

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Juliane da Silva Falcão

Alcaloides bioativos
isolados de *Waltheria*
Indica (Malvaceae)

Rio de Janeiro

2020

JULIANE DA SILVA FALCÃO

ALCALOIDES BIOATIVOS ISOLADOS DE *WALTHERIA INDICA*
(MALVACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à banca examinadora, como
cumprimento parcial das exigências para
conclusão do curso de Bacharelado em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr Murilo Marinho Carvalho
Lima

Rio de Janeiro
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Alane Elias Souza

Bibliotecária - CRB 7 n° 6321

F178

Falcão, Juliane da Silva.

Busca por novos alcaloides bioativos a partir da espécie *Waltheria Indica* (Malvaceae). / Juliane da Silva Falcão, 2020.

54f.

Orientador: Murilo Marinho Carvalho Lima.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2020.

1. Família Malvaceae. 2. Gênero *Waltheria* L. 3. *Waltheria Indica*. 4. Alcaloides Quinolônicos. 5. *Waltherionas*. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Lima, Murilo Marinho Carvalho. III. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

JULIANE DA SILVA FALCÃO

ALCALOIDES BIOATIVOS ISOLADOS DE *WALThERIA INDICA*
(MALVACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto Federal do Rio de Janeiro como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia

Aprovado em 17 / 05 / 2021.

Banca Examinadora

Murilo Marinho Carvalho Lima
Prof. Dsc. Murilo Marinho Carvalho Lima – (Orientador)
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Anne Caroline C. Gomes
Profa. Dsc Anne Caroline Cândido Gomes – (Membro Interno)
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Rodolfo Goetze Fiorot
Prof. Dsc. Rodolfo Goetze Fiorot – (Membro Externo)
Universidade Federal Fluminense (UFF)

RESUMO

As waltherionas representam uma nova classe de alcaloides 4-quinolônicos cuja ocorrência é restrita aos gêneros *Waltheria* e *Melochia* da família Malvaceae e se destacam pelo seu elevado potencial farmacológico. Plantas do gênero *Waltheria* e *Melochia* são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, desde enfermidades leves, tais como erupções cutâneas e febre, até doenças mais graves como a malária, asma e anemia. Na literatura, estudos constataram que alcaloides presentes em *W. indica* inibem fortemente o crescimento de *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma b. brucei*, além de possuírem atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, ação nematicida contra nematodos do nó da raiz, citoproteção contra o vírus HIV-1 e inibição contra o fator nuclear kappa- β , o qual é responsável pelo controle de mais de 200 genes envolvidos na ocorrência e progressão do câncer. Considerando que os estudos relatados foram realizados principalmente com *W. indica* coletada na Nigéria, o objetivo deste projeto é investigar a composição química de uma variedade de *Waltheria indica*, coletada na cidade de Tombos-MG, na busca de alcaloides presentes na fase hexânica das folhas de *W. indica*. A partir de métodos usuais de purificação por cromatografia, foram isolados os alcaloides waltheriona P, chamaedrona, waltheriona G e waltheriona L, as estruturas desses alcaloides foram identificadas por análise de dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura. Esses resultados demonstram que a espécie coletada no Sul de Minas Gerais é uma potencial fonte de alcaloides bioativos.

Palavras-chave: Família Malvaceae, Gênero *Waltheria* L., *Waltheria Indica*, Alcaloides Quinolônicos, Waltherionas.

ABSTRACT

Waltheriones represent a new class of 4-quinolonic alkaloids whose occurrence is restricted to the genera *Waltheria* and *Melochia* of the Malvaceae family and stand out for their high pharmacological potential. Plants of the genus *Waltheria* and *Melochia* are used in traditional medicine for the treatment of various diseases, from mild illnesses, such as skin rashes and fever, to more serious diseases such as malaria, asthma and anemia. In the literature, studies have found that alkaloids present in *W. indica* strongly inhibit the growth of *Trypanossoma cruzi* and *Trypanossoma b. brucei*, in addition to having antifungal activity against *Candida albicans* strains, nematicidal action against root node nematodes, cytoprotection against the HIV-1 virus, and inhibition against the nuclear factor kappa- β , which is responsible for the control of more than 200 genes involved in the occurrence and progression of cancer. Considering that the reported studies were carried out mainly with *W. indica* collected in Nigeria, the objective of this project is to investigate the chemical composition of a variety of *Waltheria indica*, collected in the city of Tombos-MG, in search of alkaloids present in the hexane phase of the leaves of *W. indica*. From usual chromatography purification methods, the alkaloids waltheriona P, chamaedrone, waltheriona G and waltheriona L were isolated, the structures of these alkaloids were identified by analysis of spectral data from ^1H and ^{13}C NMR and comparison with the literature. These results demonstrate that the species collected in the south of Minas Gerais is a potential source of bioactive alkaloids.

Keywords: Family Malvaceae, Genus *Waltheria* L., *Waltheria Indica*, Quinoline Alkaloids, Waltheriones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CLASSE DE ALCALOIDES DERIVADAS DA ORNITINA E LISINA.....	15
FIGURA 2 - WALTHERIONAS DE CADEIA FECHADA.....	16
FIGURA 3- WALTHERIONAS DE CADEIA ABERTA	17
FIGURA 4 - BIOGÊNESE DA ANTIDESMONA	19
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DO NÚCLEO 4-QUINOLONA VIA ANTRANIL-COA E MALONIL-COA.....	20
FIGURA 6 - ALCALOIDES 5-METOXIWALTHERIONA A, WALTHERIONA A E WALTHERIONA C	22
FIGURA 7 - FRAÇÕES PURIFICADAS DA FASE HEXÂNICA DAS FOLHAS DA <i>WALTHERIONA INDICA</i> (WFH)	27
FIGURA 8 - ESTRUTURA DA WALTHERIONA P	29
FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-1A (CDCl ₃ , 400MHz).....	31
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DE WFH-1A (CDCl ₃ , 100MHz).....	32
FIGURA 11 - AMPLIAÇÃO DE PARTE DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-1A (CDCl ₃ , 400 MHz).....	32
FIGURA 12 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-1A (δ 0 – 2,80)	33
FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS DE WFH-1A (ESI, MODO POSITIVO)	33
FIGURA 14 - ESTRUTURA DA CHAMAEDRONA.....	35
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-5 (CDCl ₃ , 400 MHz)	37
FIGURA 16 - AMPLIAÇÃO DE PARTE DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-5 (δ 0 – 4,50).....	37
FIGURA 17 - SINAIS DOS HIDROGÊNIOS DIASTEREOTÓPICOS E DA POSIÇÃO CINCO NO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-5 (CDCl ₃ , 400MHz)	38
FIGURA 18 - ESPECTRO DE MASSAS DE WFH-5 (EI)	38
FIGURA 19 - FRAGMENTAÇÕES POR IMPACTO ELETRÔNICO DE WFH-5.....	39
FIGURA 20 - ESTRUTURA DA WALTHERIONA G.....	41
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-1.6 (CDCl ₃ , 400 MHz)	43
FIGURA 22 - AMPLIAÇÃO DE PARTE DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-1.6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	43
FIGURA 23 - ESPECTRO DE HSQC DE WFH-1.6	44
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DE WFH-1.6 (CDCl ₃ , 100 MHz)	44

FIGURA 25 - ESPECTRO DE MASSAS DE WFH-1.6 (ESI, MODO POSITIVO).....	45
FIGURA 26 - ESTRUTURA DA WALTHERIONA L.....	48
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-5.4 (CDCl ₃ , 400 MHz)	50
FIGURA 28 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE WFH-5.4 (δ 1,20 – 3,30)	50
FIGURA 29 - ESPECTRO DE HSQC DE WFH-5.4 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	51
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DE WFH-5.4 (CDCl ₃ ; 100 MHz)	51
FIGURA 31 - ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE WFH-5.4 (ESI, MODO POSITIVO)	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DE WFH-1A	30
TABELA 2 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DE WFH-5.....	36
TABELA 3 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DE WFH-1.6.....	42
TABELA 4 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DE WFH-5.4.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
SAM	S-adenosilmetionina
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
CIM	Concentração Inibitório Mínima
WFE	Extrato etanólico das folhas da Waltheria Indica
WFH	Fase hexânica das folhas da Waltheria Indica
WFD	Fase de diclorometano das folhas
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia por adsorção em coluna de vidro
CoA	Coenzima A
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
ESI	Ionização por electrospray
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MHz	Mega Hertz
ppm	Partes por milhão
s	Simpleto ou singleto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS	12
1.2 CONSIDERAÇÕES DO GÊNERO WALTHERIA	13
1.3 ALCALOIDES QUINOLÔNICOS	14
1.3.1 Atividades biológicas relatadas	20
1.4 OBJETIVOS	23
1.4.1 Objetivo geral	23
1.4.2 Objetivos específicos	23
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 METODOLOGIA.....	23
2.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	23
2.1.2 Preparo dos extratos	24
2.1.3 Isolamento e identificação dos alcaloides	24
2.1.4 Obtenção dos extratos brutos	25
2.1.5 Separações cromatográficas	25
2.1.6. Análises por cromatografia em camada delgada	26
2.1.7 Métodos de determinação estrutural	26
2.1.8 Processamento de espectros	26
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
2.2.1 Extração e isolamento	27
2.2.2 Identificação estrutural dos alcaloides isolados	27
2.2.2.1 Identificação da Waltheriona P	28
2.2.2.2 Identificação da Chamaedrona	34
2.2.2.3 Identificação da Waltheriona G	39
2.2.2.4 Identificação da waltheriona L	45
3 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional e complementar tem sido cada vez mais encorajada no cenário mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a medicina tradicional como “soma total de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde e na prevenção, diagnóstico, aprimoramento ou tratamento de doenças físicas e mentais” (WHO, 2013). Esta inclui práticas não medicamentosas como acupuntura, terapias manuais e espirituais, além da prática medicamentosa que utiliza apenas ervas medicinais para este fim (WHO, 2002).

Muito investimento está sendo aplicado nesta área. Estima-se que em 2012 a China tenha gastado 83,1 bilhões de dólares em produtos de medicina tradicional e complementar. Na República da Coreia a despesa em 2009 foi de 7,4 bilhões e nos Estados Unidos da América (EUA) em 2008 de 14,8 bilhões. Com a estratégia de medicina tradicional 2014-2023 feita pela OMS, espera-se que esta área amplie ainda mais (WHO, 2013).

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, compondo quase 19% da flora mundial. Praticamente só a partir de 1970 é que a botânica taxonômica começou a ganhar espaço. Desde então, estima-se que no país há a ocorrência de 5-10 espécies de gimnospermas, 55.000-60.000 espécies de angiospermas, 3.100 espécies de briófitas, 1.200-1.300 espécies de pteridófitas e cerca de 525 espécies de algas marinhas, ficando de fora ainda, os fungos e líquens com estimativas de 2.800 espécies. Valendo-se ressaltar a necessidade de coletas mais intensivas em áreas remotas do país, tais como montanhas e áreas de sazonalidade bem marcadas do país, como o Pantanal, Caatinga, Amazônia e florestas semidecíduas (GIULIETTI *et al.*, 2005).

Desde 1886 já eram descritos em inventários o potencial econômico e a biodiversidade da flora brasileira, tendo plantas produtoras de frutos, resinas, gomas, aromas e algumas com potencial medicinal. Porém o mercado de

fitomedicamentos ainda é restrito a poucas empresas, tendo ainda um investimento reduzido (KLEIN *et al.*, 2009).

Até meados do século XX, as plantas medicinais eram a base da terapêutica medicamentosa. Graças ao aparecimento da síntese química no final do século XIX, atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e 25% são originários de plantas, isolados ou produzidos por semi-síntese. Porém, mesmo o Brasil tendo um alto potencial em sua flora, durante os últimos 20 anos os fármacos de origem natural desenvolvidos foram graças a pesquisas científicas de outros países como China, Japão e Coréia (FOGLIO *et al.*, 2006).

Nos últimos anos o interesse em trabalhar com fitoterapia tem ressurgido, haja visto o aumento expressivo de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas na área da química e farmacologia. Esse interesse é explicado pela boa eficácia de moléculas recentemente descobertas sobre doenças complexas. No planeta existem aproximadamente entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas conhecidas, porém em sua maioria sem estudos químicos, analíticos e farmacológicos com monografias completas e modernas. Atualmente muitas espécies ainda são usadas pela população, sem estudos científicos de eficácia e segurança. Apenas 17% das plantas da Terra foram estudadas quanto ao seu emprego medicinal. Esses dados mostram o enorme potencial de novas moléculas a serem descobertas a partir da natureza (FOGLIO *et al.*, 2006).

1.2 CONSIDERAÇÕES DO GÊNERO WALTHERIA

A família Malvaceae possui cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies conhecidas. No Brasil são encontrados cerca de 80 gêneros e 400 espécies. Uma de suas subfamílias, a Byttnerioideae, tem prevalência Pantropical, principalmente América do Sul e Austrália, tendo maior ocorrência nas zonas mais quentes do planeta. Essas plantas são caracterizadas por serem ervas, arbustos ou árvores de pequeno porte. O gênero *Waltheria* L, pertencente à família Malvaceae, possui 60 espécies, dentre as quais inclui-se a planta deste

estudo, a *Waltheria indica*. (AGÊNCIA, 2017; CHASE *et al.*, 2016; SAUNDERS, 2011).

A *Waltheria indica* é uma espécie nativa do Brasil com ocorrência em todas as cinco regiões do país, estando presente na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Essa planta é conhecida popularmente como “vassourinha” e se caracteriza por ser uma erva e subarbusto (REFLORA, 2020).

1.3 ALCALOIDES QUINOLÔNICOS

Algumas plantas durante o seu processo de evolução desenvolveram dois tipos de metabolismo, os chamados metabolismo primário e secundário. A via de metabolização primária se caracteriza em processos geradores de energia e/ou constituição do protoplasma, através da síntese de carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Enquanto que o metabolismo secundário, embora não esteja relacionado com processos de energia, também se mostra vital para as plantas à medida que gera produtos que funcionam como atrativos, repelentes, protetores contra radiação UV e poluição, sinalizadores intraespecíficos e muitas outras funções. Além disso, mostra-se com elevada plasticidade genética e diversidade, podendo expressar a individualidade de famílias, gêneros e, até mesmo espécies, garantindo adaptações a fatores bióticos e abióticos. Essas moléculas advindas do metabolismo secundário são as principais responsáveis pelos efeitos terapêuticos de plantas medicinais utilizadas pelo homem desde os primórdios (REZENDE *et al.*, 2016).

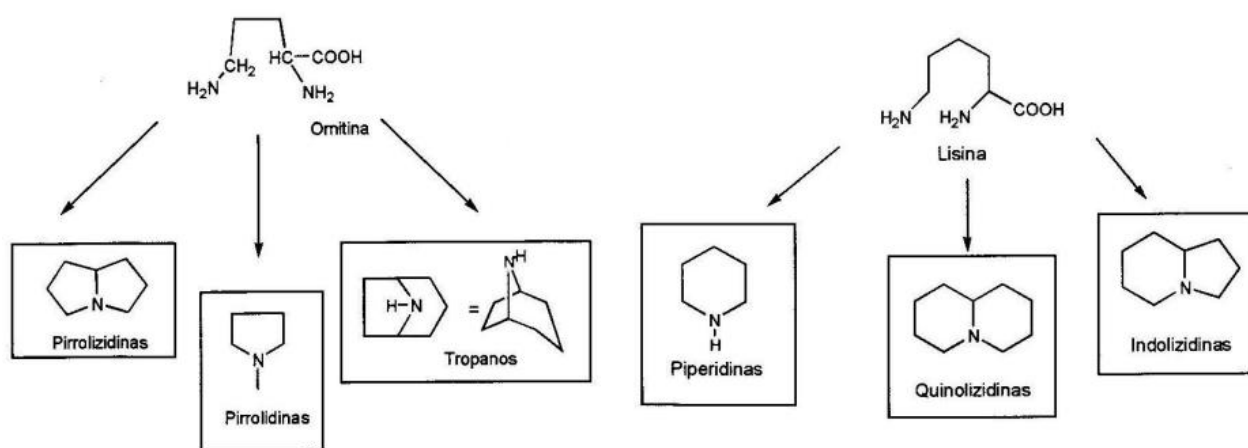
Os metabólitos secundários são sintetizados em diferentes compartimentos celulares da planta, através de quatro vias de biossíntese, sendo estas: via do acetato malonato, do ácido mevalônico, do metileritritol fosfato e do ácido chiquímico. Estas vias produzem os três principais grupos de metabólitos secundários: terpenos, substâncias fenólicas, substâncias nitrogenadas e ácidos graxos. Entre as substâncias nitrogenadas, as quatro classes mais importantes são os alcaloides, betalaínas, glicosídeos

cianogênicos e glucosinolatos, os quais são formados a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos (REZENDE *et al.*, 2016).

Os alcaloides apesar de serem um grupo de substâncias bastante heterogêneas, compartilham entre si um caráter básico, conferido pela presença do nitrogênio, e um ou mais anéis heterocíclicos. Essa classe de moléculas é geralmente classificada de acordo com sua forma, estrutura e moléculas precursoras. Existem três tipos principais: alcaloides verdadeiros, os protoalcaloides e os pseudoalcaloides (ANISZEWSKI, 2015).

Os alcaloides verdadeiros possuem os aminoácidos como precursores de sua síntese, sendo os aminoácidos alifáticos e aromáticos os mais comumente empregados, além de possuir o nitrogênio presente em seu anel heterocíclico. Os alcaloides quinolônicos, alvos do presente estudo, são sintetizados através da glicina e acetato (BRINGMANN *et al.*, 2000). Existem ainda, muitos outros alcaloides verdadeiros sintetizados por outros tipos de aminoácidos, como por exemplo pela ornitina: tropânicos, pirrolidínicos e pirrolizidínicos; lisina: quinolizidínicos, indolizidínicos e piperidínicos dentre outros (ANISZEWSKI, 2015; REZENDE *et al.*, 2016).

Figura 1 - Classe de alcaloides derivadas da ornitina e lisina



Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2007

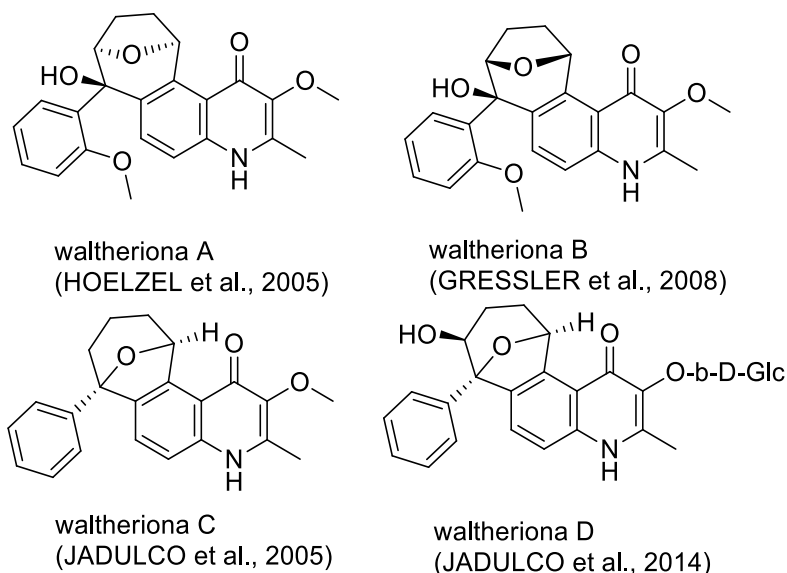
Os protoalcaloides também são derivados de aminoácidos, porém seu átomo de nitrogênio está presente em uma cadeia lateral acíclica. Já os pseudoalcaloides não derivam de aminoácidos e sim de outras substâncias,

podendo derivar de acetato, fenilalanina, terpenoides e esteroides. (ANISZEWSKI, 2015)

As waltherionas são alcaloides 4-quinolônicos cuja ocorrência está nos gêneros *Waltheria* e *Melochia*. Essa classe se destaca pelo elevado potencial farmacológico intrínseco observado em diversos estudos (JADULCO *et al.*, 2014).

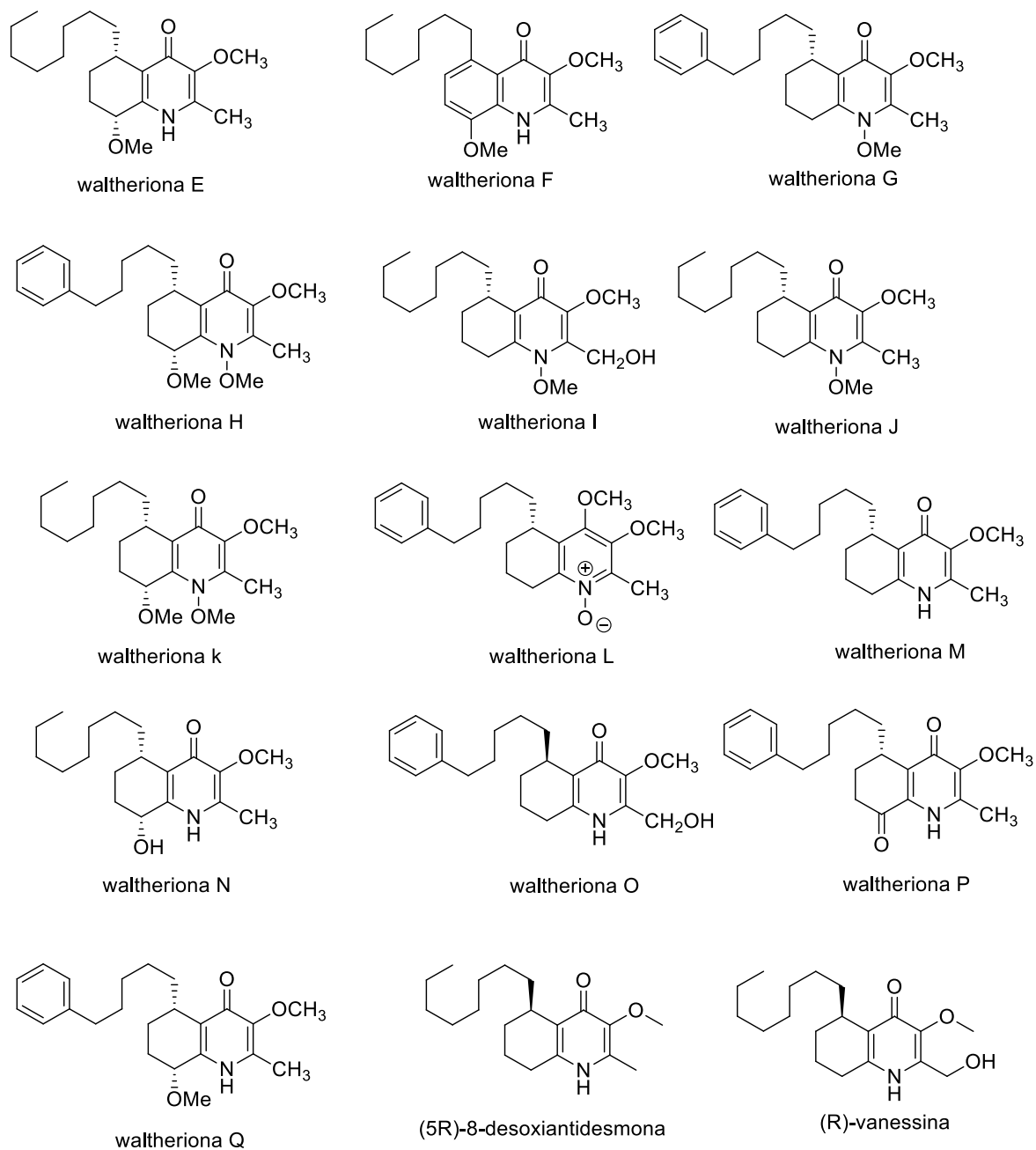
Esta classe de alcaloides quinolin-4-onas são estruturalmente caracterizadas por uma porção de 4-quinolona com um grupo metil em C-2 e um grupo metoxila ou uma glicosilação em C-3, sendo divididos em waltherionas ciclizadas (Figura 1) e waltherionas de cadeia aberta (Figura 2).

Figura 2 - Waltherionas de cadeia fechada



Fonte: HOELZEL *et al.* (2005); GRESSLER *et al.* (2008); HOELZEL *et al.* (2005); JADULCO *et al.* (2014)

Figura 3- Waltherionas de cadeia aberta

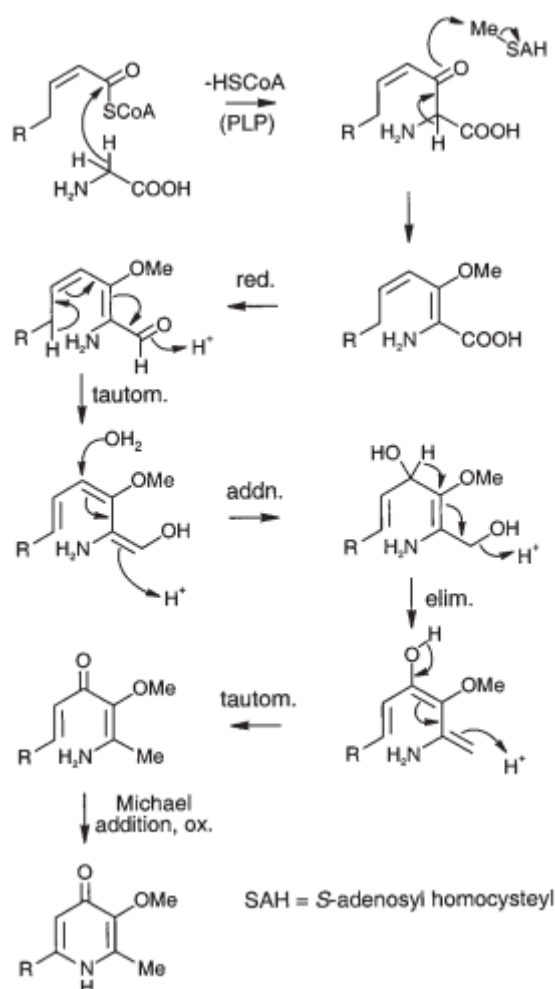


Fonte. O Autor

A característica estrutural comum destes alcaloides - a presença de um grupo metila e de um grupo metoxila nas posições, 2 e 3, respectivamente, do anel 4-quinolona - evidencia uma origem biossintética comum.

Ainda sobre a biossíntese desta classe de compostos, tomando como base o estudo da biossíntese da antidesmona, uma walterionina de cadeia aberta, Bringmann e colaboradores em 2000 consideraram a biogênese deste alcaloide como sendo não usual e realizaram então um estudo de biossíntese via marcação isotópica utilizando culturas de células de *Antidesma membranaceum*. Através da incorporação de precursores marcados ^{13}C (glicose e acetato) e ^{15}N (glicina e aspartato), e adotando análises de ressonância magnética nuclear (RMN), pode-se concluir que a antidesmona era biossintetizada a partir de uma cadeia policetídica C-16 e glicina, mostrando que o alcaloide era produzido por outra rota biossintética. A metila ligada ao carbono 2 do sistema 4-quinolônico é originária do aminoácido glicina, enquanto a metoxila ligada ao carbono 3 tem a via do acetato como origem do átomo de oxigênio e a metila provém da S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 3).

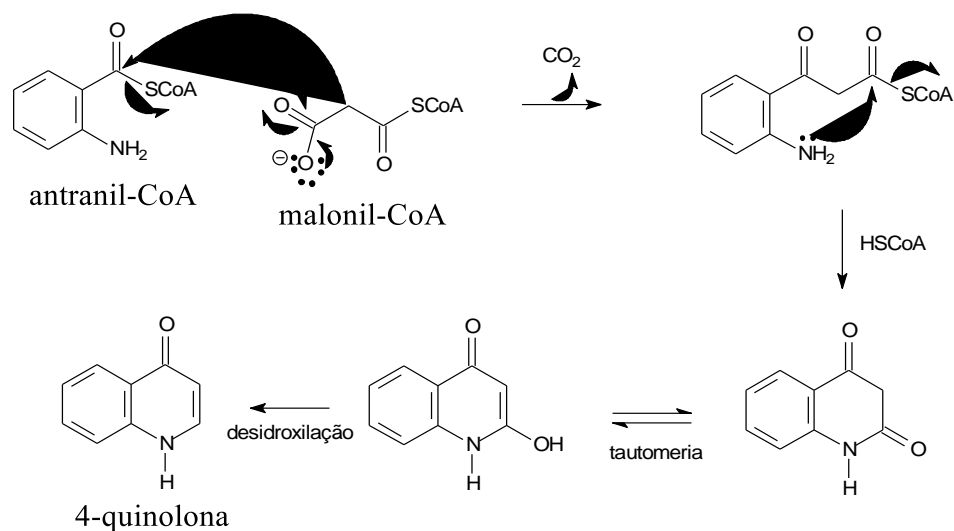
Figura 4 - Biogênese da antidesmona



Fonte: BRINGMANN *et al.*, 2000.

Sobre as demais classes de alcaloides 4-quinolônicos, de acordo com DEWICK (2009), a formação desta classe de compostos ocorre a partir do ácido antranílico, onde temos inicialmente uma condensação de Claisen entre antranil-CoA e malonil-CoA, essa condensação ocorre devido à descarboxilação da unidade malonil que posteriormente condensa via ataque nucleofílico do ânion CH_2^- da unidade de malonil-CoA a carboxila do tioéster do antranil-CoA e ataque do par de elétrons do nitrogênio à carbonila com a liberação de uma unidade de HS-CoA. Posteriormente temos tautomeria e desidroxilação para a formação da 4-quinolona (Figura 4).

Figura 5 - Formação do núcleo 4-quinolona via antranil-CoA e malonil-CoA



Fonte: Adaptado de DEWICK (2009)

1.3.1 Atividades biológicas relacionadas

As atividades biológicas podem ser atribuídas aos abundantes tipos de componentes químicos presentes em toda a planta, tais como: alcaloides, flavonoides, esteróis, terpenos, glicosídeos cardiotônicos, saponinas, antraquinonas e carboidratos.

Na medicina tradicional são utilizados diversos modos de preparo de extratos da *W. indica*, principalmente de suas folhas e raízes e em alguns casos da planta inteira. A decocção das folhas é utilizada para o tratamento da malária e convulsões, a infusão para anemia, gengivite e úlcera gástrica, o chá para inflamações, seu suco para conjuntivite e sífilis e também aplicações dessas folhas em fermentos. Enquanto que a decocção das raízes é usada no tratamento de disfunção erétil, impotência, câncer, asma, tosse, hemorroidas e diarreia. Em algumas populações a mastigação das raízes também é utilizada para aliviar infecções de gengiva e dentes, contra a tosse, dor de garganta e até mesmo para tratar hemorragias internas. (ZONGO *et al.*, 2013).

Em 2014, Cretton e colaboradores utilizando o extrato de diclorometano das raízes da *Waltheria indica*, encontraram forte inibição de crescimento das

formas amastigotas dos protozoários *Trypanossoma cruzi* ($CI_{50} = 0,74 \mu\text{g/mL}$) e *Trypanossoma b. brucei* (2,3% sobreviveram com $20 \mu\text{g/mL}$), e em menor grau contra o *Trypanossoma b. rhodesiense* ($CI_{50} = 17,4 \mu\text{g/mL}$), agentes causadores da doença de chagas e tripanossomíase africana respectivamente. Além disso a citotoxicidade em células L-6 de camundongo se mostrou fraca, com um $CI_{50} = 24,0 \mu\text{g/mL}$. Os valores de CI_{50} encontrados para os alcalóides desse extrato se mostraram menores que o da droga de referência, o benzonidazol. Os valores de inibição encontrados contra cepas do *T. cruzi* foram: 8-deoxoantidesmona ($CI_{50} = 0,49 \mu\text{M}$); waltheriona E ($CI_{50} = 0,23 \mu\text{M}$); waltheriona F ($CI_{50} = 1,1 \mu\text{M}$); waltheriona G ($CI_{50} = 0,02 \mu\text{M}$); waltheriona H ($CI_{50} = 0,04 \mu\text{M}$); waltheriona I ($CI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$); waltheriona J ($CI_{50} = 0,10 \mu\text{M}$); waltheriona K ($CI_{50} = 0,04 \mu\text{M}$); waltheriona L ($CI_{50} = 3,1 \mu\text{M}$); antidesmona ($CI_{50} = 0,17 \mu\text{M}$).

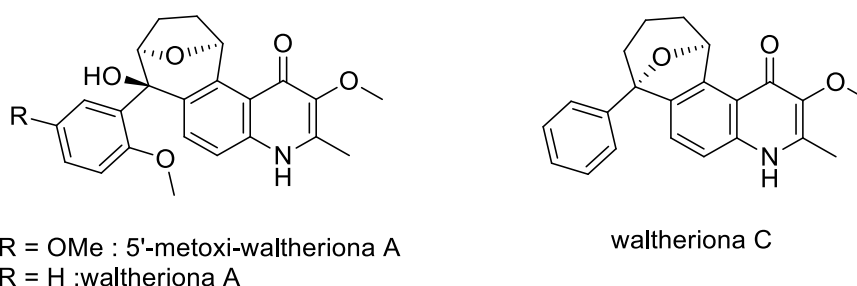
Em um outro estudo feito pelo mesmo autor foi relatada a atividade antifúngica de *Waltheria indica* no extrato de diclorometano das partes aéreas da planta em cepas de *Candida albicans*. Dentre as vinte e uma substâncias que apresentaram atividade antifúngica ($CIM \leq 32 \mu\text{g/mL}$) encontram-se sete alcaloides quinolônicos, sendo estes: 8-deoxoantidesmona ($CIM = 16 \mu\text{g/mL}$), antidesmona ($CIM = 32 \mu\text{g/mL}$), waltheriona E ($CIM = 4 \mu\text{g/mL}$), waltheriona G ($CIM = 32 \mu\text{g/mL}$), waltheriona I ($CIM = 32 \mu\text{g/mL}$), waltheriona J ($CIM = 16 \mu\text{g/mL}$), e waltheriona F ($CIM = 8 \mu\text{g/mL}$). Somado a isto, estes alcaloides também reduziram em mais de 50% a atividade metabólica de maturação do biofilme em contrações similares aos seus valores de CIM planctônicas ($\leq 32 \mu\text{g/mL}$) (CRETTON *et al.*, 2015).

O extrato metanólico das raízes da *Waltheria indica* se mostrou como um promissor nematicida botânico em alternativa aos nematicidas químicos, à medida que exibiu uma mortalidade de 100% contra células J2 de *M. incognita* na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ após 72h de exposição. Dentre as nove frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel, a fração F8 obteve uma mortalidade acima de 80% na concentração de $7,5 \mu\text{g/mL}$ após 24h de exposição contra células do *M. incognita*. Este patógeno é um exemplo de nematodo do nó da raiz, os quais são nematóides parasitas de plantas do gênero *Meloidogyne*. São os patógenos economicamente mais importantes pois atingem quase todas as espécies de plantas vasculares. A eluição com

metanol/água desta fração F8 permitiu a purificação de três alcaloides: waltheriona A ($CE_{50} = 0,27 \mu\text{g/mL}$), a waltheriona C ($CE_{50} = 16,59 \mu\text{g/mL}$) e a 5-metoxiwaltheriona A ($CE_{50} = 0,09 \mu\text{g/mL}$), com os respectivos valores de CE_{50} contra o *M. incognita*. O autor também testou estes mesmos alcaloides em outras espécies de nematodos do nó da raiz obtendo bons resultados com a waltheriona A e a 5-metoxiwaltheriona A, variando de $CE_{50} = 0,09 \mu\text{g/mL}$ a $CE_{50} = 3,54 \mu\text{g/mL}$ (JANG *et al.*, 2019).

Somado a isto, as Waltherionas A e C (Figura 5) mostraram significativa citoproteção contra o vírus HIV-1 em células CEM-TART infectadas *in vitro* ($CE_{50} = 56,2 \mu\text{M}$ e $CE_{50} = 0,84 \mu\text{M}$ respectivamente). Um segundo ensaio medindo a produção da proteína P24 do capsídeo do HIV em células de linfócitos T infectadas confirmou a atividade anti-HIV da Waltheriona A e C mostrando uma inibição acima de 50% em concentrações de $1,7 \mu\text{M}$ e $0,95 \mu\text{M}$, respectivamente. Embora nenhuma toxicidade significativa tenha sido observada no ensaio da proteína P24 de 48h, índices terapêuticos mais estreitos foram observados no ensaio de citoproteção de 96h ($CL_{50} = 102 \mu\text{M}$ e $CL_{50} = 11 \mu\text{M}$) (JADULCO *et al.*, 2014).

Figura 6 - Alcaloides 5-metoxiwaltheriona A, Waltheriona A e Waltheriona C



Fonte: Autor

O extrato de diclorometano das partes aéreas de *W. indica* também apresentou atividade inibitória de 79% na ativação do fator nuclear kappa B (FN- κB) induzida por TNF- α em uma concentração de $20 \mu\text{g/mL}$. Esse fator é responsável pelo controle de mais de 200 genes envolvidos na inflamação, além da transformação celular, proliferação, metástase, angiogênese e quimiorresistência, ou seja, vários aspectos envolvidos na ocorrência e progressão do câncer. Entre os 17 alcaloides presentes nesse extrato, quatro

deles se mostraram ativos. Os alcaloides waltheriona A e waltheriona C exibiram as maiores potências com valores de $CI_{50} = 56,1 \mu\text{M}$ e $CI_{50} = 55,5 \mu\text{M}$ respectivamente sem diminuição significativa na viabilidade celular. Enquanto que a waltheriona M e Waltheriona Q se mostraram ativas com uma menor potência ($CI_{50} = 94,5 \mu\text{M}$ e $CI_{50} = 268,4 \mu\text{M}$) (MONTEILLIER *et al.*, 2017).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Considerando que os estudos relatados foram realizados principalmente com *W. indica* coletada na Nigéria utilizando suas partes aéreas e raízes, decidiu-se investigar a composição química de uma variedade de *W. indica* coletada na cidade de Tombos-MG, na busca de alcaloides presentes na fase hexânica de suas folhas.

1.4.2 Objetivos específicos

- Isolar os alcaloides de interesse através da técnica de cromatografia em coluna de sílica gel e purificar através de cromatografia em camada delgada
- Determinar as estruturas dos metabólitos isolados através de técnicas espectrométricas e espectroscópicas de elucidação estrutural como: RMN de ^1H (1D e 2D), RMN de ^{13}C e Espectrometria de Massas

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

A espécie de *Waltheria indica* (caule e folhas) foi coletada na cidade de Tombos (MG) pelos professores Murilo Marinho Carvalho Lima (IFRJ) e Eliane Carvalho (UFF) em agosto de 2014. A identificação botânica foi realizada pelo professor Murilo Marinho Carvalho Lima do IFRJ.

2.1.2 Preparo dos extratos

A metodologia a seguir foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Plantas Mediciniais do laboratório de Bases Químicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, localizado no campus Realengo.

Do material coletado, foram separadas as folhas dos caules e posteriormente lavadas com água para a retirada de material de solo residual e submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 40°C por um período de sete dias. Em seguida, pequena quantidade destas (100g) foi moída em moinho da marca Willey TECNAL modelo TE-650 e submetida separadamente à maceração estática à temperatura ambiente com etanol P.A. da marca Vetec por quatro vezes com intervalo de 72 horas. A cada intervalo de 72 horas o líquido extraído foi filtrado e posteriormente concentrado sob pressão reduzida, em evaporador rotatório (40°C) para a obtenção do extrato etanólico das folhas (WFE).

O extrato bruto WFE obtido foi posteriormente submetido à partição líquido-líquido após ser solubilizados, separadamente, em uma mistura de água:metanol (3:1) com posterior partição em funil com os solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila, para a obtenção das respectivas fases hexânica (WFH) e diclorometano (WFD).

2.1.3 Isolamento e identificação dos alcaloides

A partir do extrato hexânico foram realizadas sucessivas purificações por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol, em composições binárias de hexano/acetato de etila 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1; diclorometano/metanol 98:2, 95:5, 90:10 e 80:20 e metanol puro, em ordem crescente de polaridade para o isolamento dos alcaloides.

As frações obtidas foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando como revelador a luz UV nos comprimentos de onda de 245 nm e 365 nm, além de reagente de Dragendorff. As amostras foram consideradas puras quando apresentaram-se como uma mancha única e homogênea em CCD, mesmo variando-se o solvente. As placas cromatográficas das frações WFH-1, WFH-1.1, WFH-1.2, WFH-1.3, WFH-1.4, WFH-1.5, WFH-1.6, WFH-2 e WFH-3 foram eluídas em hexano/acetato de etila 9:1; as WFH-4, WFH-5 e WFH-5A em hexano/acetato de etila 8:2 e WFH-5B, WFH-5C, WFH-5D e WFH-6 em hexano/acetato de etila 7:3.

Foi-se verificado em placa cromatográfica que as frações WFH-1.3, WFH-1.4 e WFH-5 se tratavam da mesma substância, portanto elas foram submetidas em conjunto à uma nova coluna cromatográfica utilizando-se os solventes hexano/acetato de etila 8:2, 7:3, 6:4 e metanol. Obteve-se assim as frações WFH-1A e WFH-1B, as quais foram eluídas em placa cromatográfica em sistema hexano/acetato de etila 8:2 para a confirmação de sua pureza.

Os alcaloides foram identificados através da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , Espectrometria de massas e comparação com dados da literatura.

2.1.4 Obtenção dos extratos brutos

Raízes e caule secos foram moídos em moinho da marca Willey TECNAL modelo TE-650. Para a maceração do material vegetal moído foi utilizado etanol P.A. da marca Vetec. Para a concentração de frações líquidas foram utilizados rota evaporadores rotatórios sob pressão reduzida da marca BUCHI.

2.1.5 Separações cromatográficas

Para a purificação das substâncias foram utilizadas:

i. Cromatografia por adsorção em coluna de vidro (CC) utilizando-se como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh e 230-400 mesh da ACROS ORGANICS.

2.1.6. Análises por cromatografia em camada delgada

Para as análises em CCD foram utilizadas folhas de alumínio com sílica gel 60 F254, com 0,2 mm de espessura da Merck. Como reveladores foram utilizados luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, utilizando-se Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C.

2.1.7 Métodos de determinação estrutural

Foram utilizados os seguintes métodos para determinação estrutural das substâncias isoladas:

i. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (1D e 2D)

Para as análises de RMN substâncias puras ou em mistura foram solubilizadas em solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL-CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, com % de deutério de 99,8% para CDCl_3 . Foram utilizados espectrômetros de RMN do DQ/UFSCAR: Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C) e AVANCE III 400NANO Varian 9,4 T (400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C).

ii. Rotação óptica

Os compostos com carbono quiral tiveram sua rotação óptica determinada em equipamento PERKIN-ELMER modelo 241 do laboratório de Sínteses Orgânicas do prof. Timothy John Brockson (UFSCAR). Utilizou-se como solventes: diclorometano e metanol grau HPLC e as concentrações foram determinadas a partir de modelos da literatura.

2.1.8 Processamento de espectros

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram processados utilizando-se os softwares TOPSPIN 6.0, ACD LABS e Spin Works. Os espectros de massas e

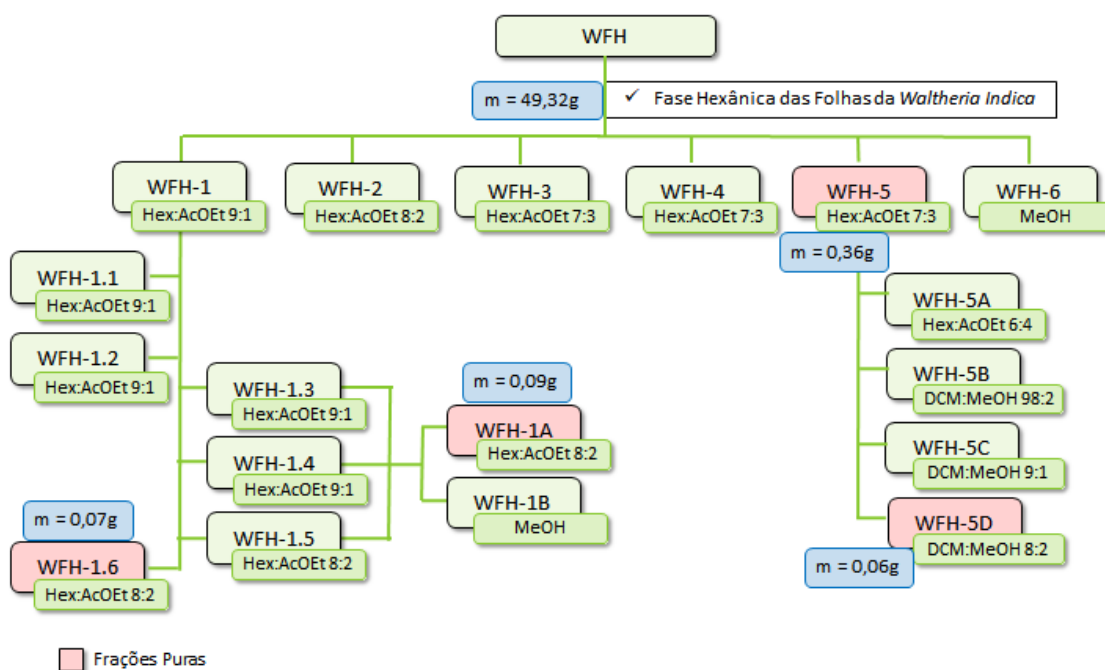
dicroísmo circular foram processados pelos respectivos softwares dos aparelhos.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Extração e isolamento

A fase hexânica de folhas de *Waltheria indica* (WFH) obteve no total 18 sub-frações (Figura 6).

Figura 7 - Frações purificadas da fase hexânica das folhas da *Waltheria Indica* (WFH)



Fonte: O Autor

2.2.2 Identificação estrutural dos alcaloides isolados

As waltherionas podem ser identificadas através de sinais característicos de RMN ^1H . O primeiro passo para a identificação destes alcaloides é observar no espectro os sinais do núcleo quinolin-4-ona e do oxabicyclo [3.2.1] das

waltherionas ciclisadas ou da cadeia lateral alquílica nas waltherionas de cadeia aberta (CRETTON *et al.*, 2014).

Considerando-se o núcleo quinolin-4-ona, este é identificado através dos sinais da metila ligada ao carbono 2 como um simpleto entre δ 2,3 – 2,5 ppm no espectro. O sinal da metoxila ligada ao carbono 3 é encontrado também como um simpleto entre δ 3,7 – 4,0 ppm. O terceiro sinal característico do núcleo é do hidrogênio ligado ao nitrogênio, o qual se encontra como um simpleto largo entre δ 8,0 – 12,0 ppm.

Nas waltherionas de cadeia aberta pode-se ter uma metila terminal acoplado com os dois hidrogênios do carbono vizinho com sinal tripleto entre δ 0,7 – 1,6 ppm, ou uma fenila terminal com sinal multiplete entre δ 6,0 – 8,0 ppm, além do sinal tripleto do hidrogênio benzílico em δ 2,6 ppm. Somado a isso, a cadeia alquílica lateral apresenta seu sinal entre δ 1,4 – 1,8 ppm, o hidrogênio do carbono 5 possui um simpleto largo entre δ 2,9 – 3,3 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C , a carbonila do núcleo quinolin-4-ona na posição 4 têm seu sinal como um simpleto entre δ 170 – 174 ppm, sendo assim importante para a determinação desta classe de alcaloides.

2.2.2.1 Identificação da Waltheriona P

A waltheriona P (Figura 7) foi isolada da subfração WFH-1A, obtendo-se 90mg. Apresentou pureza através de uma única mancha homogênea em CCD e revelou-se positivamente com o reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN de ^1H desta subfração apresentou os sinais característicos do núcleo quinolin-4-ona com dois simpletos em δ 2,38 ppm e δ 3,9 ppm, indicando a presença da metila ligada ao C-2 e a metoxila em C-3, respectivamente. Além do sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel presente como um simpleto largo em δ 8,7 ppm (Figura 8). A presença do núcleo também foi confirmada pelo sinal da carbonila do C-4 em δ 174 ppm no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 9).

Esse mesmo espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos de uma cadeia alquílica lateral com a presença de uma fenila terminal. O sinal da fenila terminal é encontrado como um multiplete entre δ 7,16 – 7,28 ppm

(Figura 10), o hidrogênio benzílico como um tripleto em δ 2,60 ppm, os hidrogênios metilênicos da cadeia como um multiplete na faixa de δ 1,40 – 1,68 ppm e o hidrogênio em C-5 como um simpleto largo em δ 3,30 ppm (Figura 11).

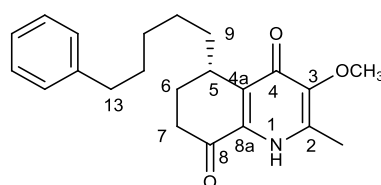
O espectro de RMN de ^{13}C também apresentou um sinal em δ 195 ppm, indicando a presença de uma segunda carbonila na molécula (Figura 9). Essa suposição foi confirmada pelos sinais de RMN de ^1H que indicaram a presença de hidrogênios alfa-carbônicos em δ 2,75 e δ 2,55; e beta-carbônicos em δ 2,2 e δ 2,1 (Figura 11).

O espectro de massas obtido por meio de ionização *Electro-spray* (ESI) em modo positivo, apresentou o íon pseudo-molecular $[\text{M} + \text{H}^+]$ 354,3 Da, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ (Figura 12).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C e ESI-EM de WFH-1A foram comparados com aqueles reportados por Cretton e colaboradores (CRETTON *et al.*, 2016), de modo que a o alcaloide encontrado na fração WFH-1A é confirmado como sendo a waltheriona P (Tabela 1).

O presente estudo é o segundo registro na literatura da waltheriona P, a qual ainda não possui atividades farmacológicas descritas. Seu primeiro registro se encontra no estudo de Cretton, S. e colaboradores em 2015, onde este alcaloide não apresentou atividade antifúngica. Porém, considerando que a antidesmona possui potente ação tripanocida com $\text{CI}_{50} = 0,17 \mu\text{M}$ contra cepas de *T. cruzi* e grande similaridade estrutural com a waltheriona P, tendo sua única diferença na metila terminal ao invés da fenila terminal, existe neste alcaloide isolado grande potencial para estudos de atividade biológica futuros (CRETTON *et al.*, 2014).

Figura 8 - Estrutura da Waltheriona P



waltheriona P

Fonte: O Autor

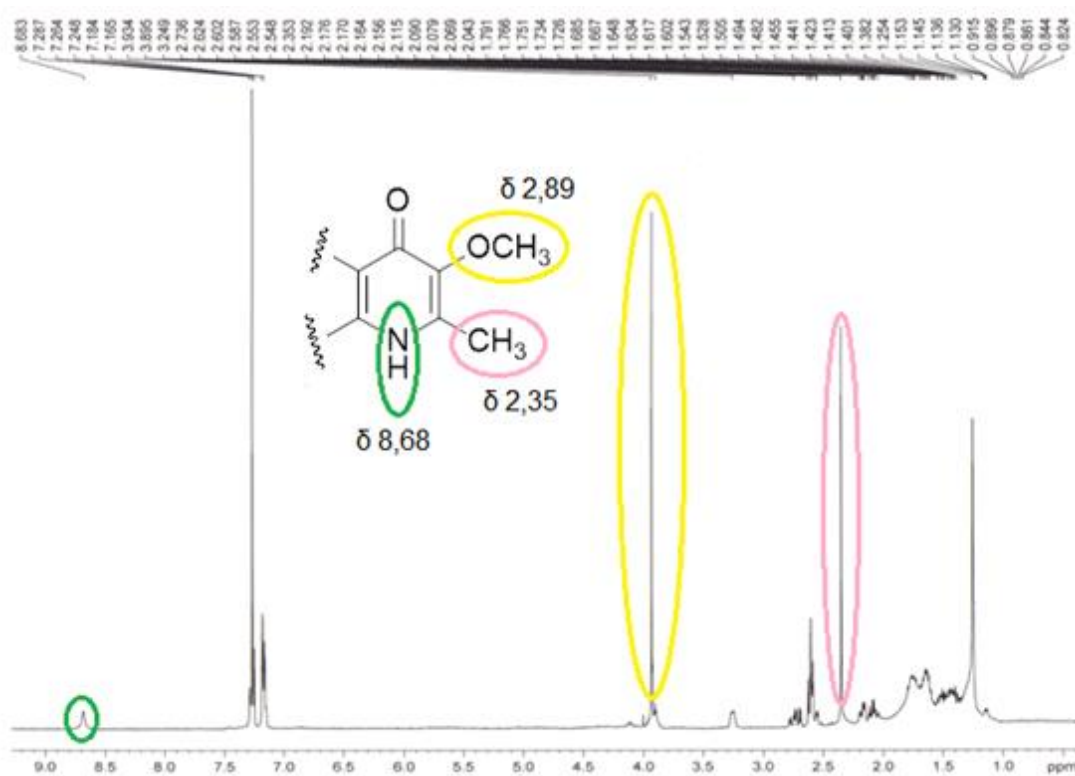
Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de WFH-1A

Posição	WFH-1A (CDCl_3)		Waltheriona P (Lit*1) (CDCl_3)	
	^1H 400 MHz σ (ppm) <i>J</i> (Hz)	^{13}C 100 MHz σ (ppm)	^1H 500 MHz σ (ppm) <i>J</i> (Hz)	^{13}C 125 MHz σ (ppm)
2	-	138,12	-	138,90
3	-	147,63	-	147,50
4	-	173,40	-	172,18
5	3,25 (<i>m</i>)	30,31	3,27 (<i>m</i>)	30,30
6ax	2,08 (<i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,5; 4,3)	24,47	2,08 (<i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,7; 4,4)	24,30
6eq	2,20 (<i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,3)		2,20 (<i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,4)	
7ax	2,75 (<i>ddd</i> , 14,7 ;18,1; 5,3)	32,23	2,75 (<i>ddd</i> , 14,7 ;18,2; 5,3)	32,20
7eq	2,58 sobreposto		2,58 (<i>ddd</i> , 18,2 ;4,4 ; 2,4)	
8	-	194,87	-	194,60
9	-	131,97	-	
10	-	138,97	-	
11a	1,50 – 1,80 (sobreposto)	30,53	1,75 (sobreposto)	30,50
11b	1,45 (sobreposto)		1,45 (sobreposto)	
12-13	1,25 – 1,80	29,20 - 29,60	1,25 – 1,80	29,20 – 29,60
14	1,60 (sobreposto)	32,12	1,25	22,60
15	2,62 (<i>t</i> , 7,0)	36,00	0,87 (<i>t</i> , 7,0)	14,00
1'	-	142,78	-	-
2'	7,18 (<i>m</i>)	128,25	-	-
3'	7,28 (<i>m</i>)	128,06	-	-
4'	7,18 (<i>m</i>)	125,47	-	-
5'	7,28 (<i>m</i>)	128,06	-	-

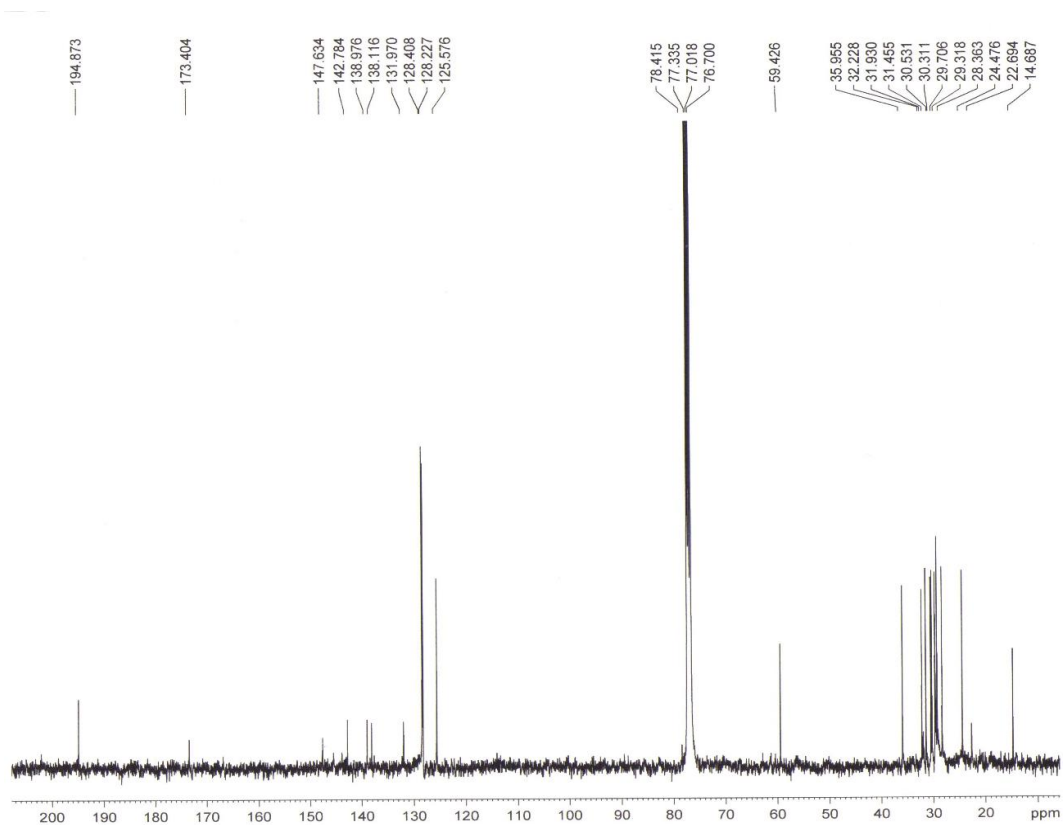
6'	7,18 (m)	128,25	-	-
2-C-CH ₃	2,35 (s)	14,68	2,36 (s)	14,50
3-O-CH ₃	3,93 (s)	59,42	3,93 (s)	59,40
N-H	8,68 (s)	-	8,73 (s)	-

Fonte: O Autor. *Literatura= CRETTON *et al.*, 2016.

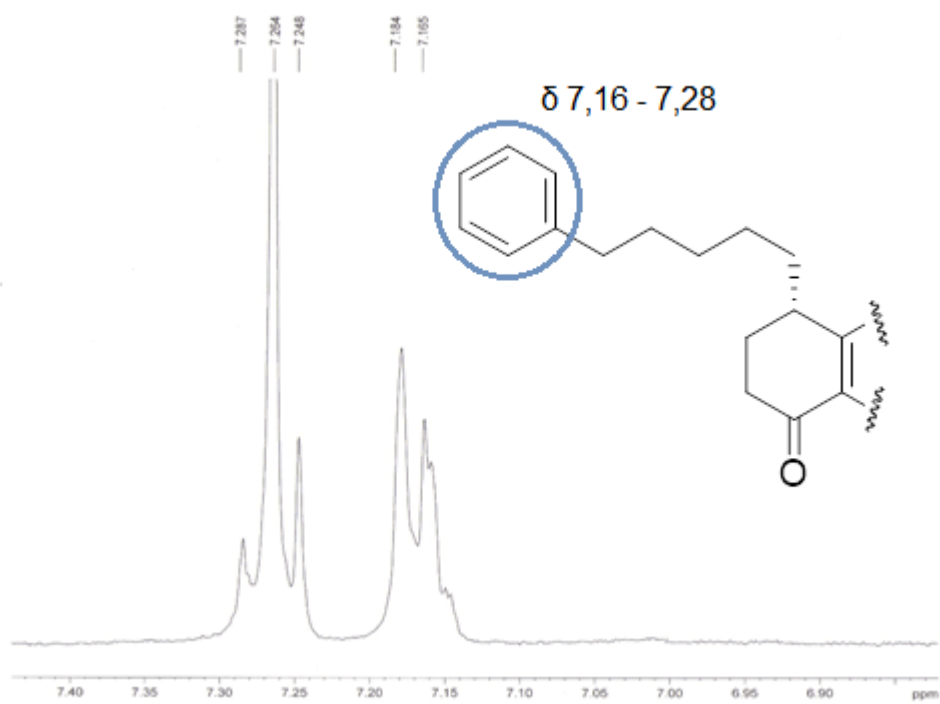
Figura 9 - Espectro de RMN de ¹H de WFH-1A (CDCl₃, 400MHz)



Fonte: O Autor

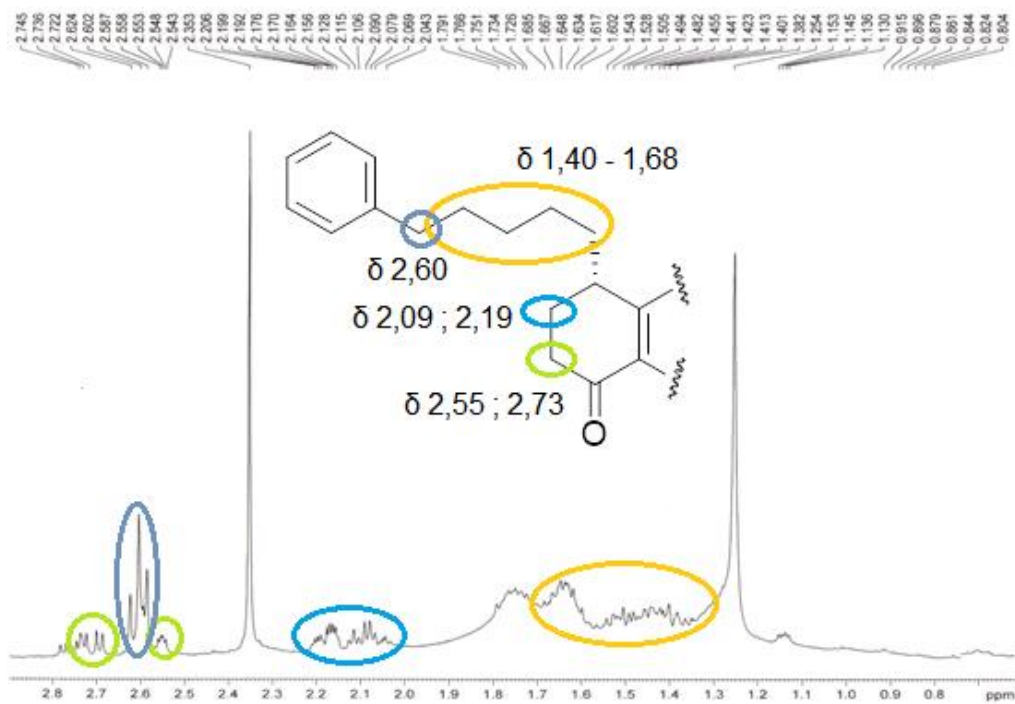
Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C de WFH-1A (CDCl_3 , 100MHz)

Fonte: O Autor

Figura 11 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H de WFH-1A (CDCl_3 , 400 MHz)

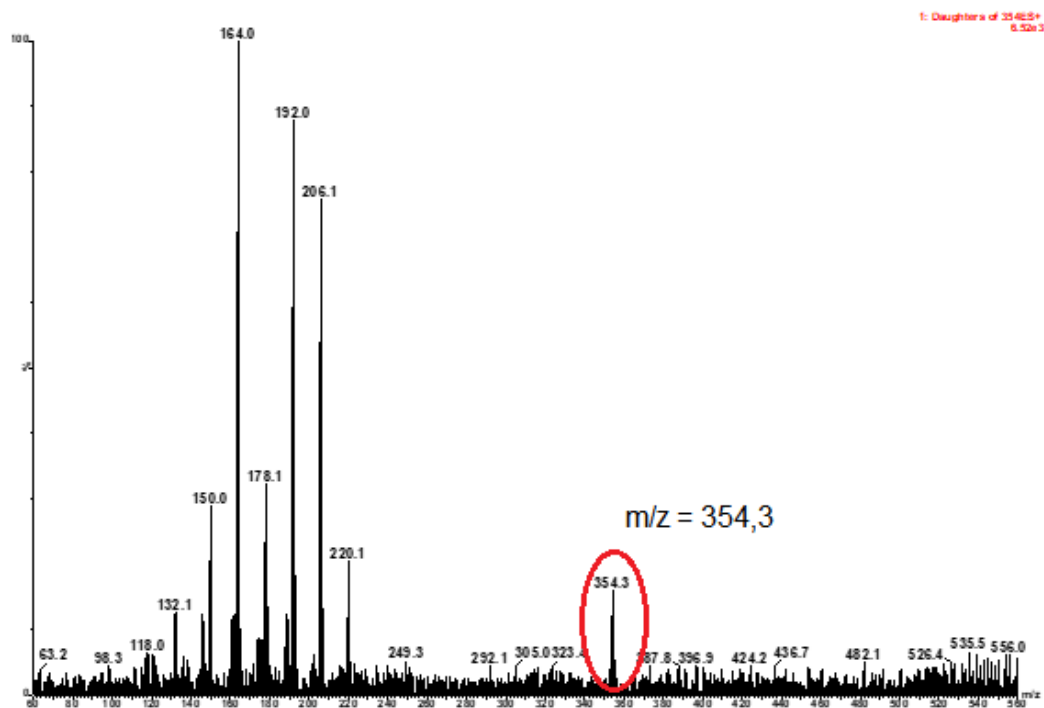
Fonte: O Autor

Figura 12 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de WFH-1A (δ 0 – 2,80)



Fonte: O Autor

Figura 13 - Espectro de Massas de WFH-1A (ESI, modo positivo)



Fonte: O Autor

2.2.2.2 Identificação da Chamaedrona

A chamaedrona (Figura 13) foi isolada na fração WFH-5, obtendo-se 360mg de um óleo. Apresentou pureza através de uma única mancha homogênea em CCD e revelou-se positivamente com o reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN de ^1H deste alcaloide apresentou sinais que caracterizam o núcleo estrutural de quinolonas características da tribo *Hermannieae* (família *Malvaceae*), a saber, os sinais de simpleto largo em δ 8,16 referente a um hidrogênio ligado ao nitrogênio (N-H); um simpleto integrando para três hidrogênios em δ 2,29, o que caracteriza uma metila ligada à um carbono sp^2 aromático (C-2); um simpleto integrando para três hidrogênios em δ 3,88 referente à metoxila ligada ao carbono C-3, do anel quinolônico (Figura 14).

Foram observados ainda neste espectro, os sinais típicos das *waltherionas* de cadeia aberta, como um tripleto em δ 0,87 ($J = 7,0$ Hz), característico de metila terminal e multipletos entre δ 1,3 – 1,8 característicos de hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica. Observa-se ainda; um sinal de metoxila ligada a carbono sp^3 δ 3,49 e um outro sinal de multipletos em δ 4,2 referentes à hidrogênio ligado a carbono oxigenado, sugerindo assim que a metoxila encontra-se ligada a um carbono metínico (CH) (Figura 15).

O sinal de multipletos em δ 2,88 integrando para um hidrogênio é bem característico da posição 5 de quinolonas da tribo *Hermannieae* com o anel B ciclohexeno. Este espectro apresentou ainda quatro sinais de hidrogênios em δ 1,96; 1,62; 2,14 e 1,69 com multiplicidades não bem definidas (Figura 16), onde estes sinais diferenciados são decorrentes do ambiente químico que sugere a proximidade de grupos retiradores de densidade eletrônica, o que leva à mudança dos ambientes eletrônicos dos hidrogênios frente a outros; e a proximidade à carbonos quirais, o que levará a diferenciação dos hidrogênios diastereotópicos (DIAS et al., 2007b).

O espectro de massas (EI) deste alcaloide apresentou o íon molecular em m/z 335 Da, sendo possível afirmar que a cadeia lateral deste alcaloide possui sete grupos metilênicos (Figura 17). As fragmentações propostas a partir da

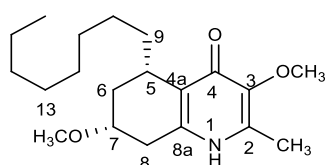
análise do espectro de massas são compatíveis com a estrutura proposta (Figura 18).

Com base na análise dos dados espectrais apresentados e a comparação destes com a literatura, foi possível identificar a substância WFH-5 como sendo o alcalóide quinolin-4-ona chamaedrona. Este alcalóide foi isolado anteriormente de *Melochia chamaedrys* (DIAS et al., 2007b).

A estereoquímica da chamaedrona foi determinada por difração de raios-X por Dias e colaboradores (DIAS et. al.; 2007b). Neste estudo, verificou-se que a estereoquímica do carbono C-5 da chamaedrona é a mesma da (S)-antidesmona. Já para o carbono 7, verificou-se por raio-X que a estrutura mais estável tem a metoxila em face beta e o valor medido de $[\alpha]_{D25} = -3,8^{\circ}$ (c 1,2; CHCl₃). Assim, dado o valor de $[\alpha]_{D25} = -3,9^{\circ}$ (c 1,2; CHCl₃) para nossa amostra, sugere-se que o alcaloide da fração 5 tenha a mesma estereoquímica que a chamaedrona relatada na literatura.

Este estudo é o segundo registro do isolamento da chamaedrona na literatura. O primeiro foi feito pelo autor Dias, G. e colaboradores em 2007 na espécie *Melochia chamaedrys*, o qual também encontrou para este alcaloide atividades antimicrobianas contra cepas de *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. O autor também relata uma atividade inibitória moderada em comparação com o cloranfenicol para as bactérias e a nistatina para os fungos.

Figura 14 - Estrutura da Chamaedrona



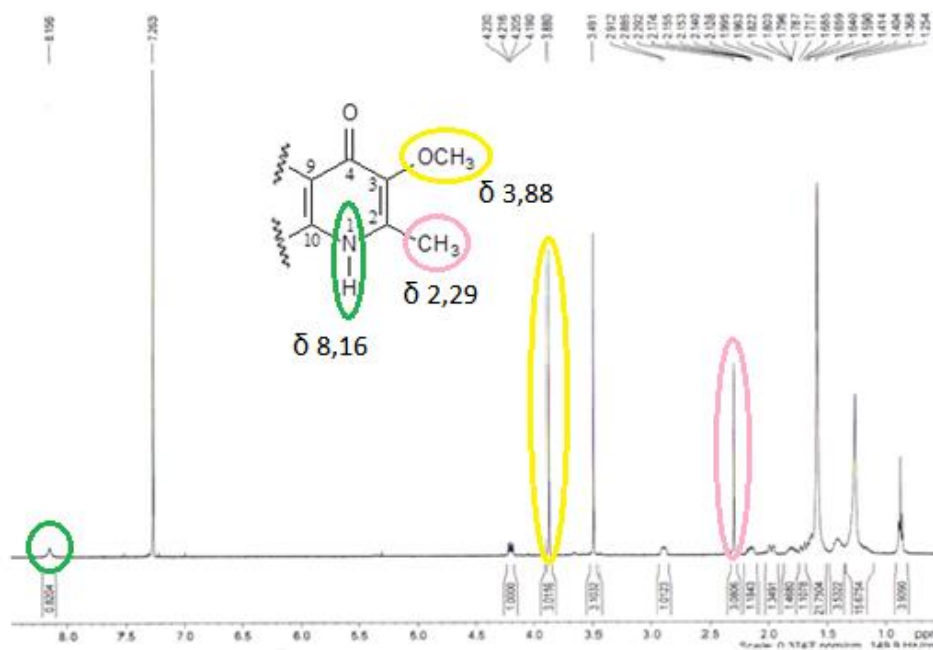
chamaedrona

Fonte: O Autor

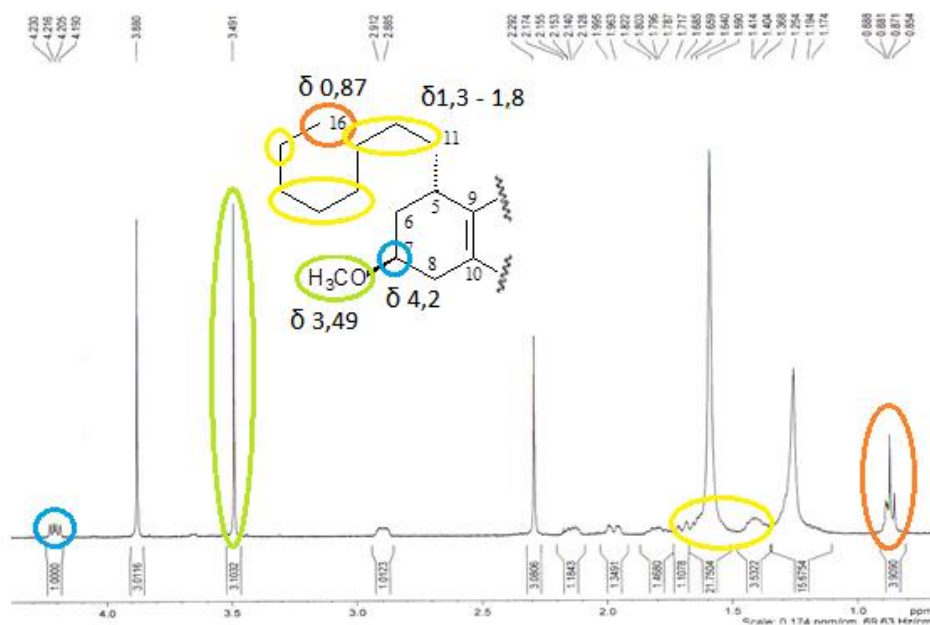
Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de WFH-5

Posição	Fração 5	Chamaedrona (Lit* ¹)
H/C	^1H 400 MHz σ (ppm) J (Hz)	^1H 400 MHz σ (ppm) J (Hz)
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	2,90 (m)	2,90 (m)
6a	1,62 (m)	1,62 (m)
6b	1,96 (m)	1,96 (m)
7	4,23	4,27 (dd; 5,0; 10)
8a	1,69 (m)	1,69 (m)
8b	2,14 (m)	2,14 (m)
9	-	-
10	-	-
11a	1,50 – 1,80 (sobreposto)	1,75 (m)
11b	1,45 (sobreposto)	1,25 (sobreposto)
12-17	1,25 – 1,80	1,25 – 1,80
18	0,87 (t; 7,0)	0,86 (t; 7,0)
7-OCH ₃	3,50 (s)	3,49 (s)
2-C-CH ₃	2,30 (s)	2,34 (s)
3-O-CH ₃	3,89 (s)	3,93 (s)
N-H	8,20 (s)	NO ^{*3}

Fonte: O Autor. *Literatura= DIAS *et al.*, 2007.

Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H de WFH-5 (CDCl_3 , 400 MHz)

Fonte: O Autor

Figura 16 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H de WFH-5 (δ 0 – 4,50)

Fonte: O Autor

Figura 17 - Sinais dos hidrogênios diastereotópicos e da posição cinco no espectro de RMN de ^1H de WFH-5 (CDCl_3 , 400MHz)

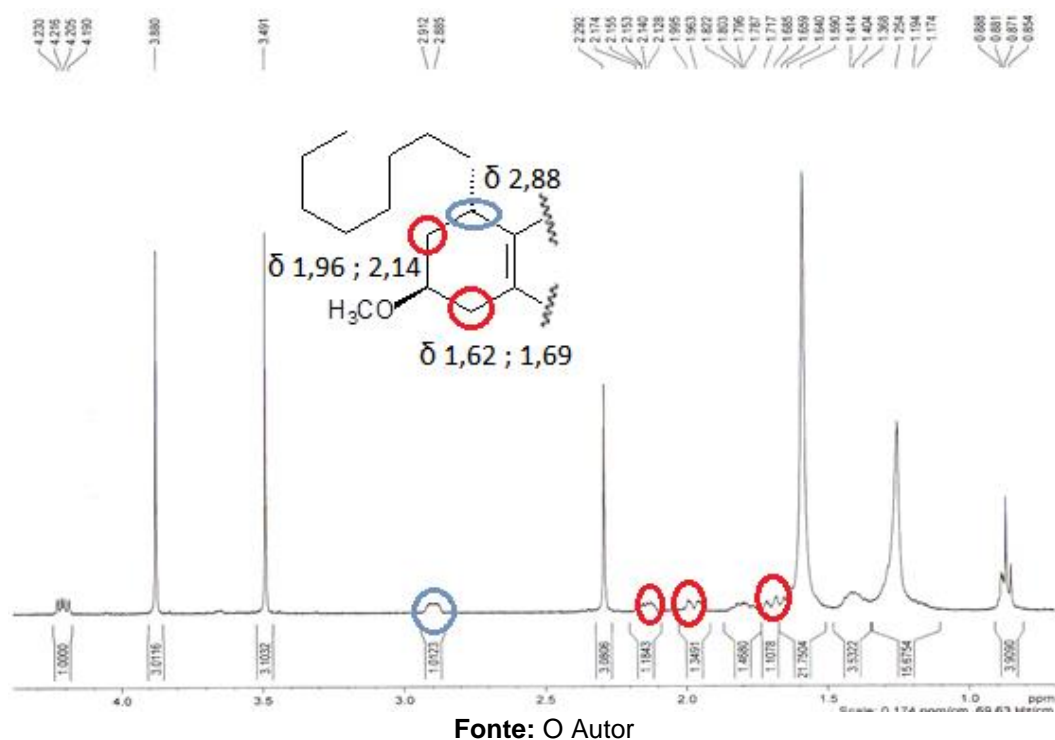


Figura 18 - Espectro de Massas de WFH-5 (EI)

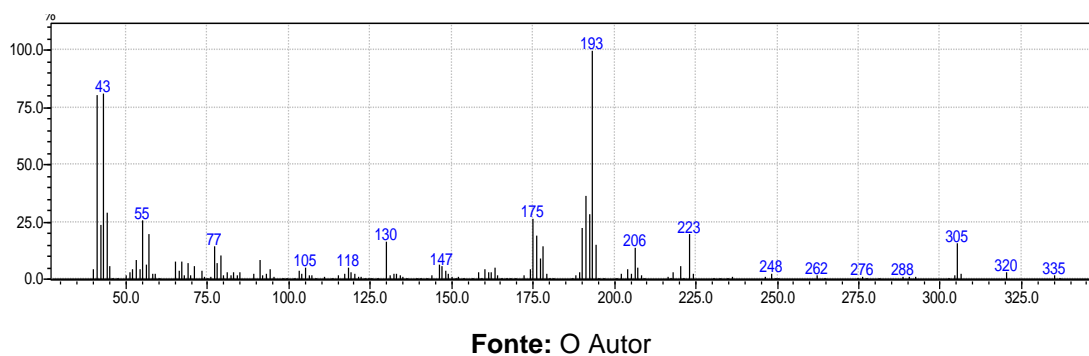
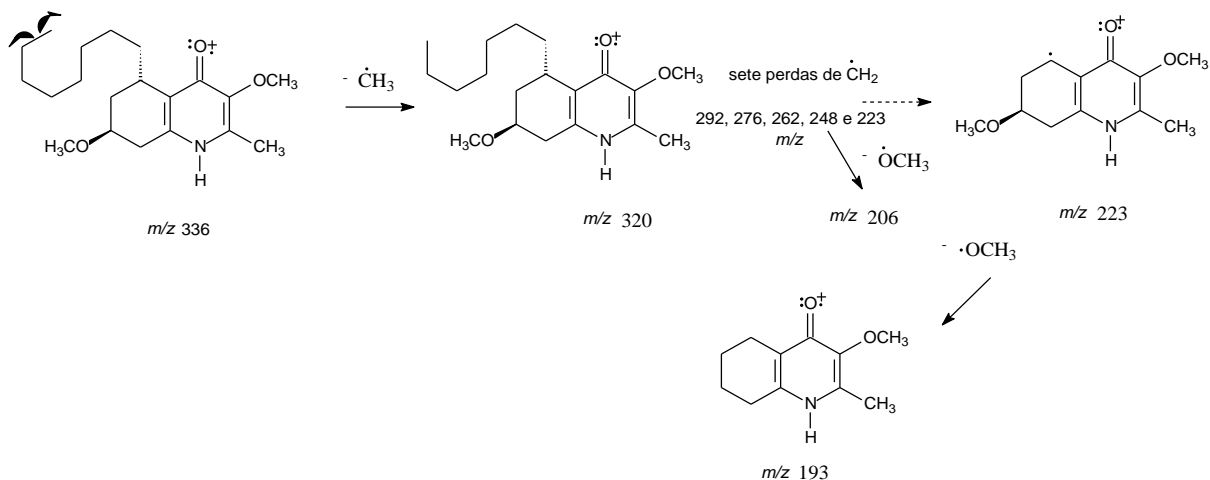


Figura 19 - Fragmentações por impacto eletrônico de WFH-5



Fonte: O Autor

2.2.2.3 Identificação da Waltheriona G

A Waltheriona G (Figura 19) foi isolada na fração WFH-1.6, obtendo-se 70mg. Apresentou pureza através de uma única mancha homogênea em CCD e revelou-se positivamente com o reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN de ^1H de WFH-1.6 apresentou sinais característicos dos alcaloides quinolônicos discutidos anteriormente, como os sinais integrando para três hidrogênios em δ 3,88 e 2,44 característicos de metoxila em C-3 e metila ligado a carbono C-2 sp^2 , respectivamente, comum a todas as quinolonas anteriormente discutidas (Figura 20). Observou-se ainda o sinal de multiplete em δ 3,03 característico no hidrogênio na posição 5. São observados ainda sinais de multiplete entre δ 1,25 – 1,80 característicos de hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica saturada (Figura 21).

A exemplo do espectro de RMN de ^1H da waltheriona P não se observou o tripleto em δ 0,87 referente à metila terminal da cadeia lateral, mas sim um tripleto adicional integrando para dois hidrogênios em δ 2,60 ($J = 8,0\text{Hz}$) e dois multipletos típico de sistema AB em aproximadamente δ 7,2, integrando para cinco hidrogênios, sugerindo assim uma fenila terminal para a cadeia lateral da estrutura deste alcaloide. Outro sinal de metila ligada a heteroátomo foi observado em δ 3,95, sugerindo a presença de metoxila ou N-metila como substituinte na estrutura de WFH-1.6 (Figura 20).

O espectro de HSQC (COLOCAR NA METODOLOGIA QUE FEZ ESPECTRO 2D) apresentou informações importantes sobre a estrutura deste composto (Figura 22). O sinal referente à metila em δ 3,95 correlacionou-se com o sinal de carbono em δ 65,37 o que caracterizou a presença de uma *N*-metoxila na estrutura de WFH-1.6 dada a desblindagem do carbono metílico acima de 63,5 ppm de acordo com (RAZAKOVA *et. al*; 1984). Esse tipo raro de substituição justifica a ausência do sinal de N-H no espectro de RMN de ^1H de WFH-1.6.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou todos os sinais de carbono da estrutura de WFH-1.6, inclusive os carbonos totalmente substituídos (Figura 23). O espectro de massas de WFH-1.6 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular em m/z 370, confirmando a estrutura desta molécula com a cadeia lateral contendo cinco grupos metilênicos (Figura 24).

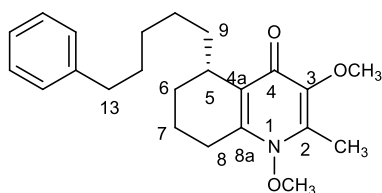
Assim, através da análise de todos os dados espectrais apresentados e a comparação com a literatura, permitiram identificar inequivocamente a estrutura do alcaloide WFH-1.6 como sendo a waltheriona G (CRETTON *et al.*, 2014). A configuração do carbono C-5 da waltheriona G foi atribuída como sendo (S), dado o valor de $[\alpha]_D^{25} = + 27,5^\circ$ (c 1,5; CHCl_3), quando comparado com a literatura, considerando a antidesmona como modelo (Buske *et.al.*; 1999).

No estudo de Cretton, S. e colaboradores em 2015 a waltheriona G e a waltheriona J mostraram o espectro de atividade antifúngica mais amplo, com um CIM ≤ 32 $\mu\text{g/mL}$ contra todas as cepas de levedura testadas, a saber: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e também contra uma levedura não patogênica, *Saccharomyces cerevisiae*. Esta atividade foi obtida em um meio de cultura ácido (pH 4,6) e não pode ser detectado em pH neutro, provavelmente devido a uma protonação das moléculas que poderiam facilitar suas atividades nas células fúngicas, conforme relatado para outras drogas. Além disso, a waltheriona G reduziu em mais de 50% a atividade metabólica de biofilmes maduros em concentrações semelhantes aos seus valores de CIM planctônicos (≤ 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

Em outro estudo de Cretton, S. e colaboradores em 2014, foi encontrado para a Waltheriona G uma potente inibição de crescimento contra as formas amastigotas do *T. cruzi*, com um IC_{50} mais baixo do que o da droga de referência, o benzonidazol, exibindo assim a mais potente atividade antichagásica do estudo

($IC_{50} = 0,02 \mu M$) e uma inibição em menor grau para o *T. b. brucei* ($IC_{50} = 24,1 \pm 2,28 \mu M$) e *T. b. rhodesiense* ($IC_{50} 30,4 \mu M$). No entanto, a citotoxicidade contra as células esqueléticas de camundongo L-6 foi alta ($IC_{50} = 0,64 \mu M$).

Figura 20 - Estrutura da Waltheriona G.



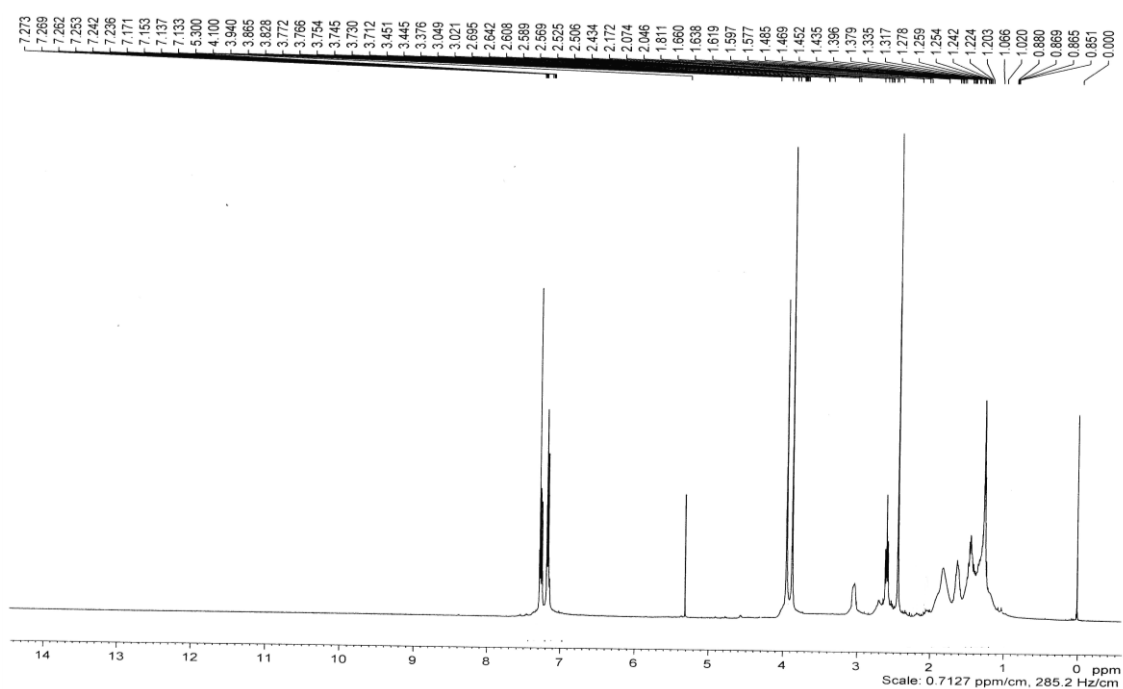
waltheriona G

Fonte: O Autor

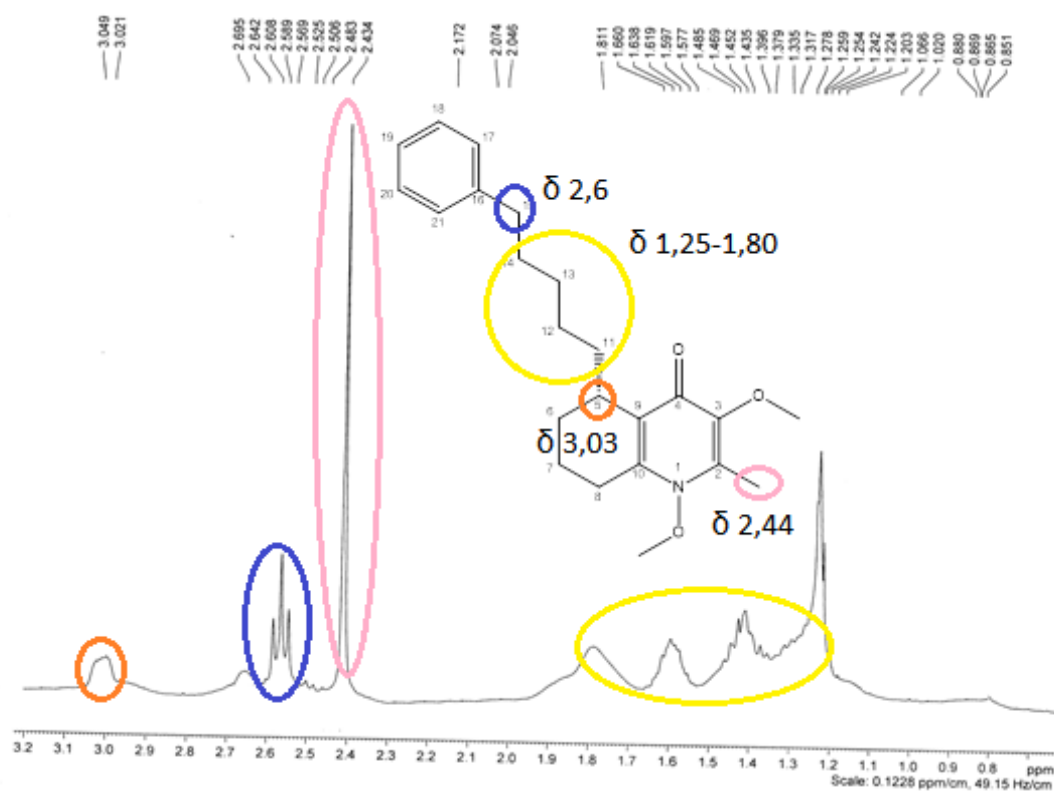
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de WFH-1.6

Posição	WFH-1.6 (CDCl_3)		(CRETTON <i>et al.</i> , 2014) (CDCl_3)	
	^1H 400 MHz σ (ppm) <i>J</i> (Hz)	^{13}C 100 MHz σ (ppm)	^1H 400 MHz σ (ppm) <i>J</i> (Hz)	^{13}C 100 MHz σ (ppm)
2	-	138,65	-	141,00
3	-	143,77	-	145,40
4	-	169,90	-	172,60
5	3,03 (<i>m</i>)	31,30	2,95 (<i>m</i>)	32,70
6a	1,85 sobreposto	24,27	1,86 (<i>m</i>)	25,70
6b	1,45 (sobreposto)		1,50 (<i>m</i>)	
7	1,80 (sobreposto)	16,70	1,80 (<i>m</i>)	18,20
8	2,67	23,61	3,01 (<i>m</i>)	24,90
9	-	128,52	2,74 (<i>m</i>)	
10	-	142,98	-	129,70
11a	1,75 (sobreposto)	31,55	-	145,10 33,50
11b	1,25 (sobreposto)		1,76 (<i>m</i>)	
12-13	1,25 – 1,85	27,90 – 29,60	1,25 (<i>m</i>)	
14	1,60 (sobreposto)	32,53	1,44 (<i>m</i>)	28,80
15	2,60 (<i>t</i> , 7,0)	36,00	1,39 (<i>m</i>)	30,50
1'	-	142,71	1,64 (<i>m</i>)	32,80
2'	7,18 (<i>m</i>)	128,39	2,60 (<i>t</i> , 7,7)	36,90
3'	7,27 (<i>m</i>)	128,16	-	144,00
4'	7,18 (<i>m</i>)	125,46	7,16 (<i>d</i> ; 7,6)	129,20
5'	7,27 (<i>m</i>)	128,16	7,23 (<i>t</i> , 7,6)	129,20
6'	7,18 (<i>m</i>)	128,39	7,13 (<i>t</i> ; 7,6)	126,60
2-C- CH_3	2,44 (<i>s</i>)	10,37	7,23 (<i>t</i> , 7,6)	129,20
3-O- CH_3	3,88 (<i>s</i>)	60,10	7,16 (<i>d</i> ; 7,6)	129,20
N-O CH_3	3,95 (<i>s</i>)	65,37	3,99 (<i>s</i>)	66,10

Fonte: O Autor

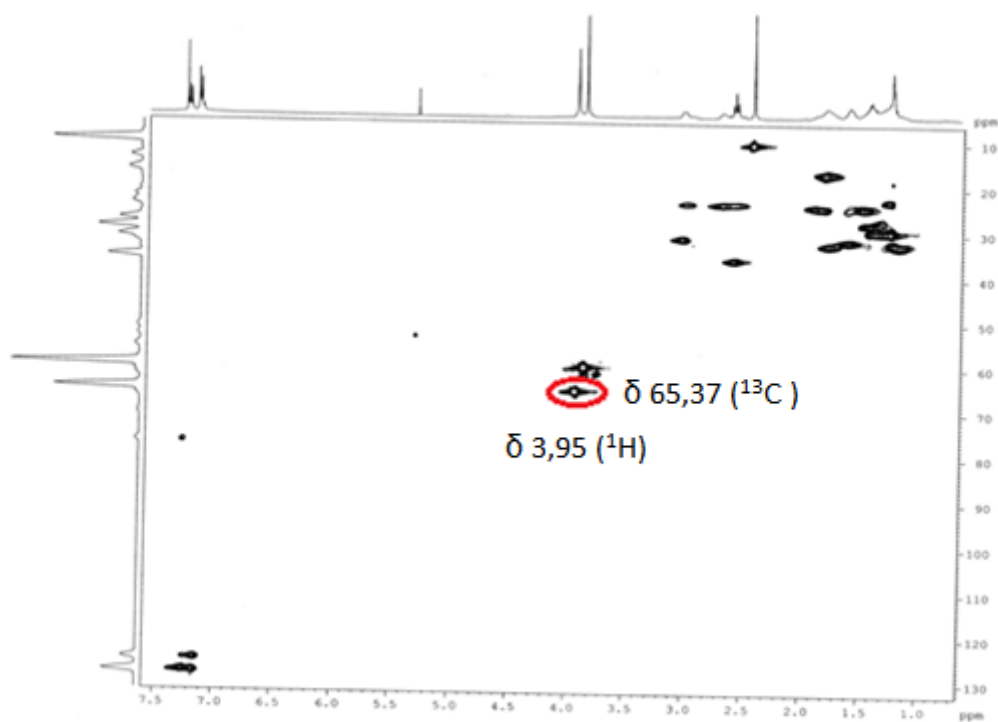
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de WFH-1.6 (CDCl_3 , 400 MHz)

Fonte: O Autor

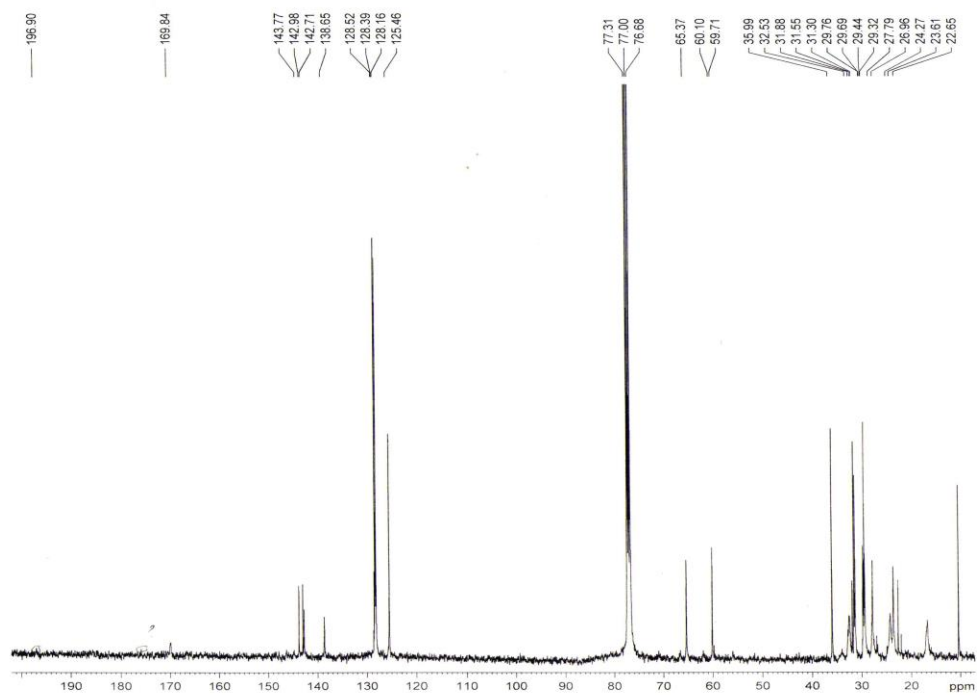
Figura 22 - Ampliação de parte do espectro de RMN de ^1H de WFH-1.6 (CDCl_3 , 400 MHz)

Fonte: O Autor

Figura 23 - Espectro de HSQC de WFH-1.6

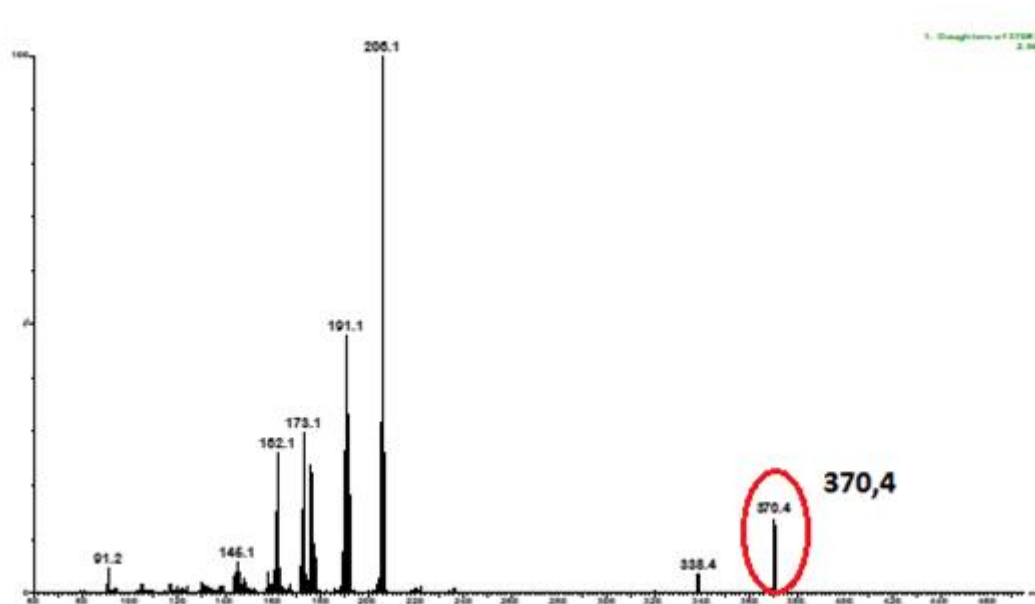


Fonte: O Autor

Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C de WFH-1.6 (CDCl_3 , 100 MHz)

Fonte: O Autor

Figura 25 - Espectro de Massas de WFH-1.6 (ESI, modo positivo)



Fonte: O Autor

2.2.2.4 Identificação da waltheriona L

A Waltheriona L (Figura 25) foi isolada na fração WFH-5.4, obtendo-se 90mg. Apresentou pureza através de uma única mancha homogênea em CCD e revelou-se positivamente com o reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN de ^1H de WFH-5.4 apresentou grande semelhança com o espectro de RMN de ^1H da waltheriona G, destacando-se os sinais característicos da cadeia alquílica lateral com um grupo fenílico terminal, sendo os multipletos entre δ 7,14 – 7,28 característicos de anel aromático monossustituído em livre rotação, o tripleto em δ 2,60 ($J = 8,0$ Hz) de hidrogênios metilênicos benzílicos e demais sinais entre δ 1,25 – 1,90, característicos dos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral.

Observou-se ainda neste espectro sinais característicos do núcleo quinolônico dos alcaloides discutidos anteriormente, como os sinais em δ 3,81 e 2,58 característicos da metoxila na posição 3 e da metila ligada a carbono sp^2 na posição 2 (Figura 26). Assim como para a waltheriona G, foi observado um sinal adicional de metila ligada a heteroátomo em δ 4,01 e a ausência do sinal

referente ao hidrogênio ligado a nitrogênio. Foram observados ainda dois sinais adicionais, com relação ao espectro de RMN de ^1H da *waltheriona G*, sendo um *ddd* em δ 2,78 ($J = 19,6; 10,8$ e $7,2$ Hz), e, um *dd* em δ 3,20 ($J = 19,6; 6,0$ Hz), sendo que a constante de acoplamento de 19,6 Hz em ambos, foi sugestivo de que estes hidrogênios sejam geminais, ou seja, ligados ao mesmo carbono (Figura 27).

No espectro de HSQC de WFH-5.4 observou-se quatro grupos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos (Figura 28). Os hidrogênios em δ 1,25 e 1,75 correlacionaram com o sinal de carbono em δ 31,60; sendo este característico da posição 11, vizinho ao centro esterogênico em C-5. Os hidrogênios geminais em δ 2,78 e δ 3,20 correlacionaram com o sinal de carbono em δ 25,61, enquanto que os hidrogênios em δ 1,90 e 1,45 correlacionaram com o sinal de carbono em δ 23,83 e os hidrogênios em δ 1,40 e 1,75 correlacionaram com o sinal de carbono em δ 16,17. Todos esses valores de deslocamento são característicos do anel B do núcleo quinolônico, quando comparado com o modelo da *waltheriona G* e do alcaloide *vanessina*, previamente reportado na literatura (GRESSLER *et. al.*; 2008).

O segundo sinal de metoxila observado no espectro de RMN de ^1H de WFH-5.4 em δ 4,01 correlacionou-se com o sinal de carbono em 60,76; descartando assim a possibilidade de tratar-se de uma *N-O*-metoxila, sugerindo-se então que esta poderia estar ligada na posição 4.

No espectro de RMN de ^1H de WFH-5.4, o deslocamento químico da metila ligada ao carbono C-2 sp^2 apresentou uma desblindagem de 0,14 ppm, quando comparado com o deslocamento químico desta metila para o alcaloide *waltheriona G*. Utilizou-se então um modelo já descrito na literatura (HOELZEL *et. al.*; 2005), onde o anel A é idêntico ao dos alcaloides quinolônicos já discutidos. Neste modelo o alcaloide quinolínico *O*-metilado na posição 4, apresentou a metila na posição 2 em δ 2,59; confirmando a hipótese de a metoxila em δ 4,01 estar ligada na posição 4 do anel A quinolínico.

O espectro de massas, apresentou o íon *pseudo*-molecular $[\text{M} + \text{H}^+]$ em m/z 370 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}$ (Figura 30). A partir deste dado foi possível confirmar a presença de cinco grupos CH_2 na cadeia lateral de WFH-5.4, idêntico ao número de CH_2 da cadeia lateral nas

waltherionas P e G. A massa excedente de 16 Daltons foi então inequivocamente atribuída à presença de um oxigênio ligado ao nitrogênio, caracterizando a presença de um N-óxido na estrutura de WFH-5.4.

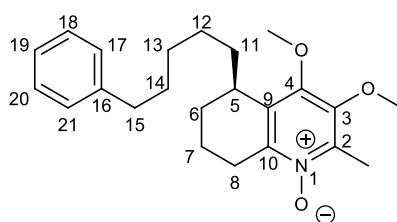
A confirmação da presença de N-óxido na estrutura de WFH-5.4 explica satisfatoriamente a desblindagem verificada nos carbonos C-2 e C-10, quando comparado com os mesmos valores de δ_c para estes carbonos da waltheriona G, esta desblindagem provavelmente deve-se a carga positiva centrada no átomo de nitrogênio.

Outra diferença observada no espectro de RMN de ^1H de WFH-5.4, quando comparado com a waltheriona G, está no deslocamento químico e na multiplicidade dos hidrogênios ligados ao carbono 8. Estes hidrogênios na waltheriona G apresentam-se como multiplete em δ_H 2,70. Enquanto que em WFH-5.4, os hidrogênios metilênicos na posição 8 apresentam deslocamento químico e multiplicidade diferentes. Isso provavelmente ocorre pelo efeito sofrido por estes devido à proximidade do cone de desblindagem da nuvem eletrônica do oxigênio do N-óxido. A proximidade espacial de hidrogênios metilênicos a um grupo N-óxido pode levar a uma desblindagem de 0,60 ppm para o hidrogênio *pseudo-equatorial*, enquanto que para o hidrogênio *pseudo-axial*, pouca ou nenhuma diferença é observada de acordo com a literatura (FARJADO *et. al.*; 2009).

A partir da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), espectrometria de massas, inclusive espectrometria de massas de alta resolução, a estrutura do alcaloide WFH-5.4 foi identificada como sendo o alcaloide waltheriona L, descrito somente em um estudo realizado com uma espécie de *Waltheria indica* coletada na Nigéria (CRETTON *et. al.*, 2014). A configuração do carbono C-5 de WFH-5.4 foi atribuída como sendo (*R*), dado o valor de $[\alpha]_D^{25^\circ} = -29^\circ$ (1,5 M; CHCl_3), quando comparado com a literatura, considerando a antidesmona como modelo (Buske *et.al.*; 1999).

Cretton, S. e colaboradores em 2014 relatam que a waltheriona L, assim como a waltheriona G, também apresentou inibição de crescimento para o *T. b. rhodesiense* (IC_{50} 55,7 μM) e *T. cruzi*, (IC_{50} 3,1 μM) com uma baixa citotoxicidade (IC_{50} 41,1 μM).

Figura 26 - Estrutura da Waltheriona L

**waltheriona L**

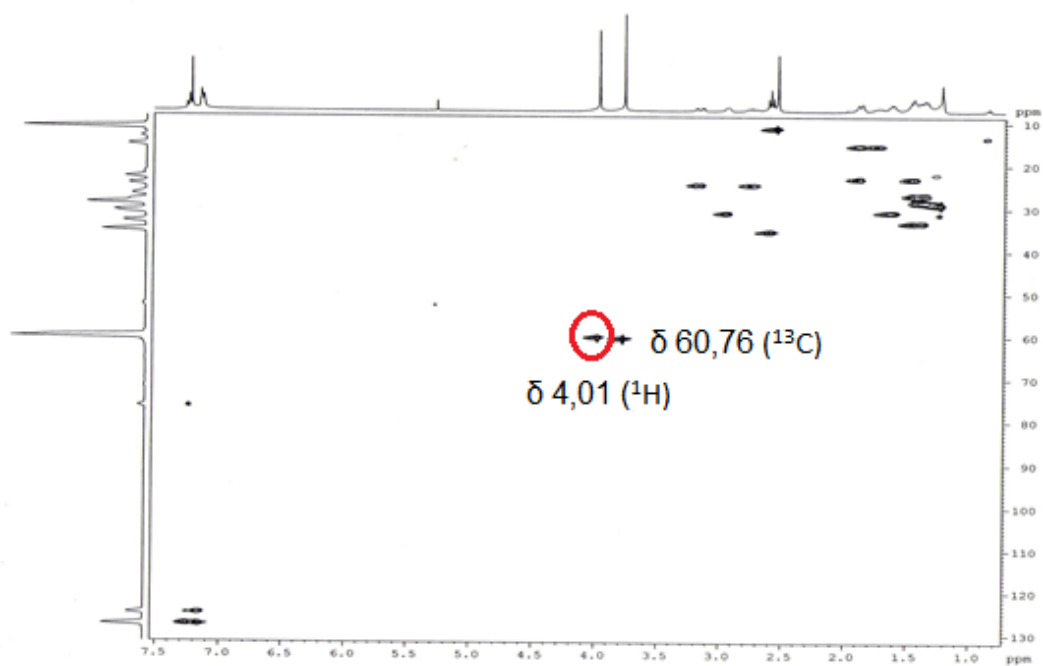
Fonte: O Autor

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de WFH-5.4

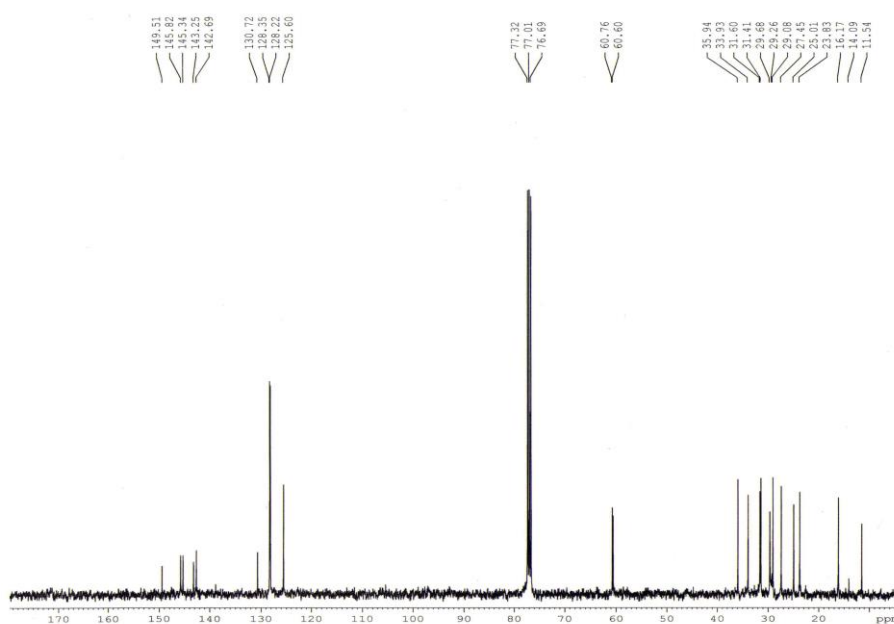
Posição	WFH-5.4 (CDCl_3)			Waltheriona L (Lit*1) (CD_3OD)	
	^1H 400 MHz σ (ppm) <i>J</i> (Hz)	^{13}C 400 MHz σ (ppm)	HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$)	^1H 500 MHz σ (ppm) <i>J</i> (Hz)	^{13}C 125 MHz σ (ppm)
2	-	143,25	-	-	141,20
3	-	145,97	-	-	145,70
4	-	149,39	-	-	152,00
5	2,95 (<i>m</i>)	31,74	C-11	3,03 (<i>m</i>)	32,90
6a	1,99	24,00	C-7; C-8; C- 5; C-11	1,95 (<i>m</i>)	24,80
6b	1,47			1,52 (<i>m</i>)	
7	1,75	16,35	Não observado	1,90 (<i>m</i>)	17,20
	1,88				
8	2,65 (<i>m</i> ; sobreposto)	25,10	Não observado	2,63 (<i>t</i> , 7,8)	36,90
	3,10 (<i>dd</i> ; 19,6; 6,0)				
9	-	130,87	-	-	127,80
10	-	145,37	-	-	142,50
11	1,38	34,09	Não observado	1,69 (<i>m</i>)	32,20
	1,50				

12 - 14	1,30 - 1,37	28,53 - 29,89	Não observado	1,30 (<i>m</i>) – 1,40 (<i>m</i>)	30,00 - 30,90
15	2,61 (<i>t</i> , 7,73)	36,07	C-16; C-17; C-18; C-20; C-21	2,63 (<i>t</i> , 7,7)	36,80
16	-	142,83	-	-	142,40
17	7,18 (<i>d</i> ; sobreposto)	128,49	C-15; C-17; C-18; C-19; C-20; C-21	7,17 (<i>d</i> ; 7,3)	129,50
18	7,28 (<i>m</i>)	128,36	C-16; C-17; C-18; C-19; C-20, C-21	7,24 (<i>t</i> , 7,6)	129,50
19	7,16 (<i>d</i> ; sobreposto)	125,74	C-18; C-20	7,14 (<i>t</i> ; 7,3)	126,80
20	7,28 (<i>m</i>)	128,36	C-16; C-17; C-18; C-19; C-20, C-21	7,24 (<i>t</i> , 7,6)	129,50
21	7,18 (<i>d</i> ; sobreposto)	128,49	C-15; C-17; C-18; C-19; C-20; C-21	7,17(<i>d</i> ; 7,3)	129,50
2-C-CH ₃	2,46 (<i>s</i>)	11,67	C-2; C-3	2,47 (<i>s</i>)	11,70
3-O-CH ₃	3,78 (<i>s</i>)	60,88	C-3; C-2	3,83 (<i>s</i>)	61,60
4-O-CH ₃	3,92 (<i>s</i>)	60,74	C-4	3,99 (<i>s</i>)	61,40

Fonte: O Autor

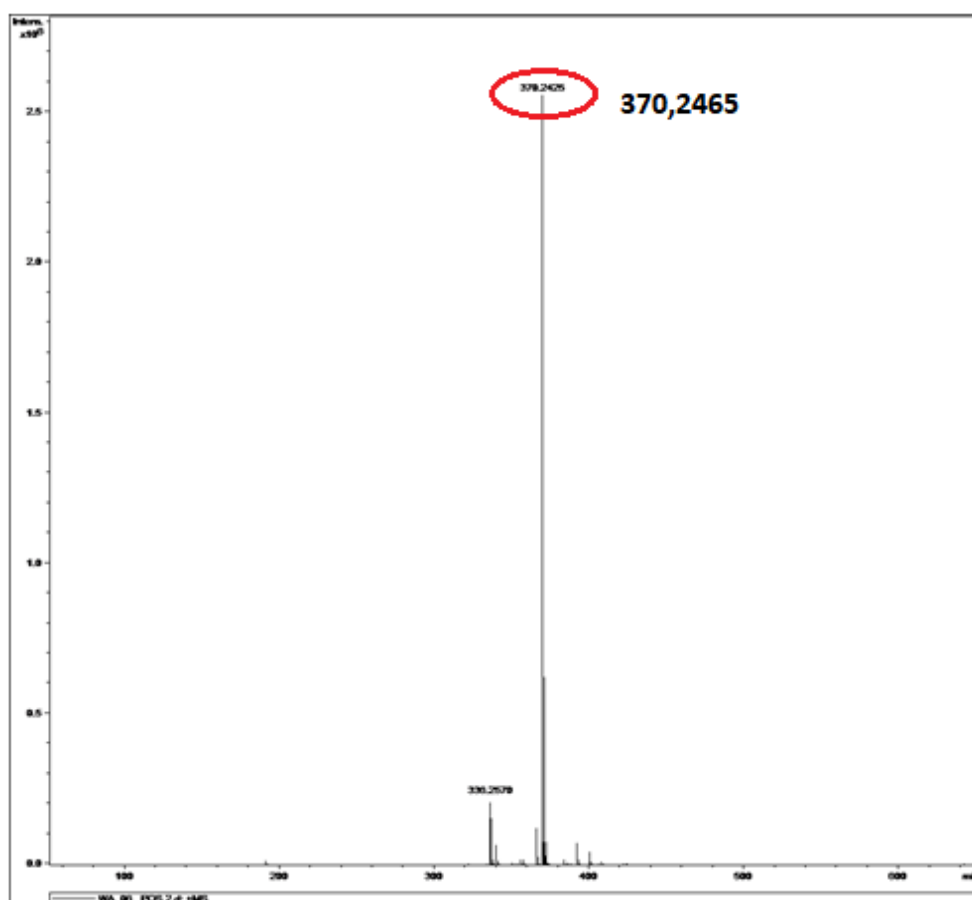
Figura 29 - Espectro de HSQC de WFH-5.4 (CDCl₃; 400 MHz)

Fonte: O Autor

Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³C de WFH-5.4 (CDCl₃; 100 MHz)

Fonte: O Autor

Figura 31 - Espectro de Massas de alta resolução de WFH-5.4 (ESI, modo positivo)



Fonte: O Autor

3 CONCLUSÃO

A investigação da composição química das folhas de *Waltheria indica* cumpriu satisfatoriamente os objetivos propostos, à medida que, realizou-se o isolamento e identificação de alcaloides quinolônicos bioativos da espécie coletada na cidade de Tombos-MG. Foram isolados quatro alcaloides pertencentes à classe das waltherionas de cadeia aberta, sendo estes: waltheriona P, chamaedrona, waltheriona G e waltheriona L. Dentre estes destacamos a ocorrência de um *N*-óxido (waltheriona G) que é um padrão de substituição bastante raro em metabólitos secundários vegetais. Ao comparar nosso resultado com o perfil dos alcaloides quinolônicos encontrados no gênero *Melochia*, dos alcaloides isolados neste trabalho, apenas a chamaedrona tinha ocorrência descrita em *Melochia*. A determinação estrutural destas moléculas foi realizada através da análise e comparação com a literatura de dados dos

espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e Espectrometria de Massas (ESI), o que permitiu a identificação inequívoca dos alcaloides.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/%20CONT000fu1ekyj602wyiv807nyi6s9rqihfq.html>. Acesso em: 01 de jun. 2020.

ANISZEWSKI, T. Definition, typology, and occurrence of alkaloids. In: ANISZEWSKI, T. **Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications**. 2. ed. [S. l.]: Elsevier, 2015. cap. 1, p. 1-97.

BRINGMANN, G. *et al.* Revised Structure of Antidesmone, an Unusual Alkaloid from Tropical *Antidesma* Plants (Euphorbiaceae). **Tetrahedron**, Würzburg, n. 56, p. 3691-3695, ab. 2000.

BUSKE, A., SCHIMIDT, J., BRINGMANN, G., ADAN, G., BUSEMANN, S., MUEHLBACHER, J., PORZEL, A. Antidesmone, a novel type isoquinoline alkaloid from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae). **Tetrahedron**, v. 55, p. 1079 – 1086, 1999.

BUSKE, A., SCHIMIDT, J., HOFFMANN, P. Chemotaxonomy of the tribe Antidesmeae (Euphorbiaceae): antidesmone and related compounds. **Phytochemistry**, v. 60, p. 489 – 496, 2002.

CHASE, M. W. *et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, abr. 2016.

CRETTON, S. *et al.* Antifungal Quinoline Alkaloids from *Waltheria indica*. **Journal of Natural Products**, Geneva, v. 79, n. 2, p. 300-307, fev. 2016.

CRETTON, S. *et al.* Antitrypanosomal Quinoline Alkaloids from the Roots of *Waltheria indica*. **Journal of Natural Products**, Geneva, v. 77, n. 10, p. 2304-2311, ago. 2014.

CRETTON, S. *et al.* Chemical constituents from *Waltheria indica* exert in vitro activity against *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Phytoterapia**, Geneva, n. 105, p. 55-60, jun. 2015.

DEWICK, M. P. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3. ed. England: Wiley, 2009.

DIAS, G. O. C. *et al.* Alkaloids from *Melochia chamaedrys*. **Planta Medica**, v. 73, n. 3, p. 289-292, mar. 2007.

FARJADO, V.; ARAYA, M.; CUADRA, P.; OYARZUN, A.; GALLARDO, A.; CUETO, M.; DIAS-MARRERO, A. R.; DARIAS, J.; VILLARROEL, L.; A'LVARES, C. A.; MORA-PEREZ, Y.; JOSEPH-NATHAN, P. Pronuciferine N-oxide, a proaporphine N-oxide alkaloid from *Berberis celetioides*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 7, p. 1355-1356, fev. 2009.

FOGLIO, M.A et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. In: Construindo a História dos Produtos Naturais. **MultiCiência**, out. 2006.

GIULIETTI, A. M. *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, jul. 2005

JADULCO, R. C. *et al.* 4-Quinolone Alkaloids From *Melochia Odorata*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 183–187, jan. 2014.

JANG, J. Y. *et al.* Control of root-knot nematodes using *Waltheria indica* producing 4-quinolone alkaloids. **Society of Chemical Industry**, v. 75, p. 2264-2270, jan. 2019.

KLEIN, T. *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241- 248, mar. 2009.

MONTEILLIER, A. *et al.* Cancer chemopreventive activity of compounds isolated from *Waltheria indica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 214–225, 2017.

NETO, L. G.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, abr. 2007.

KASAKOVA, D. M.; BESSANOVA, I. A.; YUNOSOV, S. Y. Components of *Haploidium obtusifolium*. *Khim. Prir. Soedin*, v. 5, p. 635 – 636, 1984.

REFLORA. ***Waltheria indica* L.** [S. l], 2020. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB136634>. Acesso em: 23 mai. 2021

REZENDE, F. M. *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: BOTÂNICA NO INVERNO, 6., 2016, São Paulo. **Capítulos** [...]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. p. 93-104.

SAUNDERS, J. G. Resurrection of the Maui endemic *Waltheria pyrolifolia* (Sterculiaceae, Hermannieae). Buenos Aires: **Darwiniana**, v. 49, n. 1, p. 76-85, fev. 2011.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: **UFRGS**, 2007. 1104 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine strategy 2002–2005**. Geneva, 2002. Disponível em <<https://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/>>. Acesso em: 01 de jun. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine strategy 2014–2023**. Geneva, 2013. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/>. Acesso em: 01 de jun. 2020.

ZONGO, F. *et al.* Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 14-26, abr. 2013.