

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Exatas — Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Alcaloides Esteroidais de Frutos de *Solanum caavurana* Vell.:
Isolamento, Proposta dos seus Mecanismos de Fragmentação por ESIMS/MS e Avaliação de seu uso Popular para o Tratamento da
Hanseníase.

Doutoranda: M.Sc. Nelissa Pacheco Vaz

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Helena L. de N. Sales Maia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências; Área de Concentração: Química Orgânica.

Curitiba – Paraná

(Curitiba, 26 de Março de 2013).

"Eu usei minha sabedoria para examinar tudo isso. Estava resolvido a ser sábio, mas não conseguia alcançar a sabedoria. Como é que alguém pode descobrir o sentido das coisas que acontecem? Isso é profundo demais para nós e muito difícil de entender.

Mas eu resolvi estudar e conhecer as coisas. Estava decidido a encontrar a sabedoria e achar as respostas para as minhas perguntas [...]
Tudo que aprendi se resume nisto: Deus nos fez simples e direitos, mas nós complicamos tudo.
Somente os sábios conseguem explicar as coisas. A sabedoria de uma pessoa brilha no seu rosto e a torna simpática mesmo que seja feia".

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela vida e por ser meu melhor amigo, companheiro e consolador nas horas mais difíceis e angustiantes: Tu és tudo pra mim;
- À minha família: minha irmã Karina, minha mãe Jeane Márcia e meu pai Sérgio Luiz, por acreditarem, apoiarem, incentivarem e terem investido tempo, amor e dedicação para minhas realizações pessoais. Agradeço também pela compreensão e convivência:
- Um agradecimento especial para Karina Pacheco Vaz que além de ser minha irmã e me aguentar a vida inteira, tem paciência comigo, compreende as minhas angústias, limitações, anseios e sonhos... Você é minha melhor amiga e eu te amo muito!
- A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química desta universidade pela oportunidade de realização deste trabalho e pela minha formação acadêmica desde a graduação;
- À minha orientadora professora Dr^a. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia pela amizade de quase 10 anos, humanidade, compreensão, presença, motivação e auxílio durante a realização deste trabalho;
- Aos órgãos de fomento CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro para a execução do projeto e a CAPES pela bolsa de estudos;
- Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) pela autorização de coleta do material botânico necessário para este estudo em uma de suas Unidades de Conservação, o Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PEVR- Fênix/PR);
- Aos biólogos Dr^a. Sandra B. Mikich (Embrapa Florestas-PR) e Osmar Santos Ribas (MBM - Museu Botânico Municipal - Jardim Botânico de Curitiba/PR) pela coleta e identificação do material botânico utilizado para a realização deste estudo, pelas fotos e pela amizade;
- Ao Dr. Dejair Caitano do Nascimento do Instituto Lauro Souza de Lima (ILSL Bauru/SP) por realizar as análises de atividade antileprótica, pela amizade, dedicação e atenção prestada;
- Ao professor Dr. Andersson Barison e a todos os alunos do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (UFPR) que contribuíram com as aquisições dos experimentos de RMN (HMBC e HSQC) no 400MHz;
- Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) pela amizade, ensinamentos, paciência, camaradagem e pela oportunidade de desenvolver grande parte deste estudo no NPPNS - Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos;
- Aos servidores técnicos José Carlos (Tomaz) e Cristina (Cris) do NPPNS Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP-USP pela amizade, ensinamentos, paciência e todo auxílio durante a realização dos experimentos em Espectrometria de Massas (amo muito vocês dois amigos!);
- Aos professores Dr^a Ana Luiza Lacava Lordello, Dr^a Francinete Ramos Campos e Dr. Francisco de Assis Marques pelas importantes observações, correções e sugestões feitas durante o Exame de Qualificação;

- Aos professores Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DQ-UFRRJ), Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP), Dr. Brás Heleno de Oliveira (DQ-UFPR) e Dr. Andersson Barison pela participação na Defesa desta Tese: Pelas importantes observações, correções e sugestões feitas;
- A todos os professores do Departamento de Química que participaram durante minha formação acadêmica, intelectual e profissional entre Bacharelado, Licenciatura, Mestrado e Doutorado. No aniversário dos meus 12 anos de UFPR, vocês são minha família, meus amigos pessoais e onde me espelho para prosseguir e evoluir na vida profissional;
- Aos funcionários técnico-administrativos do departamento pelos auxílios prestados durante a graduação e pós-graduação em especial à Selma, à Sônia, ao Paulo (hialotécnico) e ao secretário Marcelino. Meu muito obrigado para todos aqueles que foram indispensáveis para a execução deste trabalho!
- Aos amigos que fiz lá na pensão da Dona Angelina durante minha estadia em Ribeirão Preto, Christian, Luiz, 'Cisquinho', Túlio, Bruno, Leda, Claudia, Rosana, Felipes I e II, Paulo, e em especial para minhas irmãs Gabriela Solano e Ana Paula Gaspari (amo vocês duas irmãzinhas!);
- Aos colegas de laboratório Dr. Érica L. dos Santos, Dr. Emmanoel V. Costa, Elizabete Bellini, Jéssica Hirota, M.Sc. Maria Helena Verdan, M.Sc. Regiane L. B. Strapasson, Carolina S. K. Barbosa, Laís Francine, Camila R. Borges, Juliana Mari Jo, Barbara S. Inoue, M.Sc. Edione Fátima Canzi, Inaiara Casapula, M.Sc. Anderson Rogério dos Santos, Cassiano Pires, M.Sc. Thalita (Guilda) Santos e M.Sc. Renata Olegário, pelo apoio, auxílio, compreensão, desabafos, incentivos e convivência harmoniosa;
- Ao aluno estagiário Douglas Ianuch pelo auxílio durante as reações para obtenção da 3β-N-formilaminoespirossolano;
- E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

SUMÁRIO

		TURAS	
		TABELAS	
		FIGURAS	
		ESQUEMASESPECTROS	
		ESPECTROS	
		Γ	
AD	SINAC	I	XVI
1.	INTRO	DDUÇÃO	1
••	1.1	A Família Solanaceae	
	1.2	O Gênero Solanum	
		1.2.1 Principais Metabólitos Secundários de Solanum	
	1.3	Técnicas Hifenadas Atuais e a Descoberta de Novos Produtos Naturais	
	1.4	Espécies Vegetais em Estudo	
2.	ORJE	ΓΙVOS	13
	2.1	Geral	
	2.2	Específicos	
3.	МАТЕ	CRIAIS E EQUIPAMENTOS	11
Э.	3.1	Suportes Para Cromatografia	
	3.1	Equipamentos	
4.		UDO FITOQUÍMICO	
	4.1	Coleta e Identificação Botânica	
	4.2	Preparo dos Extratos para Estudo Fitoquímico	
	4.3	Extração para Alcaloides – Extratos Metanólicos e Hidroalcoólicos	
	4.4	Purificação de SCFIMPA – Métodos Cromatográficos Utilizados	
		4.4.1 Purificação de SCFIMPA - CC em Alumina Neutra	
	15	4.4.2 Purificação de SCFIMPA F.110-145: CC em Alumina Neutra	
	4.5	Purificação de SCFIMFN – Métodos Cromatográficos Utilizados 4.5.1 Purificação de SCFIMFN F.31-40 por Cromatografia em Coluna	
		4.5.2 Purificação por CCDP de F. 31(13)	
	4.6	Estudo Complementar dos Frutos Maduros de Solanum caavurana	
	4.0	4.6.1 CCDP da Fase Alcaloídica – Frutos Maduros de Solanum caavurana	
		4.6.2 Cromatografia em Coluna Rápida de SCFMDFN:	
		4.6.3 CCDP de SCFMDFN F.59-66:	
		4.6.4 Cromatografia em Coluna Rápida de SCFMDFI	
	4.7	Espectrometria de Massas	
	7./	4.7.1 Obtenção dos Extratos para Estudos de ESI-MS	
		4.7.2 Partição dos Extratos	
	4.8	Obtenção Química da Caavuranamida a Partir de SCFI - 3	
_			
<i>5</i> .		ES BIOLÓGICOS	
	5.1	Atividade Antimicrobiana	
	5.0	5.1.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana	
	5.2	Atividade Antiproliferativa (Atividade Antitumoral in vitro)	36
	5.3	Avaliação da Atividade do Extrato em Camundongos Nude Inoculados com M. leprae	37
_	D == ===		•
<i>6</i> .		LTADOS E DISCUSSÃO:	
	6.1	Obtenção dos Extratos para o Estudo Fitoquímico	39

	6.2	Identificação dos Metabólitos Secundários dos Frutos de Solanum caavurana	40
		6.2.1 Determinação Estrutural de SCFI - 1 – Tomatidina	42
		6.2.2 Determinação Estrutural de SCFI - 2 e SCFI - 3	44
		6.2.3 Determinação Estrutural de SCFI - 4 - 5α-tomatidan-3-ona	46
		6.2.4 Determinação Estrutural de SCFI - 5 - 4-tomatiden-3-ona	46
		6.2.5 Identificação estrutural de SCFM-1 - caavuranamida	47
	6.3	Obtenção Química da Caavuranamida a Partir de SCFI-3	50
	6.4	Testes de Atividade dos Extratos vegetais	52
		6.4.1 Atividade Antimicrobiana	52
		6.4.2 Atividade Antitumoral	53
		6.4.3 Atividade Antileprótica	54
	6.5	Estudo dos Mecanismos de Fragmentação de Alcaloides Esteroidais	54
		6.5.1 Mecanismos de Fragmentação dos Espirossolanos por ESI-MS/MS	58
		6.5.2 Estudo Comparativo das Vias de Fragmentação dos Espirossolanos Isola	
		6.5.3 Determinação Estrutural de SCFM-2 por ESI-MS/MS aliado a estudos de	?
		<i>RMN</i>	
	6.6	Estudo de Mapeamento Fitoquímico por ESI-MS e ESI-MS/MS	68
<i>7</i> .	CONSI	DERAÇÕES FINAIS	72
8.	REFEI	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	Anex	o I – Tabelas	86
	Anex	o II – Espectros	94

ABREVIATURAS

AcOEt Acetato de etila calcd. Calculada

CC Cromatografia em coluna / Coluna Cromatográfica

CCD Cromatografia em camada delgada

CCDP Cromatografia em camada delgada preparativa

CCFlash Cromatografia em coluna rápida (*flash*)

CG-EM Cromatografia em fase gasosa, acoplada com espectrometria de massas
CID Collision Induced Dissociação induzida por colisão)

CL Cromatografia em fase liquida

CLAE / HPLC

Cromatografia líquida de alta eficiência

High performance liquid chromatography

CLAE-EM/EM Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas

sequencial

CL-EM Cromatografia em fase liquida acoplada com espectrometria de massas

CL-EM/EM Cromatografia em fase liquida acoplada com espectrometria de massas

sequencial

CL-UV Cromatografia em fase liquida acoplada com espectroscopia no ultravioleta

COBEA Comitê Brasileiro de Experimentação Animal

DEPT 135 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DIMS Direct Infusion Mass Spectrometry

EHE Extrato hidroetanólico
EHM Extrato hidrometanólico
EM Espectrometria de massas

EME Extrato em metanol

EP Extrato em éter de petróleo

FAB-MS/MSFast atom bombardment tandem mass spectrometry **HMBC**Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence

HTS High-throughput screening

ESI-MS Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

ESI-MS/MS Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray

IV Infravermelho MeOH Metanol

MIC Minimun inhibitory concentration

MM Massa molecular

NaTFA Trifluoroacetato de sódio

NOESY Nuclear Overhauser effect spectroscopy

OMS / WHO Organização Mundial de Saúde
World Health Organization

PEVR Parque Estadual de Vila Rica do Espírito Santo

PF Ponto de fusão
PPT Precipitado
PQT Poliquimioterapia

RMN Ressonância magnética nuclear

SC Solanum caavurana

SCFI *Solanum caavurana*, frutos imaturos

SCFIH Solanum caavurana, frutos imaturos, extrato hidroetanólico

SCFIHFA

Solanum caavurana, frutos imaturos, extrato hidroetanólico, fração alcaloídica
SCFIHFI

Solanum caavurana frutos imaturos extrato hidroetanólico fração insolúvel
SCFIHFN

Solanum caavurana frutos imaturos extrato hidroetanólico fração neutra
Solanum caavurana frutos imaturos extrato hidroetanólico precipitado

alcaloídico

SCFIHPA

SCFIM Solanum caavurana frutos imaturos extrato metanólico

SCFIMFA Solanum caavurana frutos imaturos extrato metanólico fração alcaloídica SCFIMFI Solanum caavurana frutos imaturos extrato metanólico fração insolúvel SCFIMFN Solanum caavurana frutos imaturos extrato metanólico fração neutra

SCFIMPA Solanum caavurana frutos imaturos extrato metanólico precipitado alcaloídico Solanum caavurana frutos maduros extrato hidroetanólico, diclorometano,

SCFMDFA fração alcaloídica

SCFMDFI Solanum caavurana frutos maduros extrato hidroetanólico, diclorometano,

fração insolúvel

SCFMDFNScenario Solanum caavurana frutos maduros extrato hidroetanólico, diclorometano,

fração neutra

SCT Solanum caavurana tronco

SD Solanum diploconos

SDPA Solanum diploconos partes aéreas

SS Solanum scuticum

SSFI Solanum scuticum frutos imaturos

SSFIMFA Solanum scuticum frutos imaturos, extrato metanólico, fração alcaloídica SSFIMFI Solanum scuticum frutos imaturos, extrato metanólico, fração insolúvel SSFIMFN Solanum scuticum frutos imaturos, extrato metanólico, fração neutra

SUS Sistema Único de Saúde
TGI Total growth inhibition
TMS Tetrametilsilano Si(CH₃)₄

UV Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Espécies vegetais disponíveis para estudo de mapeamento fitoquímico	12
Tabela 4.1 Dados do gradiente de fracionamento para purificação de SCFIMPA em CC		
	usando alumina neutra como fase estacionária	22
Tabela 4.2	Dados do gradiente de fracionamento para purificação de SCFIMPA F.110 -	
	145 em CC usando alumina neutra como fase estacionária	23
Tabela 4.3	Dados do gradiente de fracionamento para purificação de SCFIMFN em CC	
	usando gel de sílica como fase estacionária	25
Tabela 4.4	Dados do gradiente de fracionamento para purificação de SCFIMFN F.31 - 40	
	em CC usando gel de sílica como fase estacionária	27
Tabela 4.5	Dados do gradiente de fracionamento por CCFlash da fração SCFMDFN	29
Tabela 4.6	Dados do gradiente de fracionamento por CCFlash da fração SCFMDFI;	32
Tabela 6.1	Informações sobre a obtenção dos extratos para o estudo fitoquímico	39
Tabela 6.2	Massas e rendimentos obtidos para extrações de alcaloides dos extratos	40
Tabela 6.3	Substâncias isoladas dos frutos maduros e imaturos de S.caavurana	41
Tabela 6.4	Dados de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do composto SCFI -1 (9)	
	comparados com os da tomatidina (9)	86
Tabela 6.5	Dados de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) do composto SCFI - 2 (15) e dos	
	compostos (22S,25S)-3α-amino-5α-espirossolano (α-NH ₂) e soladunalinidina	
	$(\beta-NH_2)$	87
Tabela 6.6	Dados de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) do composto SCFI - 3 (16) e dos	
	compostos (22S,25S)-3 α -amino-5 α -spirosolano (α -NH ₂) e soladunalinidina (β -	
	NH_2)	88
Tabela 6.7	Dados de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) dos compostos SCFI -4 (7) e SCFI - 5	
	(6) comparados com os da 5α-tomatidan-3-ona (7)	89
Tabela 6.8	Dados de RMN de ¹ H (200MH _z , CDCl ₃) e RMN de ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) de	
	SCFM - 1 e do composto caavuranamida (5)	90
Tabela 6.9	Dados de RMN de ¹ H (200MH _z , CDCl ₃) e RMN de ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) do	
	produto natural SCFM - 1 [caavuranamida (5)] e do obtido por via química a	
	partir da <i>N</i> -formilação de SCFI - 3	91
Tabela 6.10	Atividade antimicrobiana de extratos e frações de Solanum contra	
	microrganismos	92
Tabela 6.11	Atividade antiproliferativa de extratos e frações de Solanum obtidas, contra	
	linhagens de células cancerosas	93
Tabela 6.12	Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às substâncias isoladas dos frutos	
	maduros e imaturos de S. caavurana	62
Tabela 6.13	Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às principais moléculas protonadas	
	[M+H] ⁺ encontradas no extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de <i>S</i> .	
	caavurana	69
Tabela 6.14	Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às principais moléculas protonadas	
	$[M+H]^+$ encontradas no extrato hidrometanólico dos frutos maduros de S .	
	caavurana	69
Tabela 6.15	Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às principais moléculas protonadas	
	[M+H] ⁺ encontradas no extrato hidrometanólico das folhas de <i>S. caavurana</i>	70
Tabela 6.16	Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes aos principais íons referentes à	
	moléculas protonadas encontrados no extrato hidrometanólico do tronco de <i>S</i> .	
	caavurana	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Mapa de distribuição mundial da família Solanaceae	5	
Figura 1.2	Mapa de distribuição do gênero Solanum ao redor do mundo	6	
Figura 4.1	Hábito de Solanum caavurana Vell.	17	
Figura 4.2	Frutos imaturos de S. scuticum M. Nee (S. tabacifolium Dunal.)	17	
Figura 4.3	Solanum diploconos (Mart.) Bohs. (Cyphomandra diploconos)	17	
Figura 6.1 Substâncias isoladas dos frutos imaturos e maduros de <i>Solanum</i> caavurana Vell			
Figura 6.2	Deslocamentos de RMN de ¹³ C (em ppm) característicos para os anéis F de alcaloides esteroidais de <i>Solanum</i> com esqueleto do tipo espirosolano	43	
Figura 6.3	Correlações relevantes observadas no NOESY para a caavuranamida (5).	49	
Figura 6.4	Reação de N -formilação da anilina, catalisada com ácido fórmico e ${\rm TiO_2}$ - ${\rm P25}$	50	
Figura 6.5	Reações de <i>N</i> -formilação de SCFI-3	51	
Figura 6.6	Racionalização do processo de desidratação comum a glicoalcaloides esteroidais e à aglicona tipo espirossolano tomatidina [SCFI - 1 (9)], conforme proposto por CATALDI <i>et.at.</i> , 2005	55	
Figura 6.7	Mecanismo de clivagem dos anéis E e F da aglicona esteroidal do tipo espirossolano tomatidina [SCFI - 1 (9)] proposto por Cataldi <i>et.at.</i> , 2005. Reação de eliminação para a perda de 143Da. A perda neutra de	_	
Figura 6.8	H_2O também está ilustrada (m/z 273 \rightarrow 255) Mecanismos que racionalizam a formação de m/z 273 e 161, no espectro CID da tomatidina (9) SCFI – 1	56 57	
Figura 6.9	Mecanismo proposto para a perda neutra de água (18 Da) no anel E: característica dos alcaloides esteroidais da classe dos espirossolanos	58	
Figura 6.10	Mecanismo proposto para a perda dos anéis E e F (143 Da): característica dos alcaloides esteroidais da classe dos espirossolanos	59	
Figura 6.11	Mecanismo dirigido por carga: proposta para a formação do fragmento de m/z 147	60	
Figura 6.12	Via de fragmentação proposta para SCFI - 1 (m/z 416,3532) mostrando seus principais íons produtos	63	
Figura 6.13	Via de fragmentação proposta para SCFI - 2 e SCFI - 3 (m/z 415,3676) mostrando seus principais íons produtos	64	
Figura 6.14	Via de fragmentação proposta para SCFI - 4 (m/z 414,3378) mostrando seus principais íons produtos	65	
Figura 6.15	Via de fragmentação proposta para SCFI - 5 (m/z 412,3320) mostrando seus principais íons produtos	65	
Figura 6.16	Via de fragmentação proposta para SCFM - 1 (<i>m/z</i> 443,3705) mostrando seus principais íons produtos	66	

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4.1	Obtenção dos extratos	18
Esquema 4.2	Procedimento experimental para extração de alcaloides do extrato	
	EME e EHE dos frutos imaturos de S. caavurana	20
Esquema 4.3	Cromatografia em Coluna (CC) em alumina do extrato SCFIMPA -	
	agrupamento das frações	22
Esquema 4.4	Cromatografia em Coluna (CC) em alumina do extrato SCFIMPA	
	F.110 – 145. Agrupamento das frações	24
Esquema 4.5	Agrupamento das frações cromatografia em coluna (CC) em gel de	
	sílica do extrato SCFIMFN	26
Esquema 4.6	Agrupamento das frações cromatografia em Coluna (CC) em gel de	
	sílica do extrato SCFIMFN	27
Esquema 4.7	CCDP da SCFIMFN F.31(13) da extração de alcaloides dos frutos	
	imaturos de S. caavurana	28
Esquema 4.8	CCDP da SCFMDFA da extração de alcaloides da fração CH ₂ Cl ₂ dos	
	frutos maduros de S. caavurana	29
Esquema 4.9	Cromatografia em coluna rápida (CCFlash) da SCFMDFN	
	agrupamento das frações	30
Esquema 4.10	CCDP da SCFMDFN F.59 - 66 da extração de alcaloides da fração	
	CH_2Cl_2	30
Esquema 4.11	Cromatografia em Coluna Rápida (CCFlash) da fração SCFMFINS.	
	Agrupamento das frações	31
Esquema 4.12	Fluxograma do procedimento de obtenção dos extratos para análise de	
	desreplicação	33
Esquema 6.1	Proposta para obtenção dos 3-N-formilaminoespirossolanos nas	
	configurações 3α e 3β a partir dos 3-aminoespirossolanos (3α e 3β)	5 0
	isolados.	50

LISTA DE ESPECTROS

Espectro EI.1	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto SCFI - 1	94
Espectro EI.2	Espectro de RMN de ¹³ C com ampliação (125 MHz, CDCl ₃) do	94
-	composto SCFI - 1	
Espectro EI.3	Espectro de DEPT 135 (125 MHz, CDCl ₃) do composto SCFI - 1	95
Espectro EII.1	Espectro de RMN de ¹ H (200MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 2	95
Espectro EII.2	Espectro de RMN de ¹³ C (50MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 2	96
Espectro EII.3	Espectro de DEPT 135 ¹³ C (50MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 2	96
Espectro EIII.1	Espectro de RMN de ¹ H (200MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 3	97
Espectro EIII.2	Espectro de RMN de ¹³ C (50MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 3	97
Espectro EIII.3	Espectro de DEPT 135 ¹³ C (50MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 3	98
Espectro EIV.1	Espectro de RMN de ¹ H (200MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 4	98
Espectro EIV.2	Espectro de RMN de ¹³ C (50MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 4	99
Espectro EIV.3	Espectro de DEPT 135 (50MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 4	99
Espectro EV.1	Espectro de RMN de ¹ H (400MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 5	100
Espectro EV.2	Espectro de RMN de ¹³ C (100MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 5	100
Espectro EV.3	Espectro de DEPT 135 (100MHz em CDCl ₃) da amostra SCFI - 5	101
Espectro EVI.1	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 1	101
Espectro EVI.2	Espectro de RMN de ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 1	102
Espectro EVI.3	Espectro de DEPT 135 (100MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 1	102
Espectro EVI.4	Mapa de correlação NOESY 2D da substância SCFM - 1	103
Espectro EVI.5	Espectro de infravermelho IV (KBr) da substância SCFM - 1	103
Espectro EVII.1	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 1	104
	obtida por via química a partir de SCFI - 3	
Espectro EVII.2	Espectro de RMN de ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 1	104
	obtida por via química a partir de SCFI - 3	
Espectro EVIII.1	Espectro de RMN de ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 2	105
Espectro EVIII.2A	Espectro de RMN de ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) da substância SCFM - 2	106
Espectro EVIII.2B	Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) da	107
	substância SCFM - 2	
Espectro EVIII.3	Mapa de correlação HMBC da substância SCFM - 2	108
Espectro EVIII.4A	Mapa de correlação HSQC da substância SCFM - 2	109
Espectro EVIII.4B	Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância SCFM - 2	110
Espectro EM.1	Espectro de massas full scan do composto SCFI - 1	111
Espectro EM.2	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 416) para o composto SCFI - 1	112
Espectro EM.3	Espectro de massas full scan do composto SCFI - 2	113
Espectro EM.4	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 415) para o composto SCFI - 2	114
Espectro EM.5	Espectro de massas full scan do composto SCFI - 3	115
Espectro EM.6	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 415) para o composto SCFI - 3	116
Espectro EM.7	Espectro de massas full scan do composto SCFI - 4	117
Espectro EM.8	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 414) para o composto SCFI - 4	118
Espectro EM.9	Espectro de massas full scan do composto SCFI - 5	119
Espectro EM.10	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 412) para o composto SCFI - 5	120
Espectro EM.11	Espectro de massas full scan do composto SCFM - 1	121
Espectro EM.12	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 443) para o composto SCFM - 1	122
Espectro EM.13	Espectro de massas full scan do composto SCFM - 2	123
Espectro EM.14	Espectro ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 428) para o composto SCFM - 2	124

Espectro EM.15	Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos	125
	imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.16	Ampliação do espectro de massas full scan do extrato	126
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.17	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato	127
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.18	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 412) proveniente do extrato	128
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.19	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 414) proveniente do extrato	129
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.20	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 415) proveniente do extrato	130
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.21	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 416) proveniente do extrato	131
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.22	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato	132
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.23	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 443) proveniente do extrato	133
	hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.24	Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos	134
	maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.25	Ampliação do espectro de massas full scan do extrato	135
	hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.26	Ampliação do espectro de massas full scan do extrato	136
	hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.27	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato	137
	hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.28	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 412) proveniente do extrato	138
	hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.29	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 415) proveniente do extrato	139
	hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.30	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato	140
	hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.31	Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico das folhas de	141
	Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.32	Ampliação do espectro de massas full scan do extrato	142
	hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.33	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato	143
	hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.34	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 410) proveniente do extrato	144
	hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.35	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 411) proveniente do extrato	145
	hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.36	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato	146
	hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.37	Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico do tronco de	147
	Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.38	Ampliação do espectro de massas full scan do extrato	148
	hidrometanólico do tronco de <i>Solanum cagyurana</i> Vell	

Espectro EM.39	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato	149
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.40	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 412) proveniente do extrato	150
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.41	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 413) proveniente do extrato	151
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.42	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 414) proveniente do extrato	152
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.43	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 415) proveniente do extrato	153
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.44	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato	154
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.45	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 444) proveniente do extrato	155
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.46	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 578) proveniente do extrato	156
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.47	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 726) proveniente do extrato	157
	hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.	
Espectro EM.48	Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 740) proveniente do extrato	158
	hidrometanólico do tronco de <i>Solanum caavurana</i> Vell.	

RESUMO

O estudo químico realizado em frutos maduros e imaturos de *Solanum caavurana* Vell. resultou no isolamento de sete substâncias, todas pertencentes a classe dos alcaloides esteroidais e com esqueleto do tipo espirossolano. Os compostos **SCFI - 1**, **SCFI - 2**, **SCFI - 3**, **SCFI - 4** e **SCFI - 5** foram obtidos tanto de frutos maduros quanto de frutos imaturos, enquanto **SCFM - 1** e **SCFM - 2** só foram isolados a partir do fracionamento dos extratos oriundos de frutos maduros desta espécie.

Seis compostos tiveram suas estruturas determinadas principalmente pela análise dos espectros de RMN de 13 C aliado ao espectro de DEPT 135 e aos experimentos bidimensionais HMBC e HSQC quando necessário. O alcaloide esteroidal caavuranamida (**SCFM - 1**) é inédito na natureza e teve sua estereoquímica relativa determinada após o exame do espectro de NOESY 2D e experimentos de α_D .

Neste trabalho também foi possível obter o composto inédito **SCFM - 1** a partir da transformação química de **SCFI - 3** (um 3-aminoespirossolano considerado raro no gênero *Solanum*) para realizar estudos de RMN e de fragmentação pela técnica de ESI-MS/MS.

Estudos de fragmentação utilizando técnicas modernas de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) foram realizados e mecanismos de fragmentação foram propostos para todos os alcaloides esteroidais isolados, propondo-se fragmentos característicos para identificar a classe dos espirossolanos.

Até onde conhecemos, com exceção de **SCFI - 1**, não há relatos na literatura de estudos de fragmentação para nenhum dos espirossolanos isolados neste trabalho. Além disso, foi possível identificar a presença de **SCFM - 1** no extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de *S.caavurana* sem a necessidade de seu isolamento, apenas utilizando a técnica de ESI-MS/MS.

Além disso, foi possível identificar a presença de **SCFM** - **1** no extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de *S.caavurana* sem a necessidade de seu isolamento, apenas utilizando a técnica de ESI-MS/MS com infusão direta dos extratos na fonte de ionização. Este resultado ilustra a alta produtividade e simplicidade características da técnica. No entanto foram observadas algumas limitações, mais especificamente os dois isômeros **SCFI** - **2** e **SCFI** - **3** não puderam ser diferenciados nem localizados nos extratos utilizando esta técnica de *screening* rápido, uma vez que possuem as mesmas massas exatas e perfil de fragmentação semelhante. Desta maneira faz-se necessária a utilização de

um processo prévio de separação cromatográfica tal como CLAE para auxiliar a identificação e caracterização das outras substâncias nos demais extratos.

Outras duas espécies também foram coletadas: *Solanum scuticum* M Nee (*S. tabacifolium* Dunal.) e *Solanum diploconos* (Mart.) Bohs. (*Cyphomandra diploconos*) que tiveram seus extratos brutos (e algumas frações obtidas da extração para alcaloides), avaliados quanto as suas atividades antimicrobiana e antiproliferativa *in vitro*, juntamente com aqueles oriundos de *S. caavurana*, obtendo alguns resultados promissores, até mesmo superiores quando comparadas ao padrão positivo empregado. Além disso, os extratos e subfrações provenientes de troncos, folhas, frutos maduros e imaturos de *S. caavurana* foram avaliados para atividade antileprótica no sentido de verificar o relato de seu uso etnofarmacológico desta espécie para o tratamento da hanseníase.

PALAVRAS CHAVE: *Solanum caavurana*, *S. scuticum* (*S. tabacifolium*), *S. diploconos* (*Cyphomandra diploconos*), alcaloides esteroidais, espectrometria de massas (ESI-MS e ESI-MS/MS), mecanismos de fragmentação.

ABSTRACT

The phytochemical study was performed on ripe and unripe fruits of *Solanum* caavurana Vell. It resulted on the isolation of seven steroidal alkaloids with spirosolane type skeleton.

The compounds **SCFI** - **1**, **SCFI** - **2**, **SCFI** - **3**, **SCFI** - **4** e **SCFI** - **5** were obtained from ripe and unripe fruits while **SCFM** - **1** e **SCFM** - **2** were just found on the ripe ones. Among these, six compounds have their structures fully elucidated mainly on 13 C NMR and DEPT 135 spectra analysis. HMBC and HSQC techniques were used just when was necessary. The steroidal alkaloid caavuranamide (**SCFM** - **1**) that is new on the genera has your absolute stereochemistry assigned after analyzed the NOESY 2D spectra and α_D experiment.

On this work it was also possible to obtain the caavuranamide (SCFM - 1) directly from the chemical reaction of the rare 3 β -aminospirosolane SCFI - 3 to accomplish complete NMR assignments and ESI-MS/MS fragmentation patterns.

Fragmentation studies using modern mass spectrometry techniques with eletrospray ionization as ESI-MS/MS were performed. With this approach it was possible to propose fragmentation pathways and mechanisms for all isolated steroidal alkaloids, identifying the main reactions involved and the characteristic fragments for the spirosolane type skeleton.

To the best of our knowledge with the exception of **SCFI - 1**, there are no reports on the fragmentation studies of none isolated spirosolanes on this work. Thus, it was also possible to identify **SCFM - 1** in the hydrometanolic extracts of unripe fruits of *S. caavurana* without the need of its isolation, just using the ESI-MS/MS approach.

Besides, it was also possible to identify **SCFM** - **1** in hydromethanolic extract of *S.caavurana* unripe fruits without isolation, just using direct injection analysis of the extracts on ESI-MS/MS source. This result illustrates the high productivity and the simplicity of the technique. However some limitations were found, more specifically the two isomers **SCFI** - **2** and **SCFI** - **3** could not be differentiated nor localizated on other extracts using this fast screening technique, since they posses the same accurate mass and similar fragmentation pattern. This way previously chromatographic purification step as HPLC for instance is needed to aid the identification and characterization of other compounds on other extracts.

Other two species were collected: *Solanum scuticum* M Nee (*S. tabacifolium* Dunal.) e *Solanum diploconos* (Mart.) Bohs. (*Cyphomandra diploconos*) which had their

crude extracts (and some fractions obtained from acid-base treatment), evaluated for their antimicrobial and antiproliferative activities *in vitro*, together with those obtained from *S. caavurana*, getting some promising results even higher when compared to the positive control. In addition, extracts and sub fractions from *S. caavurana* trunks, leaves, ripe and unripe fruits, were evaluated for antileprotic activity in order to verify the reports of its ethnopharmacological use for the treatment of leprosy.

KEY WORDS: *Solanum caavurana*, *S. scuticum* (*S. tabacifolium*), *S. diploconos* (*Cyphomandra diploconos*), steroidal alkaloids, mass spectrometry (ESI-MS e ESI-MS/MS), fragmentation patterns.

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase, também conhecida como mal de Hansen ou lepra, é uma doença infecciosa e contagiosa, não hereditária, provocada pelo *Mycobacterium leprae*, e sua evolução depende de características do sistema imunológico da pessoa que foi infectada (PENNA *et.al.*, 2005). Por isso, considera-se que o *M. leprae* não é muito patogênico e que a maioria das infecções não resulta em sintomas (VISSCHEDIJK *et.al.*, 2000). O Mal de Hansen é uma doença que tem cura, mas, quando não tratada, pode causar incapacidades e deformidades. Atualmente o tratamento é baseado na utilização de diversos princípios ativos que estagnam a doença e impedem que as sequelas e sintomas apareçam (BVS-MS, 2007).

O doutor norueguês Gerard Hansen é o responsável pela identificação do agente etiológico desta enfermidade que afeta principalmente o Sistema Nervoso Periférico, compreendendo os nervos superficiais e a pele dos seres humanos. O termo "lepra" foi utilizado durante séculos para denominar diversos tipos de doenças dermatológicas de várias origens e gravidades. Durante muitos anos, esta doença foi considerada incurável e mutiladora, forçando o isolamento de seus pacientes em leprosários, principalmente na Europa durante a Idade Média, onde os doentes eram obrigados a tocarem sinos para anunciar sua presença (BARBOSA-FILHO *et.al.*, 2007). Ainda no final do século XX tratou-se de uma doença endêmica em muitos países em desenvolvimento, afetando as parcelas mais pobres de suas populações, causando marcas profundas e sofrimentos, psicológico e social aos pacientes (VISSCHEDIJK *et.al.*, 2000).

A hanseníase ainda permanece como um problema de saúde pública em muitos países e é alvo de descaso público, contando com recursos reduzidos e pouco investimento em pesquisas para sua erradicação, o que a caracteriza como uma Doença Tropical Negligenciada (ALENCAR *et.al.*, 2012). Estima-se que mais de 5 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *M. leprae*, sendo mais frequente a ocorrência de casos da doença na Ásia, África, América Latina e ilhas do Pacífico (BARBOSA-FILHO *et.al.*, 2007).

Todos os anos são diagnosticados novos casos de lepra em mais de meio milhão de pessoas, além dos milhões que já sofrem de alguma forma com as sequelas desta doença (VISSCHEDIJK *et.al.*, 2000). Depois da Índia, o Brasil é o país que tem o maior número de casos de lepra no mundo, com quase 38.000 novos casos diagnosticados em 2009,

número este que representa 98% do total de todos os novos casos desta doença em todo continente Americano (ALENCAR *et.al.*, 2012).

O tratamento, denominado de poliquimioterapia (PQT), é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e se dá por via oral, constituindo-se pela associação dos princípios ativos (1 - 4), em combinações e proporções específicas, dependendo do estágio da doença (BVS-MS, 2007). A PQT foi introduzida mundialmente em 1982 e seu uso no tratamento da hanseníase consiste na aplicação de quatro drogas, que são: dapsona (1), rifampicina (2), clofazimina (3) e etionamida (4) (NAAFS, 2006).

Dentre estas se destaca a rifampicina (2) que é um macrolídeo semi-sintético obtido a partir de precursor isolado de *Nocardia mediterranei* (Nocardiaceae) e é um dos antibióticos mais eficazes contra o *M. leprae*. Sua atividade é maior que qualquer droga ou qualquer combinação com aplicação antileprótica conhecida (BARBOSA - FILHO *et.al.*, 2007).

Porém com a implantação da PQT para o tratamento da hanseníase, ocorreu um aumento na incidência de reações adversas nos pacientes a ele submetido, acarretando uma preocupação mais acentuada dos médicos em relação aos seus pacientes (ENNES, 1993). O acesso à informação sobre o diagnóstico e tratamento poliquimioterápico é um dos elementos chave na estratégia de eliminação desta doença como um problema de saúde

pública onde se busca atingir menos de 1 caso de lepra em 10.000 da população (WHO, 2008).

No Brasil, o tratamento terapêutico mais tradicionalmente empregado para todas as doenças existentes desde o tempo da colonização, foi baseado em plantas medicinais com ampla influência da medicina indígena. No século XIX os índios do Amazonas empregaram no tratamento de hanseníase (lepra) e outras doenças da pele, o óleo extraído de muitas plantas da família Flacourtiaceae como: *Carpotroche brasiliensis*, *Lindackeria maynensis* e *Mayna odorata*, as quais foram estudadas por vários médicos que as consideraram como um verdadeiro milagre da natureza para aquele tempo (BARBOSA-FILHO *et.al.*, 2007).

A utilização de plantas medicinais é uma prática comum entre as populações. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial recorrem às medicinas tradicionais para atender suas necessidades primárias de assistência médica (VENDRUSCOLO *et.al.*, 2006, BARBOSA-FILHO, 1997). Logo, estudos aliando a etnobotânica com a etnofarmacologia são importantes especialmente no Brasil, uma vez que seu amplo território abriga uma das floras mais ricas e exuberantes do globo. Isto aliado ao fato de que 99,6% desses exemplares vegetais ainda não possuem estudo químico relatado (FONSECA-KRUEL *et.al.*, 2004), reforça a necessidade crescente pela busca de metabólitos bioativos que possam estar presentes nesses organismos com relativa urgência, uma vez que, com as constantes queimadas e desmatamentos crescentes estes, poderão ser fadados à extinção.

A preservação da sabedoria popular é de igual importância como uma forma de proteger principalmente o conhecimento das comunidades, que participam fornecendo dados importantes guiando novas descobertas científicas. Aliado às pesquisas acadêmicas estas informações podem originar novos conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas das plantas e também aplicações diferenciadas para as mesmas (VENDRUSCOLO *et.al.*, 2006).

Conhecida popularmente como "jurubeba-branca", *Solanum caavurana* Vell. pertence à família Solanaceae. Suas raízes e folhas são empregadas na medicina popular, geralmente em substituição às de *Solanum paniculatum* L. (a "jurubeba verdadeira" da Farmacopeia Brasileira), cujas raízes, caules e frutos são indicados contra anemias, desordens do fígado e também como digestivo (NURIT-SILVA *et.al.*, 2009). Também é atribuído para *S. caavurana*, o uso etnofarmacológico como combatente ao mal de Hansen (CORRÊA, 1984).

Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa com os frutos maduros desta espécie resultou no isolamento de alcaloides esteroidais do tipo espirosolano (5 - 7) em quantidades mínimas que impossibilitaram qualquer análise de atividade biológica dos mesmos (VAZ, 2008).

A exploração de fontes medicinais promissoras como essa, requer a união de estudos etnobotânico, etnofarmacológico, químico, biológico, farmacológico e toxicológico, como os propostos neste trabalho.

1.1 A Família Solanaceae

Solanaceae é uma das maiores famílias entre as Angiospermas, com cerca de 2.300 espécies subordinadas a 96 gêneros. Apresenta ampla distribuição geográfica (**Figura 1.1**) e está concentrada principalmente na América do Sul, onde há um grande centro de diversidade (SOARES *et.al.*, 2007) e a presença de aproximadamente 50 gêneros endêmicos. Segundo busca na literatura, para o Brasil não existe nenhuma avaliação recente no que diz respeito à diversidade de espécies desta família, porém no início deste século foram reconhecidos 27 gêneros para o Brasil, com base em pesquisas bibliográficas e visitas aos herbários (CARVALHO *et.al.*, 2006).

Muitas Solanáceas são endêmicas ao país e amplamente estudadas devido a sua indiscutível importância econômica mundial. Possui como principais representantes: a

batata - *Solanum tuberosum* (DISTL *et.al.*, 2009; SHAKYA *et.al.*, 2008; JENSEN *et.al.*, 2008; FRIEDMAN, 2004); a berinjela - *S. melongena* L. (GONÇALVES *et.al.*, 2006a e 2006b; BRIETZIG *et.al.*, 2004); os tomates - *Lycopersicon* spp. (FRIEDMAN *et.al.*, 2009 e 2004; NOGUCHI *et.al.*, 2006; YAHARA *et.al.*, 2004); as jurubebas - *S. paniculatum*, *S. asterophorum*, etc... (BHATTACHARYYA *et.al.*, 2009; SILVA *et.al.*, 2007); o joá-bravo (*S. aculeastissimum*); a erva moura (*S. americanum*); o tomatinho (*S. diflorum*); pimentas verdes e vermelhas (*Capsicum* spp.); inclusive plantas ornamentais como as petúnias (*Petúnia* spp.) e os jasmins (*S. jasminoides*). Também compreende o tabaco (*Nicotiana* spp.) – uma das plantas mais nocivas, porém economicamente mais importantes do mundo – juntamente com muitas outras plantas de valor toxicológico e medicinal como a beladona (*Atropa belladona* L.) (EDMONDS *et.al.*, 1997).

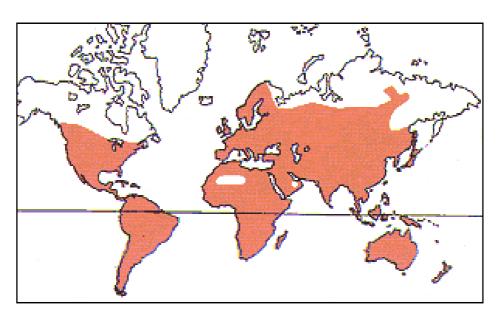


Figura 1.1 Mapa de distribuição mundial da família Solanaceae. (Fonte: Site *The Solanaceae Source*, acessado em 22.11.2008)

As plantas da família Solanaceae são fontes abundantes de metabólitos secundários bioativos, como os alcaloides tropânicos (GRIFFIN, 2000) e piridínicos (CHENG *et.al.*, 2008), witanolidas (DINAN *et.al.*, 2001), ecdisteroides, sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcaloides (FRIEDMAN, 2004), alcaloides esteroidais (WEISSENBERG, 2001; USUBILLAGA *et.al.*, 1997; RIPPERGER *et.al.*, 1997), alcaloides do tipo pirrol (SAYED *et.al.*, 1998), flavonoides (CORNELIUS, 2004; ESTEVES-SOUZA *et.al.*, 2002), esteroides (SAEZ *et.al.*, 1998), saponinas (ZHOU *et.al.*, 2006), sapogeninas esteroidais (WEISENBERG, 2001; USUBILLAGA *et.al.*, 1987), alcamidas (SILVA *et.al.*, 2002),

glicosídeos esteroidais (ONO *et.al.*, 2009; YOSHIMITSU *et.al.*, 2003; YE *et.al.*, 2001) e até mesmo antraquinonas encontradas em menor quantidade (WINK, 2003).

1.2 O Gênero Solanum

O principal gênero da família Solanaceae é o gênero *Solanum* (**Figura 1.2**), considerado um dos mais amplos e complexos entre as Angiospermas, sendo constituído por cerca de 1500 espécies e pelo menos 5000 epítetos já descritos (SILVA *et.al.*, 2005). Este gênero é bem representado no Brasil com cerca de 350 espécies (SILVA *et.al.*, 2008) e é amplamente distribuído do Norte ao Sul em vários tipos de ecossistemas (SILVA *et.al.*, 2005).

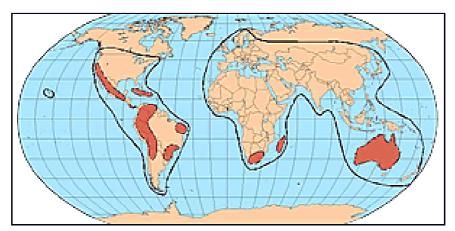


Figura 1.2 Mapa de distribuição do gênero *Solanum* ao redor do mundo. (Fonte: Site *The Solanaceae Source*, acessado em 22.11.2008)

Observando o mapa da **Figura 1.2**, destacam-se duas grandes áreas de distribuição de espécies de *Solanum* no Brasil, uma no Nordeste e outra localizada na região Sul. No Nordeste brasileiro segundo dados recentes, o gênero é representado por cerca de 80 espécies, incluindo 32 que são endêmicas ao país e 20 que são endêmicas à região Nordeste do Brasil (SILVA *et.al.*, 2005). Para o Rio Grande do Sul, são relatadas 61 espécies nativas de *Solanum* (MENTZ *et.al.*, 2007) considerando aquelas que estavam classificadas como pertencentes ao gênero *Cyphomandra* (Solanaceae) e que agora pertencem ao gênero *Solanum* (SOARES *et.al.*, 2006).

1.2.1 Principais Metabólitos Secundários de Solanum

Os metabólitos secundários desempenham papéis importantes na bioquímica e fisiologia dos vegetais. Muitas classes de produtos naturais constituem grupos importantes, estando envolvidos em muitos processos fisiológicos de plantas, particularmente naqueles que respondem ao estímulo ambiental. É importante ressaltar que em espécies de importância agrícola, como por exemplo, a batata *S. tuberosum*, a composição de metabólitos secundários nos tecidos da planta pode influenciar diretamente sobre a qualidade e toxicidade dos alimentos produzidos para humanos e animais (STOBIECKI *et.al.*, 2003).

As plantas do gênero *Solanum* produzem uma variedade de metabólitos secundários, dentre os quais os alcaloides esteroidais (8 - 13), constituem o grupo principal. Estes são de amplo interesse, tanto na área de ecologia como de saúde humana.

Na natureza, eles são componentes importantes para o "armamento químico" da planta contra herbívoros e outras pragas (FUKUHARA *et.al.*, 2004), tanto que estudos

recentes relatam a utilização de algumas espécies de *Solanum*, como fontes potenciais e naturais de resistência contra o ataque do microrganismo *Ralstonia solanacearum*, que ocasiona enfraquecimento às plantações (SIRI *et.al.*, 2009). Este fato é bastante interessante uma vez que os agroquímicos convencionais muitas vezes são ineficientes e nocivos à saúde animal e/ou humana.

As plantas do gênero *Solanum* também são conhecidas por produzirem uma grande variedade de saponinas (NAKAMURA *et.al.*, 2008; ZHOU *et.al.*, 2006; BENTO *et.al.*, 2004), sapogeninas (WEISSENBERG, 2001; VALERI *et.al.*, 1989; USUBILLAGA *et.al.*, 1987), glicoalcaloides (DISTL *et.al.*, 2009; SILVA *et.al.*, 2008; HALL *et.al.*, 2006) e flavonoides (SILVA, *et.al.*, 2009; SILVA *et.al.*, 2003).

Estudos pioneiros centraram a atenção no isolamento e caracterização da solasodina (8), visando sua utilização como material de partida na produção industrial de hormônios esteroidais (FIESER, 1959). Tanto que alguns autores a reconhecem como "diosgenina (14) do futuro" (BARBOSA-FILHO, 1997; BARBOSA-FILHO *et.al.*, 1991).

Os glicoalcaloides já foram detectados em mais de 350 espécies de plantas, a maioria em *Solanum* spp. ou outros membros da família Solanaceae. São conhecidas mais de 75 estruturas de agliconas (alcaminas) de ocorrência natural, e esqueleto colestano (C₂₇) contendo nitrogênio em anéis ou em grupos que lhes confiram basicidade e alguma atividade biológica (SILVA *et.al.*, 2005).

Estudos recentes relatam a inativação do vírus *Herpes simplex* e a inibição de crescimento de fungos (FENNER *et.al.*, 2006; CIPOLLINI *et.al.*, 1997) pelos glicoalcaloides encontrados no gênero. Mais especificamente, os glicoalcaloides derivados da solasodina (8) e tomatidina (9) são efetivos clinica e histologicamente, no tratamento de tumores da pele (USUBILLAGA *et.al.*, 1997) e outros tipos de cânceres tais como mama, cólon, fígado e estômago (FRIEDMAN *et.al.*, 2009; KODORU *et.al.*, 2007).

Outras atividades para extratos de exemplares do gênero *Solanum* também são avaliadas *in vitro*, tais como: tripanossomicida (CHATAING *et.al.*, 1998; ABDEL-SATTAR *et.al.*, 2009), alelopática (ALVES *et.al.*, 2003), moluscicida (SILVA *et.al.*, 2008, 2006 e 2005; WANYONYI *et.al.*, 2002), larvicida (CHOWDHURY *et.al.*, 2008 e 2007), repelente (RAJKUMAR *et.al.*, 2005), antinociceptiva (BENTO *et.al.*, 2004), hipolipemiante (GONÇALVES *et.al.*, 2006b), antimicrobiana, antiviral, citotóxica, antifúngica (FENNER *et.al.*, 2006; CIPOLLINI *et.al.*, 1997), imunossecretora, antioxidante (SABIR *et.al.*, 2008), analgésica, anti-inflamatória (EMMANUEL *et.al.*, 2006; HERRERA-SALGADO *et.al.*, 2005), cardiovascular, agregação plaquetária, antiasmática (VADNERE *et.al.*, 2008), antiulcerogênica (NGUELEFACK *et.al.*, 2008), antitumoral (KODORU *et.al.*, 2007), hepatoprotetora (SABIR *et.al.*, 2008) entre outras.

Estes relatos demonstram a importância deste gênero na medicina popular, onde muitas de suas espécies ainda podem ser estudadas para a descoberta de novos compostos bioativos. Tanto que esforços consideráveis estão sendo gastos por muitos centros de pesquisa ao redor do globo no isolamento de produtos naturais bioativos, de organismos terrestres e marinhos, macro- e microrganismos (LANG *et.al.*, 2008).

1.3 Técnicas Hifenadas Atuais e a Descoberta de Novos Produtos Naturais

Com os avanços nas indústrias farmacêutica e agroquímica, observa-se uma crescente necessidade de identificação de compostos ativos em extratos complexos (WOLF et.al., 2007). Este fato aliado à imensa gama de atividades biológicas previamente descritas especificamente para os extratos oriundos de espécies vegetais (inclusive aquelas pertencentes ao gênero *Solanum*) demonstram a importância que os produtos naturais possuem na descoberta e no desenvolvimento de novas moléculas químicas para serem usadas como materiais de partida para a síntese de drogas cada vez mais específicas e eficientes.

Há relatos referentes a duas vertentes principais para a descoberta de novos produtos naturais: O fracionamento biomonitorado e o *screening* de compostos puros (WOLF *et.al.*, 2007).

A primeira proposta trata-se do fracionamento biomonitorado, uma metodologia convencional (clássica) que promove o ensaio de vários extratos, seguido do fracionamento cromatográfico daquele que se mostrou mais promissor para determinada atividade. Esta metodologia envolve a extração de quantidades significativas de material vegetal e um extensivo trabalho cromatográfico, conduzindo aos compostos puros bioativos, que são

caracterizados posteriormente por diversas técnicas instrumentais (WOLF *et.al.*, 2007). Contudo o isolamento de compostos já conhecidos após dispendioso trabalho fitoquímico ainda é bastante comum quando se adota esta metodologia e caracteriza um problema comum e constante em alguns centros de pesquisa da área.

Desta forma a utilização da segunda vertente também conhecida como técnica de Mapeamento Fitoquímico (ou Desreplicação) pode ser bastante vantajosa, pois promove redução na mão de obra envolvida, diminuição do consumo de tempo e de insumos despendidos nas análises, bem como nos processos tediosos de redescoberta de compostos previamente conhecidos (ZHOU *et.al.*, 2008; LANG *et.al.*, 2008; MITOVA *et.al.*, 2008). Desta maneira a desreplicação é tida como um pré-requisito necessário para a descoberta de novos produtos naturais que sejam potencialmente bioativos (SMYTH *et.al.*, 2012).

Entende-se como desreplicação o processo para identificação de produtos naturais previamente conhecidos, evitando o trabalho repetitivo de isolamento dos mesmos (WOLF *et.al.*, 2007), em extratos que contenham compostos interferentes, ou metabólitos secundários previamente conhecidos (LANG *et.al.*, 2008). Desta forma, fazendo-se uso de uma biblioteca de dados de compostos puros de interesse, é possível identificá-los em outros extratos. Além disso, esta metodologia pode ser utilizada para efetuar a proposta estrutural de substâncias ainda desconhecidas (WOLF *et.al.*, 2007), com grande homologia estrutural.

Trata-se de uma proposta bastante vantajosa por permitir não somente a identificação de substâncias já conhecidas como também a localização de compostos desconhecidos em extratos diferentes. Essa informação pode ser muito útil, uma vez que permite com que: (i) se faça uma lista de prioridades para o fracionamento biomonitorado convencional; (ii) haja a identificação do princípio ativo pela simples comparação com extratos ativos e inativos e, (iii) efetuar o screening de compostos puros (WOLF et.al., 2007).

Existem inúmeros avanços baseados em técnicas hifenadas que auxiliam a desreplicação, e cada uma dessas possuem vantagens próprias em ganho de sensibilidade, resolução ou escala. Os métodos mais comuns consistem primeiramente na separação e identificação completa de cada metabólito para a construção de uma biblioteca (base de dados). Técnicas tais como CL-UV, CL-EM, CL-EM/EM bem como suas combinações e o desenvolvimento de sondas capilares e criogênicas para RMN (LANG *et.al.*, 2008; MITOVA *et.al.*, 2008) trouxeram grandes avanços nesta área. Como notado, a etapa de separação é dominada pelas técnicas cromatográficas e para a etapa de identificação

prevalece o uso de métodos espectroscópicos e espectrométricos, tais como a espectrometria de massas (EM) como proposto neste trabalho.

Nos últimos anos, tem-se mostrado que a cromatografia líquida (CL) acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) é uma ferramenta poderosa para separar e identificar produtos naturais (TAKEARA *et.al.*, 2007; SHAKYA *et.al.*, 2008). Os métodos de desreplicação baseados no uso de CL-EM e CL-EM/EM em especial, são muito sensíveis e fornecem informações estruturais, massas moleculares de baixa ou alta resolução, fórmulas moleculares, entre outros (LANG *et.al.*, 2008) sem a necessidade de isolamento dos compostos em todos os extratos estudados. Os mecanismos de fragmentação obtidos e os cálculos das fórmulas empíricas podem ser utilizados em conjunto com outras técnicas analíticas disponíveis (tais como o HPLC-DAD) para identificação de novos compostos (ZHOU *et.al.*, 2008).

Contudo, a elucidação estrutural de compostos naturais em misturas complexas tem sido possível pela injeção direta de extratos brutos (DIMS) na fonte de ionização nos espectrômetros de massas sequenciais (ESI-MS/MS), utilizando pequenas quantidades de material botânico (FREDENHAGEN et.al., 2005; MAURIN et.al., 2003). Mais recentemente, investigações sistemáticas relacionadas ao mecanismo de fragmentação de produtos naturais para seu mapeamento têm sido útil para estudo de plantas (PIVATTO et.al., 2005). Estas abordagens constituem ferramentas analíticas importantes para screening rápido e determinação estrutural de produtos naturais, que podem auxiliar na busca de novas drogas para o Mal de Hansen.

Estes avanços estabeleceram a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) e posteriormente a cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massas sequenciais (CL-EM/EM) como métodos de rotina mais adequados e elucidativos para o estudo de metabolismo de drogas (OLIVEIRA *et.al.*, 2000). O diferencial no emprego de técnicas hifenadas, tais como a ESI-MS/MS é que esta permite realizar análises de moléculas polares sem a necessidade de processos de derivatização (OLIVEIRA *et.al.*, 2000) como usualmente necessário nas análises em CG-EM. Além disso, é possível obter informações estruturais valiosas a partir dos íons fragmentos gerados de íons precursores, fundamentais para a identificação *on line* ou para mapeamento de substâncias conhecidas (WARIDEL *et.al.*, 2001). Todas essas vantagens elegeram o sistema CLAE-EM/EM como uma das mais importantes ferramentas para os estudos de metabolismo de fármacos e de matrizes biológicas como, por exemplo, extratos vegetais.

Dentro desse contexto, o presente trabalho vem contribuir com o estudo químico de *Solanum caavurana* Vell., isolando e identificando seus principais metabólitos secundários, os alcaloides esteroidais, com estudos de fragmentação de massas desses compostos e colaborando com estudos de atividade biológica para o tratamento da Hanseníase.

1.4 Espécies Vegetais em Estudo

Informações referentes às espécies vegetais contempladas neste estudo constam na **Tabela 1.1**, sendo que o estudo fitoquímico foi realizado somente para os frutos maduros e imaturos de *S. caavurana*. As demais partes da planta e outras espécies tiveram apenas seus extratos preparados, os quais foram utilizados para o início do estudo de mapeamento fitoquímico por ESI-MS/MS.

Tabela 1.1 Espécies vegetais disponíveis para estudo de mapeamento fitoquímico

Espécie Vegetal	Parte Coletada	Local de Coleta	Estudo Químico	Atividades biológicas descritas	Descrições Botânicas	
	Frutos Maduros Frutos Imaturos	PEVR – Fênix / PR PEVR – Fênix / PR	VAZ et.al., 2012. BARBOSA- FILHO et.al., 1991.	NURIT-SILVA et.al., 2009. CORRÊA, 1984.	REITZ, 1966. NURIT-SILVA	
S. caavurana	Folhas	PEVR – Fênix / PR	ne		et.al., 2009. MENTZ et.al., 2004.	
	Tronco	PEVR – Fênix / PR	ne		2004.	
S. scuticum (S.tabacifolium)	Frutos Imaturos	UNICAMP	ne	ne	NEE et.al., 2006. CARVALHO et.al., 2006. MENTZ et.al., 2004.	
S. diploconos (Cyphomandra diploconos)	Folhas	União da Vitória / PR	ne	ne	SOARES <i>et.al.</i> , 2006.	

ne = não encontrado.

Desta tabela, salvo *Solanum caavurana*, não há relatos para o uso popular em hanseníase nem estudo químico relatado para as demais espécies na literatura. Porém de acordo com Conceição (1987), Corrêa (1984) e Penna (1950) várias espécies de *Solanum* são/foram utilizadas por médicos e pela população no tratamento de doenças da pele e erupções cutâneas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo principal, realizar estudo fitoquímico dos frutos de *Solanum caavurana* Vell., isolando e identificando seus principais metabólitos secundários, caracterizando estruturalmente os alcaloides esteroidais além de fazer avaliação de atividade frente a hanseníase.

2.2 Específicos

- Continuar o trabalho de Vaz (2008), isolando e identificando os metabólitos secundários dos extratos dos frutos maduros de *S. caavurana* e realizar estudo fitoquímico, isolando e identificando os metabólitos secundários dos extratos dos frutos imaturos de *S. caavurana*;
- Efetuar o estudo dos mecanismos de fragmentação de todas as substâncias isoladas e identificadas, utilizando a técnica de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS);
- Conduzir testes para verificar a atividade antimicrobiana e antitumoral para os extratos das espécies de *Solanum* coletadas;
- Proceder a testes para avaliar a atividade antileprótica, verificando a aplicação popular de *S. caavurana* no tratamento da Hanseníase;
- Realizar estudos de desreplicação através da técnica de DIMS, considerando as técnicas de ESI-MS e ESI-MS/MS, para monitoramento e identificação das principais substâncias isoladas, em extratos de outras partes da planta;
- Obtenção via transformação química, dos isômeros 3α e 3β dos 3-N-formilaminoespirossolanos, a partir dos isômeros 3α e 3β dos 3-aminoespirossolanos naturais, isolados dos frutos imaturos de S. caavurana, para estudos de determinação da configuração relativa no carbono 3 através de técnicas de RMN.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1 Suportes Para Cromatografia

- Cromatografia em coluna (CC). As quantidades de amostras que foram cromatografadas foram determinantes na etapa de escolha do comprimento e diâmetro das colunas de vidro usadas nos fracionamentos. Para as purificações cromatográficas, as seguintes fases estacionárias foram utilizadas neste trabalho:
- Gel de sílica 60 para cromatografia em coluna, com 0,063 0,200 mm (70 230 mesh ASTM), Merck, Darmstadt, Alemanha. A proporção de sílica foi cerca de 20 vezes a massa da amostra a ser purificada;
- Alumina Neutra: Óxido de alumínio 90 ativo neutro (grau de atividade I), para cromatografia em coluna, 0,063 0,200 mm (70 230 mesh ASTM), Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.
 - Sephadex LH-20 Pharmacia LKB, Biotechnology AB, Uppsala Sweeden;
- Cromatografia em camada delgada (CCD). As análises em camada fina foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 e indicador de fluorescência F254, 0,2 mm de espessura, Merck, Darmstadt, Alemanha. Também foram utilizadas cromatofolhas de óxido de alumínio 150 neutro tipo T (alumina neutra) com indicador de fluorescência F254, em suporte de alumínio e 0,2 mm de espessura, Merck, Darmstadt, Alemanha.
- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em placas de vidro (20 x 20 cm) com espessura de 1,0 mm de gel de sílica 60 da Merck, com indicador de fluorescência F254. As faixas foram reveladas sob luz ultravioleta (nos comprimentos de 254 e 366 nm). A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes: diclorometano (CH2Cl2), clorofórmio (CHCl3) e metanol (CH3OH).
- Cromatografia em coluna rápida (CCFlash). Alguns fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro própria para cromatografia rápida, sendo que a variação do diâmetro se processou de acordo com as quantidades de amostras a serem purificadas. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 com 0,040 -

0,063mm da Merck em quantidade suficiente para preencher a coluna até a altura de 200 mm (STILL *et al.*, 1978).

- **Reveladores**. A revelação das substâncias foi feita sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, solução de aldeído anísico (anisaldeído), reagente de Dragendorff e reagente de Marquis.
- **Solventes**. Como eluente cromatográfico, foram utilizados solventes P.A. das marcas Merck, Synth, Vetec e Sigma Aldrich.

3.2 Equipamentos

- As análises de ressonância magnética nuclear foram registradas em:
- Espectrômetro de RMN Bruker DPX 200 operando em 200 MHz, magneto de 4,7T; observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 200,13 e 50,45 MHz respectivamente.
- Espectrômetro de RMN Bruker Avance 400 operando em 400 MHz, magneto de 9,4 T; observado os núcleos de ¹H e ¹³C a 400,13 e 100,61 MHz, respectivamente.
- Espectrômetro de RMN Bruker Avance DRX 500 operando em 500 MHz, magneto de 11,74 T; observando os núcleos e ¹H e ¹³C a 500,13 e 125,77 MHz, respectivamente.

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado, utilizando TMS como padrão interno de calibração. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e são dados em relação ao TMS com $\delta=0$ ppm.

• As análises de espectrometria de massas foram realizadas em equipamento micrOTOF-QII, da Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA) em colaboração com o Prof°. Dr. Norberto Peporine Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo: Departamento de Física e Química - FCFRP-USP). A técnica utilizada para a obtenção dos espectros de massas foi a ionização por eletrospray (ESI-MS).

Tanto o espectro do íon precursor (*full scan*) quanto os espectros dos íons produtos foram obtidos no modo íon-positivo e registrados em um instrumento de quadrupolo e tempo de vôo. As condições adotadas durante as análises: Voltagem do capilar 3700 V; Temperatura do gás seco, 200 °C; Fluxo do gás seco, 4 L h⁻¹; Gás nebulizador nitrogênio

- (N₂). Foi utilizado NaTFA 10 mmol L⁻¹ como padrão interno e externo de calibração. Para a análise por ESI-MS/MS, nitrogênio foi utilizado como o gás de colisão (CID).
- Os pontos de fusão foram determinados em equipamento de micro fusão Quimis modelo Q-340S23.
- Para aquisição dos espectros na região do infravermelho (IV) foi utilizado equipamento FTIR marca BioRad modelo FTX 3500, operando em ambiente Varian Resolution 4.0. Especificações do FTIR: Fonte MIR Carbeto de Silício; Beamsplitter MIR KBr (brometo de potássio); Detector MIR DTGS (sulfato de triglicina deuterada). As seguintes condições para análise foram adotadas: medição em transmitância; Número de *scans* 32; Resolução 4 cm⁻¹; Função de Apodização Blackman : Harris 3 Term; Faixa espectral MIR 400 4000 cm⁻¹.
- O desvio óptico foi medido em um espectropolarímetro automático Autopol III da Rudolph Research, Flanders – New Jersey.

4. ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1 Coleta e Identificação Botânica

A coleta dos frutos imaturos, do tronco e das folhas de Solanum caavurana Vell.,



ocorreu em 10/03/2010 no Parque Estadual de Vila Rica do Espírito Santo, localizado em Fênix/PR. A identificação da espécie foi feita pelo botânico e curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Osmar dos Santos Ribas sob número de exsicata 356965.







Figura 4.1 Hábito de *Solanum caavurana Vell.* (**A**); Detalhe dos troncos e galhos (**B**); Frutos verdes (**C**); Folha e detalhe da flor (**D**) (Fonte: Autora. Coleta 10/03/2010 em PEVR).

A coleta dos frutos imaturos de *Solanum scuticum* M Nee (*S. tabacifolium* Dunal.) foi efetuada no campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).



A espécie foi identificada pelo biólogo Dr. José Roberto Trigo (Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia - UNICAMP). Espécies da planta foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UNICAMP (UEC).

Figura 4.2 Frutos imaturos de S. scuticum M. Nee (S. tabacifolium Dunal.) (Coleta - UNICAMP).

A coleta das folhas de Solanum diploconos (Mart.) Bohs. (Cyphomandra Mart. ex Sendtn.)

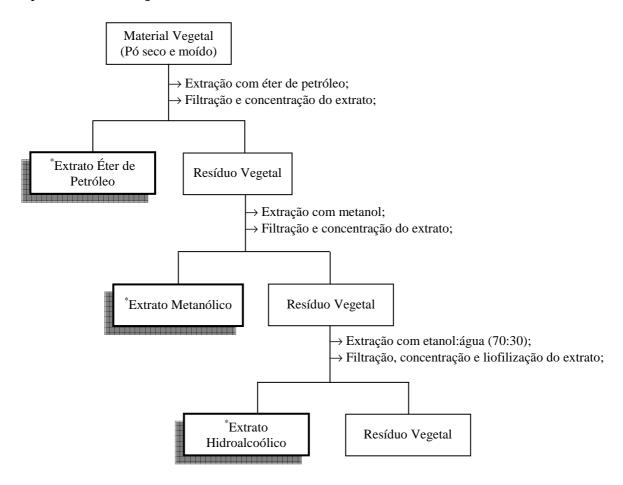


foi efetuada em União da Vitória – PR, submetida à confecção de exsicata, identificada pelo Prof. Nelson Ivo Matzenbacher (UFRGS) e seu representante está depositado no Herbário do Instituto de Ciências Naturais da UFRGS sob o número ICN 143526.

Figura 4.3 Solanum diploconos (Mart.) Bohs. (Cyphomandra diploconos) (Coleta - União da Vitória/PR).

4.2 Preparo dos Extratos para Estudo Fitoquímico

Depois de procedida a coleta, secagem, moagem e pesagem dos materiais vegetais, estes foram submetidos individualmente à extração a frio (maceração) como está representado no **Esquema 4.1**:



Esquema 4.1 Obtenção dos extratos.

Foram adicionados solventes de ordem crescente de polaridade: éter de petróleo (EP), metanol (MeOH) e etanol : água - 70 : 30 (EHE), com renovação do solvente em intervalos de 24 horas. Ao final da extração o resíduo vegetal foi desprezado. Os extratos EP e MeOH foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida sendo posteriormente armazenados em dessecador. Os extratos EHE foram concentrados ao máximo em pressão reduzida, armazenados em freezer e posteriormente liofilizados.

^{*}Os respectivos rendimentos para cada extrato podem ser encontrados na **Tabela 6.1** (pág. 39).

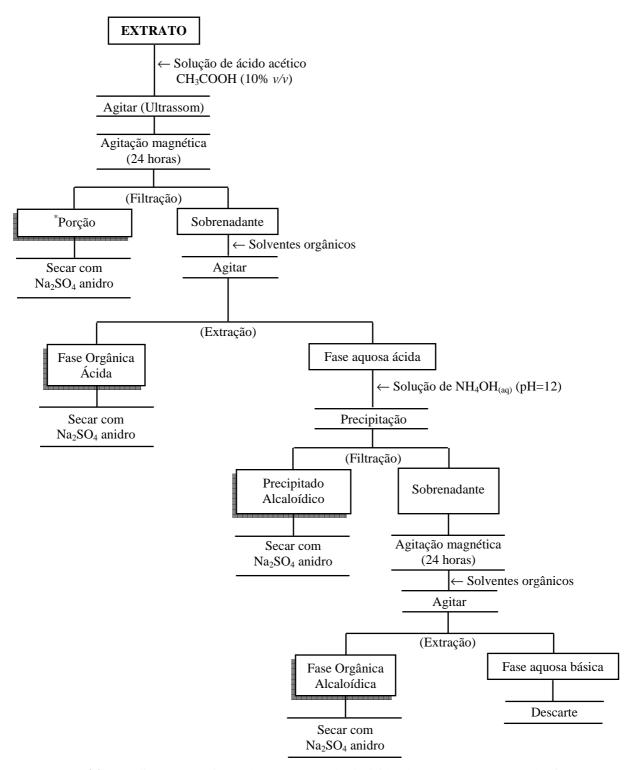
4.3 Extração para Alcaloides – Extratos Metanólicos e Hidroalcoólicos

Para definir a melhor estratégia no que se refere ao tratamento para pré-purificação dos extratos MeOH e EHE, uma sequência de testes para a extração de alcaloides foi realizada, cabendo a estes, auxiliarem na escolha de quais parâmetros seriam mais adequados, tomando como base o cálculo do percentual de rendimento de extração dos metabólitos na fase alcaloídica. A metodologia escolhida (**Esquema 4.2**, pág. 20) fez uso de uma solução de ácido acético (CH₃COOH 10%), fazendo extração subsequente com diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio (CHCl₃) e acetato de etila (AcOEt).

Inicialmente o extrato MeOH dos frutos imaturos de *Solanum caavurana* Vell. (**SCFIM**) foi colocado em um béquer de 2000 mL onde a solução de ácido acético (CH₃COOH 10%) era acrescentada aos poucos (foram utilizados aproximadamente 500 mL de solução ácida no total). Na sequência a mistura formada foi levada em banho ultrassônico para garantir uma melhor solubilização; a suspensão formada foi deixada em agitação magnética por um período de 24 horas.

Após passadas 24 horas, a mistura foi filtrada em papel para um erlenmeyer de 1000 mL. Nesta etapa foram obtidas duas frações: a aquosa ácida e um sólido insolúvel, o qual após ser completamente solubilizado em CH₃OH, foi seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e transferido para um frasco sendo chamado de fração insolúvel (**SCFIMFI**). A fração líquida ácida foi colocada em um funil de separação de 1000 mL, extraída sequencialmente com: clorofórmio (CHCl₃ - 5 x 80 mL), diclorometano (CH₂Cl₂ - 1 x 80 mL) e acetato de etila (AcOEt - 5 x 80 mL). As frações orgânicas (CHCl₃, CH₂Cl₂ e AcOEt) foram combinadas, secas com Na₂SO₄ anidro, concentradas sob pressão reduzida e armazenadas em frasco rotulado previamente pesado, sendo chamadas de fase orgânica neutra (**SCFIMFN**).

Após procedimento de extração com os solventes orgânicos, a fase aquosa ácida remanescente, foi transferida para um béquer de 2000 mL, basificada com adição de hidróxido de amônio (NH₄OH) concentrado até pH 11 - 12. Com a adição da base, notouse que a solução se tornara bastante turva, caracterizando a ocorrência da formação de um precipitado gelatinoso com coloração marrom - alaranjada intensa. Este precipitado foi separado por filtração simples em papel de filtro, solubilizado em CH₃OH e CHCl₃, sendo seco com adição de Na₂SO₄ anidro, caracterizando o precipitado rico em alcaloides **SCFIMPA**.



Esquema 4.2 Procedimento experimental para extração de alcaloides do extrato EME e EHE dos frutos imaturos de *S. caavurana*.

A fase aquosa (o filtrado de pH básico) contida em um béquer (1000 mL) foi deixada reagir por 24 horas em contato com a base, em agitação magnética. Após esse período esta solução foi transferida para funil de separação de 1000 mL, extraída com os solventes orgânicos, CHCl₃ (5 x 80 mL), CH₂Cl₂ (2 x 80 mL) e AcOEt (5 x 80 mL). Cada

^{*}Os respectivos rendimentos para cada fração, podem ser encontrados na Tabela 6.2 (pág. 40).

porção recolhida foi agrupada, secadas sob Na₂SO₄ anidro, concentradas sob pressão reduzida e armazenadas em frasco rotulado previamente pesado constituindo a fase orgânica básica (ou alcaloídica - **SCFIMFA**).

Esse mesmo procedimento (descrito pelo **Esquema 4.2**, pág. 20), também foi adotado para o tratamento alcaloídico de EHE dos frutos imaturos de *S. caavurana* (**SCFIH**) e EME de *S. scuticum*.

4.4 Purificação de SCFIMPA - Métodos Cromatográficos Utilizados

Analisando os rendimentos e a complexidade das frações provenientes do tratamento para extração de alcaloides (**Esquema 4.2**, pág. 20), havia necessidade de selecionar uma metodologia que fosse mais adequada primeiramente, para ser utilizada na purificação do precipitado rico em alcaloides oriundo do extrato MeOH dos frutos imaturos de *Solanum caavurana* Vell. - **SCFIMPA**. Para tanto, pequenas quantidades desse material foram submetidas a alguns fracionamentos testes utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 (que não forneceu resultados satisfatórios para esta amostra) e alumina neutra (óxido de alumínio neutro).

Como o ensaio feito em pequena escala utilizando alumina neutra forneceu uma melhor separação, **SCFIMPA** teve sua purificação iniciada conforme metodologia detalhada na sequência:

4.4.1 Purificação de SCFIMPA - CC em Alumina Neutra

Para o tratamento de **SCFIMPA**, (3,0328 g) este, foi submetido à técnica de Cromatografia em Coluna (CC) usando alumina neutra como fase estacionária. Para esta purificação as seguintes condições foram adotadas: a coluna utilizada (CC de vidro, h = 560 mm, $\emptyset = 25 \text{ mm}$) foi empacotada com alumina neutra suspensa em CH_2Cl_2 até a altura de 300 mm da base.

O extrato foi misturado com uma pequena porção de alumina formando um pó fino e seco que foi colocado sobre o leito de alumina.

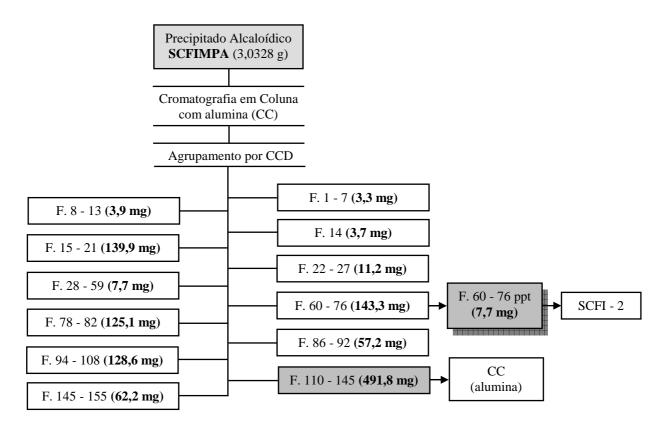
O gradiente de eluição aplicado nesta purificação está disposto na **Tabela 4.1** (pág. 22):

Tabela 4.1 Dados do gradiente de fracionamento para purificação de **SCFIMPA** em CC usando alumina neutra como fase estacionária

Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)
F. 1 - 29	CH ₂ Cl ₂ 100%	250
F. 30 - 39	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 1 %	100
F. 40 - 62	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 2 %	200
F. 63 - 103	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 4 %	400
F. 104 - 111	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 8 %	100
F. 112 - 119	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 16 %	100
F. 120 - 129	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 30 %	100
F. 130 - 139	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 60 %	100
F. 140 - 155	MeOH 100 %	200

CC = cromatografia em coluna; SCFIMPA = Solanum caavurana, frutos imaturos, extrato metanólico, precipitado alcaloídico; CH_2Cl_2 = diclorometano; MeOH = metanol.

Foram coletadas 155 frações de aproximadamente 9 mL cada, as quais foram agrupadas (**Esquema 4.3**) em 12 frações, após análise comparativa por CCD revelada sob lâmpada de UV (254 e 366 nm) seguida por borrifamento com reagente de Dragendorff.



Esquema 4.3 Cromatografia em Coluna (CC) em alumina do extrato SCFIMPA - agrupamento das frações.

Durante o agrupamento observou-se certa heterogeneidade da fração **F.60 - 76** (143,3 mg) culminando na formação de um precipitado branco, o qual foi separado, lavado

com acetona, resultando em um composto hialino com brilho vítreo que se cristalizava em formato de agulhas (**SCFI - 2:** 7,7 mg).

A sub-fração **F.110 - 145** apresentou maior quantidade em massa (491,8 mg) e menor complexidade sendo desta forma, submetida a uma purificação sequencial em CC também usando alumina neutra como fase estacionária. Este fracionamento está descrito em detalhes no **Item 4.4.2**.

4.4.2 Purificação de SCFIMPA F.110-145: CC em Alumina Neutra

A purificação de **SCFIMPA F.110 - 145** (491,8 mg oriunda do fracionamento descrito pelo **Esquema 4.3**, pág. 22) foi realizada através de CC usando alumina neutra como fase estacionária. Para esta purificação as seguintes condições foram adotadas:

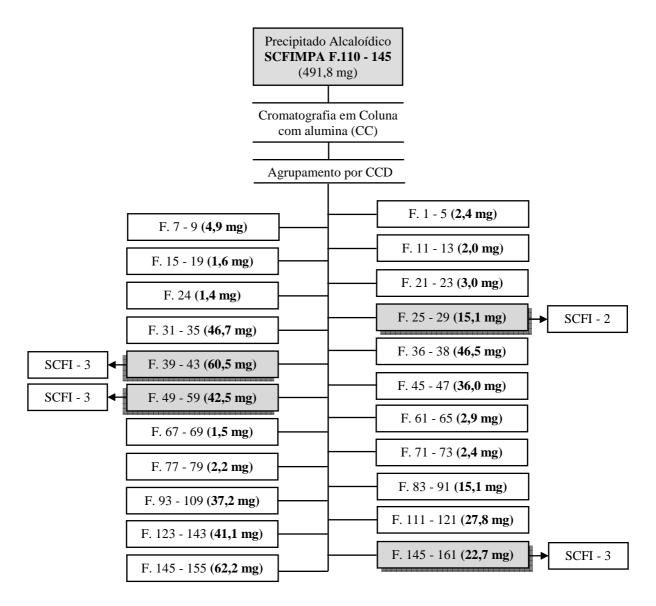
A coluna utilizada (CC de vidro, h = 560 mm, $\emptyset = 14$ mm) foi empacotada com alumina neutra suspensa em diclorometano (CH₂Cl₂) até a altura de 200 mm da base. A massa de amostra disponível foi misturada com uma pequena porção de alumina formando um pó fino e seco que foi colocado sobre o leito de alumina. O gradiente de eluição aplicado nesta separação está disposto na **Tabela 4.2**:

Tabela 4.2 Dados do gradiente de fracionamento para purificação de **SCFIMPA F.110 - 145** em CC usando alumina neutra como fase estacionária

Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)
F. 1 - 12	CH ₂ Cl ₂ 100%	100
F. 13 - 30	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 1 %	200
F. 31 - 42	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 2 %	100
F. 43 - 61	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 3 %	200
F. 62 - 73	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 4 %	100
F. 74 - 98	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 5 %	200
F. 99 - 108	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 7 %	100
F. 109 - 118	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 10 %	100
F. 119 - 131	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 15 %	100
F. 132 - 151	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 30 %	200
F. 152 - 162	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 50 %	100
F. 163 - 171	MeOH 100 %	100

CC = Cromatografia em Coluna; **SCFIMPA** = *Solanum caavurana*, frutos imaturos, extrato metanólico, precipitado alcaloídico; **CH**₂**Cl**₂ = diclorometano; **MeOH** = metanol.

Foram coletadas 171 frações de aproximadamente 9 mL cada, as quais foram agrupadas (**Esquema 4.4**, pág. 24) em 22 frações, após análise comparativa por CCD revelada sob lâmpada de UV (254 e 366 nm) seguida por borrifamento com reagente de Dragendorff.



Esquema 4.4 Cromatografia em Coluna (CC) em alumina do extrato **SCFIMPA F.110 – 145**. Agrupamento das frações.

O composto **SCFI - 2** apresentava-se como um sólido alaranjado, amorfo e opaco, enquanto a substância **SCFI - 3** foi isolada como um sólido fibroso de cor creme e brilho sedoso. Todas as frações apresentaram apenas uma mancha observada em análise de CCD, dando resultado positivo frente à reagente de Dragendorff.

Todos os compostos isolados de **SCFIMPA** tiveram suas estruturas determinadas pela análise de RMN de ¹³C e o espectro de DEPT 135.

4.5 Purificação de SCFIMFN - Métodos Cromatográficos Utilizados

Para o tratamento da fração neutra **SCFIMFN** (2,55 g oriundo do fracionamento descrito pelo **Esquema 4.2**, pág. 20), esta foi submetida à técnica de Cromatografia em

Coluna (CC) usando gel de sílica como fase estacionária. Para esta purificação as seguintes condições foram adotadas:

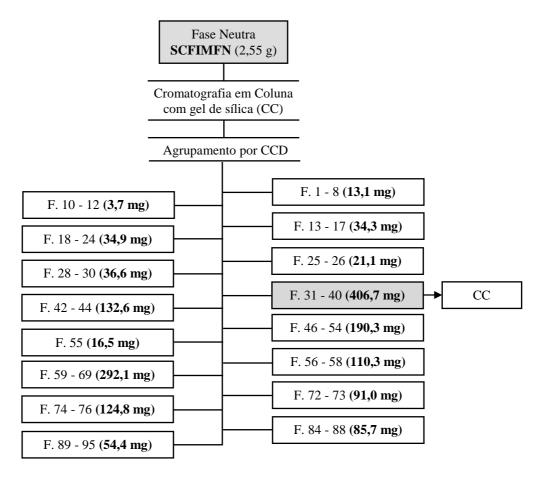
A coluna utilizada (CC de vidro, h = 560 mm, $\emptyset = 25$ mm) foi empacotada com gel de sílica suspensa em CH_2Cl_2 até a altura de 295 mm da base. A amostra também foi solubilizada em CH_2Cl_2 e, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, colocada sobre o leito de sílica. O gradiente de eluição aplicado neste fracionamento está disposto em detalhes na **Tabela 4.3**:

Tabela 4.3 Dados do gradiente de fracionamento para purificação de **SCFIMFN** em CC usando gel de sílica como fase estacionária

Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)	
F. 1 – 6	CH ₂ Cl ₂ 100%	200	
F. $7 - 9$	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 2,5 %	100	
F. 10 - 13	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 5 %	100	
F. 14 - 16	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 10 %	100	
F. 17 - 20	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 20 %	100	
F. 21 - 24	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 25 %	100	
F. 25 - 27	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 35 %	100	
F. 28 - 30	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 55 %	100	
F. 31 - 33	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 80 %	100	
F. 34 - 37	AcOEt 100 %	100	
F. 38 - 40	AcOEt: MeOH 2,5 %	100	
F. 41 - 44	AcOEt: MeOH 5 %	100	
F. 45 - 51	AcOEt: MeOH 10 %	200	
F. 52 - 54	AcOEt: MeOH 15 %	100	
F. 55 - 57	AcOEt: MeOH 20 %	100	
F. 58 - 64	AcOEt: MeOH 25 %	200	
F. 65 - 70	AcOEt: MeOH 30 %	200	
F. 71 - 78	AcOEt: MeOH 50 %	250	
F. 79 - 82	AcOEt: MeOH 80 %	100	
F. 83 - 95	MeOH 100 %	200	

CC = Cromatografia em Coluna; SCFIMFN = Solanum caavurana, frutos imaturos, extrato metanólico, fase neutra; CH₂Cl₂ = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; MeOH = metanol.

Foram coletadas 95 frações de aproximadamente 35 mL cada, as quais foram agrupadas (**Esquema 4.5**, pág. 26) em 23 frações, após análise comparativa por CCD revelada sob lâmpada de UV ($\lambda = 254$ e 366 nm) seguida por borrifamento com reagente de Dragendorff e solução de anisaldeído.



Esquema 4.5 Agrupamento das frações cromatografia em coluna (CC) em gel de sílica do extrato **SCFIMFN**.

A sub-fração **F. 31 - 40** (406,7 mg) foi escolhida inicialmente para purificação por Cromatografia em Coluna (CC) em gel de sílica. Particularidades referentes a este fracionamento estão descritos em detalhes no **Item 4.5.1**.

4.5.1 Purificação de SCFIMFN F.31-40 por Cromatografia em Coluna

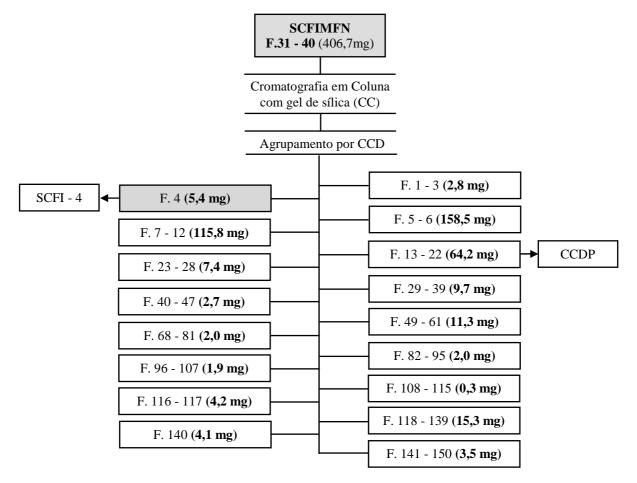
Para o tratamento de **SCFIMFN F.31 - 40** (406,7 mg) foi utilizada a purificação por CC usando gel de sílica como fase estacionária. Nesta etapa foram adotadas as seguintes condições: coluna utilizada (CC de vidro, h = 560 mm, $\emptyset = 15$ mm) foi empacotada com gel de sílica suspensa em CHCl₃ até a altura de 200 mm da base. À amostra foi misturado um pouco de sílica, CHCl₃ e CH₃OH para solubilização. Após secagem dos solventes o pó fino resultante foi colocado de forma homogênea, sobre o leito da coluna de sílica empacotada. O gradiente de eluição utilizado neste fracionamento está disposto em detalhes na **Tabela 4.4** (pág. 27):

Tabela 4.4 Dados do gradiente de fracionamento para purificação de **SCFIMFN F.31 - 40** em CC usando gel de sílica como fase estacionária

Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)
F. 1 - 20	CHCl ₃ 100%	200
F. 21 - 45	CHCl ₃ : MeOH 0,5 %	200
F. 46 - 56	CHCl ₃ : MeOH 1,0 %	100
F. 57 - 67	CHCl ₃ : MeOH 1,5 %	100
F. 68 - 79	CHCl ₃ : MeOH 2,0 %	100
F. 80 - 91	CHCl ₃ : MeOH 2,5 %	100
F. 92 - 103	CHCl ₃ : MeOH 3,0 %	100
F. 104 - 116	CHCl ₃ : MeOH 5,0 %	100
F. 117 - 127	CHCl ₃ : MeOH 10 %	100
F. 128 - 139	CHCl ₃ : MeOH 30 %	100
F. 140 - 150	MeOH 100 %	100

CC = cromatografia em coluna; SCFIMFN = *Solanum caavurana*, frutos imaturos, extrato metanólico, fase neutra; CHCl₃ = clorofórmio; MeOH = metanol.

Foram coletadas 150 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais foram agrupadas (**Esquema 4.6**) em 17 frações, após análise comparativa por CCD revelada em lâmpada de UV (254 e 366 nm) seguida por borrifamento com reagente de Dragendorff e solução de anisaldeído.



Esquema 4.6 Agrupamento das frações cromatografia em Coluna (CC) em gel de sílica do extrato **SCFIMFN**.

Durante agrupamento das frações a análise em CCD mostrou que a fração F.31(4) com 5,4 mg, possuía apenas uma mancha de coloração amarelo intenso quando revelada com anisaldeído e cor alaranjada intensa frente à reagente de Dragendorff. Após evaporação do solvente este composto puro denominado **SCFI - 4** apresentou-se na forma de um sólido cristalino branco com brilho vítreo e em formato de agulhas.

A sub-fração **F. 31 (13)** (64,2 mg) foi purificada por CCDP em gel de sílica. As especificidades referentes a este fracionamento estão descritos em detalhes no **Item 4.5.2**.

4.5.2 Purificação por CCDP de F. 31(13)

Foi feita uma CCDP da fração **F. 31 (13)** (64,2 mg), eluindo em CHCl₃ e 4% MeOH (*v/v*), resultando em dois compostos puros (**SCFI - 1 e SCFI - 5**), conforme mostra o **Esquema 4.7.**



Esquema 4.7 CCDP da SCFIMFN F.31(13) da extração de alcaloides dos frutos imaturos de S. caavurana

O composto **SCFI - 1** (7,7 mg) foi obtido como cristais em formato de agulhas e coloração marrom bastante pálido. Quando borrifado com anisaldeído revelou-se com cor azul bastante intensa e coloração alaranjada intensa característica dos alcaloides quando revelado com reagente de Dragendorff. O interessante é que **SCFI - 1** não apresenta manchas quando colocado sob luz UV (λ = 254 e 366nm) caracterizando ausência de grupos cromóforos.

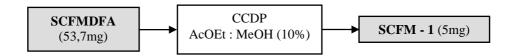
Além dessas, outras frações de **SCFIMFN** também foram purificadas. Porém o tratamento das mesmas não forneceu compostos puros com bom rendimento para os estudos de RMN.

4.6 Estudo Complementar dos Frutos Maduros de Solanum caavurana

Em continuação ao estudo prévio (VAZ, 2008), a massa remanescente da fração em diclorometano (CH₂Cl₂) do extrato EHE dos frutos maduros de *S. caavurana*, foi submetida a uma nova extração para alcaloides, bastante semelhante àquela descrita anteriormente pelo **Esquema 4.2** (pág. 20). Os rendimentos e análise por CCD frente à anisaldeído e Dragendorff mostraram que a extração foi reprodutível (VAZ, 2008).

4.6.1 CCDP da Fase Alcaloídica – Frutos Maduros de Solanum caavurana

Foi feita uma CCDP da nova fração alcaloídica obtida (53,7mg), eluindo em acetato de etila 10% metanol (v/v), resultando em um composto puro (**SCFM-1**), conforme mostra o **Esquema 4.8**:



Esquema 4.8 CCDP da SCFMDFA da extração de alcaloides da fração CH₂Cl₂ dos frutos maduros de *S. caavurana*

4.6.2 Cromatografia em Coluna Rápida de SCFMDFN:

A metodologia utilizada na purificação da amostra **SCFMDFN** (248,8 mg) foi a técnica de Cromatografia em Coluna Rápida (CCFlash) descrita por Still e colaboradores (1978) com as seguintes adaptações:

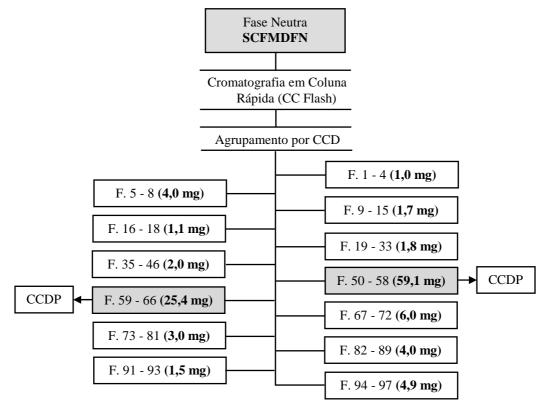
A coluna utilizada (CCFlash, h = 560 mm, $\emptyset = 35 mm$) foi preenchida com gel de sílica seca para cromatografia rápida (40 - 63 μm – Merck) até a altura de 200 mm da base. Na sequência o solvente (CH₂Cl₂) foi adicionado à coluna que posteriormente foi fechada. Aplicou-se fluxo de ar de aproximadamente 2,0 pol. min⁻¹ até que todos os espaços vazios do interior da fase estacionária fossem ocupados pelo solvente. Sobre o leito da coluna foi colocada uma camada fina de algodão e a amostra foi aplicada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur: a coluna foi novamente preenchida de fase móvel e eluída na taxa de vazão constante e previamente citada. O gradiente de eluição para este fracionamento está disposto na **Tabela 4.5**:

Tabela 4.5 Dados do gradiente de fracionamento por CCFlash da fração SCFMDFN

Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)
F. 1 - 18	CH ₂ Cl ₂ 100%	350
F. 19 - 46	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 2 %	400
F. 47 - 85	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 5 %	400
F. 86 - 90	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 10 %	100
F. 91 - 97	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 20 %	100

 ${\bf CCFlash}={\bf Cromatografia}$ em Coluna Rápida; ${\bf SCFMDFN}={\bf Solanum}$ caavurana frutos maduros, diclorometano, fase neutra; ${\bf CH_2Cl_2}={\bf diclorometano}$; ${\bf MeOH}={\bf metanol}$.

Foram coletadas 97 frações de aproximadamente 20 mL cada, as quais foram agrupadas (**Esquema 4.9**) em 16 frações, após análise comparativa por CCD revelada sob lâmpada de UV (254 e 366 nm) seguida por borrifamento com anisaldeído e aquecimento.

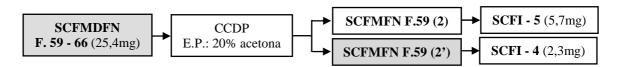


Esquema 4.9 Cromatografia em coluna rápida (CCFlash) da SCFMDFN agrupamento das frações.

As sub-frações **F. 50 - 58** (59,1 mg) e **F. 59 - 66** (25,4 mg) foram purificadas por CCDP em gel de sílica. As especificações referentes ao fracionamento de **F. 59 - 66** estão descritas com devido detalhamento no **Item 4.6.3**. O tratamento de **F. 50 - 58** não forneceu compostos puros com bom rendimento para estudos de RMN.

4.6.3 CCDP de SCFMDFN F.59-66:

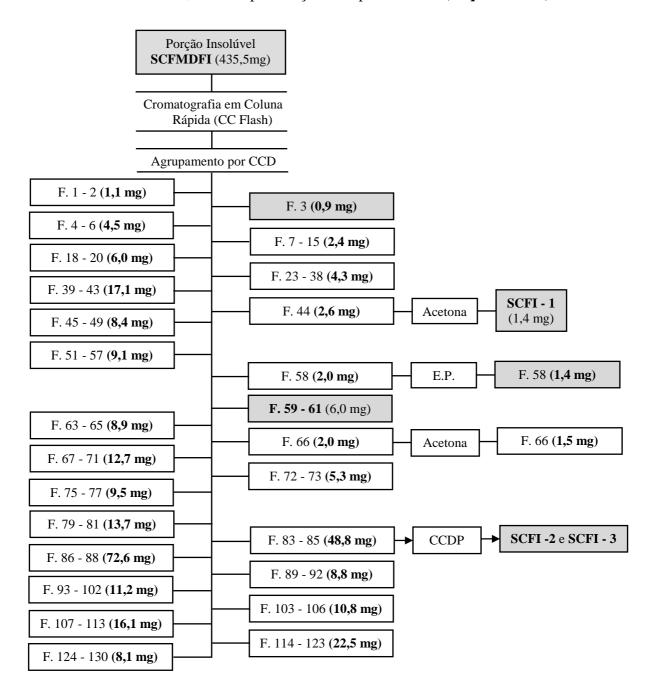
A partir da CCDP de **SCFMDFN F.59 - 66** (25,4 mg), eluída em éter de petróleo 20% acetona (*v/v*), (**Esquema 4.10**) resultou no isolamento de **SCFI - 4** que forneceu resultado positivo frente a reagente de Dragendorff.



Esquema 4.10 CCDP da SCFMDFN F.59 - 66 da extração de alcaloides da fração CH₂Cl₂

4.6.4 Cromatografia em Coluna Rápida de SCFMDFI

A fração **SCFMDFI** também proveniente da extração alcaloídica dos frutos maduros de *S.caavurana*, teve sua purificação feita por CCFlash (**Esquema 4.11**).



Esquema 4.11 Cromatografia em Coluna Rápida (CCFlash) da fração SCFMDFI. Agrupamento das frações.

Para este fracionamento observou-se as mesmas condições cromatográficas previamente descritas para a purificação da **SCFMDFN** (**Item 4.6.2**) com gradiente de eluição detalhado na **Tabela 4.6** (pág. 32).

Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)	Fração	Gradiente % (v/v)	Volume do eluente (mL)
F. 1 – 20	CH ₂ Cl ₂ 100%	500	F. 75 - 81	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 20 %	200
F. $21 - 27$	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 1 %	200	F. 82 - 91	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 30 %	300
F. 28 - 34	CH_2Cl_2 : MeOH 2,5 %	200	F. 92 - 97	CH_2Cl_2 : MeOH 40 %	200
F. 35 - 44	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 5 %	300	F. 98 - 104	CH_2Cl_2 : MeOH 50 %	200
F.45 - 55	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 7 %	300	F. 105 - 111	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 60 %	200
F.56 - 67	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 10 %	400	F. 112 - 117	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 80 %	200
F. 68 - 74	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 15 %	200	F. 118 - 130	MeOH 100 %	350

Tabela 4.6 Dados do gradiente de fracionamento por CCFlash da fração SCFMDFI;

 $\mathbf{CCFlash} = \mathbf{Cromatografia}$ em Coluna Rápida; $\mathbf{SCFMDFI} = \mathbf{Solanum}$ caavurana frutos maduros diclorometano, fase insolúvel; $\mathbf{CH_2Cl_2} = \mathbf{diclorometano}$; $\mathbf{MeOH} = \mathbf{metanol}$.

Foram coletadas 130 frações de aproximadamente 20 mL cada, as quais foram agrupadas em 25 frações, após análise comparativa por CCD revelada sob lâmpada de UV (254 e 366 nm) seguida por borrifamento com anisaldeído e aquecimento. Desta coluna foram obtidas algumas substâncias puras, dentre as quais, **SCFI - 1**, **SCFI - 2** e **SCFI - 3** foram completamente determinadas. Os demais compostos foram obtidos em quantidades ínfimas não permitindo a sua determinação estrutural.

Todos os compostos isolados, tanto dos frutos imaturos quanto maduros de *S. caavurana* depois de identificados e caracterizados, foram utilizados como padrões tanto para o estudo dos mecanismos de fragmentação em EM, como para as análises destes metabólitos em extratos de outras plantas do gênero *Solanum* disponíveis (**Tabela 1.1**, pág. 12), pela metodologia de desreplicação.

4.7 Espectrometria de Massas

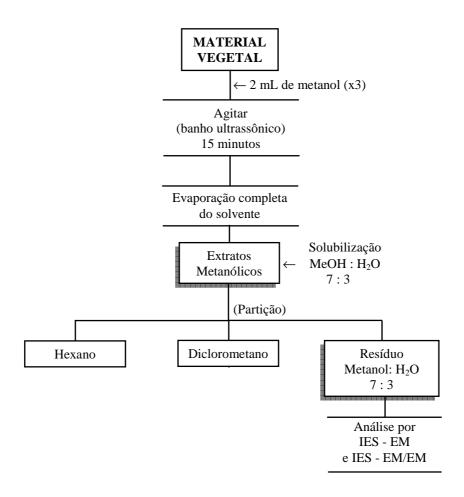
Metanol (CH₃OH), acetonitrila (CH₃CN), acetato de etila (AcOEt) grau HPLC e água desionizada (MilliQ – Millipore®) foram utilizados durante todo o estudo de espectrometria de massas (EM). Os espectros de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) do íon precursor (*full scan*) e dos íons produtos foram adquiridos no modo positivo em um espectrômetro micrOTOF-QII, da Bruker Daltonics que possui uma configuração quadrupolo, tempo de voo como analisadores.

As soluções dos extratos brutos foram infundidas para dentro da fonte de eletrospray a um fluxo de $5\mu L.min^{-1}$, usando uma bomba Harvard Aparatus modelo 1746 (Holliston, MA). Os compostos puros e os extratos foram dissolvidos em CH_3OH aquoso (20%) para fornecer uma concentração de $0.5mg.mL^{-1}$ e $10\mu L$ (após filtragem em membrana de $0.22\mu m$), foram injetados para cada análise.

Os experimentos de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) foram conduzidos somente no modo positivo usando as mesmas condições descritas anteriormente. O nitrogênio (N₂) foi utilizado como o gás de colisão (CID). A energia de colisão foi variada de 5 a 60 eV (de 5 em 5 eV), para maximizar a formação de fragmentos diagnósticos. As medidas de massas acuradas foram feitas no mesmo equipamento.

4.7.1 Obtenção dos Extratos para Estudos de ESI-MS

Para que se desse início aos estudos de mapeamento fitoquímico primeiramente houve a necessidade de obtenção dos extratos de todas as espécies vegetais (**Tabela 1.1**, pág. 12) conforme descrito pelo **Esquema 4.12**:



Esquema 4.12 Fluxograma do procedimento de obtenção dos extratos para análise de desreplicação.

Para a obtenção dos extratos, uma pequena quantidade de material vegetal foi colocada dentro de um almofariz sendo posteriormente pulverizado com auxílio de um

pistilo. O pó resultante (≅ 40 mg) foi colocado dentro de um *vial* onde foram adicionados 2mL de CH₃OH. O *vial* foi levado para banho ultrassônico e deixado extrair durante 15min. Este procedimento de extração foi repetido por 3 vezes com novas alíquotas de CH₃OH. Os sobrenadantes retirados com o auxílio de uma micropipeta foram agrupados e centrifugados, sendo posteriormente secos em temperatura ambiente até atingir massa constante.

Após determinação de suas massas os extratos foram dissolvidos em 2mL de uma mistura $CH_3OH: H_2O$ (7:3) e submetidos a partição com n-hexano (C_6H_{14}) e posteriormente com CH_2Cl_2 . O extrato n-hexânico e aquele obtido em CH_2Cl_2 foram reservados para análises posteriores. O extrato hidrometanólico (EHM) remanescente foi destinado às análises por ESI-MS e ESI-MS/MS.

4.7.2 Partição dos Extratos

No tocante aos extratos obtidos para o estudo fitoquímico (**Esquema 4.1**, pág. 18), adotou-se procedimento semelhante àquele previamente descrito para os materiais vegetais secos. Uma pequena quantidade dos extratos (\cong 20 mg) foi suspendida em 2 mL de uma mistura CH₃OH : H₂O (7 : 3) e levada em banho ultrassônico para homogeneização por 15min. O volume foi ajustado para 3 mL com mistura CH₃OH : H₂O (7 : 3). Os extratos suspensos foram então submetidos à partição com CH₂Cl₂, sendo que esta fração também foi reservada para análises posteriores e o extrato hidormetanólico (EHM) remanescente foi reservado para análises por ESI-MS e ESI-MS/MS.

4.8 Obtenção Química da Caavuranamida a Partir de SCFI - 3

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 3mmol da amina em questão juntamente com 12 mmol de ortoformiato de trietila (**Figura 6.5**, pág. 51). A água destilada ou mistura de água destilada e etanol absoluto na proporção de 1:1, foram utilizados como solvente reacional ($\cong 10$ mL). A mistura da reação foi deixada em refluxo ($T \cong 90$ °C) sob agitação magnética de 1 a 6 dias. Após agitação pelo período necessário, a mistura reacional foi extraída com CHCl₃ (3 x 10mL). Metodologia adaptada de Kaboudin (*et.al.*, 2010) detalhada no **Item 6.3** (pág. 50).

5. TESTES BIOLÓGICOS

5.1 Atividade Antimicrobiana

Os extratos brutos e algumas das frações disponíveis foram avaliados quanto à sua atividade antifúngica e antibacteriana. Estes testes foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) - UNICAMP tendo como colaboradora a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Para os extratos, os microrganismos testados foram: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Enterococcus faecium* CCT 5079, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Rhodococcus equi* ATCC 25729, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermides* ATCC 12228.

No caso dos testes com as bactérias foi utilizado o meio Nutriente Ágar, e para a levedura *C. albicans*, meio Ágar Sabouraud Dextrose.

5.1.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos, de acordo com o método da microdiluição (ELOFF, 1998), descrito a seguir:

Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços foram depositados 100 μL de caldo Mueller-Hinton, com exceção da coluna 12, que foi utilizada para os controles. Na coluna 1 - linha A, foram acrescentados 50 μL da fração ou extrato a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), até a concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Em seguida, 100 μL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindose este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 μL finais foram desprezados. Em seguida, 100 μL de uma suspensão dos microrganismos, de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland n° 0,5 e diluídos para concentração final de 10⁴ células mL⁻¹ foram adicionados. As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 h a 37 °C. Após este período foram acrescentados 50 μL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifenil

tetrazolium) a 0,5 %, e a placa re-incubada por 3 h na referida temperatura. A MIC foi definida como a menor concentração do extrato ou frações capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. Também foram incluídos nos testes, controles dos antibióticos nistatina e cloranfenicol, para confirmação da esterilidade do meio de cultura e do crescimento dos microrganismos.

5.2 Atividade Antiproliferativa (Atividade Antitumoral in vitro)

A avaliação da atividade antitumoral de extratos e frações foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida pelo *National Cancer Institute* (NCI-USA), utilizando nove linhagens tumorais humanas: linhagens U251 (Sistema Nervoso Central, SNC glioma), K562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), HT-29 (colorretal), OVCAR-3 (ovário) e 786-0 (rim), VERO (rim, célula normal, macaco verde) cultivadas em RPMI com 5% de soro fetal bovino.

Estes testes foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicidade do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) - UNICAMP, tendo como colaborador o Dr. João Ernesto de Carvalho.

Os extratos nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg ml⁻¹ foram adicionados em placas de 96 divisões, contendo quatro linhagens por placa. Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético (50 %). Após 60 minutos, o ácido tricloroacético foi removido por aspiração e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após secagem, serem coradas com a sulforrodamina B (SRB). O excesso de SRB foi removido das placas após 10 minutos através de lavagem com ácido acético a 1 %. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de tampão tris base. A leitura óptica foi realizada por leitor de microplacas (elisa) em 560 nm (SHOEMAKER, 2006).

Com os dados obtidos, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração da substância teste.

5.3 Avaliação da Atividade do Extrato em Camundongos <u>Nude</u> Inoculados com <u>M. leprae</u>

Os animais utilizados como modelo experimental, foram camundongos *nude* obtidos do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima em Bauru. Estes foram mantidos conforme normas de bioética animal preconizadas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A amostra foi constituída por três grupos experimentais. Os animais foram inoculados com 10⁴ bacilos/0,03 ml, no coxim plantar, sendo controle (GI); os grupos GII, GIII, foram tratados, com 6 mg/kg e 9,0 mg/kg/dia de extrato, respectivamente. O extrato foi administrado por gavagem, respectivamente a partir do momento das manifestações clínicas da hanseníase, 5 dias por semana, a partir da oitava semana de inoculação, durante 20 semanas. O número de bacilos recuperados nos diferentes grupos foi comparado pelo teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, conforme protocolo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O estudo fitoquímico para os frutos maduros e imaturos de *S. caavurana*, forneceu sete compostos (**Figura 6.1**), sendo todos eles identificados como alcaloides esteroidais pertencentes à classe dos espirossolanos. Suas estruturas foram determinadas predominantemente com base na análise dos espectros de RMN de ¹³C e de DEPT 135, complementadas pelos dados de RMN de ¹H e RMN 2D (HMBC, HSQC e NOESY) quando necessário.

As substâncias **SCFI - 1**, **SCFI - 2**, **SCFI - 3**, **SCFI - 4** e **SCFI - 5** foram encontradas tanto em frutos maduros quanto imaturos, enquanto **SCFM - 1** e **SCFM - 2** apenas dos frutos maduros. Após análise de RMN de ¹³C e DEPT 135 aliados aos experimentos de ESI-MS e ESI-MS/MS propôs-se o esqueleto que consta na **Figura 6.1**. Porém **SCFM - 2** ainda se encontra em fase de confirmação estrutural.

Figura 6.1 Substâncias isoladas dos frutos imaturos e maduros de Solanum caavurana Vell.

Além do estudo fitoquímico realizado para os frutos maduros (VAZ et.al., 2012) e imaturos de *Solanum caavurana* Vell., outras espécies deste gênero foram coletadas (**Tabela 1.1**, pág. 12), e tiveram seus extratos obtidos para o estudo de mapeamento fitoquímico por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray ESI-MS/MS, com injeção direta dos extratos na fonte de ionização (DIMS). Esta técnica é conhecida por ser capaz de promover a rápida identificação de metabólitos secundários de interesse em extratos ainda não fracionados, além da identificação de compostos desconhecidos (BEDAIR et.al., 2008).

Estudos como este são ideais para a compreensão do perfil de metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais da flora brasileira, com redução considerável no tempo de preparo de amostra e de análise, indispensáveis para pronta aplicação em fontes naturais visando o tratamento de doenças, tais como o Mal de Hansen por exemplo.

6.1 Obtenção dos Extratos para o Estudo Fitoquímico

Os extratos para estudo fitoquímico (**Esquema 4.1**, pág. 18) foram obtidos por maceração após serem evaporados em pressão reduzida e terem suas massas determinadas (**Tabela 6.1**).

			Massa dos Extratos (g)			
Espécie	Parte da planta	Quantidade (g)	Extrato Éter de Petróleo (EP)	Extrato Metanólico (EME)	Extrato Hidroetanólico (EHE)	
S. caavurana (SC)	Fruto Imaturo (SCFI)	562,9	3,0	22,7	13,2	
	Tronco (SCT)	785,5	1,5	46,9	ne	
S. diploconos (SD)	Partes Aéreas (SDPA)	243,6	4,0	26,4	12,8	
S. scuticum (SS)	Fruto Imaturo (SSFI)	470,3	14,4	41,2	6,5	

Tabela 6.1 Informações sobre a obtenção dos extratos para o estudo fitoquímico

SC = *Solanum caavurana*; **SD** = *Solanum diploconos*; **SS** = *Solanum scuticum*; **FI** = Frutos imaturos; **PA** = Partes aéreas; **T** = Tronco; **EP** = Extrato em éter de petróleo; **EME** = Extrato metanólico; **EHE** = Extrato hidroetanólico; *ne* = não efetuado.

Após análise com CCD destes extratos usando como reveladores anisaldeído, reagente de Dragendorff e de Marquis, foi possível identificar a presença de alcaloides no EP e EME dos frutos imaturos de *S. scuticum* e somente no EME das partes aéreas de *S. diploconos*. Para *S. caavurana* todos os extratos acusaram a presença de alcaloides.

Usou-se o reagente de Marquis (HARBORNE, 1988) como auxiliar para detecção de alcaloides, uma vez que para os alcaloides esteroidais do gênero *Solanum*, o reagente de Dragendorff muitas vezes fornece apenas um positivo muito fraco como observado no laboratório e descrito também no trabalho de Silva e colaboradores (2005). Os resultados obtidos foram muito eficientes, uma vez que o contraste do revelador de Marquis fornece em alguns casos, positivos muito mais visíveis que o reagente de Dragendorff.

Após obtenção dos extratos foram feitas as extrações de alcaloides dos EME dos frutos imaturos de *S. caavurana* e *S. scuticum* e do EHE de *S. caavurana*, usando as condições que constam no **Item 4.2** (pág. 18). Na **Tabela 6.2** são encontrados os resultados completos e rendimentos obtidos após essas extrações:

Tabela 6.2 Massas e rendimentos obtidos para extrações de alcaloides dos extratos

Espécie	Polaridade do extrato de origem	Massa do extrato (g)	Fração	Código	Massa da fração obtida (g)	Rendimento (%)
S.scuticum		23,1662	Insolúvel	SSFIMFI	7,8303	33,8
Frutos	Metanólico		Neutra	SSFIMFN	0,6015	2,6
Imaturos	Metanonico		Alcaloídica	SSFIMFA	1,1475	4,9
Illiaturos			Perda	-	13,5869	58,7
	Metanólico	23,1885	Insolúvel	SCFIMFI	3,0977	13,6
			Neutra	SCFIMFN	5,9560	26,4
			Alcaloídica	SCFIMFA	0,3048	1,3
			Ppt. Alcaloídico	SCFIMPA	3,5864	15,8
S.caavurana			Perda	-	9,7336	42,9
Frutos	Hidroalcoólico	12,4811	Insolúvel	SCFIHFI	1,9394	15,5
Imaturos			Neutra	SCFIHFN	2,2505	18,0
			Alcaloídica	SCFIHFA	0,7445	6,0
			Ppt. Alcaloídico	SCFIHPA	2,1150	16,9
			Perda	-	5,4317	43,6

Ppt. = precipitado.

Antes do fracionamento, uma pequena porção dos extratos e das frações obtidas após procedimento de extração para alcaloides, foi reservada e destinada aos testes de atividades biológicas (**Item 5**, pág. 35). Neste trabalho foram avaliadas as atividades: antitumoral, antimicrobiana e antileprótica (hanseníase). Outra pequena massa dos extratos foi destinada à análise de mapeamento fitoquímico por ESI-MS/MS.

6.2 Identificação dos Metabólitos Secundários dos Frutos de Solanum caavurana

O fracionamento dos extratos obtidos a partir dos frutos maduros e imaturos de *S. caavurana* resultou na identificação de sete substâncias conforme detalhado na **Tabela 6.3** a seguir. Pelas observações prévias de seus perfis espectrais no RMN de ¹H e análise dos

dados de RMN de ¹³C e DEPT 135, aliado ao resultado positivo frente a reagente de Dragendorff, foi possível determinar que todos os compostos isolados fossem pertencentes à classe dos alcaloides esteroidais com esqueleto do tipo espirossolano.

Tabela 6.3 Substâncias isoladas dos frutos maduros a e imaturos b de *Solanum caavurana*

Composto	Estrutura da substância isolada	Fração de origem	Massa (mg)
	H	SCFIMFN F.31-13-3-3	7,7
SCFI - 1	H _I H	SCFIMFN F.31-23-3	1,4
	HO' $\stackrel{\circ}{H}$ rel-(22S,25S)-3β-hidroxi-5α-espirossolano ou tomatidina ^{a,b} (9)	SCFMDFI F.44	1,4
	H	PAFISC F.61 (teste)	6,4
SCFI - 2	H H H	SCFIMPA F.60-76 ppt	7,7
5011 2	H_2N H	SCFIMPA F.110-145 (F.25)	15,1
	rel-(22S,25S)-3α-amino-5α-espirossolano ^b (15)	SCFMDFI F.83-85	5,3
	H	PAFISC F.69 (teste)	23,2
		SCFIMPA F.110-145 (F.39)	60,5
SCFI - 3	H_2N H H	SCFIMPA F.110-145 (F.49)	42,5
	H	SCFIMPA F.110-145 (F.145)	22,7
	rel-(22S,25S)-3β-amino-5α-espirossolano ou soladunalinidina b (16)	SCFMDFI F.83-85	3,2
	H\ N=	VAZ et.al., 2008	
	H	VAZ et.al., 2012	
SCFI - 4	O H H	SCFIMFN F.31 (4)	5,4
	Н	SCFMDFN F.59(2')	2,3
	rel-(22 S ,25 S)-5 α -espirossol-3-ona ou 5 α -tomatidan-3-ona ^{a,b} (7)	SCFIMFN F.31-13-3-1	≅ 1 , 0
SCFI - 5	H	VAZ et.al., 2008	
	HHHH	VAZ et.al., 2012	
	rel-(22S,25S)-4en-espirossol-3-ona ou 4-tomatiden-3-ona ^{a,b} (6)	SCFIMFN F.31 (13)	6,9

A seguir serão apresentadas as elucidações estruturais para os alcaloides esteroidais isolados neste trabalho.

6.2.1 Determinação Estrutural de SCFI - 1 – Tomatidina

Durante o tratamento cromatográfico de **SCFIMFN**, oriundo dos frutos imaturos de *S.caavurana*, **SCFI - 1** foi obtido como um sólido cristalino em formato de agulhas finas, de coloração bege, que forneceu resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff, apresentando uma cor azul bastante intensa quando revelada em CCD com anisaldeído e posterior aquecimento. Por não apresentar grupos cromóforos, sua detecção não pode ser efetuada em luz UV nos comprimentos de onda testados (λ = 254 e 366 nm).

SCFI - 1 *rel*-(22*S*,25*S*)-3β-hidroxi-5α-espirossolano ou tomatidina (9)

Sua fórmula molecular $C_{27}H_{45}NO_2$ (MM calcd. = 416,3523 Da) foi obtida a partir do sinal referente à molécula protonada $[M+H]^+$ no espectro de massas *full scan* em m/z

416,3532 (erro = 2,3 ppm), obtido a partir da análise de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (**Espectro EM.1**, Anexo II, pág. 111). Os demais dados referentes à sua fragmentação podem ser encontrados na **Tabela 6.12** (pág. 62).

A análise do espectro de RMN de 13 C (**Espectro EI.2**, Anexo II, pág. 94), permitiu claramente determinar a presença de 27 sinais que ocorrem predominantemente na região dos carbonos sp³, característico dos alcaloides esteroidais, os quais foram atribuídos, com auxílio do espectro de DEPT 135 (**Espectro EI.3**, Anexo II, pág. 95), como sendo a tomatidina (**9**). Sinais típicos tais como a presença de um carbono ligado a uma hidroxila, ocorrendo em $\delta_{\rm C}$ 71,3ppm (que é o substituinte mais comum em C-3 para esse tipo de substância) além da ausência de sinais na região dos carbonos sp², [descartando a hipótese de que **SCFI-1** se tratasse da solasodina (**8**) que possui uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6], foi determinante para sua elucidação.

Outros carbonos típicos desse tipo de esqueleto são o C-16 ocorrendo em δ_C 78,7ppm e o C-22 (δ_C 98,8ppm), este último caracterizando a presença do anel aminoespirocetal, que em união com os sinais de C-23 (δ_C 26,6ppm), C-24 (δ_C 28,4ppm) e C-26 (δ_C 50,0ppm), determinam a configuração relativa (22*S*:25*S*) típica da tomatidina (9) quando comparando os deslocamentos desses carbonos com o da outra configuração possível em C-22 e C-25, encontrada na solasodina (8) (**Figura 6.2**).

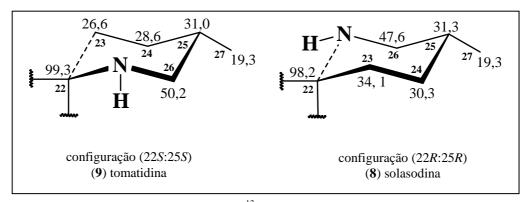


Figura 6.2 Deslocamentos de RMN de ¹³C (em ppm) característicos para os anéis F de alcaloides esteroidais de *Solanum* com esqueleto do tipo espirosolano (RADEGLIA *et.al.*, 1977).

Pelo espectro de RMN de 1 H (**Espectro EI.1**, Anexo II, pág. 94), tem-se o H-16 em $\delta_{\rm H}$ 4,13 ppm (dd), devido ao acoplamento com os hidrogênios H-15 e H-17. Todos os sinais coincidem com os valores da literatura como observado na **Tabela 6.4** (Anexo I, pág. 86), sendo que a tomatidina (**9**) é uma substância bastante comum encontrada em plantas dos gêneros *Solanum* e *Lycopersicon* (Solanaceae).

Esta substância também pode ser identificada nos frutos maduros de *S.caavurana* (em **SCFMDFI F.44**) após análise dos respectivos espectros de massas *full scan* (em *m/z* = 416,3533) e sequencial (ESI-MS/MS) onde foi possível perceber que esta, apresentara os mesmos íons fragmentos que **SCFI - 1** e com intensidades bastante semelhantes. Diante deste fato, é possível inferir que a técnica de espectrometria de massas, foi extremamente proveitosa e vantajosa na identificação desse composto no extrato em CH₂Cl₂ dos frutos maduros, uma vez que **SCFI - 1** foi isolado em pouquíssima massa (1,4mg), tendo sua identificação por RMN dificultada nas condições experimentais adotadas.

6.2.2 Determinação Estrutural de SCFI - 2 e SCFI - 3

Durante o fracionamento do precipitado alcaloídico do extrato metanólico dos frutos imaturos de *Solanum caavurana* Vell. (**SCFIMPA**) foram isolados, em várias frações, os compostos (22S,25S)-3 α -amino-5 α -spirosolano (**15**) e (22S,25S)-3 β -amino-5 α -spirosolano (**16**), sendo o último conhecido como soladunalinidina (**Tabela 6.3**, pág.41).

$$H_{2}N$$
 H_{3}
 H_{4}
 H_{5}
 H_{7}
 $H_{$

SCFI - 2 rel-(22S,25S)-3 α -amino-5 α -espirossolano (15)

SCFI - 3 rel-(22S,25S)-3 β -amino-5 α -espirossolano ou soladunalinidina (16)

Os dados dos espectros de RMN de 13 C desacoplado para ambos os compostos (**15**) e (**16**) – **Tabela 6.5** e **6.6** respectivamente, (disponíveis no Anexo I, págs. 87 e 88) também apresentaram 27 sinais de carbono distribuídos principalmente na região de carbonos sp³. Destes, a maioria dos sinais obtidos, possui deslocamentos químicos praticamente idênticos (C-7 / C-27) para ambos os compostos, **SCFI - 2** e **SCFI - 3**. Porém, os átomos de carbono dos anéis A e B (C-1 até C-10) mostraram padrões distintos quanto aos seus deslocamentos químicos, dependendo da orientação do substituinte amino (-NH₂) localizado no carbono C-3 (α ou β), $\delta_C \cong 45,9$ ppm (**15**) e $\delta_C \cong 51,0$ ppm (**16**) respectivamente.

Os demais sinais em comum, principalmente C-16 ($\delta_C \cong 78,5ppm$), C-22 ($\delta_C \cong 99,0ppm$) e C-26 ($\delta_C \cong 50,2ppm$) para ambas as substâncias, confirmam que a classe do esqueleto alcaloídico em questão, trata-se do tipo espirossolano mais especificamente com configuração relativa (22*S*-25*S*) como aquele já determinado para **SCFI - 1**, a tomatidina (9).

A presença de dois sinais referentes a carbonos nitrogenados em $\delta_C \cong 45,9ppm$ e 50,3ppm (15) e $\delta_C \cong 51,0ppm$ e 50,2ppm (16), aliada ao fato de previamente atribuir-se $\delta_C \cong 50,2ppm$ para C-26, forneceu a evidência de que restava um carbono nitrogenado. Também a ausência de quaisquer sinais nos espectros de RMN de ^{13}C em torno de $\delta_C \cong 71,0ppm$, eliminou a possibilidade destes alcaloides, serem espirossolanos 3-hidróxisubstituídos, tais como a solasodina (8) e a tomatidina (9) que são de ocorrência bastante comum como relatado anteriormente. Logo, a presença de um carbono nitrogenado extra, sugeriu que SCFI - 2 e SCFI - 3 fossem alcaloides da classe dos 3-aminoespirossolanos. De fato, SCFI - 2 difere de SCFI - 3 apenas pela configuração do grupo amino presente no C-3. Sua similaridade refletiu diretamente na semelhança dos deslocamentos químicos observados (C-7 até C-27) nos espectros de RMN de ^{13}C para ambos os compostos como mencionado anteriormente (Tabelas 6.5 e 6.6, Anexo I, págs. 87 e 88).

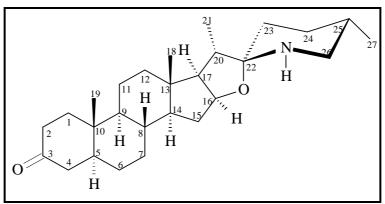
Alcaloides do grupo dos 3-aminoespirossolanos possuem ocorrência bastante rara na família Solanaceae, particularmente **SCFI - 2** e **SCFI - 3** só foram relatados anteriormente em *S. dunalianum* (BIRD *et.al.*, 1979; MAXWELL *et.al.*, 1996) e *S. arboreum* (MAXWELL *et.al.*, 1996) respectivamente.

Por se tratarem de compostos já conhecidos, as elucidações estruturais só foram feitas a partir da análise dos dados de RMN de ¹³C aliado ao DEPT 135 e estes estão de acordo com a literatura como evidenciado nas **Tabelas 6.5** e **6.6** (Anexo I, págs. 87 e 88). Futuramente experimentos de HSQC e HMBC poderão ser solicitados para atribuição dos

sinais de RMN de ¹H. Os dados referentes aos estudos de Espectrometria de Massas para ambos os compostos podem ser encontrados na **Tabela 6.12** (pág. 62).

6.2.3 Determinação Estrutural de SCFI - 4 - 5 & tomatidan-3-ona

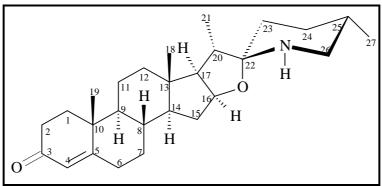
O composto **SCFI - 4**, isolado da fase neutra do extrato em metanol de frutos imaturos de *S. caavurana*, mostrou se tratar da 5α-tomatidan-3-ona (7) após comparação com os dados espectrais já publicados (NAGAOKA *et.al.*, 1993) e com aqueles previamente obtidos em nosso grupo de pesquisa (VAZ, 2008) e recentemente publicados (VAZ *et.al.*, 2012), como observado na **Tabela 6.7**, disponível no Anexo I (pág. 89).



SCFI - 4 *rel*-(22*S*,25*S*)-5α-espirossol-3-ona ou 5α-tomatidan-3-ona (**7**)

6.2.4 Determinação Estrutural de SCFI - 5 - 4-tomatiden-3-ona

O composto **SCFI** - **5** foi encontrado na fase neutra de ambas as extrações para alcaloides dos extratos em metanol, tanto dos frutos maduros quanto imaturos de *S.caavurana*. Após análise dos seus dados de RMN de 13 C e comparação dos respectivos espectros de massas *full scan* (m/z = 412,3207) e espectros de massas sequenciais (ESI-MS/MS), o composto mostrou se tratar da 4-tomatiden-3-ona (**6**), já isolado e devidamente caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa (VAZ, 2008).

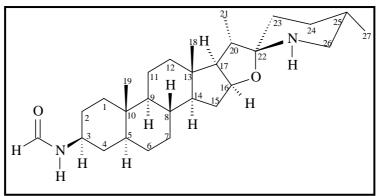


SCFI - 5 (**6**) (22*S*,25*S*)-espirossol-4-en-3-ona ou 4-tomatiden-3-ona.

Esses dados foram recentemente publicados (VAZ *et.al.*, 2012), e as atribuições como pode ser observado na **Tabela 6.7** (Anexo I, pág. 89), refletem que a diferença fundamental entre **SCFI - 4** e **SCFI - 5** é a presença de uma insaturação entre os carbonos 4 e 5.

6.2.5 Identificação estrutural de SCFM-1 - caavuranamida

A substância isolada **SCFM-1** foi identificada como sendo caavuranamida (**5**), já isolada anteriormente no estudo da fração rica em alcaloides dos frutos maduros de *S. caavurana* (VAZ, 2008). Esse composto foi obtido como um pó amorfo e amarelado. Todos os seus dados espectrais foram recentemente publicados (VAZ *et.al.*, 2012).



SCFM - 1 rel-(22S,25S)-3β-N-formilamino-5 α -espirossolano ou cavuranamida (5)

Pela análise dos espectros de RMN de 13 C (**Espectro EVI.2**, Anexo II, pág. 102) e DEPT 135 (**Espectro EVI.3**, Anexo II, pág. 102), pode-se determinar mais uma vez a presença dos carbonos típicos que caracterizam o esqueleto do tipo espirosolano, com C-16 ocorrendo em δ_C 78,5ppm e C-22 em 99,4 ppm. Além disso, pelo espectro de RMN de 1 H

(**Espectro EVI.1**, Anexo II, pág. 101), tem-se o H-16 carbinólico em $\delta_{\rm H}$ 4,12 ppm (*ddd*), devido ao acoplamento com os hidrogênios H-15a, H-15b e H-17. A presença do grupo *N*-formil em C-3, foi proposta ainda pela a análise do espectro de RMN de ¹H onde dois sinais, um em $\delta_{\rm H}$ 8,12 ppm (*m*) e outro em $\delta_{\rm H}$ 3,85 ppm (*m*) apontaram a presença de hidrogênio de função aldeído e do hidrogênio ligado ao C-3 respectivamente. O sinal largo e pouco intenso observado em $\delta_{\rm H}$ 5,35 ppm (*m*) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo *N*-formil, semelhantemente ao observado para a solanopubamida A (**18**) por Kumari e colaboradores (1986).

(18) solanopubamida A

A presença do grupo formamida atribuída pelo sinal em δ_H 8,12 ppm (m) no espectro de RMN de 1H , foi confirmada, no espectro de RMN de 1G C, pela presença de uma carbonila de amida no deslocamento de δ_C 160,3 ppm. Os dados para os demais carbonos constituintes da porção esteroidal (C-9 a C-27), tem estereoquímica coincidente com **SCFI** - **1**, a tomatidina (**9**) e cujos dados espectrais são semelhantes à mesma. Da mesma forma os valores obtidos para deslocamentos químicos nos espectros de RMN de 1H e de 1G C remanescentes (**Tabela 6.8**, Anexo I, pág. 90), foram atribuídos por comparação com o alcalóide esteroidal caavuranamida (**5**) isolado anteriormente (VAZ, 2008).

Outra característica observada é a presença das metilas C-18, C-19, C-21 e C-27, cujos sinais no RMN de 13 C e de 1 H ocorrem, respectivamente, em 16,9 ppm (0,84 ppm; s); 12,3 ppm (0,83 ppm; s); 15,9 ppm (0,96 ppm; d) e 19,3 ppm (0,86 ppm; d).

Com estes dados pôde-se concluir que o composto em questão é um alcaloide esteroidal denominado caavuranamida (5) [rel-(22S:25S)-3β-N-formilamino-5α-espirossolano], da classe dos espirossolanos que são compostos predominantes no gênero *Solanum*. Este produto natural só foi encontrado até o momento nos frutos maduros de S.

caavurana Vell (VAZ et. al., 2012). Trata-se da segunda formamida obtida no gênero (KUMARI et. al., 1986).

Também foi efetuado o experimento de NOESY (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*) (**Espectro EVI.4**, Anexo II, pág. 103), para corroborar a atribuição dos deslocamentos químicos (RMN de ¹H e de ¹³C), e principalmente para a correta determinação da configuração relativa dos carbonos estereogênicos. Nesta análise foi possível confirmar a estereoquímica relativa proposta para a substância caavuranamida (**5** – **Figura 6.3**), tais como a junção *trans* dos anéis A/B, a junção *cis* dos anéis D/E e também, a configuração (25*S*)-22β*N*-espirosolano [conforme observado para a tomatidina (**9**)] e a orientação do grupo 3β-*N*-formilamino.

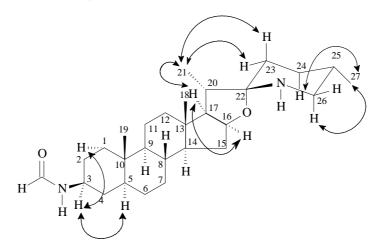


Figura 6.3 Correlações relevantes observadas no NOESY 2D para a caavuranamida (5).

Um forte NOE (*nuclear Overhauser effect*) foi observado entre os sinais de C \underline{H}_3 -27 (δ_H 0,86) com os sinais de H-26 (δ_H 2,74) e H-24 $_{ax}$ (δ_H 1,37), indicando que CH₃-27 se encontrava na posição equatorial. Correlações intensas também puderam ser observadas entre C \underline{H}_3 -21 (δ_H 0,96) com H-17 (δ_H 1,60), H-23 (δ_H 1,66 e 1,34) e H-16 (δ_H 4,14), sugerindo uma configuração relativa S para C-22 e a junção cis dos anéis D/E. A orientação axial de H-5 (δ_H 1,18) foi suportada pelas correlações intensas com H-9 $_{ax}$ (δ_H 0,69) e H-3 $_{ax}$ (δ_H 3,86). Esta última informação denota que o substituinte N-formilamino localizado em C-3 está com configuração 3 β -N. Todos os fatos descritos suportam a configuração relativa rel-(25S,22S)-3 β -N-formilamino-5 α -espirostano a qual está em concordância com solanopubamida A (18 KUMARI et.al., 1986) e com os dados relatados para (22S,25S)-3 β -amino-5 α -espirossolanos (MAXWELL et.al., 1996).

Outras análises foram feitas para completar sua caracterização, tais como: determinação do ponto de fusão: PF = 115 - 117 °C; cálculo do desvio óptico: $[\alpha]_D^{25}$ = +

6,3 (CHCl₃; c 0,0027) e a obtenção de seu espectro na região do infravermelho: IV (KBr) (**Espectro EVI.5**, Anexo II, pág. 103) v_{max}/cm^{-1} : 3429, 2930, 2852, 2362, 2341, 1656, 1543, 1456, 1383, 1264, 1037, 973, 872, 750 e 668.

6.3 Obtenção Química da Caavuranamida a Partir de SCFI-3

O isolamento dos isômeros 3α e 3β aminoespirosolanos [SCFI - 2 (15) e SCFI - 3 (16)] dos frutos imaturos de *S. caavurana* e da 3β -N-formilespirosolano [SCFM - 1 (5)], esta última inédita na literatura, nos fez propor a síntese de ambos os isômeros 3α e 3β N-formilaminoespirosolanos para estudos da configuração no C-3 através de RMN (**Esquema 6.1**).

$$H_{2N}$$
 H_{2N}
 H

Esquema 6.1 Proposta para obtenção dos 3-*N*-formilaminoespirossolanos nas configurações 3α e 3β a partir dos 3-aminoespirossolanos (3α e 3β) isolados.

Para o início dos estudos de otimização dos parâmetros necessários para conduzir a reação de *N*-formilação do produto natural isolado, tentou-se primeiramente utilizar a metodologia descrita por Krishnakumar (*et.al.*, 2011) que utiliza como agente de formilação, o ácido fórmico e catalisador, óxido de titânio (TiO₂-P25). Como composto modelo foi utilizada a anilina (**Figura 6.4**):

Figura 6.4 Reação de *N*-formilação da anilina, catalisada com ácido fórmico e TiO₂-P25.

Essa metodologia funcionou muito bem para a anilina, onde ocorreu a formação do produto esperado e com alto rendimento. Este fato foi devidamente corroborado após análise dos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C. Porém em se tratando de uma catálise ácida (em ácido fórmico), quando essas condições foram testadas na *N*-formilação do produto natural, foi observada a degradação de **SCFI - 3** com a provável abertura do anel aminoespirocetal (anel F) em meio ácido. Logo, a *N*-formilação de **SCFI - 3** só pode ser efetuada, utilizando ortoformiato de trietila, em meio hidroetanólico (50%), uma vez que **SCFI - 3** é insolúvel em água (**Figura 6.5**):

Figura 6.5 Reações de N-formilação de SCFI-3.

O produto formado a partir da reação demonstrada acima partindo do isômero 3β foi eficiente e mostrou se tratar efetivamente do composto **SCFM** - **1**, após comparação de seus dados espectrais de RMN de ¹H e RMN de ¹³C, suportados pelos dados obtidos nos experimentos de HMBC e HSQC, com os da substância natural isolada [**SCFM** - **1** (**5**)] (**Tabela 6.9**, Anexo I, pág. 91). As atribuições dos deslocamentos químicos do produto obtido por via química estão em coerência com aqueles descritos no **Item 6.2.5** (pág. 47) para o produto natural isolado **SCFM** - **1**. Além disso, os espectros de massas *full scan* (ESI-MS) e sequencial (ESI-MS/MS) do produto e de **SCFM** - **1** estão coincidentes.

Para o isômero 3α [SCFI - 2 (15)], a reação não ocorreu nas mesmas condições, não sendo possível isolar nenhum produto. Mas numa avaliação do meio reacional por EM, acusou em quantidades mínimas em relação ao reagente, a formação do produto esperado. Isso leva a considerar que a conformação de SCFI - 2 (15) deve causar um impedimento estérico ao substituinte em C-3 fazendo com que a reação ocorra muito mais lentamente que para o isômero 3β [SCFI - 3 (16)]. Novas tentativas alterando as condições reacionais serão realizadas.

6.4 Testes de Atividade dos Extratos vegetais

Extratos brutos e frações obtidas da extração para alcaloides (**Esquema 4.2**, pág. 20) foram submetidos à avaliação quanto as suas atividades antimicrobiana (**Tabela 6.10**, Anexo I, pág. 92) e antiproliferativa *in vitro* (**Tabela 6.11**, Anexo I, pág. 93), conforme procedimentos descritos no **Item 5** (pág. 35).

6.4.1 Atividade Antimicrobiana

De acordo com a **Tabela 6.10** (Anexo I, pág. 92), os extratos obtidos a partir de *S. caavurana* foram os mais ativos contra uma ampla variedade de microrganismos testados. Esta espécie mostrou ser um excelente antifúngico, visto que todos os extratos apresentaram MIC muito inferior ao controle positivo nistatina quando testados contra *C. albicans*: o extrato em metanol do tronco e o extrato em éter de petróleo dos frutos imaturos foram seletivos para este fungo com MICs 2 e 62 μg mL⁻¹ respectivamente apresentando atividade potente quando comparados com o controle adotado (MIC 50 μg mL⁻¹).

Contra *B. subtilis* foram considerados ativos os extratos **SCFMDFN** (MIC 30 μg mL⁻¹), **SCFIMFN** (MIC 31 μg mL⁻¹), **SCFIMPA** (MIC 15 μg mL⁻¹) e **SCFIMFA** (MIC 31 μg mL⁻¹) onde o controle cloranfenicol apresentou MIC de 20 μg mL⁻¹.

Para *E.coli* as frações ricas em alcaloides **SCFIMFA** e **SCFIMPA** foram mais potentes que o controle adotado (MIC 40 μg mL⁻¹) ambos apresentando MICs 31 μg mL⁻¹. O mesmo foi observado para *E. faecium* onde **SCFIMFN**, **SCFIMFA** e **SCFIMPA** (todos com MIC 31 μg mL⁻¹) onde foram muito mais potentes que o cloranfenicol que apresentou MIC de 70 μg mL⁻¹.

Os extratos obtidos de *S. scuticum* e *S. diploconos* foram pouco ativos para todos os microrganismos testados sendo seletivos para o microrganismo *S. choleraesuis* apresentando MIC de 300 e 700 µg mL⁻¹ respectivamente, enquanto o extrato hidroalcoólico de *S. diploconos* foi seletivo para *R. equi* com MIC 900 µg mL⁻¹. Os extratos brutos mais ativos foram aqueles obtidos dos frutos imaturos de *S. caavurana*.

O extrato etanólico obtido dos frutos maduros de *S.caavurana*, não mostrou atividade significativa frente a nenhum dos microrganismos testados. Contudo suas subfrações oriundas de partição liquido-líquido com diclorometano (CH₂Cl₂) e álcool *n*-butílico (*n*-butOH), e incluindo também aquelas provenientes da extração alcaloídica

descrita pelo **Esquema 4.2** (pág. 20), apresentaram forte atividade para *E. coli, M. luteus, R. equi, B. subtilis* e *E. faecium*, sendo similares e em alguns casos até superiores que o controle positivo cloranfenicol para alguns microrganismos testados. A maioria dos resultados obtidos para *S.caavurana* são promissores uma vez que se referem a extratos brutos que são considerados ativos até a concentração de 1000 μg.mL⁻¹ (SARTORATTO *et.al.*, 2004).

6.4.2 Atividade Antitumoral

De acordo com Fouche (*et.al.*, 2006) a atividade antitumoral pode ser categorizada para fins de estudo: o extrato pode ser considerado inativo (TGI > 50ppm), pode apresentar uma atividade fraca (15ppm < TGI < 50ppm), apresentar atividade moderada (6,25ppm < TGI < 15ppm) ou ter uma atividade potente (TGI < 6,25ppm). Os resultados do teste de atividade antiproliferativa (antitumoral) obtidos para os extratos de algumas espécies de *Solanum* estudadas está mostrado na **Tabela 6.11** (Anexo I, pág. 93) apresentando os resultados na forma de concentrações em ppm (μg.mL⁻¹) de "*Total Growth Inhibition -TGI*", ou seja, trata-se da concentração inibitória para crescimento total da linhagem da célula cancerígena. Diante disso, foi observado que alguns dos extratos brutos e frações oriundas das extrações para alcaloides mostraram ser bastante ativos para algumas linhagens de células tumorais humanas.

Todos os extratos considerados potentes foram obtidos a partir de *S. caavurana*, onde o extrato em etanol dos seus frutos maduros com TGI = 2,11 ppm contra células de melanoma, **SCFIMPA** com TGI = 6,4 ppm contra células de leucemia e TGI = 1,4 ppm contra células de câncer de ovário, o **SCTM** com TGI = 5,0 ppm sendo seletivo para câncer de ovário e, **SCFIMFI** e **SCFIMFN** do extrato em metanol de *S.caavurana* com TGI 2,1 e 4,8 ppm ambos para células de câncer de ovário.

Os extratos que apresentaram atividade considerada como moderada também são oriundos de *S. caavurana*: **SCFMDFN** com TGI de 8,09 para células de melanoma, **SCFIMFA** com TGI de 9,3 para células de câncer de ovário. A única atividade pronunciada para os extratos de *S. scuticum* representada por **STFIFA** com TGI 11,8 para células de leucemia, indicando que esse extrato é seletivo para esta linhagem.

54

6.4.3 Atividade Antileprótica

Devido ao relato de uso etnofarmacológico de *S.caavurana* para o tratamento da hanseníase (CORRÊA, 1984), os testes para determinar a atividade antileprótica foram realizados em parceria com o Instituto Lauro Souza de Lima (ILSL - Bauru/SP) sob responsabilidade do Dr. Dejair Caitano do Nascimento. Os resultados se encontram na sequência.

A mediana, a soma e média dos ranks, nos respectivos grupos foi:

GI (n=8): 20,00; 112,00; 14,00;

GII (n=8): 21,00; 125,00; 15,62;

GIII (n=10): 13,80; 114,00; 11,40. P = 0,4938.

Os resultados obtidos neste estudo não foram considerados promissores uma vez que o extrato de *S. caavurana* não reduziu a proliferação bacilar *in vivo*, apesar de haver relatos sobre sua ação antiproliferativa, *in vitro*. Os resultados indicam que as dificuldades dos estudos com extrato bruto são as limitações no tocante às informações quali e quantitativas e acerca das substâncias ativas no extrato, além de propriedades físico-químicas dos ativos que assegure sua interferência com bacilo.

6.5 Estudo dos Mecanismos de Fragmentação de Alcaloides Esteroidais

O gênero *Solanum* é rico em alcaloides esteroidais glicosilados ou não e seu isolamento e identificação não é uma tarefa fácil. Devido a isso, a identificação por EM desses compostos é muito útil para posterior utilização dessa informação em estudos de desreplicação, ou seja, identificação dessa classe de compostos em outras espécies de *Solanum*, sem necessariamente precisar isolá-los.

Em busca recente na literatura foi encontrado o trabalho de Cataldi (*et.al.*, 2005) que tinha como objetivo, analisar os glicoalcaloides do tomate [*Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae)] pela técnica de LC-ESI-MS/MS. Neste trabalho eles também identificaram a presença da aglicona tomatidina [SCFI-1 (9)] no extrato e, baseando-se nos mecanismos de fragmentação de saponinas esteroidais por FAB-MS/MS (LIANG *et.al.*, 2002), propuseram o mecanismo de fragmentação de SCFI-1 (9) pela técnica de ESI-MS/MS, como representado pelas **Figuras 6.6** e **6.7** (págs. 55 e 56 respectivamente).

De acordo com os autores ocorre inicialmente uma perda neutra de água, através de um processo de rearranjo no anel E, originando o íon de m/z 398, a partir da molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z 416 conforme representado na **Figura 6.6**:

$$R$$
 $M/2$
 $M/$

Figura 6.6 Racionalização do processo de desidratação comum a glicoalcaloides esteroidais e à aglicona tipo espirossolano tomatidina [**SCFI - 1** (**9**)], conforme proposto por CATALDI *et.at.*, 2005.

Isto demonstra que as perdas de água são comuns para todos os íons contendo agliconas do tipo espirossolano, independentemente do tipo de substituinte –R localizado no C-3 (CATALDI *et.al.*, 2005). Paralelamente este íon (com *m/z* 416), pode originar outros dois íons em *m/z* 273 e 255, envolvendo agora a clivagem da ligação C-N do carbono espirossolano no anel F, através de um mecanismo de fragmentação que é similar àquele observado para outras saponinas esteroidais (LIANG *et.al.*, 2002), conforme ilustrado na **Figura 6.7** (pág. 56).

Trata-se de uma proposta pouco provável, uma vez que migrações de hidreto em fase gasosa são bastante raros. Porém essas evidências fornecem subsídios para propor que a desidratação posterior ocorre em outro local da molécula além do anel E.

Por sua vez Claeys (*et.al.*, 1996) estudou o processo de fragmentação (FAB-MS/MS de baixa energia) de glicoalcaloides esteroidais e algumas de suas agliconas, entre elas a tomatidina (9) e a solasodina (8), com esqueleto do tipo espirossolano e a demissidina (19) e a solanidina (13), ambas com esqueleto do tipo solanidano.

Figura 6.7 Mecanismo de clivagem dos anéis E e F da aglicona esteroidal do tipo espirossolano tomatidina [**SCFI - 1** (9)] proposto por Cataldi *et.at.*, 2005. Reação de eliminação para a perda de 143Da. A perda neutra de H₂O também está ilustrada (m/z 273 → 255).

Os autores citam que dissociações envolvendo energias brandas resultam de dois mecanismos gerais: fragmentações dirigidas por carga (*driven charge fragmentations*) ou por carga remota ou à distância (*remote charge fragmentations*). As fragmentações dirigidas por carga parecem dominar o espectro de massas de compostos contendo anéis saturados: essas reações resultam na perda de partes da cadeia lateral como espécies neutras e fornecem informações úteis sobre isômeros estruturais. Já as fragmentações por carga remota são mais intensas na presença de insaturações e também fornecem informações sobre as posições das mesmas ou de grupos hidróxi ou ceto nos anéis (CLAEYS *et.al.*, 1996).

Para o composto **SCFI-1** (9) os autores propuseram o mecanismo descrito na **Figura 6.8** (pág. 57).

Figura 6.8 Mecanismos que racionalizam a formação de *m/z* 273 e 161, no espectro CID da tomatidina (9) **SCFI - 1**. (Fonte: CLAEYS *et.al.*, 1996).

Eles também acreditam que os íons com m/z 273 observados no espectro, possam ser interpretados como oriundos da fragmentação do anel E, que é algo plausível, uma vez que origina cátions alílicos estabilizados por ressonância. Porém mais uma vez como já discutido anteriormente, é pouco provável que esses mecanismos ocorram via migração e rearranjo de hidreto visto que essas vias são raras em fase gasosa. Já os íons com m/z 255 podem ser formados pela perda de água (em C-3) a partir dos íons m/z 273 e também pela fragmentação dos íons $[M + H - H_2O]^+$ (m/z 398) conforme representado na **Figura 6.8**.

Para Claeys (*et.al.*, 1996) o íon de *m/z* 255 pode ser formado diretamente de *m/z* 398 uma vez que eles analisaram o espectro de íons produtos. Também propuseram que a formação dos fragmentos com *m/z* 161 e 147 podem ser racionalizados como resultado da perda de água e de múltiplas clivagens no anel C, o que é plausível, uma vez que a fragmentação ocorre por mecanismo dirigido por carga, resultando novamente em íons alílicos estabilizados por ressonância como sugerido na **Figura 6.8**.

Partindo-se dos dados anteriormente publicados e discutidos, o presente trabalho visa colaborar com o conhecimento acerca dos processos de fragmentação da classe dos espirossolanos, estudando os mecanismos de fragmentação das demais agliconas da classe dos espisorrolanos (**Tabela 6.3**, pág. 41), isoladas dos frutos de *S. caavurana* pela técnica de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray ESI-MS/MS.

6.5.1 Mecanismos de Fragmentação dos Espirossolanos por ESI-MS/MS

Todos os alcaloides esteroidais estudados no presente trabalho pertencem à classe dos espirossolanos. Foi possível identificar pelo espectro de massas sequencial algumas semelhanças entre suas fragmentações como será discutido a seguir.

O **Espectro EM.1** (Anexo II, pág. 111) mostra o espectro de massas em alta resolução (*full scan*) obtido para o composto **SCFI - 1** em modo positivo, mostrando a presença de um íon intenso com m/z 416,3532 referente à molécula protonada do composto **SCFI -1** (9). Para verificar seu perfil de fragmentação, foi realizada a técnica de dissociação induzida por colisão (CID) e o espectro de massas sequencial encontra-se representado no **Espectro EM.2** (Anexo II, pág. 112).

Os fragmentos obtidos no espectro de massas dos íons produtos de **SCFI-1** (*m/z* 416,3532) são bastante semelhantes àqueles já descritos para a tomatidina (9) (CLAEYS *et.al.*, 1996; CATALDI *et.al.*, 2005), onde se percebe que o processo predominante na fragmentação de alcaloides com esqueleto do tipo espirossolano, trata-se de uma perda inicial de água (18 Da), provavelmente oriunda do oxigênio presente no anel E, via mecanismo de fragmentação por carga remota ou à distância, representado na **Figura 6.9**:

$$\begin{array}{c} & & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & \\ & & & \\ & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ &$$

Figura 6.9 Mecanismo proposto para a perda neutra de água (18Da) no anel E: característica dos alcaloides esteroidais da classe dos espirossolanos.

Esta proposta é mais coerente, diferente daquela encontrada na literatura uma vez que é muito rara a ocorrência de rearranjo de hidreto em fase gasosa como proposto anteriormente por Claeys e colaboradores (1996), e representado previamente pela **Figura 6.8** (pág. 57).

Propõe-se que esta primeira perda neutra de H_2O seja realmente proveniente do anel E, considerando inicialmente a protonação no oxigênio, uma vez que ela ocorre em todas as substâncias isoladas (independente do tipo de substituinte -R presente no C-3), o que não impede eliminações competitíveis para compostos com -R = -OH. Essa fragmentação é bastante favorecida, uma vez que origina um carbocátion terciário em C-22, bastante estável devido à ocorrência de ressonância com o par de elétrons do átomo de nitrogênio vizinho.

Outra característica dos alcaloides esteroidais com esse tipo de esqueleto é a perda posterior de 143 Da, considerando inicialmente a protonação no nitrogênio, observada para todas as substâncias e que caracteriza a fragmentação do anel F, e a perda da cadeia lateral, conforme mostrado na **Figura 6.10**.

assistência anquimérica
$$R^{H}$$

$$R^{H$$

Figura 6.10 Mecanismo proposto para a perda dos anéis E e F (143 Da): característica dos alcaloides esteroidais da classe dos espirossolanos.

formação do carbocátion alílico

De acordo com Crotti e colaboradores (2006), a ionização para grande parte das substâncias orgânicas que não apresentam sistemas π conjugados, ocorre geralmente via reações ácido-base, como observado para todas as substâncias no presente trabalho. A protonação e/ou a desprotonação de uma substância, depende majoritariamente da estrutura da mesma e do tipo de solvente utilizado.

Foi observado que a estrutura dos espirossolanos possui dois heteroátomos espacialmente próximos (O e N nos anéis E e F respectivamente), com pares de elétrons não ligantes, e que podem estabilizar eletronicamente o íon H⁺, ficando retido entre eles. Portanto a fragmentação ocorre levando em conta essas duas possibilidades: ora o íon H⁺ fica localizado no átomo de N, ora no átomo de O. Logo o mecanismo representado na **Figura 6.10** (pág. 59) se processa a partir do átomo de oxigênio agindo como um nucleófilo interno, realizando uma assistência anquimérica com o C-22, tendo por consequência uma abertura do anel F. Posteriormente ocorre mais uma vez a formação de um carbocátion alílico estável (independente do tipo de substituinte ligado em C-3) com a eliminação da cadeia lateral constituída pelos anéis E e F.

Outro fragmento importante observado em algumas das substâncias isoladas ocorre em m/z 147. Este é também produto de mecanismo dirigido por carga, conforme detalhado na **Figura 6.11**:

Figura 6.11 Mecanismo dirigido por carga remota ou à distância: proposta para a formação do fragmento de m/z 147.

Estes são os principais mecanismos que ocorrem para as substâncias isoladas com esqueleto do tipo espirossolano.

Realizando a análise dos dados de ESI-MS/MS das demais substâncias isoladas (SCFI-1, SCFI-2, SCFI-3, SCFI-4, SCFI-5 e SCFM-1) e identificadas (Tabela 6.3, pág. 41) nos frutos maduros e imaturos de *S. caavurana*, a Tabela 6.12 (pág. 62) traz de maneira esquematizada, os principais íons observados para os espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS oriundos dos mecanismos já relatados.

Tabela 6.12 Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às substâncias isoladas dos frutos maduros e imaturos de S. caavurana

	SCFI - 1	SCFI - 2	SCFI - 3	SCFI - 4	SCFI - 5	SCFM - 1
Fórmula estrutural ^a	HO HH H	H H H H	H ₂ N H H H		H H H H	O H H H H
Fórmula molecular	$C_{27}H_{45}NO_2$	$C_{27}H_{46}N_2O$	$C_{27}H_{46}N_2O$	$C_{27}H_{43}NO_2$	$C_{27}H_{41}NO_2$	$C_{28}H_{46}N_2O_2$
Massa molecular calculada (Da)	415,3450	414,3610	414,3610	413,3294	411,3137	442,3559
$[M+H]^{+}$ $[M+H-H_{2}O]^{+}$ $[M+H-NH_{3}]^{+}$	416,3532 398,3394	415,3676 397,3549 398,3435	415,3707 397,3590 398,3449	414,3378 396,3252	412,3320 394,3212	443,3705 425,3611
[M+H-NH ₂ COH] ⁺	273,2210	380,3288 272,2364	380,3329 272,2379	271,2054	269,1972	300,2391
	HO HO	H ₂ N ***	H ₂ N M	271,2034	209,1972	
	255,2109	255,2113	255,2154			255,2140
	161,1318	161,1311	161,1335	253,1946 173,1374	251,1849 173,1035	161,1374
	147,1160	147,1159	147,1204	161,1317	161,1381	
	•	•	•			

^aOs espectros de massas ESI-MS e ESI-MS/MS para todas as substâncias, constam no Anexo II (a partir da pág. 111).

6.5.2 Estudo Comparativo das Vias de Fragmentação dos Espirossolanos Isolados

Após a preposição dos processos de fragmentação que ocorrem com mais facilidade nos espirossolanos, está representada na **Figura 6.12** uma via com a proposta de fragmentação para a substância **SCFI - 1**, baseada nas análises dos seus espectros de massas *full scan* (**Espectro EM.1**, Anexo II, pág. 111) e do espectro de massas sequencial (**Espectro EM.2**, Anexo II, pág. 112), levando em consideração todos os mecanismos previamente discutidos.

É possível notar a perda de água característica do anel E dos espirossolanos, e também a perda de 143 Da com eliminação dos anéis E e F, dando origem ao carbocátion alílico, além das clivagens múltiplas no anel C formando os fragmentos com m/z 161 e 147.

$$m/2$$
 416

 $m/2$ 416

 $m/2$ 416

 $m/2$ 273

 $m/2$ 273

 $m/2$ 398

 $(-H_2O)$

Formação do carbocátion alílico

 $m/2$ 147

 $m/2$ 161

 $m/2$ 255

Figura 6.12 Via de fragmentação proposta para **SCFI - 1** (*m/z* 416,3532) mostrando seus principais íons produtos.

Quando analisando os espectros de massas dos íons produtos para as duas aminas isoméricas **SCFI - 2** e **SCFI - 3** em todos os potenciais de fragmentação aplicados (de 5 a 60 eV), não foi possível perceber diferenças significativas nos íons fragmentos formados

em seus espectros de massas sequenciais (**Espectro EM.4** e **Espectro EM.6**, Anexo II, págs. 114 e 116 respectivamente). De maneira análoga, a **Figura 6.13** traz uma proposta fragmentação que é comum para as substâncias **SCFI - 2** e **SCFI - 3**.

$$(-143 \text{ Da})$$

$$mz 415$$

$$(-NH_3)$$

$$mz 272$$

$$(-NH_3)$$

$$mz 255$$
Formação do carbocátion alílico
$$mz 147$$

$$mz 161$$

Figura 6.13 Via de fragmentação proposta para **SCFI - 2** e **SCFI - 3** (*m/z* 415,3676) mostrando seus principais íons produtos.

Após a observação minuciosa dos seus espectros de massas *full scan* (**Espectro EM.3** e **EM.5**, Anexo II, págs. 113 e 115) e dos respectivos espectros de massas sequenciais (**Espectro EM.4** e **EM.6**, Anexo II, págs. 114 e 116), para ambos os casos é possível perceber mais uma vez a perda neutra de H_2O provavelmente no anel E dos espirossolanos, mesmo porque o substituinte em C-3 neste caso trata-se de um grupo amino ($-NH_2$). Há também a perda característica de 143 Da de massa, devido a eliminação dos anéis E e F, dando origem ao carbocátion alílico, além das clivagens múltiplas no anel C formando os fragmentos com m/z 161 e 147. O diferencial observado para a subclasse dos 3-aminoespirossolanos saturados especificamente, é a possibilidade de perda neutra de

uma molécula de amônia (NH $_3 \cong 17$ Da) em algumas etapas de seu processo de fragmentação como representado acima.

Para os compostos carbonilados **SCFI - 4** e **SCFI - 5**, as propostas de suas vias de fragmentação encontram-se nas figuras **6.14** e **6.15** respectivamente:

Figura 6.14 Via de fragmentação proposta para **SCFI - 4** (*m/z* 414,3378) mostrando seus principais íons produtos.

$$m/z$$
 173 (-CO) m/z 145 m/z 175 m/z 175 m/z 269 m/z 394

Figura 6.15 Via de fragmentação proposta para **SCFI - 5** (*m/z* 412,3320) mostrando seus principais íons produtos.

Para ambos os compostos carbonilados **SCFI - 4** e **SCFI - 5** isolados nos frutos maduros e imaturos de *S.caavurana*, é possível perceber novamente a perda neutra de água proveniente do anel E, e também a perda de 143 Da, resultante da eliminação dos anéis E e F em espirossolanos, originando carbocátions alílicos estáveis, ainda carbonilados neste caso.

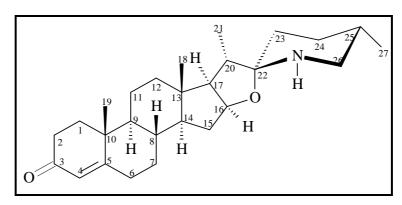
A principal diferença verificada para esses compostos em relação aos demais, é que não foram detectadas as clivagens ocorrendo no anel C, evidenciada pela ausência dos fragmentos *m*/*z* 161 e 147. Além disso, para ambos os casos, há posteriormente, outra perda neutra de H₂O que provavelmente seja oriunda da pronotação do oxigênio da carbonila em C-3. Já a insaturação presente em **SCFI** - **5**, conduz à eliminação de CO (≅28Da) provavelmente pela contração do anel A.

No caso do composto caavuranamida (6) SCFM - 1, o padrão de fragmentação segue o esperado para os espirossolanos e sua via de fragmentação proposta está descrita na Figura 6.16:

Figura 6.16 Via de fragmentação proposta para **SCFM - 1** (*m/z* 443,3705) mostrando seus principais íons produtos.

Após compreensão de todos os mecanismos de fragmentação, do reconhecimento das estruturas dos principais íons produtos obtidos para cada substância isolada, e levando em conta as vias de fragmentação descritas para os compostos isolados, espera-se ser possível realizar a proposta estrutural para outras agliconas que ainda não foram isoladas, mas que estão presentes nos extratos das outras partes de *S. caavurana*.

6.5.3 Determinação Estrutural de SCFM-2 por ESI-MS/MS aliado a estudos de RMN



SCFM - 2 (SCFI - 5 + OH)

Este composto ainda não teve sua estrutura completamente determinada. Não foi possível propor algo apenas baseando-se nos dados de RMN de ¹³C e de ¹H. A técnica de ESI-MS/MS foi fundamental para ajudar a caracterizar o tipo de arcabouço de **SCFM - 2**. Como proposta inicial trata-se de um alcaloide esteroidal com esqueleto do tipo espirossolano, substituído com uma hidroxila ainda sem definição de sua exata localização na molécula.

Analisando o espectro de RMN de 13 C para **SCFM - 2** (**Espectro EVIII.2**, Anexo II, págs. 106 e 107) foi possível observar os sinais referentes a uma carbonila α,β insaturada através dos deslocamentos dos carbonos C-3 ($\delta_{\rm C}$ 199,5 ppm), C-4 ($\delta_{\rm C}$ 123,8 ppm) e C-5 ($\delta_{\rm C}$ 171,3 ppm), além dos sinais característico dos esqueletos do tipo espirosolano o C-16 ($\delta_{\rm C}$ 78,0 ppm) e o C-22 ($\delta_{\rm C}$ 99,5 ppm).

Analisando seu espectro de massas *full scan* (**Espectro EM.13**, Anexo II, pág. 123), observamos o íon referente à molécula protonada com m/z 428,3228 tendo coerência com a fórmula molecular C27H41NO3, indicando que a massa molecular calculada do composto isolado corresponde a 427,3086 Da. No espectro de massas sequencial (**Espectro EM.14**, Anexo II, pág. 124) há primeiramente, duas perdas neutras de H_2O representadas por m/z 410,3103 e 392,3031, sendo provável que a primeira delas seja

referente a abertura do anel E dos espirossolanos e a outra possa ser originada a partir de alguma hidroxila localizada na estrutura em local diferente de C-3. Isto aliado ao fato de que no espectro de RMN de 13 C observa-se dois carbonos oxigenados em $\delta_{\rm C}$ 78,0 ppm e $\delta_{\rm C}$ 69,6 ppm, além daquele observado para a carbonila ($\delta_{\rm C}$ 199,5 ppm), é bastante plausível. Outro fragmento importante com m/z 285,1914 revela a perda neutra de 143,1314 Da, característica dos anéis E e F como observado para todos os espirossolanos isolados.

Analisando o espectro de RMN de 1 H (**Espectro EVIII.1**, Anexo II, pág. 105), observa-se ainda presença de dois hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 4,12 ppm e de hidrogênio de ligação dupla H-4 em δ_{H} 5,76 ppm. Diante destas informações, se propôs que **SCFM - 2** se assemelha a **SCFI - 5** com a presença de uma hidroxila a mais. Porém, até o presente momento não foi possível determinar onde este substituinte está localizado. As posições mais prováveis encontradas na literatura para a substituição por hidroxilas nesse tipo de estrutura é em C-6, C-7, C-11, C-12, C-16 ou C-23.

6.6 Estudo de Mapeamento Fitoquímico por ESI-MS e ESI-MS/MS

Devido à complexidade química de matrizes tais como os extratos vegetais, é geralmente aceito que apenas uma única técnica analítica não forneça uma visão completa do metaboloma, desta maneira é comum o emprego de múltiplas tecnologias. A escolha de qual é a tecnologia mais adequada, normalmente é consequência da velocidade, seletividade química e sensibilidade instrumental desejada.

Neste trabalho a técnica escolhida para a análise dos extratos foi a espectrometria de massas com infusão direta (ou DIMS). Esta técnica consiste na análise direta de extratos vegetais complexos, via espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), sem a etapa de separação cromatográfica. Trata-se de uma técnica muito sensível e que fornece um sistema de *screening* de alto desempenho (HTS) para a impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*). Constitui-se de uma análise rápida (normalmente menos de 5min.) e que possui uma sensibilidade muito maior quando comparada a técnica de RMN. Isso é bastante vantajoso, uma vez que permite várias análises em apenas um dia.

Porém as análises por DIMS além de serem suscetíveis á supressão de ionização, também possuem limitação por sua inabilidade de diferenciar compostos isoméricos uma vez que se baseiam apenas nos dados de massas acuradas conforme averiguado nesse trabalho.

Para que o procedimento de mapeamento fitoquímico tenha coerência, é necessário que tanto o íon referente a [M+H]⁺ no espectro *full scan* de ESI-MS, quanto os íons fragmentos obtidos a partir de [M+H]⁺ no espectro de massas sequencial ESI-MS/MS coincidam com àqueles observados para os compostos previamente isolados (**Tabela 6.3**, pág. 41). Levando isso em consideração, observamos algo inesperado: os compostos isolados e os constituintes dos extratos não puderam ser analisados por DIMS. Isso porque possuem relações *m/z* muito próximas que não puderam ser resolvidas pelo analisador utilizado.

Os dados referentes aos extratos hidrometanólicos dos frutos imaturos (**Tabela 6.13**) e maduros (**Tabela 6.14**) de *S.caavurana*, obtidos por ESI-MS/MS estão descritos na sequência:

Tabela 6.13 Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às principais moléculas protonadas [M+H]⁺ encontradas no extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de *S. caavurana*

$[M+H]^+$	Fragmentos majoritários (m/z) obtidos a partir de [M+H] ⁺ (40 eV) a						Espectro ^b	Possível composto
398,3440		380,3308		255,2115	161,1304	147,1128	EM.17	
412,3214	397,3531	380,3293	271,2068	255,2134	161,1322	147,1153	EM.18	
414,3374	397,3538		271,2070	255,2137	161,1327	147,1159	EM.19	ni
415,3666	397,3545		271,2071	255,2139	161,1328	147,1157	EM.20	
416,3615	397,3538		271,2075	255,2139	161,1328	147,1163	EM.21	
428,3178	410,3053	392,2950	269,1904	255,2110	161,1212		EM.22	
443,3611	425,3502	396,3201	300,2326	255,2119	161,1318	147,1150	EM.23	SCFM - 1

ni: não puderam ser identificados.

Tabela 6.14 Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às principais moléculas protonadas [M+H]⁺ encontradas no extrato hidrometanólico dos frutos maduros de *S. caavurana*

$[M+H]^+$	Fragn	nentos majo	Espectro ^b	Página				
398,3298	380,3134	271,2002	255,2052	161,1253			EM.27	137
412,3144	396,3126		269,1842	255,2049	161,1268	147,1097	EM.28	138
415,3530	397,3425	380,3183	271,1997	255,2066	161,1278	147,1129	EM.29	139
428,3036	410,2916	392,2833	285,1781	267,1689			EM.30	140

^a Espectro full scan do extrato: **Espectro EM.24**, **EM.25** e **EM.26**, disponíveis no Anexo II.

O único composto obtido que pode ser identificado trata-se de **SCFM - 1**, que foi previamente isolado na fase enriquecida de alcaloides dos frutos maduros de *S.caavurana*. (**SCFMDFA**) e que pela análise dos extratos por ESI-MS/MS pode ter sua presença identificada no extrato hidrometanólico dos frutos imaturos da mesma espécie.

^a Espectro full scan do extrato: **Espectro EM.15** e **EM.16**, disponíveis no Anexo II, págs.125 e 126.

^b Espectros disponíveis no Anexo II.

^b Espectros disponíveis no Anexo II.

Observando o espectro de massas sequencial para **SCFM - 1** (m/z 443,3705) e para o íon com m/z 443,3611 no extrato dos frutos imaturos, percebe-se os mesmos íons fragmentos caracterizando, portanto que se tratam da mesma substância.

Os extratos obtidos de folhas (**Tabela 6.15**) e do tronco (**Tabela 6.16**) de *S.caavurana* também não foram possíveis de analisar utilizando esta técnica.

Tabela 6.15 Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes às principais moléculas protonadas [M+H]⁺ encontradas no extrato hidrometanólico das folhas de *S. caavurana*

$[\mathbf{M}+\mathbf{H}]^{+}$	Fragmentos majoritários (m/z) obtidos a partir de $[M+H]^+$ em 40 eV a					Espectro ^b	Página
398,2961	380,2844	269,1858	251,1726	175,1084	145,0977	EM.33	143
410,2968	392,2863	375,2591	269,1877	251,1757	145,0985	EM.34	144
411,2996	392,2878	375,2610	269,1882	251,1763	145,0984	EM.35	145
428,3120	410,2989	392,2895	267,1731			EM.36	146

^a Espectro full scan do extrato: **Espectro EM.31** e **EM.32**, disponíveis no Anexo II.

Tabela 6.16 Dados de ESI-MS e ESI-MS/MS referentes aos principais íons referentes à moléculas protonadas encontrados no extrato hidrometanólico do tronco de *S. caavurana*

$[M+H]^{+}$	Fragme	entos majori [M-	Espectro ^b	Página			
398,3433	380,3269	255,2099	161,1259	147,1107		EM.39	149
412,3223	394,3113	269,1920	255,2123	163,0401	145,1008	EM.40	150
413,3298	394,3115	269,1919	255,2126	163,0398	145,1007	EM.41	151
414,3559	394,3112	269,1918	255,2126	163,0399	145,1007	EM.42	152
415,3669	394,3116	269,1923	255,2131	163,0404	145,1010	EM.43	153
428,3184	410,3059	392,2959	267,1747			EM.44	154
444,3126	426,3023	398,3079	267,1728	163,0404	145,1008	EM.45	155
578,4098	412,3186	255,2116	163,0412			EM.46	156
726,4800	691,3831	412,3207				EM.47	157
740,4607	255,2108					EM.48	158

^a Espectro full scan do extrato: **Espectro EM.37** e **EM.38**, disponíveis no Anexo II.

O que pode ser afirmado com certa segurança, entretanto, é que o composto **SCFM-1** não está presente no extrato hidrometanólico do tronco e nem das folhas de *S.caavurana* com concentração suficiente para que fosse detectado.

Todavia a análise dos compostos **SCFI - 1**, **SCFI - 2**, **SCFI - 3**, **SCFI - 4**, **SCFI - 5** por espectrometria de massas sequencial com infusão direta (DIMS-MS) é possível, fazendo-se uso de espectrômetros equipados com analisadores tipo armadilha de íons (*ion traps*), ou de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) ou outros espectrômetros sequenciais que possam prender e acumular os íons fragmentos, que

^b Espectros disponíveis no Anexo II.

^b Espectros disponíveis no Anexo II.

em alguns casos podem permitir a diferenciação de estruturas isoméricas (BEDAIR *et.al.*, 2008).

A espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) é uma ferramenta poderosa para DIMS devido a sua ultra resolução para altas massas (1.000.000) e massa acurada (< 1 ppm), e tem sido aplicada com sucesso em estudos de impressão digital metabólica.

Uma alternativa que também se adéqua neste caso seria realizar as medidas de espectrometria de massas após procedimento de separação cromatográfica, uma vez que essa técnica oferece a melhor combinação de sensibilidade e seletividade. A detecção cromatográfica efetuada pela técnica de espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS/MS) fornece informação química altamente específica incluindo a massa molecular e/ou os íons fragmentos específicos que podem ser utilizados para identificação de compostos através de comparação espectral de compostos com aqueles existentes em bibliotecas de dados. Além disso, é uma técnica que permite identificação de pequenas quantidades de metabólitos com limites de detecção na escala de pmols e fmols para muitos metabólitos primários e secundários.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico realizado nos frutos maduros e imaturos de *Solanum caavurana* Vell. resultou no isolamento de sete substâncias, todas pertencentes a classe dos alcaloides esteroidais e com esqueleto do tipo espirossolano. Os compostos SCFI - 1, SCFI - 2, SCFI-3, SCFI - 4 e SCFI - 5 foram obtidos tanto dos frutos maduros quanto dos frutos imaturos, enquanto SCFM - 1 e SCFM - 2 só foram isolados nos frutos maduros desta espécie.

Seis compostos tiveram suas estruturas determinadas principalmente pela análise dos espectros de RMN de 13 C aliado ao espectro de DEPT 135 e aos experimentos bidimensionais HMBC e HSQC quando necessário. O alcaloide esteroidal caavurnamida (SCFM-1) teve sua estereoquímica relativa determinada após o exame do espectro de NOESY 2D e experimentos de α_D . Neste trabalho também foi possível obter o composto SCFM - 1 a partir da transformação química de SCFI - 3 para realizar estudos completos de RMN e de fragmentação pela técnica de ESI-MS/MS.

Este trabalho foi o primeiro realizado em nosso grupo de pesquisa, envolvendo estudos de fragmentação utilizando técnicas modernas de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS). Com esta técnica foi possível propor os mecanismos de fragmentação para todos os alcaloides esteroidais isolados, identificando as principais reações envolvidas e quais fragmentos são característicos para a classe dos espirossolanos. Até onde conhecemos, com exceção de SCFI - 1, não há relatos na literatura de estudos de fragmentação para nenhum dos espirossolanos isolados neste trabalho.

Além disso, foi possível identificar a presença de SCFM - 1 no extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de *S.caavurana* sem a necessidade de seu isolamento, apenas utilizando a técnica de ESI-MS/MS com infusão direta dos extratos na fonte de ionização (DIMS-MS). Este resultado ilustra a alta produtividade e simplicidade características da técnica. No entanto foram observadas algumas limitações da DIMS-MS, mais especificamente, os dois isômeros SCFI - 2 e SCFI - 3 não puderam ser diferenciados nem localizados nos extratos utilizando esta técnica de *screening* rápido, uma vez que possuem as mesmas massas exatas e perfil de fragmentação semelhante. Desta maneira faz-se necessária a utilização de um processo prévio de separação cromatográfica tal como CLAE para auxiliar a identificação e caracterização das outras substâncias nos demais extratos.

As outras duas espécies coletadas (*S. caavurana*, *S. scuticum* e *S. diploconos*e) tiveram seus extratos brutos (e algumas frações obtidas da extração alcaloídica) avaliados quanto as suas atividades antimicrobiana e antiproliferativa *in vitro*. Foram obtidos resultados promissores, até mesmo superiores quando comparadas ao padrão positivo empregado, especialmente para *S. caavurana*, cujos extratos provenientes de troncos, folhas, frutos maduros e imaturos, foram avaliados para atividade antileprótica no sentido de verificar o relato de seu uso etnofarmacológico desta espécie para o tratamento da hanseníase. Os extratos mostraram-se inativos para esta atividade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, C.H.; RAMOS JR, A.N.; DOS SANTOS, E.S.; RICHTER, J. & HEUKELBACH, J. (2012). Clusters of Leprosy Transmission and of Late Diagnosis in a Highly Endemic Area in Brazil: Focus on Different Spatial Analysis. Tropical Medicine and International Health. 17 (4): 518 525.
- ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G. & NETO, J.J. (2003). Atividade Alelopática de Alcalóides Glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. Floresta e Ambiente. 10(1): 93 97.
- BARBOSA-FILHO, J.M. (1997). Quimiodiversidade e Potencialidade Farmacológica da Flora Paraibana. Caderno de Farmácia. 13(2): 85 102.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; OLIVEIRA, R.A.G.; PAULO, M.Q.; TROLIN, G.; CUNHA, E.V.L.; ATAIDE, J.R. & BHATTACHARYYA, J. (1991). Chemical and Pharmacological Investigation of *Solanum* Species of Brazil A Search for Solasodine and Other Potentially Useful Therapeutic Agents. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 86(supl.II): 189 191.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; NASCIMENTO JUNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M. & DINIZ, M.F.F.M. (2007). Natural products with antileprotic activity. Revista Brasileira de Farmacognosia. 17(1): 141-148.
- BENTO, A.F.; AZEVEDO, M.S.; LUIZ, A.P.; MOURA, J.A. & SANTOS, A.R.S. (2004). Atividade Antinociceptiva do Extrato Etanólico do Fruto de *Solanum acanthodes* Hook.f. em Camundongos. Revista Brasileira de Farmacognosia. 14(1): 9 10.
- BHATTACHARYYA, J.; BASILIO, I.J.L.D.; MORAIS, L.C.S.L.; AGRA, M.F. & MAJETICH, G. (2009). Alkaloids of the Root-Bark of *Solanum paludosum* Moric. Biochemical Systematics and Ecology. 37: 228 229.
- BIRD, G.J.; COLLINS, D.J.; EASTWOOD, F.W. & EXNER, R.H. (1979). Assignment of the 13 C NMR Spectra of Some 22,26-Epiminocholestanes, 22,26-Epiminocholest-22(N)-enes and Some 3 β -Amino Steroidal Alkaloids. Australian Journal of Chemistry. 32: 797 816.

- BRIETZIG, E.G.; FALKENBERG, M.B. & FREITAS, S.F.T. (2004). Avaliação da Interferência *in vitro* do Extrato Seco de Berinjela (*Solanum melongena* L.) em Testes Laboratoriais. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 36(2): 105 110.
- BVS-MS (2007). Dicas em saúde Hanseníase. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Disponível em: http://www.bvsms.saude.gov.br/ php/index.php>. Acesso em: 20/06/2008.
- CARVALHO, L.F. & BOVINI, M.G. (2006). Solanaceae na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro Brasil. Rodriguésia. 57(1): 75 98.
- CATALDI, T.R.I; LELARIO, F. & BUFO, S.A. (2005). Analysis of Tomato Glycoalkaloids by Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 19, 3103 3110.
- CHENG, F.; LI, X. & WANG, J.Z. (2008). A new alkaloid from *Solanum cathayanum*. Chinese Chemical Letters. 19: 68 70.
- CHOWDHURY, N.; BHATTACHARJEE, I.; LASKAR, S. & CHANDRA, G. (2007). Efficacy of *Solanum Villosum* Mill. (Solanaceae: Solanales) as a Biocontrol Agent Against Fourth Instar Larvae of *Culex quinquefasciatus* Say. Turkish Journal of Zoology. 31: 365 370.
- CHOWDHURY, N.; GHOSH, A. & CHANDRA, G. (2008). Mosquito Larvicidal Activities of *Solanum Villosum* Berry Extract Against the Dengue Vector *Stegomyia aegypti*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 8: 10 18.
- CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. (1997). Antifungal Activity of Solanum Fruit Glycoalkaloids: Implications for Their Frugivory and Seed Dispersal. Ecology. 78(3): 799 809.
- CONCEIÇÃO, M. (1987). Dicionário: Plantas Medicinais no Ano 2000. Dicionário de Plantas Medicinais. 3ª Edição. Editora Thesaurus Brasília DF. 282p.
- CORNELIUS, M.T.F; ALVES, C.C.F.; SILVA, T.M.S; ALVES, K.Z.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. & AGRA, M.F. (2004). Solasonina e flavonóides isolados de *Solanum crinitum* Lam. Revista Brasileira de Farmacologia. 85(2): 57 59.

- CORRÊA, M.P. (1984). Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional. Volume I, Pg. 352.
- DINAN, L., HARMATHA, J. & LAFONT, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. Journal of Chromatography A. 935: 105 123.
- DISTL, M. & WINK, M. (2009). Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber-Bearing *Solanum* species by HPLC and LC-ESI-MS. Potato Research. 52: 79 104.
- EDMONDS, J,M, & CHWEYA, J. A. (1997). Black nightshades *Solanum nigrum* L. and related species. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.15. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resourses Institute, Rome, Italy.
- ELLOF, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica *64*: 711 713.
- EMMANUEL, S., IGNACIMUTHU, S., PERUMALSAMY, R. & AMALRAJ,T. (2006). Antiinflamatory activity of *Solanum Trilobatum*. Fitoterapia. 77: 611 612.
- ENNES, S.B.P. (1993). Poliquimioterapia no tratamento da hanseníase: Reações adversas às drogas utilizadas. Anais Brasileiros de Dermatologia. 68(6): 370.
- ESTEVES-SOUZA, A., SILVA, T.M.S., ALVES, C.C.F., CARVALHO, M.G., BRAZ-FILHO, R. & ECHEVARRIA, A. (2002). Cytotoxic activities against Ehrlich Carcinoma and Human K562 Leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. Journal of Brazilian Chemical Society. 13(6): 838 842.
- FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A. & RATES, S.M.K. (2006). Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 42(3): 369 394.
- FIESER, L.F & FIESER M. (1959). Steroids. Reinhold Publishing Corporation. New York

 Chapman & Hall, LTD. London.
- FONSECA-KRUEL, V.S. & PEIXOTO, A.L. (2004). Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. Acta Botânica Brasileira. 18(1): 177 190.

- FRIEDMAN, M. (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicom esculentum*), and jimson weed (*Datura stamonium*) seeds. Journal of Chromatography A. 1054: 143 155.
- FRIEDMAN, M.; LEVIN, C.E.; LEE, S-U.; KIM, H-J.; LEE, I-S.; BYUN, J-O. & KOZUKUE, N. (2009). Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver and Stomach Cancer Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 5727 5733.
- FUKUHARA, K., SHIMIZU, K. & KUBO, I. (2004). Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark os *Solanum arundo* Mattei. Phytochemistry. 65: 1283 1286.
- GONÇALVES M.C.R., DINIZ, M.F.F.M., BORBA, J.D.C., NUNES, X.P. & BARBOSA-FILHO, J.M. (2006a). Berinjela (*Solanum melongena* L.) mito ou realidade no combate as dislipidemias? Revista Brasileira de Farmacognosia. 16 (2): 252 257.
- GONÇALVES, M.C.R.; DINIZ, M.F.F.M.; DANTAS, A.H.G. & BORBA, J.D.C. (2006b). Modesto Efeito Hipolipemiante do Extrato Seco de Berinjela (*Solanum melongena* L.) em Mulheres com Dislipidemias, Sob Controle Nutricional. Revista Brasileira de Farmacognosia. 16: 656 663.
- GRIFFIN, J. W. & LIN, G. D. (2000). Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. Phytochemistry. 53: 623 637.
- HALL, C.A.; HOBBY, T. & CIPOLLINI, M. (2006). Efficacy and Mechanisms of α-Solasonine- and α-Solamargine-Induced Cytolysis on Two Strains of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Chemical Ecology. 32: 2405 2416.
- HARBONE, J.B. 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3^a ed., London, Academic Press, 382p.
- HERRERA-SALGADO, Y., GARDUÑO-RAMÍREZ, M. L., VÁZQUEZ, L., RIOS, M. Y., & ALVAREZ, L. (2005). Myo-inositol-derived glycolipids with anti-inflammatory activity from *Solanum lanceolatum*. Journal of Natural Products. 68: 1031 1036.

- JENSEN, P.H.; JUHLER, R.K.; NIELSEN, N.J.; HANSEN, T.H.; STROBEL, B.W.; JACOBSEN, O.S.; NIELSEN, J. & HANSEN, H.C.B. (2008). Potato Glycoalkaloids in Soil-Optimising Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry for Quantitative Studies. Journal of Chromatography A 1182: 65 71.
- KODORU, S.; GRIERSON, D.S.; VAN DE VENTER, M. & AFOLAYAN (2007).

 Anticancer Activity of Steroid Alkaloids Isolated from *Solanum aculeastrum*.

 Pharmaceutical Biology. 45(8): 613 618.
- KUMARI, G.N.K., RAO, L.J.M., RAO, K.V.R., KANEKO, K., & MITSUHASHI, H. (1986). Solanopubamides A and B, two further steroidal alkaloids from *Solanum Pubescens*. Phytochemistry. 25(8): 2003 2004.
- LANG, G.; MAYHUNDIN, N.A.; MITOVA, M.I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H. & MUNRO, M.H.G. (2008). Evolving trends in the dereplication of natural products extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural products. Journal of Natural Products. 71: 1595 1599.
- MAXWELL, A.; PINGAL, M.; REYNOLDS, W.F. & MCLEAN, S. (1996). 3-aminospirosolane Alkaloids from *Solanum arboreum*. Phytochemistry. 43(4): 913 915.
- MENTZ, L. A. & OLIVEIRA, P. L. (2004) *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil *in* Pesquisas Botânica, *54*, 53.
- MENTZ, L.A.; VENDRUSCOLO, G.S.; SOARES, E.L.C. & VIGNOLI-SILVA, M. (2007). Solanaceae Nativas no Rio Grande do Sul, Brasil Listagem II: *Solanum* L. Revista Brasileira de Biociências. 5(2): 1059 1061.
- MIKICH, S.B. & SILVA, S.M. (2001). Composição Florística e Fenologia das Espécies Zoocóricas de Remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual no Centro-Oeste do Paraná, Brasil. Acta Botanica Brasilica. 15 (1): 89 113.
- MITOVA, M.I.; MURPHY, A.C.; LANG, G.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; ELLIS, G. & MUNRO, M.H.G. (2008). Evolving trends in the dereplication of natural products extracts. 2. The isolation of chrysaibol, an antibiotic peptaibol from a New Zealand

- sample of the mycoparasitic fungus *Sepedonium chrysospermum*. Journal of Natural Products. 71: 1600 1603.
- NAAFS, B. (2006). Treatment of Leprosy: science or politics? Tropical Medicine and International Health. 2(3): 268 278.
- NAGAOKA, T.; YOSHIHARA, T. OHRA, J. & SAKAMURA, S. (1993). Steroidal Alkaloids from Roots of Tomato Stock. Phytochemistry. 34 (4): 1153 1157.
- NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H. & YOSHIKAWA, M. (2008). Steroidal Saponins and Pseudoalkaloid Oligoglycoside from Brazilian Natural Medicine, "Fruta do Lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). Phytochemistry. 69: 1565 1572.
- NEE, M.; BOHS, L. & KNAPP, S. (2006). New Species of *Solanum* and *Capsicum* (Solanaceae) from Bolivia, with Clarification of Nomenclature in some Bolivian *Solanum*. Brittonia. 58(4): 322 356.
- NGUELEFACK, T.B.; FEUMEBO, C.B.; ATEUFACK, G.; WATCHO, P.; TATSIMO, S.; ATSAMO, A.D.; TANE, P. & KAMANYI, A. (2008). Anti-ulcerogenic properties of the aqueous and methanol extracts from the leaves of *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae) in rats. Journal of Ethnopharmacology. 119: 135 140.
- NOGUCHI, E.; FUJIWARA, Y.; MATSUSHITA, S.; IKEDA, T.; ONO, M. & NOHARA, T. (2006). Metabolism of Tomato Steroidal Glycosides in Humans. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 54(9): 1312 1314.
- NURIT-SILVA, K. & AGRA, M. F. (2009). Estudo Morfoanatômico de Órgãos Vegetativos de *Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae). Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense). 28 (5): 675 681.
- ONO, M.; KAKIUCHI, T.; EBISAWA, H.; SHIONO, Y.; NAKAMURA, T.K.; IKEDA, T.; MIYASHITA, H.; YOSHIMITSU, H. & NOHARA, T. (2009). Steroidal Glycosides from the Fruits of *Solanum viarum*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 57(6): 632 635.
- PENNA, G.O.; MACEDO, V.O.; MARTELLI, C.M.T.; MAROJA, M.F.; STEFANI, M.M.A. & CHAUL, A. (2005). Talidomida no tratamento do eritema nodoso

- hansênico: Revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações. Anais Brasileiros de Dermatologia. 80(5): 511 522.
- PENNA, J.F.M. (1950). Notas Sobre Plantas Brasileiras: Contendo a Descripção, Pathogenesia e Indicações das Plantas Usadas na Homeopathia. 2ª Edição. Rio de Janeiro: A. Penna. 420p.
- RADEGLIA, R., ADAM, G., & RIPPERGER, H. (1977). ¹³C NMR Spectroscopy of *Solanum* Steroid Alkaloids. Tetrahedron Letters 11: 903 906.
- RAJKUMAR, S. & JEBANESAN, A. (2005). Repellency of Volatile Oils from *Moschoma* polystachyum and *Solanum xanthocarpum* Against Filarial Vector *Culex* quinquefasciatus Say. Tropical Biomedicine. 22(2): 139 142.
- REITZ, P.R., SMITH, L.B. & DOWNS, R.J. (1966). Flora Ilustrada Catarinense. I Parte As Plantas, Fascículo Sola. Solanáceas. Itajaí-SC, Brasil. Pg.78 79.
- RIPPERGER, H. & PORZEL, A. (1997). Steroidal Alkaloid Glycosides from *Solanum* suaveolens. Phytochemistry. 46(7): 1279 1282.
- SABIR, S.M. & ROCHA, J.B.T. (2008). Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Aqueous Extract of *Solanum fastigiatum* (False "Jurubeba) Against Paracetamol-Induced Liver Damage in Mice. Journal of Ethnopharmacology. 120: 226 232.
- SAEZ, J., CARDONA, W., ESPINAL, D., BLAIR, S., MESA, J., BOCAR, M. & JOSSANG, A. (1998). Five New Steroids from *Solanum nudum*. Tetrahedron. 54: 10771 10778.
- SARTORATTO, A., MACHADO, A. L. M., DELARMELINA, C., FIGUEIRA, G. M., DUARTE, M. C. T., REHDER, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 35, 275 280.
- SAYED, K.A.E, HAMMAN, M.T., EL-RAHMAN, H.A.A. & ZAGHLOUL, A.M. (1998). New Pyrrole Alkaloids from *Solanum sodomaeum*. Journal of Natural Products. 61(6): 848 850.
- SHAKYA, R. & NAVARRE, D.A. (2008). LC-MS Analysis of Solanidane Glycoalkaloid Diversity Among Tubers of Four Wild Potato Species and Three Cultivars

- (Solanum tuberosum). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 6949 6958.
- SHOEMAKER, R.H. (2006). The NCI60 Human Tumour Cell Line Anticancer Drug Screen. Nature Reviews Cancer. 6: 813 823.
- SILVA, T.M.S., BRAZ-FILHO, R., CARVALHO, M.G. & AGRA, M.F. (2002). Flavonoids and an Alkamide from *Solanum paludosum* Moric. Biochemical Systematics and Ecology. 30: 479 481.
- SILVA, T.M.S.; BATISTA, M.M.; CAMARA, C.A. & AGRA, M.F. (2005). Molluscicidal Activity of Some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) Against *Biomphalaria glabrata*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 99(4): 419 425.
- SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; AGRA, M.F.; CARVALHO, M.G.; FRANA, M.T.; BRANDOLINE, S.V.P.B.; PASCHOAL, L.S.; BRAZ-FILHO, R. (2006). Molluscicidal Activity of *Solanum* Species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. Fitoterapia. 77: 449 452.
- SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; FREIRE, K.R.L.; SILVA, T.G.; AGRA, M.F. & BHATTACHARYYA, J. (2008). Steroidal Glycoalkaloids and Molluscicidal Activity of *Solanum asperum* Rich. Fruits. Journal of Brazilian Chemical Society. 19(5): 1048 1052.
- SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G. & BRAZ-FILHO, R. (2009). Estudo Espectroscópico em Elucidação Estrutural de Flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. Química Nova. 32 (5): 1119 1128.
- SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G., BRAZ-FILHO, R. & AGRA, M.F. (2003).

 Ocorrência de Flavonas, Flavonóis e Seus Glicosídeos em Espécies do Gênero

 Solanum. Química Nova. 26 (4): 517 522.
- SILVA, T.M.S.; NASCIMENTO, R.J.B.; BATISTA, M.M.; AGRA, M.F. & CAMARA, C.A. (2007). Brine Shrimp Bioassay of Some Species of *Solanum* from Northestern Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia. 17(1): 35 38.
- SIRI, M.I.; GALVÁN, G.A.; QUIRICI, L.; SILVERA, E.; VILLANUEVA, P.; FERREIRA, F.; FRAGUAS, L.F. & PIANZZOLA, M.J. (2009). Molecular marker

- diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. Euphytica. 165: 371 382.
- SMYTH, W.F.; SMYTH, T.J.P.; RAMACHANDRAM, V.N.; O'DONNELL, F. & BROOKS, P. (2012). Dereplication of Phytochemicals in Plants by LC-ESI-MS and ESI-MSⁿ. Trends in Analytical Chemistry. 33: 46 54.
- SOARES, E.L.C. & MENTZ, L.A. (2006). As Espécies de *Solanum* Subgênero *Bassovia* Seção *Pachyphylla* (= *Cyphomandra* Mart. Ex Sendtn. Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Pesquisas, Botânica. 57: 231 254.
- SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G.S. & MENTZ, L.A. (2007). Solanaceae Nativas no Rio Grande do Sul, Brasil: Listagem I. Revista Brasileira de Biociências. 5(2): 1050 1052.
- STILL, W.C; KAHN, M. & MITRA, A. (1978). Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. Journal of Organic Chemistry. 43(14): 2923 2925.
- STOBIECKI, M.; MATYSIAK-KATA, I.; FRANSKI, R.; SKALA, J. & SZOPA, J. (2003). Monitoring changes in Anthocyanin and Steroid Alkaloid Glycoside Content in Lines of Transgenic Potato Plants Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Phytochemistry*. 62: 959 969.
- THE SOLANACEAE SOURCE Site da Web disponível em: http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/solanaceaesource/. Acessado em: 22.11.2008.
- USUBILLAGA, A., AZIZ, I., TETTAMANZI, M. C., WAIBEL, R. & ACHENBACH, H. (1997). Steroidal alkaloids from *Solanum sycophanta*. Phytochemistry. 44: 537 543.
- USUBILLAGA, A.N. & MECCIA, G. (1987). Steroidal Sapogenins from *Solanum scorpioideum*. Journal of Natural Products. 50(4): 636 641.
- VADNERE, G.P.; GAUD, R.S & SINGHAI, A.K. (2008). Evaluation of anti-asthmatic property of *Solanum xanthocarpum* flower extracts. Pharmacologyonline. 1: 513 522.

- VALERI, B. & USUBILLAGA A. (1989). Sapogenins from *Solanum meridense*. Phytochemistry. 28(9): 2509 2511.
- VAZ, N.P. (2008). Alcalóides dos frutos maduros de *Solanum caavurana* Vell. Curitiba 2008. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Programa de pós-graduação em Química Universidade Federal do Paraná.
- VAZ, N.P.; COSTA, E.V.; SANTOS, E.L.; MIKICH, S.B.; MARQUES, F.A.; BRAGA, R.M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M.C.T.; RUIZ, A.L.T.G.; SOUZA, V.H.S.; CARVALHO, J.E & MAIA, B.H.L.N.S (2012). Caavuranamide, a Novel Steroidal Alkaloid from the Ripe Fruits of *Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society. 23 (2): 361 366.
- VENDRUSCOLO, G.S. & MENTZ, L.A. (2006). Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Série Botânica. 61(1-2): 83 103.
- VISSCHEDIJK, J.; VAN DE BROEK, J.; EGGENS, H.; LEVER, P.; VAN BEERS, S. & KLATSER, P. (2000). Mycobacterium leprae Millennium Resistant! Leprosy Control on the Threshold of a New Era. Tropical Medicine and International Health. 5 (6): 388 399.
- WANYONYI, A. W., CHHABRA, S. C., MKOJI, G., EILBERT, U. & NJUE, W. M. (2002). Bioactive steroidal alkaloids glycosides from *Solanum aculeastrum*. Phytochemistry. 59: 79 84.
- WEISSENBERG, M. (2001). Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. Phytochemistry. 58: 501 508.
- WHO (2008). Leprosy Today. World Health Organization. Disponível em: http://www.who.ont/lep/em/>. Acesso em 20/06/2008.
- WINK, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry. 64: 3 19.
- WOLF, D. & SIEMS, K. (2007). Burning the Hay to Find the Needle Data Mining Strategies in Natural Product Dereplication. Chimia. 61 (6): 339 345.

- YAHARA, S.; UDA, N.; YOSHIO, E. & YAE, E. (2004). Steroidal Alkaloid Glycosides from Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Journal of Natural Products. 67: 500 502.
- YE, W-C.; WANG, H.; ZHAO, S-X. & CHE, C-T. (2001). Steroidal Glycoside and Glycoalkaloid from *Solanum lyratum*. Biochemical Systematics and Ecology. 29: 421 423.
- YOSHIMITSU, H., NISHIDA, M. & NOHARA, T. (2003). Steroidal glycosides from the fruits os *Solanum abutiloides*. Phytochemistry. 64: 1361 1366.
- ZHOU, X., HE, X., WANG, G., GAO, H., ZHOU, G., YE, W. & YAO, X. (2006). Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. Journal of Natural Products. 69 (8): 1158 1163.
- ZHOU, Y.; HAN, Q-B.; SONG, J-Z.; QIAO, C-F. & XU, H-X. (2008) Characterization of Polyprenylated Xanthones in *Garcinia xipshuanbannaensis* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A. 1206: 131-139.

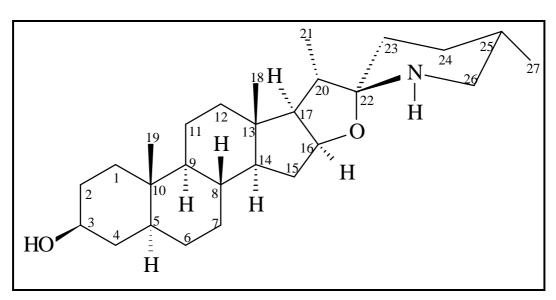
Anexo I - Tabelas ______ 86

Anexo I - Tabelas

Tabela 6.4 Dados de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto **SCFI -1** (9) comparados com os da tomatidina (9)

Posição	Tomatidina (9)	SCFI	- 1
1 osição	$\delta^{13}C^{a}$	DEPT 135	$\delta^{13}C$
1	37,0	CH_2	37,0
2	31,5	CH_2	31,5
3	71,0	CH	71,3
4	38,2	CH_2	38,2
5	44,9	CH	44,8
6	28,6	CH_2	28,6
7	32,3	CH_2	32,3
8	35,0	CH	35,0
9	54,4	CH	54,4
10	35,5	C_0	35,6
11	21,1	CH_2	21,1
12	40,2	CH_2	40,2
13	40,9	\mathbf{C}_0	40,9
14	55,8	CH	55,8
15	32,6	CH_2	32,6
16	78,5	CH	78,7
17	62,0	CH	62,0
18	16,9	CH_3	17,0
19	12,3	CH_3	12,3
20	43,0	CH	42,8
21	15,8	CH_3	15,8
22	99,3	\mathbf{C}_0	98,8
23	26,6	CH_2	26,6
24	28,6	CH_2	28,4
25	31,0	CH	30,8
26	50,2	CH_2	50,0
27	19,3	CH_3	19,3

^a RADEGLIA et.al., 1977, adquirido a 22,635 MHz em CDCl₃. (δ) Deslocamentos em ppm.



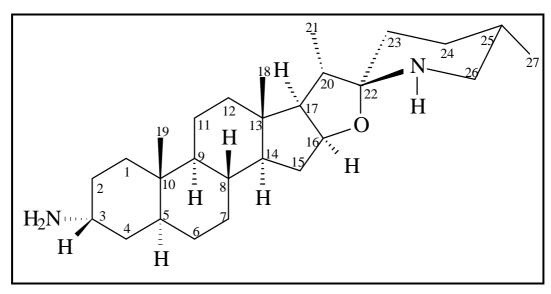
SCFI - 1 *rel*-(22*S*,25*S*)-3β-hidroxi-5α-espirossolano ou tomatidina (9)

Anexo I - Tabelas ______ 87

Tabela 6.5 Dados de RMN de 13 C (50 MHz, CDCl₃) do composto **SCFI - 2** (**15**) e dos compostos (22S,25S)-3α-amino-5α-espirossolano (α -NH₂) e soladunalinidina (β -NH₂)

		δ ¹³ C		^a δ ¹³ C		
Posição	PAFISC F.61	SCFIMPA F.60-76 ppt	SCFIMPA F.110(25)	DEPT 135	α- NH ₂ (C-3)	β- NH ₂ (C-3)
1	32,0	32,0	32,1	CH_2	32,1	37,7
2	28,6	28,6	28,6	CH_2	29,1	32,7
3	45,9	46,0	45,8	CH	45,7	51,1
4	35,6	35,5	36,0	CH_2	36,3	34,4
5	39,1	39,1	39,1	CH	39,2	45,6
6	28,6	28,6	28,9	CH_2	28,6	28,7
7	32,3	32,3	32,3	CH_2	32,3	32,4
8	35,1	35,1	35,1	CH	35,1	35,1
9	54,4	54,4	54,5	CH	54,6	54,5
10	36,4	36,4	36,4	C_0	36,5	35,7
11	20,6	20,6	20,6	CH_2	20,6	21,0
12	40,2	40,2	40,2	CH_2	40,3	40,3
13	40,9	40,9	40,9	C_0	40,9	40,9
14	55,9	55,8	55,9	CH	55,9	55,8
15	32,7	32,6	32,6	CH_2	32,7	32,6
16	78,5	78,5	78,5	CH	78,6	78,5
17	62,0	62,0	62,0	CH	62,0	62,0
18	17,0	16,7	16,9	CH_3	16,4	17,0
19	11,4	11,4	11,4	CH_3	11,4	12,4
20	43,0	43,0	43,0	CH	43,1	43,0
21	15,9	15,9	15,9	CH_3	15,9	15,9
22	98,7	99,1	99,0	C_0	99,1	99,0
23	26,7	26,7	26,6	CH_2	26,7	26,7
24	28,6	28,6	28,6	CH_2	28,6	28,6
25	31,0	31,1	31,0	CH	31,1	31,1
26	50,3	50,2	50,2	CH_2	50,3	50,2
27	19,3	19,3	19,3	CH_3	19,4	19,4

^a MAXWELL et.al., 1996, adquirido a 100 MHz em CDCl₃. (δ) Deslocamentos em ppm.



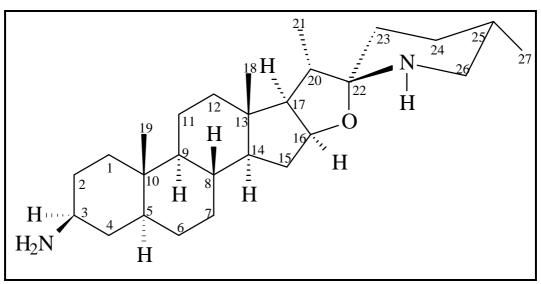
SCFI - 2 rel-(22S,25S)-3 α -amino-5 α -espirossolano (15)

Anexo I - Tabelas ______ 88

Tabela 6.6 Dados de RMN de 13 C (50 MHz, CDCl₃) do composto **SCFI - 3** (**16**) e dos compostos (22S,25S)-3α-amino-5α-spirosolano (α-NH₂) e soladunalinidina (β-NH₂)

	$\boldsymbol{\delta}^{I3}C$						^a δ ¹³ C	
Posição	PAFISC F.69	SCFIMPA F.110(39)	SCFIMPA F.110(49)	SCFIMPA F.110(145)	DEPT 135	α- NH ₂ (C-3)	β- NH ₂ (C-3)	
1	37,3	38,7	38,8	37,2	CH_2	32,1	37,7	
2	30,4	31,9	32,6	29,7	CH_2	29,1	32,7	
3	51,0	50,9	51,0	51,0	CH	45,7	51,1	
4	37,1	37,5	37,5	36,4	CH_2	36,3	34,4	
5	45,4	45,5	45,5	45,3	CH	39,2	45,6	
6	28,5	28,6	28,5	28,5	CH_2	28,6	28,7	
7	32,2	32,3	32,0	32,6	CH_2	32,3	32,4	
8	35,0	35,0	35,0	35,0	CH	35,1	35,1	
9	54,4	54,5	54,5	54,3	CH	54,6	54,5	
10	35,6	35,6	35,6	35,6	C_0	36,5	35,7	
11	20,9	20,9	21,0	21,0	CH_2	20,6	21,0	
12	40,2	40,2	40,4	40,2	CH_2	40,3	40,3	
13	40,9	40,8	40,9	40,9	C_0	40,9	40,9	
14	55,8	55,0	55,8	55,8	CH	55,9	55,8	
15	32,6	32,6	32,3	32,2	CH_2	32,7	32,6	
16	78,5	78,5	78,5	78,5	CH	78,6	78,5	
17	62,0	62,0	62,0	62,0	CH	62,0	62,0	
18	16,9	16,9	16,9	16,9	CH_3	16,4	17,0	
19	12,3	12,3	12,4	12,3	CH_3	11,4	12,4	
20	43,0	43,0	43,0	43,0	CH	43,1	43,0	
21	15,8	15,8	15,8	15,8	CH_3	15,9	15,9	
22	99,0	99,0	99,0	99,0	C_0	99,1	99,0	
23	26,6	26,5	26,6	26,6	CH_2	26,7	26,7	
24	28,5	28,5	28,6	28,5	CH_2	28,6	28,6	
25	31,0	31,0	31,0	31,0	CH	31,1	31,1	
26	50,2	50,2	50,2	50,2	CH_2	50,3	50,2	
27	19,3	19,3	19,3	19,3	CH_3	19,4	19,4	

^a MAXWELL et.al., 1996, adquirido a 100 MHz em CDCl₃. (δ) Deslocamentos em ppm.



SCFI - 3 rel-(22S,25S)-3β-amino-5α-espirossolano ou soladunalinidina (16)

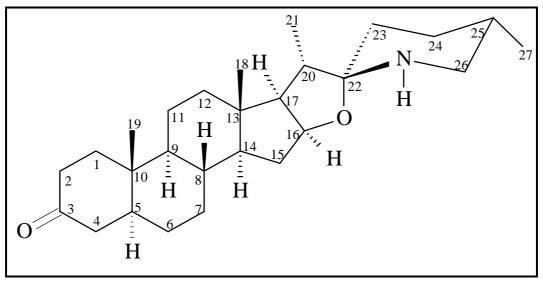
Anexo I - Tabelas _______ 89

Tabela 6.7 Dados de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) dos compostos **SCFI -4** (7) e **SCFI - 5** (6) comparados com os da 5α-tomatidan-3-ona (7)

-					
Posição	5α-tomatidan-3-ona (7)	5α-tomatida	an-3-ona (7)	SCFI – 4	SCFI – 5
Posição	$\delta^{13}C^{a}$	DEPT 135	$\delta^{13}C^{b}$	$\delta^{13}C$	$\delta^{13}C$
1	38,6	CH_2	38,5	38,5	35,7
2	38,2	CH_2	38,1	38,1	33,9
3	211,8	C_0	212,0	211,9	199,6
4	44,7	CH_2	44,7	44,7	123,9
5	46,7	CH	46,7	46,7	171,2
6	28,9	CH_2	28,8	28,8	32,8
7	32,0	CH_2	32,7	32,7	32,2
8	35,0	CH	34,9	35,0	35,1
9	53,9	CH	53,9	53,9	53,8
10	35,8	C_0	35,7	35,8	38,7
11	21,3	CH_2	21,2	21,3	20,8
12	40,1	CH_2	40,1	40,1	39,8
13	40,9	C_0	40,9	40,9	40,7
14	55,7	CH	55,6	55,6	55,1
15	32,6	CH_2	31,9	31,9	32,6
16	78,6	CH	78,4	78,5	78,3
17	61,9	CH	61,9	62,0	61,8
18	16,9	CH_3	16,9	16,9	16,8
19	11,5	CH_3	11,5	11,5	17,4
20	43,0	CH	43,0	43,1	43,0
21	15,9	CH_3	15,9	15,9	15,9
22	nd	C_0	99,1	99,3	99,4
23	26,7	CH_2	26,6	26,7	26,6
24	28,5	CH_2	28,5	28,6	28,5
25	30,9	CH	31,0	31,0	31,0
26	50,1	CH_2	50,2	50,3	50,2
27	19,3	CH_3	19,3	19,3	19,3

^a NAGAOKA et.al., 1993, adquirido a 67,8 MHz em CDCl₃. (δ) Deslocamentos em ppm.

^b VAZ et.al,. 2008, adquirido a 125 MHz em CDCl₃.



SCFI - 4 rel-(22S,25S)-5 α -espirossol-3-ona ou 5 α -tomatidan-3-ona (7)

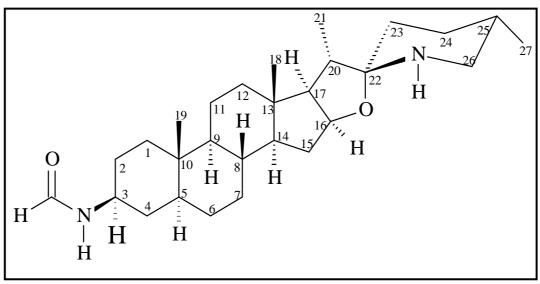
Anexo I – Tabelas _______ 90

Tabela 6.8 Dados de RMN de 1 H (200MHz, CDCl₃) e RMN de 13 C (50MHz, CDCl₃) de **SCFM - 1** e do composto caavuranamida (5)

	Caavuranamida (5)		SCFM - 1 ^b	
Posição	$\delta^{13}C^a$	DEPT	$\boldsymbol{\delta}^{\scriptscriptstyle 1} H$	$\delta^{13}C$
1	32,1	CH_2	1,02 (<i>m</i>) 1,72 (<i>m</i>)	32,7
2	28,8	CH_2	1,68 (<i>m</i>) 1,25 (<i>m</i>)	32,1
3	47,8	CH	3,86 (m)	47,6
4	37,2	CH_2	1,54 (m)	34,9
5	45,3	CH	$1,18 \ (m)$	45,3
6	28,5	CH_2	1,21 (m)	28,2
7	32,2	CH_2	1,68 (m) $0,89 (m)$	32,0
8	35,0	CH	1,54 (m)	35,0
9	54,7	CH	0,69 (m)	54,7
10	36,2	C_0		36,2
11	20,9	CH_2	1,28 (<i>m</i>) 1,54 (<i>m</i>)	20,9
12	40,2	CH_2	1,13 (<i>m</i>) 1,71 (<i>m</i>)	40,2
13	40,9	C_0		40,9
14	55,9	CH	1,07 (m)	55,9
15	32,6	CH_2	1,24 (m) $2,00 (m)$	32,6
16	78,5	CH	4,14 (m)	78,5
17	62,0	CH	$1,60 \ (m)$	62,0
18	16,9	CH_3	0.82 (s)	16,9
19	12,3	CH_3	0,83 (s)	11,4
20	42,9	CH	1,66 (m)	42,9
21	15,8	CH_3	0.96 (d J = 6.5 Hz)	15,8
22	99,3	C_0		99,3
23	26,6	CH_2	1,66 (<i>m</i>) 1,34 (<i>m</i>)	26,6
24	28,3	CH_2	1,56 (<i>m</i>) 1,37 (<i>m</i>)	28,4
25	30,9	CH	$1,60 \ (m)$	30,9
26	50,2	CH_2	2,74(m)	50,2
27	19,3	CH_3	0.86 (d J = 6.5 Hz)	19,3
	160,3	CO <u>H</u>	8,12 (m)	160,3
		N <u>H</u> COH	5,36 (d J = 7,5 Hz)	

^a VAZ, et.al., 2008, adquirido a 125 MHz em CDCl₃

 $^{^{}b}$ VAZ et.al., 2012, adquirido a 125 MHz em CDCl $_{3}$ (δ) Deslocamentos em ppm



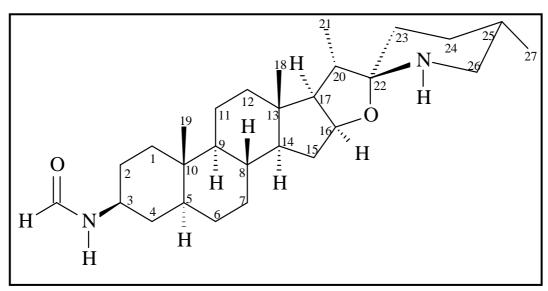
SCFM - 1 rel-(22S,25S)-3 β -N-formilamino-5 α -espirossolano ou caavuranamida (5)

Anexo I - Tabelas ______ 91

Tabela 6.9 Dados de RMN de 1 H (200MH_Z, CDCl₃) e RMN de 13 C (50MHz, CDCl₃) do produto natural **SCFM - 1** [caavuranamida (5)] e do obtido por via química a partir da *N*-formilação de **SCFI - 3**

D : ~		SCFM	- 1	Caavuranamida (5)				
Posição	DEPT	$\boldsymbol{\delta}^{\scriptscriptstyle I}$	H	$\delta^{13}C$	$\boldsymbol{\delta}^{\scriptscriptstyle 1}$	$\delta^{13}C$		
1	CH_2	1,02 (m)	1,72 (m)	32,7	1,06	(m)	32,7	
2	CH_2	$1,68 \ (m)$	1,25 (m)	32,1	1,67 (m)	1,26 (m)	32,1	
3	CH	3,86	(<i>m</i>)	47,6	3,78	S(m)	47,8	
4	CH_2	1,54	(<i>m</i>)	34,9	1,53	35,0		
5	CH	1,18	(<i>m</i>)	45,3	1,11	45,2		
6	CH_2	1,21	(<i>m</i>)	28,2	1,26	28,5		
7	CH_2	$1,68 \ (m)$	0.89 (m)	32,0	1,67 (m)	0.84 (m)	32,0	
8	CH	1,54	(<i>m</i>)	35,0	1,55	35,5		
9	CH	0,69	(<i>m</i>)	54,7	0,66	54,3		
10	C_0			36,2			36,2	
11	CH_2	$1,28 \ (m)$	1,54 (m)	20,9	1,29 (m)	$1,48 \ (m)$	20,9	
12	CH_2	$1,13\ (m)$	$1,71 \ (m)$	40,2	$1,13 \ (m)$	1,72 (m)	40,1	
13	C_0			40,9			40,8	
14	CH	1,07 (m)		55,9	1,06 (m)		55,7	
15	CH_2	1,24 (m)	2,00 (m)	32,6	1,25 (m)	2,00 (m)	32,6	
16	CH	4,14 (m)		78,5	4,12	78,5		
17	CH	$1,60 \ (m)$		62,0	1,59	62,0		
18	CH_3	0,82 (s)		16,9	0,82	16,9		
19	CH_3	0,83 (s)		11,4	0,82	12,3		
20	CH	1,66(m)		42,9	1,66	43,0		
21	CH_3	0.96 (d J = 6.5 Hz)		15,8	0,97 (d J	15,8		
22	C_0			99,3			99,3	
23	CH_2	1,66 (m)	1,34 (m)	26,6	1,66 (m)	1,37 (m)	26,6	
24	CH_2	1,56 (m)	1,37 (m)	28,4	1,54(m)	1,36 (m)	28,8	
25	CH	1,60 (m)		30,9	1,60	31,0		
26	CH_2	2,74(m)		50,2	2,74	50,2		
27	CH_3	0.86 (d J = 6.5 Hz)		19,3	0,86 (d J	19,3		
	CO <u>H</u>	8,12	(<i>m</i>)	160,3	8,09	160,4		
	N <u>H</u> COH	5,36 (d J	= 7,5 Hz		5,45			

^b VAZ et.al., 2012, adquirido a 125 MHz em CDCl₃ (δ) Deslocamentos em ppm



SCFM - 1 *rel-*(22*S*,25*S*)-5α-espirossol-3-ona ou caavuranamida (**5**)

Anexo I – Tabelas ______92

Tabela 6.10 Atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Solanum* contra microrganismos

Espécie parte da planta	Extratos e frações	Microorganismos MIC (μg.mL ⁻¹)										
		B.subtilis	C.albicans	E.coli	E.faecium	E.hirae	M.luteus	P.aeruginosa	R.equi	S.aureus	S.choleraesuis	S.epidermides
S. caavurana Frutos Maduros	SCFMEHE	b	nt	b	b	nt	b	b	500	b	700	b
	SCFMD	125	nt	125	125	nt	60	b	60	700	600	300
	SCFMB	125	nt	60	125	nt	60	b	60	500	400	250
	SCFMFN	30	nt	60	60	nt	60	b	60	600	400	300
	SCFMFA	60	nt	60	60	nt	60	b	30	600	200	250
	SCFMFI	60	nt	60	60	nt	60	b	60	300	300	400
	SCFIEP	b	62	b	600	b	b	b	250	b	b	b
S. caavurana	SCFIM	120	2	80	250	250	62	b	62	b	b	b
	SCFIH	250	4	150	300	800	300	b	200	b	b	b
	SCFIMFI	600	4	b	400	b	b	b	1000	b	b	b
Frutos Imaturos	SCFIMFN	31	4	250	31	62	62	b	1000	62	200	250
	SCFIMPA	15	4	31	31	31	31	b	1000	31	90	120
	SCFIMFA	31	15	31	31	62	31	1000	1000	250	350	250
S.caavurana	SCTEP	b	b	b	1000	b	b	b	1000	b	b	b
Tronco	SCTM	120	2	150	100	500	120	b	1000	500	600	600
C 1:1	SDPAEP	b	nt	b	b	nt	b	b	b	b	b	b
S. diploconos Partes Aéreas	SDPAM	b	nt	b	b	nt	b	b	b	b	700	b
	SDPAH	b	nt	b	b	nt	b	b	900	b	b	b
S. scuticum Frutos Imaturos	SSFIEP	b	nt	b	b	nt	b	b	b	b	b	b
	SSFIM	b	nt	b	b	nt	b	b	b	b	300	b
	SSFIH	b	nt	b	b	nt	b	b	b	b	b	b
	SSFIFI	b	b	b	500	b	b	b	250	b	b	b
	SSFIFN	b	b	b	b	b	b	b	120	b	b	b
	SSFIFA	b	b	b	b	b	b	b	250	b	b	b
	Chloranfenicol ^a	20		40	70	120	50	850	40	20	60	40
	Nistatina ^c		50									

^a Controle positivo para bactérias; ^b MIC > 1000 μg.mL⁻¹; ^c Controle positivo para fungos; *nt* = não testado;

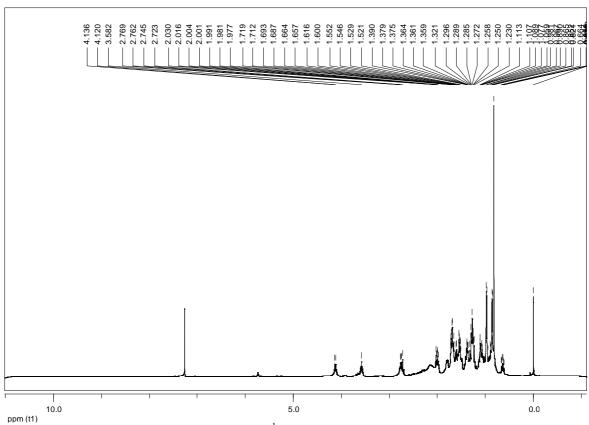
Anexo I – Tabelas

Tabela 6.11 Atividade antiproliferativa de extratos e frações de Solanum obtidas, contra linhagens de células cancerosas

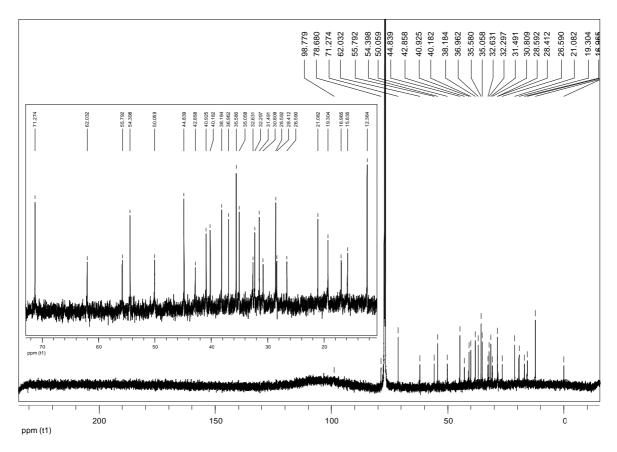
<i>Espécie</i> parte da planta	Extratos e frações	TGI (μg.mL ⁻¹) Linhagens de Células Tumorais											
		U251	UACC-62	MCF-7	NCI- H460	OVCAR-3	HT-29	786-0	PC-3	K562	NCI- ADR/RES	НаСаТ	VERO
	Etanólico	b	2,11	93,06	b	84,49	60,90	60,62	nt	b	102,13	nt	b
S.caavurana Frutos Maduros	Fração CH ₂ Cl ₂	75,53	b	142,48	b	139,66	115,39	94,97	nt	b	b	nt	b
	Fração ButOH	82,45	b	100,40	b	117,84	62,13	46,04	nt	b	243,35	nt	b
	SCFMFN	90,47	8,09	57,17	100,27	100,27	73,67	80,63	nt	b	82,37	nt	b
	SCFMFA	65,59	37,14	98,21	b	51,77	228,07	74,64	nt	b	61,20	nt	b
	Éter de Petróleo	b	nt	b	b	56,4	b	b	nt	b	b	nt	nt
	Metanol	54,9	48,7	168,4	156,9	b	b	b	133,1	b	265,8	nt	b
S.caavurana	Hidroalcoólico	21,1	20,1	b	101,3	45,5	73,9	68,9	57,9	b	104,6	nt	9,0
	SCFIMFI	64,2	nt	97,7	116,7	2,1	126,8	110,8	nt	b	b	75,7	nt
Frutos Imaturos	SCFIMFN	55,7	nt	81,0	88,8	4,8	109,3	85,8	nt	b	b	54,4	nt
	SCFIMPA	21,2	nt	20,9	40,4	1,4	36,7	22,7	nt	6,4	90,4	25,0	nt
	SCFIMFA	47,9	nt	63,7	157,2	9,3	24,1	54,2	nt	b	b	20,0	nt
S.caavurana	SCTEP	b	nt	b	b	40,1	b	b	nt	b	b	b	nt
Tronco	SCTM	71,8	nt	120,4	138,1	5,0	52,8	93,4	nt	b	b	82,5	nt
C 1: 1	Éter de Petróleo	b	b	b	b	b	b	b	nt	b	b	nt	b
S.diploconos Folhas	Metanol	180,72	65,72	b	b	124,19	209,00	76,94	nt	b	107,84	nt	b
	Hidroalcoólico	37,1	36,1	b	166,3	85,0	99,9	96,5	43,1	b	b	nt	21,7
S.scuticum Frutos Imaturos	Éter de Petróleo	b	b	b	b	178,90	b	b	nt	b	216,92	nt	b
	Metanol	b	109,61	b	b	b	b	b	nt	b	b	nt	b
	Hidroalcoólico	217,6	b	b	b	b	b	b	b	b	b	nt	b
	STFIFI	100,9	nt	129,0	b	135,8	82,1	169,7	nt	b	b	103,4	nt
	STFIFN	126,3	nt	92,5	b	b	165,3	174,1	nt	b	b	102,8	nt
	STFIFA	b	nt	b	b	250	b	b	nt	11,8	b	b	nt
	Doxorubicina ^a	3,24	0,15	10,49	>25	5,62	>25	3,73	>25	>25	>25	1,0	4,1

^a Controle positivo; ^b concentração > 250 μg.mL⁻¹; U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (colorretal), 786-0 (rim), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovário, resistente a múltiplos fármacos), HaCaT (queratinócito humano) e VERO (rim, célula normal, macaco verde).TGI (Total Growth Inhibition): concentration (μg.mL⁻¹);

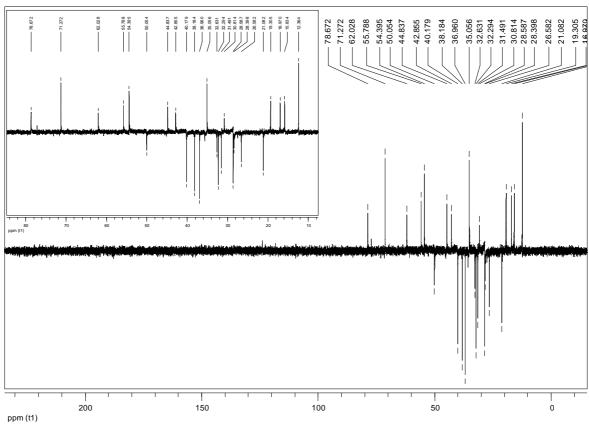
Anexo II – Espectros



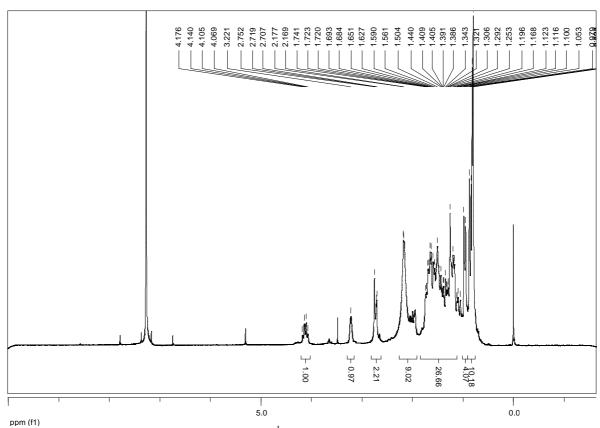
Espectro EI.1 Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto SCFI - 1



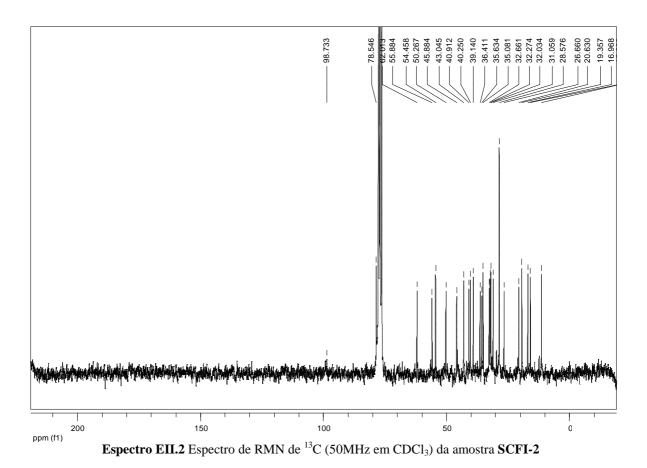
Espectro EI.2 Espectro de RMN de ¹³C com ampliação (125 MHz, CDCl₃) do composto **SCFI - 1**

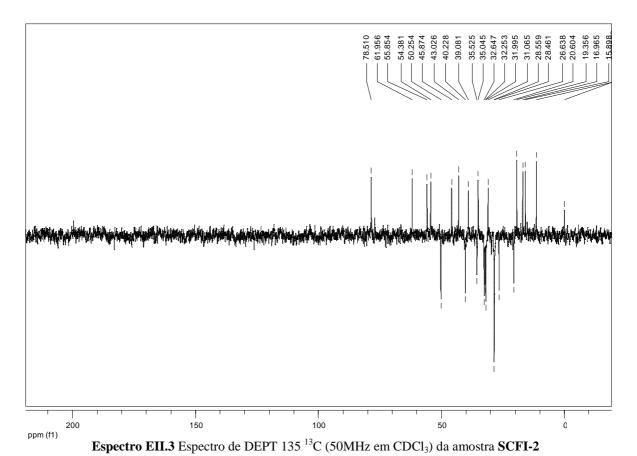


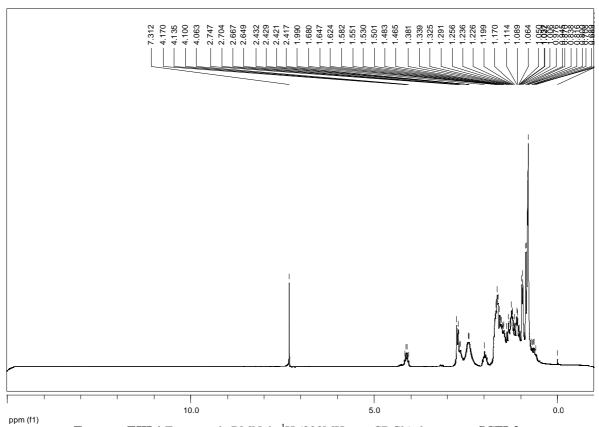
Espectro EI.3 Espectro de DEPT 135 (125 MHz, CDCl₃) do composto SCFI – 1



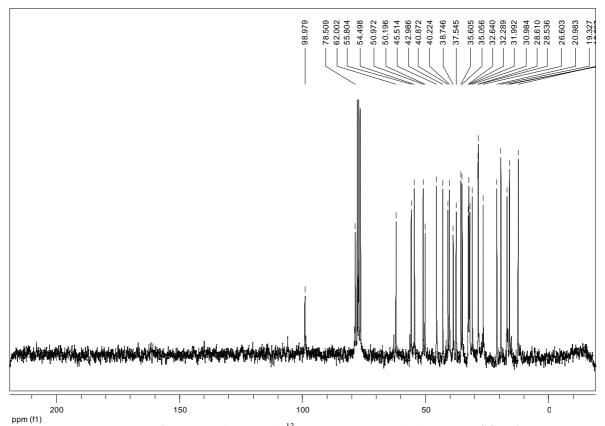
Espectro EII.1 Espectro de RMN de ¹H (200MHz em CDCl₃) da amostra SCFI - 2



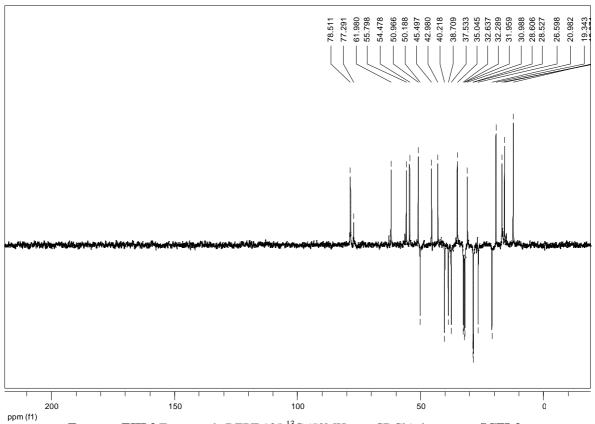




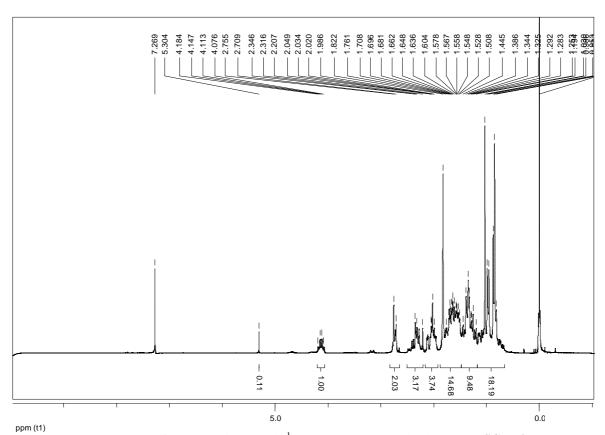
Espectro EIII.1 Espectro de RMN de ¹H (200MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-3



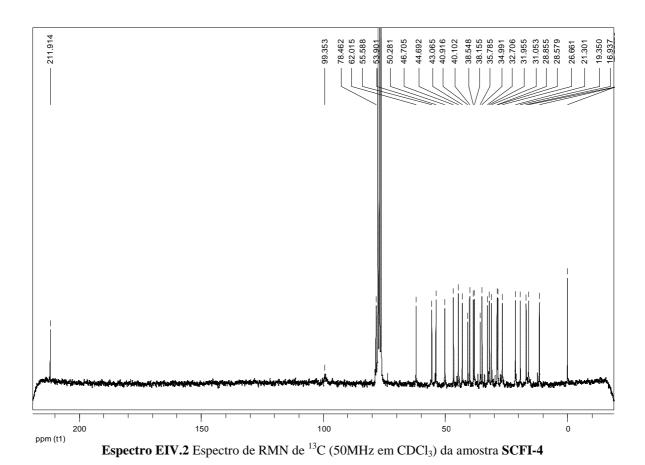
Espectro EIII.2 Espectro de RMN de ¹³C (50MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-3

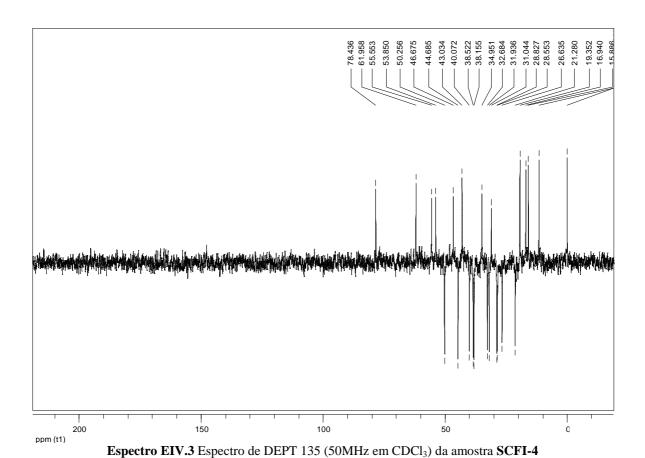


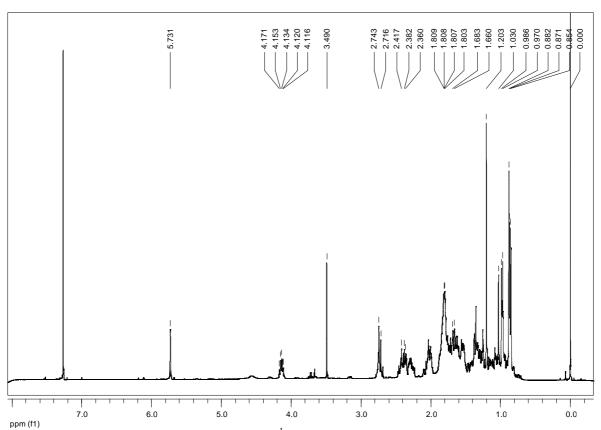
Espectro EIII.3 Espectro de DEPT 135 ¹³C (50MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-3



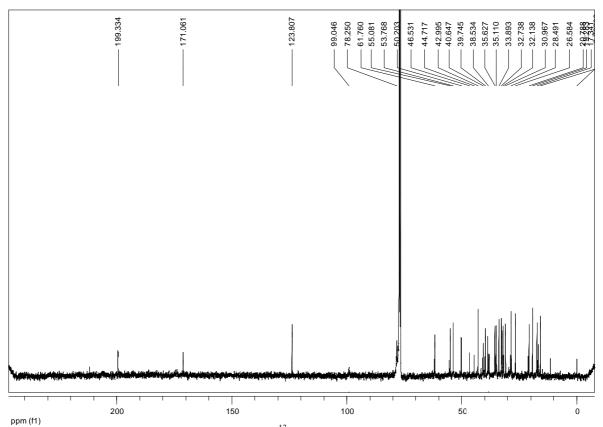
Espectro EIV.1 Espectro de RMN de ¹H (200MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-4



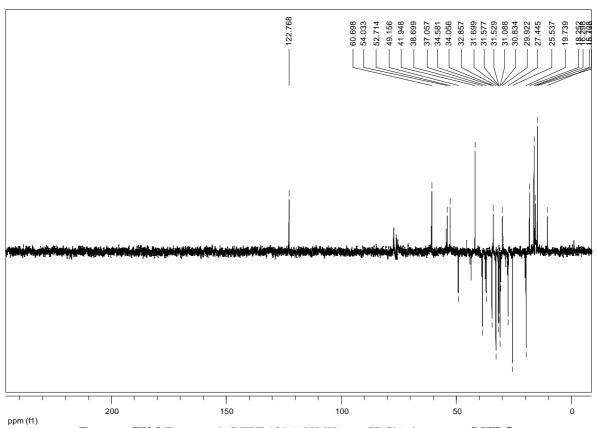




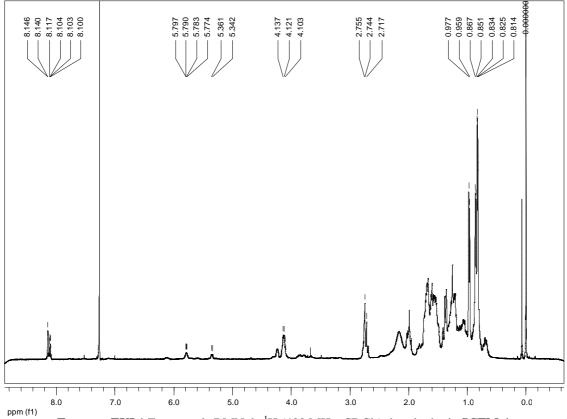
Espectro EV.1 Espectro de RMN de ¹H (400MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-5



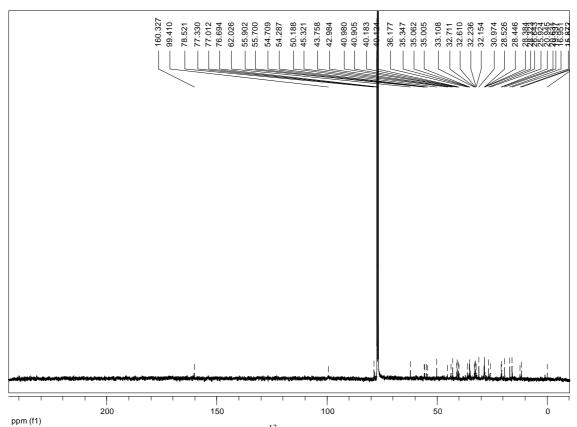
Espectro EV.2 Espectro de RMN de ¹³C (100MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-5



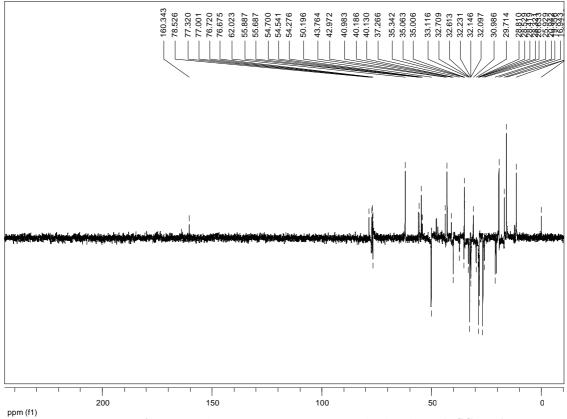
Espectro EV.3 Espectro de DEPT 135 (100MHz em CDCl₃) da amostra SCFI-5



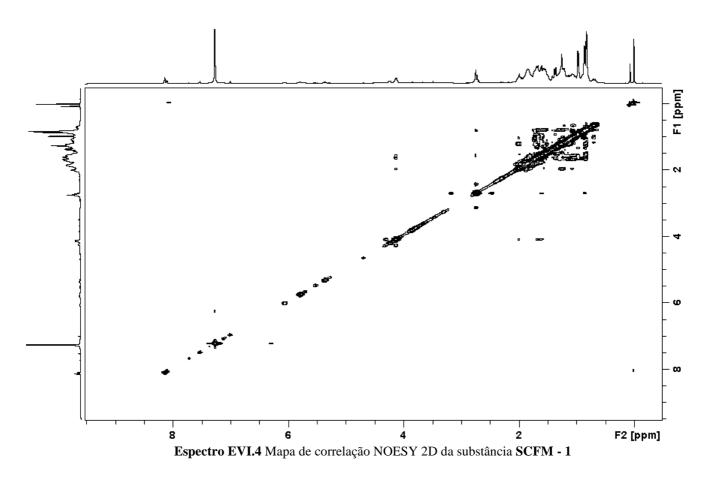
Espectro EVI.1 Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância SCFM-1

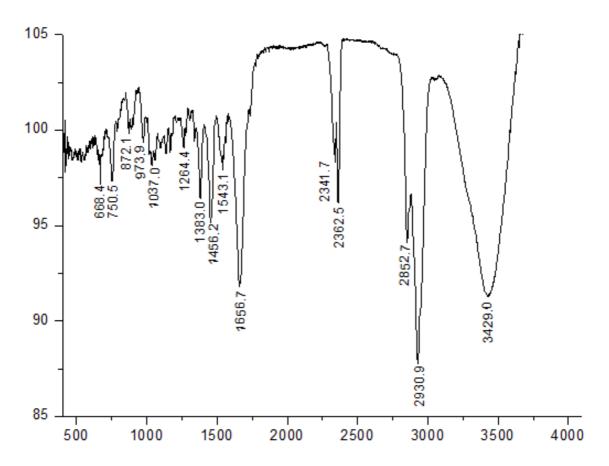


Espectro EVI.2 Espectro de RMN de ¹³C (100MHz, CDCl₃) da substância SCFM-1

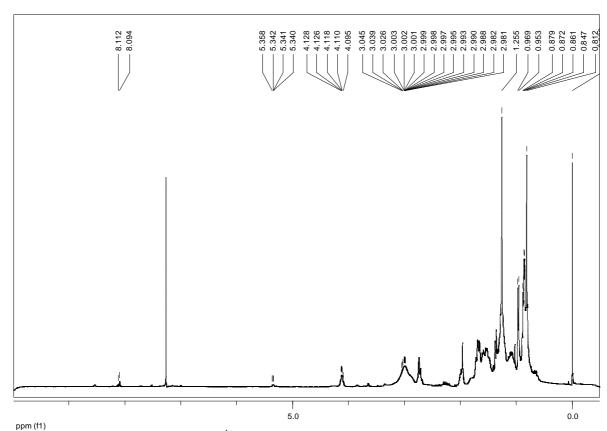


Espectro EVI.3 Espectro de DEPT 135 (100MHz, CDCl₃) da substância SCFM-1

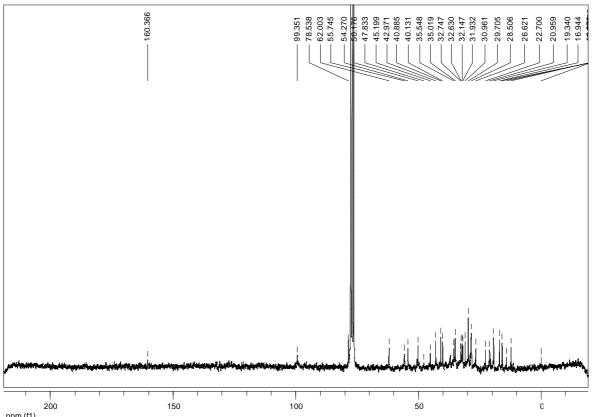




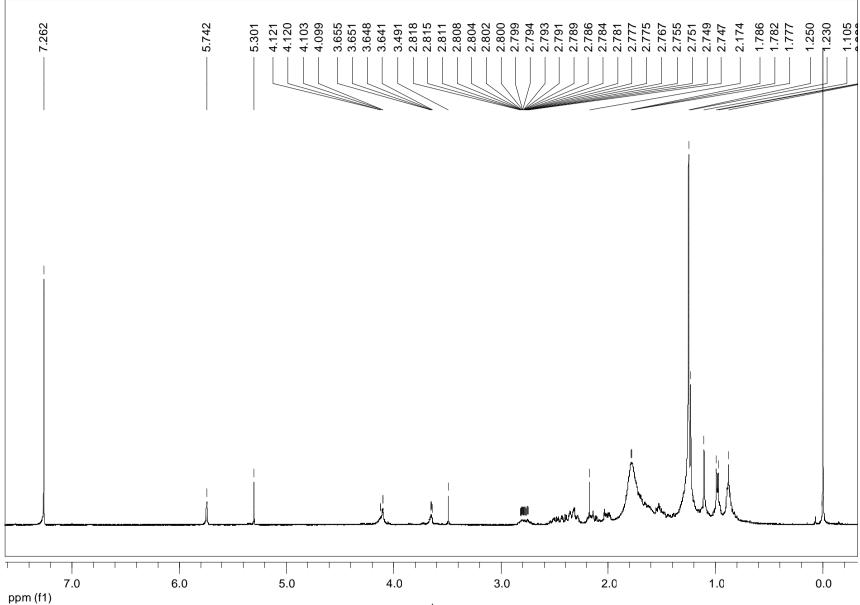
 $\textbf{Espectro EVI.5} \ \textbf{Espectro na região do Infravermelho IV (KBr) da substância } \textbf{SCFM-1}$



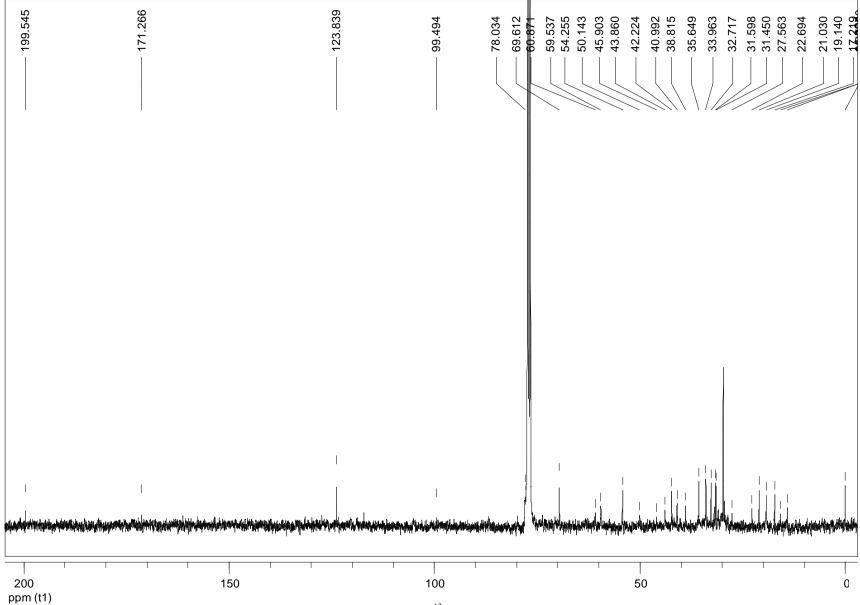
Espectro EVII.1 Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância SCFM-1 obtida por via química a partir de SCFI-3



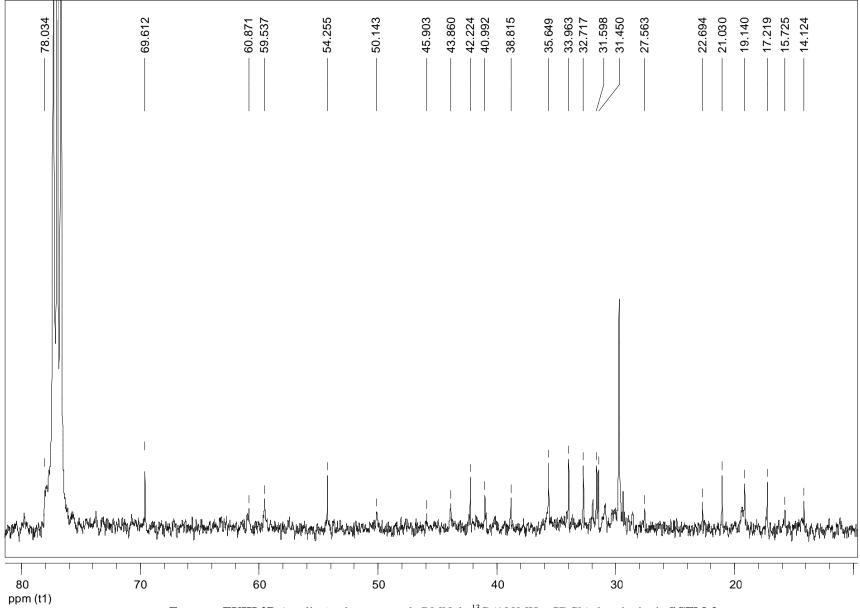
Espectro EVII.2 Espectro de RMN de ¹³C (100MHz, CDCl₃) da substância SCFM-1 obtida por via química a partir de SCFI-3



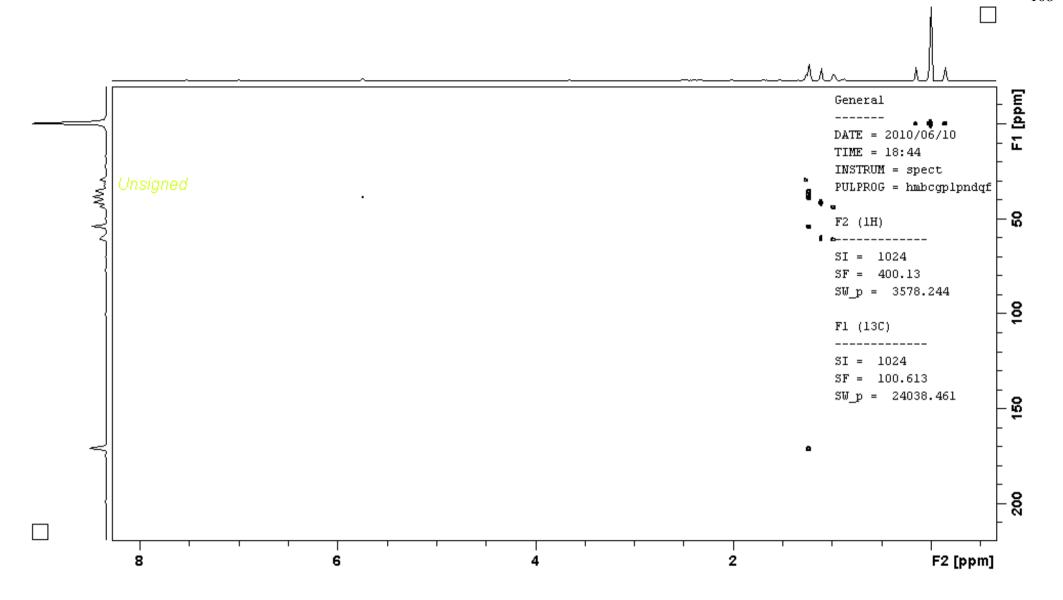
Espectro EVIII.1 Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da substância **SCFM-2**



Espectro EVIII.2A Espectro de RMN de ¹³C (100MHz, CDCl₃) da substância **SCFM-2**



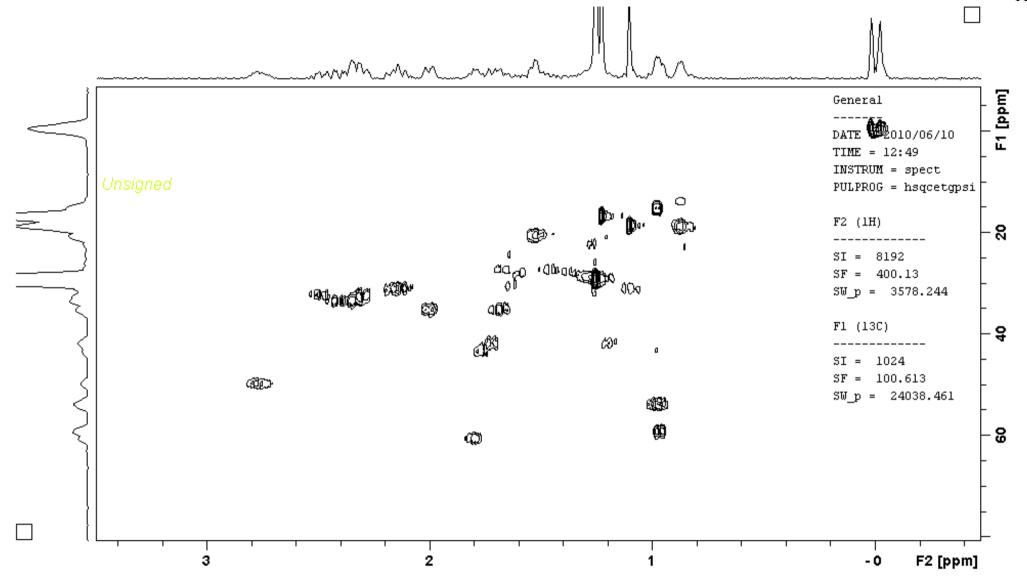
Espectro EVIII.2B Ampliação do espectro de RMN de ¹³C (100MHz, CDCl₃) da substância **SCFM-2**



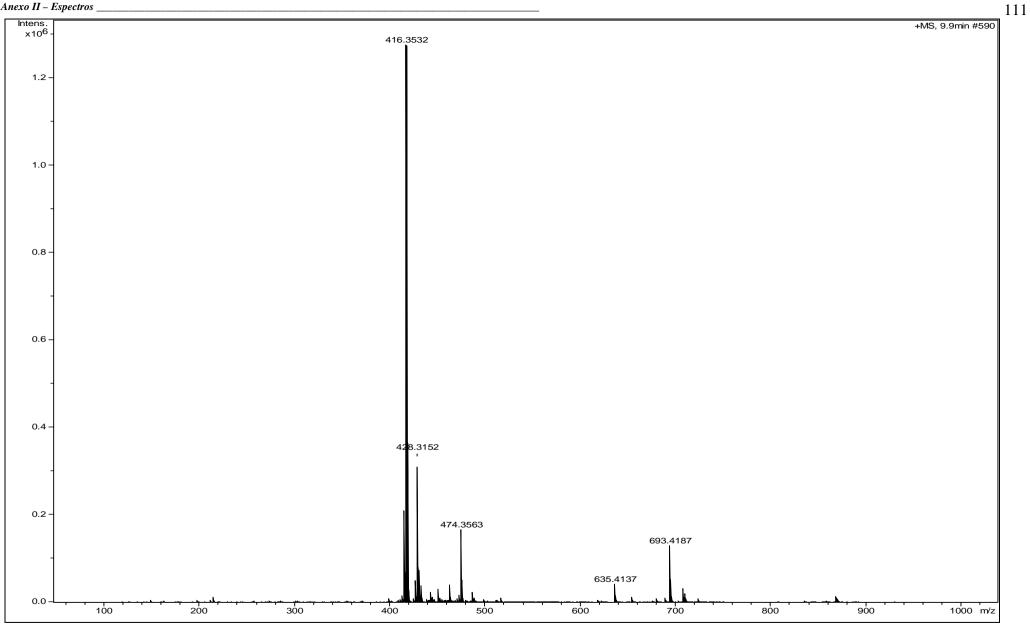
Espectro EVIII.3 Mapa de correlação HMBC da substância SCFM-2

Espectro EVIII.4A Mapa de correlação HSQC da substância SCFM-2

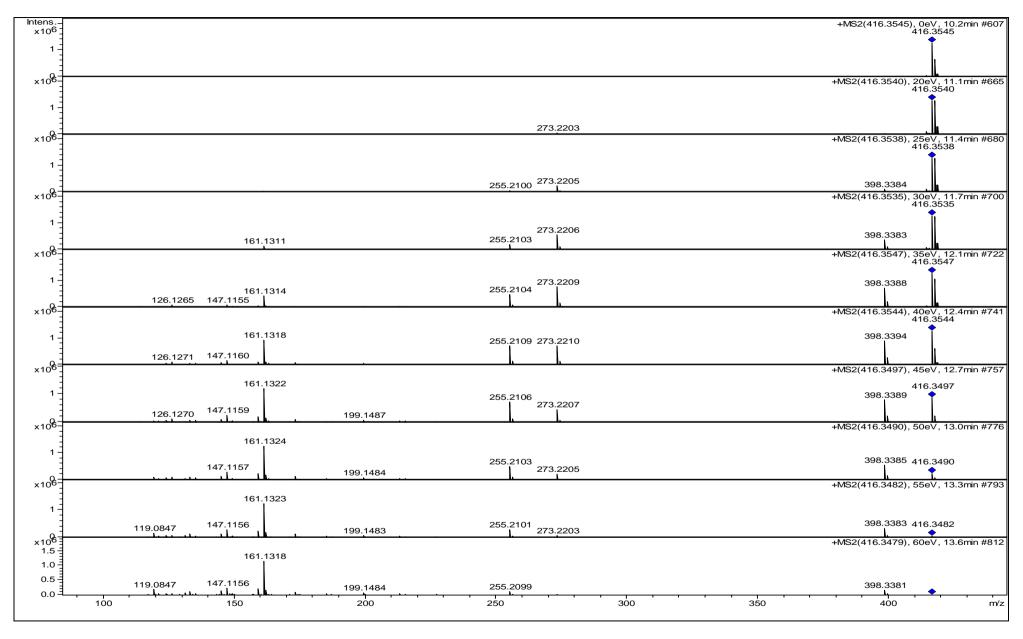
F2 [ppm]



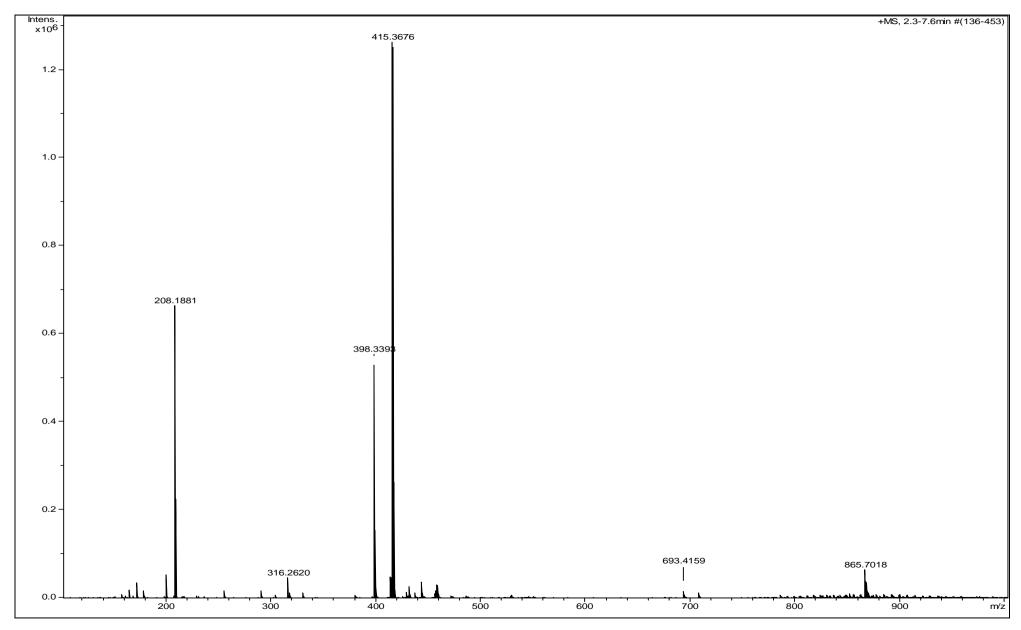
Espectro EVIII.4B Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância SCFM-2



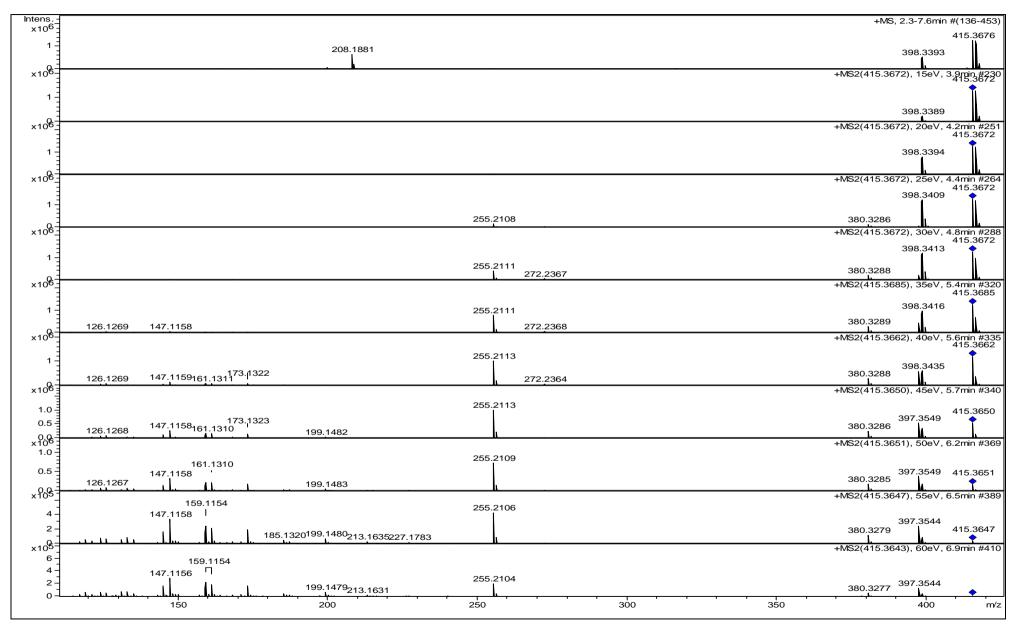
Espectro EM.1 Espectro de massas full scan do composto SCFI - 1



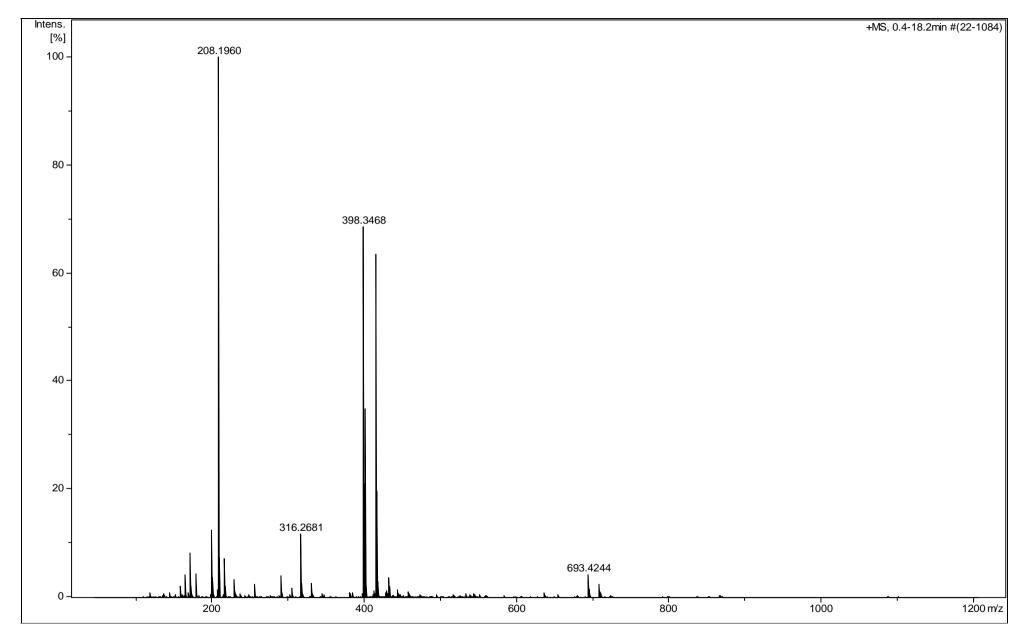
Espectro EM.2 Espectro ESI-MS/MS (m/z 416) para o composto SCFI - 1



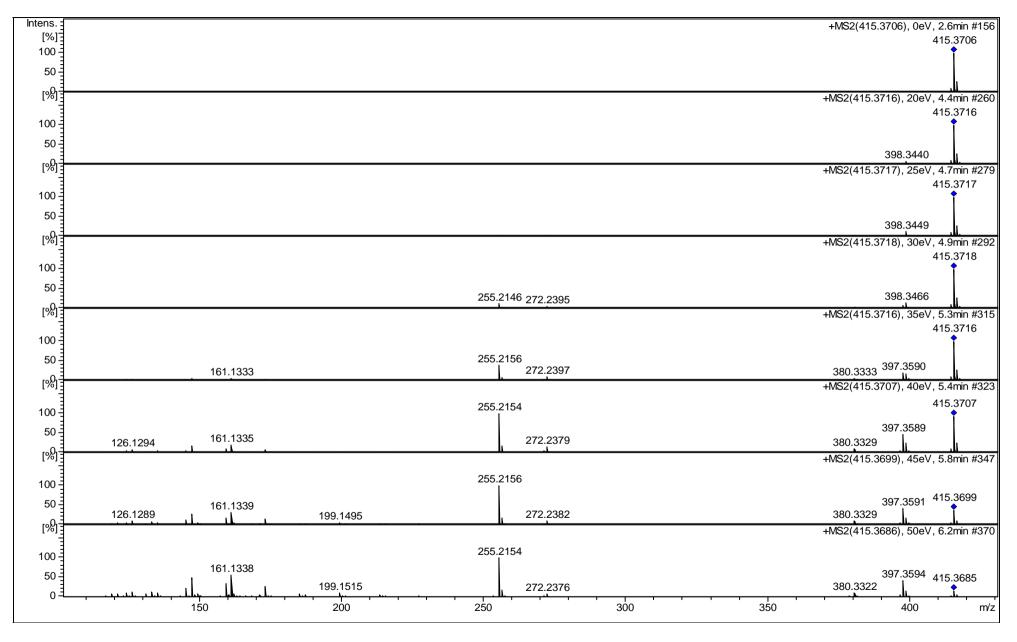
Espectro EM.3 Espectro de massas full scan do composto SCFI - 2



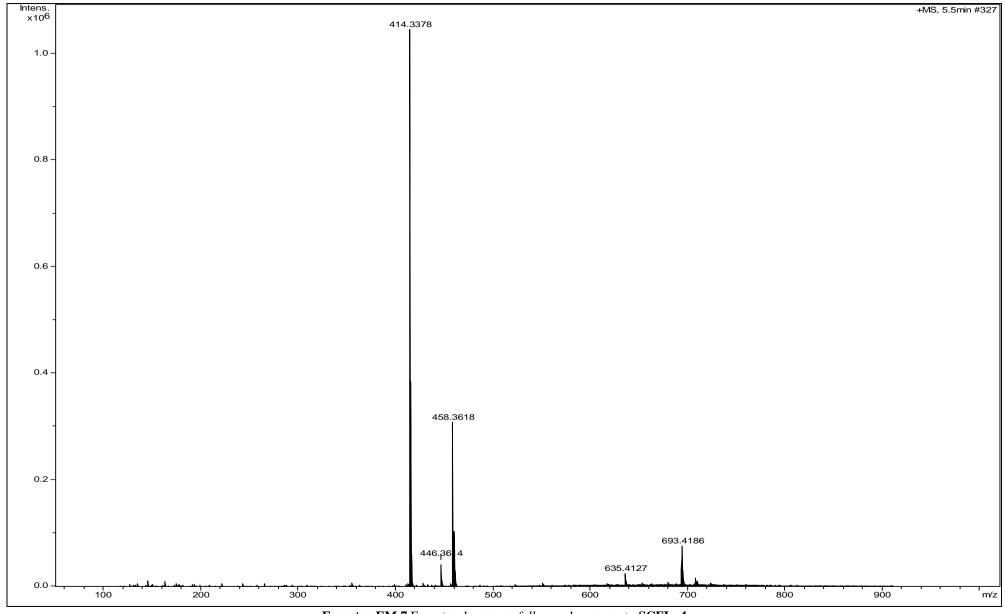
Espectro EM.4 Espectro ESI-MS/MS (m/z 415) para o composto SCFI - 2



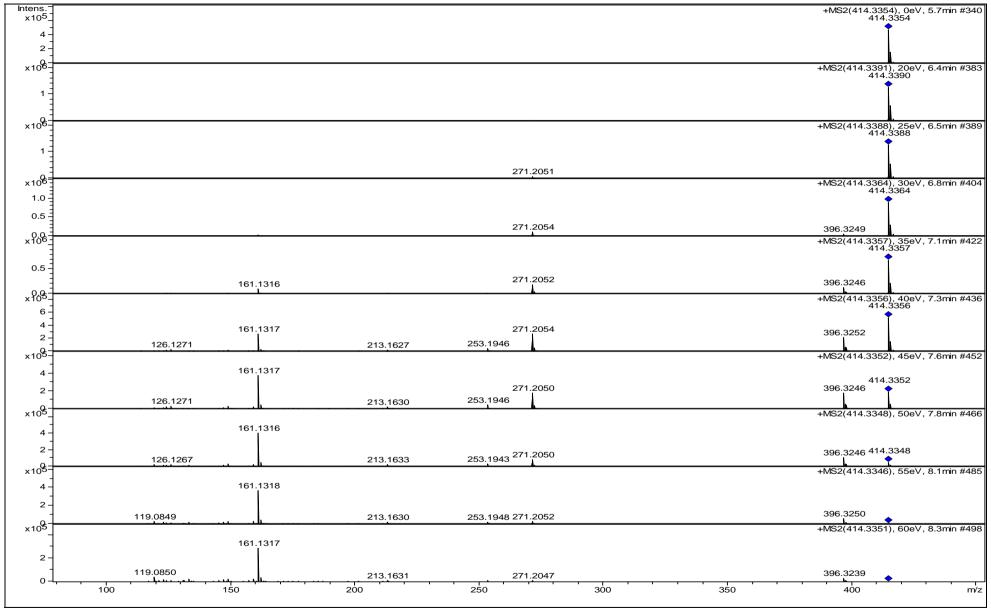
Espectro EM.5 Espectro de massas full scan do composto SCFI - 3



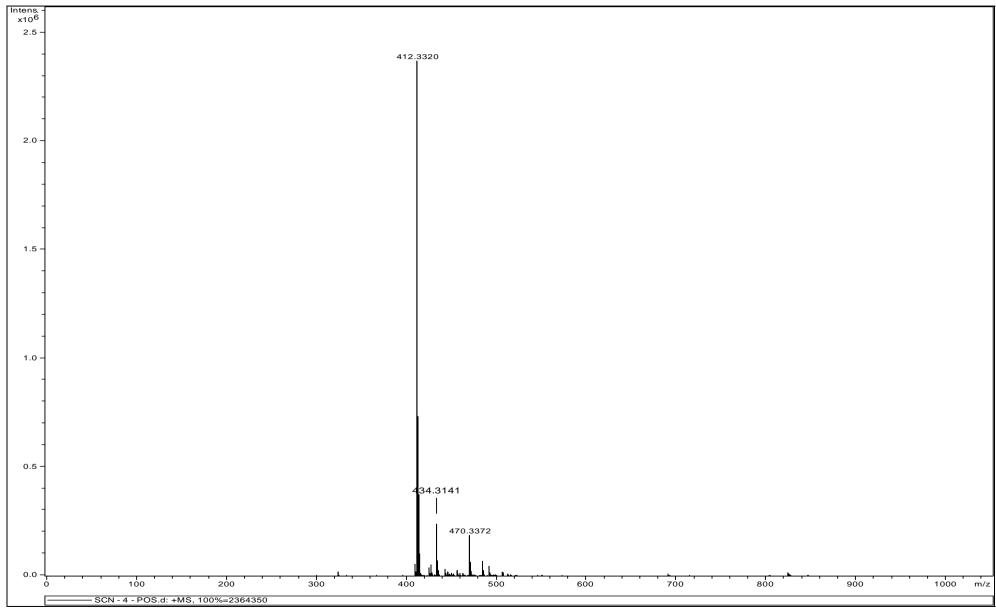
Espectro EM.6 Espectro ESI-MS/MS (m/z 415) para o composto SCFI - 3



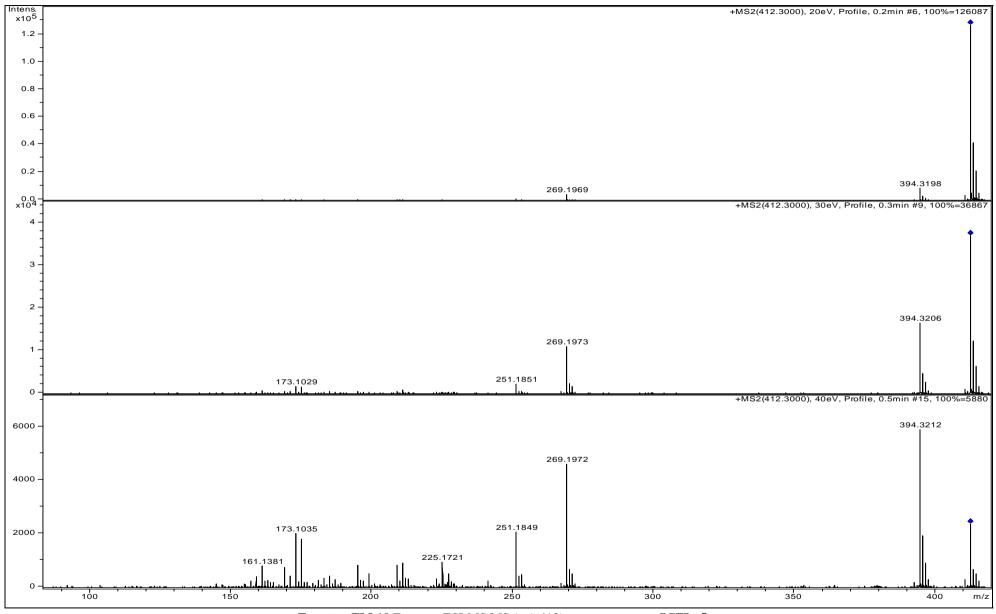
Espectro EM.7 Espectro de massas full scan do composto SCFI - 4



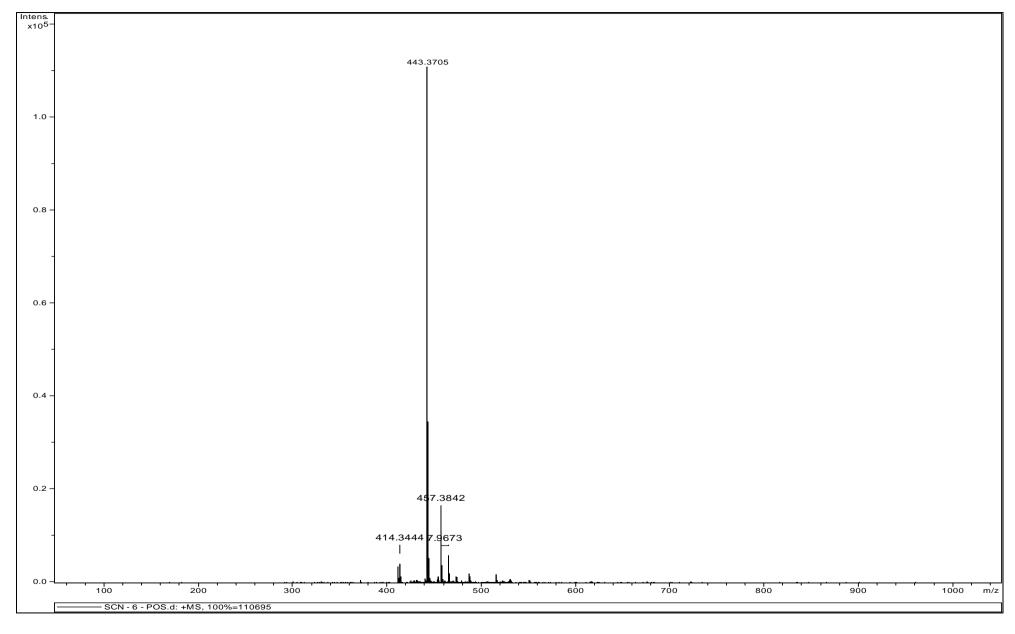
Espectro EM.8 Espectro ESI-MS/MS (m/z 414) para o composto SCFI - 4



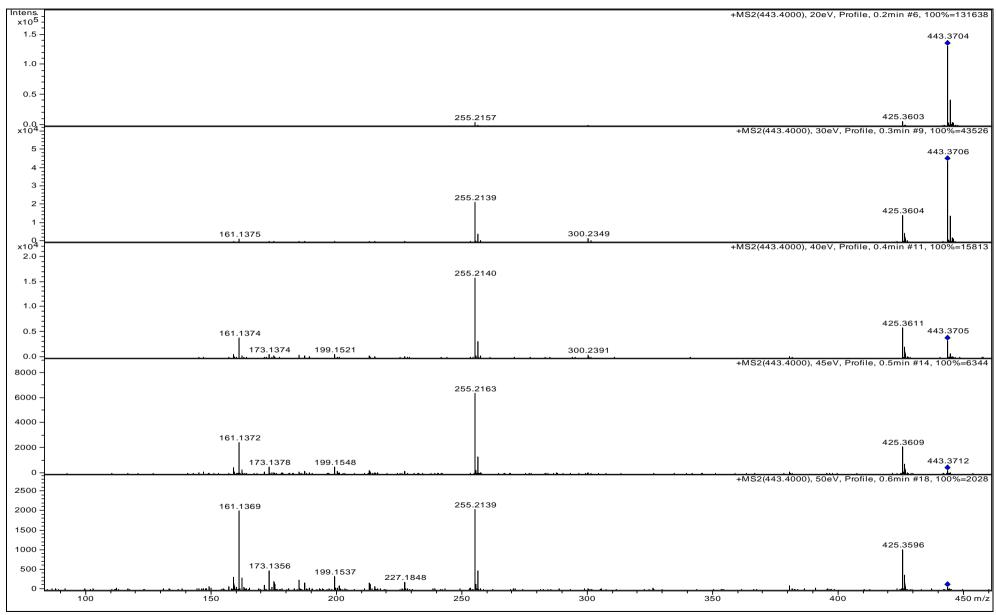
Espectro EM.9 Espectro de massas *full scan* do composto SCFI – 5



Espectro EM.10 Espectro ESI-MS/MS (m/z 412) para o composto SCFI - 5

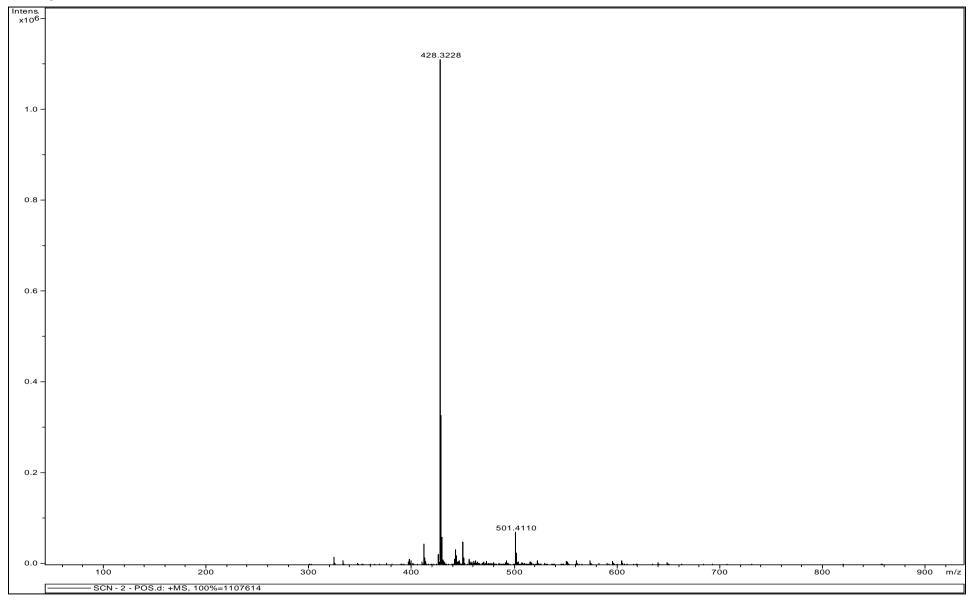


Espectro EM.11 Espectro de massas *full scan* do composto SCFM – 1

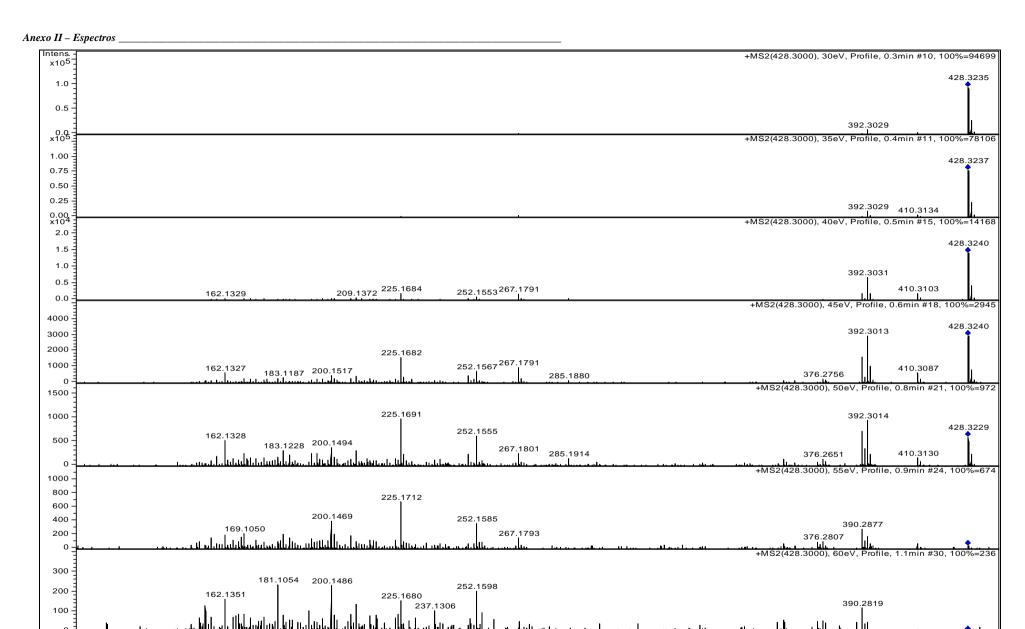


Espectro EM.12 Espectro ESI-MS/MS (*m/z* 443) para o composto **SCFM - 1**

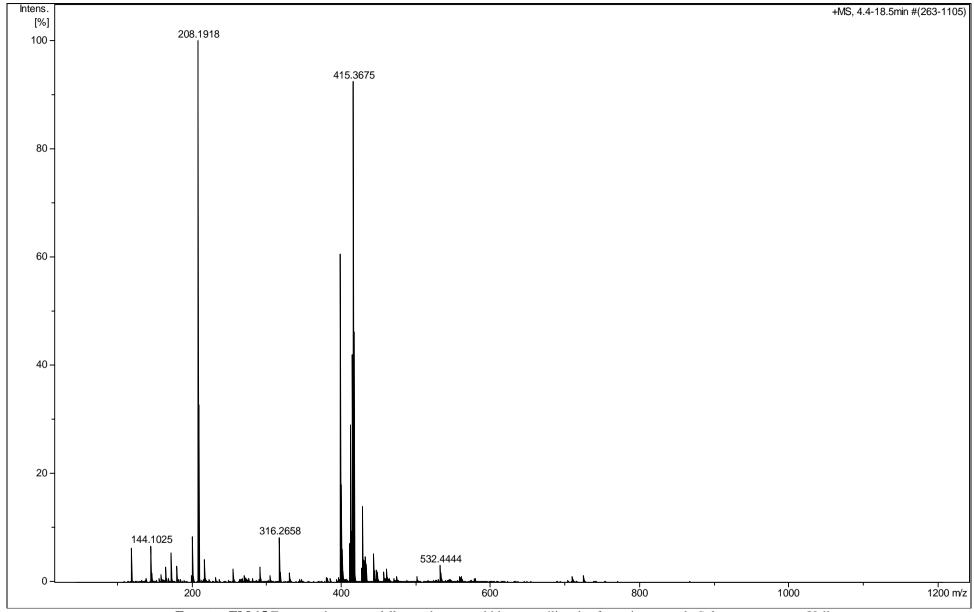
Anexo II - Espectros



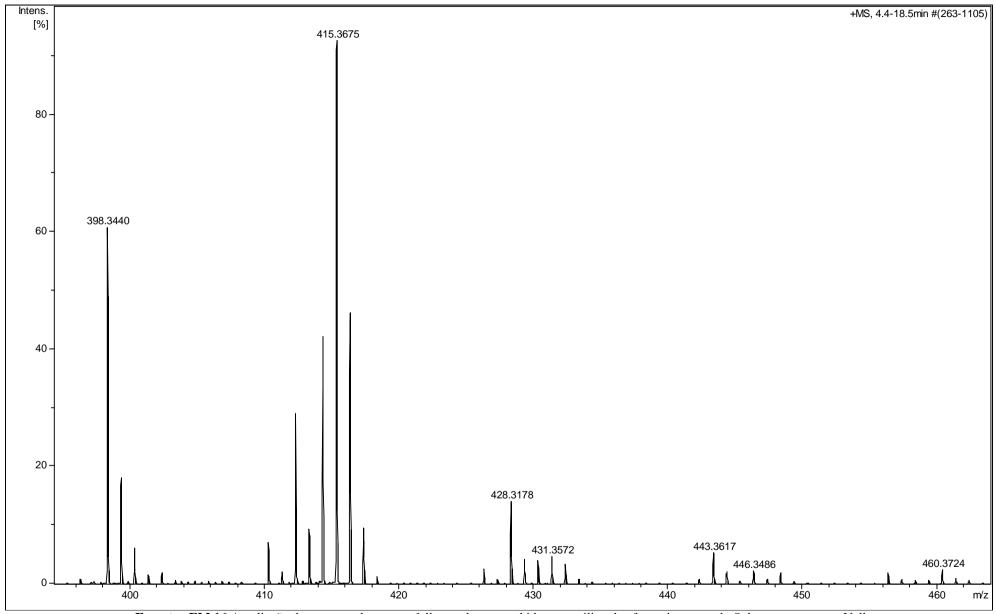
Espectro EM.13 Espectro de massas *full scan* do composto SCFM – 2



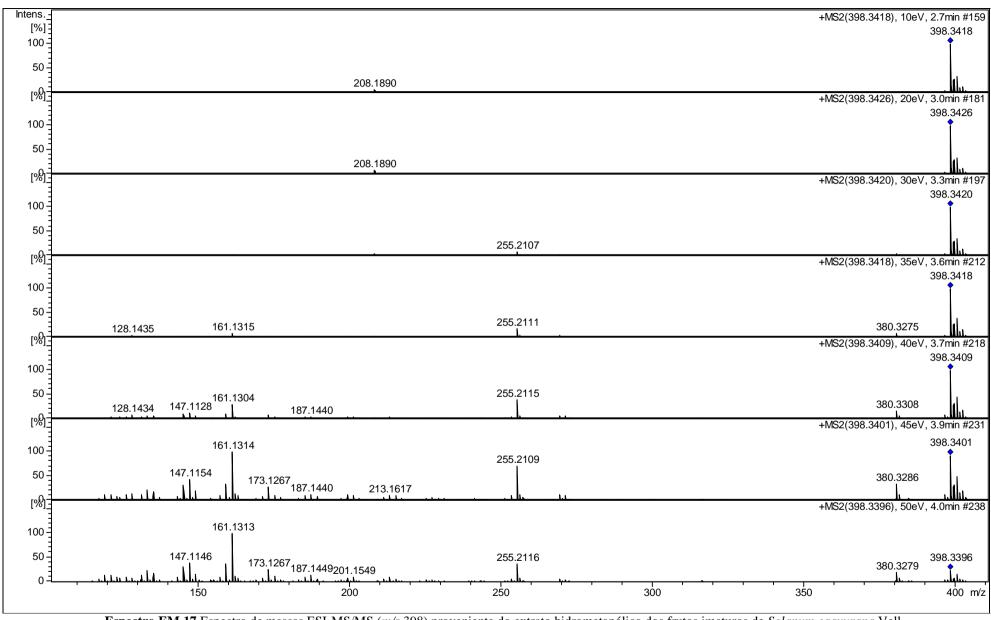
Espectro EM.14 Espectro ESI-MS/MS (*m/z* 428) para o composto **SCFM - 2**



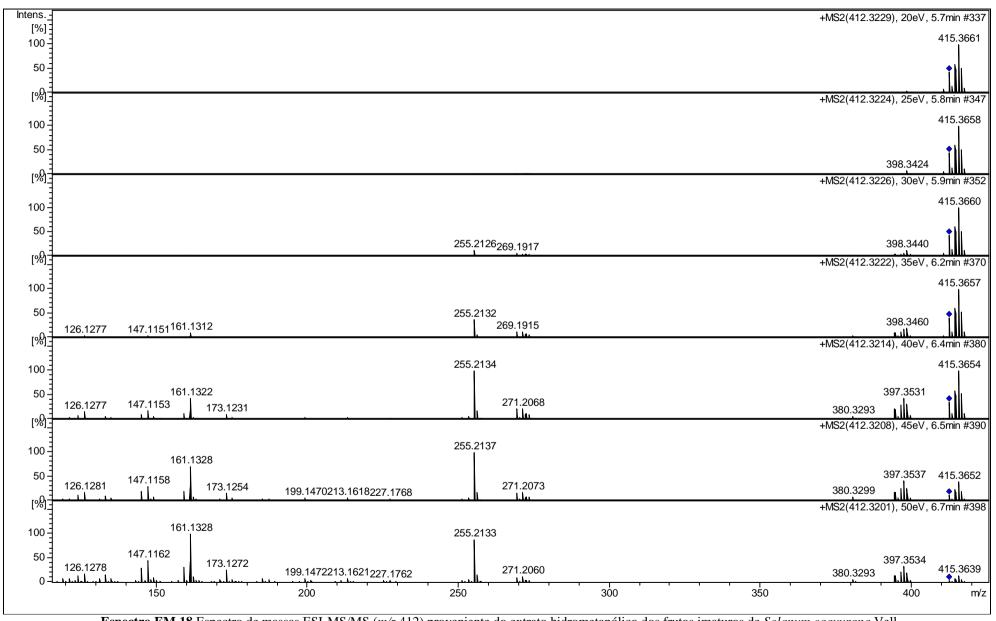
Espectro EM.15 Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



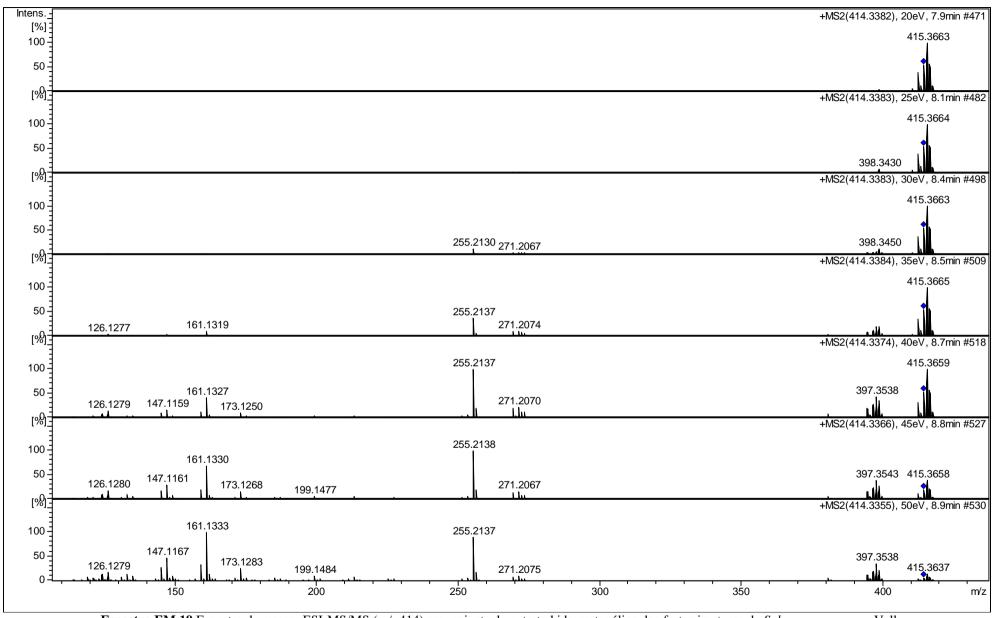
Espectro EM.16 Ampliação do espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



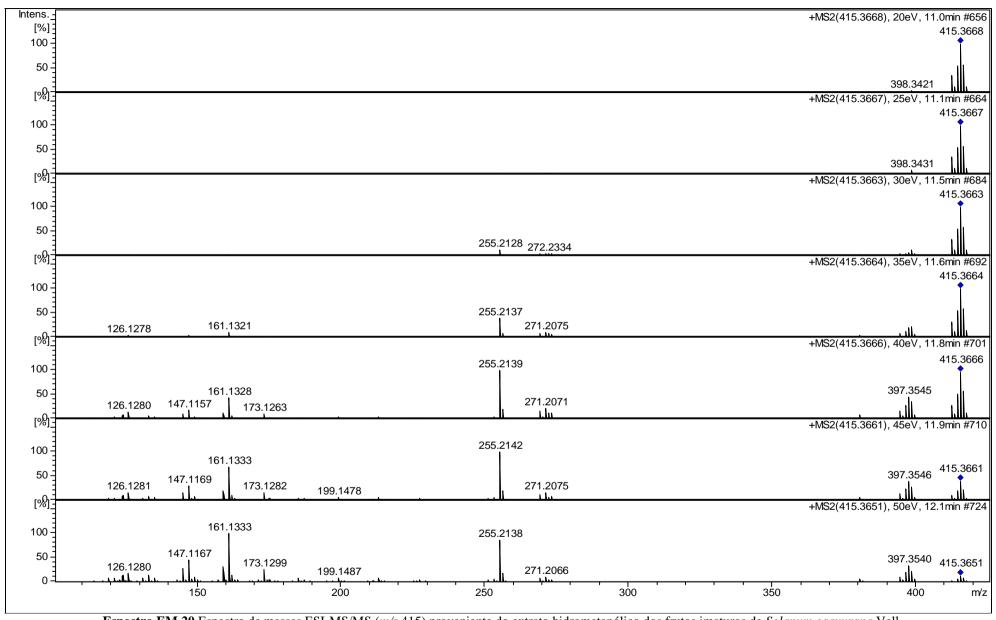
Espectro EM.17 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



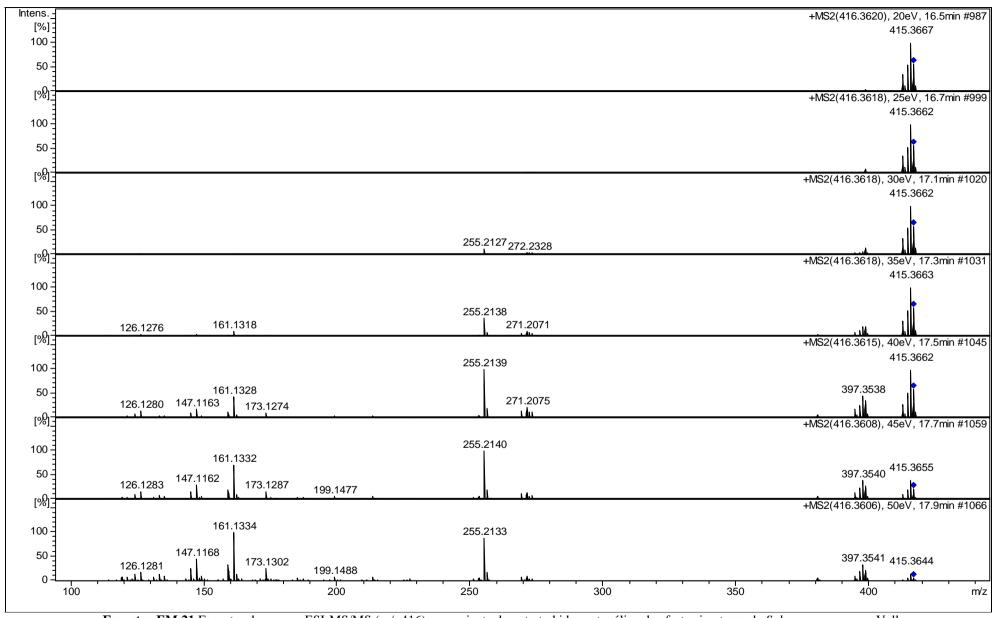
Espectro EM.18 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 412) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



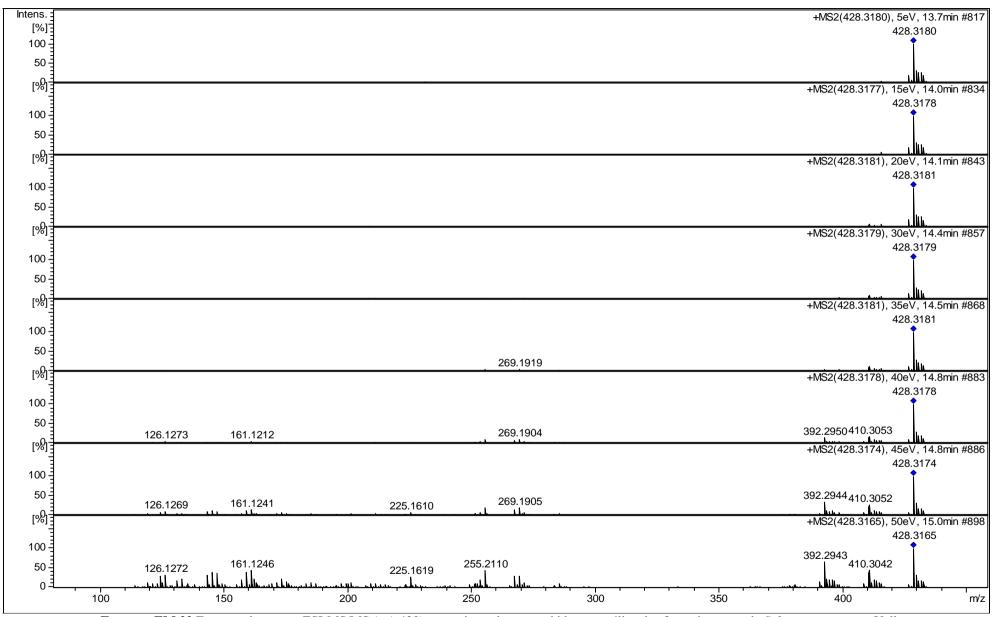
Espectro EM.19 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 414) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



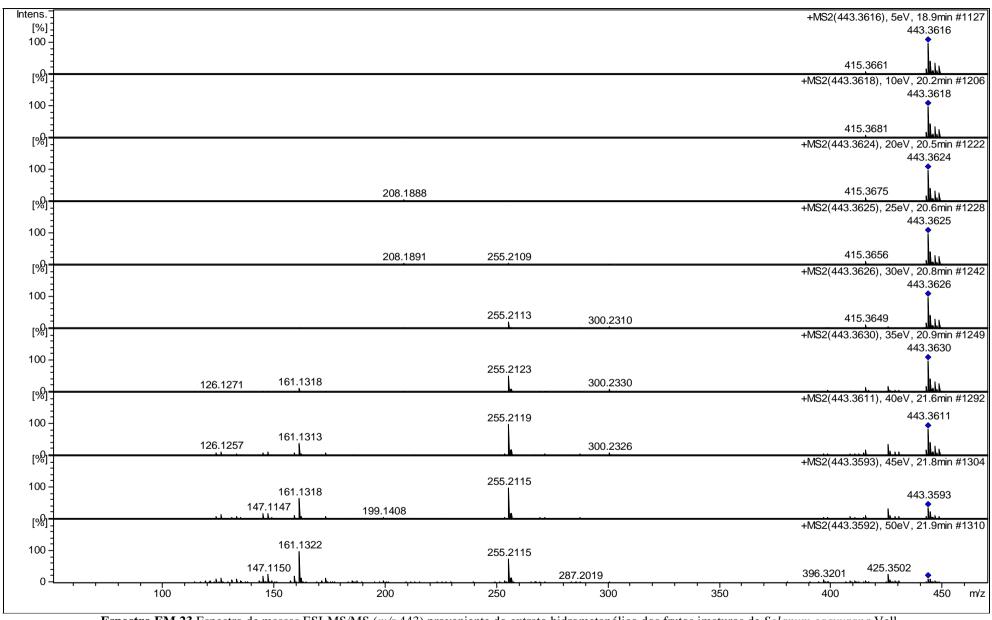
Espectro EM.20 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 415) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



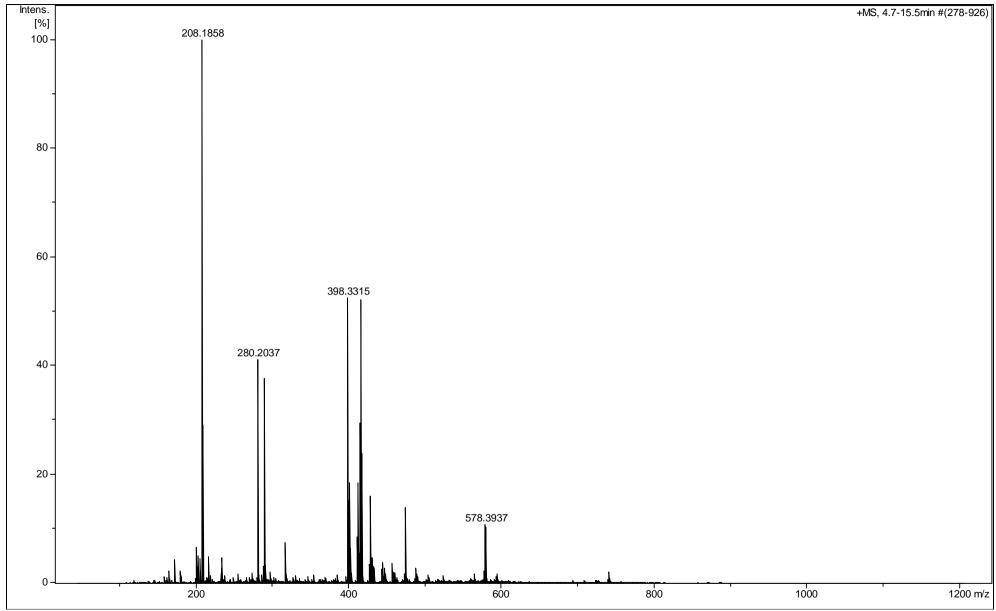
Espectro EM.21 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 416) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



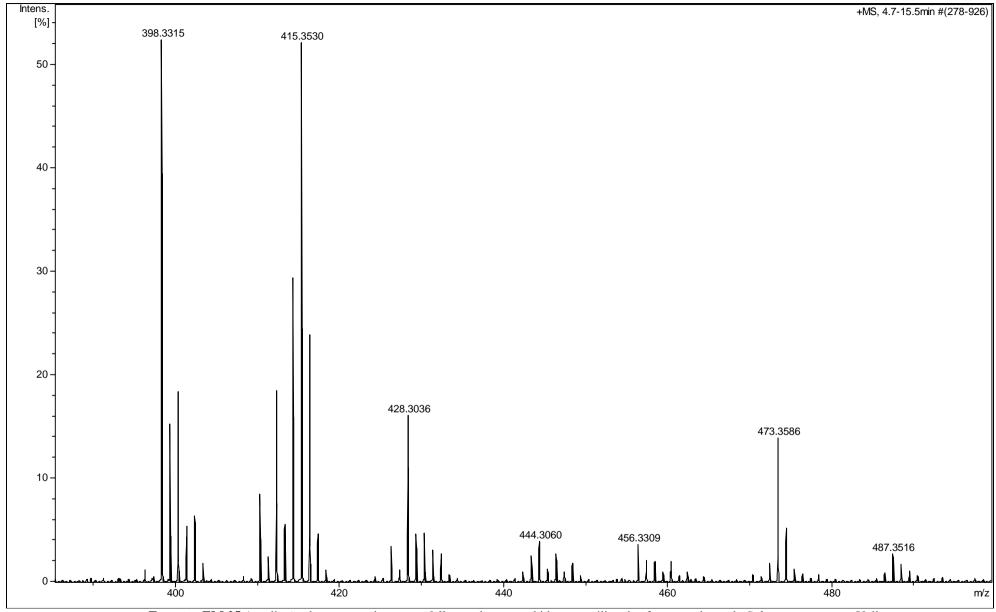
Espectro EM.22 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



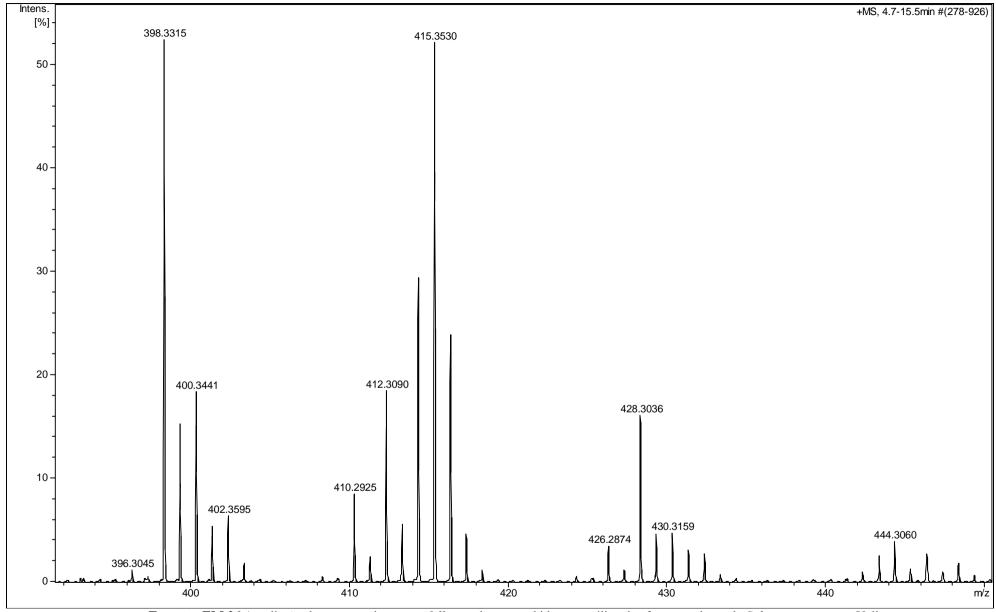
Espectro EM.23 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 443) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos imaturos de Solanum caavurana Vell.



Espectro EM.24 Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.

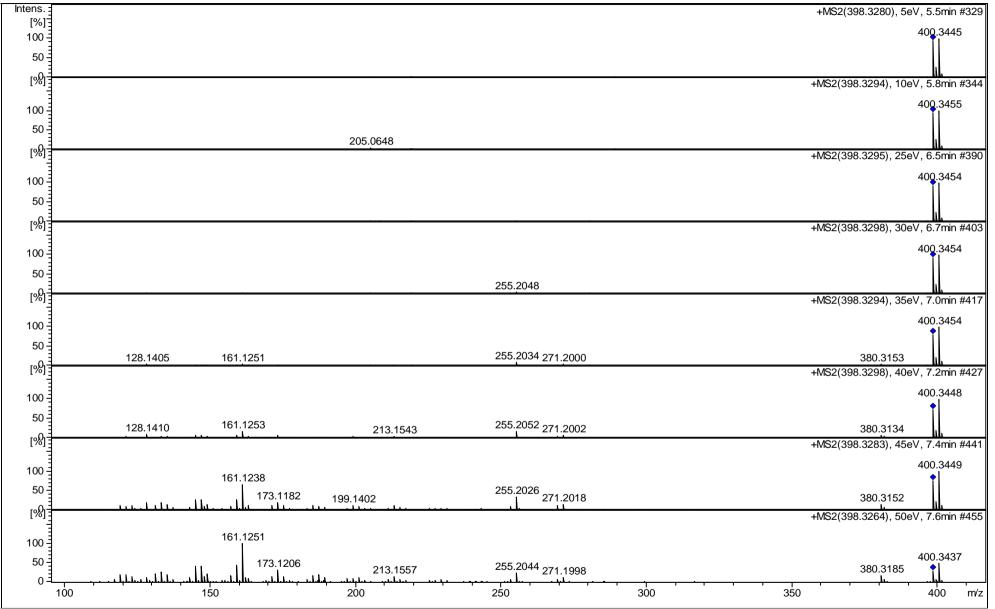


Espectro EM.25 Ampliação do espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.

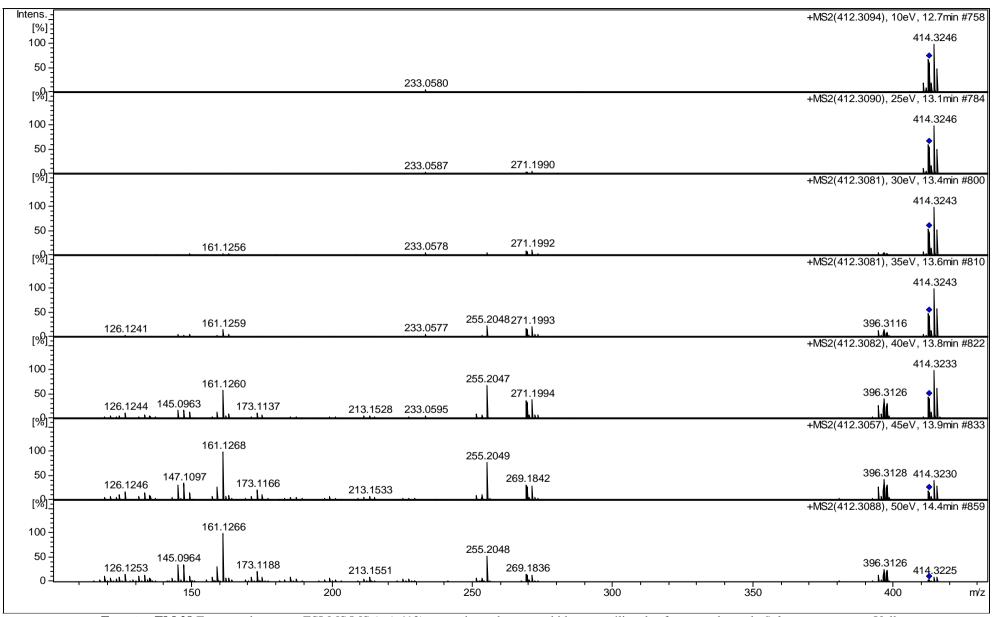


Espectro EM.26 Ampliação do espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.

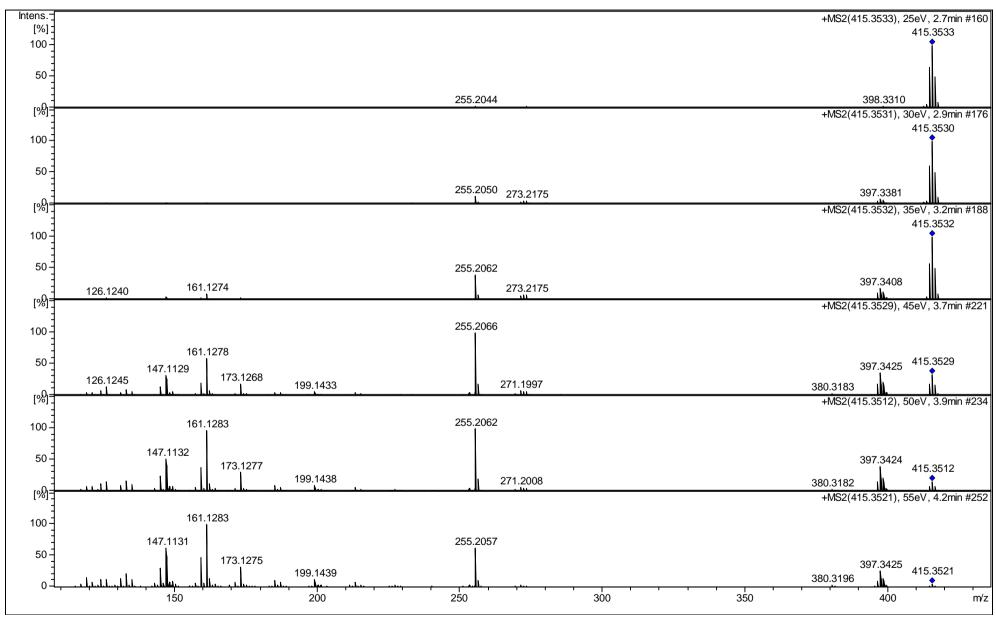




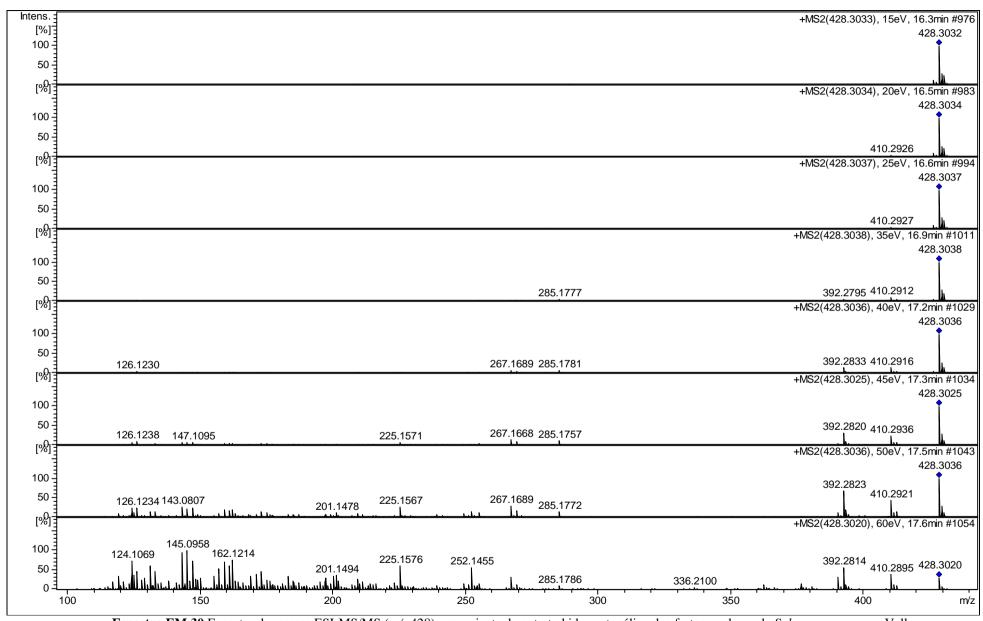
Espectro EM.27 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.



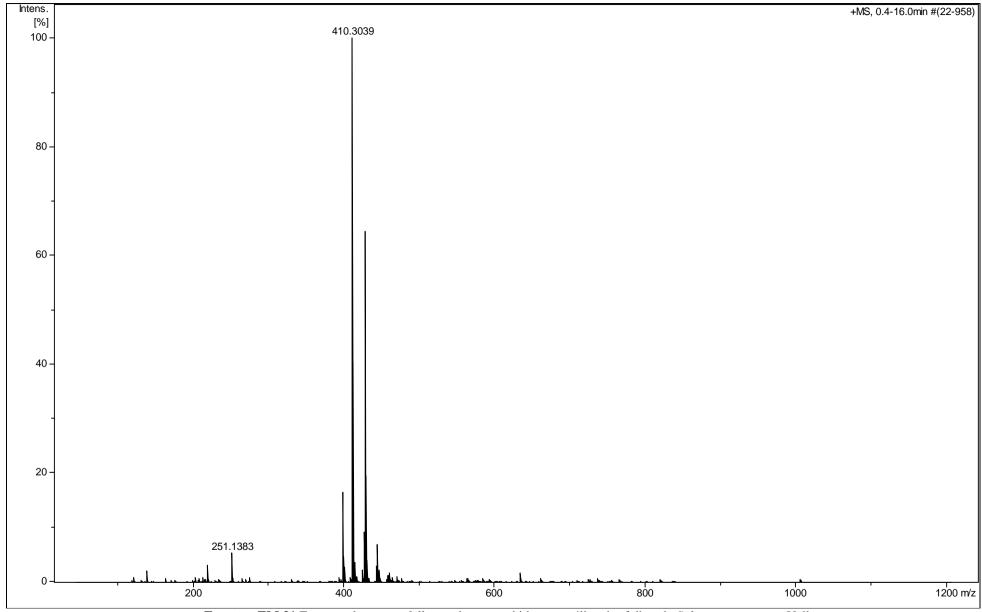
Espectro EM.28 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 412) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.



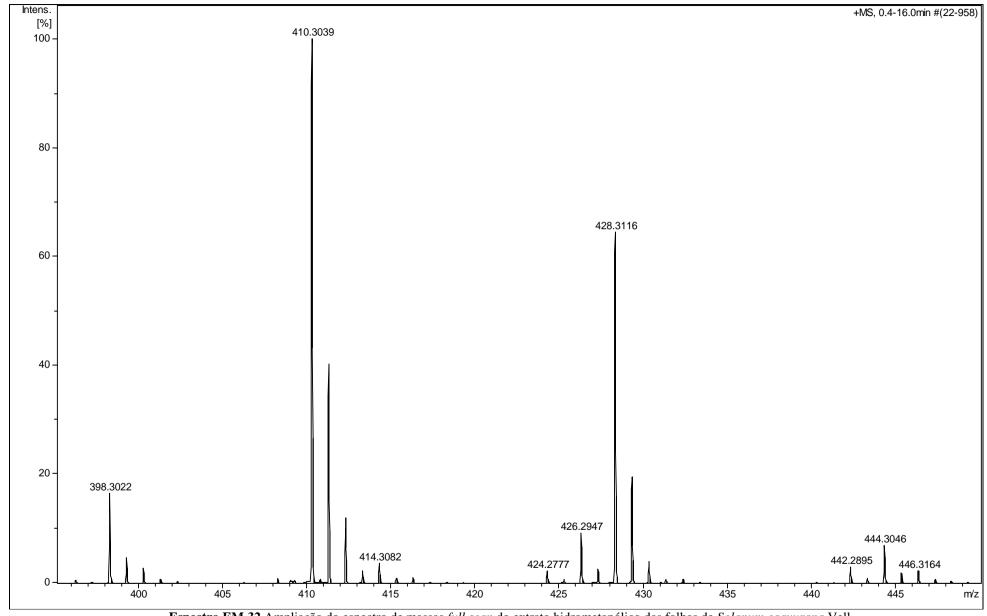
Espectro EM.29 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 415) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.



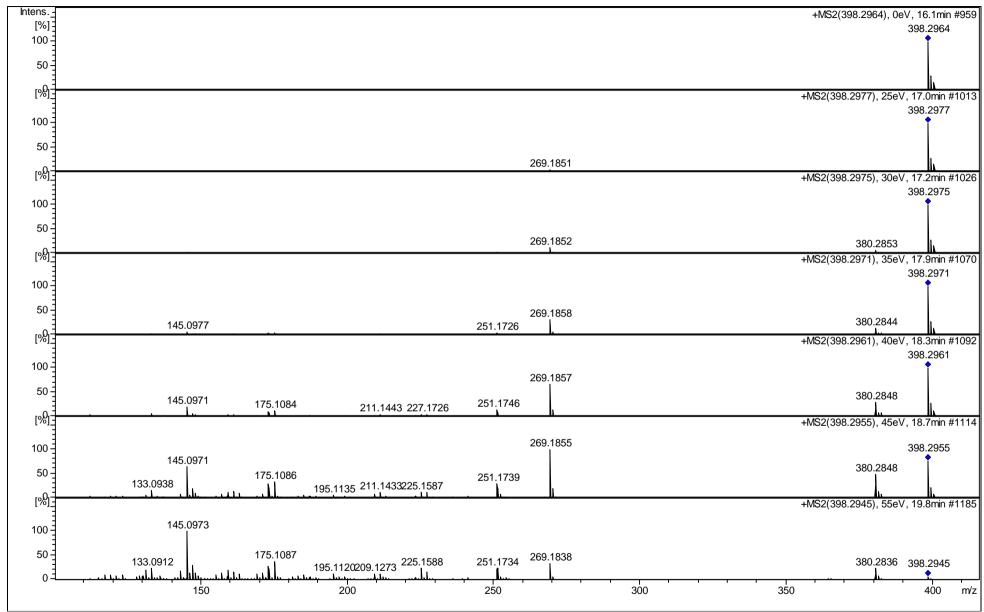
Espectro EM.30 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato hidrometanólico dos frutos maduros de Solanum caavurana Vell.



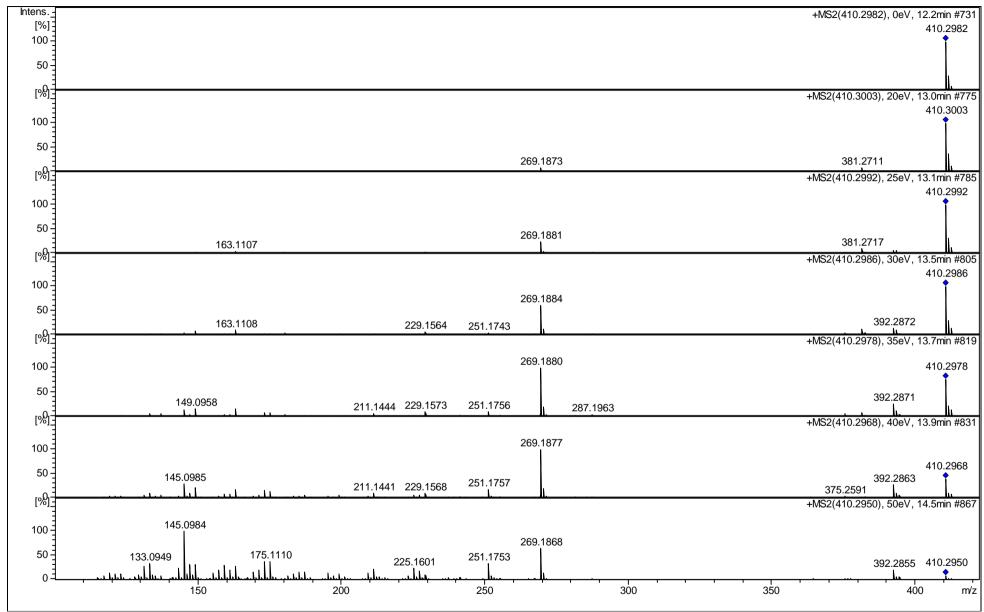
Espectro EM.31 Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.



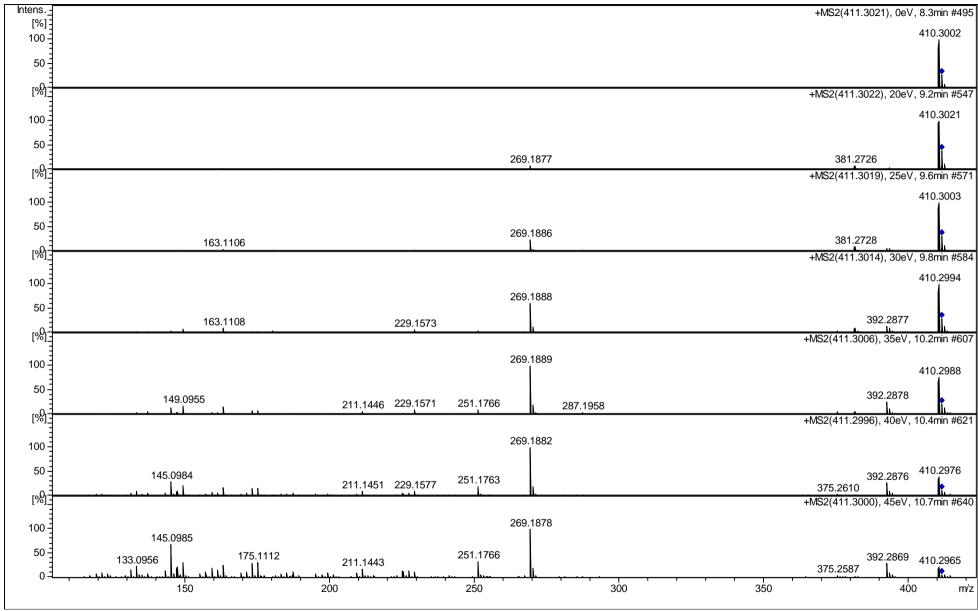
Espectro EM.32 Ampliação do espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.



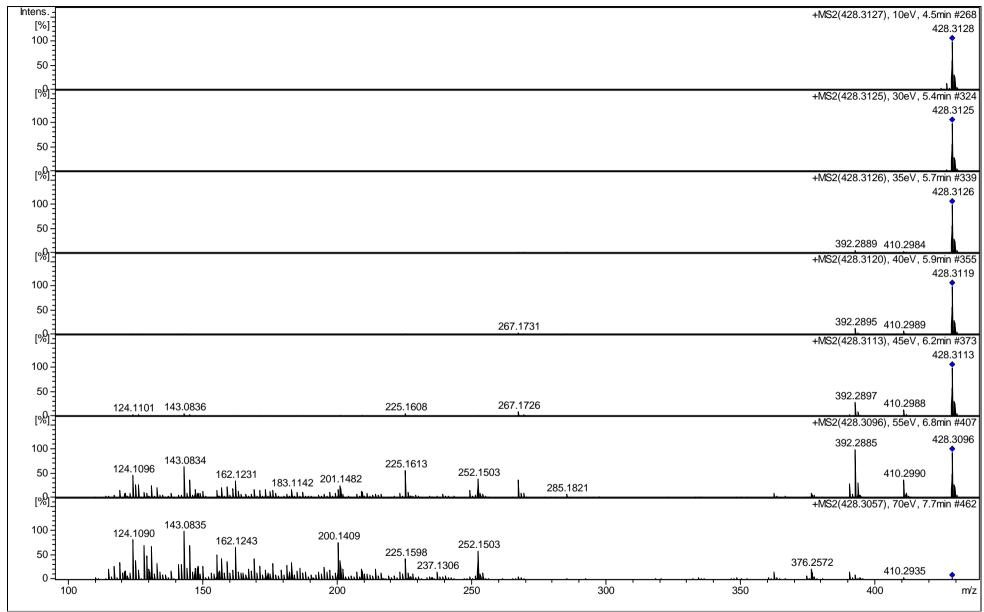
Espectro EM.33 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.



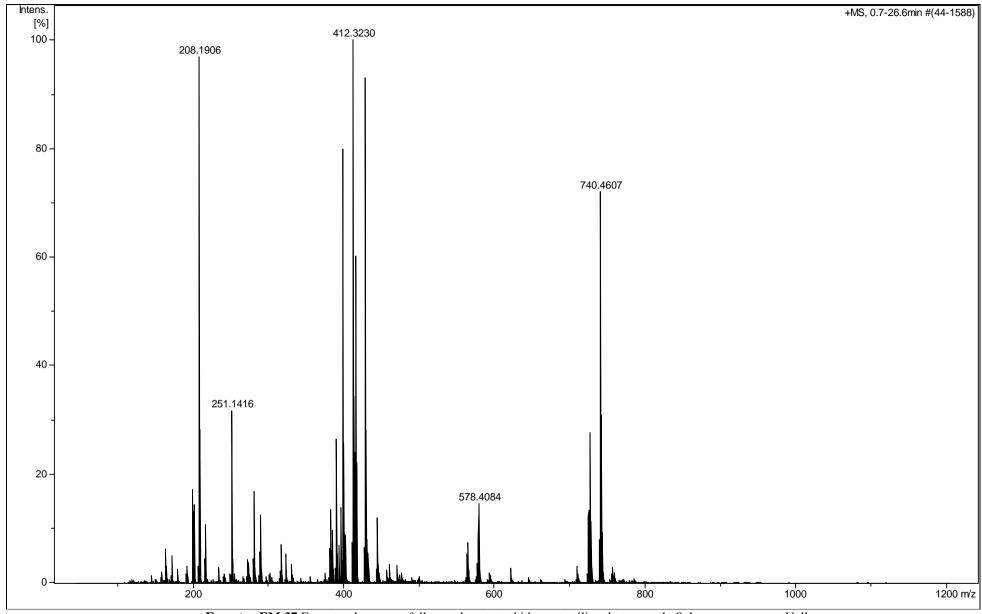
Espectro EM.34 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 410) proveniente do extrato hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.



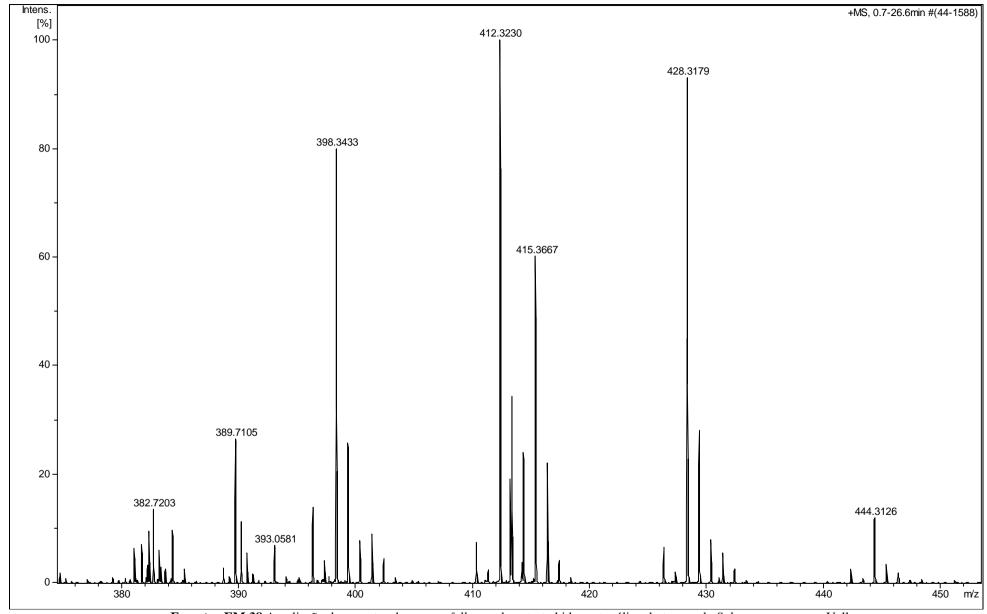
Espectro EM.35 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 411) proveniente do extrato hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.



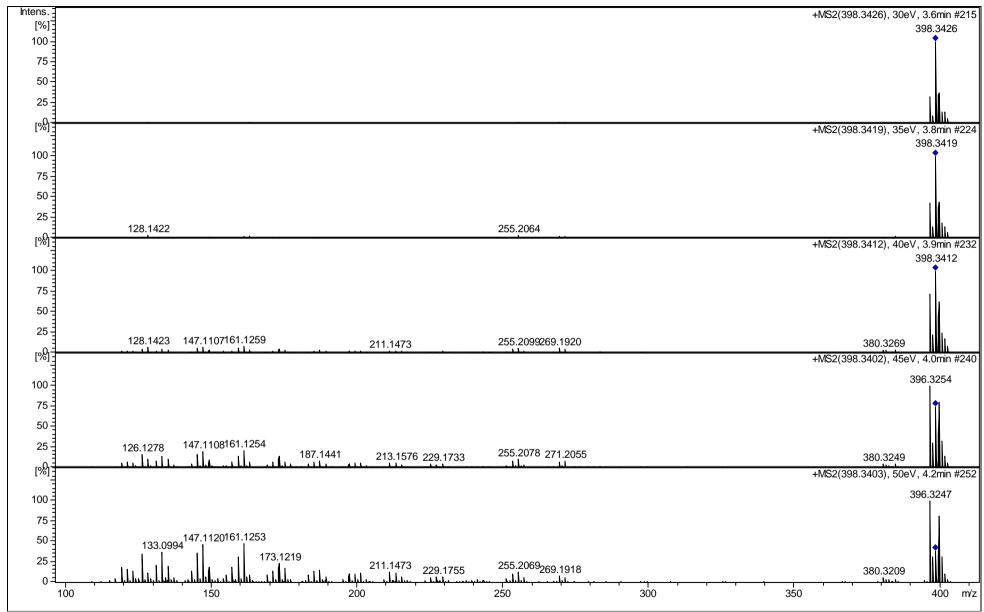
Espectro EM.36 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato hidrometanólico das folhas de Solanum caavurana Vell.



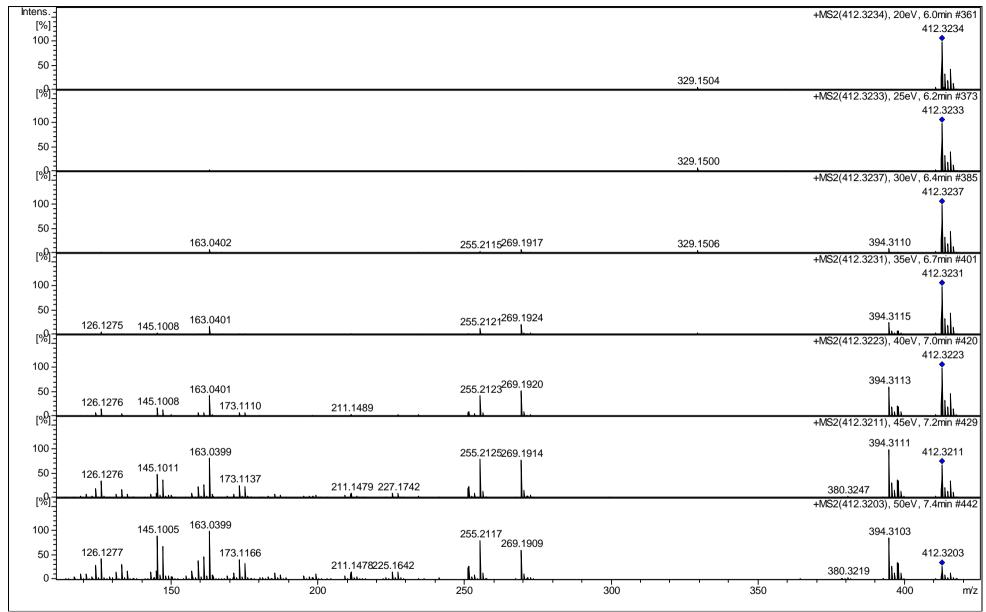
Espectro EM.37 Espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



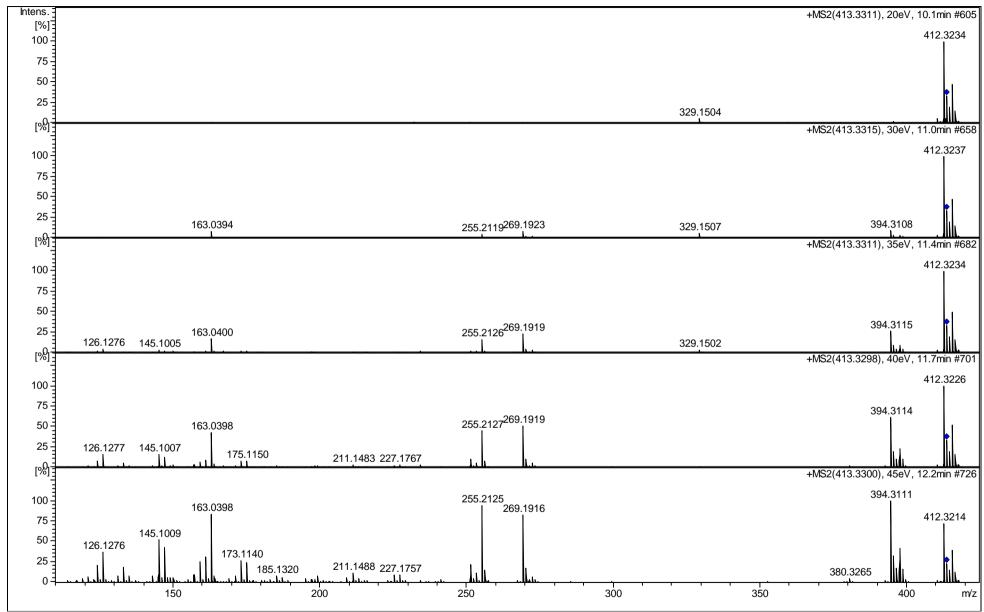
Espectro EM.38 Ampliação do espectro de massas full scan do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



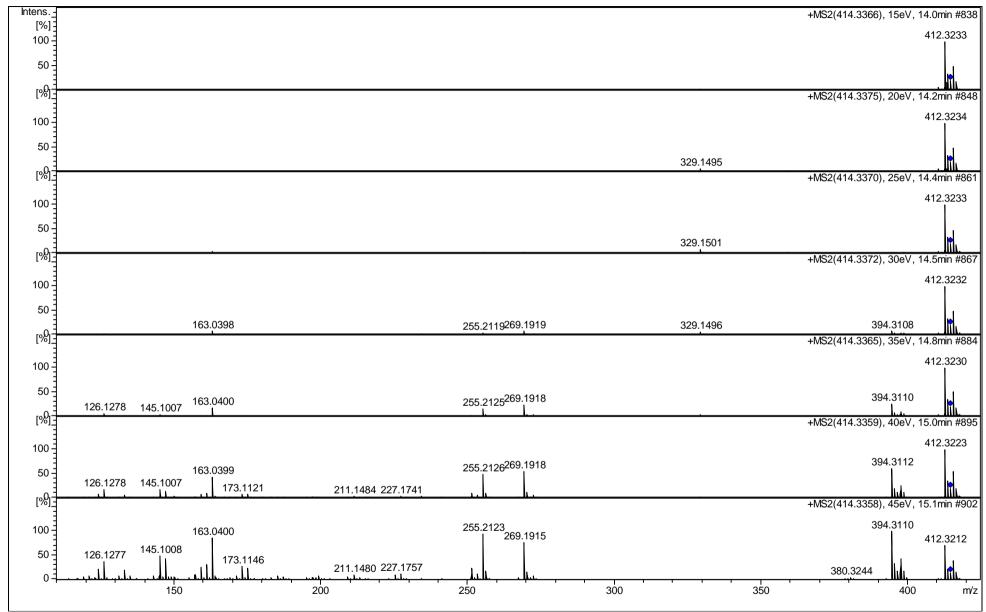
Espectro EM.39 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 398) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



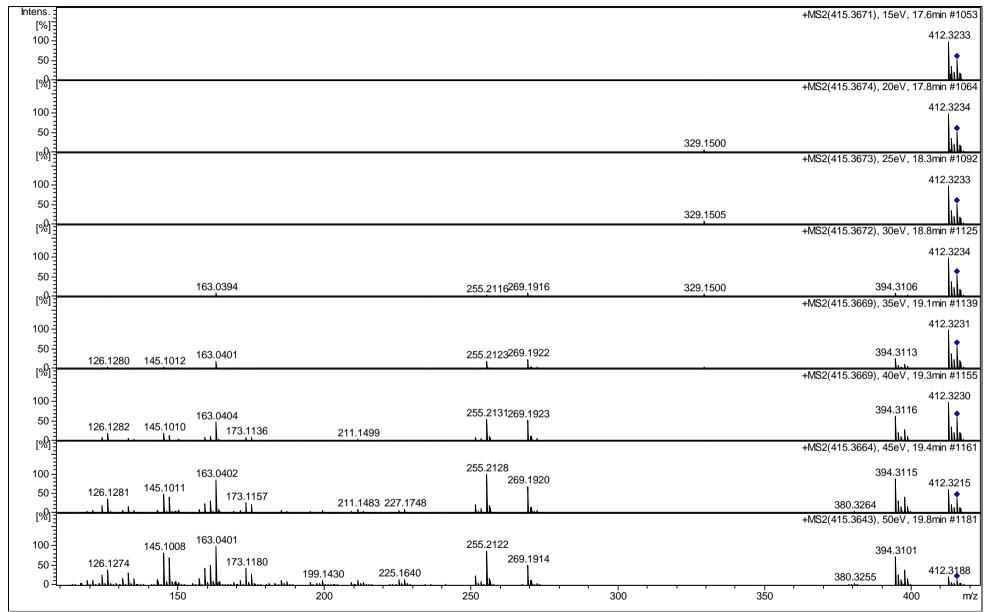
Espectro EM.40 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 412) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



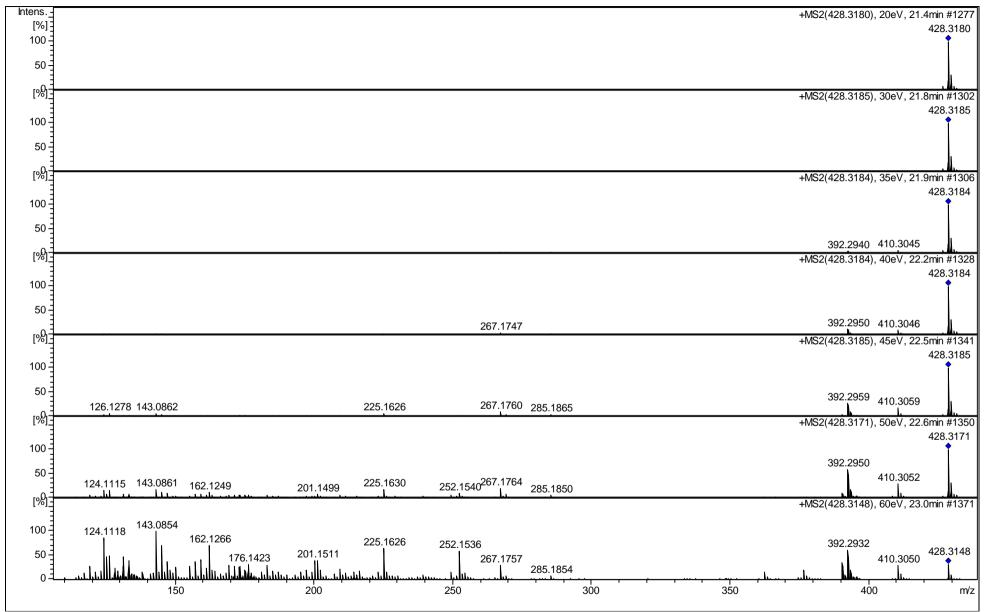
Espectro EM.41 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 413) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



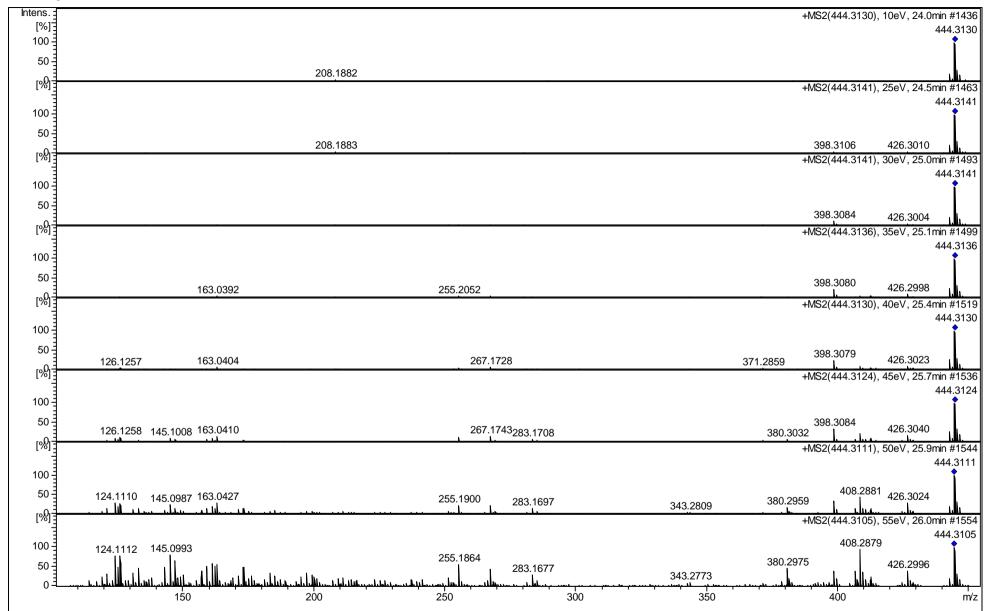
Espectro EM.42 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 414) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



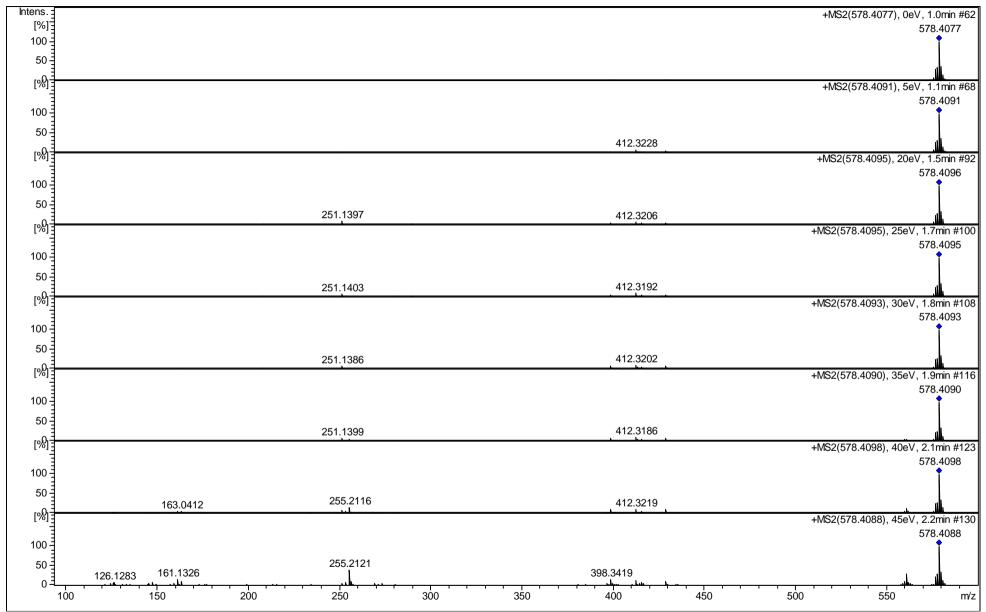
Espectro EM.43 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 415) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



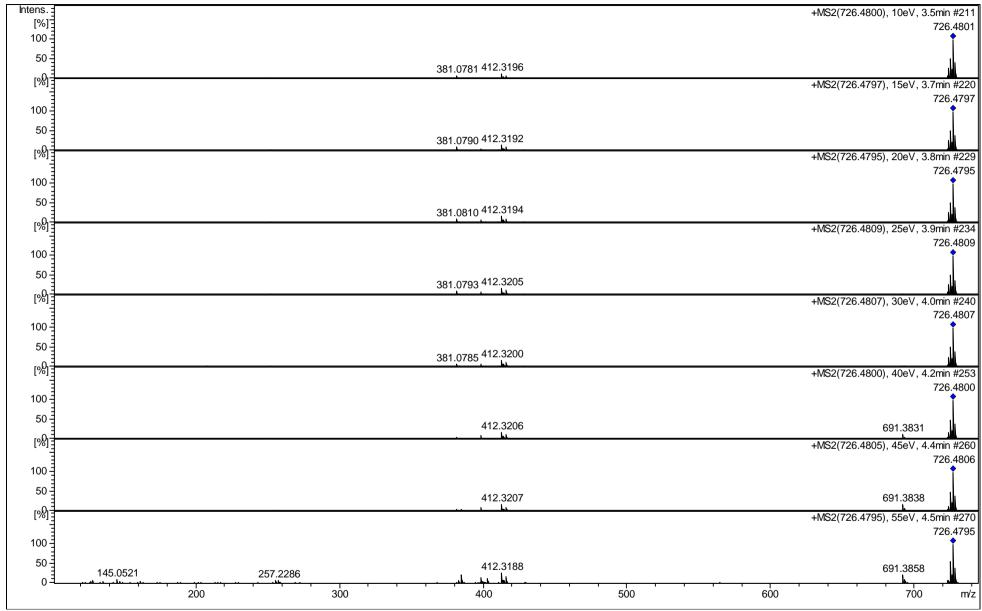
Espectro EM.44 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 428) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



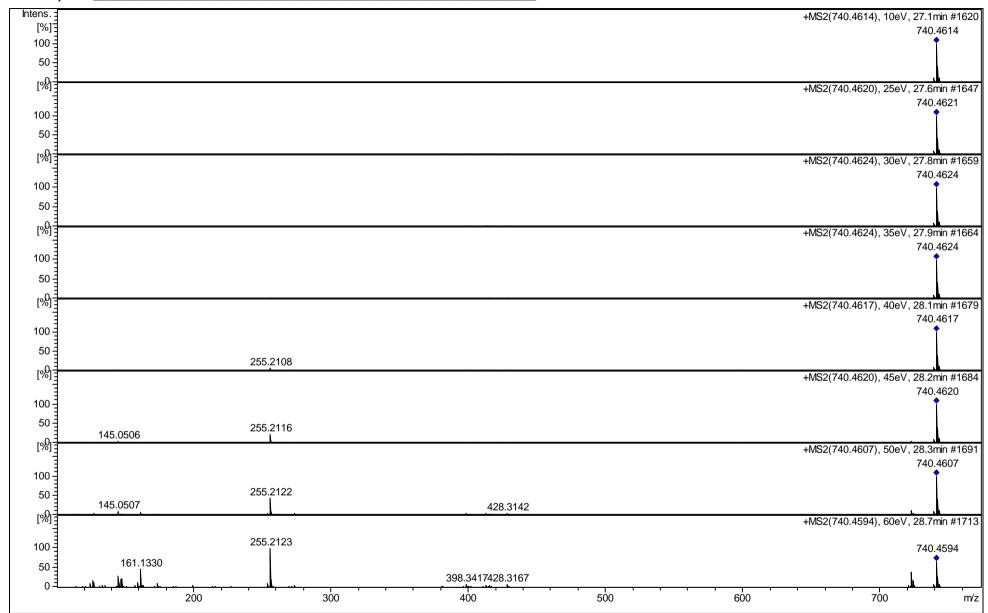
Espectro EM.45 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 444) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



Espectro EM.46 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 578) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



Espectro EM.47 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 726) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.



Espectro EM.48 Espectro de massas ESI-MS/MS (m/z 740) proveniente do extrato hidrometanólico do tronco de Solanum caavurana Vell.