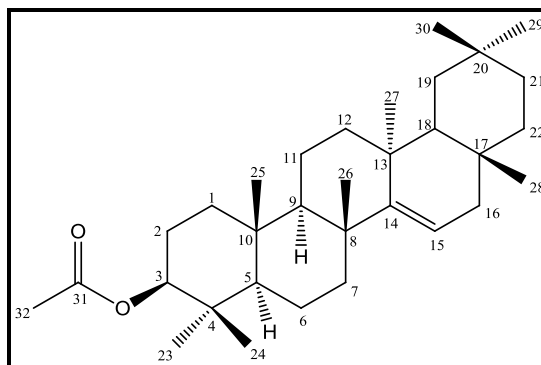
A substância codificada como *Ps-2* foi isolada na forma de cristais brancos e massa de 4,8 mg ($0,11 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figuras 77, 78 e 79) apresentou um conjunto de sinais de alta multiplicidade entre δ_{H} 2,02-0,7 característicos de substâncias pertencentes a classe dos terpenoides, destacando-se os singletos referentes a oito metilas em δ_{H} 0,80; 0,84; 0,85; 0,88 (sinal referente a duas metilas); 0,93 (sinal referente a duas metilas) e 1,06. Também foi observado um singlete em δ_{H} 2,02 compatível com metila de grupo acetato. O sinal em δ_{H} 5,51 (*dd*, $J=2,0$ e $8,0$) indicou a presença de uma ligação dupla endocíclica na estrutura e o sinal verificado em δ_{H} 4,44 (*dd*, $J=5,0$ e $10,0$) foi indicativo de acetoxila equatorial em C-3 (ABD-ALLA et al., 2014).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) (Figuras 80, 81 e 82) foi observado um total de 32 sinais, que somado aos dados de RMN ^1H nos permitiu sugerir a presença de um triterpeno acetilado. Neste mesmo espectro observou-se a presença de sinais em δ_{C} 157,95 (C-14) e 116,91 (C-15) o que caracterizou *Ps-2* como um triterpeno da série taraxano. Os sinais em δ_{C} 81,01 (C-3), 171,03 (C-31) e 21,27 (C-32) são característicos de grupo acetoxi em C-3. Os demais sinais estão compilados na Tabela 8.

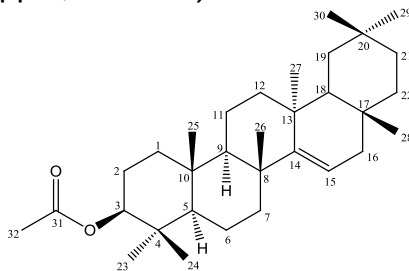
Após a análise dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais, bem como comparações com dados da literatura (ABD-ALLA et al., 2014) (Tabela 8) foi possível identificar *Ps-2* como sendo um triterpeno acetato de taraxerol, relatado pela primeira vez na família Rutaceae.

Figura 76- Estrutura química de *Ps-2*: acetato de taraxerol.



Dentre as atividades biológicas descritas para esse triterpeno, destacam-se as atividades anti-inflamatória (REHMAN et al., 2013), antitumoral (TAN et al., 2011) antimicrobiana (KUETE et al., 2009) e antiviral (KULJANABHAGAVAD et al., 2009).

Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Ps-2* (500 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C do acetato de taraxerol (300 MHz, CDCl_3) (ABD-ALLA et al., 2014) (δ em ppm, *J* em Hz).



<i>Ps-2</i>			Acetato de taraxerol (ABD-ALLA et al., 2014)	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,87		38,1	
2	23,44		23,9	
3	81,01	4,44 (<i>dd</i> , <i>J</i> =5,0 e 10,0)	81,4	4,49 (<i>m</i>)
4	37,67		37,9	
5	55,61		55,3	
6	18,67		18,4	
7	33,07		33,4	
8	38,96		39,1	
9	49,16		49,0	
10	37,53		37,8	
11	17,49		18,0	
12	36,63		36,9	
13	37,67		38,0	
14	157,95		158,1	
15	116,91	5,51 (<i>dd</i> , <i>J</i> =2,0 e 8,0)	116,9	5,31 (<i>m</i>)
16	33,65		33,5	
17	35,77		36,2	
18	48,72		48,5	
19	41,19		41,0	
20	28,79		28,8	
21	35,08		35,2	
22	37,36		37,7	
23	27,96	0,88 (<i>s</i>)	28,0	0,87 (<i>s</i>)
24	16,57	0,88 (<i>s</i>)	16,5	0,87 (<i>s</i>)
25	15,49	0,93 (<i>s</i>)	15,7	0,95 (<i>s</i>)
26	25,91	1,06 (<i>s</i>)	26,2	1,07 (<i>s</i>)
27	29,91	0,84 (<i>s</i>)	29,5	0,91 (<i>s</i>)
28	29,81	0,80 (<i>s</i>)	29,5	0,83 (<i>s</i>)
29	21,32	0,85 (<i>s</i>)	22,4	0,93 (<i>s</i>)
30	33,33	0,93 (<i>s</i>)	32,6	0,95 (<i>s</i>)
31	171,03		171,4	
32	21,27	2,02 (<i>s</i>)	20,9	2,01 (<i>s</i>)

Figura 77- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-2*.

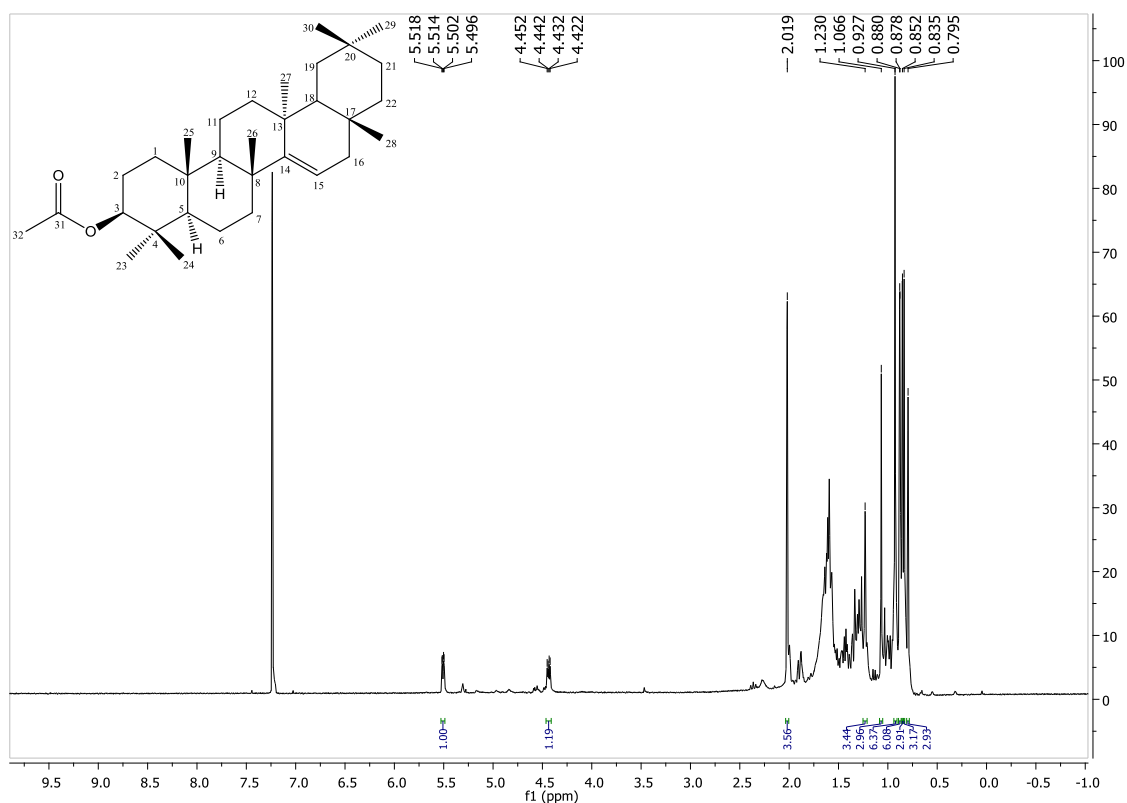


Figura 78- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-2* na região de 5,9-4,1 ppm.

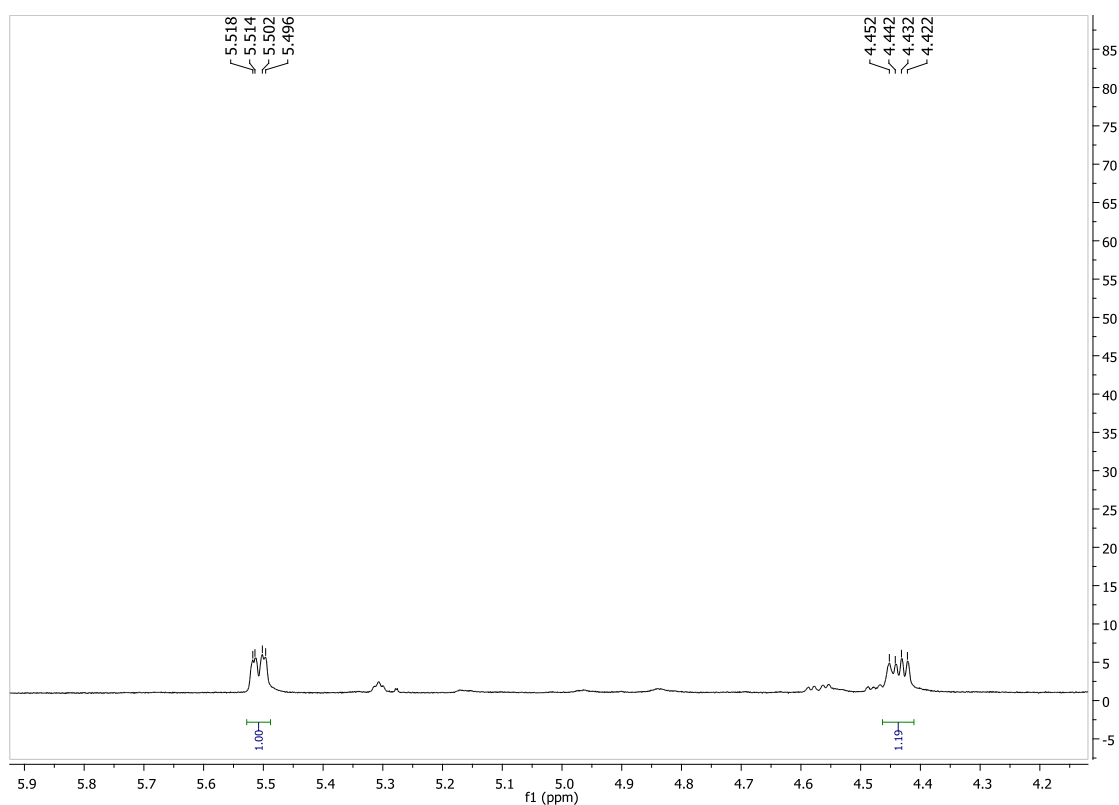


Figura 79- Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-2* na região de 2,2-0,6 ppm.

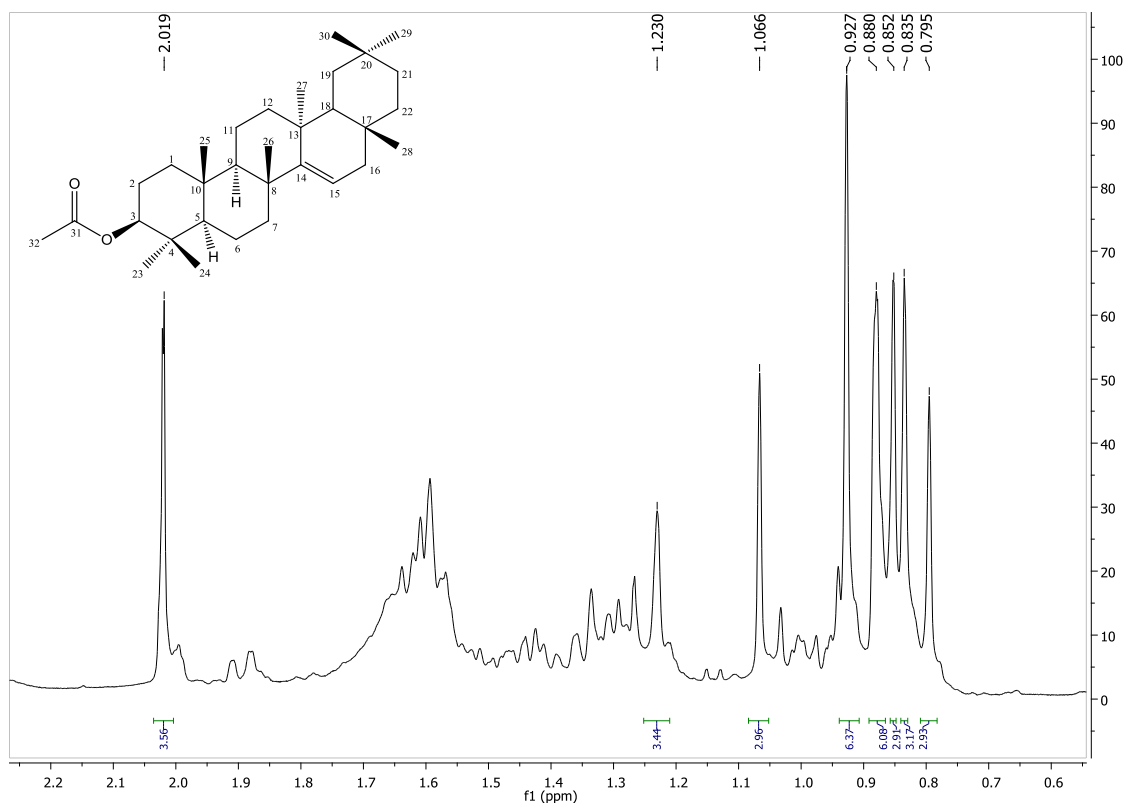


Figura 80- Espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de *Ps-2*.

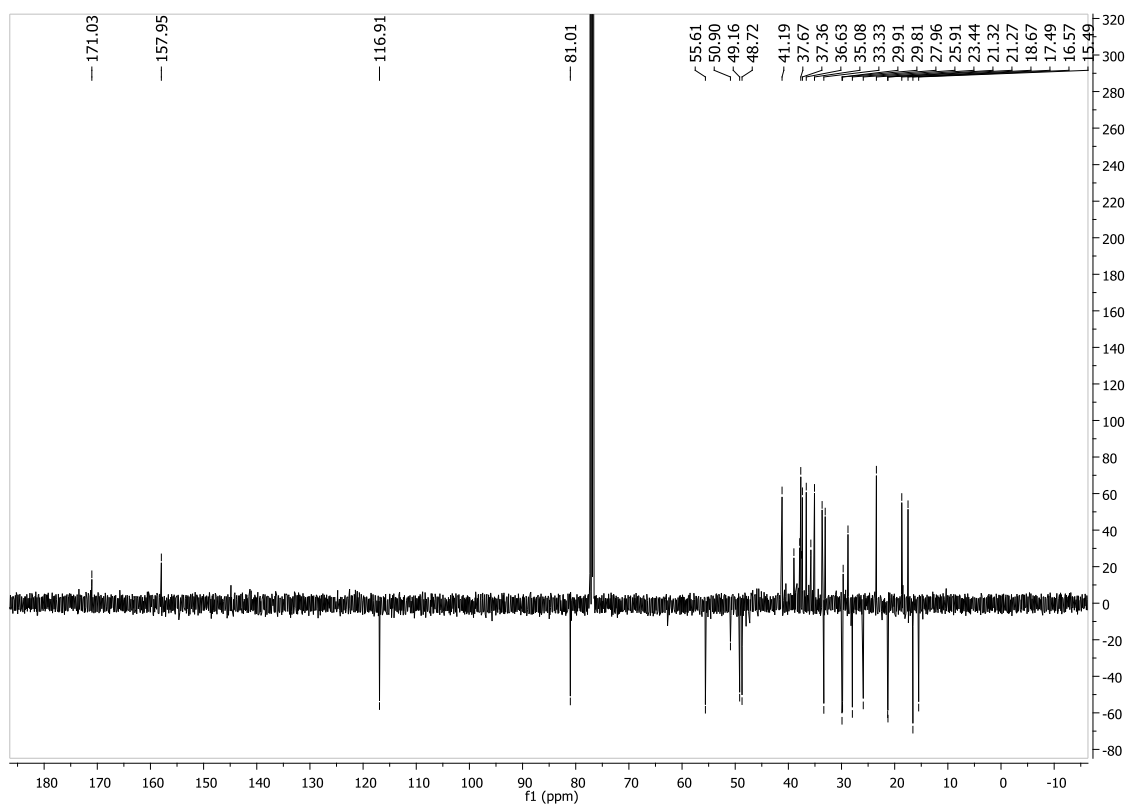


Figura 81- Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de *Ps-2* na região de 57-35 ppm.

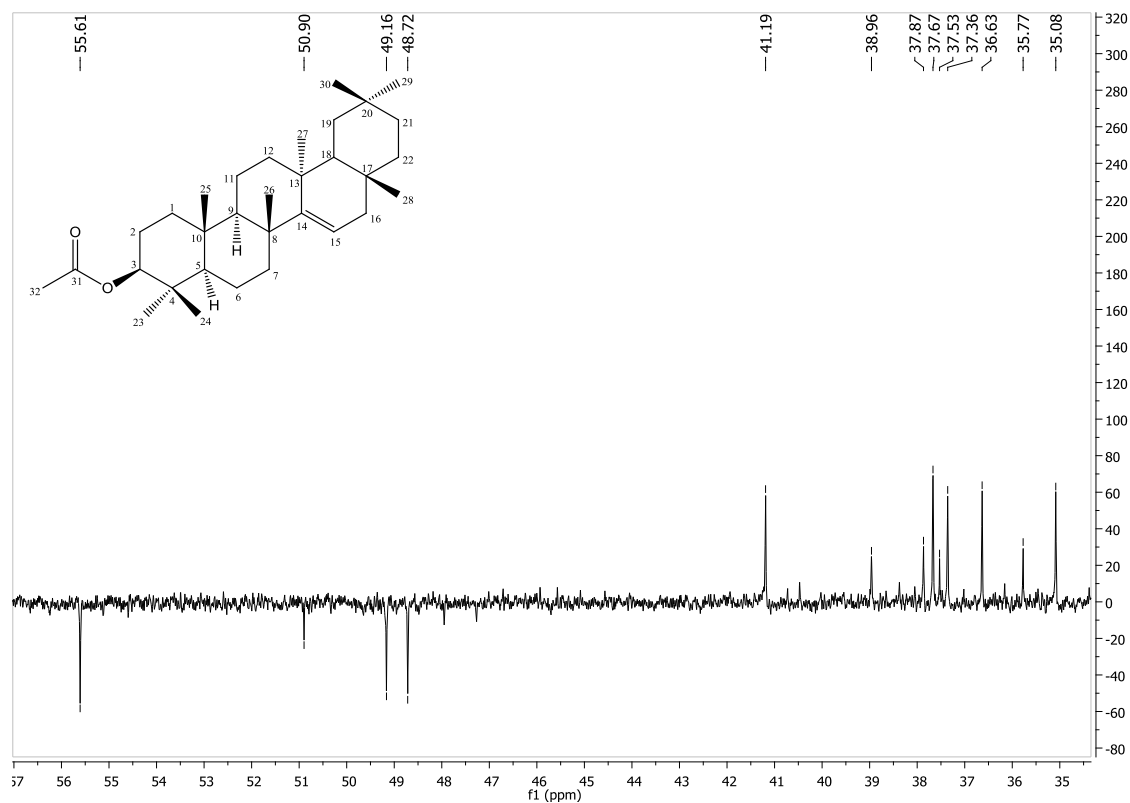
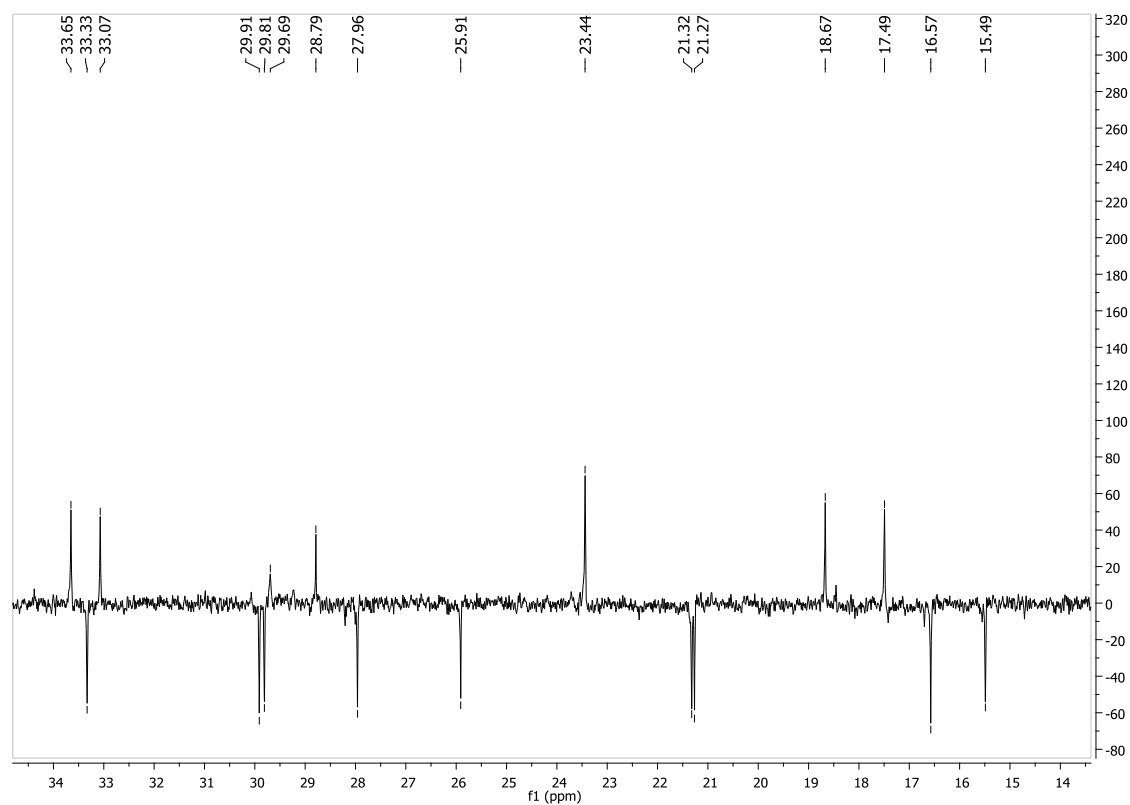


Figura 82- Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de *Ps-2* na região de 35-14 ppm.



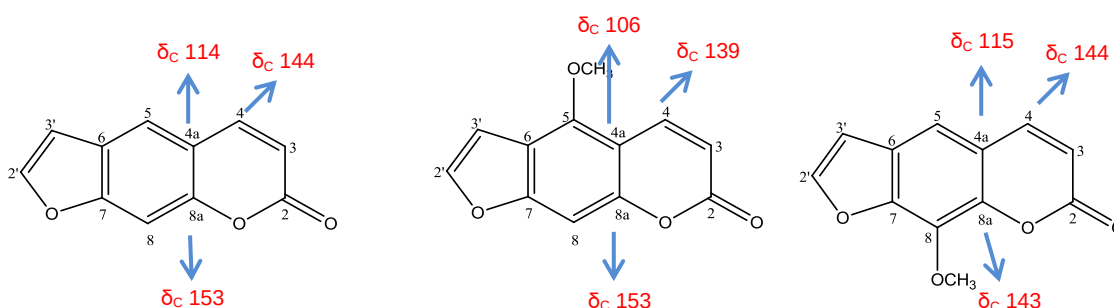
5.2.3. Determinação estrutural de Ps-3

A substância Ps-3 foi isolada na forma de cristais incolores, com ponto de fusão de 191,6-192,5 °C (lit. 193-194 °C) (DINCEL et al., 2013) e massa de 74,4 mg ($1,56 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-MS (Figura 84) mostrou um pico em 239,0 $[M+Na]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_8O_4$ (calc. 216,0).

Semelhante ao que foi observado anteriormente para as substâncias Mm-2 (xantotoxina) (pág. 72) e Mm-3 (isopimpineline) (pág. 79) isoladas de *M. mollis*, Ps-3 apresentou sinais compatíveis para uma furanocumarina. No espectro de RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) (Figuras 85 e 86) foram observados os sinais, acoplando entre si, em δ_H 6,23 (*d*, $J = 9,6$ Hz) e 8,11 (*dd*, $J = 9,6$ e 0,4 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, e em δ_H 7,56 (*d*, $J = 0,8$ Hz) e 6,99 (*dd*, $J = 2,4$ e 0,8 Hz) correspondentes aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente.

A linearidade da furanocumarina foi sugerida pela presença de um singlete δ_H 4,24, característico de metoxila. Como relatado anteriormente, metoxilas que possuem valores de deslocamentos químicos maiores que δ_H 4,15 indicam linearidade e as que absorvem em menos de δ_H 4,15 caracterizam as angulares (O'NEILL et al., 2013; MURRAY; JORGE, 1984).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, $CDCl_3$) (Figura 87) observou-se a presença dos sinais em δ_C 139,24, 106,40, 152,69, sugerindo que a metoxila estaria inserida em C-5, protegendo, dessa forma, os carbonos C-4a e C-4.



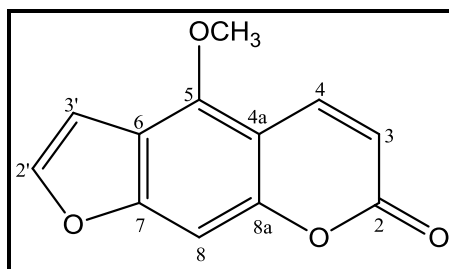
Quando a oxigenação ocorre no carbono 5, observa-se uma caso bastante especial de acoplamento a longa distância, uma condição relatada anteriormente por Evans e colaboradores (1981) para os compostos

aromáticos policíclicos, de modo que H-8 acopla, à cinco ligações (^5J), com os hidrogênios H-3' e H-4.

A estrutura de *Ps*-3 foi confirmada através da análise dos espectros de RMN bidimensionais HMQC (Figuras 88 e 89) e HMBC (Figuras 90, 91 e 92). O espectro HMBC, mostrou uma correlação entre o hidrogênio δ_H 8,11 (H-4) com o carbono oxigenado em δ_C 149,56 (C-5), confirmando da presença da metoxila em C-5. As demais correlações encontram-se compiladas na Tabela 9.

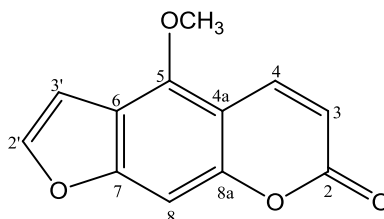
De acordo com o que foi exposto, além de comparação com dados da literatura (SANDOVAL-MONTEMAYOR et al., 2012) (Tabela 9), foi possível identificar *Ps*-3 como sendo a furanocumarina bergapteno (Figura 83), isolada anteriormente em outras espécies do gênero *Pilocarpus* (CUCA; AVILA, 2007; AMARO-LUIS et al., 1990), porém, relatada pela primeira vez para a espécie *P. spicatus*.

Figura 83- Estrutura química de *Ps*-3: bergapteno.



De acordo com a literatura, bergapteno apresenta diversas atividades biológicas, tais como: atividade anticolinesterásica e antioxidante (DINCEL et al., 2013), antibacteriana (GUZMAN et al., 2013), antitumoral (SUMIYOSHI et al., 2014) e fototóxica (MENEZES et al., 2014).

Tabela 9- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Ps-3* (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da bergapteno (700 MHz, CDCl_3) (SANDOVAL-MONTEMAYOR et al., 2012) (δ em ppm, J em Hz).



$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC					$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC		Bergapteno (SANDOVAL-MONTEMAYOR et al., 2012)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}		
2	161,22		H-3	H-4	161,53			
3	112,57	6,22 (<i>d</i> , $J=9,6$)			112,76	6,28 (<i>d</i> , $J=9,8$)		
4	139,24	8,11 (<i>dd</i> , $J=9,6$ e 0,4)			139,53	8,16 (<i>dd</i> , $J=9,8$ e 0,7)		
4a	106,40		H-3	H-8	106,61			
5	149,56			H-4; OCH_3	149,78			
6	112,67		H-3'	H-8; H-2'	112,87			
7	158,36		H-8	H-2', H-3'	158,59			
8	93,83	7,07 (<i>t</i> , $J=0,8$)			94,07	7,14 (<i>dd</i> , $J=1,4$ e 0,7)		
8a	152,69		H-8	H-4	152,90			
2'	144,77	7,55 (<i>d</i> , $J=2,4$)			145,01	7,60 (<i>d</i> , $J=2,8$)		
3'	105,02	6,98 (<i>dd</i> , $J=2,4$ e 0,8)	H-2'		105,26	7,02 (<i>dd</i> , $J=2,1$ e 1,4)		
OCH_3	60,08	4,24 (<i>s</i>)			60,30	4,27 (<i>s</i>)		

Figura 84- Espectro de massas em baixa resolução de *Ps-3*.

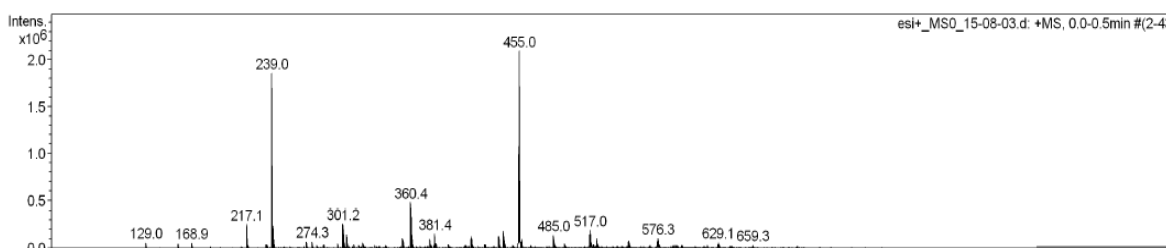


Figura 85- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-3*.

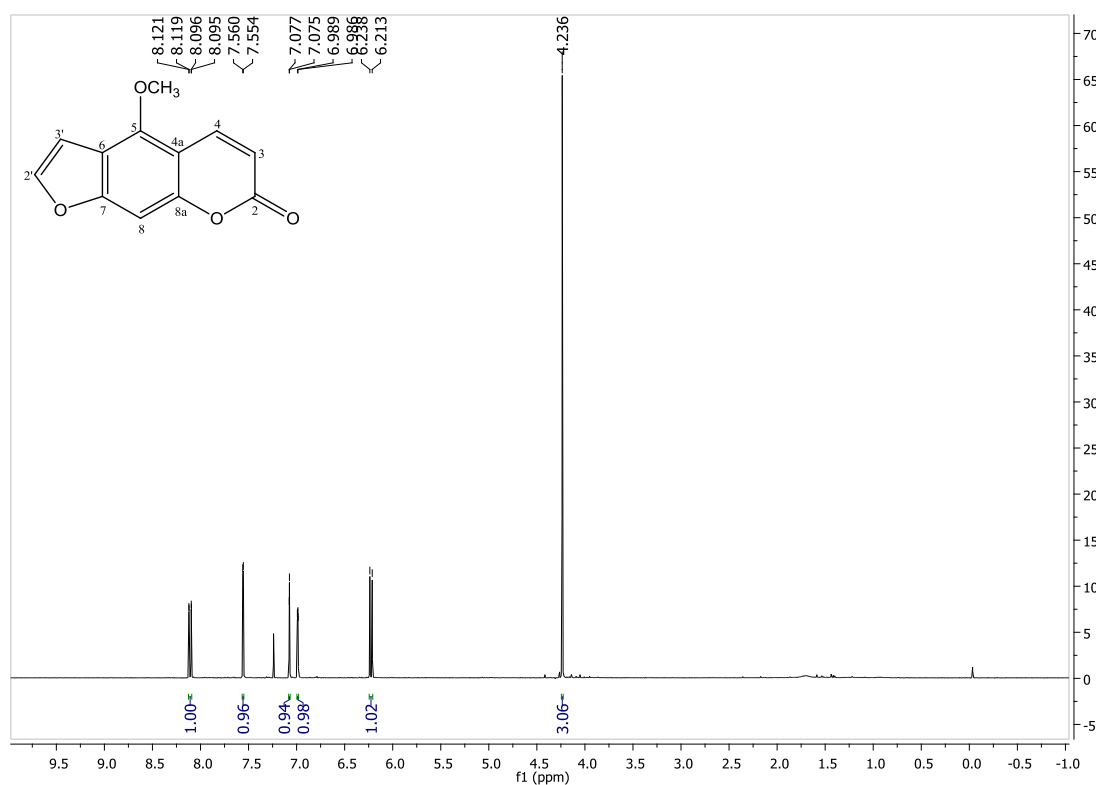


Figura 86- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-3* na região de 8,3-6,9 ppm.

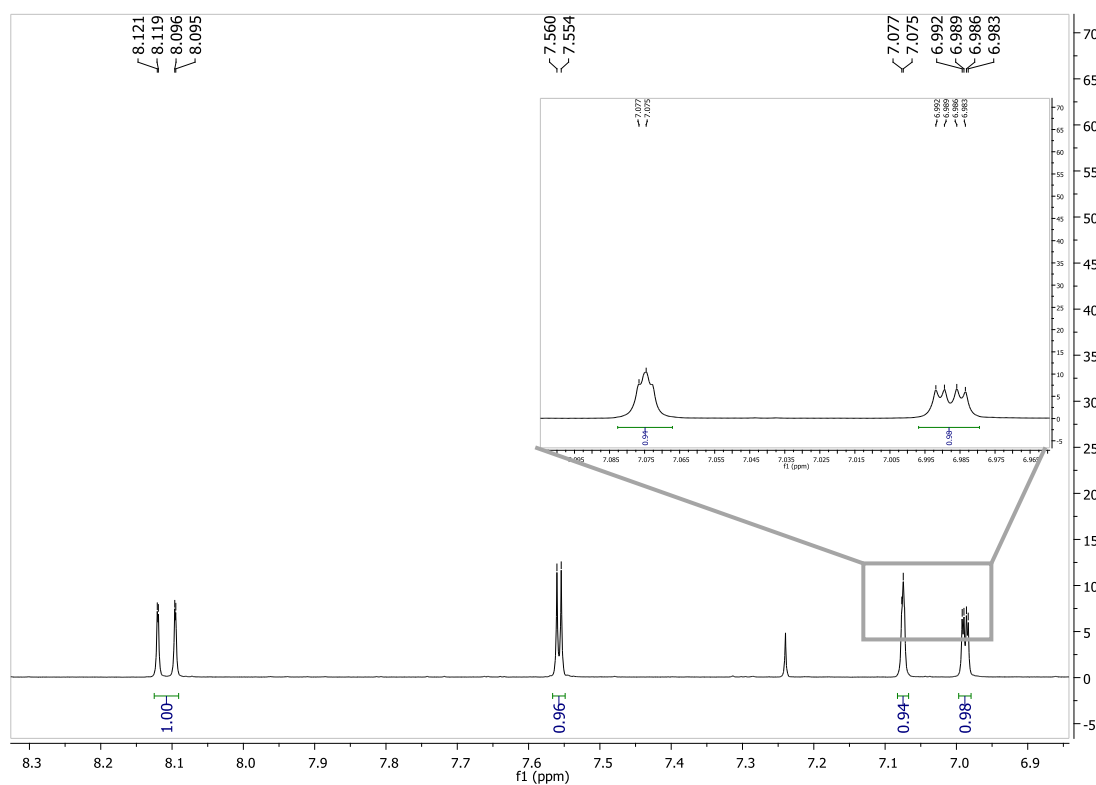


Figura 87- Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz, CDCl_3) de *Ps*-3.

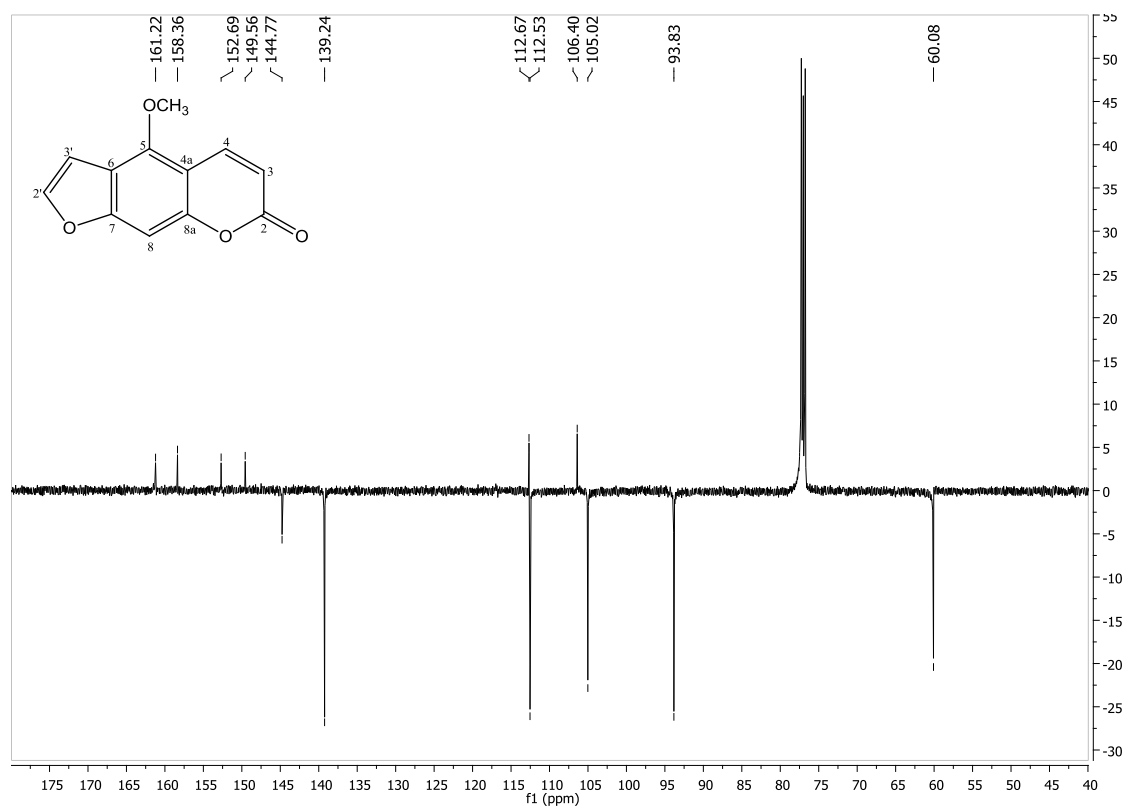


Figura 88- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps*-3.

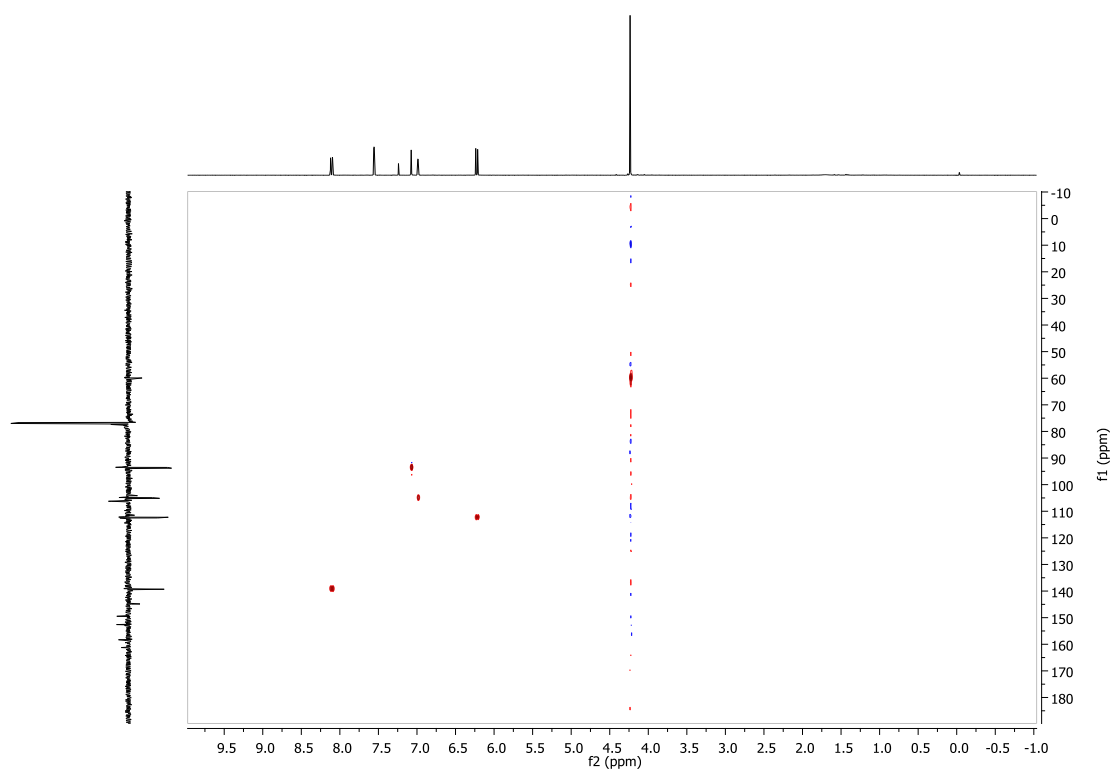


Figura 89- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-3* na região de (8,3-6,0 ppm) x (150-90 ppm).

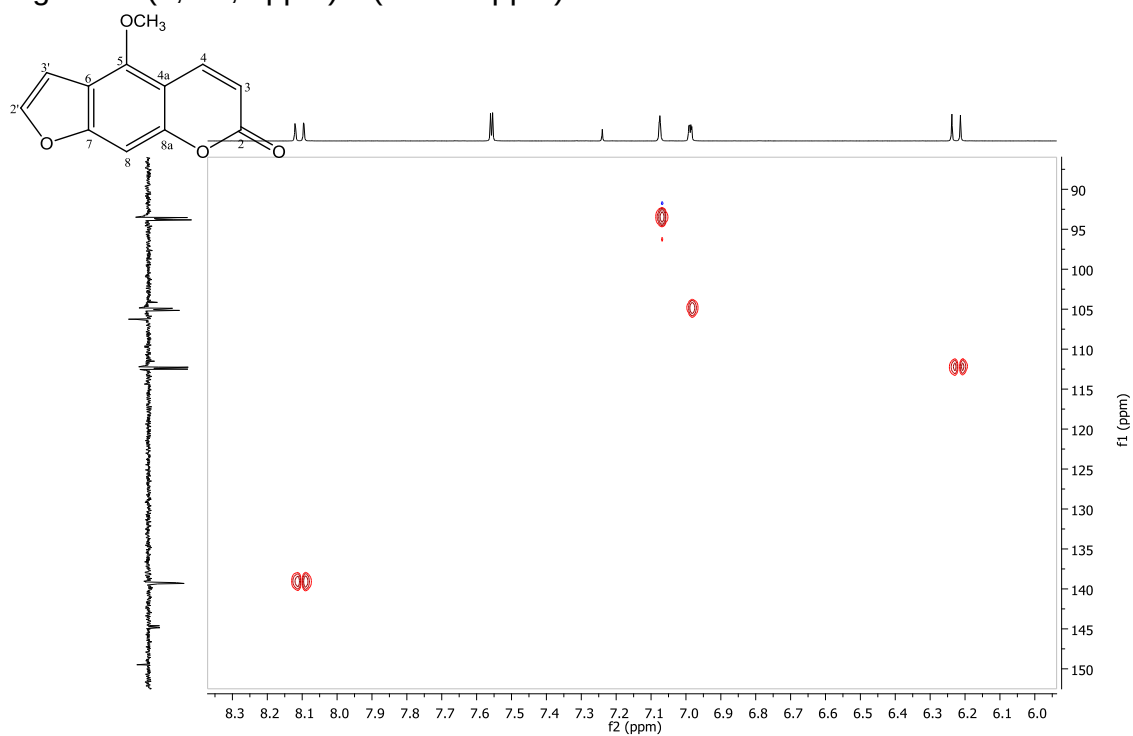


Figura 90- Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-3*.

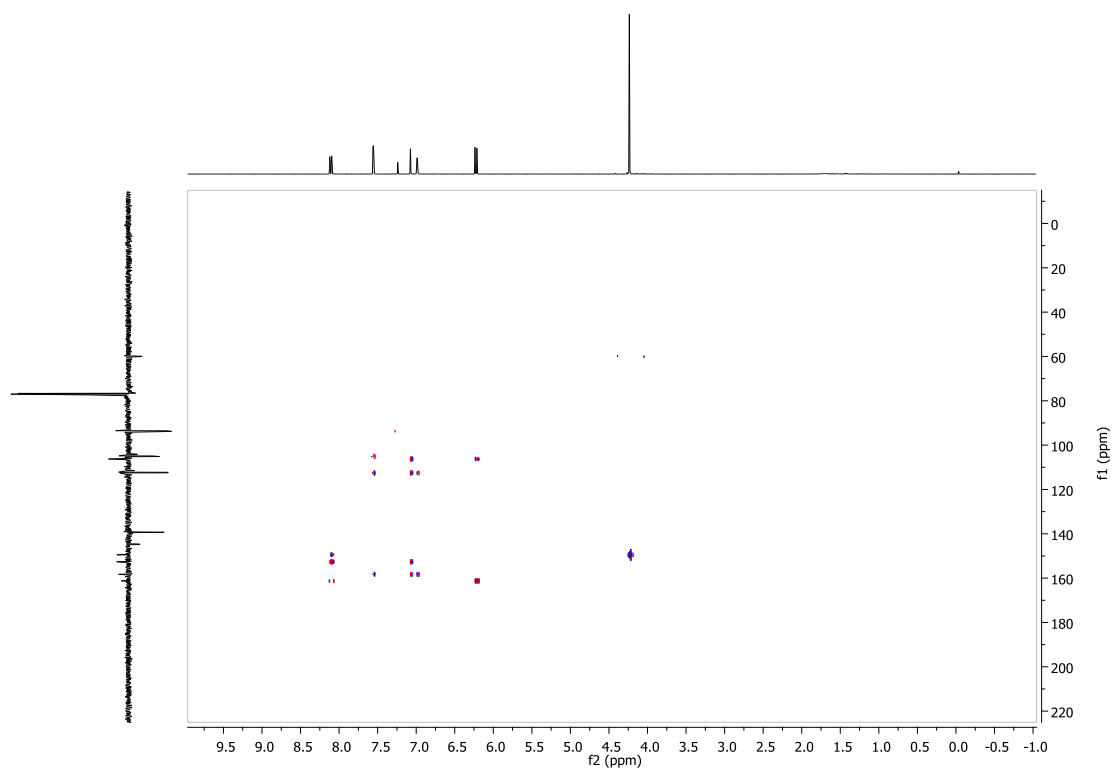


Figura 91- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-3* na região de (7,7-6,0 ppm) x (124-99 ppm).

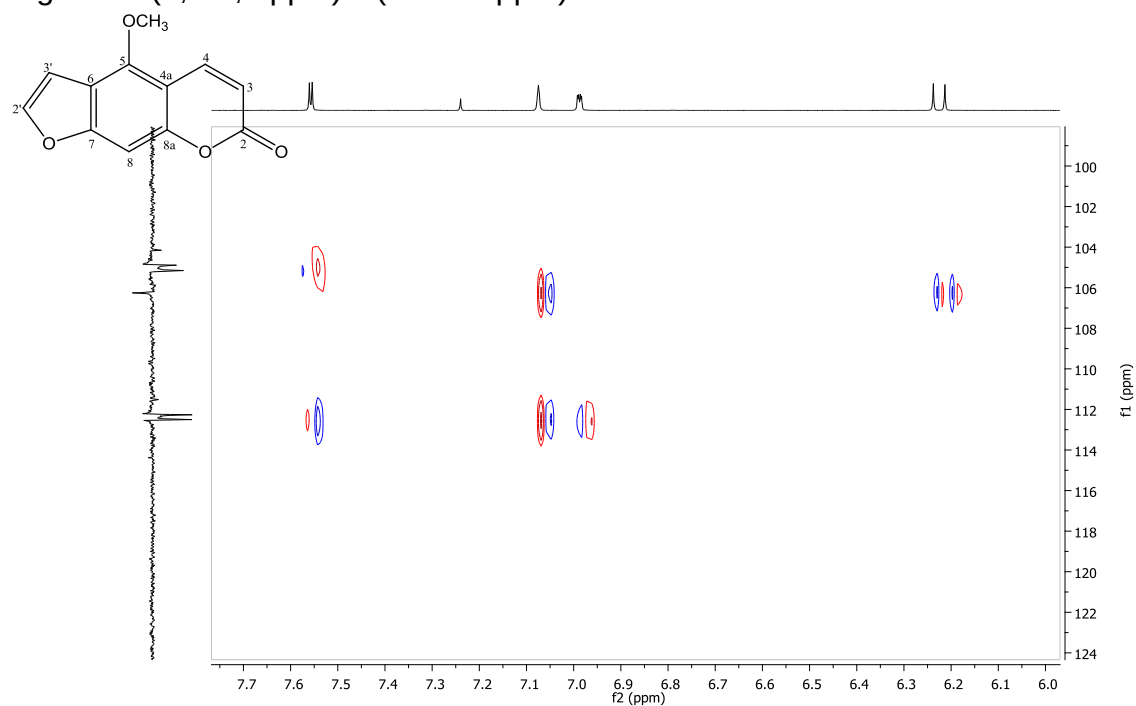
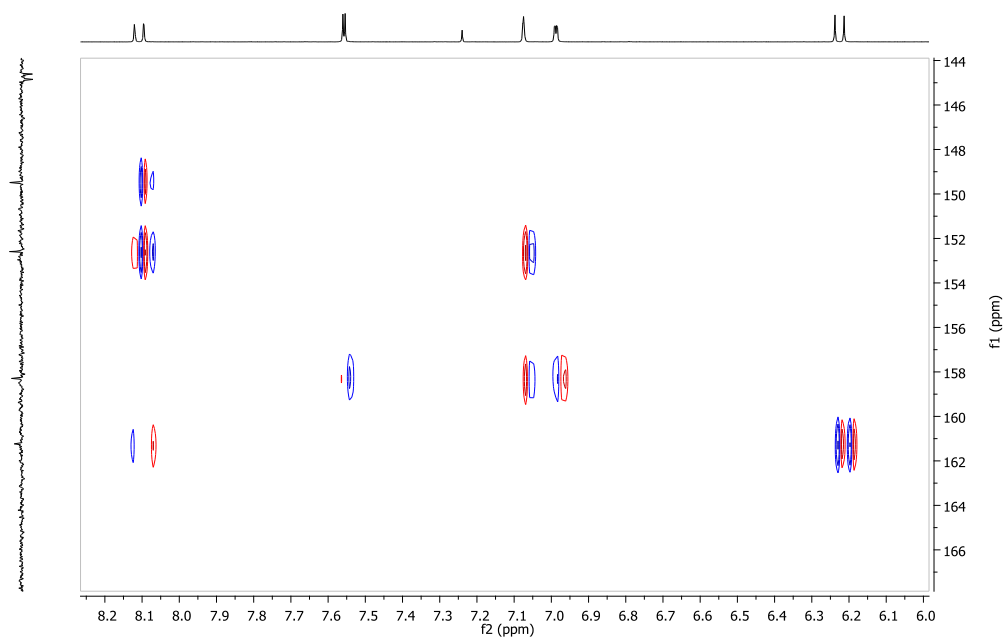


Figura 92- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-3* na região de (8,2-6,0 ppm) x (167-144 ppm).



5.2.4. Determinação estrutural de *Ps-4*

A substância *Ps-4* foi isolada na forma de cristais incolores, com ponto de fusão de 99,7-102,2 °C (lit. 102 °C) (RAZDAN et al., 1987) e massa de 81,1 mg ($1,80 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). O espectro de massas obtido em baixa resolução IES-MS (Figura 94) mostrou um pico em 293,1 $[M+Na]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_4$ (calc. 270,1).

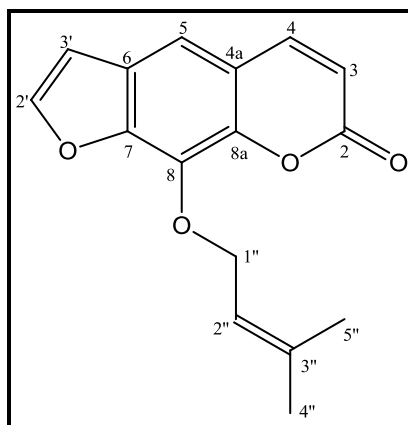
Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, $CDCl_3$) (Figuras 95, 96 e 97) de *Ps-4* mostraram sinais bastante semelhantes aos observados para furanocumarina xantotoxina (*Mm-2*) (pág. 72), de forma que os deslocamentos químicos em δ_C 160,53, 114,56, 144,36, 113,11, 125,81, 148,51, 131,55, 116,40, 143,71, 146,56 e 106,67 foram atribuídos aos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-4a, C-8a, C-2' e C-3', respectivamente.

Diferente do que foi observado para xantotoxina, o espectro de RMN ^1H (Figuras 95 e 96) de *Ps-4* mostrou um tripleto em δ_H 5,58 ($J = 7,2$ Hz, H-2'') para um hidrogênio de alceno trissubstituído acoplando com um dubleto em δ_H 4,97 ($J = 7,2$ Hz, H-1''), característicos de hidrogênio oxi metilênico, e dois singletos em δ_H 1,68 (H-4'') e 1,71 (H-5'') para hidrogênios de duas metilas alílicas. Estes dados permitiram propor uma unidade prenila para *Ps-4*. A presença dessa unidade foi sustentada pelos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C (Figura 97) em δ_C 139,74 (C-3''), 119,67 (C-2''), 25,80 (C-5''), 70,08 (C-1'') e 18,09 (C-4'') (WEI; ITO, 2006).

Todos esses assinalamentos foram confirmados através das correlações diretas observadas no espectro de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 98, 99 e 100). Dentre as correlações observadas nesse espectro, temos a correlação entre o singlete em δ_H 7,33 (H-5) com o sinal em δ_C 113,11 (C-5), do dubleto em δ_H 4,97 (H-1'') com o sinal em δ_C 70,09 (C-1'') e do tripleto em δ_H 5,58 (H-2'') com o sinal em δ_C 119,67 (C-2'').

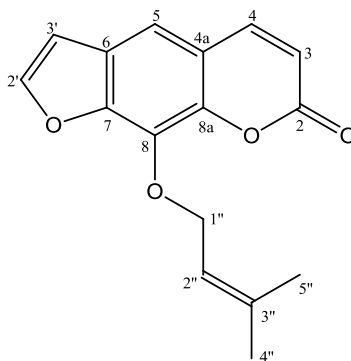
Todos os dados descritos estão reunidos na Tabela 10 e estão de acordo com os descritos na literatura para a furanocumarina imperatorina (WEI; ITO, 2006) (Figura 93).

Figura 93- Estrutura química de *Ps-4*: imperatorina.



Imperatorina foi isolada anteriormente em *Pilocarpus goudotianus* (MACÍAS et al., 1993) e este é o primeiro relato na espécie *P. spicatus*. Essa substância possui diversas evidências farmacológicas, tais como: Inseticida (WANG et al., 2012), antimicrobiana (WIDELSKI et al., 2009), antitumoral (JAKUBOWICZ-GIL et al., 2012; KLEINER; REED; DIGIOVANNI, 2003), anti-osteoporose (LV et al., 2013), anti-inflamatória (HUANG et al., 2012), anticonvulsivante (LUSZCZKI et al., 2010) e vasodilatadora (ZHOU et al., 2013; ZHANG et al., 2010; HE et al., 2007; NIE et al., 2009).

Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Ps-4* (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C da imperatorina (500 MHz, CDCl_3) (WEI; ITO, 2006) (δ em ppm, J em Hz).



<i>Ps-4</i>			Imperatorina (WEI; ITO, 2006)	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	160,53		159,82	
3	114,56	6,33 (<i>d</i> , $J=9,6$)	114,20	6,29
4	144,36	7,73 (<i>d</i> , $J=9,6$)	145,34	7,73
4a	116,40		116,38	
5	113,11	7,33 (<i>s</i>)	114,13	7,29
6	125,81		125,72	
7	148,51		147,83	
8	131,55		130,56	
8a	143,71		143,21	
2'	146,56	7,66 (<i>d</i> , $J=2,2$)	146,43	7,67
3'	106,67	6,78 (<i>d</i> , $J=2,2$)	107,09	6,78
1''	70,09	4,97 (<i>d</i> , $J=7,2$)	69,37	4,98
2''	119,67	5,58 (<i>t</i> , $J=7,2$)	119,70	5,56
3''	139,74		139,12	
4''	18,09	1,68 (<i>s</i>)	17,85	1,79
5''	25,80	1,71 (<i>s</i>)	25,49	1,79

Figura 94- Espectro de massas em baixa resolução de *Ps-4*.

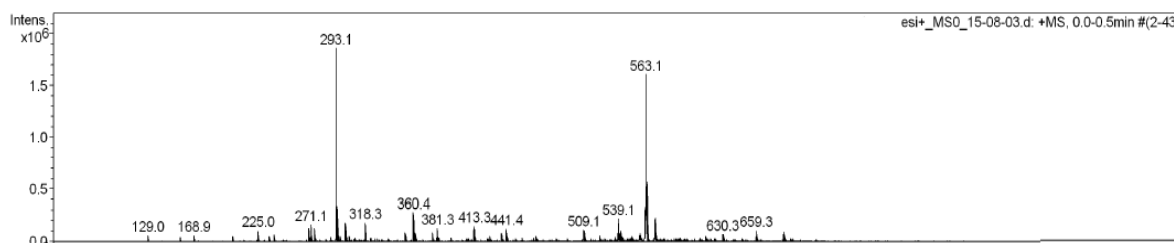


Figura 95- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-4*.

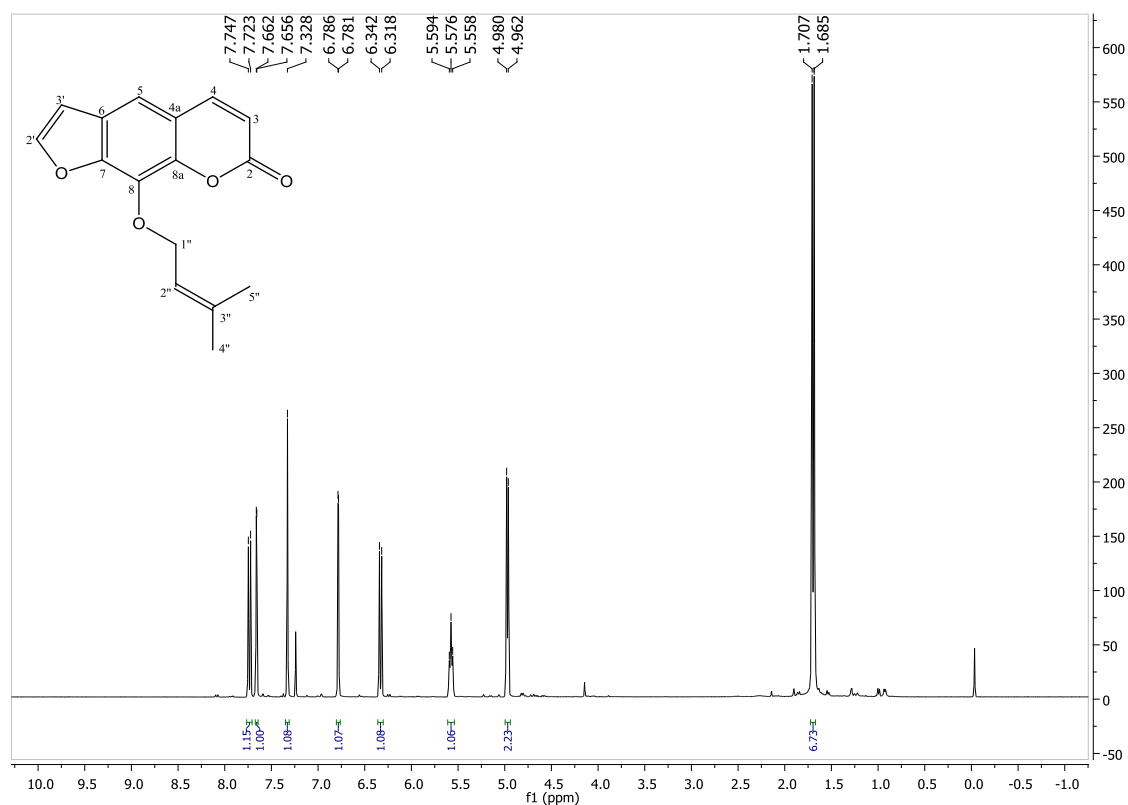


Figura 96- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-4* na região de 7,9-4,6 ppm.

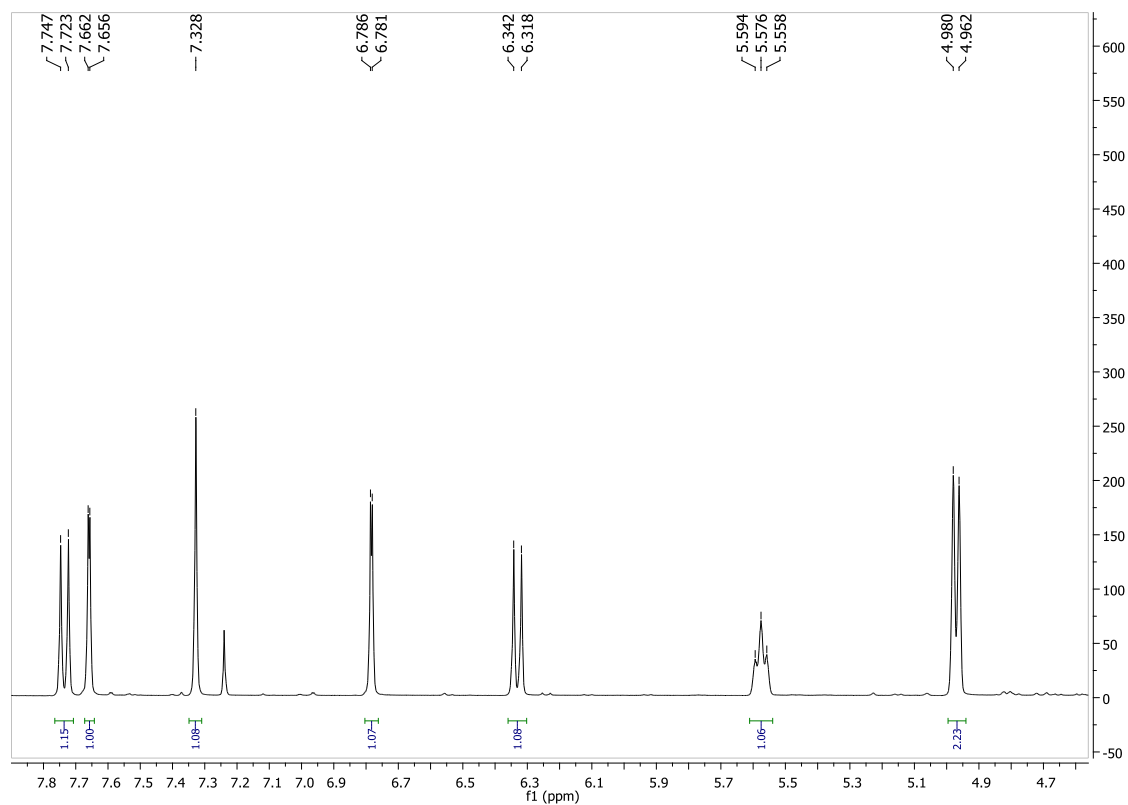


Figura 97- Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz, CDCl_3) de *Ps*-4.

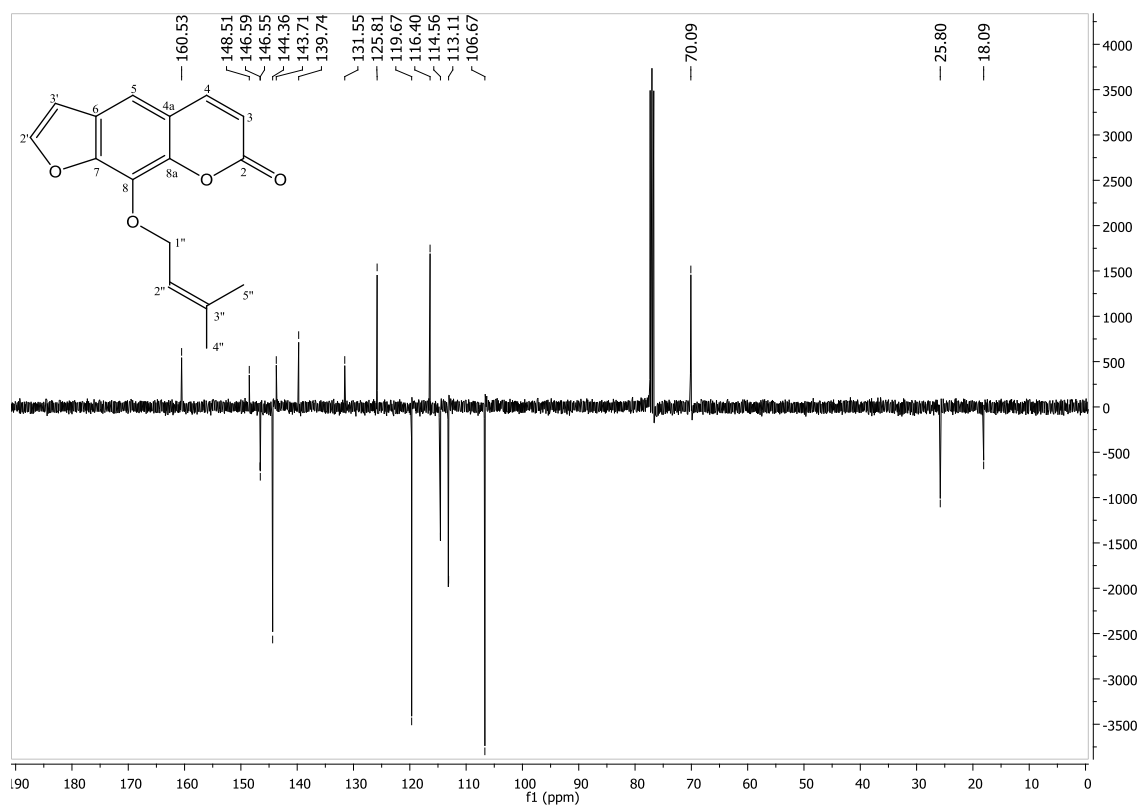


Figura 98- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps*-4.

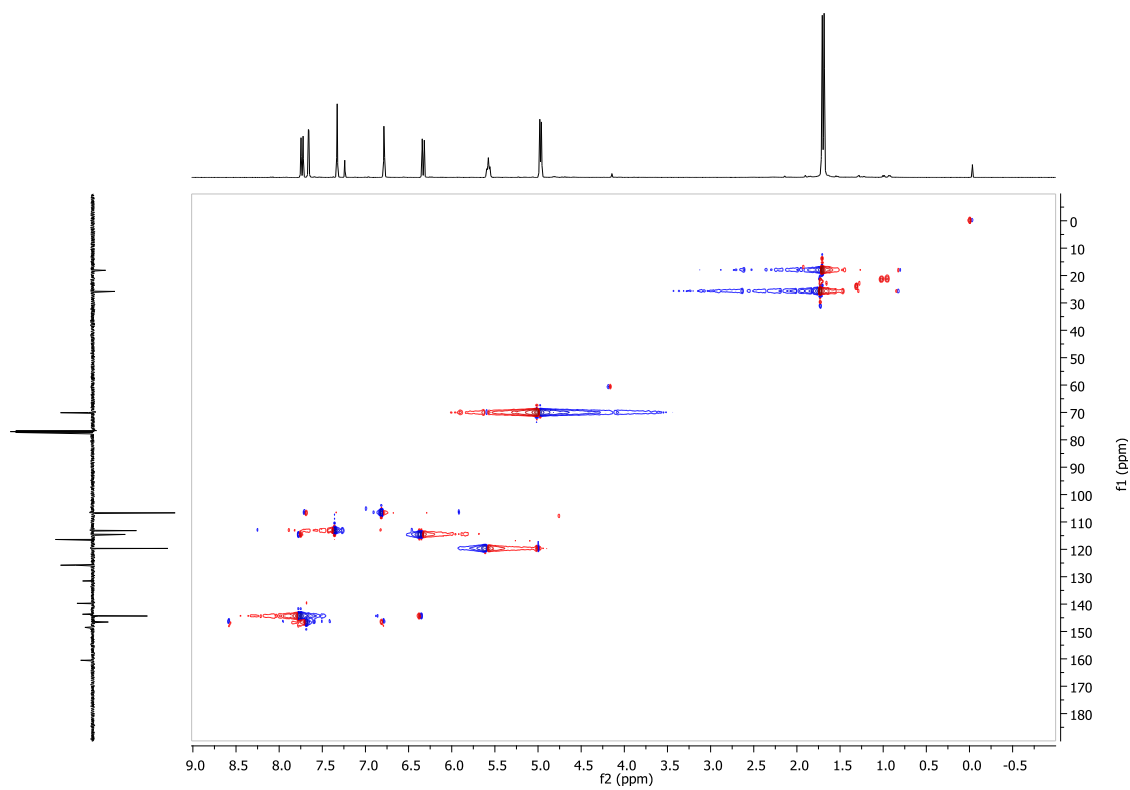


Figura 99- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-4* na região de (8,6-4,8 ppm) x (150-90 ppm).

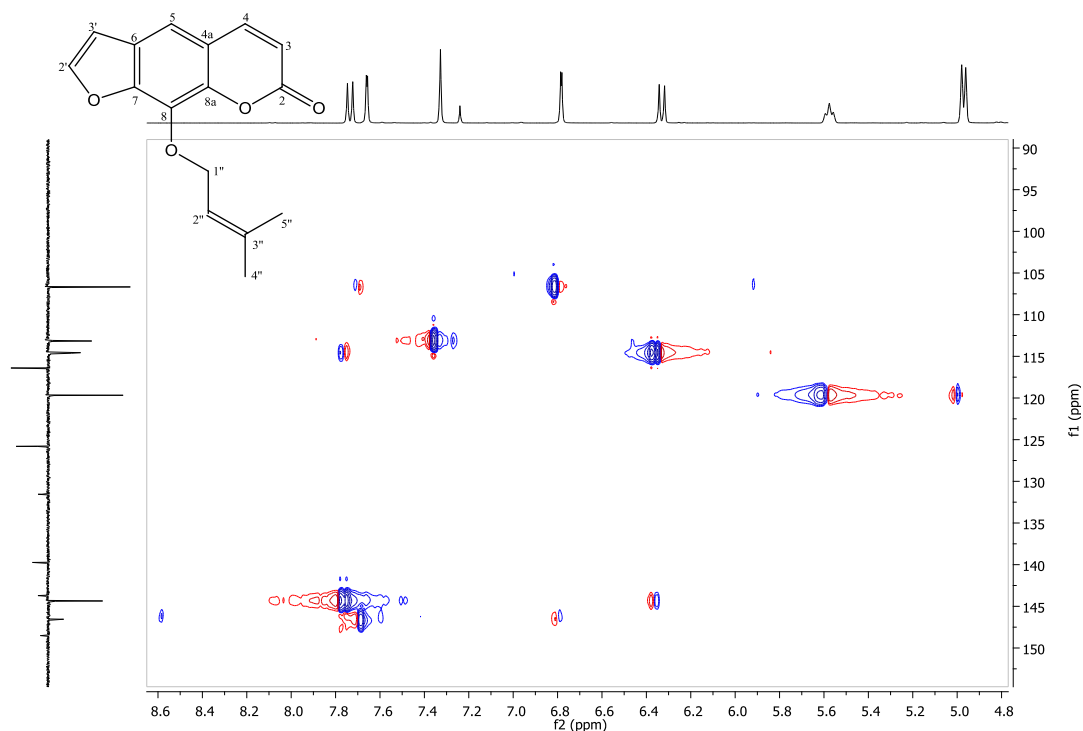
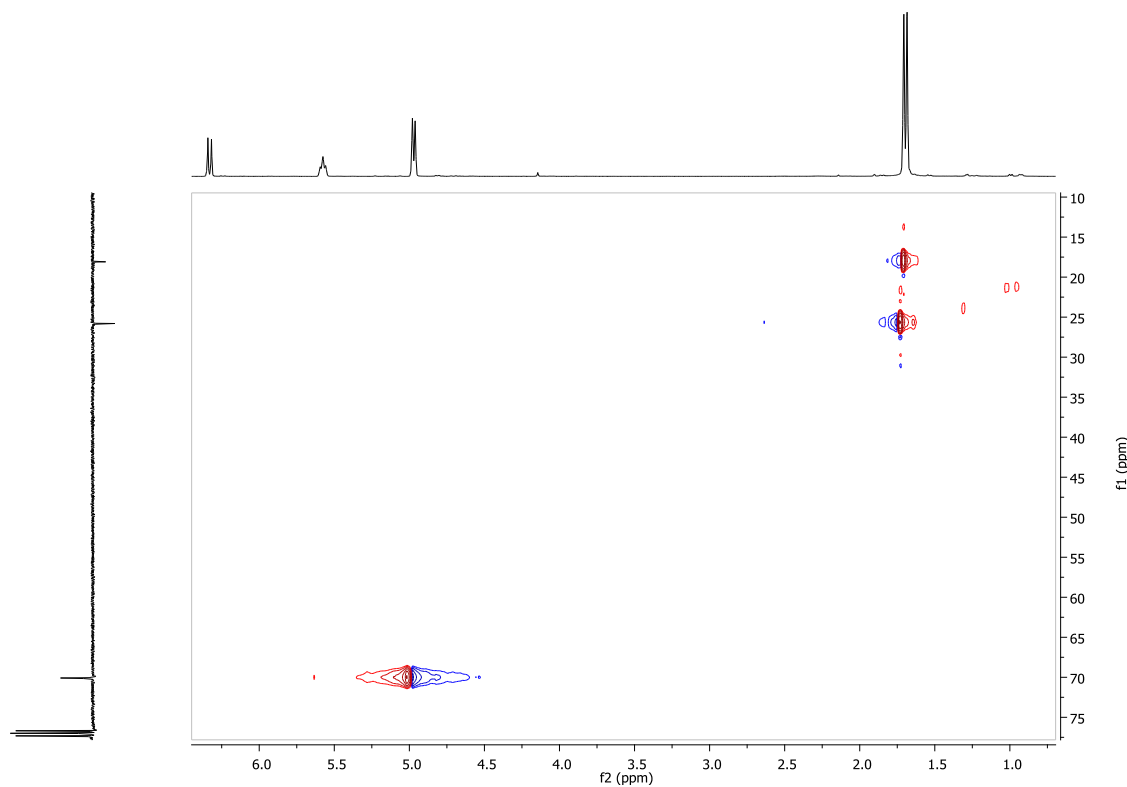


Figura 100- Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-4* na região de (6,2-1,0 ppm) x (75-10 ppm).



5.2.5. Determinação estrutural de *Ps-5*

A substância *Ps-5* foi isolada na forma de cristais incolores e massa de 88,7 mg ($1,97 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada).

Após análise espectroscópica (Figura 102) e comparação com dados obtidos para *Mm-2* (pág. 72), os quais se mostraram idênticos, foi possível identificar *Ps-5* como sendo a furanocumarina xantotoxina (Figura 101), isolada em *Metrodorea mollis* e em outras espécies do gênero *Pilocarpus* (CUCA; AVILA, 2007; COMPAGNONE; RODRIGUEZ; DELLE MONACHE, 1993; AMARO-LUIS et al., 1990), agora relatada pela primeira vez para a espécie *P. spicatus*.

Figura 101- Estrutura química de *Ps-5*: xantotoxina.

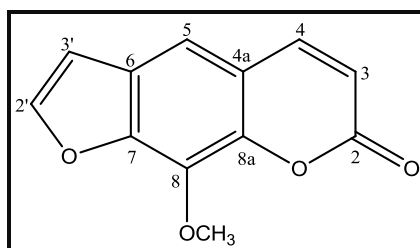
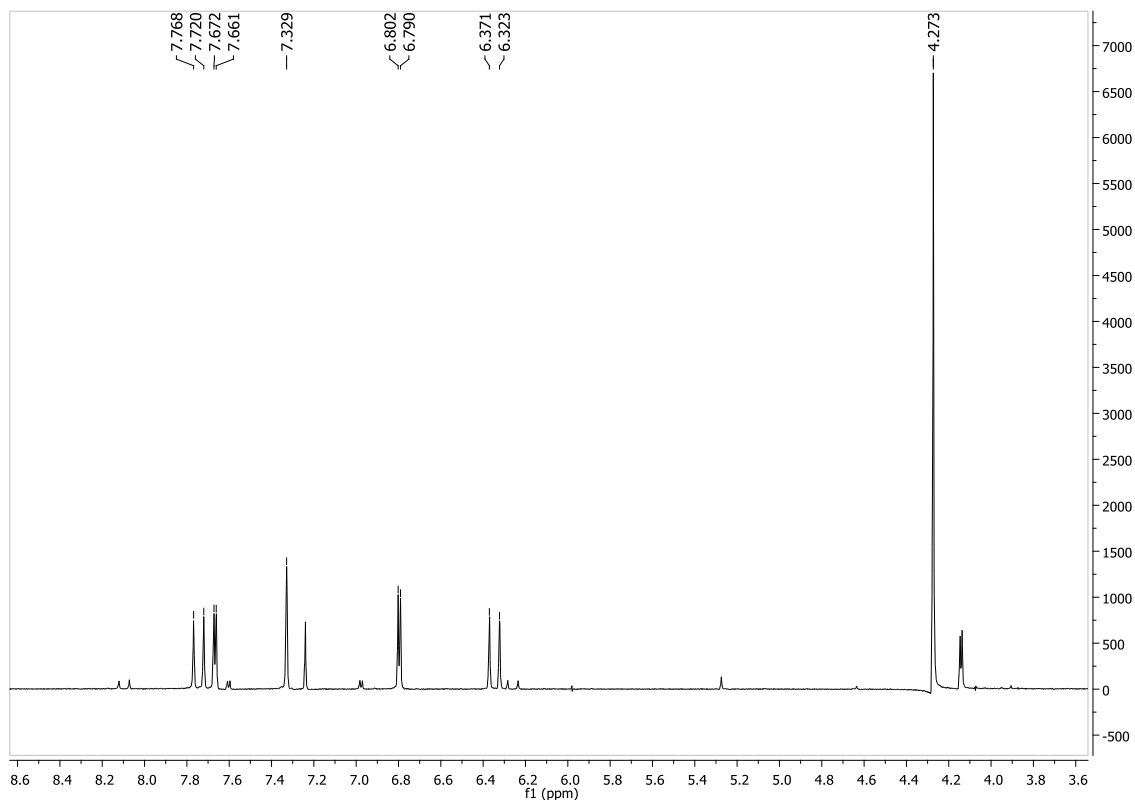


Figura 102- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *Ps-5*.

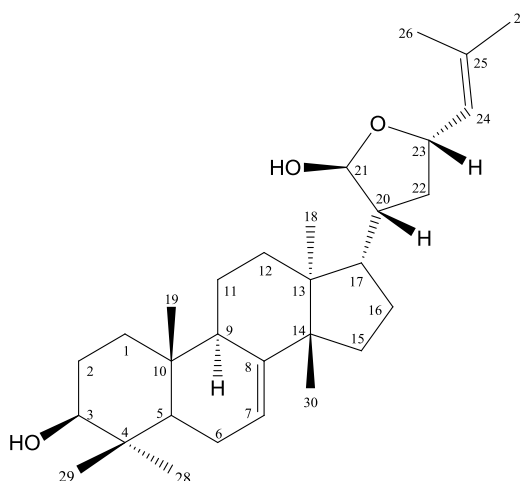


5.2.6. Determinação estrutural de Ps-6

O composto *Ps-6* foi isolado na forma de cristais brancos e massa de 15,3 mg ($0,34 \times 10^{-3}$ % em relação à massa da planta seca e pulverizada). O espectro de massas de alta resolução IES-MS (Figura 106) mostrou o pico da molécula cationizada em m/z 439,3561 $[M + H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_2$ (calc. 438,3498). O espectro de IV (Figura 107) mostrou absorções na região entre $3100-3000\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento de C-H de alceno; entre $2960-2880\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento de C-H de alcano; entre $1390-960\text{ cm}^{-1}$ de estiramento C-O, bem como absorção em 760 cm^{-1} característica de deformação C-H sp^2 de dupla ligação trisubstituída.

No espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) (Figuras 108, 109 e 110) observou-se a presença de dois hidrogênios olefínicos em δ_H 5,24 (*sl*, H-7) e 5,14 (*d*, $J = 8,8\text{ Hz}$, H-24), sete singletos referentes a hidrogênios metílicos em δ_H 1,71, 1,69, 0,95 (sinal referente a duas metilas), 0,91, 0,89 e 0,76, bem como três hidrogênios oximetínicos em δ_H 5,10 (*d*, $J = 2,4\text{ Hz}$, H-21), 4,52 (*m*, H-23) e 3,52 (*sl*, H-3). Em comparação com o triterpeno tirucalano 3-*epi*-flindissol (Figura 103) sugeriram que ambos os compostos possuem o mesmo esqueleto (KAMPERDICK et al., 2003).

Figura 103- Estrutura química do triterpeno 3-*epi*-flindissol.



O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figuras 112, 113, 114 e 115) mostrou 30 sinais correspondentes a 6 carbonos não hidrogenados, 9 carbonos metínicos, 8 carbonos metilênicos e 7 carbonos metílicos. Os deslocamentos

químicos em δ_C 124,43 (C-24), 118,41 (C-7), 99,66 (C-21), 75,62 (C-3), 72,94 (C-23), 51,89 (C-17), 50,87 (C-20), 49,94 (C-9) e 45,08 (C-5) fortaleceram a proposta do triterpeno tetracíclico semelhante ao 3-*epi*-flindissol (KAMPERDICK et al., 2003), exceto o sinal em δ_C 27,60 referente ao carbono C-2. Para Ps-6 o sinal atribuído ao carbono C-2 foi o em δ_C 18,33. Ainda no espectro de RMN ^{13}C , os sinais em δ_C 75,62 e 99,66 foram atribuídos a C-3 e C-21.

O espectro de Infravermelho (Figura 107) não mostrou absorções referente a estiramento O-H e o produto da reação de acetilação de Ps-6 não registrou no espectro de RMN ^1H o sinal referente a metila de grupo acetoxi (Figura 111). Assim, foi possível estabelecer a ciclização de Ps-6. Essa proposta foi confirmada através do espectro bidimensional HMBC (Figuras 119, 120, 121 e 122), onde foi possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_H 3,52 (H-3) com o carbono em δ_C 99,66 (C-21). Além disso, no espectro de NOESY (Figuras 125, 126 e 127) observou-se uma correlação entre H-3 e H-21, indicando uma proximidade desses núcleos, confirmando a epoxidação de Ps-6. As demais correlações estão compiladas na Tabela 11.

No estudo conformacional, foram selecionados os 2 confórmeros de menor energia, que após otimização da geometria e análise das frequências vibratórias, utilizando DFT - B3LYP / 6,311 + G ** possuíram energias internas inferiores a $-3,4 \cdot 10^6$ kJ / mol (Figura 105). A principal diferença entre as conformações é a distância entre átomos de hidrogênio H-3 e H-21 em torno de 3,03 Å, o que corrobora os dados de NOESY.

A análise dos dados espectrais, de modelagem molecular e comparação com os dados da literatura (Tabela 11), nos permitiram elucidar Ps-6 como sendo o triterpeno tirucalano, 3 α ,21 α -21,23-diepoxi-tirucala-7,24-dieno, nomeado trivialmente de Brazoxido A (Figura 104), um novo produto natural, não usual, uma vez que se trata do primeiro registro de ciclização desses triterpenos através das ligações em C-3-O-C-21.

Figura 104- Estrutura química de *Ps-6*: 23 α ,21 α -21,23-diepoxi-tirucala-7,24-dieno (Brazoxido A).

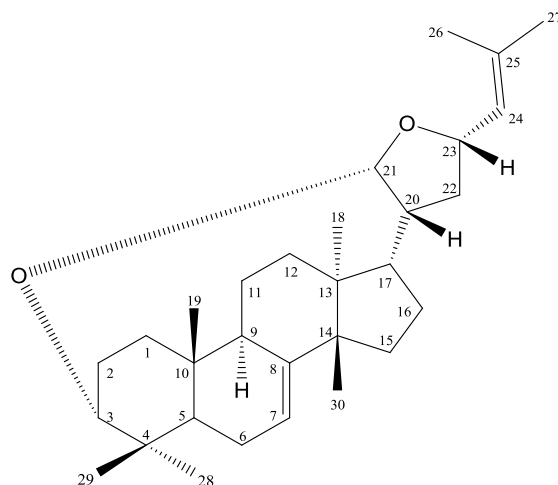


Figura 105- Modelagem molecular. As setas pretas indicam a distância em angstroms entre os hidrogénios H-3 e H-21: a) 3,04 Å e b) 3,03 Å. A menor geometria energia dos conforméros: a) -3,468,111.12 kJ / mol e b) -3,468,119.71 calculado pelo DFT-B3LYP / 6,311 + G **.

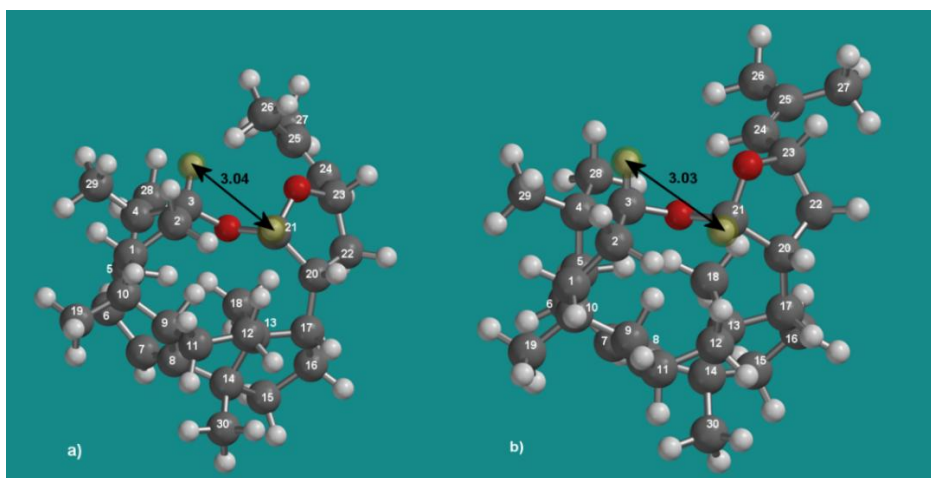
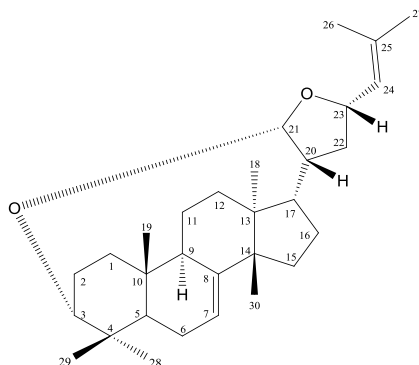


Tabela 11- Dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Ps-6* (400 MHz, CDCl_3) e de RMN ^1H e ^{13}C do modelo 3-*epi*-flindissol (300 MHz, CDCl_3) (KAMPERDICK et al., 2003) (δ em ppm, J em Hz).



$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC		$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY	3- <i>epi</i> -flindissol (KAMPERDICK et al., 2003)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$			δ_{C}	δ_{H}
1	32,62	1,36/1,65		H-3; H-19			37,12	1,13/1,66
2	18,34	1,84/1,66					27,60	1,64/1,60
3	75,62	3,52 (s/)		H-1	H-2	H-21; H-23	79,16	3,24 (dd, 11,2, 3,9)
4	36,85		H-3; H-28; H-29				38,92	
5	45,08	1,86		H-3; H-7; H-19; H-28; H-29			50,64	1,31
6	23,78	2,03/1,91					23,92	2,14/1,97
7	118,41	5,24 (s/)			H-6		118,13	5,27
8	146,15			H-30			145,45	
9	49,94	2,49		H-7; H-19	H-11	H-5; H-18	48,75	2,23
10	34,33		H-19				34,97	
11	17,37	1,59/1,50					17,51	1,54/1,50
12	31,82	1,96/1,76		H-18			31,65	1,74/1,72
13	44,15		H-18	H-30			43,70	
14	51,23		H-30	H-18			50,91	
15	34,04	1,55/1,47		H-30			33,78	1,54/1,48
16	28,54	1,91/1,25					27,35	1,88/1,30
17	51,89	2,30		H-21			50,54	1,79
18	22,46	0,95 (s)					22,50	0,90 (s)
19	13,26	0,76 (s)		H-1			13,01	0,75 (s)
20	50,87	1,77	H-17			H-23	50,13	2,20
21	99,66	5,10 (d, $J=2,4$ e 4,8)		H-3; H-17	H-17		101,38	5,30 (d, $J=3,3$)
22	40,44	2,08/1,19		H-24			39,61	2,12/1,26
23	72,94	4,52 (m)			H-22		73,93	4,81 (ddd, $J=10,4$, 8,6 e 4,6)
24	124,43	5,14 (d, $J=8,8$)		H-26; H-27	H-23		124,80	5,14 (d, $J=7,3$, 1,2)
25	137,54		H-26; H-27				136,84	
26	18,34	1,69 (s)					18,27	1,73 (s)
27	25,89	1,71 (s)					25,78	1,70 (s)
28	28,34	0,91 (s)		H-3; H-29			27,56	0,97 (s)
29	21,50	0,89 (s)		H-3			14,67	0,86 (s)
30	26,73	0,95 (s)					27,07	0,98 (s)

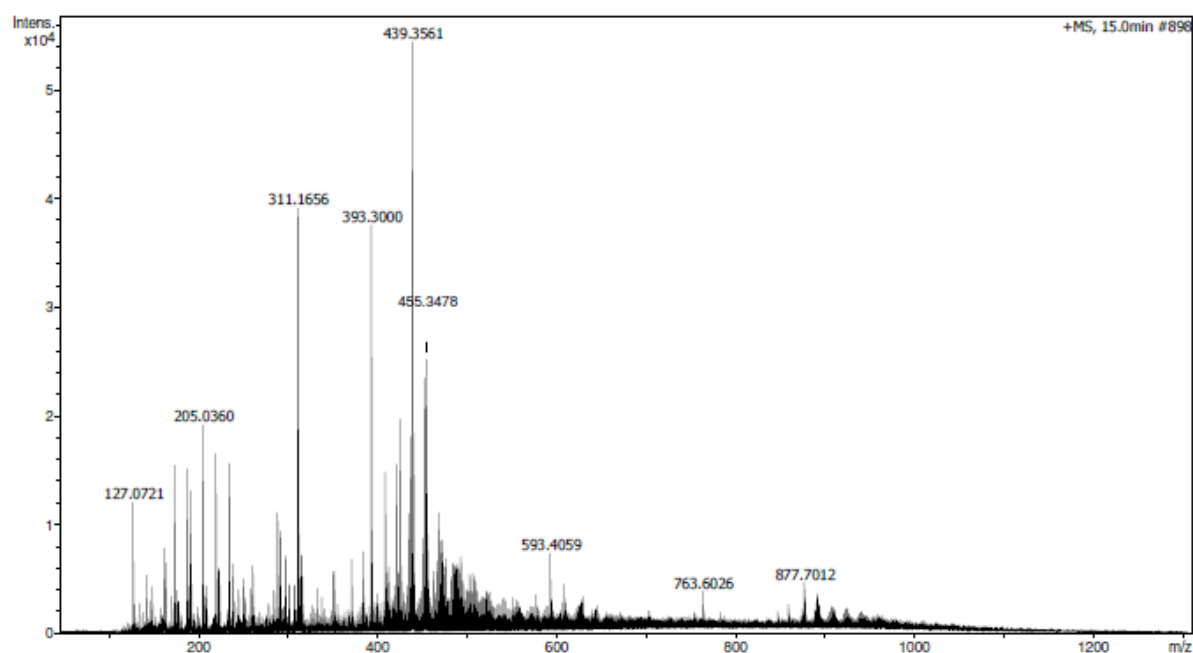
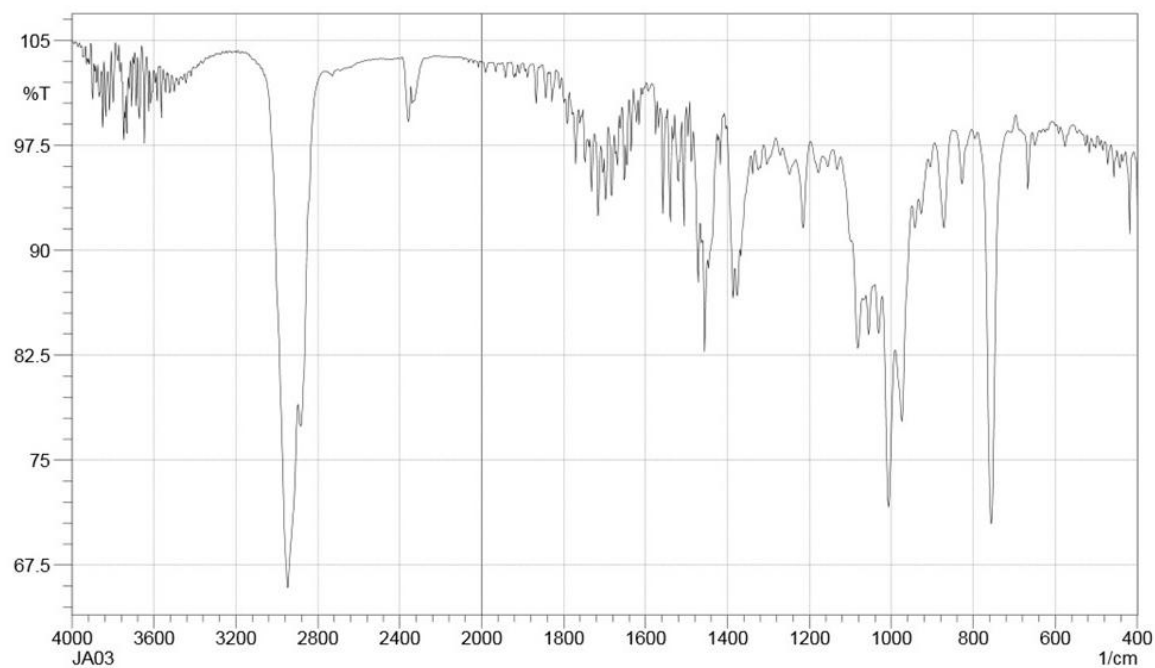
Figura 106- Espectro de massas em alta resolução de *Ps-6*.**Figura 107-** Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de *Ps-6*.

Figura 108- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de *Ps-6*.

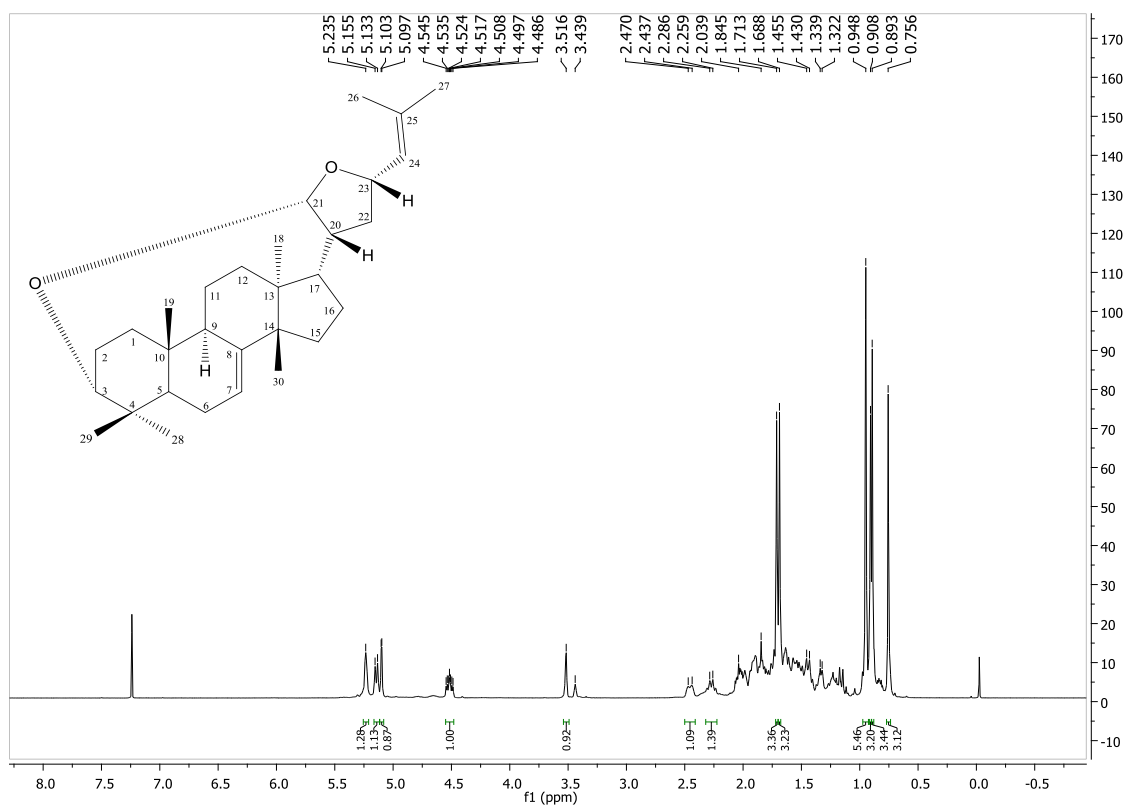


Figura 109- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de 5,7-3,1 ppm.

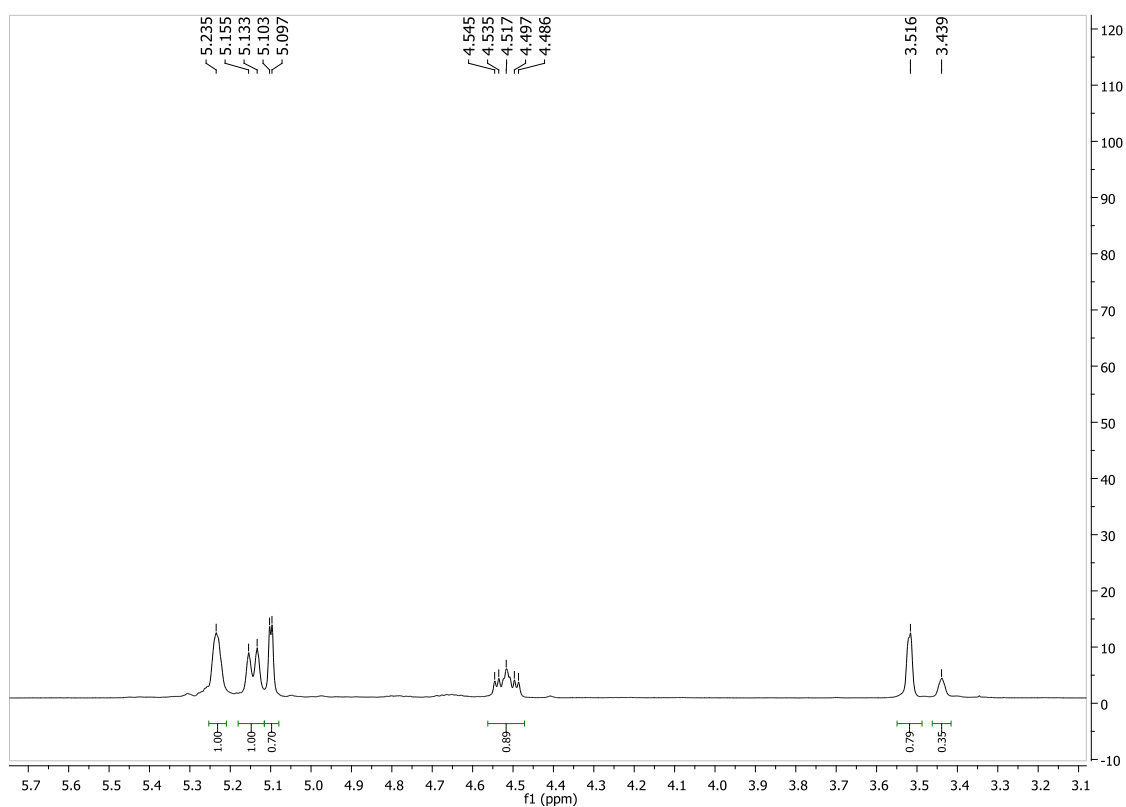


Figura 110- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de 2,5-0,4 ppm.

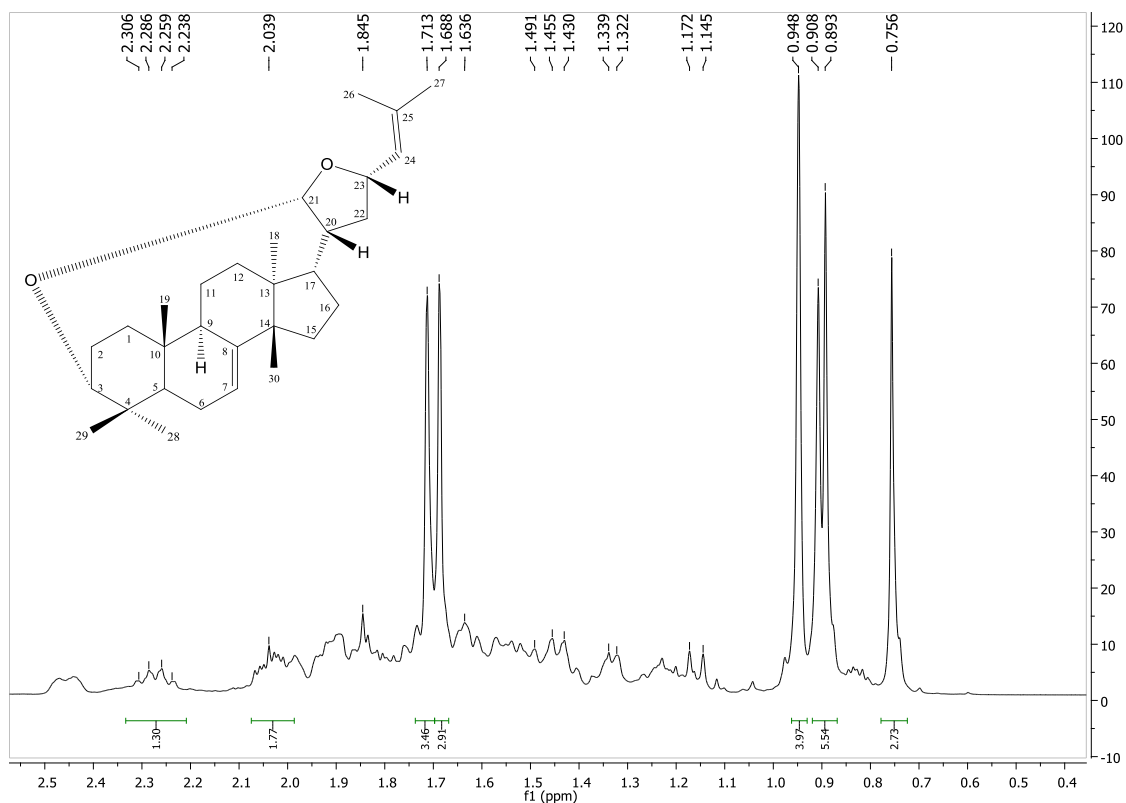


Figura 111- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da acetilação *Ps-6*.

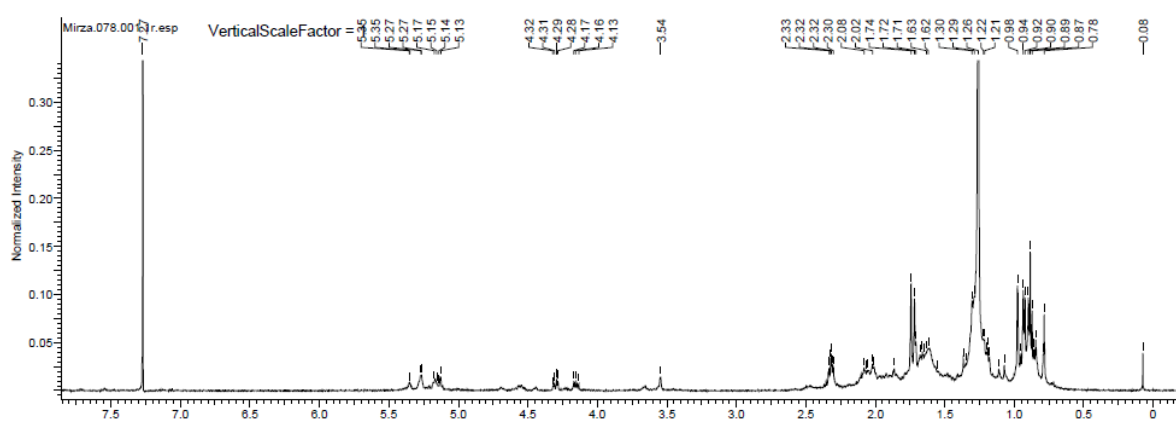


Figura 112- Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de *Ps*-6.

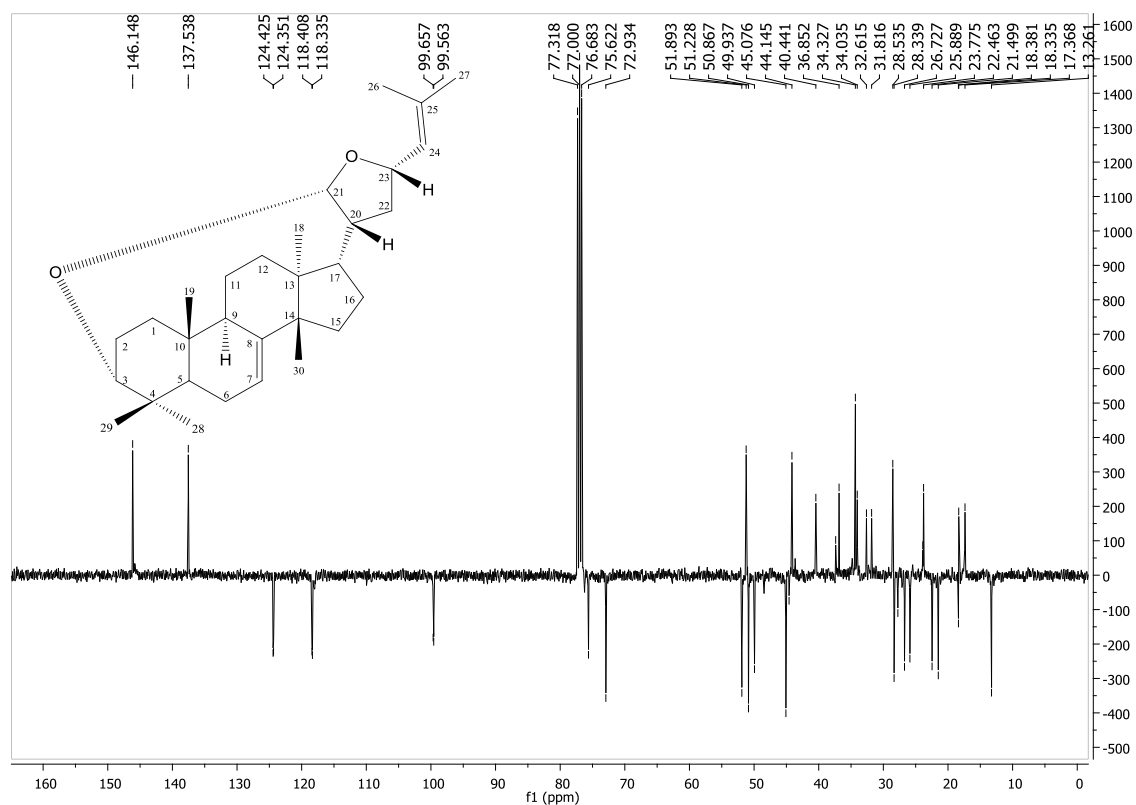


Figura 113- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 100 MHz) de *Ps*-6 na região de 148-92 ppm.

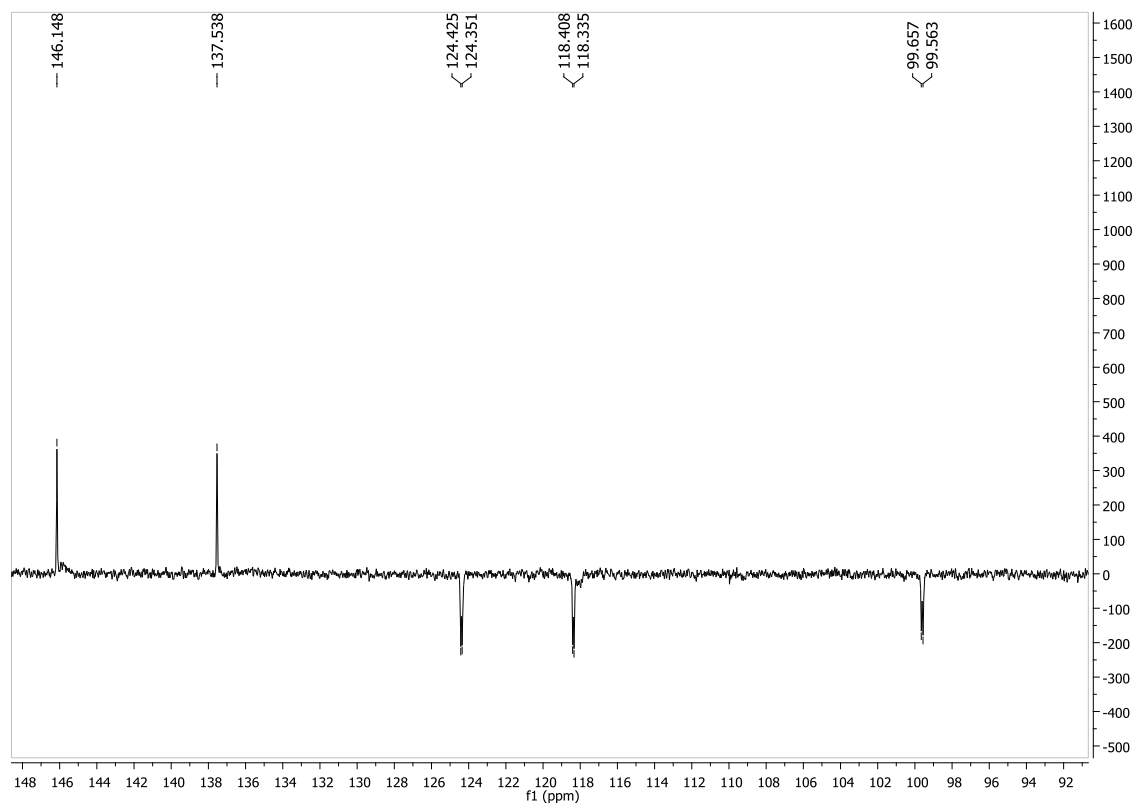


Figura 114- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 100 MHz) de Ps-6 na região de 83-42 ppm.

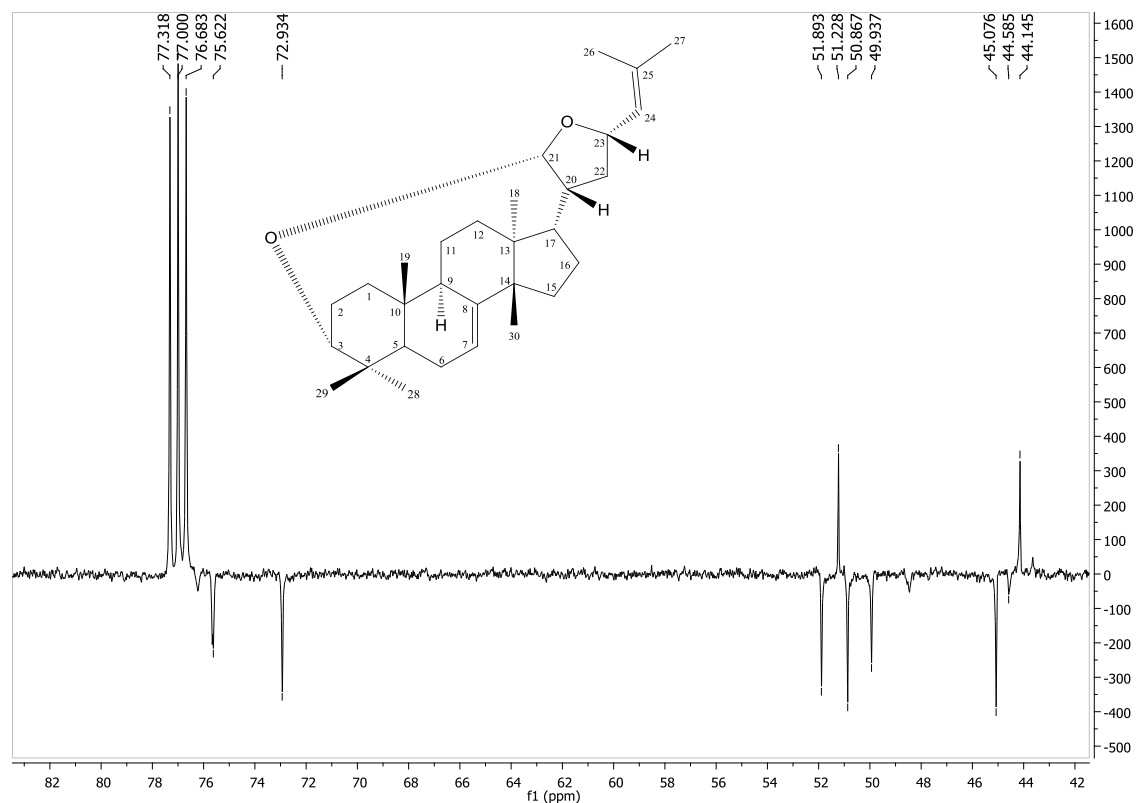


Figura 115- Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 100 MHz) de Ps-6 na região de 42-10 ppm.

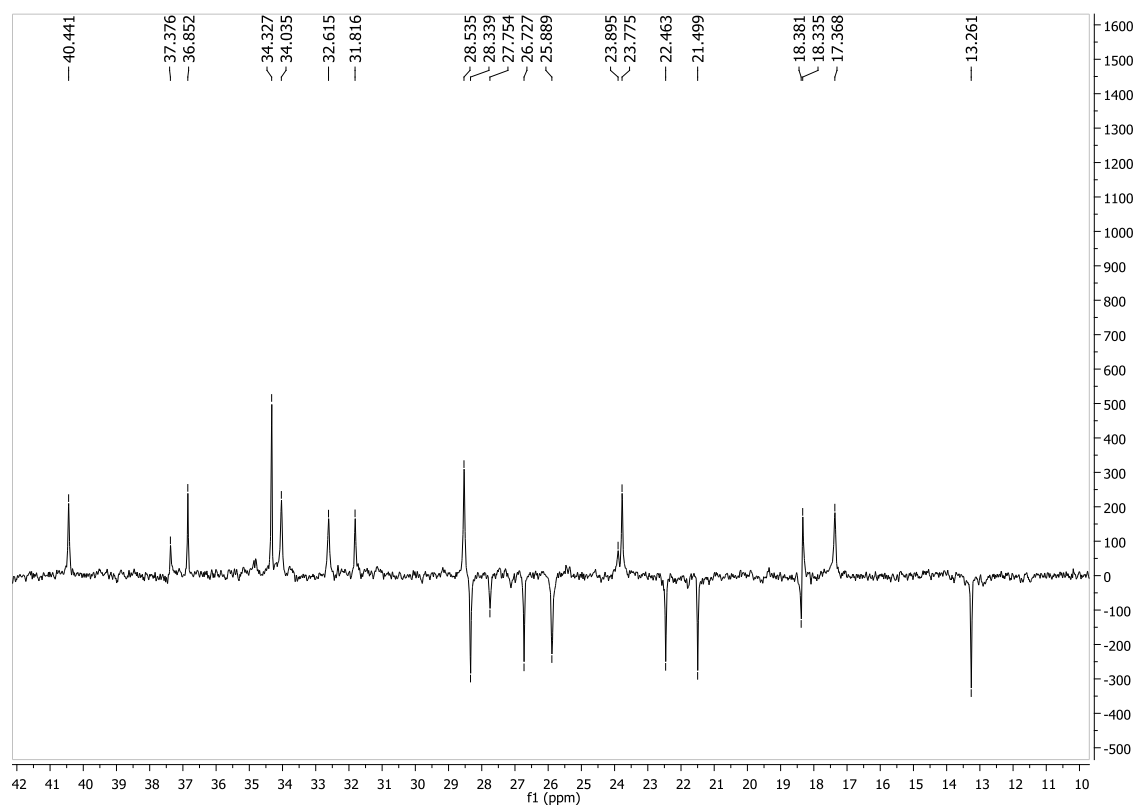


Figura 116- Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6*.

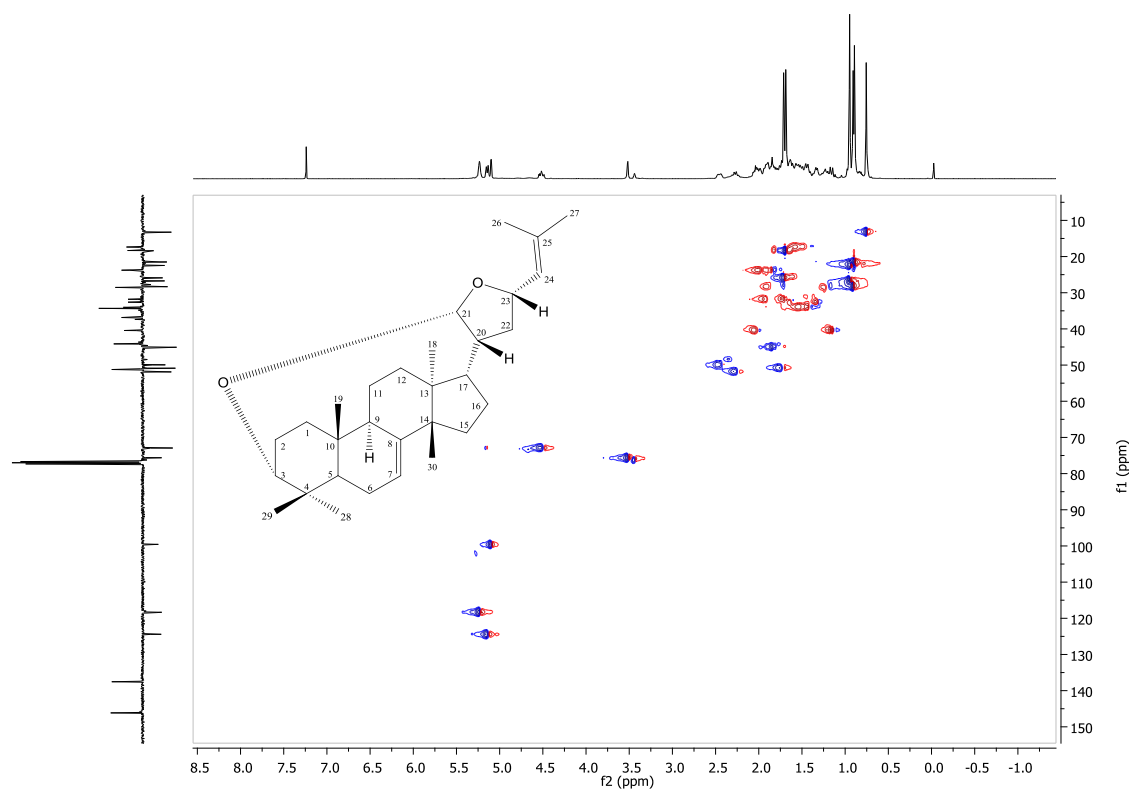


Figura 117- Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (6,1-3,1 ppm) x (140-50 ppm).

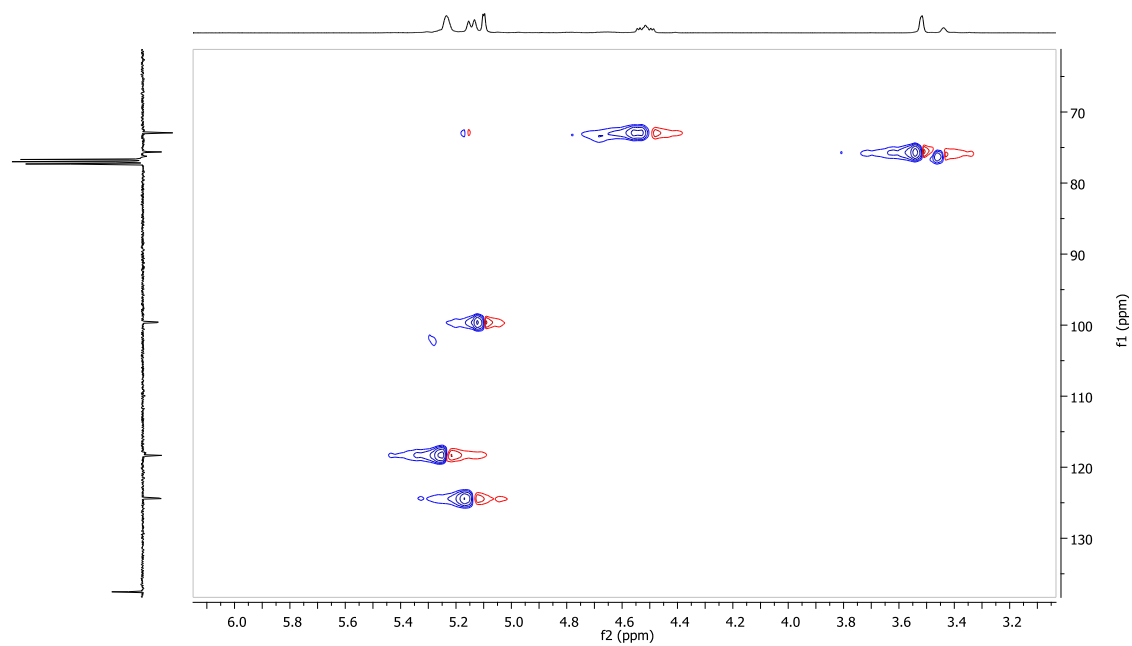


Figura 118- Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (2,6-0,4 ppm) x (60-10 ppm).

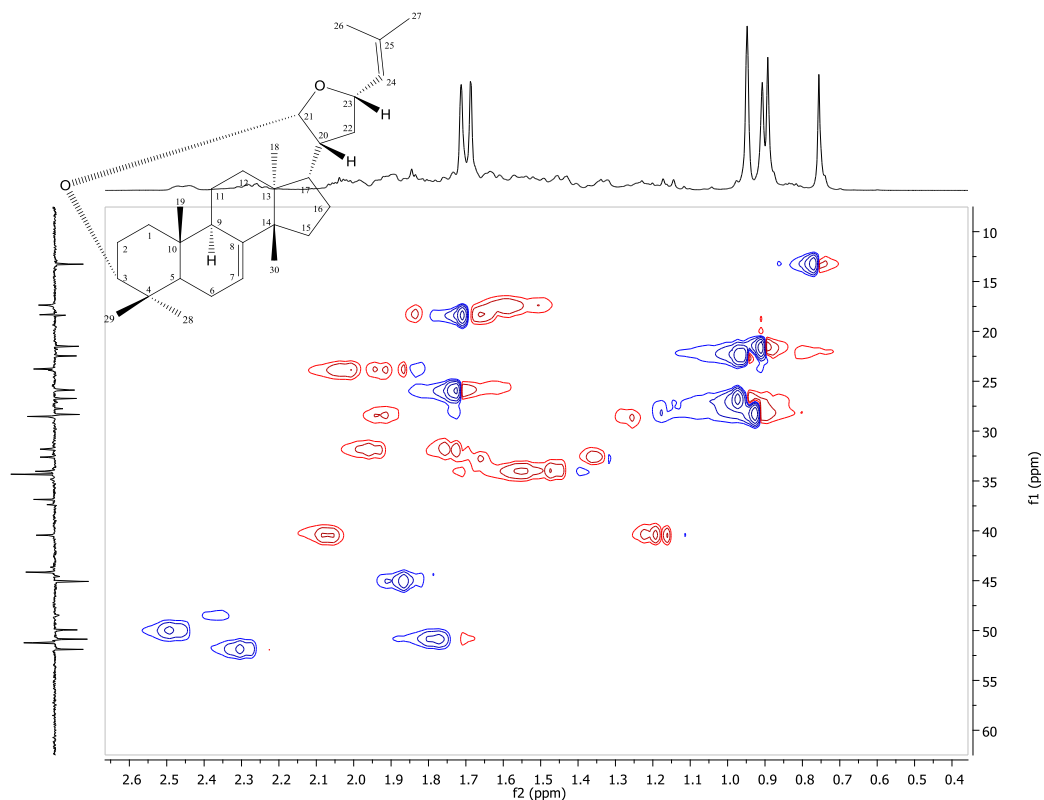


Figura 119- Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6*.

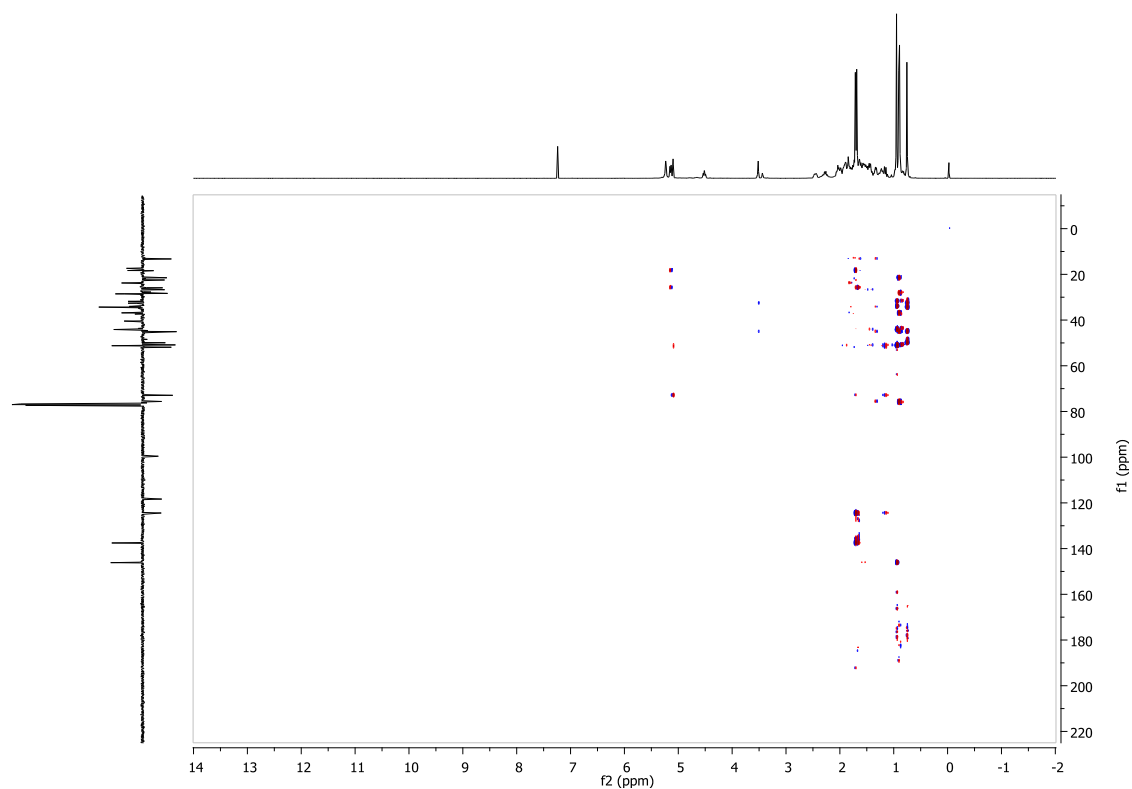


Figura 120- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (5,7-2,8 ppm) x (200-10 ppm).

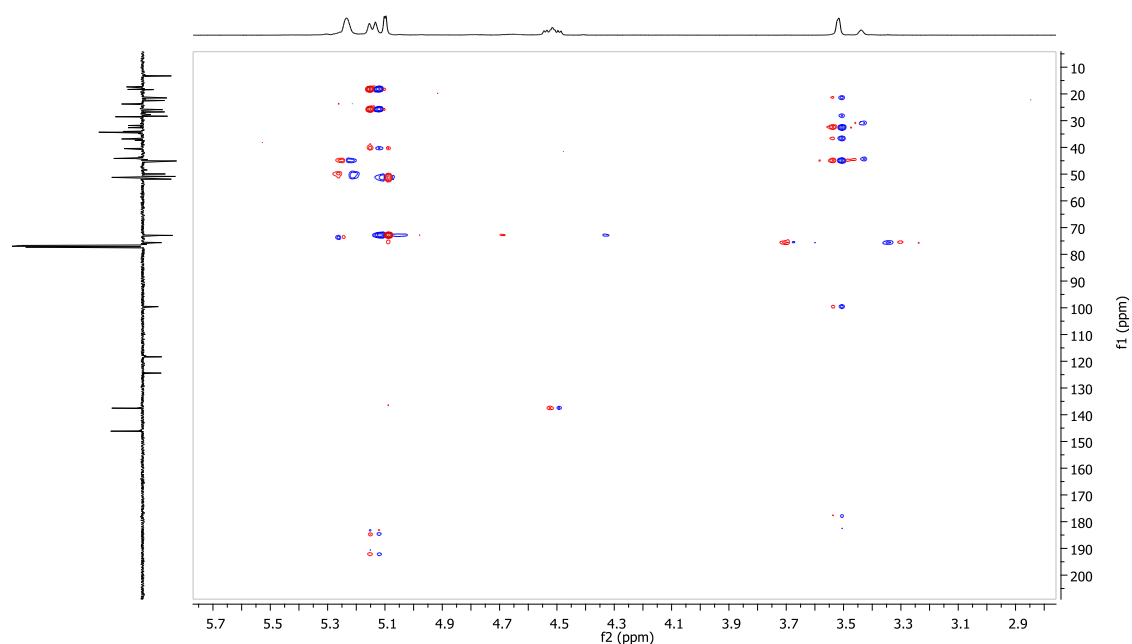


Figura 121- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (4,2-2,9 ppm) x (105-10 ppm).

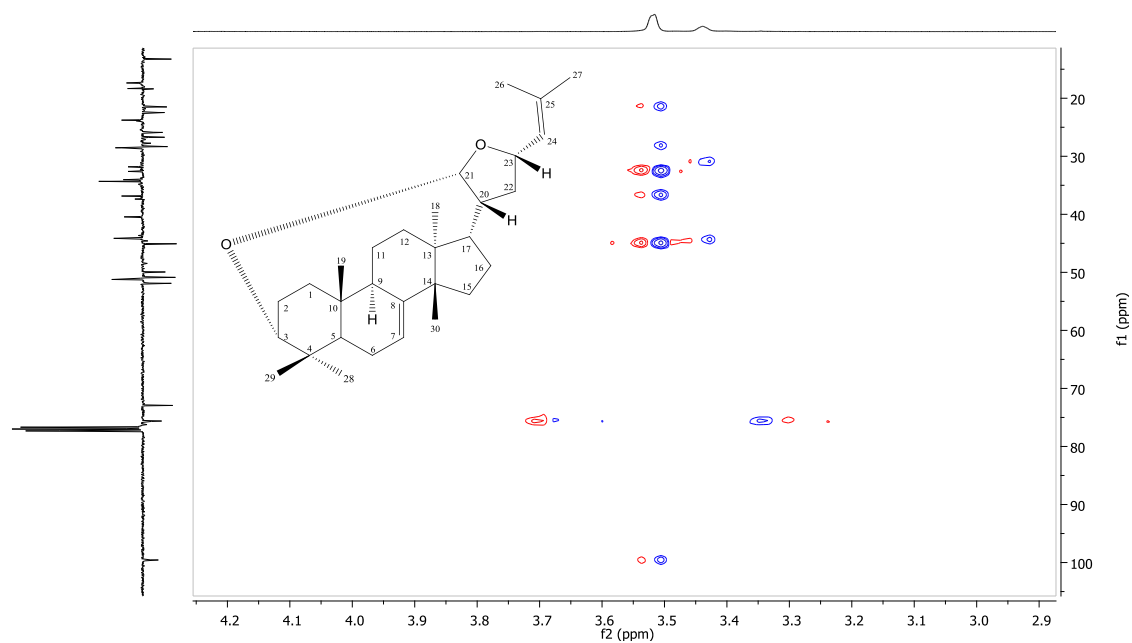


Figura 122- Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (2,2-0,0 ppm) x (220-0 ppm).

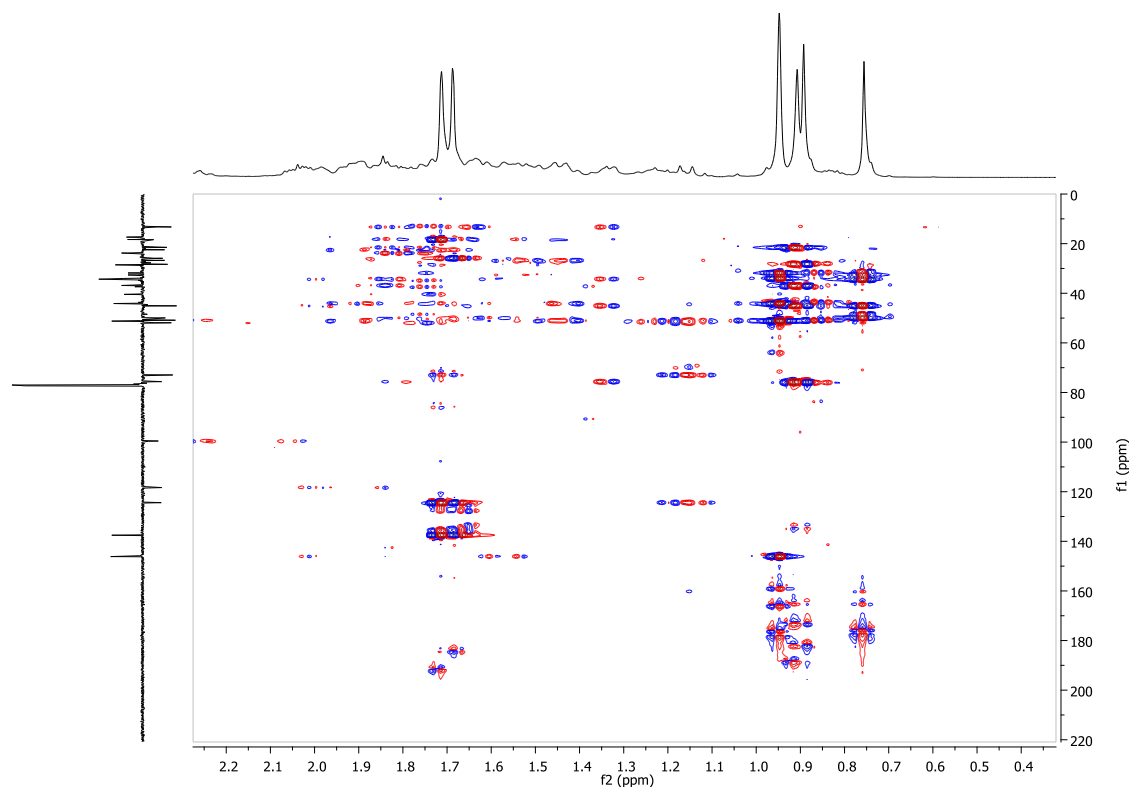


Figura 123- Espectro COSY (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-6*.

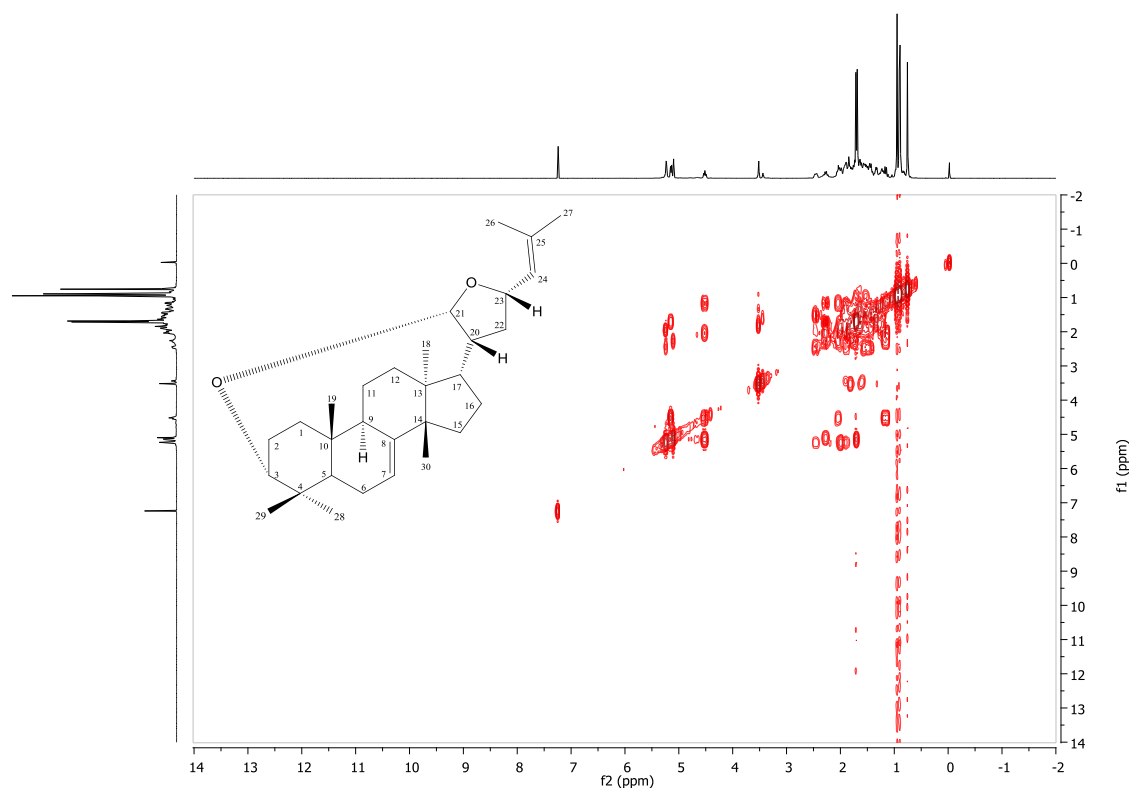


Figura 124- Expansão do espectro COSY (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (5,7-0,0 ppm) x (6,0-0,0 ppm).

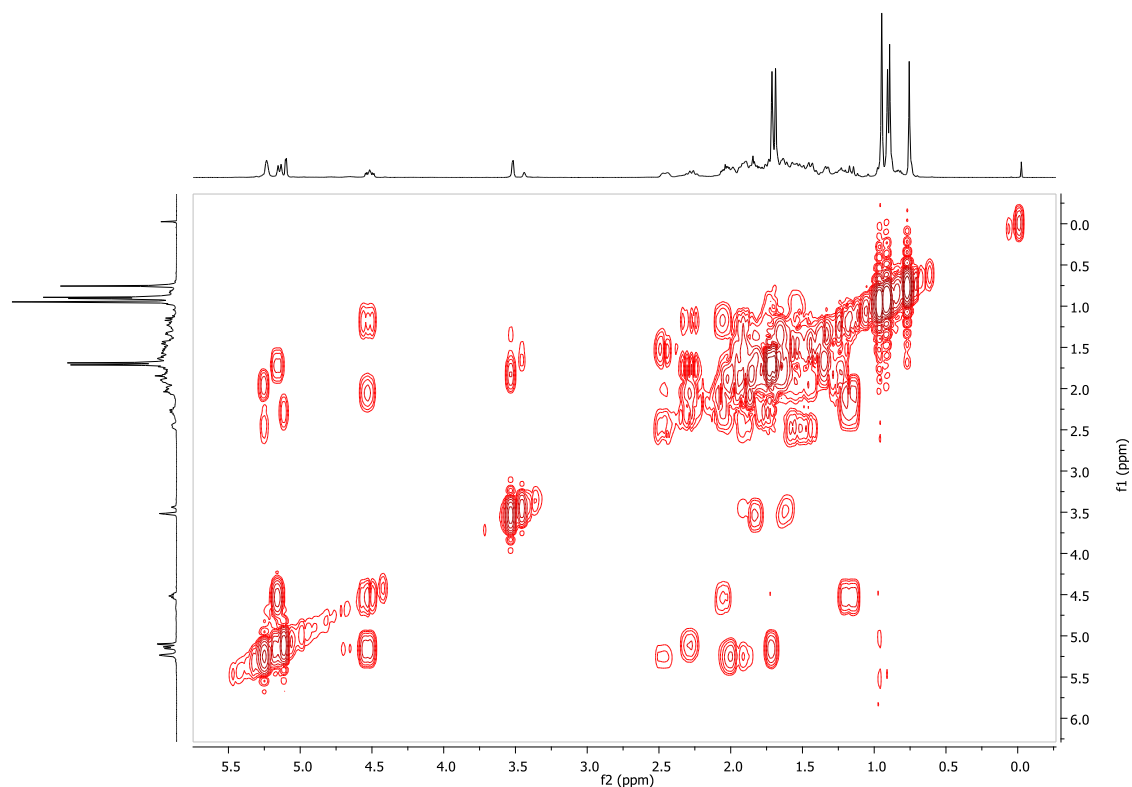


Figura 125- Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-6*.

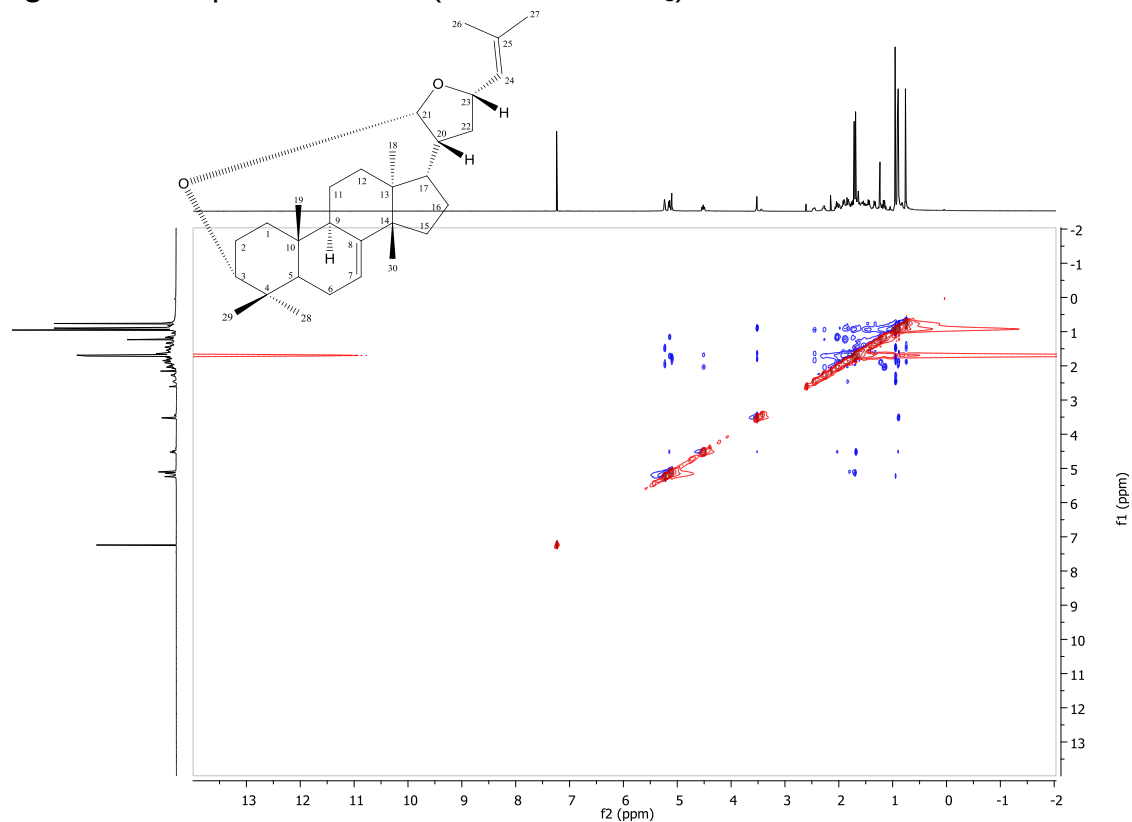


Figura 126- Expansão do espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (7,0-0,0 ppm) x (6,5-0,0 ppm).

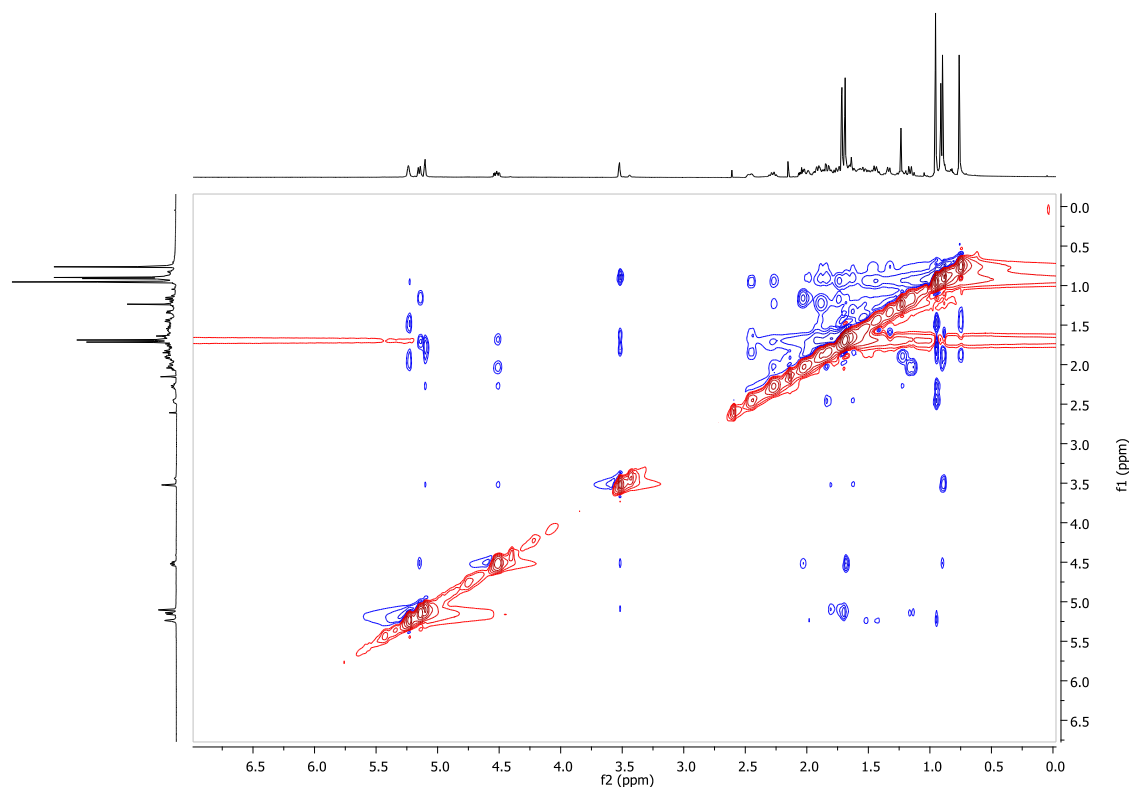
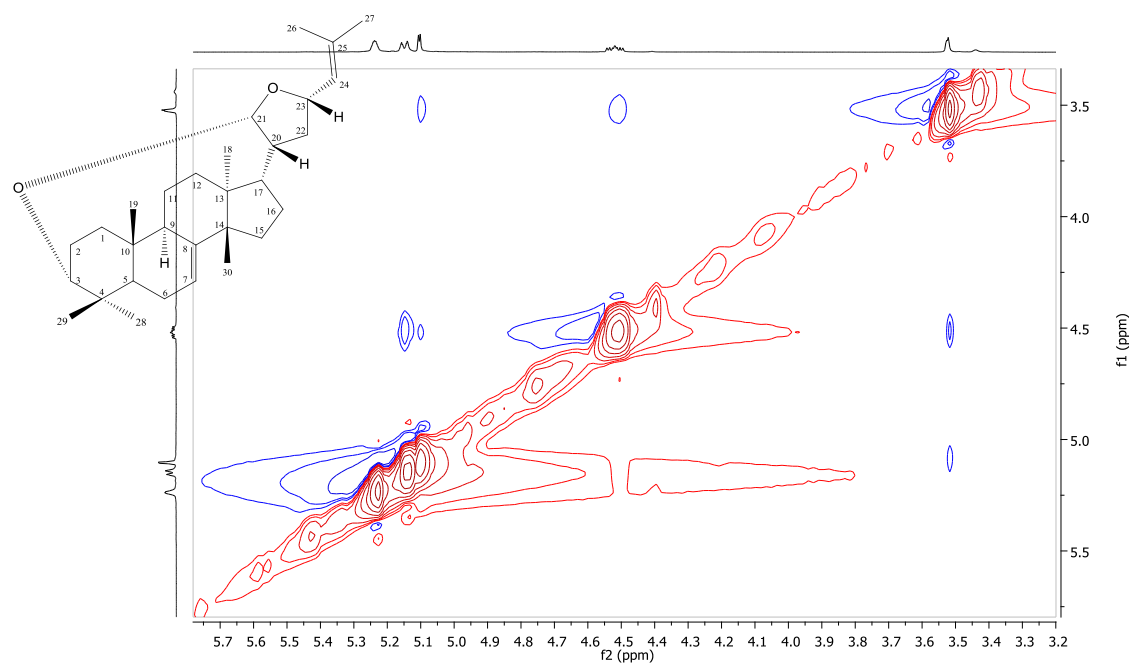


Figura 127- Expansão do espectro NOESY (400, CDCl_3) de *Ps-6* na região de (5,7-3,2 ppm) x (3,5-5,7 ppm).



5.3. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos marcadores no EEB de *Pilocarpus spicatus* por CLAE

5.3.1. Desenvolvimento do Método Cromatográfico

No desenvolvimento do método cromatográfico, para quantificação dos marcadores xantotoxina e imperatorina, foram testados os modos de eluição isocrático e gradiente, listados no quadro abaixo.

Quadro 15- Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método em CLAE-DAD.

Método*	Fase móvel	Tempo (min)	Tr (min)
1	MeCN:H ₂ O (05:95)→MeCN:H ₂ O (95:05)	0.00 a 60.00	Xant.: 27,97 Imp.: 40,09
2	MeCN:H ₂ O (40:60)	0.00 a 30.00	Xant.: 7,97 Imp.: 24,51
3	MeCN:H ₂ O (45:55)	0.00 a 30.00	Xant.: 6,81 Imp.: 21,06
4	MeCN:H ₂ O (40:60) MeCN:H ₂ O (60:40)	0.00 a 15.00 15.01 a 30.00	Xant.: 8,40 Imp.: 19,56
5	MeCN:H ₂ O (40:60) MeCN:H ₂ O (55:45)	0.00 a 15.00 15.01 a 30.00	Xant.: 8,43 Imp.: 20,32

*Para todos os métodos o comprimento de onda utilizado foi 250 nm, volume de injeção 20 µL e fluxo de 1,0 mL/min.

No Método 1 (Figura 128) foi utilizado um sistema gradiente variando a proporção de MeCN de 5% a 95%, durante 60 minutos. Nesse método, foi possível determinar o perfil cromatográfico do EEB de *P. spicatus*, obtendo-se para os marcadores xantotoxina um Tr igual a 27,97 min e para a imperatorina 40,09 min.

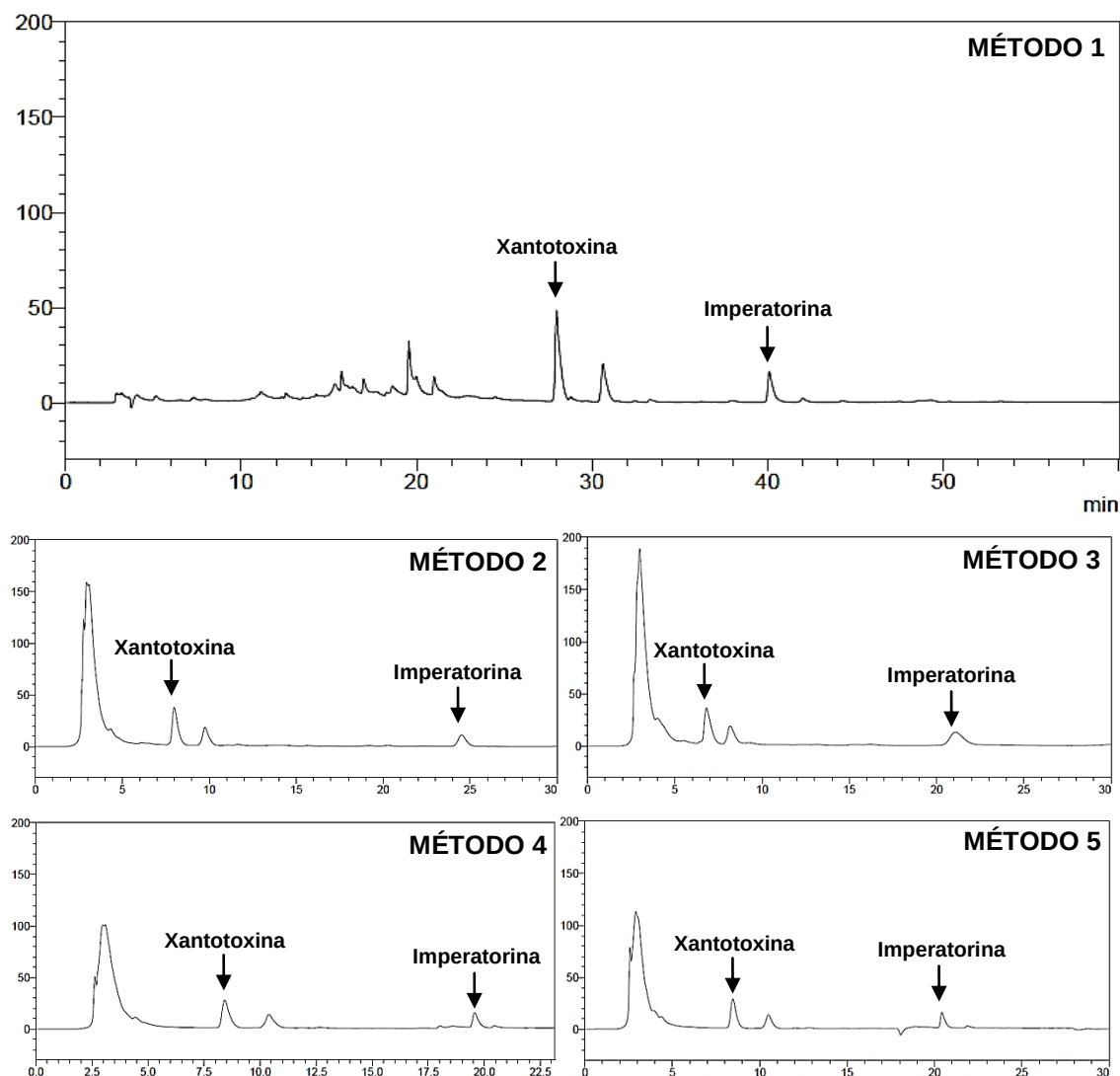
O modo de eluição isocrático foi então avaliado por ser um modo simples e conveniente de usar (MA et al., 2015). Iniciou-se com o Método 2, no qual a porcentagem de MeCN foi de 40% durante 30 minutos. Os picos referentes aos marcadores apresentaram-se resolutos, sem a presença de impurezas e com diminuição dos tempos de retenção, 7,97 min (xantotoxina) e 24,51 min (imperatorina).

Na tentativa de diminuir o tempo de análise, aumentou-se a proporção de MeCN para 45% (Método 3), porém o pico referente a xantotoxina (Tr 6,81 min) apresentou-se impuro e o pico da imperatorina alargado (Tr 21,06 min).

No Método 4, foi mantida a proporção de 40% de MeCN durante os primeiros 15 min de análise, uma vez que foi observado no método 2 que nessa proporção a xantotoxina eluiu de forma satisfatória. Então, foi diminuído o Tr da imperatorina aumentando a proporção de MeCN para 60% nos próximos 15 min. Entretanto, nesta proporção a imperatorina apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção.

No Método 5, a proporção de MeCN nos primeiros 15 min foi mantida e diminuiu para 55% a proporção durante os 15 min finais, solucionando o problema observado no método 4, uma vez que no método 5 o pico da imperatorina (Tr 20,32 min) apresentou-se puro, sendo então esse método o escolhido para realizar o estudo de validação.

Figura 128- Cromatogramas do EEB de *P. spicatus*, obtidas durante o desenvolvimento do método.



5.3.2. Especificidade/Seletividade

A Figura 129 mostra os resultados obtidos para análise da especificidade/seletividade do método analítico utilizado. Por meio da análise visual dos cromatogramas pode-se observar que não houve presença de picos interferentes no tempo de retenção correspondente aos marcadores xantotoxina e imperatorina na amostra do EEB.

Os picos dos marcadores no cromatograma do extrato foram avaliados com relação à pureza do pico. Os resultados de pureza encontrados para o pico referente a xantotoxina foi de 99,99% e para imperatorina foi 100%, o que demonstra não haver coeluição com os picos dos marcadores. Adicionalmente foi avaliado o índice de similaridade de cada marcador no extrato, os resultados obtidos foram 99,89% (xantotoxina) e 99,11% (imperatorina), conforme observado na Figura 130.

Figura 129- Análise da seletividade do método para xantotoxina e imperatorina. (A) Cromatograma do EEB de *P. spicatus*; (B) Cromatograma dos marcadores.

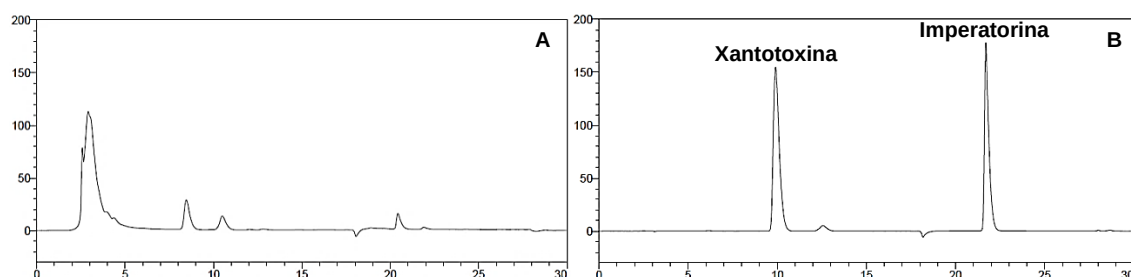
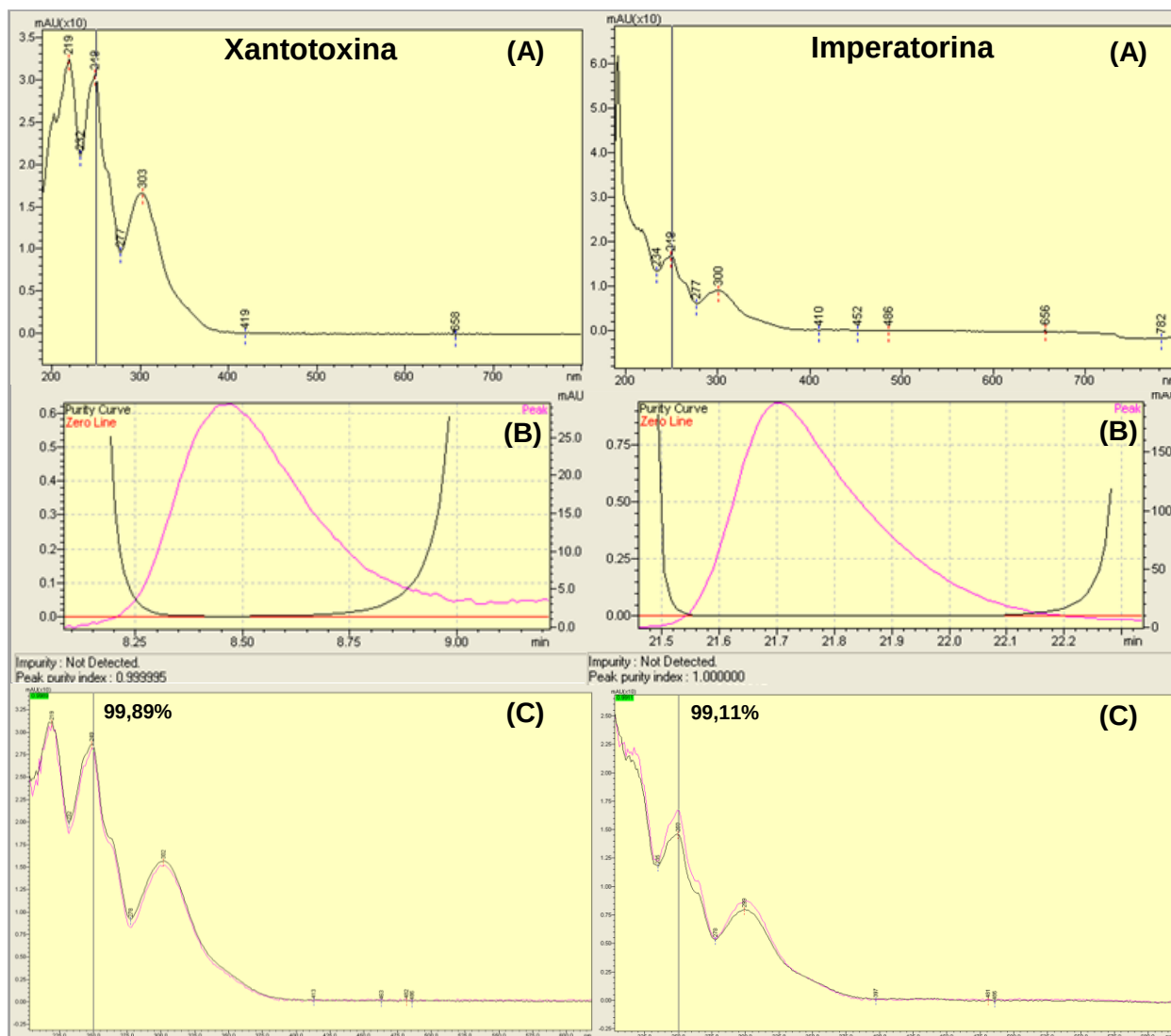


Figura 130- Análise da seletividade do método para xantotoxina (à esquerda) e imperatorina (à direita). (A) Espectro de ultravioleta (B) Curva de pureza (peak purity) (C) Similaridade.



5.3.3. Linearidade

A linearidade foi determinada através do coeficiente de correlação linear (r^2), obtido a partir das curvas de calibração dos três dias de análise (Tabela 12) (Figuras 131 e 132).

Os resultados obtidos, para as três curvas de calibração, pelo método dos mínimos quadrados mostrou a existência de correlação positiva significativa entre o aumento da concentração dos marcadores e da área dos picos, apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9999 para a xantotoxina e 0,9998 para a imperatorina.

Tabela 12- Resultados da curva média de calibração dos marcadores xantotoxina e imperatorina.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Área média do pico	
	Xantotoxina	Imperatorina
2,0	233918 $\pm$ 7382	196199 $\pm$ 6267
5,0	616546 $\pm$ 22741	510079 $\pm$ 14628
10,0	1215864 $\pm$ 38617	1006885 $\pm$ 32303
15,0	1795875 $\pm$ 43381	1486410 $\pm$ 26919
20,0	2358250 $\pm$ 41035	1955116 $\pm$ 21796
30,0	3526848 $\pm$ 67526	2932062 $\pm$ 42462
50,0	5837285 $\pm$ 107576	4850102 $\pm$ 61534

* Os resultados foram expressos como média dos três dias $\pm$ desvio padrão (DP)

Figura 131- Curva padrão da xantotoxina.

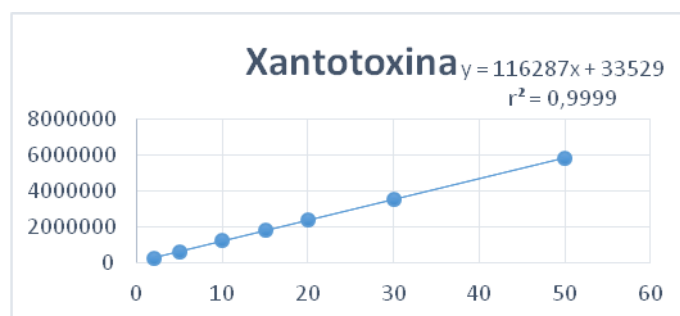
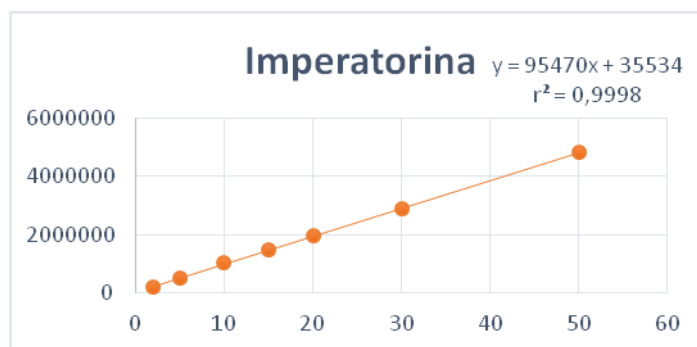


Figura 132- Curva padrão da imperatorina.



Para avaliar a aplicabilidade do modelo de ajuste linear, os resíduos foram avaliados quanto à normalidade conforme mostrado nas Figuras 133 e 134. A análise de variância (Tabelas 12 e 13) nos permitiu testar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada.

Figura 133- Gráficos dos resíduos dos dados de linearidade do marcador xantotoxina, obtidos a partir da curva média de calibração.

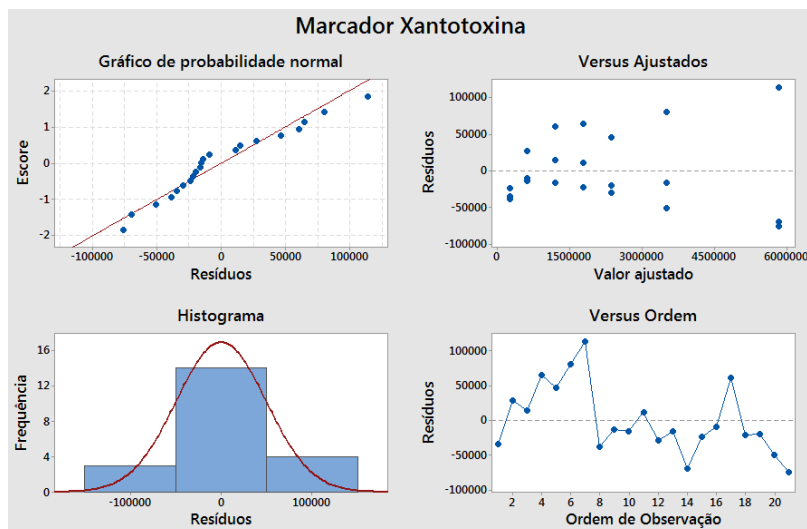
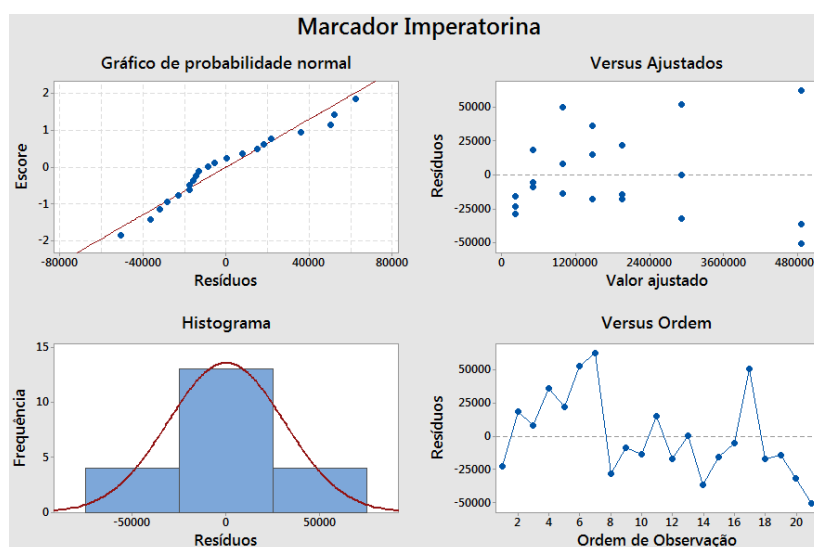


Figura 134- Gráficos dos resíduos dos dados de linearidade do marcador imperatorina, obtidos a partir da curva média de calibração.



Os resíduos para o marcador xantotoxina apresentaram distribuição normal ($p = 0,060$), a regressão é significativa ($p = 0,00$) e não houve falta de ajustes para o modelo aplicado ($p = 0,866$).

Os resíduos para o marcador imperatorina apresentaram distribuição normal ($p = 0,065$), a regressão é significativa ($p = 0,00$) e não houve falta de ajustes para o modelo aplicado ($p = 0,764$).

Desse modo, os parâmetros da reta, obtidos através do ajuste linear dos dados, são adequados para explicar o aumento da área do pico em função do

aumento da concentração do analito nas soluções analisadas com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 13- Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método na determinação do teor de xantotoxina no EEB de *P. spicatus*.

Fonte	GL	SQ	MQ	F _{calculado}	¹ p	F _{tabelado}
Modelo	1	6,75399E+13	6,75399E+13	26105,59	0,000	4,381
Residual	19	491564478626	2587183086	<i>Curva Linear</i>		
Falta de ajuste	5	5634590797	1126918159	0,36	0,866	2,958
Erro puro	14	43521887829	3108706273	<i>Não há falta de ajuste</i>		
Total	20	6,75891E+13				

¹Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ ($n = 21$).

Tabela 14- Tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método na determinação do teor do marcador imperatorina no EEB de *P. spicatus*.

Fonte	GL	SQ	MQ	F _{calculado}	¹ p	F _{tabelado}
Modelo	1	4,66650E+13	4,66650E+13	46375,66	0,000	4,381
Residual	19	19118540919	1006238996	<i>Curva Linear</i>		
Falta de ajuste	5	29466573465	589314693	0,51	0,764	2,958
Erro puro	14	16171967455	1,155140532	<i>Não há falta de ajuste</i>		
Total	20	4,66841E+13				

¹Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ ($n = 21$).

5.3.4. Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Como resultado da curva de linearidade, foram calculados os limites de detecção e quantificação. O LD e LQ da xantotoxina foram de 0,2806 e 0,9355 µg/mL e da imperatorina foram 0,2837 e 0,9457 µg/mL, respectivamente.

5.3.5. Precisão

O método desenvolvido mostrou-se preciso nos dois níveis avaliados: repetibilidade e precisão intermediária.

Para o parâmetro repetibilidade, foram obtidas as seguintes médias de concentração para a xantotoxina: 5,02, 5,01 e 4,84 µg/mL, para o primeiro, segundo e terceiro dia, respectivamente, e para a imperatorina 2,35, 2,22 e 2,17 µg/mL, com valores de CV% abaixo do valor máximo de 5%, de acordo com a RE nº 899 de 2003 (Tabela 14).

A precisão intermediária demonstrou que o método é preciso para análises realizadas em dias diferentes, com valores médios de precisão nos três dias de 4,96 µg/mL (CV%= 1,99) para xantotoxina e 2,25 µg/mL (CV%=

4,28) para imperatorina, estando dentro das especificações estabelecidas pela RE nº 899 de 2003 (Tabela 15).

A precisão do método foi avaliada por ANOVA fator único. Os resultados obtidos apresentaram valores de $F_{\text{calculado}}$ de 2,7270 para a xantotoxina e de 2,2774 para a imperatorina, menores que o F_{tabelado} (3,6823) e com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 15- Precisão Intra-dia (repetibilidade) dos estudos por CLAE para as cumarinas xantotoxina e imperatorina no EEB de *P. spicatus*.

Repetições	Xantotoxina (µg/mL)			Imperatorina (µg/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
1	5,180278	5,068537	4,932572	2,320677	2,251304	2,237499
2	5,239141	4,993464	4,965912	2,038588	2,212276	2,259411
3	5,184819	5,075228	4,930302	2,308390	2,252404	2,185765
4	4,806969	4,995219	4,902913	2,276600	2,219346	2,201184
5	4,900599	4,973058	4,682768	2,353315	2,208484	2,070829
6	4,785883	4,980686	4,649376	2,345878	2,206107	2,063235
Média	5,016282	5,014365	4,843974	2,357241	2,224987	2,169654
DP	0,207482	0,045349	0,139643	0,093014	0,021291	0,083671
(CV%)	4,136167	0,904391	2,882815	3,945865	0,95689	3,856442

Tabela 16- Precisão Inter-dia (precisão intermediária) dos estudos por CLAE para as cumarinas xantotoxina e imperatorina no EEB de *P. spicatus*.

Dias	Xantotoxina (µg/mL)	Imperatorina (µg/mL)
1	5,016282	2,357241
2	5,014365	2,224987
3	4,843974	2,169654
Média	4,958207	2,250627
DP	0,098933	0,096386
(CV%)	1,995345	4,282635
$F_{\text{calculado}}$	2,7270	2,2774
F_{tabelado}	3,6823	3,6823

5.3.6. Exatidão

Os resultados da exatidão do método podem ser visualizados na Tabela 16. As médias dos valores de exatidão para xantotoxina e imperatorina foram 96,39-102,09% e 102,09-106,09%, respectivamente.

Os resultados da avaliação estatística dos três níveis de concentração para os marcadores apresentaram valores de $F_{\text{calculado}}$ de 4,7149 para a xantotoxina e 2,5872 para a imperatorina, apresentando valores menores que o

Ftabelado (5,1432). A avaliação estatística pelo teste de ANOVA de fator único confirma que não houve diferença estatisticamente significativa, com intervalo de confiança de 95%, em relação aos valores médios de exatidão obtidos nos diferentes níveis, demonstrando assim que a recuperação dos marcadores para o método desenvolvido a partir do EEB não é alterada nas condições avaliadas.

Tabela 17- Resultados da exatidão inter-dias para a xantotoxina e imperatorina.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)		EXATIDÃO	
	Xantotoxina	Imperatorina	Xantotoxina	Imperatorina
2	2,07	2,11	96,39±3,79	102,09±5,15
15	15,41	15,95	102,09±2,28	106,09±1,64
30	30,53	31,65	101,50±3,85	105,39±2,84
Fcalculado			4,7149	2,5872
Ftabelado			5,1432	5,1432

* Os resultados foram expressos como média dos três dias ± desvio padrão (DP)

5.3.7. Robustez

Para avaliação da robustez do método avaliou-se os efeitos da alteração do percentual de solvente orgânico na fase móvel, do fluxo e da coluna. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que a redução de 2% no percentual de MeCN aumenta o tempo de retenção dos marcadores de 8,55 para 9,38 min (xantotoxina) e de 20,51 para 21,79 (imperatorina), enquanto o aumento de 2% de MeCN na fase móvel reduz o Tr da xantotoxina para 7,02 min e da imperatorina para 17,96 min, com manutenção da resolução dos picos (Tabela 17).

A alteração do fluxo de 1,0 para 0,8 e 1,2 mL/min resultou em uma redução e um aumento do Tr, respectivamente. A utilização da coluna da marca ACE alterou o Tr, porém manteve a resolução e a pureza dos picos (Tabela 17).

A robustez do método foi avaliada por ANOVA fator único. Os resultados obtidos apresentaram valores de p maiores que 0,05 para todos os parâmetros avaliados.

O método em questão apresentou características de desempenho apropriadas, sendo considerado adequado para quantificação dos marcadores xantotoxina e imperatorina no EEB de *P. spicatus*.

Tabela 18- Avaliação da robustez do método.

CONDIÇÕES ANALÍTICAS	Xantotoxina			Imperatorina		
	Tr (min)	Área Média	*p	Tr (min)	Área Média	*p
Condição padrão	8,55	628608		20,51	265062	
Fase móvel						
MeCN:H ₂ O (38:62)→(53:47)	9,38	594460	0,06	21,79	245852	0,11
MeCN:H ₂ O (42:58)→(57:43)	7,02	587732	0,10	17,96	243250	0,06
Fluxo						
0,8 mL/min	10,02	620616	0,58	22,07	248727	0,13
1,2 mL/min	6,20	647399	0,22	15,45	245089	0,08
Coluna	10,20	642448	0,29	22,02	259253	0,44

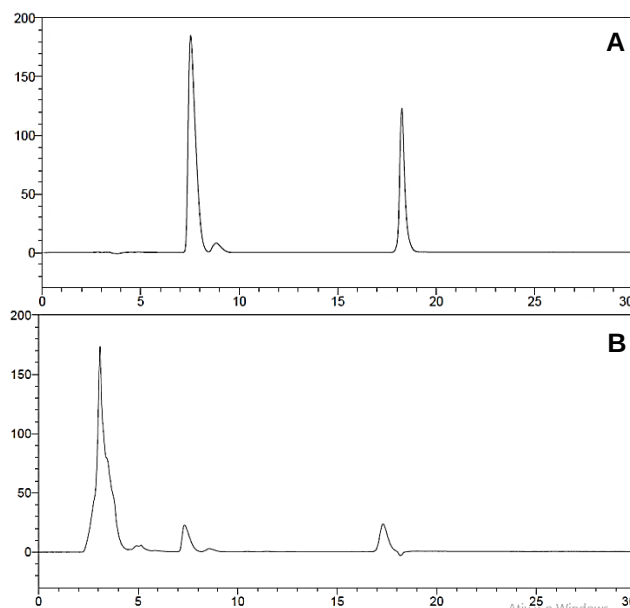
*Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5.3.8. Degradação básica

Os ensaios de degradação podem ser utilizados para avaliar a seletividade do método para o analito, pois permite observar se o pico da substância permanece em bom formato e sem produtos de degradação em co-eluição. Após a degradação forçada NaOH a 0,01M, os picos referentes aos marcadores xantotoxina e imperatorina apresentaram-se sem interferentes em seu tempo de retenção, embora tenha ocorrido o aparecimento de picos relativos à produtos de degradação.

A pureza dos picos após degradação básica foi de 99,99% para ambos os marcadores, comprovando que o método é seletivo para a quantificação dos mesmos.

Figura 135- Cromatogramas da mistura dos padrões a 30 µg/mL. (A) amostra não submetida à degradação básica e (B) amostra submetida à degradação básica.



5.3.9. Quantificação dos marcadores xantotoxina e imperatorina no EEB de *Pilocarpus spicatus*

Após validação do método, avaliou-se sua aplicação para a quantificação dos marcadores no EEB de *P. spicatus*. Para isso, uma amostra na concentração de 1mg/mL foi injetada em triplicata e as médias das áreas sobre os picos dos marcadores foram aplicadas às equações obtidas no teste de linearidade. A concentração encontrada para a solução do EEB de *P. spicatus* a 1mg/mL foi de 5,01 µg/mL para xantotoxina e 2,22 µg/mL para imperatorina.

5.4. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*

5.4.1. Concentração inibitória mínima (CIM)

O EEB e as cumarinas (bergapteno, xantotoxina, isopimpinellina e imperatorina) não apresentaram atividade antibacteriana relevante. O EEB apresentou CIM >512 µg/mL e as cumarinas CIM >256 µg/mL (Tabela 18).

Tabela 19- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEB de *P. spicatus*, das cumarinas e dos antibióticos em µg/mL em cepas bacterianas da espécie *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo.

Substâncias	Cepa (Bomba de efluxo)		
	IS-58 (TetK)	RN4220 (MsrA)	SA-1199B (NorA)
EEB	>512	>512	>512
Bergapteno	>256	>256	>256
Xantotoxina	>256	>256	>256
Isopimpineline	>256	>256	>256
Imperatorina	>256	>256	>256
Tetraciclina	64	-	-
Eritromicina	-	512	-
Norfloxacino	-	-	64
Clorpromazina*	64	-	64

*Controle positivo pra bombas TetK e NorA.

5.4.2. Atividade moduladora da resistência a drogas

A utilização de mono ou multi-combinações de antibióticos e produtos naturais pode afetar não somente um único alvo, mas vários, onde os diferentes componentes terapêuticos colaboram de uma forma sinérgica (TINTINO et al., 2013). Diante disso, foi realizada a avaliação da susceptibilidade de antibióticos na presença e ausência do EEB e das cumarinas frente a cepas de *S. aureus* IS-58, RN-4220 e SA-1199B, que superexpressam, respectivamente, as bombas de efluxo TetK, MsrA e NorA.

De acordo com os dados expostos na Tabela 19, observou-se que o EEB e as cumarinas bergapteno e xantotoxina não modularam a atividade antibacteriana da tetraciclina, eritromicina e norfloxacino, não havendo alteração da CIM destes antibióticos frente às cepas resistentes testadas. A isopimpineline apresentou uma redução de quatro vezes da CIM de eritromicina, não havendo efeito na modificação da atividade bacteriana dos outros dois antibióticos testados. A imperatorina apresentou a melhor atividade moduladora dentre as substâncias ensaiadas, com redução da CIM para os antibióticos tetraciclina (2 vezes), eritromicina (4 vezes) e norfloxacino (4 vezes).

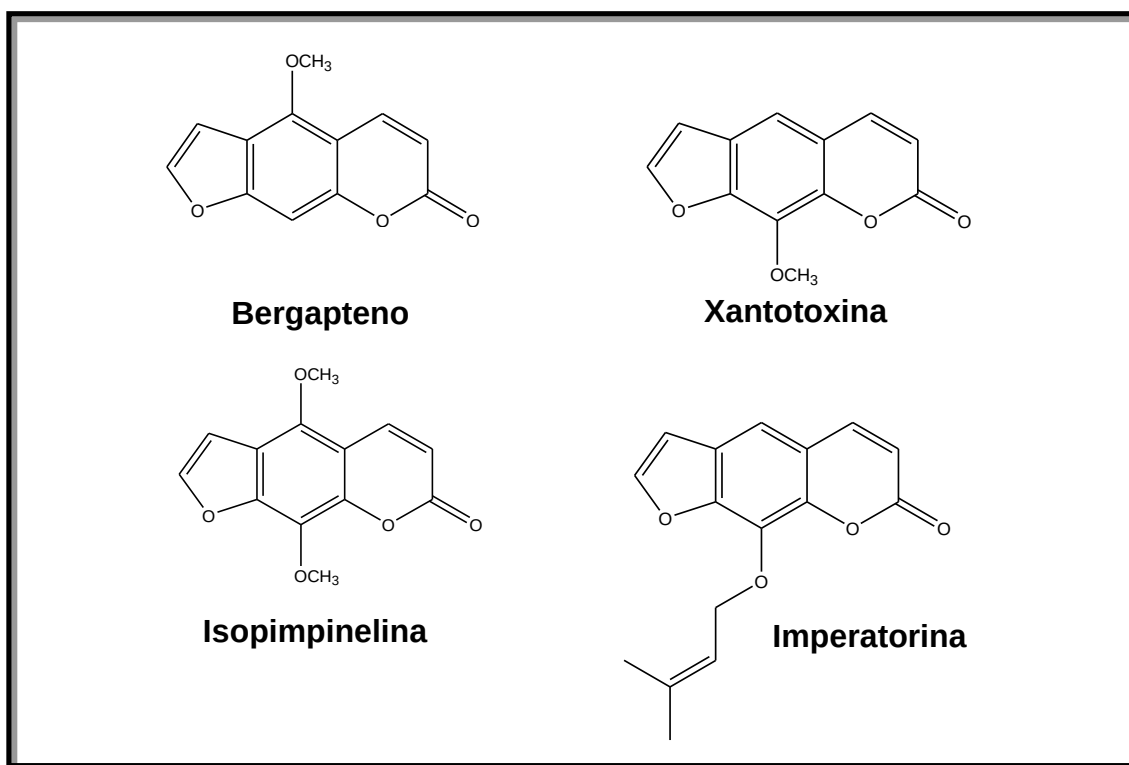
Tabela 20- Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos tetraciclina, eritromicina e norfloxacino na ausência e na presença de concentração subinibitória do EEB de *P. spicatus*, cumarinas e clorpromazina (controle positivo).

Substâncias ($\frac{1}{4}$ da CIM)	Cepa (Bomba de efluxo) / Antibiótico utilizado (CIM em $\mu\text{g/mL}$)		
	IS-58 (TetK) / Tetraciclina (64)	RN4220 (MsrA) / Eritromicina (512)	SA-1199B (NorA) / Norfloxacino (64)
EEB	64	>512	64
Bergapteno	64	>512	64
Xantotoxina	64	>512	64
Isopimpinellina	64	128 (4)*	64
Imperatorina	32 (2)*	128 (4)*	16 (4)*
Clorpromazina	32 (2)*	>256	16 (4)*

*Entre parênteses, fatores de redução da CIM

Ao se comparar estruturalmente as quatro cumarinas testadas (Figura 136), foi observado que o bergapteno e a xantotoxina apresentam estruturas bastante similares, diferenciando apenas na posição do radical metoxi. A isopimpinellina apresenta um radical metoxi a mais (quando comparada com as anteriores) e a imperatorina o radical prenila em C-8. Esses radicais aumentam o caráter lipofílico da molécula, fazendo com que a passagem pela membrana bacteriana seja facilitada. Isso pode ser uma das razões pela quais essas últimas duas substâncias apresentaram melhor atividade moduladora, principalmente a imperatorina, por ser a mais lipofílica, característica essa relatada entre diversos inibidores putativos de bombas de efluxo (GIBBONS, 2004).

Segundo Schinkovitz e colaboradores (2003) a presença de uma unidade de prenila ligado ao anel carbocíclico favorece as atividades antimicrobianas e de acordo com estudos anteriores, imperatorina demonstrou um amplo espectro de atividade antimicrobiana frente a diversas cepas (RAJA et al., 2011; WIDELSKI et al., 2009; ROSSELLI et al., 2007; ULUBELEN et al., 1995).

Figura 136- Estrutura química das cumarinas testadas.

Levando-se em consideração que só a cumarina imperatorina apresentou efeito modulador da atividade inibitória de norfloxacinó contra *S. aureus* SA-1199B, esta substância foi ainda testada para determinação da CIM em combinação com o do brometo de etídio (BrEt). Os resultados deste ensaio, mostraram uma diminuição da CIM do BrEt de oito vezes (32 µg/mL para 4 µg/mL) (Tabela 20).

Tabela 21- Concentração inibitória mínima (CIM) do BrEt na presença e ausência da cumarina imperatorina frente a linhagem de *S. aureus* SA-1199B (NorA).

Substância	CIM (µg/mL) SA-1199B (NorA)
BrEt	32
BrEt + Imperatorina (128 µg/mL)	4 (8)*

* fator de redução do valor da CIM

O BrEt é um substrato bastante conhecido para bomba de efluxo NorA, visto que a única forma de resistência bacteriana adquirida por ele ocorre por

meio de bomba de efluxo (KUMAR et al., 2008). Sendo assim, a diminuição da CIM do BrEt indica que a modulação da resistência a Nor em *S. aureus* SA-1199B ocorreu por meio da inibição do sistema de efluxo NorA (FALCÃO-SILVA et al., 2009).

Novas e aprofundadas pesquisas são necessárias para uma possível utilização desse produto natural combinado aos antimicrobianos testados frente às linhagens patogênicas. Os resultados obtidos no presente estudo se mostraram promissores, podendo estimular futuras pesquisas sobre o uso de produtos naturais a fim de favorecer a sua viabilização na utilização no combate à resistência microbiana.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies da família Rutaceae, *Metrodorea mollis* e *Pilocarpus spicatus*, resultou no isolamento de doze substâncias. Do extrato hexânico de *M. mollis* foram isolados: duas cumarinas (xantotoxina e isopimpinellina), duas lignanas (hinoquinina e savinina), um terpenoide (lupeol) e um esteroide (β -sitosterol). Da fase hexânica de *P. spicatus* foram identificados: três cumarinas (bergapteno, xantotoxina e imperatorina), uma lignana (asarinina) e dois terpenoides (acetato de taraxerol e brazoxido A), sendo este último relatado pela primeira vez na literatura.

O método cromatográfico desenvolvido para análise simultânea das cumarinas, xantotoxina e imperatorina, no EEB de *P. spicatus* foi validado segundo o preconizado na Resolução 899 da ANVISA e se mostrou seletivo, linear, exato, preciso e robusto.

As cumarinas (bergapteno, xantotoxina, isopimpinellina e imperatorina) e o EEB não apresentaram atividade antibacteriana na maior concentração utilizada frente às cepas de *S. aureus* resistentes à tetraciclina, eritromicina e norfloxacino pelo mecanismo de bomba de efluxo.

As cumarinas, bergapteno e xantotoxina, e o EEB de *P. spicatus* não modularam a atividade antibacteriana contras as cepas testadas. A isopimpinellina reduziu a CIM da eritromicina, e a imperatorina apresentou a melhor atividade moduladora reduzindo a CIM dos três antibióticos, bem como foi a única que modulou a resistência ao brometo de etídio.

O presente trabalho, além de fornecer importantes conhecimentos fitoquímico e biológico sobre as espécies *M. mollis* e *P. spicatus*, viabiliza novos estudos de atividade biológica dos extratos e das substâncias isoladas. Sendo assim, pretende-se dar continuidade ao estudo químico, bem como, realizar novos estudos de atividade farmacológica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, H. I.; ALY, H. F.; SHALABY, N. M. M.; ALBALAWY, M. A.; ABOUTABL, E. A. Hunting for renal protective phytoconstituents in *Artemisia judaica* L. and *Chrysanthemum coronarium* L. (Asteraceae). **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 13, p. 46-57, 2014.
- ABREU, I. N.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* stapf). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 6, p. 806-811, 2005.
- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p.1007-1021, 2012.
- ADESINA, S. K.; OLUGBADE, T. A.; AKINWUSI, D. D.; BERGENTHAL, D. Extractives from *Zanthoxylum lemairie* root and stem. **Pharmazie**, v. 52, p. 720-724, 1997.
- AL-ZIKRI, P. N. H.; TAHER, M.; SUSANTI, D.; REZALI, M. F.; READ, R. W.; SOHRAB, M. H.; HASAN, C. M.; AHMAD, F. Cytotoxic tirucallane triterpenes from the stem of *Luvunga scandens*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 24, p. 561-564, 2014.
- AMARO-LUÍS, J. M.; MASSANET, G. M.; PANDO, E.; RODRÍGUEZ-LUÍS, F.; ZUBÍA, E. New coumarins from *Pilocarpus goudotianus*. **Planta Medica**, v. 56, p. 304-306, 1990.
- ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; GAMBARDELA, M. T. P.; SANTOS, R. H. A. 24-methyl-25-ethyldammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 739-743, 1994.
- ANDRADE-NETO, M.; MENDES, P. H.; SILVEIRA, E. R. An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 885-887, 1996.
- ANKLI, A.; HEILMANN, J.; HEINRICH, M.; STICHER, O. Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 531-537, 2000.

ASENSI, M.; ORTEGA, A.; MENA, S.; FEDDI, F.; ESTRELA, J. M. Natural polyphenols in cancer therapy, **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 48, n. 5, p. 197-216, 2011.

AUTORE, G.; MARZOCCO, S.; FORMISANO, C.; BRUNO, M.; ROSSELLI, S.; JEMIA, M. B.; SENATORE, F. Cytotoxic Activity and Composition of Petroleum Ether Extract from *Magydaris tomentosa* (Desf.) W. D. J. Koch (Apiaceae). **Molecules**, v. 20, p. 1571-1578, 2015.

BADAWI, M. M.; SEIDA, A. A.; KINGHORN, A. D.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Potential anticancer agents. XVIII. Constituents of *Amyris pinnata* (Rutaceae). **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 331-334, 1981.

BAETAS, A. C. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Coumarins from *Metrodorea Flavida*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 491-493, 1996.

BAETAS, A. C. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Coumarins and alkaloids from the stems of *Metrodorea Flavida*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 3, p. 181-183, 1999.

BARROS, S. M. D.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Decreased survival of UV-irradiated *Staphylococcus aureus* in the presence of 8-methoxypsoralen in the post-irradiation plating médium. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, p. 153-156, 2002.

BASILE, A.; SORBO, S.; SPADARO, V.; BRUNO, M.; MAGGIO, A.; FARAONE, N.; ROSSELLI, S. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 939-952, 2009.

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, p. 3098-3100, 1988.

BEZERRA, F. S.; SOUSA, A. H.; NETO, M. A.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; FONSECA, A. M.; LEMOS, T. L. G. Isolamento e Atividade Antioxidante de Flavonóides de *Pilocarpus alatus* (Rutaceae). In: 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. **Anais**

eletrônicos... Águas de Lindóia, 2006. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1831-1.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2015.

BORGATI, T. F. **Síntese e Atividade Antimalárica de Derivados 1,2,3-Triazólicos do Lupeol**. 2013. 107f. Dissertação (Mestre em Química)-Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte-MG.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 27, 17 de maio de 2012. **Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**, Brasília, DF, maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 26, 13 de maio de 2014. **Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**, Brasília, DF, maio de 2014.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.

BURGER, M. C. M; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F; ESCALANTE, A.; PRUDHOMME, J.; LE ROCH, K. G.; IZIDORO, M. A.; VIEIRA, P. C. Structures and bioactivities of dihydrochalcones from *Metrodorea stipularis*. **Journal Natural Products**, v. 77, p. 2418-2422, 2014.

BURNS, D.; REYNOLDS, W. F.; BUCHANAN, G.; REESE, P. B.; ENRIQUEZ, R. G. Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. **Magnetic Resonance In Chemistry**, v. 38, p. 488-493, 2000.

BUSSEY, R. O.; SY-CORDERO, A. A.; FIGUEROA, M.; CARTER, F. S.; FALKINHAM, J. O.; OBERLIES, N. H.; CECH, N. B. Antimycobacterial furofuran

lignans from the roots of *Anemopsis californica*. **Planta Medica**, v. 80, p. 498-501, 2014.

CAI, T.; QI, W.; YANG, L.; TU, G.; YANG, R.; XIE, K.; FU, H. Chemical constituents of *Pseudolarix kaempferi* Gord, **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 428-435, 2012.

CAO, X.; XU, J.; BAI, G.; ZHANG, H.; LIU, Y.; XIANG, J.; TANG, Y. Isolation of anti-tumor compounds from the stem bark of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. by silica gel column and counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 929, n. 15, p. 6-10, 2013.

CHASE, M. W.; MORTON, C. M.; KALLUNKI, J. A. Phylogenetic relationships of Rutaceae: A cladistic analysis of the subfamilies using evidence from *rbcL* and *atpB* sequence variation. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 8, p. 1191-1199, 1999.

CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. **International Current Pharmaceutical Journal**, v.1, n. 9, p. 239-242, 2012.

CHEN, Y.; CHANG, F.; WU, C.; YEN, M.; LIAW, C.; HUANG, H.; KUO, Y.; WU, Y. New cytotoxic 6-oxygenated 8,9-dihydrofurocoumarins, hedyotiscone A - C, from *Hedyotis biflora*. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 75-78, 2006.

CHEN, J. J.; HUANG, H. Y.; DUH, C. Y.; CHEN, I. S. Cytotoxic constituents from the stem bark of *Zanthoxylum pistaciiflorum*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 51, p. 659-663, 2004.

CHENG, M. J.; LEE, K. H.; TSAI, I. L.; CHEN, I. S. Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5915-5920, 2005.

CHERNG, J.; CHIANG, W.; CHIANG, L. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. **Food Chemistry**, v. 106, p. 944-950, 2008.

CHO, J. Y.; PARK, J.; KIM, P. S.; YOO, E. S.; BAIK, K. U.; PARK, M. H. Savinin, a lignan from *Pterocarpus santalinus* Inhibits tumor necrosis factor- α production and T cell Proliferation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 167-171, 2001.

COMPAGNONE, R.; RODRIGUEZ, M. C.; DELLE MONACHE, F. Coumarins from *Pilocarpus racemosus*. **Fitoterapia**, v. 64, n. 6, p. 557, 1993.

COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; SÃO PEDRO, A.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.

CRUZ, R.; DUARTE, M.; PIRANI, J. R.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. Development of leaves and shoot apex protection in *Metrodorea* and related species (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 267-282, 2015.

CUCA, L. E.; AVILA, M. C. New benzoyl lactone and others constituents from *Pilocarpus alvaradoii* (Rutaceae). **Revista Colombiana de Química**, v. 36, n. 3, p. 285-290, 2007.

CUCA, L. E.; MARTINEZ, V. J. C.; DELLE MONACHE, F. Chemical constituents of *Zanthoxylum monophyllum*. **Revista Colombiana de Química**, v. 27, p. 17-27, 1998.

DE BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aqueous and ethanol plant extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DENG, Y.; LEE, J. P.; TIANASOA-RAMAMONJY, M.; SNYDER, J. K.; DES ETAGES, S. A.; KANADA, D.; SNYDER, M. P.; TURNER, C. J. New antimicrobial flavanones from *Physena madagascariensis*. **Journal Natural Products**, v. 63, n. 8, p. 1082-1089, 2000.

DIAS, P.; UDULUTSCH, R. G.; PIRANI, J. R. New species of *Metrodorea* (Rutaceae) from Brazil: morphology, molecular phylogenetics, and distribution. **Phytotaxa**, v. 117, n. 2, p. 35-41, 2013.

DINCEL, D.; HATİPOĞLU, S. D.; GÖREN, A. C.; TOPÇU, G. Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 37, p. 675-683, 2013.

DIWAN, R.; MALPATHAK, N. Furanocoumarins: Novel topoisomerase I inhibitors from *Ruta graveolens* L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 7052-7055, p. 2009.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, p.1-16, 2006.

EVANS, F. E.; FU, P. P.; CAIRNS, T. Long-range coupling constants for structural analysis of complex polycyclic aromatic hydrocarbons by high-field proton magnetic resonance spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 558–560, 1981.

FALCÃO-SILVA, V. S.; SILVA, D. A.; SOUZA, M. F. V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1367-1370, 2009.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FOUOTSA, H.; MBAVENG, A. T.; MBAZOA, C. D.; NKENGFACK, A. E.; FARZANA, S.; IQBAL, C. M.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; KUETE, V. Antibacterial constituents of three Cameroonian medicinal plants: *Garcinia nobilis*, *Oricia suaveolens* and *Balsamocitrus camerunensis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 81, p. 1-10, 2013.

FRANÇA, V. C.; VIEIRA, K. V. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 326-330, 2005.

FREITAS, A. C.; LIMA, M. P.; FERREIRA, A. G.; TADEI, W. P.; PINTO, A. C. S. Constituintes químicos do caule de *Spathelia excelsa* (Rutaceae) e atividade frente a *Aedes aegypti*. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2068-2072, 2009.

GALLO, M.B., SARACHINE, M.J. Biological activities of Lupeol. **Internacional Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n.1, p. 46-66, 2009.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 13-17, 2003.

GIBBONS, S.; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 139-140, 2000.

GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Coumarins in the Rutaceae. **Phytochemistry**, v. 17, n. 5, p. 845-864, 1978.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry News & Features**, p. 305-309, 1996.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R.; SALATINO, M. L.; BLANCO, S. R.; KALLUNKI, J. A. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 985-1005, 2008.

GROPPO, M.; KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R.; ANTONELLI, A. Chilean *Pitavia* more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to Neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the Family. **PhytoKeys**, v. 19, p. 9-29, 2012.

GUERREIRO, G.; LIMA, J. E. S. L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; MAGALHÃES, C. M. I.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PIRANI, J. R. Sesquiterpenos do caule de *Pilocarpus riedelianus* e atividades sobre microorganismos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 986-990, 2005.

GUNATILAKA, A. A. L.; DE SILVA, A. M. Y. J.; SOTHEESWARAN, S.; TILLEKERATNE, L. M. V. Horsfieldin, a lignan and other constituents from *Horsfieldia iryaghedhi*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 11, p. 2719-2723, 1982.

GUZMAN, J. D.; EVANGELOPOULOS, D.; GUPTA, A.; PRIETO, J. M.; GIBBONS, S.; BHAKTA, S. Antimycobacterials from lovage root (*Ligusticum officinale* Koch). **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 993-998, 2013.

HAMAD, M. N. Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization. **Pharmacie Globale**, v. 3, n. 4, p. 1-3, 2012.

HAMED, M. M.; REFAHY, L. A.; ABDEL-AZIZ, M. S. Evaluation of antimicrobial activity of some compounds isolated from *Rhamnus cathartica* L. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 1133-1140, 2015.

HAWAS, U.; ELTOMY, S.; NASSIF, R.; EL-HOSSARY, G.; ABOUZID, S. A new antifungal labdane diterpene from the leaves of *Saraca indica*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 21, p. 1-6, 2015.

HE, J. Y.; ZHANG, W.; HE, L. C.; CAO, Y. X. Imperatorin induces vasodilatation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, p. 170-175, 2007.

HIRANO, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potente cytostatic agents against human leukemic HI-60 cells. **Life Sciences**, v. 55, n. 13, p. 1061-1069, 1994.

HUANG, G. J.; DENG, J. S.; LIAO, J. C.; HOU, W. C.; WANG, S. Y.; SUNG, P. J.; KUO, Y. H. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1673-1681, 2012.

JAKUBOWICZ-GIL, J.; PADUCH, R.; ULZ, Z.; BADZIUL, D.; GLOWNIAK, K.; GAWRON, A. Cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 50, p. 381-391, 2012.

JANUÁRIO, A. H.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. Alcaloides β -indolopiridoquinazolinicos de *Esenbeckia grandiflora* MART. (RUTACEAE). **Química Nova**, v. 32, p. 2034-2038, 2009.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.2650-2655. 1995.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1086-1094. 1993.

KAMPERDICK, C.; LIEN, T. P.; ADAM, G.; SUNG, T. V. Apotirucallane and tirucallane triterpenoids from *Luvunga sarmentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 675-678, 2003.

KLEINER, H. E.; REED, M. J.; DIGIOVANNI, J. Naturally occurring coumarins inhibit human cytochromes P450 and block benzo[a]pyrene and 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation in MCF-7 cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, p. 415-422, 2003.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunellavulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KUETE, V.; NANA, F.; NGAMENI, B.; MBAVENG, A. T.; KEUMEDJIO, F.; NGADJUI, B. T. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacol**, v. 124, n. 3, p. 556-561, 2009.

KULJANABHAGAVAD, T.; SUTTISRI, R.; PENGSUPARP, T.; RUANGRUNGSI, N. Chemical structure and antiviral activity of aerial part from *Laggera pterodonta*. **Journal of Health Research**, v. 23, n. 4, p. 175-177, 2009.

KUMAR, A.; KHAN, I. A.; KOUL, S.; KOUL, J. L.; TANEJA, S. C.; ALI, I.; ALI, F.; SHARMA, S.; MIRZA, Z. M.; KUMAR, M.; SANGWAN, P. L.; GUPTA, P.; THOTA, N.; QAZI, G. N. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 1270-1276, 2008.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos. p. 481-501, 2001.

LIMA, A. I. L. P.; LDICIR SCARIOT, A.; MEDEIROS, M. B.; SEVILHA, A. C. Diversidade e uso de plantas do Cerrado em comunidade de Geraizeiros no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 675-684, 2012.

LUO, X.; PIRES, D.; AÍNSA, J. A.; GRACIA, B.; DUARTE, N.; MULHOVO, S.; ANES, E.; FERREIRA, M. U. *Zanthoxylum capense* constituents with

antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo with in human macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 417-422, 2013.

LUSZCZKI, J. J.; ANDRES-MACH, M.; GLENSK, M.; SKALICKA-WOZNIAK, K. Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: A comparative study. **Pharmacological Reports**, v. 62, p. 1231-1236, 2010.

LV, X.; LIU, D.; HOU, J.; DONG, P.; ZHAN, L.; WANG, L.; DENG, S.; WANG, C.; YAO, J.; SHU, X.; LIU, K.; MA, X. Biotransformation of imperatorin by *Penicillium janthinellum*. Anti-osteoporosis activities of its metabolites. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2260–2266, 2013.

MA, T.; NIE, L.; LI, H.; HUO, Q.; ZHANG, Y.; WU, C. Determination of isobavachalcone in rat plasma by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 50-55, 2015.

MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MASSANET, G. M.; RODRIGUEZ-LUIS, F.; ZUBÍA, E. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.7, p. 1371-1379, 1993.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 335-340, 2000.

MAIA, G. L. D. A.; FALCÃO-SILVA, V. S.; AQUINO, P. G. V.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; RODRIGUES, L. C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R. M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. **Molecules**, v. 16, p. 4828-4835, 2011.

MARCOTULLIO, M. C.; PELOSI, A.; CURINI, M. Hinokinin, an Emerging Bioactive Lignan. **Molecules**, v. 19, p. 14862-14878, 2014.

MARTINS, T. P.; TEIXEIRA, S. P.; GROPPPO, M. Anatomia foliar comparada de *Metrodorea* A.St.-Hil. (Rutaceae). In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 16, 2008, Ribeirão Preto. **CD de resumos**, Ribeirão Preto: USP, 2008.

MBAZE, L. M.; LADO, J. A.; WANSI, J. D.; SHIAO, T. C.; CHIOZEM, D. D.; MESAİK, M. M.; CHOUDHARY, M. I.; LACAİLLE-DUBOIS, M.; WANDJI, J.; ROY, R.; SEWALD, N. Oxidative burst inhibitory and cytotoxic amides and lignans from the stem bark of *Fagara heitzii* (Rutaceae). **Phytochemistry**, v. 70, p. 1442-1447, 2009.

MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 559-574, 2008.

MELLO, C. B.; UZEDA, C. D.; BERNARDINO, M. V.; MENDONÇA-LOPES, D.; KELECOM, A.; FEVEREIRO, P. C. A.; GUERRA, M. S.; OLIVEIRA, A. P.; ROCHA, L. M.; GONZALEZ, M. S. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 514-520, 2007.

MENEZES, H. D.; PEREIRA, A. C.; BRANCINI, G. T. P.; LEÃO, H. C.; JÚNIOR, N. S. M.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BASTOS, J. K.; BRAGA G. U. L. Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 74-83, 2014.

MORA, S.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; CHAVARRIA, M.; MURILLO, R. Chemical constituents from *Zanthoxylum setulosum* (Rutaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 10, n. 2, p. 155-158, 2011.

MÜLLER, A. H.; DEGASPARI, L. R. O.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES J. B.; PIRANI, J. R. 3-methoxyfurocoumarins from *Pilocarpus riedelianus*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 2, p. 585-586, 1993.

MÜLLER, A. H.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. Dihydrochalcones, coumarins and alkaloids from *Metrodorea nigra*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1797-1800, 1995.

MURRAY, R. D.H.; JORGE, Z. D. A simple method for differentiating between angular and linear 5-methoxyfuranocoumarins. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 697-699, 1984.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; SKORUPA, L. A. An aromatic hydrocarbon from the foliar epicuticular wax of *Pilocarpus jaborandi*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 127-129, 1998.

NIE, H.; MENG, L. Z.; ZHOU, J. Y.; FAN, X. F.; LUO, Y.; ZHANG, G. W. Imperatorin is responsible for the vasodilatation activity of *Angelica dahurica* var. *formosana* regulated by nitric oxide in an endothelium-dependent manner. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 15, p. 442-447, 2009.

NOGUEIRA, J.; MOURÃO, S. C.; DOLABELA, I. B.; SANTOS, M. G.; MELLO, C. B.; KELECOM, A.; MEXAS, R.; FEDER, D.; FERNANDES, C. P.; GONZALEZ, M. S.; ROCHA, L. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on *Rhodnius prolixus* nymph. **Parasitology Research**, v. 113, p. 4271-4279, 2014.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância clínica e farmacológica. **Química Nova**, v.29, p.549-54, 2006.

NOORDAM, A.; MAAT L.; BEYERMAN, H. C. Stereoselective synthesis of (+)-pilocarpine, an imidazole alkaloid used in ophthalmology (Imidazole Chemistry, Part VII). **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 98, n. 7-8, p. 467-468, 1979.

NYAHANGA, T.; JONDIKO, J. I.; MANGURO, L. O. A.; ORWA, J. A. Antiplasmodial and larvicidal compounds of *Toddalia asiatica* root bark. **Journal of Chemical Sciences**, v. 125, n. 5, p. 1115-1121, 2013.

O'NEILL, T.; JOHNSON, J. A.; WEBSTER, D.; GRAY, C. A. The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 232-237, 2013.

PARHOODEH, P.; RAHMANI, M.; HASHIM, N. M.; SUKARI, M. A.; LIAN, G. E. C. Lignans and other constituents from aerial parts of *Haplophyllum Villosum*. **Molecules**, v. 16, 2268-2273, 2011.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, p. 13-17, 2002.

PERNIN, R.; MUYARD, F.; BÉVALOT, F.; TILLEQUIN, F.; MORETTI, C. Coumarins from the roots and stem bark of *Metrodorea favida*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 531-533, 1999.

PERUMALSAMY, H.; CHANG, K. S.; PARK, C.; AHN, Y. Larvicidal Activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10001-10006, 2010.

PINHEIRO, C. U. B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp, Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. **Economic Botany**, v. 51, p. 49-58, 1997.

PIRANI, J. R. **Estudos taxonômicos em Rutaceae: Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae), análise cladística de Pteleinae, sinopse de Rutaceae do Brasil**. 1999. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIRANI, J.R. *Metrodorea*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB811>>. Acesso em: 27 Jun. 2015.

PIRANI, J.R. *Metrodorea*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB817>>. Acesso em: 27 Jun. 2015.

PIRANI, J. R. *Pilocarpus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015c. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB866>>. Acesso em: 04 Jul. 2015.

PIRANI, J. R. *Pilocarpus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015d. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB898>>. Acesso em: 04 Jul. 2015.

PIRANI, J.R.; GROppo, M. Rutaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>>. Acesso em: 21 Mai. 2015.

PUTMAN, M.; VEEN, H. W. V.; KONINGS, W. N. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 672-693, 2000.

PYMAN, F. L. Pilosine: a new alkaloid from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of the Chemical Society**, v. 101, p. 2206-2271, 1912.

RAHMAN, M. M.; GRAY, A. I. Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 73-77, 2002.

RAJA, S. B.; MURALI, M. R.; ROOPA, K.; DEVARAJ, S. N. Imperatorin a furocoumarin inhibits periplasmic Cu-Zn SOD of *Shigella dysenteriae* their by modulates its resistance towards phagocytosis during host pathogen interaction. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 8, p. 560-568, 2011.

RAQUET, N.; SCHRENK, D. Application of the equivalency factor concept to the phototoxicity and -genotoxicity of furocoumarin mixtures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 257-266, 2014.

RAVICHANDRAN ,V.; SHALINI, S.; SUNDRAM, K. M.; HARISH, R. Validation of analytical methods-Strategies & Importance. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.3, p.18-22, 2010.

RAZDAN, T. K.; QADRI, B.; HARKAR, S.; WAICHT, E. S. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2063-2069, 1987.

REFSIO, C.; BRANDÃO, D. C.; BRANDÃO, G. C.; KORUKIAN, M.; GARCIA, R. J.; BONFIGLIOLI, R.; NERY, C. A. S.; GAMBA, R. Avaliação clínica da eficácia e segurança do uso de extrato padronizado da *Cordia verbenacea* em pacientes portadores de tendinite e dor miofascial. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, n. 1/2, p. 40-46, 2005.

REHMAN, U. U.; SHAH, J.; KHAN, M. A.; SHAH, M. R.; ISHTIAQ; KHAN, I. Molecular docking of taraxerol acetate as a new COX inhibitor. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 8, p. 194-197, 2013.

REIS, K. B. **Extrato padronizado de *Ruta graveolens* L.: avaliação de seu potencial no controle da brusone em arroz.** 2013. 145f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, M. G.; MENDONÇA, M. M.; PAULA, J. A. M. Análise do uso racional de *Hypericum perforatum* a partir do perfil das prescrições médicas aviadas em farmácias de Anápolis-GO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 42-52, 2006.

ROSSELLI, S.; MAGGIO, A.; BELLONE, G.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; CICALA, C.; ALFIERI, A.; MASCOLO, N.; BRUNO M. Antibacterial and anticoagulant activities of coumarins isolated from the flowers of *Magydaris tomentosa*. **Planta Medica**, v. 73, n. 2, p. 116-120, 2007.

SALES, E. M. **Regiosseletividade na biotransformação de furano e pirano cumarinas** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.

SANDOVAL-MONTEMAYOR, N. E.; GARCÍA, A.; ELIZONDO-TREVIÑO, E.; GARZA-GONZÁLEZ, E.; ALVAREZ, L.; CAMACHO-CORONA, M. R. Chemical Composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. **Molecules**, v. 17, p. 11173-11184, 2012.

SANTOS, F. A.; CUNHA, G. M. A.; VIANE, G. S. B.; RAO, V. S. N.; MANOEL, A. N.; SILVEIRA, E. R. Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 67-69, 1997.

SANTOS, A. P.; LOPES, M. C.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. H. Analysis of the volatile oil from *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire (Rutaceae) leaves by GC-MS. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p.325-326, 2004.

SANTOS, P. D.; TAVARES, D.; UDULUTSCH, R. G.; PIRANI, J. R.; DIAS, P. Uma nova espécie de *Metrodorea* a. St.-Hil. (Rutaceae) da Bahia, Brasil. In 62º Congresso Nacional de Botânica, 2011, Fortaleza. **Anais eletrônicos...**

Disponível em: <<http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/62CNBot/1822.pdf>> Acesso em: 25 jun. 2015.

SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R.G.; NISHIBE, S.; DANESHTALAB, M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 3, p. 471-480, 2011.

SCHINKOVITZ, A.; GIBBONS, S.; STAVRI, M.; COCKSEGE, M.J.; BUCAR, F. Ostruthin: Na antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. **Planta Medica**, v. 69, p. 369-371, 2003.

SHIN, E.; LEE, C.; SUNG, S. H.; KIM, Y. C.; HWANG, B. Y.; LEE, M. K. Antifibrotic activity of coumarins from *Cnidium monnieri* fruits in HSC-T6 hepatic stellate cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 370-374, 2011.

SILVA, E. B. F.; BARBOSA, I. J. F.; BARRETO, H. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Modulation of the UVB-induced lethality by furocoumarins in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 260-263, 2014.

SILVA, J. C. R.; RAO, V. S. N. Involvement of serotonin and eicosanoids in the rat paw oedema response to the essential oil of *Pilocarpus spicatus*. **Mediators of Inflammation**, v. 1, p. 167-169, 1992.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M. C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R. S. A.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal Natural Products**, v. 76, p. 1071-1077, 2013.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2010.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**, p. 1-14, 2000.

SKORUPA, L. A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae)**. 1996. 426f. Tese (Ph.D.) - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

SKORUPA, L. A.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic meaning. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 655-662, 1998.

SKORUPA, L. A. Novos táxons infraespecíficos e combinações em *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 2, p. 263-270, 2003.

SMITH, E.; WILLIAMSON, M.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and MRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 538-542. 2005.

SNEL, G. G. M.; MALVISI, M.; PILLA, R.; PICCININI, R. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 174, p. 489-495, 2014.

SOUSA, A. H.; BARBOSA, F. G.; NETO, M. A.; MAFEZOLI, J.; LOPES, E. L.; NASCIMENTO, R. R. G.; SOUSA, V. S. Primeiro Estudo Fitoquímico de *Pilocarpus sulcatus* Skorupa (Rutaceae). In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **Anais eletrônicos...** Fortaleza, 2009. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0498-1.pdf>> Acesso em: 11 jul. 2015.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.1247-1260, 2007.

SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M.; TANIGUCHI, M.; BABA, K.; KIMURA, Y. Anti-tumor effects of various furocoumarins isolated from the roots, seeds and fruits of *Angelica* and *Cnidium* species under ultraviolet A irradiation. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, p. 83-94, 2014.

TAKAKU, N.; CHOI, D.; MIKAME, K.; OKUNISHI, T.; SUZUKI, S.; OHASHI, H.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M. Lignans of *Chamaecyparis obtusa*. **Japan Wood Research Society**, v. 47, p. 476-482, 2001.

TAN, B.; SHI, H.; JI, G.; XIE, J. Effects of taraxerol and taraxeryl acetate on cell cycle and apoptosis of human gastric epithelial cell line AGS. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 6, p. 638-642, 2011.

TANGJITMAN, K.; WONGSAWAD, C.; KAMWONG, K.; SUKKHO, T.; TRISONTHI, C. Ethnomedicinal plants used for digestive system disorders by the Karen of northern Thailand. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** v. 11, n. 27, p. 1-13, 2015.

TAVARES, L. C.; ZANON, G.; WEBER, A. D.; NETO, A. T.; MOSTARDEIRO, C. P.; CRUZ, I. B. M.; OLIVEIRA, R. M.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Structure-activity relationship of benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* having antimicrobial activity. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 1-10, 2014.

TINTINO, S. R.; CUNHA, F. A. B.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; SOUZA, C. E. S.; MATIAS, E. F. F.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; ANDRADE, J. C.; COSTA, J. G. M.; FREITAS, M. A.; COUTINHO, H. D. M. Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus* cf. *arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 157-162, 2013.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; TAN, N.; ÖLÇAL, S.; JOHANSSON, C.; ÜÇER, M.; BIRMAN, H.; TAMER, S. Biological activities of a Turkish medicinal plant, *Prangos platychlaena*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45, p. 193-197, 1995.

VERECKEN, L.; PIERLOOT, K.; PEETERS, J., B3LYP-DFT characterization of the potential energy surface of the $\text{CH}(\text{X}^2\Pi)+\text{C}_2\text{H}_2$ reaction. **The Journal of Chemical Physics** 1998, v. 108, p. 1068-1080, 1998.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.326-337, 2006.

WANG, X.; LIN, Y.; GENG, Y.; LI, F.; WANG, D. "Preparative separation and purification of sesamin and sesamolin from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography". **Cereal Chemistry**, v. 86, n.1, p. 23-25, 2009.

WANG, Z.; KIM, J.; WANG, M.; SHU, S.; AHN, Y. Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1041-1047, 2012.

WATERMAN, P. G. Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, p. 149-180, 1975.

WEI, Y.; ITO, Y. Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb "bai zhi" *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, p. 112-117, 2006.

WEN, C.; KUO, Y.; JAN, J.; LIANG, P.; WANG, S.; LIU, H.; LEE, C.; CHANG, S.; KUO, C.; LEE, S.; HOU, C.; HSIAO, P.; CHIEN, S.; SHYUR, L.; YANG, N. Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 4087-409, 2007.

WIDELSKI, J.; POPOVA, M.; GRAIKOU, K.; GLOWNIAK, K.; CHINO, I. Coumarins from *Angelica lucida* L. - Antibacterial Activities. **Molecules**, v. 14, p. 2729-2734, 2009.

WRIGHT, P. M.; SEIPLE I. B.; MYERS, A. G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840-8869, 2014.

XIU-JUAN, Z.; ZONG-YAN, L.; LI-JUAN, H.; YU-BIN, J. Effect of xanthotoxin on SGC-7901 cells proliferation and Autophagy. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 10, p. 545-548, 2014.

YILDIZOGLU-ARI, N.; ALTAN, V. M.; ALTINKURT, O.; ÖZTÜRK, Y. Pharmacological effects of rutin. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 1, p. 19-23, 1991.

ZHANG, Y.; WANG, Q. L.; ZHAN, Y. Z.; DUAN, H. J.; CAO, Y. J.; HE, L. C. Role of store-operated calcium entry in imperatorin-induced vasodilatation of rat small mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 647, p. 126-131, 2010.

ZHOU, N.; HE, J.; WANG, T.; ZHANG, J.; HE, H. Design, synthesis, and vasorelaxation activity of novel imperatorin derivatives. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 6, p. 650-657, 2013.