

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA RECURSOS
AMAZÔNICOS

ÍVINA THAYNÁ MIRANDA TRINDADE

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
Aspidosperma excelsum Benth

ITACOATIARA-AM

2024

ÍVINA THAYNÁ MIRANDA TRINDADE

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
Aspidosperma excelsum Benth

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, na linha de pesquisa: Prospecção química, biológica e desenvolvimento de substâncias bioativas.

Orientadora: Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo

Coorientador: Prof. Dr. Geone Maia Corrêa.

ITACOATIARA-AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T833e Trindade, Ívina Thayná Miranda
Estudo químico e avaliação das propriedades biológicas de
Aspidosperma excelsum Benth / Ívina Thayná Miranda Trindade .
2024
71 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dominique Fernandes de Moura do Carmo
Coorientador: Geone Maia Corrêa
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Apocynaceae. 2. Carapanaúba. 3. Composição. 4. Atividades
biológicas. I. Carmo, Dominique Fernandes de Moura do. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título



ÍVINA THAYNÁ MIRANDA TRINDADE

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE *Aspidosperma excelsum*
Benth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado(a) em 31.10.24.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA DO CARMO

Data: 19/11/2024 11:32:10-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo (Presidente da Banca)

Documento assinado digitalmente



JEAN MICHEL DOS SANTOS MENEZES

Data: 19/11/2024 12:03:42-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jean Michel dos Santos Menezes

Documento assinado digitalmente



BRUNA RIBEIRO DE LIMA

Data: 24/11/2024 21:33:58-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Bruna Ribeiro de Lima

*A minha família, em especial aos meus pais Raimunda Ferreira de
Miranda e Daniel Borges Trindade.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter me permitido sonhar e por abrir portas para que esses sonhos se concretizem.

Aos meus pais, Raimunda Ferreira de Miranda e Daniel Borges Trindade, por todo apoio, carinho e compreensão. Obrigada por investirem tudo o que tinham na nossa educação.

Aos meus irmãos, Kellem Osaki, Fábio Trindade, Janaína Trindade e Yara Trindade, por todo os momentos compartilhados durante os meus 26 anos de vida. O apoio de vocês nessa jornada foi de extrema importância.

Aos meus sobrinhos, Fábio Wenckerson, Hemilly, Daniel, Gabriel, Davi e Luís, por todos os momentos compartilhados.

Ao meu esposo, Marcelo Cardoso de Araújo, pelo amor, carinho e incentivo. Sei que suas palavras e atitudes me fizeram ter forças para continuar a graduação e agora a pós-graduação.

A Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, por viabilizar a realização deste curso para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos.

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo, pela paciência, dedicação e ensinamentos. Agradeço pela confiança ao longo desses seis anos, desde o PIBIC até o presente, por todo o empenho dedicado a cada aluno que orientou, pelas valiosas oportunidades oferecidas e por cada palavra de incentivo.

Ao Prof. Dr. Geone Maia Corrêa, pela orientação, contribuição, incentivo e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Felipe de Souza Araújo, da Central Analítica, por sempre reservar um tempo para nos receber e auxiliar.

Aos Responsáveis do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB), Central Analítica da UFAM, pela disponibilidade em realizar as análises.

Ao Instituto Gonçalo Moniz (FioCruz/BA), em especial ao Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira e orientandas do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia - LETI – recepção e colaboração no ensaio antimalárico e citotóxico.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), especialmente o Prof. Dr. João Vicente de Souza e ao Laboratório de Microbiologia pela colaboração.

A TAE Sulcimilena Mady Flores, por todo auxílio e paciência durante esses anos de desenvolvimento de pesquisa. Jamais esquecerei as inúmeras vezes em que percorreu os laboratórios para nos apoiar na execução dos experimentos.

Aos meus companheiros de Laboratório, Aniele Neves, Vitor Hugo, José Douglas, Celine Menezes, Kácia Hellem, Joysse Mara e Valéria, por todo auxílio e ensinamento. Não esquecerei os momentos felizes que vivenciamos juntos.

As minhas amigas de mestrado Rafaela Rolim da Silva e Josiele Viana Gomes, pelo auxílio e compreensão durante esses anos. Com certeza os dias no laboratório e as viagens foram mais alegres quando estávamos juntas. A amizade de vocês foi essencial nessa etapa e por isso sou grata por cada momento, conselho, risada e parada para o café no fim da tarde.

Ao meu amigo, Everton Martins da Silva, que comprimiu o combinado, fomos uma dupla desde que passamos na seleção. Obrigada pela amizade, ajuda, colaboração e troca de conhecimentos durante as disciplinas.

As minhas amigas, Fabíola Pinto Muniz, Edinelza Martins de Oliveria, Cristiane Gama Fernandes e Evelyn Suamy Moreira da Paixão, pela amizade desde a graduação. Sou grata pelo incentivo e por muitas vezes ouvirem.

A CAPES e a FAPEAM, pelo suporte financeiro e material, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

RESUMO

Espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) são reconhecidas por sua quantidade de alcaloides indólicos e seu uso popular no tratamento de doenças como leishmaniose, malária, diabetes, entre outras. Dentre as 68 espécies do gênero catalogada no Brasil, a espécie *Aspidosperma excelsum*, conhecida como Caparanaúba, é constantemente comercializada em feiras populares devido suas propriedades medicinais. Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar a composição química dos extratos de uma amostra comercial das cascas de *A. excelsum* e determinar a atividade antioxidante, antimicrobiana e antimalárica. Os extratos foram obtidos a partir da suspensão do material vegetal em solventes com ordem crescente de polaridade. As amostras foram submetidas a uma análise fitoquímica preliminar, assim como a métodos cromatográficos clássicos, espectrométricos e espectroscópicos (Espectrômetro de massas e Ressonância Magnética Nuclear). Os extratos foram avaliados quanto a sua ação antioxidante, frente aos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e no potencial de redução do íon ferro (FRAP), e antimicrobiana sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, através da técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A atividade antimalárica foi avaliada por meio de microteste *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum*, utilizando a linhagem 3D7 (sensível a cloroquina) e a citotoxicidade frente a linhagem de macrófagos murinos J774. Na triagem fitoquímica preliminar foram identificadas as classes de metabólitos alcaloides, antronas, triterpenos e esteroides. O fracionamento dos extratos resultou no isolamento e identificação dos alcaloides indólicos carapanaubina e *O*-Acetiloiimbina, e por meio do estudo dos padrões de fragmentação dos extratos brutos, foram identificados três alcaloides indólicos, a espruceanumina B, 10-metóxidiidrocorinanteol e 11- metoxiioimbina, além dos ácidos 2-hidroxi-3-*O*- β -D-glicopiranosilo-benzóico, 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico e Quínico. No que se refere ao estudo biológico, o extrato hexânico apresentou ação moderada, com concentração inibitória mínima (CIM) de 400 μ g/mL, e os demais extratos obtiveram atividade fraca, com CIM de 1600 μ g/mL, frente a *C. parapsilosis*. Todos os extratos apresentaram atividade antifúngica fraca sobre *C. albicans* e demonstraram ser inativos frente a todas as bactérias nas diluições testadas. Todos os extratos analisados demonstraram pouco conteúdo de fenólicos totais, com valores entre 31,25 a 138,06 $\pm$ 0,9 mg GAE g⁻¹. O potencial antioxidante, frente aos radicais testados, foi expresso em micromolares de equivalente de Trolox (μ M TE). Relativo à avaliação frente o radical de ABTS^{•+}, o extrato hexânico foi inativo, porém os extratos clorofórmicos, acetato de etila e metanólico, apresentaram valores médios relativamente elevados, quando comparados com o padrão Trolox, na faixa entre 500 a 1000 μ M, com valores entre 801,88 $\pm$ 42,22 e 936,33 $\pm$ 61,28 μ M TE. Sobre o radical DPPH[•], os extratos demonstraram baixo poder antioxidante. As amostras EC-Aex e EA-Aex, apresentaram maior poder de redução do ferro com valores de 841,11 $\pm$ 0,016 e 816,67 $\pm$ 0,023 μ M Fe²⁺/g, respectivamente. Quanto a atividade antimalárica, as amostras EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex, foram ativas frente a linhagem 3D7 de *P. falciparum*, apresentando percentual de inibição de 98, 97,5 e 83%. Os CI₅₀ das amostras variaram entre 10 $\pm$ 2,1 ng/mL a 25 $\pm$ 10 ng/mL. Os extratos EC-Aex e EA-Aex apresentam eficácia antimalárica significativa contra *P. falciparum*, com concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) de 25 $\pm$ 2,8 μ g/mL e 78 $\pm$ 20 μ g/mL. O extrato hexânico, foi inativo frente a *P. falciparum*. Os resultados obtidos demonstram que estudos subsequentes com *A. excelsum* são promissores, a fim de encontrar compostos com ações farmacológicas, uma vez que esta espécie apresentou atividades nos ensaios realizados, além de contribuir com os conhecimentos tradicionais.

Palavras-chaves: Apocynaceae; Carapanaúba; Composição; Atividades biológicas.

ABSTRACT

Species of the genus *Aspidosperma* (Apocynaceae) are recognized for their quantity of indole alkaloids and their popular use in the treatment of diseases such as leishmaniasis, malaria, diabetes, among others. Among the 68 species of the genus cataloged in Brazil, the species *Aspidosperma excelsum*, known as Caparanauba, is constantly sold in popular fairs due to its medicinal properties. In this sense, the present study aimed to evaluate the chemical composition of the extracts of a commercial sample of the bark of *A. excelsum* and to determine the antioxidant, antimicrobial and antimalarial activity. The extracts were obtained from the suspension of the plant material in solvents with increasing order of polarity. The samples were subjected to a preliminary phytochemical analysis, as well as to classical chromatographic, spectrometric and spectroscopic methods (mass spectrometer and nuclear magnetic resonance). The extracts were evaluated for their antioxidant action against DPPH[•], ABTS^{•+} radicals and iron ion reduction potential (FRAP), and antimicrobial action against strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, through the broth microdilution technique to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The antimalarial activity was evaluated by in vitro microtest against *Plasmodium falciparum*, using the 3D7 strain (sensitive to chloroquine) and the cytotoxicity against the murine macrophage strain J774. In the preliminary phytochemical screening, the following classes of metabolites were identified: alkaloids, anthrones, triterpenes and steroids. The fractionation of the extracts resulted in the isolation and identification of the indole alkaloids carapanaubine and *O*-acetylhimbine, and through the study of the fragmentation patterns of the crude extracts, three indole alkaloids were identified, spruceanumine B, 10-methoxydihydrocorinanteol and 11-methoxyhimbine, in addition to 2-hydroxy-3- β -D-glucopyranosyloxy-benzoic, 9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic and quinic acids. Regarding the biological study, the hexane extract showed moderate action, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 400 $\mu\text{g/mL}$, and the other extracts obtained weak activity, with MIC of 1600 $\mu\text{g/mL}$, against *C. parapsilosis*. All extracts showed weak antifungal activity against *C. albicans* and were inactive against all bacteria in the dilutions tested. All extracts analyzed showed low total phenolic content, with values ranging from 31.25 to $138.06 \pm 0.9 \text{ mg GAE g}^{-1}$. The antioxidant potential against the tested radicals was expressed in micromolar Trolox equivalents ($\mu\text{M TE}$). Regarding the evaluation against the ABTS^{•+} radical, the hexane extract was inactive, but the chloroform, ethyl acetate and methanol extracts showed relatively high mean values when compared to the Trolox standard, in the range between 500 and 1000 μM , with values between 801.88 ± 42.22 and $936.33 \pm 61.28 \mu\text{M TE}$. Regarding the DPPH[•] radical, the extracts demonstrated low antioxidant power. The EC-Aex and EA-Aex samples showed greater iron reduction power with values of 841.11 ± 0.016 and $816.67 \pm 0.023 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, respectively. Regarding antimalarial activity, samples EC-Aex, EA-Aex and EM-Aex were active against the 3D7 strain of *P. falciparum*, presenting inhibition percentages of 98, 97.5 and 83%. The IC₅₀ of the samples ranged from $10 \pm 2.1 \text{ ng/mL}$ to $25 \pm 10 \text{ ng/mL}$. The EC-Aex and EA-Aex extracts showed significant antimalarial efficacy against *P. falciparum*, with a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of $25 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$ and $78 \pm 20 \mu\text{g/mL}$. The hexane extract was inactive against *P. falciparum*. The results obtained demonstrate that subsequent studies with *A. excelsum* are promising in order to find compounds with pharmacological actions, since this species presented activities in the tests performed, in addition to contributing to traditional knowledge.

Keywords: Apocynaceae. Carapanaua; Composition; Biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registros de Apocynaceae no Brasil.....	14
Figura 2 - Núcleo indol característico dos Alcaloides indólicos	14
Figura 3 - Alcaloides indólicos isolados de espécies de <i>Aspidosperma</i> . (A) Aspidospermina. (B) Quebrachamina. (C) Aspidocarpina (D) Elipticina	17
Figura 4 - Flavonoides isolados de <i>Aspidosperma</i> . (A) quercetina. (B) Isorramnetina. (C) Isorramnetina-3-O-ramnosilglicosídeo. (D) Isorramnetina-3-O-ramnosildiglicosídeo. (E) Quercetina-3-O-ramnosilglicosídeo. (F) Quercetina-3-O-xilosilgalactosídeo. (G) Quercetina-3-O-ramnosildiglicosídeo. (H) Quercetina-3-O-xilosilgalactosilglicosídeo. (I) Campferol-3-O-ramnosilglicosídeo. (J) Campferol-3-O-ramnosildiglicosídeo	18
Figura 5 - Espécie <i>Aspidosperma excelsum</i> . (A-B) Tronco. (C) Folhas.	19
Figura 6 - Distribuição da espécie <i>Aspidosperma excelsum</i>	19
Figura 7 - Substâncias isoladas das cascas da raiz de <i>A. excelsum</i> . (A) 11-Metoxitubotaiwina. (B) Orolifuanina A. (C) Tetraidro-secamina. (D) 16-Desmetoxicarboniltetraidro-secamina. (E) 16-Hidroxitetraidro-secamina. (F) 16-Hidroxi,16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina. (G) Didesmetoxicarboniltetraidrosecamina. (H) Compactinervina (I) N-acetilaspidospermidina. (J) O-metilaspidospermina. (K) 3 α -Aricina. (L) Ioimbina. (M) O-acetilioimbina. (N) Excelsinidina	22
Figura 8 - Alcaloides isolados das cascas dos caules de <i>A. excelsum</i> . (A) Isoreserpilina. (B) Reserpilina. (C) 3 α , 20 β -corinan-17-ol. (D) 10-metoxi- corinan-17-ol. (E) 10-metoxi-15S,16S-E-isositsiriquina. (F) N-óxido-15S,16S-E-isositsiriquina. (G) 3 α ,15 α -10-metoxi-geissosquizol. (H) E-15S,16S-isositsiriquina. (I) Substância G - 2FBC-4-A	23
Figura 9 – Fracionamento Cromatográfico de EC-Aex.....	27
Figura 10 - Disposição das amostras, controle positivo e negativo na placa Elisa	29
Figura 11 - Espectro MS/MS obtido para a substância espruceanumina B	35
Figura 12 - Proposta de fragmentação do íon m/z 439 para a formação dos íons m/z 379 e 351	35
Figura 13 - Espectro MS/MS obtido para a substância 10-metóxidiidrocorinanteol	36

Figura 14 - Alcaloide 10-metóxidihidrocorinanteol	36
Figura 15 - Espectro MS/MS para a substância 11-metoxiioimbina	37
Figura 16 - Proposta de fragmentação do íon m/z 385 para a formação dos íons m/z 174 e 159	37
Figura 17 – Espectro MS/MS obtido para o Ácido 2-hidroxi-3-O-β-D-glicopiranosiloxi-benzóico.....	38
Figura 18 - Proposta de fragmentação do íon m/z 315 [M-H] - para a formação dos picos m/z 153 e 109	38
Figura 19 - Espectro MS/MS para o Ácido 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico	39
Figura 20 - Estrutura do Ácido 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico	39
Figura 21 - Espectro MS/MS do Ácido Quínico	40
Figura 22 - Proposta de fragmentação do íon m/z 191 para a formação dos picos m/z 173, 127, 109 e 95	40
Figura 23 - Proposta de Fragmentação da amostra Fr2ClAex1-4.6.1	41
Figura 24 - Estrutura proposta para o alcaloide carapanaubina segundo os dados de RMN de H1 da amostra Fr2ClAex1-4.6.1	44
Figura 25 - Proposta de fragmentação para a obtenção do íon m/z 365	44
Figura 26 - Estrutura do alcaloide <i>O</i> -Acetilioimbina	46
Figura 27 - Curva padrão de Trolox (Método DPPH*)	49
Figura 28 - Curva de Calibração do Trolox (Método ABTS ^{•+})	49
Figura 29 - Redução do Ferro presente no Complexo [Fe (III) (TPTZ) ₂] ³⁺	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação botânica da família Apocynaceae, segundo Rapini (2012), Sennblad, Endress e Breme (1998)	13
Quadro 2 - Algumas substâncias bioativas presentes na família Apocynaceae	14
Quadro 3 - Espécies de <i>Aspidosperma</i> agrupados em séries	15
Quadro 4 - Uso etnofarmacológico de <i>A. excelsum</i>	20
Quadro 5 - Condições estabelecidas para a análise fitoquímica preliminar.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento dos extratos brutos.....	32
Tabela 2 - Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos das cascas de <i>A. excelsum</i> para diferentes classes de metabólitos.....	33
Tabela 3 - Substâncias identificadas através da APCI-MS	34
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H da substância Fr2ClAex1-4.6.1	43
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (500,13 MHz, Clorofórmio-d) para a fração CFr1ClAex52, comparados com os valores descritos na literatura para O-Acetiloinbina	45
Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de <i>A. excelsum</i>	47
Tabela 7 - Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{++}$ e teor de fenólicos totais de <i>A. excelsum</i>	48
Tabela 8 - Atividade antimalárica, IC $_{50}$ e CC $_{50}$ dos extratos	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Família Apocynaceae	12
2.2	Gênero <i>Aspidosperma</i>	15
2.3	A espécie <i>Aspidosperma excelsum</i> Benth	19
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo Geral	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Material vegetal e preparação dos extratos.....	25
4.2	Análise Química	25
4.2.1	Prospecção Fitoquímica	25
4.2.2	Fracionamento Cromatográfico.....	26
4.2.3	Espectrometria de Massas (APCI-MS)	27
4.2.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	28
4.3	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana.....	28
4.4	Teste de Atividade Antioxidante e Fenólicos Totais.....	29
4.4.1	Determinação do Teor de Fenólicos Totais (FT)	29
4.4.2	Avaliação <i>in vitro</i> da Capacidade Antioxidante.....	29
4.5	Avaliação da atividade antiplasmodica <i>in vitro</i> frente a cepas do <i>Plasmodium falciparum</i>	30
4.6	Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade em macrófagos.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1	Rendimento dos extratos das cascas de <i>A. excelsum</i>	32
5.2	Análise química	32
5.2.1	Triagem Fitoquímica dos extratos	32
5.2.2	Constituintes Químicos identificados por APCI-MS	34

5.2.3	Caracterização estrutural da amostra Fr2ClAex 1-4.6.1.....	40
5.2.4	Caracterização estrutural da amostra CFr1ClAex52	44
5.3	Atividade antimicrobiana	46
5.4	Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante	48
5.5	Atividade antimalárica e citotóxica	52
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO A.....	68
	ANEXO B	69
	ANEXO C	70
	ANEXO D.....	71

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são aquelas que possuem ação terapêutica no organismo do ser humano e que podem ser cultivadas ou não para este fim (Brasil, 2009; Ferreira, 2016). Estas espécies vegetais são amplamente utilizadas por comunidades tradicionais para combater doenças. No entanto, a comercialização desses recursos demonstra que o saber acerca de suas propriedades biológicas tem sido incorporado também nas comunidades urbanas (Alves e Rosa, 2007). Assim, estes produtos podem ser encontrados por seus consumidores, tanto na natureza quanto em feiras, comércios e lojas, *in natura* ou industrializado (Alves, 2008).

O amplo emprego popular de plantas medicinais tem incentivado uma maior investigação dessas espécies. Isso decorre principalmente do uso empírico, muitas vezes sem respaldo científico quanto ao seu efeito e segurança. O estudo químico desses fitoterápicos, se faz necessário devido a não prescrição dos mesmos por profissionais capacitados, o que torna este recurso um potencial risco a saúde em decorrência da possível presença de substâncias tóxicas (Argenta *et al.*, 2011).

Vieira e Fernandes (2021), ao investigar dados sobre efeitos tóxicos de plantas medicinais comercializadas *in natura* no Município de São Luís/MA, constatou que as espécies popularmente conhecidas babosa, mastruz, hortelã, boldo, erva-doce, quebra-pedra, arruda, malva-santa, manjerição e pata-de-vaca, são tóxicas quando consumidas em elevadas quantidades, mas grande parte da população que faz uso dessas espécies desconhece esses efeitos. Não há um respaldo científico, quanto as ações biológicas e quais as dosagens necessárias para este fim.

As propriedades fitoterápicas das espécies medicinais estão associadas aos metabólitos secundários presentes nas plantas. Estes compostos naturais, de perfil variado, além de as proteger de estresses em decorrência a efeitos bióticos e abióticos, possui diversas aplicações farmacológicas e nutricionais (Pacheco; Amorim, 2020). Assim, estas espécies representam importantes fontes de compostos bioativos, indicando que as mesmas possuem enorme potencial para a descoberta de novos fitoterápicos (Foglio *et al.*, 2006).

Em meio a vasta biodiversidade presente na Região amazônica, espécies da família Apocynaceae Juss. destacam-se economicamente devido à qualidade de sua madeira e produção de látex, e por ser uma grande fonte de princípios ativos (Oliveira *et al.*, 2009; Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002). Vários membros deste táxon apresentam propriedades medicinais e são importantes na biotecnologia para a produção de compostos de interesse terapêutico (Bhadane; Patil; Maheshwari; Patil, 2018).

A família Apocynaceae, é constituída por 424 gêneros e 4.600 espécies, predominantes em regiões tropicais e subtropicais (Bhadane *et al.*, 2018). Neste táxon destacam-se os gêneros *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Rauwolfia*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancornia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Himatanthus* (*Plumeria*) e *Wrightia* (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

As espécies de Apocynaceae produzem vários compostos químicos, pertencentes principalmente as classes dos alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, glicosídeos, lactona e hidrocarbonetos, estes metabólitos são de grande interesse medicinal (Bhadani *et al.*, 2018). São utilizados, por exemplo, como fonte terapêutica, os alcaloides reserpina, ajmalicina, ajmalina, e serpentina, extraídos de *Rauwolfia serpentina*, para tratar hipertensão e arritmias cardíacas (Arora; Madan, 1956; Ciofalo; Roberts, 1966).

O gênero *Aspidosperma* Mart & Zucc. é um dos mais representativos da família, com cerca de 300 espécies (Almeida *et al.*, 2019). No Brasil são registradas 68 espécies, as quais são conhecidas principalmente por perobas, guatambus, pau-pereiro, caparanaúba, pequiá, quina, taroba e amargoso (Lorenzi, 1998; Castello; Pereira; Simões, Koch, 2024). Fitoquimicamente, caracteriza-se pela predominância de alcaloides do tipo indólicos de grande diversidade estrutural e promissoras atividades farmacológicas (Lopes, 2019).

Na medicina popular regional, a infusão das folhas ou caules de espécies desse gênero são constantemente utilizadas para o tratamento da leishmaniose, malária, inflamação uterina e ovário, diabetes, doenças do fígado, problemas estomacais, câncer, febre e reumatismo (Pereira *et al.*, 2007; Almeida, *et al.*, 2019). Diversas atividades atribuídas as *Aspidosperma* já foram atestadas por meio de testes biológicos, tais como o efeito antitumoral, antiplasmódico, anti-hipertensivo (Henrique; Nunomura; Pohlit, 2010; Coutinho *et al.*, 2013; Furtado *et al.*, 2017).

A literatura evidencia ainda sua ação antimicrobiana, incluindo as espécies *A. marcgravianum*, *A. desmanthum* e *A. nitidum*, que demonstraram este efeito frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com dados da literatura, o extrato metabólico de *A. marcgravianum* possui concentração inibitória mínima (CIM) de 3,12 µg/mL sobre *S. aureus*, 12,5 µg/mL para *S. epidermidis* e *E. coli*, e 50 µg/mL para *P. aeruginosa*; os extratos aquosos da *A. desmanthum* e *A. nitidum* frente a *S. epidermidis* e *E. coli* possuem CIM de 50 µg/mL; Frente a *S. aureus*, os extratos metanólicos de *A. desmanthum* e *A. nitidum* apresentam CIM de 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, e ambas sobre *S. epidermidis* e *E. coli* possuem CIM de 50 µg/mL (Araújo, 2022).

Aspidosperma excelsum Benth., cujo dados taxonômicos apontam *A. marcgravianum* Woodson e *A. nitidum* Benth. ex Müll. Arg como sinônimos (IPNI, 2024), está entre as espécies de *Aspidosperma* mais presentes na região amazônica. É conhecida como caparanaúba, carapanúba-preta, sapopema e sapopemba e apresenta grande aplicações na medicina popular (Trindade *et al.*, 2016). É utilizada como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamações, febres, diabetes, contra câncer e antimalárica, principalmente (Perez, 2002). Estas propriedades terapêuticas são constante associadas aos alcaloides indólicos, dos quais relatam-se que 22 compostos desta classe já foram isolados (Pereira *et al.*, 2007). Dos extratos obtidos das cascas de *A. excelsum*, já foram isoladas as substâncias ioimbina, *O*-acetilioimbina, excelsinina, *O*-acetilexcelsinina e 16-epi-excelsinina (Benoin; Burnell; Riedin, 1967; Burnell; Nguyen-Thi-Sen, 1971). Esta espécie representa uma importante opção terapêutica adotada pela população e por isso este recurso natural é constantemente comercializado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Apocynaceae

Apocynaceae Juss. pertence à ordem Gentianales (APG IV, 2016) e abrange 424 gêneros e 4.600 espécies (Bhadane *et al.*, 2018), sendo uma das famílias mais extensas e emblemáticas das angiospermas (Melo; Oriel; Lucena, 2021). É subdividida em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (Endress; Bruyns, 2000). O Quadro 1 apresenta uma classificação botânica resumida de Apocynaceae, destacando algumas tribos e gêneros presentes em cada subfamília.

No Brasil, ocorrem somente as subfamílias Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae. Há registros de 103 gêneros, 1.012 espécies, 13 subespécies e 26 variedades nativas de Apocynaceae (Apocynaceae *in* Flora e Funga do Brasil, 2024), distribuídas por todas as cinco regiões do país (Figura 1), em grande parte dos estados, com ocorrência confirmada nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Santos, 2016).

Esta família botânica é composta por indivíduos com diferentes formas de vida, como árvores, arbustos, subarbustos, lianas e ervas, distribuídos principalmente em zonas tropicais e subtropicais, com alguns representantes encontrados em zonas temperadas (Judd *et al.*, 2009; Souza; Lorenzi, 2019; Melo; Oriel; Lucena, 2021). De modo geral, as características diagnósticas das Apocynaceae incluem folhas inteiras, opostas, alternadas ou verticiladas, flores pentâmeras com estiletos unidos no ápice, frutos bifoliculares, sementes carnosas e a presença de látex (Rapini, 2000).

Uma parcela substancial das espécies dessa família é venenosa, enquanto outra é amplamente utilizada para fins medicinais e ornamentais. Compostos obtidos de espécies dos gêneros *Catharanthus*, *Rauvolfia* e *Strophantus* por exemplo, são empregados, respectivamente, no combate à leucemia, no tratamento da hipertensão e doenças cardíacas. Com propósitos ornamentais, destacam-se as espécies dos gêneros *Allamanda*, *Amsonia*, *Asclepias*, *Carissa*, *Catharanthus*, *Hoya*, *Nerium*, *Plumeria*, *Stapelia*, *Trachelospermum* e *Vinca*. Outras espécies, fornecem madeira de alta qualidade (Judd *et al.*, 2009).

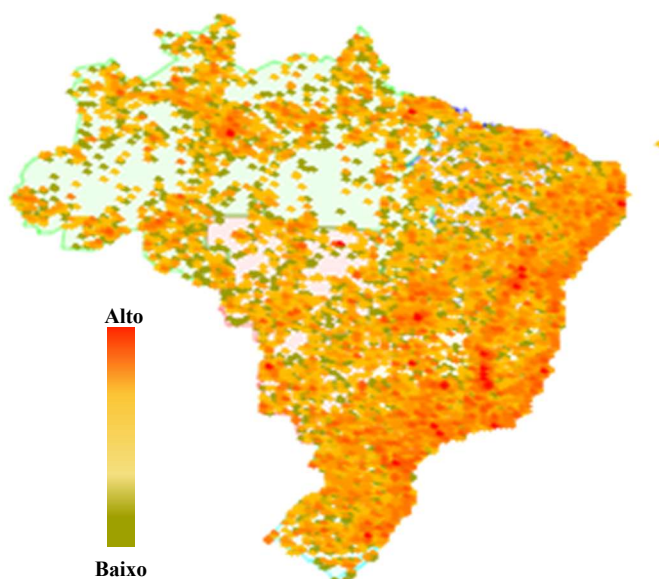
A abundância de metabólitos secundários nas Apocynaceae, como iridoides, glicosídeos cardioativos e alcaloides, principalmente os alcaloides indólicos (Figura 2), torna essa família uma das mais importantes fontes de compostos bioativos com aplicação na medicina moderna (Schripsema *et al.*, 2004). Uma grande diversidade de substâncias tem sido isolada de espécies pertencentes a essa família, muitas das quais são usadas como referência para o

desenvolvimento de novas drogas e, conseqüentemente, fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica (Quadro 2) (Lopes, 2019).

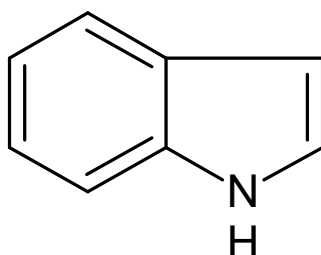
Quadro 1 - Classificação botânica da família Apocynaceae, segundo Rapini (2012), Sennblad, Endress e Breme (1998)

Subfamília	Tribo	Gênero
Rauvolfioideae	Carissae	<i>Carissa, Acokanthera</i>
	Willughbeieae	<i>Parahancornia, Hancornia, Pacouria, Lacmellea, Couma</i>
	Plumerieae	<i>Thevetia, Skythantus, Himatanthus, Allamanda</i>
	Alyxieae	<i>Condylocarpon, Alyxia</i>
	Tabernaemontaneae	<i>Macoubea, Ambelania, Rhigospira, Molongum, Spongiosperma, Neocouma, Mucoa, Tabernaemontana</i>
	Vinceae	<i>Laxoplumeria, Rauvolfia,</i>
	Aspidospermeae	<i>Geissospermum, Vallesia, Microplumeria, Aspidosperma</i>
	Alstoniae	<i>Gonioma, Tonduzia, Blaberopus, Vinca, Himatanthus, Stephanostegia, Strepeliopsis, Winchia, Diplorhynchus, Rhazya Catharanthus, Holarrhena, Dyera Plectaneia Paladelpa, Amsonia, Craspidospermum, Haplophyton.</i>
Apocynoideae	Echiteae	<i>Temnadenia, Peltastes, Rhodocalyx, Hylaea, Prestonia, Bahiella, Macropharynx</i>
	Odontadenieae	<i>Stipecoma, Secundatia, Odontadenia</i>
	Mesechiteae	<i>Mandevilla, Mesechites, Forsteronia</i>
	Apocyneae	<i>Apocynum</i>
	Malouetieae	<i>Galactaphora, Malouetia,</i>
	Nerieae	<i>Kibatalia, Nerium, Vallaris, Beaumontia, Kicksia, Pottsia, Christya, Paravallaris, Roupellina, Funtumia, Strophanthus</i>
	Wrightieae	<i>Wrightia, Adenium, Stepheostema</i>
Asclepiadaceae*	Marsdenieae	<i>Marsdeia, Drega</i>
	Asclepiadeade	<i>Astephaniae, Calotropis, Asclepias, Gomphocarpus, Tylophorinae, Glossonema, Cynanchum, Metalepis, Pentacyphus, Diplolepis, Jobinia, Kerbera, Orthosia, Stenomeria, Tassadia, Funastrum. Oxypetalum, Widgrenia, Philibertia, Araujia, Macroscepis, Pseudibatia, Fischeria, Gonolobus, Gyrostelma, Matelea, Schubertia, Blepharodon, Barjonia, Ditassa, Hemipogon, Hypolobus, Metastelma, Minaria, Nautonia, Nephradenia, Macroditassa, Peplonia, Petalostelma</i>

Fonte: Autor (2024). *Clado formado por Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae

Figura 1 - Registros de Apocynaceae no Brasil

Fonte: <http://www.splink.org.br/>

Figura 2 - Núcleo indol característico dos Alcaloides indólicos

Fonte: Autor (2024)

Quadro 2 - Algumas substâncias bioativas presentes na família Apocynaceae

Substância	Aplicação
Alstonina	Antipsicótica, tratamento de câncer de próstata
Reserpina	Antidepressivo, antipsicótica
Aspidoscarpina	Antimalárico
Elipticina	Anticancerígeno, antimalárico
Olivacina	Atividade antiproliferativa contra células HCT-116 e HL-60 antimalárico
Aricina	Tratamento da dor na neuropatia periférica antimalárico
Tchibangensina	Antiproliferativo, anti-inflamatório e antifúngicos
Tetraidrousambarensina	Antimalárico

Fonte: Adaptado de Lopes (2019)

2.2 Gênero *Aspidosperma*

O gênero *Aspidosperma* Mart. & Zucc. pertence à classe Magnoliopsida, ordem Gentianales, família Apocynaceae, subfamília Rauvolfioideae e tribo Aspidospermeae (Endress; Bruyns, 2000; Rapini, 2012). Podem ser árvores a arbustos, variando de 2 a 48m de altura. Apresenta coléteres nodais ausentes e as folhas, em geral, dispostas alternadamente, com coléteres laminares ausentes e nervuras com padrão broquidódromo ou craspedódromo. As inflorescências possuem arranjos dicásios modificados para se assemelhar a um corimbo. Outras características marcantes incluem a ausência de coléteres no cálice, a corola em formato tubular ou hipocrateriforme, o ovário súpero e apocárpico, o estilete com a extremidade fusiforme a globosa, e a presença de folículos e sementes aladas (Morokawa; Simões; Kinoshita, 2013; Pereira; Simões; Santos, 2016).

A classificação quimiotaxonômica do gênero *Aspidosperma* foi proposta por Bolzani *et al.* (1987). Com base na quimiosistemática, os autores categorizaram 48 espécies do gênero em sete séries: Rígida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobilis e Macrocarpa (Quadro 3). No entanto, há divergências quanto ao número de espécies que formam este táxon (Allorge; Poupat, 1991). Estudos mais recentes, indicam que o gênero *Aspidosperma* é um dos mais representativos da família Apocynaceae, com aproximadamente 300 espécies (Almeida *et al.*, 2019).

Quadro 3 - Espécies de *Aspidosperma* agrupados em séries

Série	Espécies
Rígida	<i>A. rigidum</i> Rusby
Nitida	<i>A. nitidum</i> Benth ex Mull. Arg., <i>A. auriculatum</i> Mgf., <i>A. excelsum</i> Benth, <i>A. spegazzinii</i> Molf. Ex Meyer, <i>A. caparanauba</i> M. Pichon, <i>A. marcgravianum</i> Woodson, <i>A. oblongum</i> A. DC., <i>A. discolor</i> A. DC., <i>A. eburneum</i> F. Allem,
Quebrachines	<i>A. chakensis</i> Spegazzini e <i>A. quebracho-blanco</i> Schlecht
Polyneura	<i>A. sessiliflorum</i> Müll.Arg., <i>A. peroba</i> Allemão ex Saldanha, <i>A. polyneuron</i> Mull-Arg, <i>A. cylindrocarpon</i> Muell.-Arg., <i>A. dispernum</i> Müll.Arg. e <i>A. cuspa</i> Blake.
Pyricolla	<i>A. quirandy</i> Hassl., <i>A. pyricollum</i> Muell-Arg., <i>A. multiflorum</i> A. DC., <i>A. pyrifolium</i> Mart., <i>A. tomentosum</i> Mart., <i>A. refractum</i> Mart., <i>A. populifolium</i> A. DC., <i>A. australe</i> Müll.-Arg., <i>A. gomesianum</i> A. DC., <i>A. olivaceum</i> Müll.-Arg., <i>A. rhombeosignatum</i> Markgr, <i>A. parvifolium</i> Mart. & Zucc., <i>A. vargasii</i> A.DC., <i>A. ulei</i> Mgf. e <i>A. subincanum</i> Mart.
Nobilis	<i>A. sandwithianum</i> Mgf., <i>A. megalocarpon</i> Müll-Arg., <i>A. melanocalyx</i> Müll.-Arg., <i>A. desmanthum</i> Benth ex. Müll.-Arg., <i>A. spruceanum</i> Benth, <i>A. fendleri</i> Woodson, <i>A. obscurinervium</i> Azembuja, <i>A. neblinae</i> Monachino, <i>A. limae</i> Woodson, <i>A. exalatum</i> Monachino e <i>A. album</i> (Vahl) R. Bent.
Macrocarpa	<i>A. verbascifolium</i> Mull-Arg, <i>A. macrocarpon</i> Mart e <i>A. duckei</i> Hub

Fonte: Autor (2024).

No Brasil, são reconhecidas 68 espécies do gênero *Aspidosperma*, popularmente chamadas como perobas, guatambu, pau-pereiro, caparanaúba, pequiá, quina, taroba e amargoso. Essas espécies estão distribuídas pelas cinco regiões, encontradas em vegetações da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Lorenzi, 1998; Castello; Pereira; Simões, Koch, 2024).

A madeira obtida das espécies de *Aspidosperma* é de qualidade devido à sua resistência e dureza, o que lhe confere um elevado valor econômico (Judd *et al.*, 2009). Além disso, estas espécies desempenham um papel significativo na medicina tradicional, sendo usadas para tratar malária, leishmaniose, problemas cardiovasculares, processos inflamatórios, febre, diabetes, problemas estomacais, entre outros (Pinto *et al.*, 2013; Dolabela *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2015; Kvist *et al.*, 2006; Agra *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2015).

Estudos fitoquímicos demonstraram que as espécies de *Aspidosperma* são quimicamente caracterizadas pela presença de alcaloide indólicos. Até 1956, apenas quatro alcaloides indólicos haviam sido identificados neste gênero. No entanto, o levantamento realizado por Pereira *et al.*, (2007), com base nos trabalhos publicados entre 1956 a 2006, revelou que foram isolados 247 compostos pertencentes a essa classe em espécies de *Aspidosperma*. A elevada ocorrência destes compostos, acrescido do uso popular destas espécies, tem despertado interesse nos investigadores em correlacionar os alcaloides isolados e as atividades terapêuticas associadas a estas espécies vegetais.

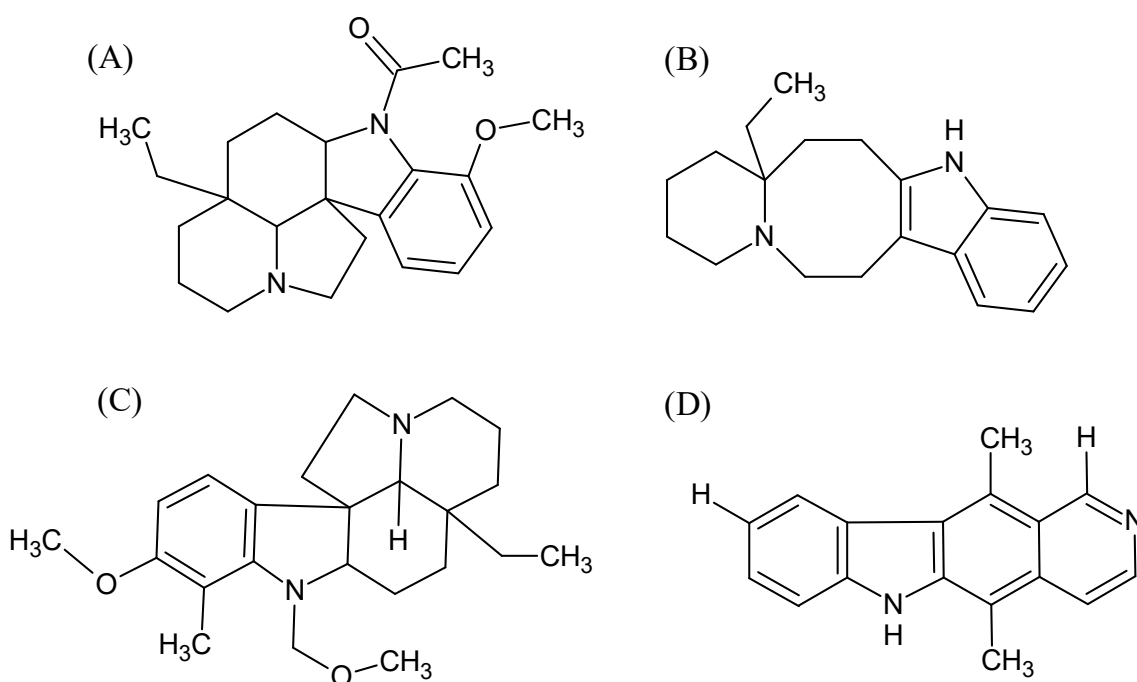
Os indolalcaloides aspidospermina (Figura 3A) e quebrachamina (Figura 3B), isolados de fontes arbóreas de *Aspidosperma* (Quebracho), foram avaliados quanto à sua capacidade de bloqueio adrenérgico em diversos tecidos urogenitais. Tais compostos demonstraram esta atividade farmacológica (Deutsch *et al.*, 1994), o que justifica o uso de espécies deste gênero no tratamento de hiperplasia prostática benigna e disfunção erétil (Silva *et al.*, 2022).

Andrade-Neto *et al.* (2007) ao investigar a atividade antimalárica dos alcaloides aspidocarpina (Figura 3C) e elipticina (Figura 3D), obtidos da casca de *Aspidosperma Vargasii* e *A. desmanthum*, respectivamente, constataram que ambos apresentaram atividades inibitórias *in vitro* frente a cepa K1 multirresistente de *Plasmodium falciparum*, com valores superiores a quinina e cloroquina.

Além de alcaloides, outras classes de compostos, apesar de pouco mencionadas, foram também detectadas em *Aspidosperma*. Messiades (2014), a partir de métodos semiquantitativos, determinou a presença das classes de polifenóis, flavonoides, saponinas e taninos em extratos hidroalcóolicos das cascas de *A. pyrifolium*.

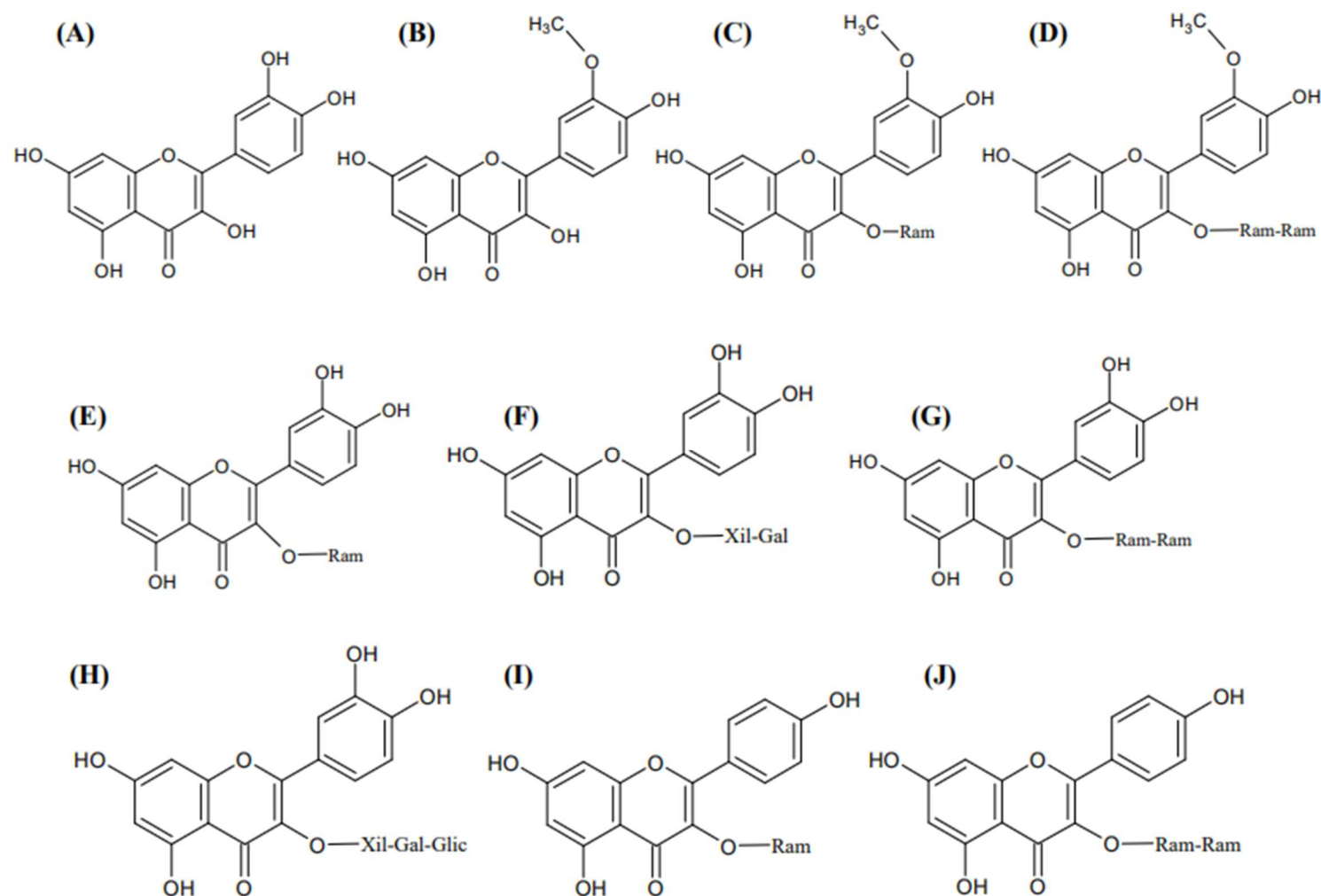
Os flavonoides, quercetina (Figura 4A) e isorramnetina (Figura 4B), foram isolados do extrato bruto hidroalcolico obtido da casca de *A. tomentosum* (Bernardo, 2012). Das folhas da espécie *A. quebracho-blanco* foram os heterosídeos (Figura 4C-J), isorramnetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo, isorramnetina-3-*O*-ramnosildiglicosídeo, quercetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo, quercetina-3-*O*-xilossilgalactosídeo, quercetina-3-*O*-ramnosildiglicosídeo, quercetina-3-*O*-xilossilgalactosilglicosídeo, campferol-3-*O*-ramnosilglicosídeo e campferol-3-*O*-ramnosildiglicosídeo (Pelloto; Del Pero, 1995).

Figura 3 - Alcaloides indólicos isolados de espécies de *Aspidosperma*. (A) Aspidospermina. (B) Quebrachamina. (C) Aspidocarpina (D) Elipticina



Fonte: Autor (2024).

Figura 4- Flavonoides isolados de *Aspidosperma*. (A) quercetina. (B) Isorramnetina. (C) Isorramnetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo. (D) Isorramnetina-3-*O*-ramnosildiglicosídeo. (E) Quercetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo. (F) Quercetina-3-*O*-xilossilgalactosídeo. (G) Quercetina-3-*O*-ramnosildiglicosídeo. (H) Quercetina-3-*O*-xilossilgalactosilglicosídeo. (I) Campferol-3-*O*-ramnosilglicosídeo. (J) Campferol-3-*O*-ramnosildiglicosídeo



Fonte: Autor (2024).

2.3 A espécie *Aspidosperma excelsum* Benth

Aspidosperma excelsum (Figura 5) é uma espécie arbórea de grande porte, com altura que varia entre 10 e 40 metros, popularmente conhecida como carapanaúba e empregada na medicina tradicional. Os galhos jovens dessa espécie são espalhados e levemente puberulentos, enquanto os ramos amadurecidos são glabros ou glabrescentes com presença de látex. As folhas de formato elíptico ou mais estreito variam de 4,5 a 12 cm de comprimento e de 2,5 a 5 cm de largura. Essa espécie pode ser encontrada em florestas úmidas e está distribuída da Costa Rica ao Brasil, e na Bolívia (Morales, 2005). Em território nacional, ocorrem somente nos estados Amazonas, Rondônia e Roraima, pertencendo ao domínio fitogeográfico da Amazônia (Figura 6) (Castello *et al.*, 2018).

Figura 5 - Espécie *Aspidosperma excelsum*. (A-B) Tronco. (C) Folhas.



Fonte: <http://www.coplants.org.taxon>

Figura 6 - Distribuição da espécie *Aspidosperma excelsum*



Fonte: http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Aspidosperma_excelsum

De acordo com a classificação quimiotaxonômica proposta por Bolzani *et al.* (1987), a espécie *A. excelsum* pertence à série nítida, assim como a *A. nitidum* e *A. marcgravianum*, que como *Macaglia excelsa*, são frequentemente consideradas sinônimas da primeira (IPNI, 2024).

O uso popular de *A. excelsum* inclui o tratamento de problemas gastrointestinais, bronquite, inflamações, febres, diabetes, câncer e como antimalárico (Perez, 2002). As aplicações etnofarmacológicas da espécie estão descritas no Quadro 4, incluindo a região associada ao uso, o tipo de material vegetal e o modo de preparo, dados obtidos por Almeida *et al.* (2018) através de levantamento bibliográfico sobre o uso de espécies de *Aspidosperma*.

Quadro 4 - Uso etnofarmacológico de *A. excelsum*

Região	Uso	Parte da Planta	Preparação / administração
Roraima, Brasil	Malária	Casca	Decocção
Manacapuru, Amazonas, Brasil	Inflamação, diabetes, fígado, alta pressão arterial, contraceptivo	Folhas, Casca	Chá, maceração
Xapuri, Acre e Pauini, Amazônia, Brasil	Malária, febre	Casca	Decocção
Comunidades Quilombola de Oriximina	Febre, enxaqueca, dor no corpo	Casca	<i>Não descrito</i>
Loreto, Nordeste de Peru	Malária, leishmamaia	Córtex	<i>Não descrito</i>

Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* (2018).

Estudos químicos de *A. excelsum* permitiram o isolamento de compostos presentes em diferentes estruturas vegetais. Da casca da raiz de *A. excelsum*, foram isolados e identificados os alcaloides: 11-Metoxitubotaiwina, Ocrofuanina A, Tetraidro-secamina, 16-Desmetoxicarboniltetraidro-secamina, 16-hidroxitetraidro-secamina, 16-hidroxi, 16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina, Didesmetoxicarboniltetraidrosecamina, compactinervina, *N*-acetilaspidospermidina, *O*-metilaspidospermina, 3 α -aricinina e *O*-aceltioimbina (Figura 7A-M), os sete primeiros com propriedades antimicrobianas (Verpoorte *et al.*, 1983). Desta mesma estrutura, Layne *et al.* (2007) isolou e determinou estruturalmente o alcalóide indólico excelsinidina (Figura 7N).

Das cascas do caule de *A. excelsum*, Lopes (2019) isolou nove substâncias (Figura 8), isoreserpilina, reserpilina, 3 α , 20 β -corinan-17-ol, 10-metoxi- corinan-17-ol, 10-metoxi-

15S,16S-E-isositsiriquina, *N*-óxido-15S,16S-E-isositsiriquina, 3 α ,15 α -10-metoxigeissosquizol, *E*-15S,16S-isositsiriquina e um outro alcaloide indolínico monoterpênico (substância G 2FBC-4-A), inédito na espécie, gênero e família. As seis primeiras substâncias apresentaram atividade antimalárica moderada frente à cepa K1 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*, com atividade citotóxica negativa dos mesmos frente à linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5).

Figura 7 - Substâncias isoladas das cascas da raiz de *A. excelsum*. (A) 11-Metoxitubotaiwina. (B) Orolifuanina A. (C) Tetraidro-secamina. (D) 16-Desmetoxicarboniltetraidro-secamina. (E) 16-Hidroxitetraidro-secamina. (F) 16-Hidroxi,16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina. (G) Didesmetoxicarboniltetraidrosecamina. (H) Compactinervina (I) *N*-acetilaspidospermidina. (J) O-metilaspidospermina. (K) 3 α -Aricina. (L) Ioimbina. (M) O-acetilioimbina. (N) Excelsinidina

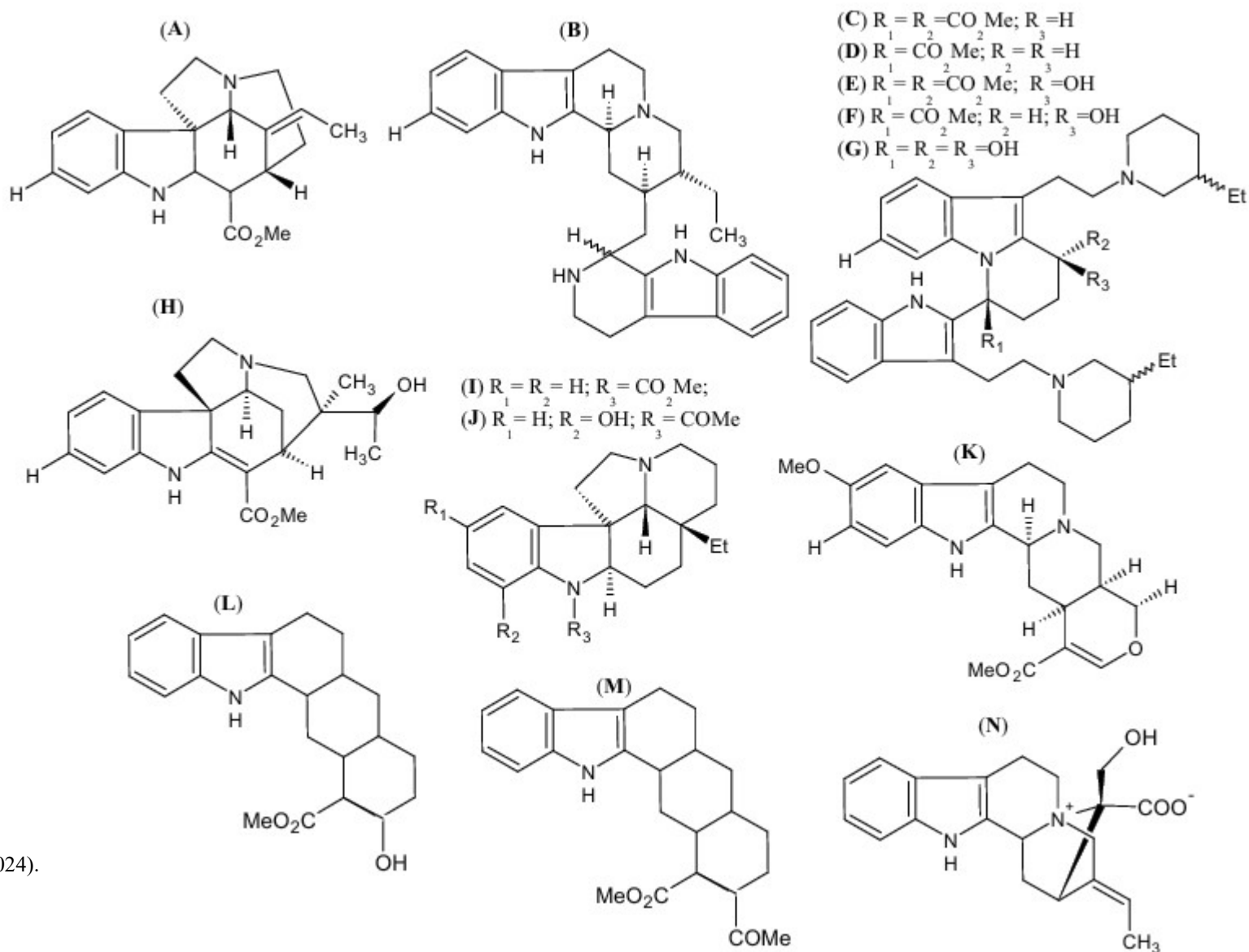
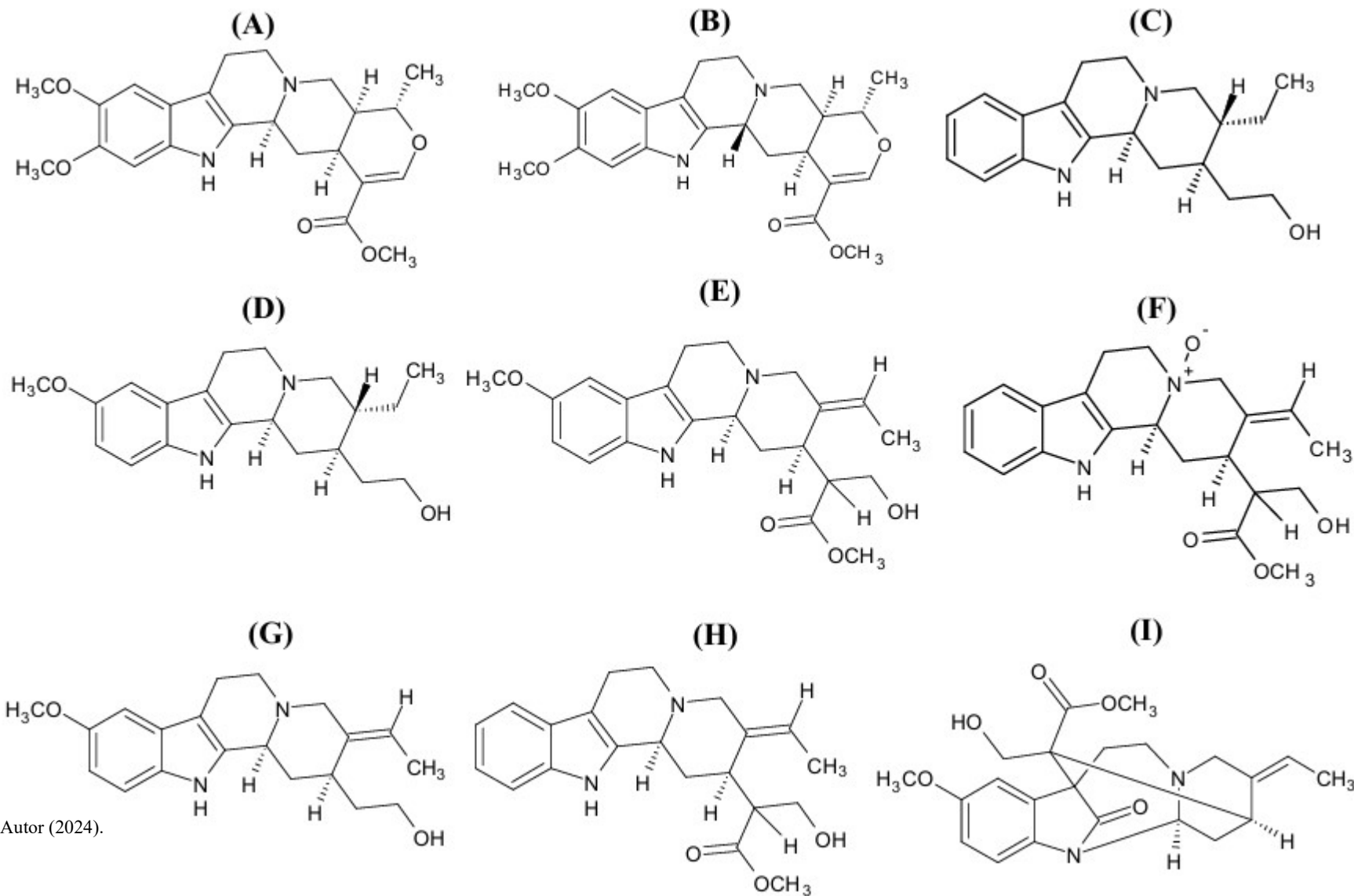


Figura 8 - Alcaloides isolados das cascas dos caules de *A. excelsum*. (A) Isoreserpilina. (B) Reserpilina. (C) 3 α , 20 β -corinan-17-ol. (D) 10-metoxi- corinan-17-ol. (E) 10-metoxi-15S,16S-E-isositsiriquina. (F) *N*-óxido-15S,16S-E-isositsiriquina. (G) 3 α ,15 α -10-metoxi-geissosquizol. (H) E-15S,16S-isositsiriquina. (I) Substância G - 2FBC-4-A.



Fonte: Autor (2024).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil químico e as atividades antimicrobiana, antioxidante, antimalárica e citotóxica dos extratos das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os principais metabólitos presentes nas cascas do caule de *Aspidosperma excelsum* Benth através da análise fitoquímica preliminar;
- Realizar o fracionamento dos extratos brutos e identificar os constituintes das frações obtidas através da técnica de APCI-MS/MS e RMN de ^1H ;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais nos extratos brutos de *A. excelsum*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelo método do sequestro dos radicais livres DPPH $\cdot$ e ABTS $^{+\cdot}$, e redução do ferro (FRAP);
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos, utilizando o método de microdiluição em caldo, frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*;
- Investigar a ação antimalárica *in vitro* e citotóxica dos extratos brutos de *A. excelsum*.

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal e preparação dos extratos

As cascas secas de *A. excelsum* (Carapanaúba) foram obtidas em comércio no município de Itacoatiara, Amazonas (3° 8' 31" Sul, 58° 26' 33" Oeste), em 17 de janeiro de 2023. Para a obtenção dos extratos brutos, 261,98g de material vegetal pulverizado foram submetidos a extrações a frio em 500 mL de solvente orgânico, por um período de 24 horas para cada solvente, a temperatura ambiente ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$). Foram utilizados os solventes: Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Metanol, totalizando um volume de 1500 mL por solvente. O filtrado foi concentrado em Rotaevaporador (FISATOM, modelo 801) sob pressão reduzida à 40°C e 40 RPM e transferido para frascos de vidro. Este processo forneceu os extratos de polaridade distintas, codificados como: hexânico (EH-Aex), clorofórmico (EC-Aex), de acetato de etila (EA-Aex) e metanólico (EM-Aex).

4.2 Análise Química

4.2.1 Prospeção Fitoquímica

A investigação das principais classes metabólicos presentes nos extratos brutos foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Matos (1997). Os testes qualitativos, constituídos por uma série de reações químicas e métodos cromatográficos, foram utilizados afim de detectar a presença de antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, alcaloides, antraquinonas, antronas, cumarinas, fenóis, taninos, triterpenos, esteroides e saponinas, seguindo as condições estabelecidas no Quadro 5.

Quadro 5 - Condições estabelecidas para a análise fitoquímica preliminar

Classe de Metabólitos	Teste/Reagente	Resultados Indicativos
Antocianinas e Antocianidinas	Adição de NaOH (1M) até pH 11	Coloração Azul-púrpura
Flavonoides		Coloração Amarela: Flavonas, flavonóis e xantonas; Coloração Vermelho púrpuro: Chalconas e auronas; Coloração Vermelho laranja: Flavononois;
Leucoantocianidinas	Adição de HCl (1 M) até pH 2 e NaOH (1 M) pH 11, seguido de aquecimento durante 3 min	pH 2: Coloração Vermelha
Catequinas		pH 2: Coloração Pardo amarelada
Flavonas		pH 11: Coloração Vermelho alaranjada
Alcaloides	*Revelação com Reagente Dragendorff Reação de precipitação: HCl (0,1 M) + Reagente Dragendorff;	Coloração Alaranjada Precipitado na cor alaranjada
Antraquinonas Antronas	* Revelação com KOH 10%	Coloração vermelha Coloração amarela
Cumarinas	* Observação sobre a luz UV (360 nm) Revelador - NaOH (10%) e KOH (10%)	Coloração azul
Fenóis	Reação de precipitação com adição de FeCl ₃	Precipitado Azul a vermelho
Taninos		Hidrolisáveis: precipitado azul escuro; Condensados: precipitado verde
Triterpenos Esteroides	Reação de Liebermann-Buchard	Parda até vermelha Azul evanescente seguida de verde
Saponinas	Agitação intensa	Espuma persistente

*Método cromatográfico. Fonte: Autor (2024).

4.2.2 Fracionamento Cromatográfico

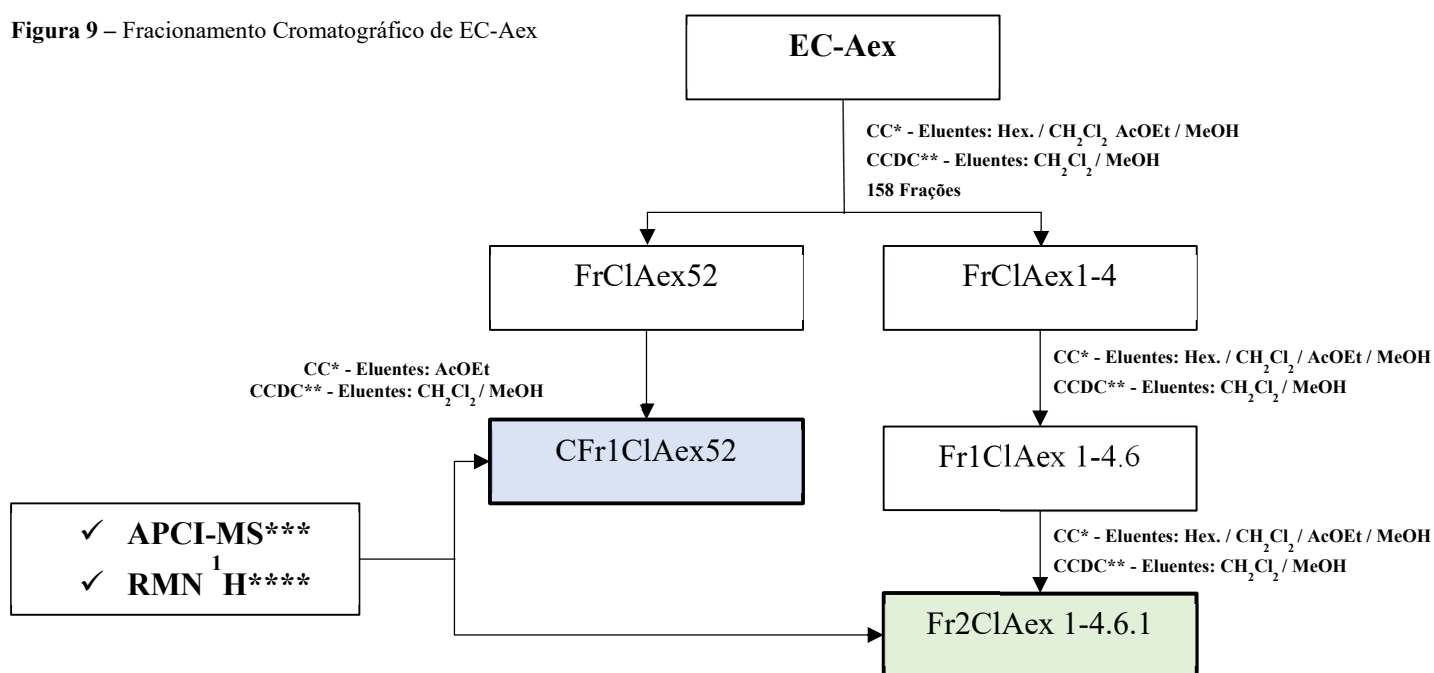
O extrato clorofórmico (EC-Aex; 2 g) foi submetido à Cromatografia em Coluna (30 mm x 300 mm Vidrolabor) utilizando-se como fase estacionária a sílica gel 60 Merck (55,6 g) e como eluentes, os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puro, em misturas binárias na proporção 90:10, originando 158 frações. As frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), com o uso de cromatofolhas de sílica

gel Merck (2mm), eluidas por diclorometano-metanol (9:1) e reveladas através da radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e pelos reagentes de Dragendorff e Ácido sulfúrico (10%). O processo de fracionamento ocorreu conforme a Figura 9.

Para a fração 1-4 (166,7 mg) utilizou-se coluna (30 mm x300 mm Vidrolabor) em sílica gel 60 Merck (45,3 g) com fase móvel (FM) os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol nas mesmas proporções utilizadas anteriormente, originando 38 frações, das quais, a fração 1-4.6 (12,6 mg) foi fracionada em uma pipeta Pasteur usando como FM uma mistura binária composta de diclorometano e metanol (9:1), originando a substância Fr2ClAex1-4.6.1. Em seguida, a amostra foi analisada por Espectrometria De Massa Com Ionização Química À Pressão Atmosférica (APCI-MS) e Ressonância Magnética Nuclear De Hidrogênio (RMN ^1H).

A fração 52 foi fracionada com pipeta Pasteur de vidro (250 mm x 230 mm) em sílica gel 60 Merck (500mg) usando como FM acetato de etila (2 mL), originando duas frações. Destas, a fração codificada como CFr1ClAex52, foi isolada em forma de cristal e na sequência foi analisada por APCI-MS e RMN- ^1H .

Figura 9 – Fracionamento Cromatográfico de EC-Aex



CC*: Cromatografia em Coluna; CCDC**: Cromatografia em Camada Delgada comparativa; APCI-MS***: Espectrometria de Massas, Ionização Química À Pressão Atmosférica; RMN ^1H ****: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. **Fonte:** Autor (2024).

4.2.3 Espectrometria de Massas (APCI-MS)

Os espectros de massas das frações e extratos brutos (1mg/mL) foram adquiridos por infusão direta em espectrômetro *ion trap* LCQ FleetTM (Thermo Scientific) operando nos modos positivo e negativo. O aparelho foi equipado com fonte de ionização APCI (Ionização

Química à Pressão Atmosférica) e programado para monitorar a faixa de m/z 100-1000 Da. Foi utilizado os seguintes parâmetros de operação: sonda (capilar), tensão de 4,5kV (modo positivo) e 3,8 kV (modo negativo); nitrogênio (30 psi); gás de secagem (5 psi); temperatura da fonte 250°C; e lentes offset e túbulos capilares em 35 V e 75 V, respectivamente. Os espectros obtidos foram analisados através do software X-Calibur® 2.0.7.

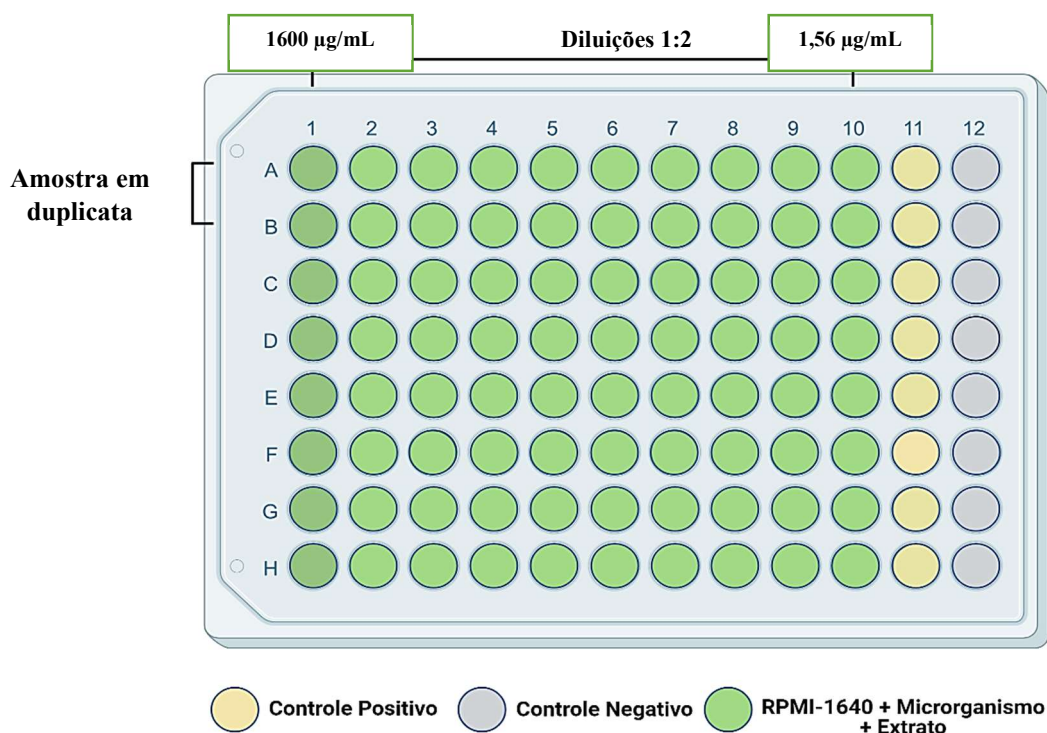
4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance III HD, operando em 500,13 MHz e equipado com sonda multinuclear de 5mm (BBFO Plus SmartProbeTM), com gradiente de campo na direção Z. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o tetrametilsilano (TMZ) foi utilizado como referência interna. Os sinais de deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao TMZ. Para o processamento dos dados foi utilizado o programa MestReNova.

4.3 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana

A concentração mínima inibitória (CIM) foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2017). Os extratos (3,2mg/mL) foram avaliados na faixa de concentrações entre 1600 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$, em duplicata, frente a cepas padrão provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Candida albicans* ATCC 80193 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Neste ensaio foram utilizadas microplacas esterilizadas com 96 poços, onde foram adicionados os extratos brutos diluídos (1:2) em caldo RPMI-1640 e o inóculo (100 μL , contendo $2,5 \times 10^3$ células/mL), o controle positivo contendo o meio de cultura e o inóculo bacteriano e o controle negativo contendo apenas o meio de cultura (Figura 10). As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas. A CIM dos extratos de *A. excelsum* foi estimada como a menor concentração de extrato, expressa em $\mu\text{g/mL}$, necessária para causar inibição de 50% do crescimento microbiano comparado a um poço controle de crescimento livre de antimicrobianos.

Figura 10 - Disposição das amostras, controle positivo e negativo na placa Elisa



Fonte: Autor (2024).

4.4 Teste de Atividade Antioxidante e Fenólicos Totais

4.4.1 Determinação do Teor de Fenólicos Totais (FT)

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada, em triplicata, por meio do método espectrométrico (Bel Photonics, UV-M51) utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Velioglu *et al.*, 1998). Para tal, foram adicionados 200 µL dos extratos (1 mg/mL) a 1500 µL do reagente Folin Ciocalteu, seguida da adição do mesmo volume de carbonato de sódio (6%). Após 90 minutos na ausência de luz, a absorbância foi medida a 725 nm. Uma curva padrão de ácido gálico, nas concentrações entre 31,25 a 250 µg·mL⁻¹, foi obtida ($y = 0,0053x - 0,0422$, $R^2 = 0,9993$) e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE g⁻¹).

4.4.2 Avaliação *in vitro* da Capacidade Antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos de *A. excelsum*, foi avaliado mediante a sua capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS⁺ (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), e poder de redução do Ferro (FRAP) em espectrofotômetro UV/VIS (Bel Photonics, UV-M51). Foram preparadas uma curva de calibração para a conversão dos valores de absorbância em concentração. O Trolox (100 a 1500 µM) foi utilizado como antioxidante de referência para os métodos de DPPH e ABTS, e os resultados expressos em micromolares de equivalentes de Trolox (µM TE). O Sulfato ferroso

(0 a 800 μM) foi utilizado como padrão no teste de redução do ferro e os resultados foram expressos em micromolares de Sulfato ferroso por grama de amostras ($\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$).

A avaliação por meio do método de DPPH $^{\bullet}$ foi realizada segundo Molyneux (2004), com alterações para a leitura em espectrofotômetro. Foram adicionados 100 μL dos extratos (1mg/mL) a 3900 μL da solução metanólica de DPPH $^{\bullet}$ (100 μM ; Abs de 0,996), em triplicata. A leitura das absorbâncias foi realizada a 515nm após a incubação por 30 minutos na ausência de luz. A curva padrão de Trolox para este ensaio foi $y = -0,0006x + 0,923$ ($R^2 = 0,9999$).

Para o ensaio com o radical ABTS $^{+\bullet}$, 30 μL dos extratos (1mg/mL) foram adicionados à 3000 μL da solução radicalar (Abs de 0,700), em triplicata, com posterior armazenamento na ausência de luz durante 6 min. A leitura da absorbância foi realizada a 734 nm (Re *et al.*, 1999). A curva padrão de Trolox foi $y = -0,0003x + 0,9179$ ($R^2 = 0,9992$).

Pelo método FRAP, a capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada segundo os procedimentos descritos Rufino (2006), com modificações. O reagente FRAP foi preparado a partir de 100mL de tampão acetato 0,3M (pH 3,6), 10 mL de 2,4,6-tris (2-pyridyl) -S-triazina (TPTZ) 10,0 mM e 10 mL de Cloreto férrico (FeCl_3) 20 mM. As amostras (90 μL), solubilizadas em metanol à 1mg/mL, foram adicionadas a 270 μL de água destilada e 2,7mL do reagente FRAP, em triplicata, e posteriormente incubadas em estufa à 37°C (Labor SSA-150L) por 30 minutos. Após o tempo de incubação, as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda igual a 593 nm (Benzie; Strain, 1996). A curva padrão de Sulfato ferroso foi $y = 0,0011x + 0,1515$ ($R^2 = 0,9896$).

4.5 Avaliação da atividade antiplasmodica *in vitro* frente a cepas do *Plasmodium falciparum*

A atividade antiplasmodial foi avaliada frente a cepas 3D7 (sensível a cloroquina). Os extratos (1mg) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluídos com meio RPMI-1640 até concentrações finais de DMSO <1%.

As amostras (100 μL) foram plaqueadas em microplacas estéreis de 96 poços, em duplicata, e submetidas a diluições seriadas na proporção de 1:2. Em seguida, foram adicionadas as placas 100 μL de culturas, com parasitemia de 1–1,5% e 2% de hematócrito (1% final), para posterior incubação à 37°C por 72 h. Como controle positivo foi utilizado a Cloroquina e o crescimento dos parasitos foi determinado de a partir da mensuração da atividade, por espectrofotometria, da enzima lactato desidrogenase do parasita (pLDH) (Makler; Hinricks, 1993).

Para o screening inicial da atividade antimalárica as culturas tratadas com os extratos, foram ressuspensas e 20 µL de cada poço foram adicionadas a uma nova microplaca contendo 100 µL do reagente MALSTAT (TritonX-100 a 0,125%, Litium L-lactato 130 mM, tampão Tris 30 mM e dinucleotídeo 3-acetilpiridina adenina – APAD 30 mM, com pH 9, e PES/NBT, preparado a partir do azul de nitrotretazólio 1,96 mM e etosulfato fenazina 0,24 mM). Após esse processo, a placa foi incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 15 minutos, para posterior leitura em Leitora de microplaca (Synergy4, BioTek) no comprimento de onda de 650 nm. Os resultados de inibição do parasito foram expressos em percentual e a determinação da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) dos parasitas em relação aos poços foi calculada com o auxílio do software Gen5 1.10.

4.6 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi realizada frente a linhagem J774 de macrófagos murinos, cultivada em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com soro fetal bovino (10% v/v), L-glutamina, vitaminas e aminoácidos em frascos de 75 cm² a 37°C. Os extratos foram solubilizados em DMSO e diluídas em meio de cultura nas concentrações entre 100 a 1,56 µM.

As células J774 foram tripsinizadas, lavadas e plaqueadas na concentração de 4×10⁴ células/poço em microplacas de 96 poços, que foram incubadas por 24h a 37° C e 5% de CO₂. As células foram submetidas teste com amostras anteriormente preparadas, nas diferentes concentrações, do grupo controle (Violeta genciana) durante 72h, nas mesmas condições relatadas acima e em duplicata. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL de CellTiter-Glo® para a análise de viabilidade células por luminescência em leitora de microplaca. O CellTiter-Glo® realiza esta avaliação por meio da presença de ATP, que se liga a luciferina, gera o complexo oxiluciferina e ocasiona a luminescência (Souza, 2021). A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi obtida a partir de leituras em dois experimentos independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimento dos extratos das cascas de *A. excelsum*

O rendimento em percentual dos extratos apresentou uma variação entre 0,20% a 6,24% (Tabela 1). Do material vegetal, constituído de 261,98g utilizado para a obtenção do extrato, o menor rendimento foi obtido com o uso do solvente de menor polaridade (hexano), de modo que o extrato metanólico, de maior polaridade, obteve maior rendimento.

Tabela 1 - Rendimento dos extratos brutos

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
EH-Aex	0,5464	0,20
EC-Aex	4,3228	1,65
EA-Aex	1,2802	0,48
EM-Aex	16,3655	6,24

EH-Aex: hexânico; EC-Aex: clorofórmico; EA-Aex: acetato de etila; EM-Aex: metanólico. Fonte: Autor (2024).

5.2 Análise química

5.2.1 Triagem Fitoquímica dos extratos

Através da triagem fitoquímica dos extratos das cascas de *A. excelsum* (Tabela 2), foi possível identificar a presença de alcaloides, antronas, triterpenos e esteroides.

A presença de alcaloides em todas as amostras analisadas corrobora com os dados da literatura referentes a espécie *A. excelsum* e outras espécies de *Aspidosperma*, uma vez que os alcaloides do tipo indólicos são considerados marcadores quimiotaxonômicos para a classificação botânica do gênero (Pereira *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos das cascas de *A. excelsum* para diferentes classes de metabólitos.

Classe de Metabólitos	EH-Aex	EC-Aex	EA-Aex	EM-Aex
Antocianinas e Antocianidinas	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-
Flavonas	-	-	-	-
Alcaloides	+	+	+	+
Antraquinonas	-	-	-	-
Antronas	-	+	-	-
Cumarinas	-	-	-	-
Fenóis	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-
Triterpenos	-	+	+	+
Esteroides	+	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-

(+): Positivo; (-): Negativo. EH-Aex: hexânico; EC-Aex: clorofórmico; EA-Aex: acetato de etila; EM-Aex: metanólico. Fonte: Autor (2024).

Os testes para esteroides e triterpenos foram positivos para os extratos hexânicos, clorofórmico, acetato de etila e metanólico. De acordo com os estudos conduzidos por Alves (2007) e Santos *et al.* (2009), foram identificadas estas classes no extrato etanólico das cascas de *A. subincanum* Mart. Mais tarde, Aquino (2012) isolou uma mistura de esteroides estigmasterol, sistosterol e campesterol de *A. macrocapon*.

Neste estudo, apenas o extrato clorofórmico testou positivo para antronas. Esta classe foi identificada no extrato metanólico das folhas de *A. pyrifolium* Mart. (Barbosa, 2014).

Na prospecção fitoquímica realizada por Alves (2007), o teste do pó das cascas de *A. subincanum* foi positivo para esteroides, triterpenoides, saponinas, taninos, alcaloides, cumarinas e resinas, e negativo para flavonoides.

No extrato hidroetanólico das cascas de *A. excelsum* há relatos da presença de alcaloides, saponinas, açúcares redutores, fenóis e taninos, bem como a ausência de metabólitos como quinonas, terpenos e flavonoides (Gomes, 2011). A partir deste estudo, nota-se as diferenças de classes detectadas na mesma espécie, no entanto, é fundamental salientar que a presença e a concentração dos metabólitos estão intrinsecamente vinculadas às peculiaridades do solo, ao

clima e a outros elementos ambientais (Mendonça *et al.*, 2015). Além disso, as características do solvente utilizado definem quais compostos serão preferencialmente extraídos (Simões *et al.*, 2010).

Os metabólitos presentes nas espécies vegetais apresentam uma variedade de funções biológicas, entre as quais: os alcaloides possuem potencial antibacteriano, antifúngico, antiplasmódico e antitumoral; os taninos são compostos que exibem ação antioxidante, e as saponinas desempenham funções antifúngicas, antimicrobianas, antiparasitárias, antivirais, citotóxicas e antitumorais; os compostos fenólicos apresentam capacidade de neutralizar radicais livres, ou seja, têm ação antioxidante (Mello; Santos, 2001; Simões *et al.*, 2010).

5.2.2 Constituintes Químicos identificados por APCI-MS

A espectrometria de massas (ANEXOS A-B) foi utilizada com o intuito de identificar os metabólicos nos extratos, sem a necessidade de isolamentos destes compostos. A identificação foi realizada por meio da espectrometria de massas sequencial (MS²) em conjunto com os dados de MS, consultados na literatura referentes a *A. excelsum* e outras espécies pertencentes ao mesmo gênero ou família. A tabela 3, apresenta os dados obtidos nas moléculas identificadas nas amostras analisadas.

Tabela 3 - Substâncias identificadas através da APCI-MS

Amostra	Substância	m/z [M+H] ⁺	m/z [M-H] ⁻	MS ²	Referência
EH-Aex	Espruceanumina B	439	-	379, 351	Brown <i>et al.</i> , 1966;
	10-Metóxidiidrocorinanteol	329	-	286, 251, 214, 168	Dastoor; Gorman; Schmid, 1967
	11-Metoxiioimbina	385	-	174, 159	Miet <i>et al.</i> , 1977.
EM-Aex	Ácido 2-hidroxi-3-O-β-D-glicopiranosiloxi-benzóico	-	315	153; 109	Nogueira, 2014; Cavalcante, 2023
	Ácido 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico	-	327	313, 312, 234	Bitwell; Sem; Luke; Kakoma, 2023
EC-Aex EA-Aex EM-Aex	Ácido Quínico	-	191	173, 127, 109, 93, 85	Bitwell; Sem; Luke; Kakoma, 2023

EH-Aex: hexânico; EC-Aex: clorofórmico; EA-Aex: acetato de etila; EM-Aex: metanólico. Fonte: Autor (2024).

No espectro de EH-Aex (Figura 11), a fragmentação do íon molecular m/z 439 $[M+H]^+$, forneceu padrões de fragmentação característicos de espruceanumina B (Figura 12). O pico em m/z 379 foi formado com a perda do óxido de etileno (CH_3CO_2H , 60 Da). A via de fragmentação do íon m/z 351, por sua vez, se dá pela desintegração do anel E (Retro-Diels-Alder), com a perda de 28 Da, correspondente a eliminação de uma molécula de eteno ($CH_2=CH_2$). Estes padrões de fragmentação, são compatíveis com a dos alcaloides plumeranos, como 21-oxo-aspidoalbidine, previamente isoladas de *Aspidosperma exalatum* (Brown *et al.*, 1966). Esta substância foi isolada e identificada em frações do extrato hexânico das sementes de *A. spruceanum* e metanólico das cascas do caule de *A. spruceanum* (Oliveira, 2008).

Figura 11 - Espectro MS/MS obtido para a substância Espruceanumina B

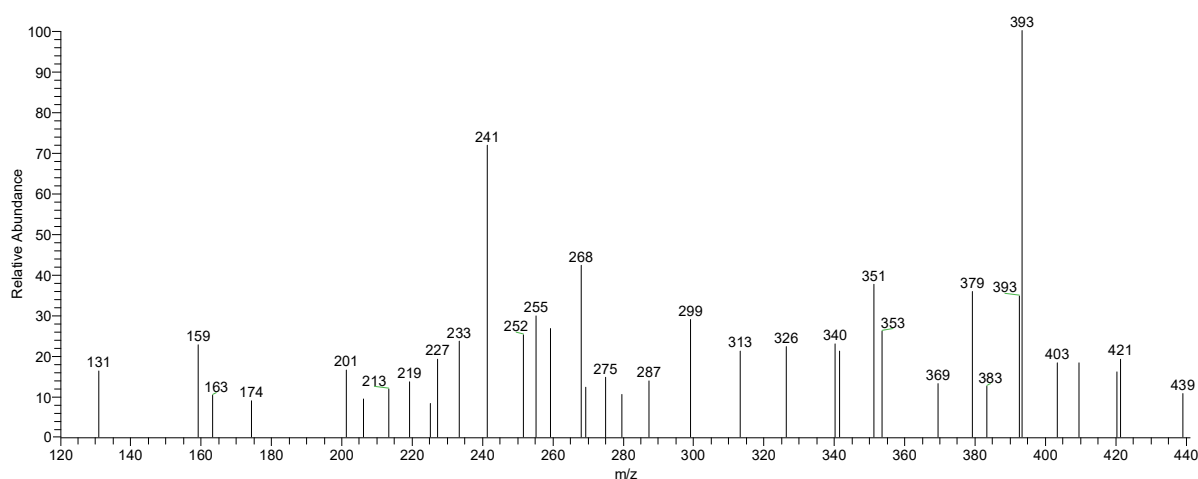
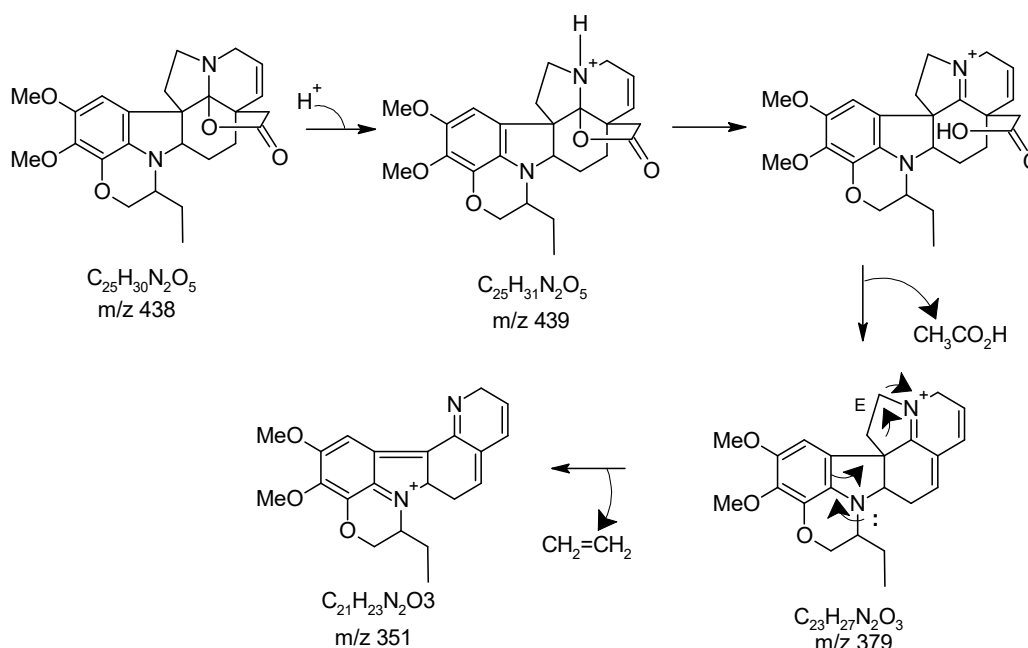


Figura 12 - Proposta de fragmentação do íon m/z 439 para a formação dos íons m/z 379 e 351



Fonte: Autor (2024).

O espectro de massas do extrato metanólico evidenciou a presença dos íons m/z 329 e 385 $[M+H]^+$, já relatados na literatura. O pico m/z 329 (Figura 13), quando fragmentado, apresentou os íons m/z 286, 251, 214 e 168, sugestivos do composto 10-metóxidiidrocorinanteol (Dastoor; Gorman; Schmid, 1967) (Figura 14). Este alcaloide, foi anteriormente isolado das cascas do caule de *Aspidosperma dicolor* A. DC (Dastoor; Gorman; Schmid, 1967).

Figura 13- Espectro MS/MS obtido para a substância 10-metóxidiidrocorinanteol

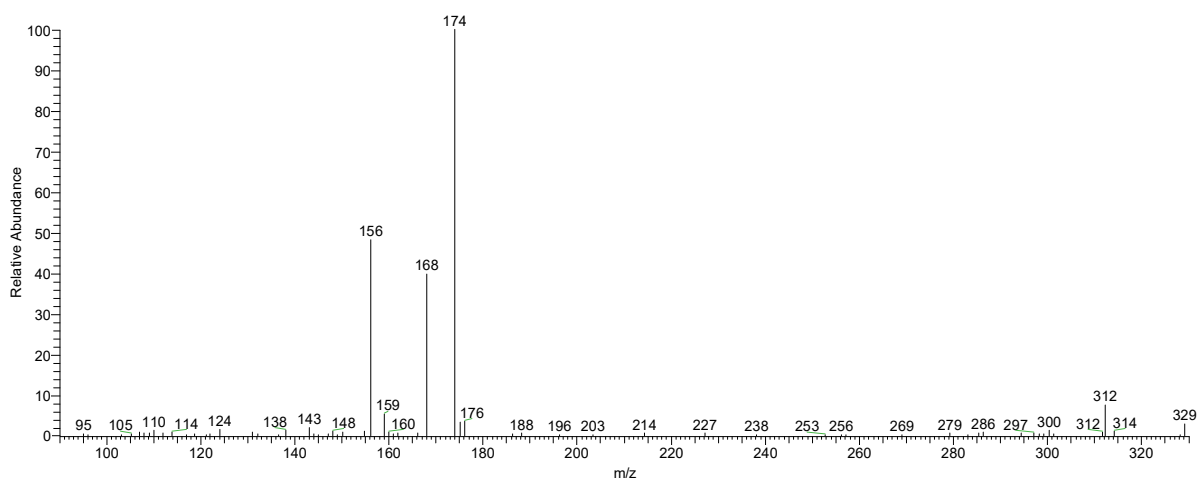
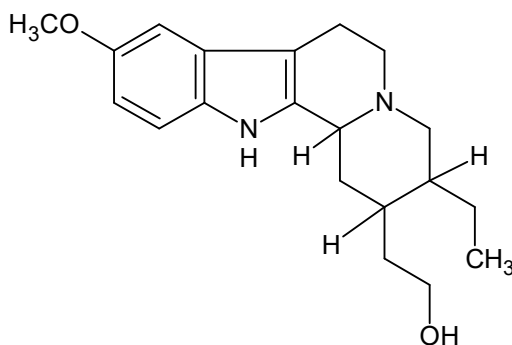


Figura 14 - Alcaloide 10-metóxidiidrocorinanteol



Fonte: Autor (2024).

O íon protonado de m/z 385 $[M+H]^+$ (Figura 15), correspondente a 11-metoxiioimbina, quando fragmentado gerou picos em m/z 174 e 159 (Figura 16). No processo de fragmentação dessa molécula foi observado uma elevada perda de massa (211 Da) resultante da eliminação inicial do terpeno por clivagem Retro Diels-Alder, seguida da quebra do anel C (Araújo, 2022; Miet *et al.*, 1977). O pico em m/z 159 é referente a perda de 15 Da, ocasionada pela eliminação da metila (-CH₃). Este tipo de perda é importante para caracterizar metoxilas adjacentes na estrutura (Tavares, 2004). Esta substância foi detectada por Araújo (2022) nas frações

alcaloídicas das cascas de *A. marcgravianum* e *A. nitidum*, utilizando a espectrometria de massas, e isolados do extrato metanólico das cascas do caule e sementes de *A. spruceanum* por Oliveira *et al.* (2009).

Figura 15 - Espectro MS/MS para a substância 11-metoxiioimbina

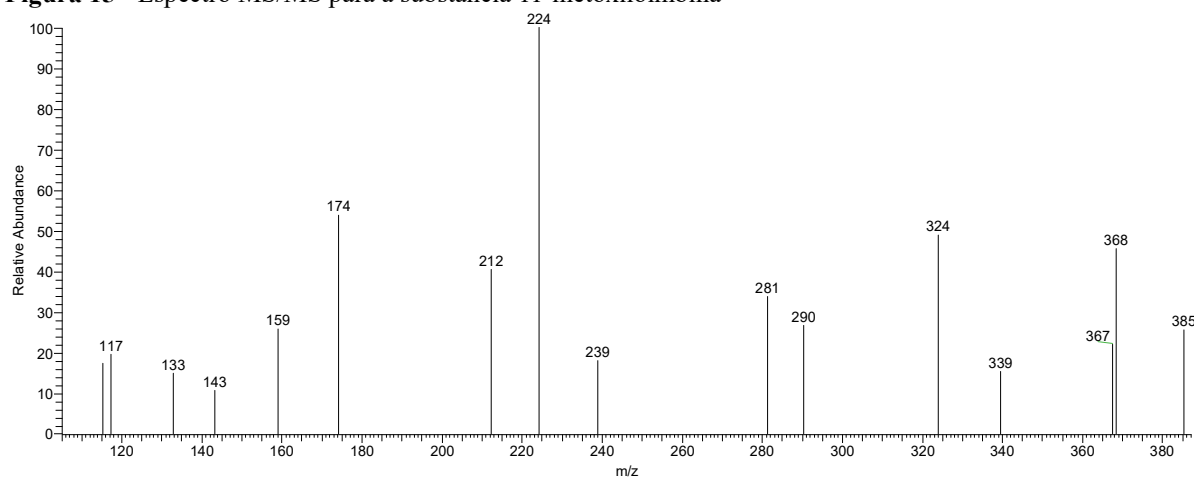
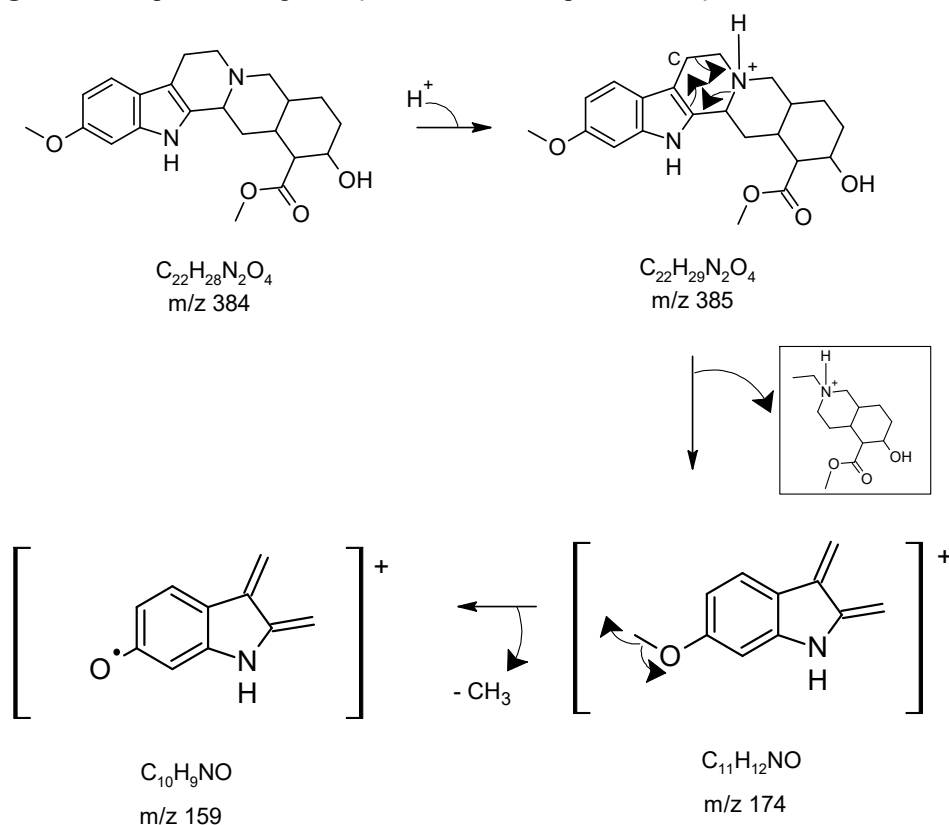


Figura 16 - Proposta de fragmentação do íon m/z 385 para a formação dos íons m/z 174 e 159



Fonte: Autor (2024).

No espectro de massas, modo negativo, do extrato metanólico foi observado os picos dos íons m/z 315 e 327 $[\text{M}-\text{H}]^-$. A molécula desprotonada $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 315 (Figura 17),

quando fragmentada exibiu os picos em m/z 153 e 109 (Figura 18). O pico m/z 153 foi gerado a partir da eliminação de uma molécula de glicose (162 Da). Com a saída do CO_2 (44 Da) ocorreu a descarboxilação e formação do pico m/z 109. O composto de fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9$, pode tratar-se do ácido 2-hidroxi-3-O- β -D-glicopiranosiloxi-benzóico, um derivado do ácido salicílico, isolado e identificado das sementes de *A. pyrifolium* (Nogueira, 2014; Cavalcante, 2023) e das folhas de *Vinca minor* (Apocynaceae) (King; Gilks; Partridge, 1955).

Figura 17 – Espectro MS/MS obtido para o Ácido 2-hidroxi-3-O- β -D-glicopiranosiloxi-benzóico

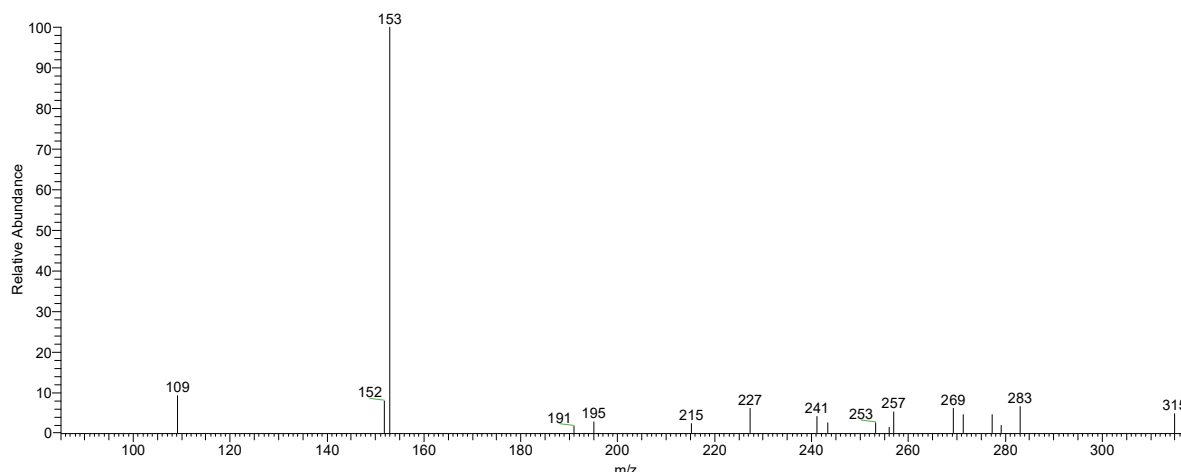
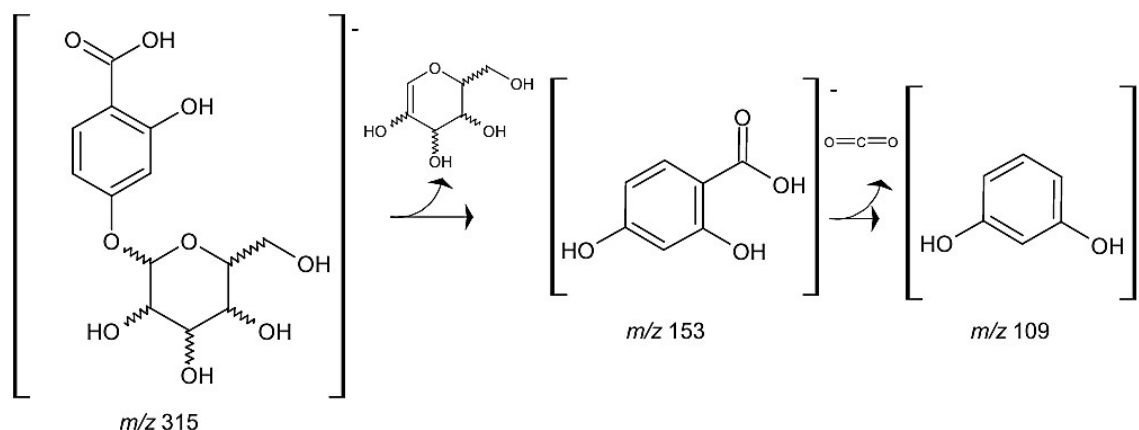
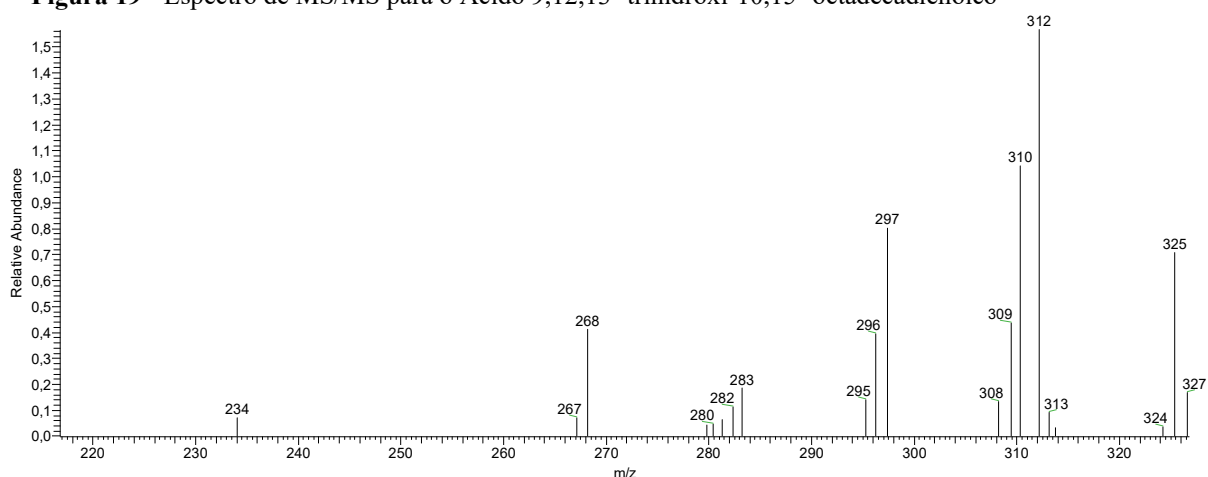
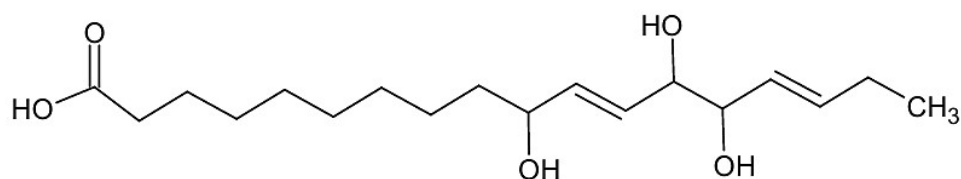


Figura 18 - Proposta de fragmentação do íon m/z 315 $[\text{M}-\text{H}]^-$ para a formação dos picos m/z 153 e 109



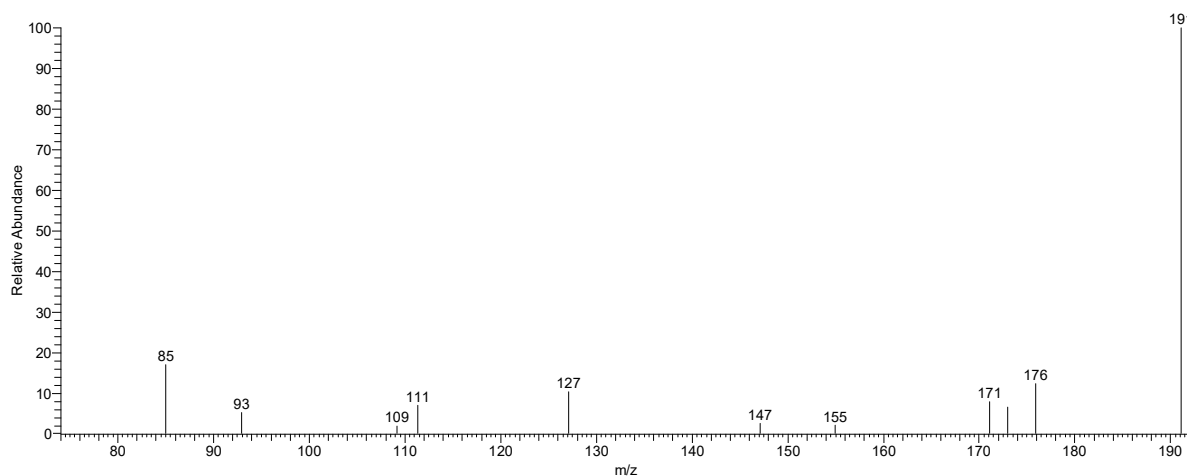
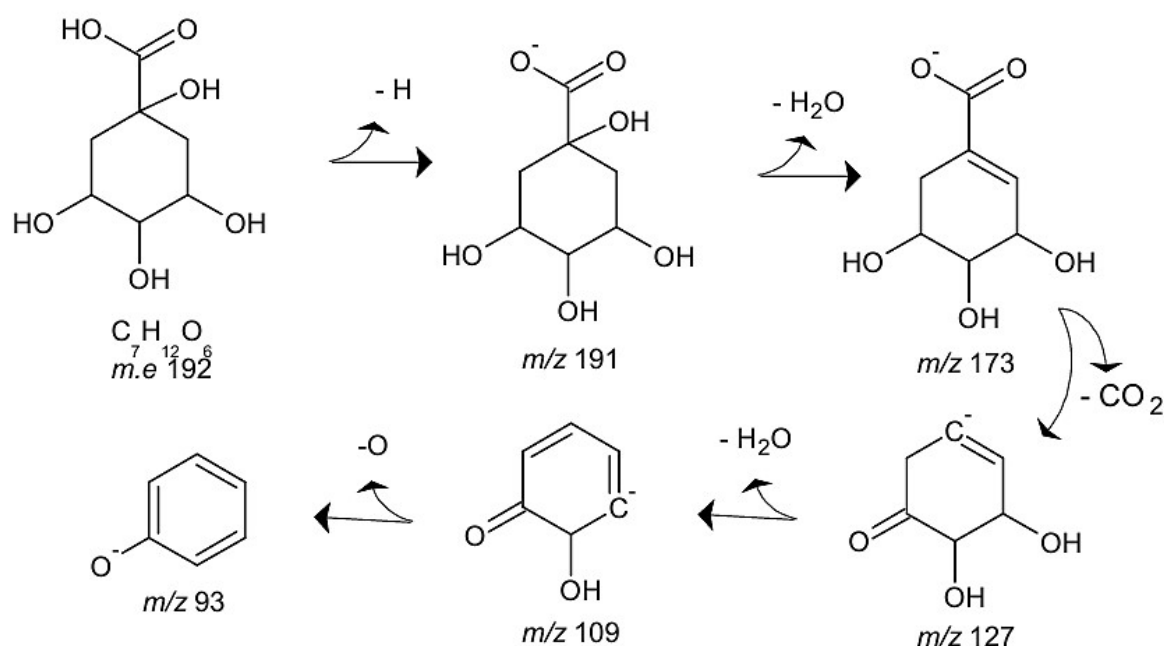
Fonte: Autor (2024).

O pico m/z 327 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Figura 19), apresentou os fragmentos de m/z 313, 312 e 234, que de acordo com os dados da literatura são característicos do Ácido 9,12,13- trihidroxi-10,15-octadecadienóico ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$) (Figura 20). Esta substância foi identificada no extrato metanólico das raízes de *Diplorhynchus condylocarpon* (Müll.Arg.) Pichon (Bitwell; Sem; Luke; Kakoma, 2023).

Figura 19 - Espectro de MS/MS para o Ácido 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico**Figura 20** - Estrutura do Ácido 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico

Fonte: Autor (2024)

No espectro de massas dos extratos EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex, foi observado o pico de uma molécula desprotonada em m/z 191 $[M-H]^-$ (Figura 21). Os dados espectrais demonstraram padrões de fragmentação característicos do ácido quínico ($C_7H_{12}O_6$). Os dados de MS^2 exibiram picos de m/z 173, 127, 109, 93 e 85 (Figura 22). O pico de m/z 127 indica uma desidratação e descarboxilação simultâneas, logo os picos de m/z 173 e 127, foram formados a partir da perda de 18 e 46 Da, devido a eliminação de uma molécula de água e dióxido de carbono, respectivamente. O íon m/z 109 foi gerado após a eliminação de uma molécula de água, com perda de 18 Da, e de m/z 93 em decorrência a perda de um átomo de oxigênio. Fragmentos de m/z 93 e 85, podem também ser resultantes de clivagens do anel ciclohexano. O ácido quínico foi identificado no extrato metanólico das cascas do caule de *Diplorhynchus condylocarpon* (Müll.Arg.) Pichon (Bitwell; Sem; Luke; Kakoma, 2023) e na polpa do fruto de *Ambelania duckei* Markgr (Corrêa *et al.*, 2023), ambas as espécies pertencentes a família Apocynaceae.

Figura 21 - Espectro MS/MS do Ácido Quínico**Figura 22** - Proposta de fragmentação do íon m/z 191 para a formação dos picos m/z 173, 127, 109 e 95

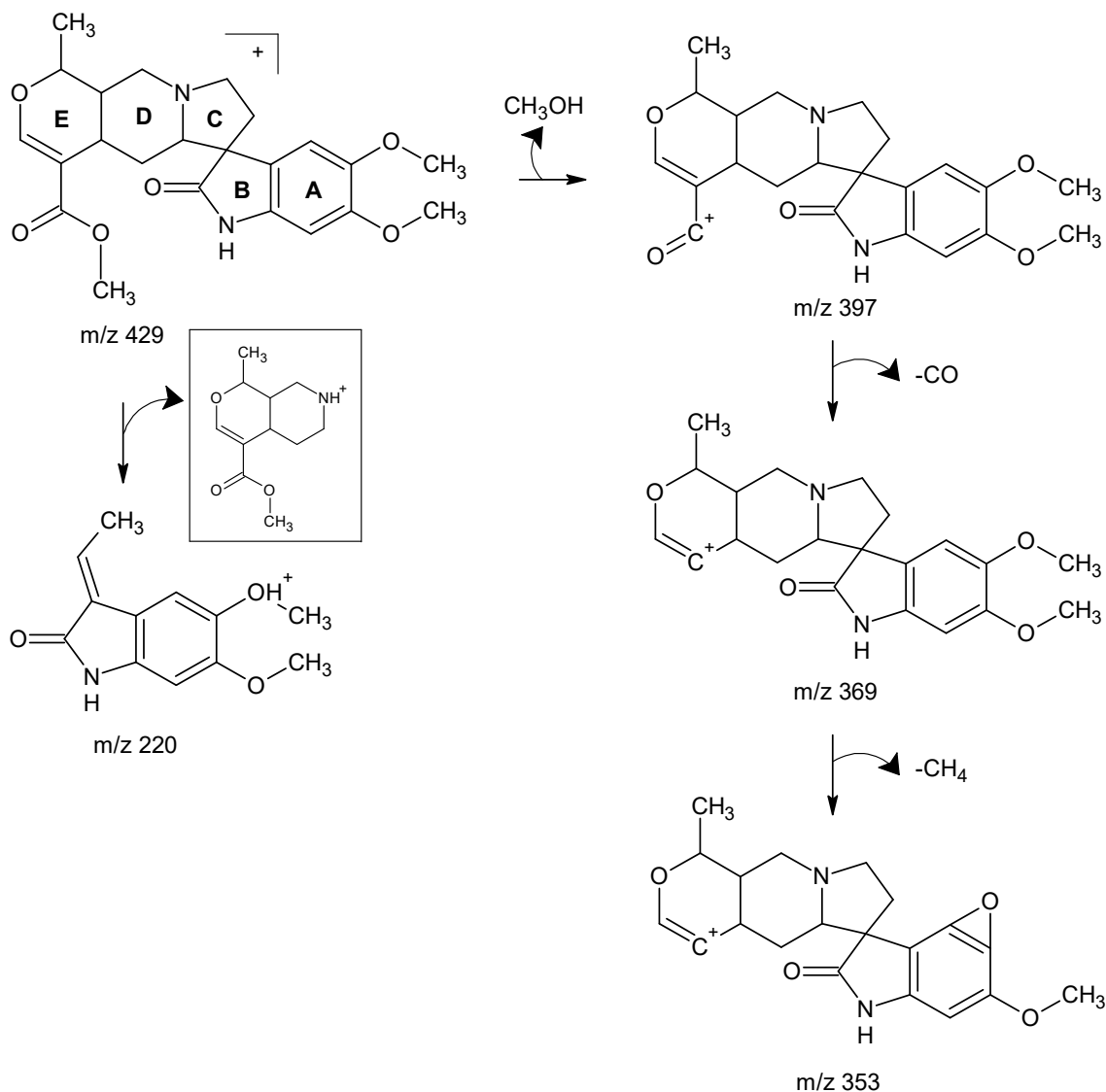
Fonte: Autor (2024)

5.2.3 Caracterização estrutural da amostra Fr2ClAex 1-4.6.1

A substância codificada como Fr2ClAex1-4.6.1 (4mg) apresentou-se como um sólido amorfo amarelo/alaranjado. A análise por APCI-MS (ANEXO C), no modo positivo, indicou a presença de um pico de maior intensidade correspondente ao íon m/z 429 (m.e 428,). A análise sequencial de massas forneceu os fragmentos m/z 397, 369, 353 e 220. Tais fragmentações são coerentes com o alcaloide carpanaubina, de fórmula molecular neutra $C_{23}H_{28}N_2O_6$. O pico em m/z 397 foi gerado devido perda de 32 Da, referente ao fragmento CH_3OH . Os fragmentos m/z 369 e 353, foram resultantes da perda subsequente de carbonila (CO , 28 Da) e metano (CH_4 ,

16 Da), respectivamente. A partir de uma segunda via de fragmentação foi gerado o pico m/z 220, com perda de 209 Da, ocasionada devido a clivagem do anel C (Figura 23).

Figura 23 - Proposta de Fragmentação da amostra Fr2ClAex1-4.6.1



Fonte: Autores, 2024.

O espectro de RMN ^1H da subfração Fr2ClAex1-4.6.1 (ANEXO A) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de grupos metoxila, grupo carbometoxi e hidrogênios aromáticos, metílicos, metilênicos e metínicos. A integração de sinais de RMN ^1H indicou a presença de 28 átomos de hidrogênios, nas regiões entre 1,13 e 7,49 ppm, que foram comparados com os dados da literatura (Tabela 4).

Foram observados sinais de dois simpletos, integrado para três hidrogênios, em δ_{H} 3,87 e 3,85, correspondentes a duas metóxilas. Na região de aromáticos, foram evidentes os sinais de dois simpletos em δ_{H} 6,82 e 7,07, integrado para um hidrogênio, com acoplamento em *para*

($J = 0$ Hz). A presença de apenas esses dois hidrogênios nesta região pode indicar que esse anel benzênico apresenta dois substituintes na posição *orto* e *meta*. Provavelmente, tais substituintes são as duas metóxilas mencionadas anteriormente, o que sugere a presença de um anel indólico.

Em δ_H 7,49 (H17), foi observado o sinal de hidrogênio mais desblindado devido a presença do átomo de oxigênio, um elemento bastante eletronegativo, provavelmente ligado a um átomo de carbono sp^2 . O espectro indicou ainda a presença de um sinal em δ_H 2,10, integrado para três hidrogênios, relacionado a uma metila desprotegida, devido à proximidade com um átomo retirador de elétrons. Na região de 3,68 ppm, foi identificada também a presença de um sinal, com integração para três hidrogênios, correlacionada a mais uma metóxila ligada a um carbono carbolínico. Sinais de hidrogênios metínicos foram observados em δ_H 1,71, 2,20 e 2,35, na forma de multipletos, e em δ_H 4,23 (dd, $J = 6,8; 1,3$ Hz) e δ_H 1,13 (d; 6,8). Foi possível observar ainda oito sinais de hidrogênios metilênicos e metilínicos em δ_H 1,69 (dt; $J = 3,7; 4,90; 13,25$) e 2,26 (dd; $J = 2,23; 6,60; 8,30$), δ_H 2,84 (dd, $J = 11,5$ e 6,1 Hz) e 2,31 (d, $J = 11,20$), δ_H 2,40 e 2,34 (dd, $J = 7,6; 2,1$ Hz), e 2,10 (m) e 1,25 (m).

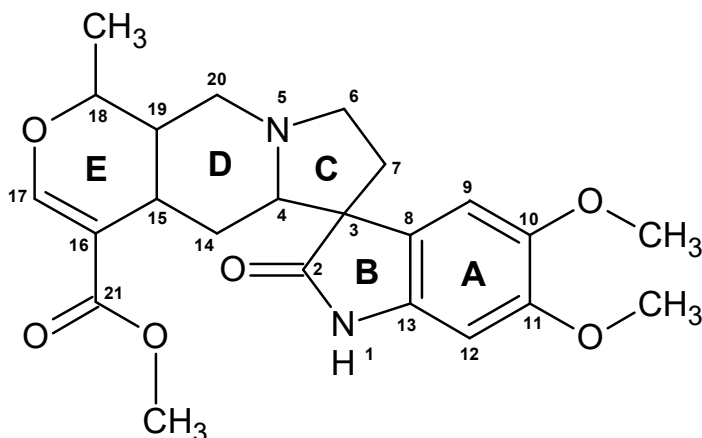
O conjunto de dados espectrais obtidos (Tabela 4) sugerem que composto Fr2ClAex1-4.6.1, possa ser identificado como a carapanaubina (Figura 24). Este alcaloide indólico foi isolado anteriormente das cascas de *Aspidosperma nitidum* Benth e de espécies do gênero *Rauwolfia*, família Apocynaceae (Sales, 2019; Kumar *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H da substância Fr2ClAex1-4.6.1

H	Fr2ClAex1-4.6.1 δ_{H}	Carapanaubina* δ_{H}
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	2.20 (m)	2,25 (m)
5	-	-
6	2,4 2.34 (dd, $J = 7,6$; 2.1 Hz)	2,4 3,28 (dd; $J = 1,97$; 8,60)
7	1,69 (dt; $J = 3,7$; 4,90; 13,25) 2,26 (dd; $J = 2,23$; 6,60; 8,30)	1,99 (dt; $J = 3,68$; 4,50; 13,22) 2,26 (dd; $J = 2,20$; 6,50; 8,70)
8	-	-
9	7.07	7,13
10	-	-
11	-	-
12	6.82	6,6
13	-	-
14	2,12 (m) 1,25 (m)	2,08 (m) 1,11 (m)
15	2.35 (m)	2,75 (m)
16	-	-
17	7.49	7,43
18	4,23 (dd, $J = 6,8$ e 1,3 Hz)	H 4,25 (dd; $J = 1,50$; 6,50)
19	1.71 (m)	2,01 (m)
20	2.84 (dd, $J = 11,5$ e 6.1) 2.31 (d, $J = 11,21$)	3,08 (dd; $J = 11,20$; 4,70) 2,11 (d; $J = 11,20$)
21	-	-
OCH ₃	3.87	3,83
OCH ₃	3.85	3,81
OCH ₃	3.68	3,61
22	1,13 (d; 6,8)	1,23 (d; 6,50)

*Sales (2019). Fonte: Autor (2024).

Figura 24 - Estrutura proposta para o alcaloide carapanaubina segundo os dados de RMN de ^1H da amostra Fr2ClAex1-4.6.1

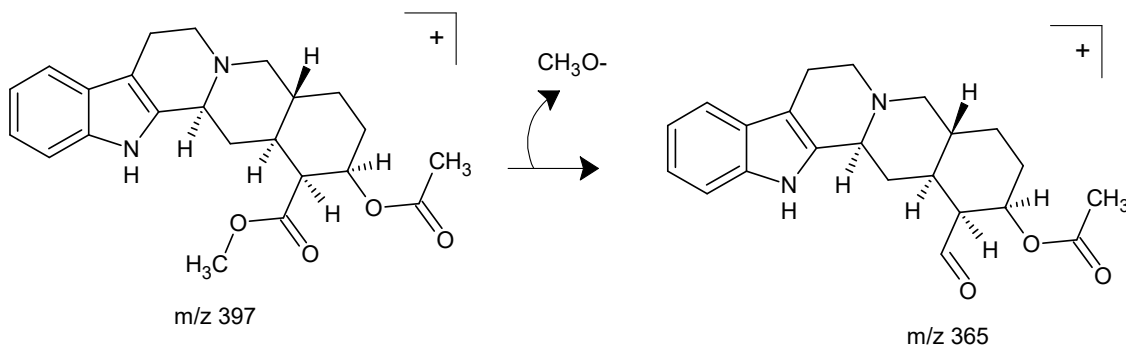


Fonte: Autores (2024).

5.2.4 Caracterização estrutural da amostra CFr1ClAex52

A amostra CFr1ClAex52 (6mg) foi isolada na forma de um sólido amorfo branco solúvel em clorofórmio. A análise por APCI-MS (ANEXO D), no modo positivo, exibiu o pico da molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 397 (m.e 369,4794), compatível fórmula molecular elemental $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$. A análise sequencial de massas forneceu os fragmentos m/z 365, gerado a partir da perda de uma metóxila (Figura 25) e em m/z 313. Estes fragmentos são coerentes com o espectro de massas descrito para o alcaloide *O*-acetiloiimbina (Nascimento *et al.*, 2018).

Figura 25 - Proposta de fragmentação para a obtenção do íon m/z 365



Fonte: Autores (2024).

O espectro de RMN de ^1H de CFr1ClAex52 (Anexo B) indicou a presença de simpletos em δ_{H} 2.07 e 3.74, integrado para três hidrogênios, condizente com os hidrogênios metílicos presentes nos grupos $-\text{OCOCH}_3$ e $-\text{COOCH}_3$, respectivamente. O multipletto em δ 3.96, integrado para um hidrogênio, evidenciou o hidrogênio H-17 presente em CHOCOCH_3 . Foi observado ainda, um sinal simples integrado para um hidrogênio em δ 7.57, o qual foi associado

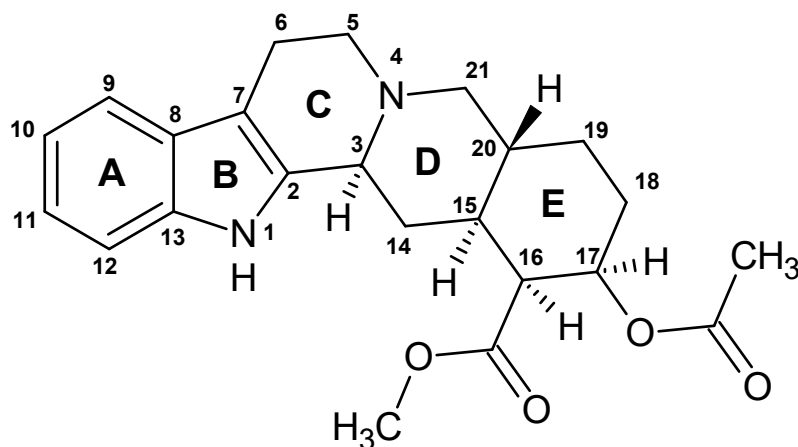
a hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio no núcleo indólico. Os dados espectrais foram comparados com a literatura (Tabela 5) e este composto foi identificado como o alcaloide *O*-Acetilioimbina (Figura 26). Esta substância já foi isolada anteriormente das cascas do caule e das raízes de *A. excelsum* (Benoin *et al.*, 1967; Verpoorte *et al.*, 1983).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (500,13 MHz, Clorofórmio- d) para a fração CFr1ClAex52, comparados com os valores descritos na literatura para *O*-Acetilioimbina

H	CFr1ClAex52 δ_{H}	<i>O</i>-Acetilioimbina* δ_{H}
	1.28 (s, 2H)	-
	1.65 (s, 3H)	-
OCOCH₃	2.07 (s, 3H)	2.08 (s, 3H)
	2.20 (s, 2H)	-
	3.52 (s, 9H)	-
	3.70 – 3.65 (m)	-
COOCH₃	3.74 (s, 3H)	3.70 (s, 3H)
	3.76 (s, $J = 11.4$ Hz, 3H),	-
	3.83 (s, 2H)	-
CHOCOCH₃	3.96 (m, 1H)	5.40 (m, 1H)
17		
	6.50 (s, 1H)	-
	7.07 (s, 1H)	-
	7.34 (s, 2H)	-
	7.49 (s, 1H)	-
NH	δ 7.57 (s, 1H)	7.82 (s, 1H)

*Benoin *et al.* (1967). Fonte: Autores (2024).

Figura 26 - Estrutura do alcaloide *O*-Acetilioimbina



Fonte: Autor (2024).

5.3 Atividade antimicrobiana

Como critérios para aceitação da atividade foram contempladas as determinações propostas por Holetz *et al.* (2002), com modificações. Assim, a atividade foi considerada boa com CIM < 100 µg/mL, moderada para CIM entre 100 a 500 µg/mL, fraca para CIM entre 500 e 1600 µg/mL e inativa quando a amostra não apresentar inibição até a maior concentração testada (CIM > 1600 µg/mL).

A partir da análise dos resultados constatou-se que os extratos não apresentaram atividade inibitória frente as bactérias nas diluições testadas (CIM > 1600 µg/mL). Apesar de não haver dados referentes atividade antibacteriana de extratos de *A. excelsum*, outras espécies de *Aspidosperma* foram avaliadas quanto a este potencial, bem como para a *A. marcgravianum*, que é considerada um sinônimo da espécie estudada.

No estudo realizado Oliveira *et al.* (2009), os extratos etanólicos da casca do caule das *A. polyneurum*, *A. dispernum* e *A. pyriformium* foram inativas sobre as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, apresentando a CIM superior a maior concentração avaliada no ensaio (CIM > 1000 µg/mL). Por outro lado, a espécie *A. tomentosum* foi apontada como detentora de atividade antibacteriana fraca frente a *S. aureus* e *B. subtilis*, com CIM: 1000 e 500 µg/mL, respectivamente (Pessini, 2015). O extrato metanólico das cascas da espécie *A. marcgravianum* apresentaram boa atividade antibacteriana frente as cepas *S. aureus* (CIM: 3,1250 µg/mL), *S. epidermes* (CIM: 12,550 µg/mL), *P. aeruginosa* (CIM: 50 µg/mL), *E. coli* (CIM: 12,5 µg/mL) (Araújo, 2022).

Em relação as leveduras (Tabela 6), o extrato hexânico foi inativo (CIM: >1600 µg/mL) e os demais extratos demonstraram fraca atividade a frente a *C. albicans*, com CIM de

1600µg/mL. Frente a *C. parapsilosis*, a amostra EH-Aex apresentou atividade moderada, com resultados característicos de atividade antifúngica nas três primeiras diluições, sendo a CIM de 400µg/mL. Já os extratos EC-Aex (CIM: 1600µg/mL), EA-Aex (CIM: 800µg/mL) e EM-Aex (800µg/mL), apresentaram atividade fraca contra a *C. parapsilosis*.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por Pessini (2015) ao analisar o potencial antifúngico das frações das cascas do caule de diferentes espécies de *Aspidosperma*, entre elas a *A. macrocarpon* e *A. pyriformium*, frente aos mesmos microrganismos testados. Outros estudos descrevem ainda a inatividade dos extratos brutos etanólico de galhos e folhas de *A. ramiflorum* e de *A. olivaceum* contra *S. aureus* e *C. albicans* (Agripino *et al.*, 2004), e de raízes, caule e cascas de *A. tomentosum* frente a ambas espécies de *Candida* testadas (Pessini, 2015).

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *A. excelsum*

Cepas	Concentração das amostras em µg/mL			
	EH-Aex	EC-Aex	EA-Aex	EM-Aex
<i>Candida albicans</i>	>1600	1600	1600	1600
<i>Candida parapsilosis</i>	400	1600	800	800

Legenda: EH-Aex: hexânico; EC-Aex: clorofórmico; EA-Aex: acetato de etila; EM-Aex: metanólico
Boa – CIM: <100µg/mL; **Moderada** – CIM: 100 a 500 µg/mL; **Fraca** – CIM: 500 a 1600µg/mL; **Inativa** – CIM: >1600µg/mL. Fonte: Autor (2024).

Entre os metabólitos encontrados na caracterização química dos extratos, os alcaloides são apontados como substâncias com potencial antifúngico (Henrique *et al.*, 2010) pela capacidade de desestabilizar as membranas biológicas (Soares *et al.*, 2016). Apesar disso, foram observados resultados pouco promissores. Tais resultados podem estar associados a composição química dos extratos e aos microrganismos testados.

Segundo Endo *et al.* (2010), a presença de biofilmes produzidos pela levedura *C. albicans* podem estar relacionadas a resistência e/ou inatividade da ação de antifúngicos e extratos vegetais. Com isto, a atividade antifúngica dos extratos e de compostos isolados de *A. excelsum* pode ser analisada frente a outras espécies de fungos. A literatura, por exemplo, descreve que os alcaloides ramiflorina A e B, isolados do extrato bruto metanólico de *A. ramiflorum*, possuem ação frente a *Cryptococcus neoformans* com CIM de 3,12-12,5 µg/mL e 12,5-25 µg/mL, respectivamente (Souza *et al.*, 2006). E ainda, que o extrato etanólico do caule de *A. polyneuron* foi ativo frente a bactéria *Proteus mirabilis* (Granato *et al.*, 2005). Tais

resultados, enfatizam a importância de investigações tanto sobre as diferenças de constituição química das amostras quanto a testes em novos microrganismos.

5.4 Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante

Os resultados para o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos frente aos três métodos analisados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH[•] e ABTS^{•+} e teor de fenólicos totais de *A. excelsum*

Amostras	TFT (mg GAE g ⁻¹)	DPPH (μM TE)	ABTS (μM TE)	FRAP (μM Fe ²⁺ /g)
EH-Aex	< 31,25	< 100	127,44 ± 29,87	5,86 ± 0,010
EC-Aex	120,89 ± 2,26	226,66 ± 25,22	936,33 ± 61,28	841,11 ± 0,016
EA-Aex	123,81 ± 1,60	160 ± 16,66	801,88 ± 42,22	816,67 ± 0,023
EM-Aex	138,06 ± 0,9	355 ± 26,82	876,33 ± 20,09	263,32 ± 0,004

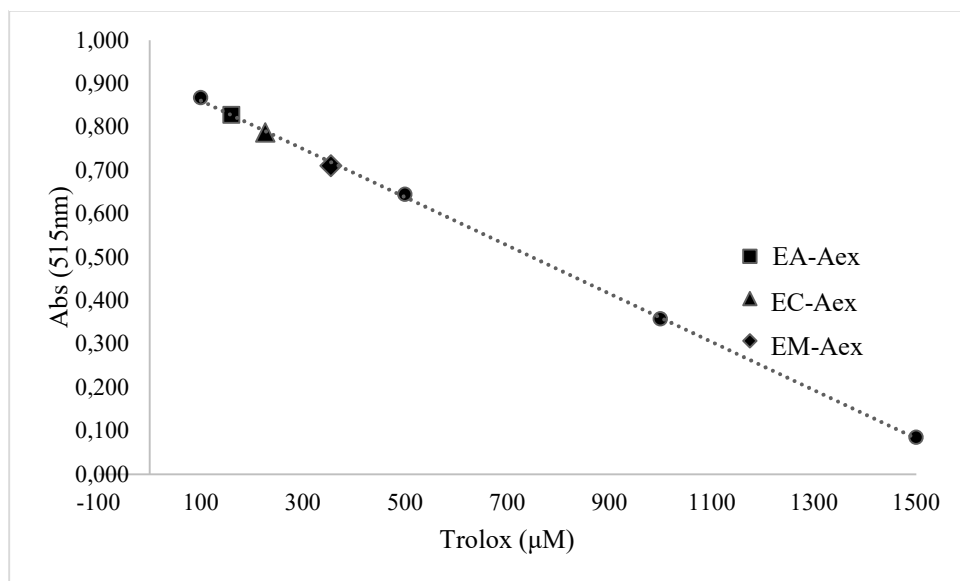
EH-Aex: hexânico; EC-Aex: clorofórmico; EA-Aex: acetato de etila; EM-Aex: metanólico. TFT: Teor de fenólicos totais. Fonte: Autor (2024).

A partir da análise dos resultados pode-se observar que as amostras apresentam baixo conteúdo de fenólicos totais. O extrato EH-Aex apresentou valor abaixo de 31,25 mg GAE g⁻¹ e nos demais extratos, os fenóis totais foram quantificados com valores entre 120,89 ± 2,26 a 138,06 ± 0,9 mg GAE g⁻¹.

Os compostos fenólicos demonstram uma grande quantidade de propriedades biológicas, no entanto, estas substâncias são principalmente associadas à sua ação antioxidante (Rossa, 2013; Degáspari, 2004). Contudo, os resultados obtidos neste estudo não constataram uma correlação entre o teor de fenólicos e a atividade antioxidante em ambos os métodos aplicados.

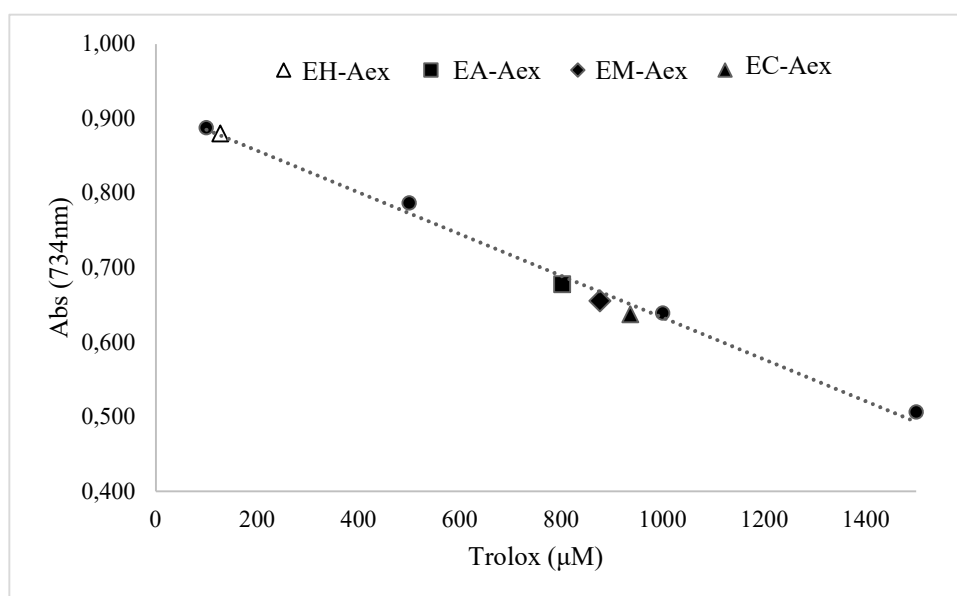
As técnicas DPPH[•] e ABTS^{•+} foram utilizadas com a finalidade de avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos de *A. excelsum*. Em ambos os métodos, a capacidade de redução dos radicais foi medida por uma curva de calibração com soluções de Trolox.

Os dados de atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•], permitem verificar que todos os extratos apresentaram pouca atividade sequestrante. Por meio da curva de calibração com soluções de Trolox (Figura 27), constata-se que as EA-Aex, EC-Aex e EM-Aex na concentração de 1mg/mL apresentaram atividade menor que 500μM de Trolox. Contudo, a amostra EH-Aex demonstrou atividade menor que o Trolox a 100μM.

Figura 27 - Curva padrão de Trolox (Método DPPH')

Fonte: Autores (2024).

No método ABTS^{•+}, apenas o extrato EH-Aex não apresentou atividade antioxidante. A amostra que demonstrou maior capacidade de reduzir o radical foi o extrato EC-Aex com valor de $936,33 \pm 61,28$, seguido dos extratos EM-Aex e EA-Aex, com valores de $876,33 \pm 20,09$ e $801,88 \pm 42,22$ μM TE, respectivamente. Tais resultados destacam que essas amostras apresentaram atividade similar ao Trolox na faixa de 500 a 1000μM (Figura 28).

Figura 28 - Curva de Calibração do Trolox (Método ABTS^{•+})

Fonte: Autores (2024)

Na literatura, informações relacionadas a análise do potencial antioxidantes da espécie supracitada são escassas, no entanto, há relatos da avaliação da capacidade sequestrante, frente ao radical DPPH', em outras espécies pertencentes ao mesmo gênero.

Na análise feita por Santos (2016), a fração diclorometano dos extratos das sementes de *A. pyrifolium* apresentou expressiva inibição do radical DPPH[•] (83,68%), com a concentração máxima inibitória de 50% da concentração do radical (IC₅₀) de $133,4867 \pm 2,22 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Araújo (2022) ao avaliar a capacidade dos constituintes dos extratos e frações das cascas de *A. desmanthum*, *A. marcgravianum* e *A. nitidum*, em capturar radical DPPH[•] observou que as amostras analisadas demonstraram baixo percentual de inibição quando comparada ao padrão utilizado (Ácido Gálico). A autora argumenta que as espécies deste gênero são ricas em alcaloides indólicos monoterpênicos e que a síntese desses alcaloides está diretamente ligada ao estresse oxidativo. Ao considerar que o estresse oxidativo afeta a concentração de alcaloides bioativos e no teste do DPPH[•], a reatividade do antioxidante é determinada pela concentração dessas moléculas, a baixa atividade antioxidante nas amostras testadas pode ser atribuída diminuição da concentração de moléculas com grupos hidroxilas ligadas ao núcleo aromático das substâncias presente nas amostras avaliadas. Este fato é confirmado ao se considerar que a elevada ação antioxidante dos compostos fenólicos resulta da presença de hidroxilas nos anéis aromáticos dessas substâncias (Martins *et al.*, 2018).

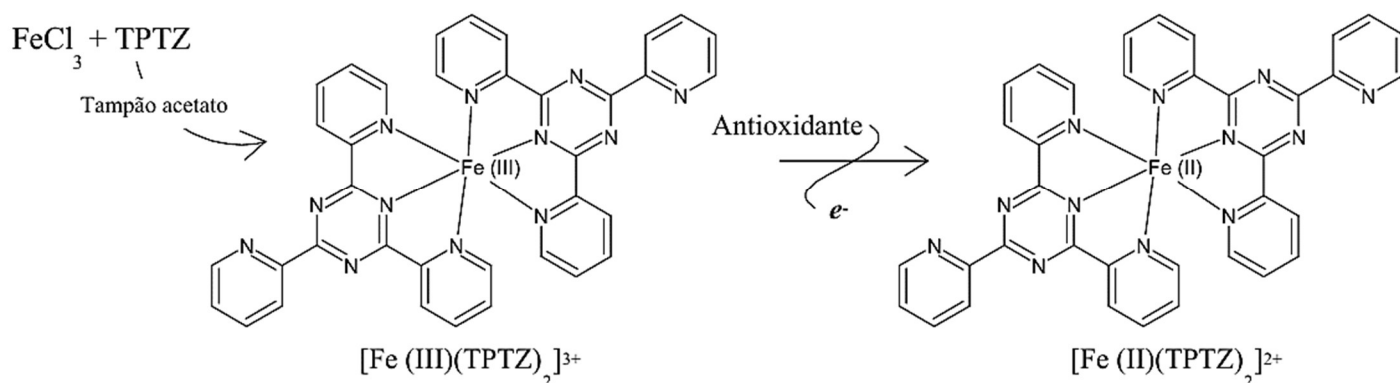
Os resultados obtidos quanto ao poder antioxidante das amostras salientam a importância de testes comparativos para a comprovação da existência de atividade antioxidante, já que os resultados alteraram conforme a metodologia aplicada. Alam *et al.* (2023), afirma que a atividade antioxidante não deve ser definida por um único método de avaliação antioxidante, uma vez que há variações dos mesmos em diferentes aspectos.

Ambas as técnicas inicialmente aplicadas neste estudo, visam avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos de *A. excelsum*, no entanto, diferem-se devido o ABTS ser baseado na capacidade dos antioxidantes em reduzir o cátion (ABTS^{•+}); enquanto o teste do DPPH[•], analisa a presença de moléculas capazes de doar prótons (H⁺) (Araujo, 2022; Costa, 2015). Além disso, enquanto com uso do método ABTS^{•+} é possível medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, já o DPPH[•] só é solúvel em meio orgânico (Daroncho *et al.*, 2012).

Considerando que as amostras analisadas são ricas em alcaloides, justifica-se a maior atividade destas frente ao cátion ABTS^{•+} quando comparada ao DPPH[•]. Uma vez que estes compostos se caracterizam pela presença de nitrogênio, pares de elétrons livres, estruturas conjugadas e estado de oxidação negativo (Vizzotto, 2010; Pelletier, 2001; Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2020), o que os torna capazes de doar elétrons e estabilizar o radical por meio de ressonância e dissipação da energia, reduzindo o cátion ABTS^{•+} de forma eficiente.

A atividade antioxidante, medida pelo método FRAP, é determinada a partir da capacidade das substâncias presente nas amostras em atuar como redutoras, produzindo o íon ferro II (Fe^{2+}) a partir do íon ferro III (Fe^{3+}), existente no complexo $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$ formado pela adição do cloreto férrico ao TPTZ (Figura 29) (Benzie; Strain, 1996).

Figura 29 - Redução do Ferro presente no Complexo $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$



Fonte: Autor (2024)

De acordo com os dados da Tabela 7, pode-se observar que o extrato que apresentou maior atividade foi o EC-Aex com $841,11 \pm 0,016 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, seguida do EA-Aex com valor de $816,67 \pm 0,023 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$. Os extratos hexânico (EH-Aex) e metanólico (EM-Aex), apresentaram valores de $5,86 \pm 0,010$ e $263,32 \pm 0,004 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, respectivamente, demonstrando baixa atividade antioxidante.

Araujo (2022) detectou poder de redução do Fe^{3+} dos extratos metanólicos das cascas das espécies *A. desmanthum*, *A. marcgravianum* e *A. nitidum*, as duas últimas consideradas sinônimas da espécie de estudo, com valores $886,83 \pm 0,001$, $741,86 \pm 0,004$ e $699,60 \pm 0,001 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, respectivamente.

Segundo Pereira (2019), alguns compostos fenólicos, possuem ação quelante em metais de transição, consequentemente, estas substâncias podem inibir a oxidação ocasionada por metais e formação de radicais de oxigênio. Este processo ocorre por coordenação com Fe^{2+} , através da autooxidação ou da formação de complexos inativos. Ao considerar classe de compostos predominantes nas espécies de *Aspidosperma*, os alcaloides, suas características, assim como as dos compostos fenólicos, podem permitir que estes compostos doem elétrons ou atuem como agentes quelantes e se liguem ao Fe^{3+} , estabilizando o metal e evitando a formação de radicais livres.

Nesta pesquisa, os resultados referentes a atividade antioxidante dos extratos não obtiveram uma correlação com o teor de fenólicos detectado. Assim, reafirma-se que o potencial

antioxidante de uma amostra não pode ser relacionado apenas ao teor destes compostos, sendo necessário a caracterização estrutural do composto ativo (Tavares; Ramos, 2008).

5.5 Atividade antimalárica e citotóxica

Os resultados da triagem inicial da atividade antiplasmodial *in vitro*, frente a cepas 3D7 de *P. falciparum*, CI_{50} e CC_{50} estão sumarizados na Tabela 8. A atividade antimalárica foi estabelecida inicialmente a partir dos critérios propostos por Camargo (2011), com adaptações. As amostras que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia entre 80 a 100 % foram consideradas ativas (A), parcialmente ativas (PA) quando com percentual de inibição obtivessem valores entre 50 a 70% e inativas (I) quando a inibição fosse menor que 50%.

Tabela 8 - Atividade antimalárica, IC_{50} e CC_{50} dos extratos

Amostras	T. I.		$CI_{50} \pm DP$ ng/mL	Atividade CI_{50}	CC_{50} µg/mL
	(%)	Atividade			
EH-Aex	30	I	> 200	-	50±10
EC-Aex	98	A	12,5±3,1	MA	25±2,8
EA-Aex	97,5	A	25±10	MA	78±20
EM-Aex	83	A	10±2,1	MA	20±0,9
Cloroquina	99,9	A	0,21±0,01	MA	N. T
Violeta Genciana	N.T.	N.T.	N.T.	N. T.	4,5±0,7

T.I. – Triagem inicial na concentração de 20 µg/mL. EH-Aex: hexânico; EC-Aex: clorofórmico; EA-Aex: acetato de etila; EM-Aex: metanólico. N.T: Não testado. DP: Desvio padrão. Classificação da triagem inicial: A - Ativas: 80 a 100 %. PA - Parcialmente ativas: 50 a 70%. I - Inativas < 50%. Classificação a partir do CI_{50} : MA - Muito ativo: $CI_{50} < 0,1$ µg/mL; A – Ativo: CI_{50} de 0,1 a 5 µg/mL; M – Moderada: CI_{50} de 5 a 10 µg/mL; I – Inativo: $CI_{50} > 11$ µg/mL. Fonte: Autor (2024).

Os extratos ativos, EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex, apresentaram percentual inibição entre 83 a 98%. Destes, o extrato clorofórmico apresentou maior atividade inibitória de parasitemia, com 98%, seguido do extrato de acetato de atila com 97,5%. Estes valores estão próximos ao percentual de inibição da Cloroquina (99,9%), droga utilizada comercialmente no tratamento da malária. Por outro lado, a amostra EH-Aex foi inativa frente a cepa de plasmódio testada, uma vez que inibiu apenas 30% dos parasitos.

Bertani *et al.* (2005) propõe a classificação de atividade antimalárica a partir da concentração inibitória de 50% de crescimento parasitário, de acordo com os seguintes parâmetros: $CI_{50} < 0,1$ µg/mL = muito ativo; CI_{50} de 0,1 a 5 µg/mL = ativo; CI_{50} de 5 a 10

$\mu\text{g/mL}$ = atividade moderada; $\text{CI}_{50} > 11 \mu\text{g/mL}$ = inativo. Análise dos valores de CI_{50} obtidos (Tabela 7) mostram que os extratos EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex, são considerados muito ativos, com CI_{50} de $12,5 \pm 3,1 \text{ ng/mL}$ ($0,0125 \mu\text{g/mL}$), $25 \pm 10 \text{ ng/mL}$ ($0,025 \mu\text{g/mL}$) e $10 \pm 2,1 \text{ ng/mL}$ ($0,01 \mu\text{g/mL}$), respectivamente. No entanto, apesar desta classificação, o CI_{50} das amostras EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex demonstraram valores superiores a cloroquina ($0,21 \pm 0,01 \text{ ng/mL}$), também classificada como muito ativa.

O extrato metanólico, embora tenha apresentado 83% de inibição dos parasitos, demonstra maior potência que os demais extratos, uma vez que apresentou a menor concentração necessária para inibir 50% do parasito. Contudo, a partir dos valores de CI_{50} de EC-Aex, constata-se que esta amostra apresentou valor equipotente a EM-Aex, diferindo-se apenas no percentual de inibição, que foi de 98%. O EA-Aex, apresentou CI_{50} maior que dos demais extratos ativos, enquanto que EH-Aex obteve CI_{50} superior a 200 ng/mL .

A citotoxicidade das amostras foi testada a partir da análise de viabilidade celular em células da linhagem de macrófagos murinos (J774). O padrão, violeta genciana, apresentou CC_{50} de $4,5 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ e os extratos demonstraram valores entre $20 \pm 0,9$ a $78 \pm 20 \mu\text{g/mL}$. Apenas EH-Aex demonstrou ser citotóxico frente a células de mamífero, dado que a sua concentração citotóxica foi consideravelmente menor que a concentração inibitória de 50% do parasito ($\text{CI}_{50} > 200 \text{ ng/mL}$; CC_{50} de $50 \pm 10 \mu\text{g/mL}$). No entanto, este extrato apresentou maior espectro de concentração citotóxica que o controle positivo (CC_{50} de $4,5 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$).

Para os extratos clorofórmico e acetato de etila o CC_{50} foi determinado como $25 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ e $78 \pm 20 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A amostra EA-Aex demonstrou ser menos citotóxica, uma vez que obteve a concentração que induz a morte celular em 50% foi quase sete vezes maior que de EC-Aex, indicando maior espectro de segurança. Os dados obtidos indicam que EC-Aex e EA-Aex apresentam eficácia antimalárica significativa contra *P. falciparum*, pois a inibição dos parasitos ocorreu em concentrações que não são tóxicas a células saudáveis.

A amostra EM-Aex, embora apresente menor CC_{50} ($20 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) entre os extratos ativos, destacou-se por sua baixa toxicidade em relação à concentração que inibe de 50% do parasito, uma vez que a concentração tóxica é significativamente maior que a de inibição. Esta característica eleva o espectro de segurança, uma vez que seria possível aumentar a concentração com um risco reduzido de toxicidade celular. Contudo, este extrato pode ser considerado de eficácia inferior aos demais, por apresentar taxa de inibição de 83%.

Apesar de *A. excelsum* ser amplamente utilizada como agente antimalárico, poucos estudos estão sendo conduzidos com essa espécie afim de investigar essas e diversas outras propriedades biológicas (Oliveira *et al.*, 2009). Mas, ainda assim, os resultados positivos

referente a atividade antimalárica detectada neste estudo, foram também observadas por Kvist *et al.* (2006), ao avaliar os extratos etanólicos das cascas de *A. excelsum* frente as cepas 3D7 de *P. falciparum*. As amostras apresentaram CI_{50} de 42 $\mu\text{g/mL}$, com concentração citotóxica superior a 100 $\mu\text{g/mL}$. Lopes (2019), ao analisar as frações geradas com partições ácido e base dos extratos metanólico e etanólico das cascas de mesma espécie, constatou que estas foram ativas frente a cepas K1 de *P. falciparum* com CI_{50} na faixa de 2,53 – 6,16 $\mu\text{g/mL}$, não demonstrando efeitos citotóxicos (CC_{50} entre 53,3 e $< 200 \mu\text{g/mL}$) frente à linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5), nas concentrações testadas.

Os extratos metanólicos das cascas de *A. excelsum*, também foram avaliadas por Jordão (2018), assim como frações enriquecidas em alcaloides e alcaloides indólicos isolados, os resultados indicaram que essas amostras inibem o crescimento de *P. falciparum*. O extrato foi ativo e obteve CI_{50} de 5,24 $\mu\text{g/mL}$. As substâncias isoreserpilina, reserpilina, 10-metoxi-corinan-17-ol, 3 α ,20 β -corinan-17-ol e 10-metoxi-15S,16S-E-isositsiriquina, foram moderadamente ativas, os valores de CI_{50} foram 18,0 μM , para as duas primeiras substâncias, e 13,9, 12,5, 10,3 μM para as demais, respectivamente. Ressalta-se que as substâncias puras são consideradas moderadamente ativas com $20 \mu\text{M} \leq CI_{50} > 5,0 \mu\text{M}$ (Silva, 2014). Estas amostras apresentaram ainda baixa toxicidade frente a MRC-5. Além disso, a autora destaca que quando com parada as outras amostras, a fração básica do extrato bruto (2F.AcOEt-B) rica em alcaloides apresentou atividade antiplasmódica superiores (CI_{50} de 2,53 $\mu\text{g/mL}$), e maior toxicidade (CI_{50} de 53.3 $\mu\text{g/mL}$) frente à linhagem celular MRC-5.

Estudos apontam que as diversas atividades biológicas de espécies de Apocynaceae, resultam da alta concentração de alcaloides, classe considerada a marcadora quimiotaxônomica deste táxon. Com relação a atividade antimalárica, alcaloides como Elipticina e Olivacina, podem interagir com o grupo heme, por apresentarem metóxilas e nitrogênio dispostos em posições diferentes do anel indólico. Essa interação é importante na ação antimalárica, pois no ciclo de vida do parasito o heme, liberado devido ao ataque as hemácias e degradação da hemoglobina, é tóxico e como mecanismo de defesa há a transformação em uma forma inativa do heme, a hemozoína. Quando os alcaloides se ligam ao grupo heme, não há formação da hemozoína, consequentemente há acúmulo de heme livres, provocando estresse oxidativo, que causa danos às membranas, proteínas e ao DNA do parasita, e podem gerar a sua morte (Silva, 2014).

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico preliminar permitiu a detecção da presença de alcaloides, característicos do gênero, antronas, triterpenos e esteroides. Análise por espectrometria de massas dos extratos hexânico e metanólico de *A. excelsum*, evidenciou a presença dos alcaloides indólicos espruceanumina B, 10-metóxidiidrocorinanteol e 11-metoxiioimbina, respectivamente. Estas substâncias já haviam sido relatadas na literatura em outras espécies deste gênero. Os ácidos 2-hidroxi-3-O- β -D-glicopiranosiloxi-benzóico, 9,12,13- trihidroxi-10,15- octadecadienóico e Quínico, foram detectados nos extratos clorofórmico, acetato de etila e metanólico, sendo a primeira vez identificados na espécie *A. excelsum*.

A análise por RMN da fração obtida do extrato clorofórmico das cascas de *A. excelsum*, possibilitou a elucidação estrutural dos alcaloides indólicos pela primeira vez relatados na espécie, carapanaubina e O-Acetilioimbina.

Nos testes biológicos, constatou-se que todos os extratos foram inativos frente as bactérias testadas, e somente o extrato hexânico apresentou ação moderada frente a *C. parapsilosis*. Os demais extratos apresentaram atividade fraca frente aos microrganismos testados. Quanto ao potencial antioxidante, apenas o extrato hexânico foi inativo frente ao radical ABTS^{•+}, no entanto, todos os extratos demonstraram pouca atividade sequestrante frente ao radical DPPH[•]. Os extratos EC-Aex e EA-Aex, apresentaram maior poder de redução do ferro.

As amostras EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex, foram ativas frente a linhagem 3D7 de *P. falciparum*, apresentando percentual de inibição de 98, 97,5 e 83%, respectivamente. Dentre os extratos avaliados, EC-Aex, EA-Aex e EM-Aex, são considerados muito ativos, com CI₅₀ de 12,5 $\pm$ 3,1 ng/mL (0,0125 μ g/mL), 25 $\pm$ 10 ng/mL (0,025 μ g/mL) e 10 $\pm$ 2,1 ng/mL (0,01 μ g/mL), respectivamente. Os extratos EC-Aex e EA-Aex apresentam eficácia antimalárica significativa contra *P. falciparum*, com CC₅₀ de 25 $\pm$ 2,8 μ g/mL e 78 $\pm$ 20 μ g/mL. O extrato hexânico, foi inativo frente a *P. falciparum*.

Os resultados obtidos contribuem com informações científicas sobre *A. excelsum*, destacando a relevância dos metabólitos presentes e associando-os as atividades encontradas. Em estudos posteriores sobre a atividade antioxidante dos extratos serão realizados através da autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, bem como a investigação do perfil químico da espécie por meio do isolamento e identificação de seus constituintes. Assim, espera-se isolar outros compostos a serem avaliados frente a atividade antioxidante, antimicrobiana e antimalárica.

7 REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I. J. D.; NURIT, K.; COELHO, V.P.; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do Cariri paraibano. **Oecologia Australis**, v. 11, n. 3, p. 323-330, 2007.
- AGRIPINO, D. G. et al. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and dnadamaging activities: I. Atlantic rain forest. Ecological station juréia-itatins. **Biota Neotropica** 4: 1-15, 2004.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, MD. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALLORGE, L., POUPAT, C. Position systématique el révision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trios Guyanes. **Le point sur leer chimique. Letters Botaniques**, v. 138, n. 415, p. 267-301, 1991.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* *Aspidosperma* species: A review of their chemistry and biological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 231, p. 125–140, 2019.
- ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasil, 2007.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zootherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 541-555, 2007.
- ALVES, R. R. N.; SILVA, C. C.; NÓBREGA ALVES, H. N. Aspectos SócioEconômicos do Comércio de Plantas e Animais Medicinais em Área Metropolitanas do Norte e Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, n.1, p.181 - 189, 2008.
- ANDRADE-NETO, V. F de. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 102, n. 3, p. 359-366, 2007.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG IV). 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Bot. J. Linn. Soc.** 181(1): 120.

APOCYNACEAE in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB48>>. Acesso em: 11 set. 2024

AQUINO, P. G. V. **Estudo químico e atividades anti-hipertensiva e antioxidante de *Aspidosperma macrocarum* Mart. (Apocynaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, 2012.

ARAÚJO, B. R. de O. **Investigação do perfil de alcaloides de espécies de *Aspidosperma* ssp por LC-MS**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Amazonas. 2022.

ARGENTA, S. C., ARGENTA, L. C., GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. (2011). Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências*, v. 7, n. 12, 51-60, 2011.

ARORA, R. B.; MADAN, B. R. Antiarrhythmics. VI. Ajmaline and serpentine in experimental cardiac arrhythmias. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 117, n. 1, p. 62-67, 1956.

BARBOSA, D. P. **Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida e antioxidante de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

BENOIN, P. R., BURNELL, R. H., RIEDINA, J. D. Alkaloids of *Aspidosperma excelsum* Benth, Can. **J. Chem.** 45, 725-730, 1967.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. A capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) como uma medida de “poder antioxidante”: o ensaio FRAP. **Bioquímica Analítica**, v. 239, n.1, p. 70–76, 1996.

BERNARDO, V. B. *et al.* **Caracterização do extrato hidroalcoólico atomizado de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade federal de Alagoas, Instituto de química e biotecnologia, 2012.

BERTANI, S. *et al.* Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 45-54, abr., 2005.

BESSA, N. G. F. *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15 n. 4, p. 692-707, 2013.

BHADANE, B. S. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p. 1181–1210, 2018.

BITWELL, C.; SEN, S. I.; LUKE, C.; KAKOMA, M. K. UHPLC-MS/MS phytochemical screening, polyphenolic content and antioxidant potential of *Diplorhynchus condylocarpon* (Müll.Arg.) Pichon (Apocynaceae), a medicinal plant. **Scientific African**, [S.L.], v. 20, p. e01712, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). 136 p. 2009.

BROWN, K. S. *et al.* Unusual Mass Spectral Fragmentation of 21 - Oxoaspidoalbidine-T type Alkaloids. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, n.21, p. 4984-4989, 1966.

BURNELL, R. H.; NGUYEN, T. S. Alpha-yohimbine from *Aspidosperma excelsum*. Elsevier. **Phytochemistry**, v.10, p.895. USA. 1971.

CASTELLO, A. C. D.; PEREIRA, A. S. S.; SIMÕES, A. O.; KOCH, I. *Aspidosperma in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB4520>>. Acesso em: 16 fev. 2024

CAVALCANTE, C. D. M. **Desreplicação do extrato etanólico das sementes de *Aspidosperma pyrifolium***. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CIOFALO, F.; LEVITT, B.; ROBERTS, J. Some aspects of the anti-arrhythmic activity of reserpine. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 28, n.1, p. 44, 1966.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s27th. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2017.

CORRÊA, P. G.; MOURA, L. G. S.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, F. C. A.; AGUIAR, J. P. L.; ALELUIA, R. L.; SILVA, J. R. A. Chemical and nutritional characterization of *Ambelania duckei* (Apocynaceae) an unexplored fruit from the Amazon region. **Food Research International**, [S.L.], v. 163, p. 112290, 2023.

COSTA, M. J. R. **Determinação da Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos Totais em Óleos Essenciais**. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo, 2015.

COUTINHO, J. P. *et al.* ***Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites**. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

DARONCHO, M. **Quantificação da Atividade Antioxidante Através de Análises Pelos Métodos DPPH E ABTS**. 2012. Disponível em: <<http://www.unifra.br/eventos/seminarionutricao2012/Trabalhos/4392.pdf>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2024.

DASTOOR, N. J.; GORMAN, A. A.; SCHMID, H. Uber die Alkaloide von *Aspidosperma discolor* A. DC. **Helvetica Chimica Acta**, v. 50, n.1, p. 213–231, 1967.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DEUTSCH, H. F., EVENSON, M. A., DRESCHER, P., SPARWASSER, C., & MADSEN, P. O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 12, n.10, p. 1283-1287, 1994.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. rev. ampl. São Paulo: Editora UNESP, p.372-393, 2002.

DOLABELA, M.F., OLIVEIRA, S.G., PERES, J.M., NASCIMENTO, J.M.S., POVOA, M.M., OLIVEIRA, A.B. *In vitro* antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). **An. Acad. Bras. Ciênc.** v. 84, p. 899-910, 2012.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae *s.l.* **Botanical Review**, v. 66, p. 1-56, 2000.

FERREIRA, D. L. R. *et al.* **Plantas medicinais utilizadas em 9 comunidades rurais de Itacoatiara e aspectos anatômicos e histoquímicos de duas espécies (*Pogostemon cablin* Benth e *Tripogandra glandulosa* (Seub.) Rohw).** 2016.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Construindo a História dos Produtos Naturais. **MultiCiência**, 2006.

FURTADO, F. F. *et al.* Antihypertensive and Vasorelaxant Effects of the Ethanolic Extract From the Stem Bark of *Aspidosperma Tomentosum* Mart. **J App Pharm Sci**, v. 7, n. 10, p. 118-124, 2017.

GOMES, L. F. S. **Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmodica in vitro e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae).** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade Farmácia, Belém, 2011.

GRANATO, D. *et al.* Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2005.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. *et al.* Plant Alkaloids: structures and bioactive properties. **Plant-Derived Bioactives**, [S.L.], p. 85-117, 2020.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. Published on the Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Herbarium. [Retrieved 02 July 2024]

IPNI (2024). Índice Internacional de Nomes de Plantas. Publicado na Internet <http://www.ipni.org>. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University

Herbaria & Libraries e Australian National Herbarium. [Recuperado em 11 de setembro de 2024].

JORDÃO, L. G. **Atividade antimalárica in vitro de extratos, frações e substâncias isoladas de duas espécies vegetais da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Tradução André Olmos Simões et al. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KING, F. E.; GILKS, J. H.; PARTRIDGE, M. W. A Glycosidic Constituent of Vinca minor and its Identification as 3- β -D-Glucosyloxy -2-hydroxybenzoic Acid. **Journal of the Chemical Society**, p. 4206-4215, 1955.

KUMAR, S. *et al.* Structural characterization of monoterpene indole alkaloids in ethanolic extracts of Rauwolfia species by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n.6, p. 363-373, 2016.

KVIST, L.P.; CHRISTENSEN, S.B.; RASMUSSEN, H.B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of *Peruvian* plants used to treat malaria and leishmaniasis. **J. Ethnopharmacol**, v. 106, p. 390-402, 2006.

LAYNE, T. H. *et al.* Excelsinidine, A Quaternary Alkaloid from *Aspidosperma excelsum*. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 6, p. 1934578X0700200606, 2007.

LOPES, E. V. **Alcaloides indólicos monoterpénoides com atividade antimalárica de carapanaúba (*Aspidosperma excelsum* Benth)**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Amazonas, 2019.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 352p, 1998.

- MARTINS, G. V. *et al.* Estudo químico e avaliação das atividades antioxidante, antiacetilcolinesterase e antileishmanial de extratos de *Jatropha Gossypifolia* L.(Pião Roxo). **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, p. 21-36, 2018.
- MELO, A. C. O.; ORIEL, H. B.; LUCENA, E. M. P. "Látex de plantas da família Apocynaceae: Uma revisão." **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 8, e13910817192-e13910817192, 2021.
- MENDONÇA, A. C. A. M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Psychotria colorata* (Willd. Ex. R. & S.) Müll. Arg. E *P. Hoffmannseggiana* (R. & S.) Müll. Arg. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 2, p. 7-16, 2015.
- MESSIADES, D. M. D. S. **Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.**, 2014.
- MIET, C.; CROQUELOIS, G.; POISSON, J. Structure de deux methoxy-yohimbines, isolees de *Rauwolfia capuroni*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 6, p. 803–805, 1977.
- MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Anti-Oxidant Activity. Songk-ianakarin **J. Sci. Technol**, v. 26, p. 211–219, 2004
- MORALES, J. F. Estudios En Las Apocynaceae Neotropicales Xix:La Familia Apocynaceae S. Str. (Apocynoideae, Rauvolfioideae) De Costa Rica. **Darwiniana**, v. 43, n.1-4, p. 90-191, 2005.
- MOROKAWA, R.; SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S. Apocynaceae s. str. do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, p. 179-199, 2013.
- MOURA, M. D. B. DE; AGRA, M. DE F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos Estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, p. 273-279, 1989.
- NASCIMENTO, M. S. D. **Investigação fitoquímica e das atividades antioxidante e antiparasitária do extrato e frações de *Aspidosperma excelsum* Benth.** Dissertação

(Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2013.

NASCIMENTO, M. S. *et al.* In vitro antiplasmodial activity and identification, using tandem LC-MS, of alkaloids from *Aspidosperma excelsum*, a plant used to treat malaria in Amazonia. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 228, p. 99-109, 2019.

NOGUEIRA, P. C. DO N. **Estudo Cromatográfico, Espectroscópico e Farmacológico de Alcaloides Plumeranos das Sementes de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** 2014.

OLIVEIRA, B. *et al.* Spruceanumines A and B, novel plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n.4, p. 753–759, 2009.

OLIVEIRA, D. R.; KRETTLI, A. U.; AGUIAR, A. C.; LEITÃO, G. G.; VIEIRA, M. N.; MARTINS, K. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **J. Ethnopharmacol**, v. 173, p. 424–434, 2015.

OLIVEIRA, V. B. DE. **Alcalóides indólicos de *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE).** Tese (doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2009.

PACHECO BORGES, L.; ALVES AMORIM, V. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, 2020.

PELLETIER, S. W. **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives.** Volume 15, New York: USA, Willey. Pages 1-635, 2001.

PELLOTO, J. P.; DEL PERO, M. A. Flavonoids from *Aspidosperma Quebracho-blanco* leaves. **Fitoterapia**, v. 22, n.1, p. 88, 1995.

PEREIRA, A. S. S.; SIMÕES, A. O.; SANTOS, J. U. M. Taxonomy of *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae, Rauvolfioideae) in the State of Pará, Northern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 2, p. e20150080, 2016.

PEREIRA, F. A. N. **Caracterização química e atividade antitumoral in vitro da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em linhagem celular de câncer de ovário.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2019.

PEREIRA, M. DE M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. DE C.; ALVES, ROSEMEIRE B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970–983, 2007.

PEREZ, D. Etnobotânica medicinal y biocidas para malária en la región Ucayali. **Folia amazônica**, v. 13, p. 87-108, 2002.

PESSINI, G. L. **Atividade antimicrobiana e estudo químico bioguiado de espécies de *Aspidosperma*.** [tese: Doutorado em biotecnologia]. Universidade Federal de Alagoas, Maceió: Instituto de Química e Biotecnologia; 2015.

PINTO, A. Z.; ASSIS, A. F. S.; PEREIRA, A. G.; PASA, M. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no mercado do porto em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Flovet**, v. 5, p. 51- 70, 2013.

RAPINI, A. **Sistemática:** Estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. Instituto de Biociências, São Paulo, SP, USP, 2000.

RAPINI, A. Taxonomia "em construção": avanços na sistemática de Apocynaceae, com ênfase nas brasileiras Asclepiadoideae. **Rodriguésia**, v. 63, p. 075-088, 2012.

RE, R. *et al.* Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, E. F.; REIS, C. F.; CARVALHO, F. S.; ABREU, J. P. S.; ARRUDA, A. F.; GARROTE, C. F. D.; ROCHA, M. L. Diuretic effects and urinary electrolyte excretion induced by *Aspidosperma subincanum* and the involvement of prostaglandins in such effects. **J. Ethnopharm**, v.163, p. 142–148, 2015.

RODRIGUES, F. A. *et al.* Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **E. Biosfera**, v.13, n. 23, p. 870-887, 2016.

RUFINO, M. S. M. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa**, Comunicado técnico 125, 2006.

SALES, M. L. F. **Estudo fitoquímico de *Aspidosperma nitidum* (Benth)**. Dissertação (Mestrado em Química dos Produtos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, 2019.

SANTOS, S. P. D. dos. **Alcaloides indólicos de *Aspidosperma pyrifolium*: estudo fitoquímico e dados espectroscópicos**. Dissertação de Mestrado. Brasil, 2016.

SANTOS, S. P. D. dos. **Alcaloides indólicos de *Aspidosperma pyrifolium*: estudo fitoquímico e dados espectroscópicos**. Dissertação de Mestrado. Brasil, 2016.

SANTOS, S. R. *et al.* Toxicological and phytochemical studies of *Aspidosperma subincanum* Mart. stem bark (Guatambu). **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 12, p. 836-839, 2009.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROCICK, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 819-846, 2004.

SENNBLAD, B.; ENDRESS, M. E.; BREMER, B. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. **american Journal of Botany**, v. 85, n. 8, p. 1143-1158, 1998.

SILVA, A. F. *et al.* Monitoramento das aplicações químicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e0411426963-e0411426963, 2022.

SILVA, L. F. R. **Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: estudos *in vitro*, *in vivo* e de**

mecanismo de ação. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 6^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRS/ UFS. 2010.

SOARES, N. *et al.* Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **E. Biosfera**, v. 13, n. 24, 2016.

SOUSA, C. C. **Avaliação das propriedades farmacológicas de complexos de rutênio (III) conjugados com as naftoquinonas lapachol ou atovaquona como candidatos a fármacos antimaláricos.** Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, 2021.

SOUZA, A. C. M. *et al.* **Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*:** In: 29^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, Adaltech, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG IV** (4a ed.) Jardim Botânico Plantrum, 2019.

TAVARES, J. F. *et al.* Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 115-118, 2005.

TAVARES, M. S. S.; RAMOS, M. I. L. **Atividade Antioxidante de Frutos do Cerrado e do Pantanal, do Estado de Mato Grosso do Sul:** Padronização de Metodologias. 2008. Disponível em: <
<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=490>>. Acesso em 18 de dezembro de 2023.

TRINDADE, R. C. S.; KIKUCHI, T. Y. S.; SILVA, R. J. F.; VALE, V. V.; OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; COELHO-FERREIRA, M. R. Estudo farmacobotânico das folhas de *Aspidosperma excelsum* Benth. (Apocynaceae). **Revista Fitos**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 238-253, 2016.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4113–4117, 1998.

VERPOORTE, R. *et al.* Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Med.**, v. 48, p. 283-289, 1983.

VIEIRA, E. D. O. G.; FERNANDES, R. M. T. Efeitos tóxicos de plantas medicinais comercializadas in natura no Município de São Luís/MA: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 5, p. e55910514821, 2021.

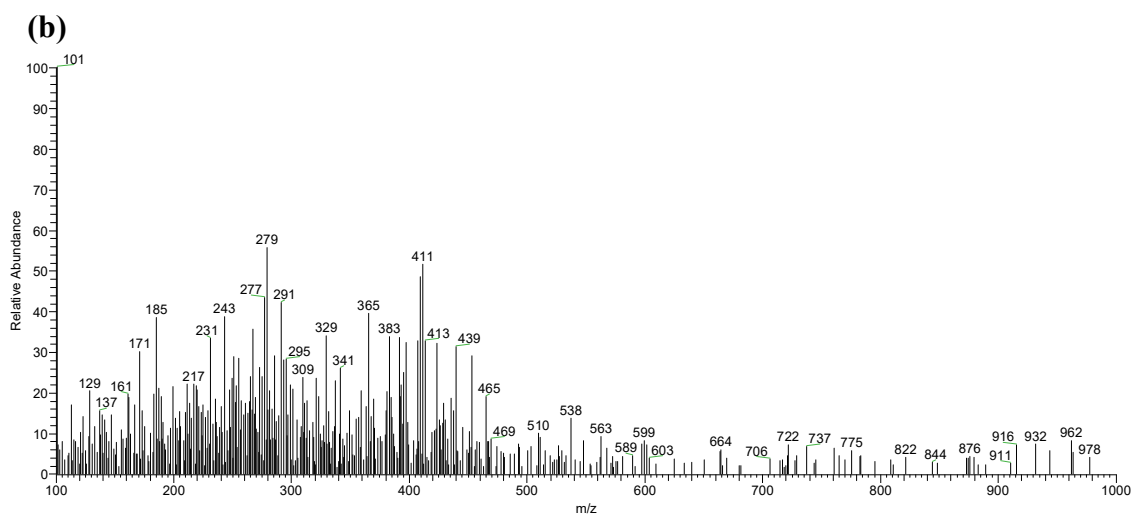
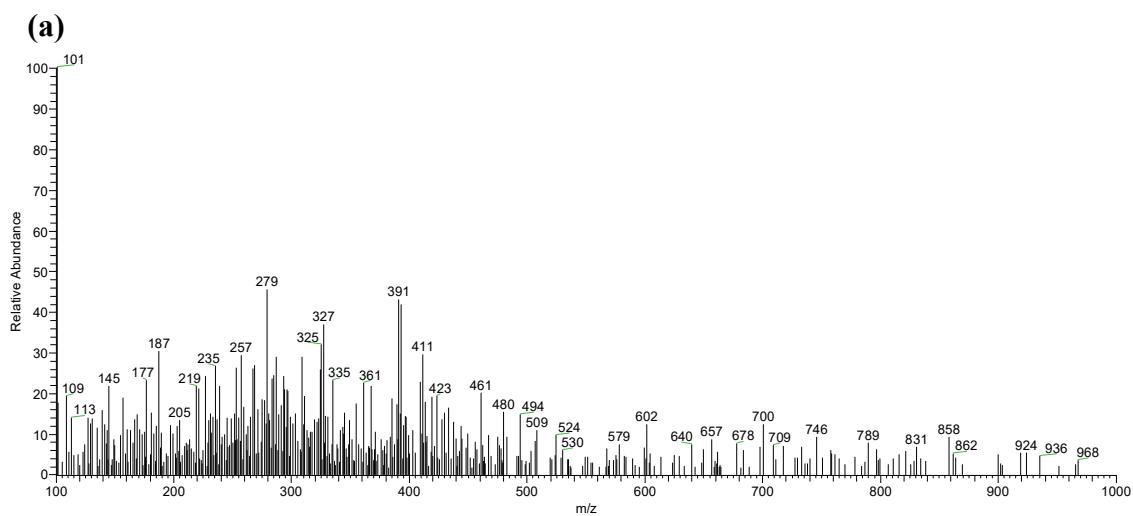
VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. 2010.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543, 2001.

BHADANE, B. S.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V. L.; PATIL, R. H. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 7, p. 1181–1210, 2018.

ANEXO A

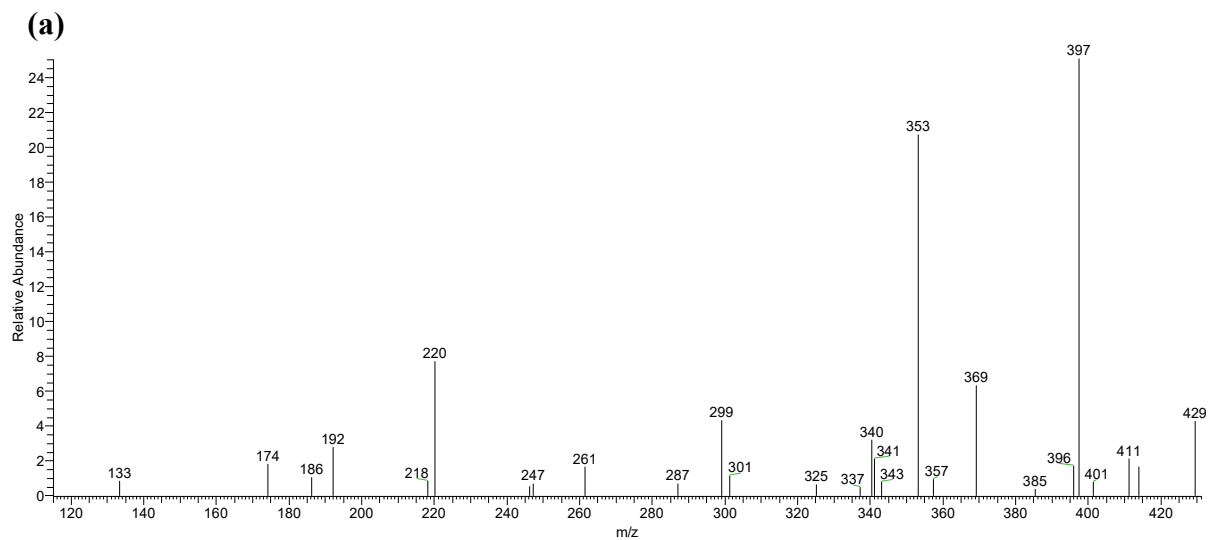
Espectro de massas em *FullScan* dos extratos brutos de *A. excelsum* no modo positivo. (a) EH-Aex, modo positivo. (b) EM-Aex, modo positivo.



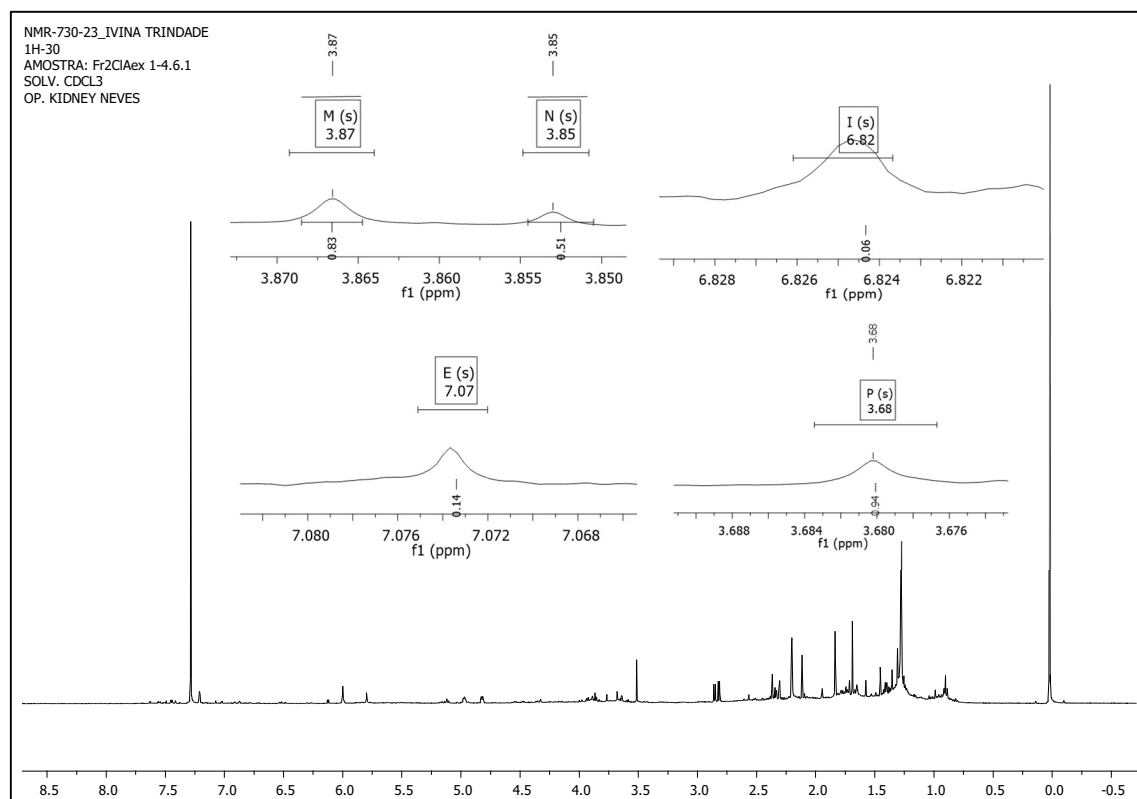


ANEXO C

**Espectro de Massas (a) e de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da
substância (b) codificada como Fr2ClAex 1-4.6.1**



(b)



ANEXO D

**Espectro de Massas (a) e de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da
substância (b) codificada como CFr1ClAex52**

