

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SEMI-SÍNTESE DE DERIVADOS DA ELIPTICINA E
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE ISOLADOS E INFUSÕES
DE *Aspidosperma vargasii***

ANDREIA MONTOIA

Manaus – AM

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SEMI-SÍNTESE DE DERIVADOS DA ELIPTICINA E
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE ISOLADOS E INFUSÕES
DE *Aspidosperma vargasii***

ANDREIA MONTOIA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração de Química Orgânica.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Co-orientador: Dr. Rodrigo César das Neves Amorim

Manaus-AM

2013



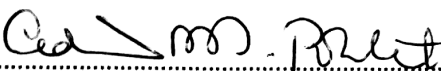
ANDREIA MONTOIA

**SEMI-SÍNTESE DE DERIVADOS DA ELIPTICINA E ATIVIDADE
ANTIMALÁRICA DE ISOLADOS E INFUSÕES DE
*Aspidosperma vargasii***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração de Química Orgânica.

Aprovado em 08 de março de 2013

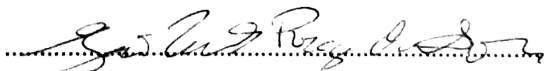
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. *Adrian Martin Pohlit* – Presidente (INPA)



Prof. Dr. *Marcos Batista Machado* – Membro (UFAM)



Prof. Dr. *João Vicente Braga de Souza* – Membro (INPA)

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais que se dedicaram e se sacrificaram muito para que eu pudesse chegar até aqui, ao meu noivo Jose Antônio de Melo Salvador, por seu amor, paciência e companheirismo e a todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Primeiramente a Deus por me dar força e fé nos momentos mais difíceis.
- ✓ Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit, pela amizade, orientação, confiança que influenciaram minha formação acadêmica.
- ✓ Ao Dr. Rodrigo César das Neves Amorim, pela co-orientação.
- ✓ A Dra. Marycleuma Henrique Campos e Prof. Angelo da Cunha Pinto, que gentilmente cederam amostras, que enriqueceram este trabalho.
- ✓ Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes, Lucas Sartori (doutorando) e José Carlos Tomaz (especialista em Espectrometria de Massas) da USP-Ribeirão Preto, por ceder espaço em seu laboratório para análises usando CLAE-DAD-Vis e ajuda dispensada.
- ✓ Aos meus amigos de laboratório (LAPAAM) do INPA que tive o prazer de conhecer e conviver nos últimos anos (Magno, Kettlellin, Rita Cynara, Andreza, Banny, Tiago, Suniá, Patrícia, Ellen, Paula, Renata, Viviane, Berna).
- ✓ Ao professor Dr. Marcos Nogueira Eberlin (UNICAMP) e a Rita de Sousa Zaccardi (especialista em espectrometria UPLC-MS) pelas análises e espectros de massas e RMN, os quais contribuíram para finalização deste trabalho.
- ✓ Ao doutorando Luiz Francisco Rocha e Silva (Fundação de Medicina Tropical), pelas análises *in vitro* e *in vivo* das minhas amostras.
- ✓ Ao professor Dr. Valter F. Andrade-Neto (UFRN), por ceder espaço e animais para realização dos testes *in vivo*. A Gracielle (mestranda) pela amizade e assistência nas análises realizadas na UFRN.

- ✓ A Dra. Márcia Rubia do laboratório de Malária e Dengue (INPA), pelo treinamento em teste *in vitro*.
- ✓ Ao Dr. Emerson Silva Lima e colaboradores (UFAM- Farmácia), pela realização dos testes citotóxicos.
- ✓ Aos órgãos de fomento CNPq e FAPEAM: PRONEX- Rede Malária (coordenador Prof. Lin Chau Ming-UNESP), Rede Malária e à Rede Bionorte (ambos coordenados por Dr. Wanderli P. Tadei).
 - ✓ Ao CNPQ, do qual sou bolsista.

Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Montoia, Andreia

M798s Semi-síntese de derivados da elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusões de *Aspidosperma vargasii* / Andreia Montoia. - Manaus: UFAM, 2013.
107 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Orientador: Adrian Martin Pohlit

Co-orientador: Rodrigo César das Neves Amorim

1. *Aspidosperma vargasii* 2. Antimaláricos 3. Malária – Tratamento
4. Elipticina 5. Plantas medicinais I. Pohlit, Adrian Martin (Orient.) II. Amorim, Rodrigo César das Neves (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007): 582.923.5:616.936(043.3)

O segredo do sucesso é a constância do propósito.

RESUMO

O aumento de casos de resistência aos antimaláricos comuns cloroquina e TCA (Tratamentos Combinados baseados na Artemisinina) favorece a busca por novas substâncias com atividade antiplasmodial. Em 2007, o Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) descobriu a atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* do alcaloide indólico elipticina (**10**). Um levantamento bibliográfico revelou que diversos alcaloides indólicos de estruturas relativamente simples possuem atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. No presente estudo, substâncias relacionadas estruturalmente a **10** foram obtidas por isolamento ou semi-síntese e sua atividade antimalárica *in vitro* foi investigada. **10** e 2-metil-1, 2, 3, 4-tetraidroelipticina (**12**) foram isoladas a partir dos extratos alcalinos das cascas de carapanaúba (*Aspidosperma vargasii*, Apocynaceae) por cromatografia em coluna. Análise por UPLC-ESI-MS revelou a presença de **10** e **12** em uma infusão das cascas de *A. vargasii*. As reações de nitração (HNO_3/HOAc) e bromação ($\text{Br}_2/\text{CHCl}_3$) utilizando **10** como material de partida levou à formação dos produtos de substituição eletrofílica aromática 7-nitroelipticina (**20**, substância inédita) e uma mistura 3:1 de 7,9-dibromoelipticina (**17**, substância inédita) e 9-bromoelipticina (**18**), respectivamente. Todas as substâncias inibiram a cepa K1 de *P. falciparum in vitro* apresentando valores de IC_{50} de 0,19 (**10**); 1,10 (**12**); 0,43 (**20**) e 0,30 (**17+18**) $\mu\text{g/mL}$. As substâncias **10**, **12**, **17**, **18** e **20** não exibiram toxicidade para fibroblastos humanos ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$). **10** via oral exibiu elevada atividade *in vivo* no teste de supressão de 4 dias contra *P. berghei* em camundongos e inibiu em 92 % a parasitemia no quinto dia na dose de 10 mg/kg/dia. Futuramente, **17**, **18** e **20** deverão ser preparados em maior quantidade e avaliados para atividade antimalárica *in vivo*.

Palavras-chave: elipticina, 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina, 7-nitroelipticina, 7,9-dibromoelipticina, 9-bromoelipticina, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, malária.

ABSTRACT

The growing number of cases of resistance to the common antimalarials chloroquine and the ACTs (artemisinin-based combined therapy) favors the search for new substances with antiplasmodial activity. In 2007, the Amazonian Active Principles Laboratory (LAPAAM) at the National Institute for Amazon Research (INPA) discovered the *in vitro* antimalarial activity of the indole alkaloid ellipticine (**10**) against *Plasmodium falciparum*. A bibliographic search revealed that many indole alkaloids of relatively simple structure exhibited *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. In the present study, substances that are structurally related to **10** were obtained by isolation or semi-synthesis and their *in vitro* antimalarial activity was investigated. **10** and 2-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroellipticine (**12**) were isolated from the alkaline extracts of the bark of carapanaúba (*Aspidosperma vargasii*, Apocynaceae) by column chromatography. UPLC-MS analysis revealed the presence of **10** and **12** in an infusion of *A. vargasii* bark. Nitration (HNO₃/AcOH) and bromination (Br₂/CHCl₃) reactions using **10** as starting material formed electrophilic aromatic substitution products 7-nitroellipticine (**20**, new substance) and a 3:1 mixture of 7,9-dibromoellipticine (**17**, a new substance) and 9-bromoellipticine (**18**), respectively. All substances inhibited the K1 strain of *P. falciparum* *in vitro* as evidenced by IC₅₀ values 0,19 (**10**), 1,10 (**12**), 0,43 (**20**) and 0,30 (**17+18**) µg/mL. Compounds **10**, **12**, **17**, **18** and **20** were not cytotoxic to human fibroblasts (IC₅₀ > 50 µg/mL). **10** administered by mouth was highly active in the 4 day suppressive test against *Plasmodium berghei* in mice and inhibited parasitemia by 92% on the 5th day at a dose of 10 mg/kg/day. In the future, **17**, **18** and **20** will be prepared in larger quantity and evaluated for *in vivo* antimalarial activity.

Keywords: ellipticine, 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroellipticine, 7-nitroellipticine, 7,9-dibromoellipticine, 9-bromoellipticine, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, malaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial da ocorrência da malária	18
Figura 2. Gráfico com dados do Índice Parasitário Anual das áreas endêmicas no período de 2010 e 2011.	19
Figura 3. Proporção de casos de malária em relação aos três tipos de protozoários presentes no Brasil, entre 2010/2011.....	20
Figura 4. Ciclo de vida de espécies de <i>Plasmodium</i>	22
Figura 5. Compostos 4-aminoquinolínicos quinina (1), cloroquina (2) e mefloquina (3).....	23
Figura 6. Estrutura da artemisinina (4), derivado semi-sintético 5 e análogo sintético 6	24
Figura 7. Alguns alcalóides que já foram isolados de espécies do gênero <i>Aspidosperma</i>	25
Figura 8. Sementes, folhas e tronco de <i>Aspidosperma vargasii</i>	26
Figura 9. Classe das olivacinas e elipticinas isoladas a partir de <i>Aspidosperma vargasii</i>	27
Figura 10. Classes de alcalóides derivados do aminoácido triptofano.	28
Figura 11- Biogênese para a obtenção elipticina a partir da stemmadenina.....	29
Figura 12. Criptolepina (10) e seus derivados bromados 14, 15 e 16.	33
Figura 13. Resumo da rota sintética de Cranwell e Saxton (1962) para produção da elipticina.	35
Figura 14. Rota sintética para obtenção de derivados 8-substituídos a partir do 1,4-dimetil-carbazol	36
Figura 15. Fracionamento da fração MHV8.....	41
Figura 16. Fracionamento da fração AMV8-37A	42
Figura 17. Fracionamento das frações MHV8C-37B e MHV8C-41.3	43
Figura 18. Sistema para a reação de bromação da elipticina e procedimento pós-reacional.....	45
Figura 19. Experimento para reação de acetilação e evaporação do produto	46
Figura 20. Garrafa com o meio de cultura e o <i>Plasmodium</i> , microplacas de teste na câmara incubadora e análise de um esfregaço no microscópio.....	48

Figura 21. Administração das drogas, utilizando as vias oral e subcutânea.	49
Figura 22. HRMS da elipticina C ₁₇ H ₁₄ N ₂ ⁺ (Sigma-Aldrich), HR-ESI-MS-XEVO, [M+H] ⁺ m/z 247,1222.....	51
Figura 23. HRMS da olivacina isolada C ₁₇ H ₁₄ N ₂ ⁺ , HR-ESI-MS-XEVO, [M+H] ⁺ m/z 247,1222.	52
Figura 24. Espectrograma UPLC-ESI-MS da ioimbina (Sigma-Aldrich), 2-metil-1, 2,3 4-tetrahydroelipticina (natural), elipticina (Sigma-Aldrich), olivacina (natural), respectivamente.	52
Figura 25. Espectrograma UPLC-ESI-MS do 2-metil-1, 2,3 4-tetrahydroelipticina (natural) (12) e elipticina natural (10), respectivamente.	54
Figura 26. Espectro MS-MS da elipticina (10), selecionando a fragmentação dos principais m/z 247,5; 231,3; 204,1.....	54
Figura 27. Espectro MS-MS da substância 12, selecionando a fragmentação dos principais m/z 265,5, 236, 3 e 222,4.....	55
Figura 28. Ampliação da região aromática do espectro de RMN ¹³ C (150MHz) em CD ₃ OD do composto 12.	56
Figura 29. Ampliação da região δ 8-64 de RMN ¹³ C (150MHz) em CD ₃ OD do composto 12. As impurezas (x) são DCM e CD ₃ OD.....	57
Figura 30. Região de δ 2,40 a 3,80 do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em CD ₃ OH do composto 12.....	58
Figura 31. Ampliação da região de δ 7,0 a 7,35 do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em CD ₃ OH do composto 12.	59
Figura 32. Ampliação da região de δ 6,9 a 8,30 do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em CD ₃ OH do composto 12.	59
Figura 33. Estrutura numerado do 2-metil 1,2,3,4-tetrahydroelipticina (12)	61
Figura 34. Bromação de 1,4 dimetil-carbazol por Dracynský <i>et al.</i> (2007).	62
Figura 35. Produtos previstos <i>a priori</i> na bromação direta da elipticina.	63
Figura 36. A quindolina e seu derivado bromado, descrito por Holts e Pettrow (1947)	64
Figura 37. Cromatograma UPLC-ESI-MS da mistura de bromados.....	65
Figura 38. Espectro de massas UPLC-ESI-MS do produto monobromado 18.....	65
Figura 39. Espectro de massas UPLC-ESI-MS do produto dibromado 17.....	66

Figura 40. Mecanismo de reação para a formação dos produtos bromados.	66
Figura 41. Ampliação d faixa de δ 2,72 a 3,20 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 da mistura de bromados.	67
Figura 43. Ampliação das regiões referentes ao anel piridínicos do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 da mistura de bromados.	68
Figura 44. Ampliação do anel substituído do espectro de RMN ^1H da mistura de bromados.	69
Figura 45. Região de δ 8,08 a 8,13 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 da mistura de bromados.	70
Figura 47. 9-dibromoelipticina com os deslocamentos, multiplicidades e constantes de acoplamento de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6).	71
Figura 48. Produto obtido por Dracinsky e colaboradores (2007)	72
Figura 49. Cromatograma UPLC-ESI-MS e estrutura de possíveis produtos nitrados.	73
Figura 50. Região de δ 2,20 a 3,60 do espectro de RMN ^1H da substância 18 (DMSO- d_6 , 500 MHz).	74
Figura 51. Região de δ 7,4 a 11,6 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 do produto nitrado 18.	74
Figura 52. Ampliações dos picos de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 correspondentes aos hidrogênios piridínicos do produto mononitrado.	75
Figura 53. Ampliação do espectro de RMN ^1H da região dos hidrogênios indólicos do produto mononitrado	76
Figura 54. Estrutura do 7-nitroelipticina, com os deslocamentos, multiplicidade e constante de acoplamento de RMN ^1H , 500 MHz em DMSO- d_6	77
Figura 55. Mecanismo de reação para formação de 7-nitroelipticina.	77
Figura 56. Cromatograma UPLC-ESI-MS do produto da reação de acetilação da elipticina.	79
Figura 57. Alguns produtos possíveis para a reação de acetilação.	80
Figura 58. Estrutura do N-óxido obtido por Boogaard <i>et al.</i> (1994).	81
Figura 59. Espectro de massas UPLC-ESI-MS por infusão direta da mistura reacional de formação do N-óxido.	81

Figura 60. Alcaloides usados como padrão para determinação do perfil cromatográfico das <i>Aspidospermas</i>	82
Figura 61. Cromatograma UPLC-ESI-MS da infusão das cascas de <i>A.vargasii</i> , utilizando os solventes H ₂ O + 0,1 HCOOH:MeOH e o mix dos padrões 7,10,12,e 27.	83
Figura 62. Estrutura de dos alcaloides indólicos 3,4,5,6-tetradésidroioimbina sendo com <i>m/z</i> 357 e o razinilam <i>m/z</i> 281.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN ^1H (500 MHz) para o 9-bromoelipticina e 7,9-bromoelipticina em comparação com dados da Literatura.	71
Tabela 2. Comparação dos dados de RMN ^1H 500 MHz, solvente DMSO- <i>d</i> 6 com literatura para o 7-nitroelipticina (20).....	78
Tabela 3. Inibição do crescimento <i>in vitro</i> da cepa K1 de <i>P. falciparum</i>	85
Tabela 4. Resultados dos ensaios para o teste <i>in vivo</i> contra <i>P. berghei</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS

2AMV8-50.1	Fração de pH 8 de <i>Aspidosperma vargasii</i>
AMV8C-1.3	Fração de pH 8 de <i>Aspidosperma vargasii</i>
AMV8C-37A	Fração de pH 8 de <i>Aspidosperma vargasii</i>
AMV8C-37B	Fração de pH 8 de <i>Aspidosperma vargasii</i>
AMV8C-41.2	Fração de pH 8 de <i>Aspidosperma vargasii</i>
c.a	Cerca de
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CC	Cromatografia de Coluna
CCDP	Cromatografia de Camada Delgada Preparativa
δ	Deslocamento
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HR-MS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (High Resolution Mass Spectrometry)
ESI	Ionização por Eletrospray (Electrospray Ionization)
FVS-AM	Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas
IC ₅₀	Concentração inibitória mediana
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IPA	Índice de Parasitemia Anual
K1	Cepa de <i>P. falciparum</i>
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
m/z	Relação massa/carga
M-CPBA	Ácido 3-meta-cloroperoxybenzóico
MEOH	Metanol
MS	Espectrometria de Massas
OMS	Organização Mundial da Saúde
SVS	Sistema de Vigilância da Saúde
R _F	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica

TCA	Terapias combinadas de Artemisinina
TOF	Tempo de voo
TIC	Cromatogramas de íons totais (Total Ion Chromatogram)
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UPLC	<i>Ultra-High Pressure Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.1 Malária.....	20
1.2 Ciclos da Malária	21
1.3 Antimaláricos	22
1.4 <i>Aspidosperma</i> spp.....	24
1.4.1 <i>Aspidosperma vargasii</i>	26
1.5 Alcalóides	27
1.5.1 Alcalóides com Atividade Antimalárica.....	29
1.5.2 Elipticina.....	32
1.5.3 Análogos da elipticina com relevância para este trabalho.....	33
1.6 Síntese	34
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 MATERIAIS.....	38
3.1 Alcalóides indólico	38
3.2 MÉTODOS	38
4 METODOLOGIA	40
4.1 Análise para verificaR a pureza da elipticina, olivacina e ioimbina.....	40
4.2 isolamento da elipticina e 2-metil-1, 2, 3,4-TETRAIDROELIPTICINA.....	40
4.2.1 Fracionamento Cromatográfico da fração MHV8 (pH 8)	41
4.2.2 Fracionamento da fração AMV8C-37A (elipticina)	41
4.2.3 Recristalização da amostra AMV8C-41.2 (elipticina)	42
4.2.4 Fracionamento das frações AMV8C-37B e MV8C-41.3 (10-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina).....	42
4.2.5 Recristalização da fração 2AMV8-50.1 (10-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina).....	43
4.3 Reações	43
4.3.1 Bromação.....	44
4.3.2 Nitração.....	45

4.3.3	Acetilação.....	46
4.3.4	Tentativa de Síntese de N- Óxidos da Elipticina	47
4.4	Análise cromatográfica de infusões de <i>Aspidosperma vargasii</i>	47
4.5	Ensaio biológicos.....	48
4.5.1	Teste <i>in vitro</i>	48
4.5.2	Teste <i>in vivo</i>	49
4.6	Análises UPLC-MS e HRMS	50
4.7	Análises de RMN.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Testes de pureza da elipticina, olivacina, ioimbina e ALCALÓIDE 12.....	51
5.2	Caracterização dos alcaloides isolados (substâncias 10 e 12)	53
5.2.1	Análises dos dados obtidos para elipticina.....	53
5.2.2	Análise dos dados obtidos para 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina.....	55
5.3	Reação	61
5.4	Bromação	62
5.5	Nitração	72
5.6	Acetilação	78
5.7	N-óxido	80
6	Análise por UPLC-ESI-MS da infusão das cascas de <i>Aspidosperma vargasii</i>	81
7	Ensaio <i>in vitro</i>	84
8	Ensaio <i>in vivo</i>	85
9	Conclusão	87
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXOS	97

INTRODUÇÃO

A malária é considerada um dos mais graves problemas de saúde pública em todo mundo, ocorrendo em mais de 100 países e territórios, principalmente em regiões de clima subtropical e tropical. Atualmente as situações mais graves se concentram na África subsaariana. Em todo mundo cerca de 500 milhões de pessoas são infectadas, a doença chega a matar entre 1,5 a 2,7 milhões de pessoas ao ano, sendo a maioria crianças (OMS, 2010).

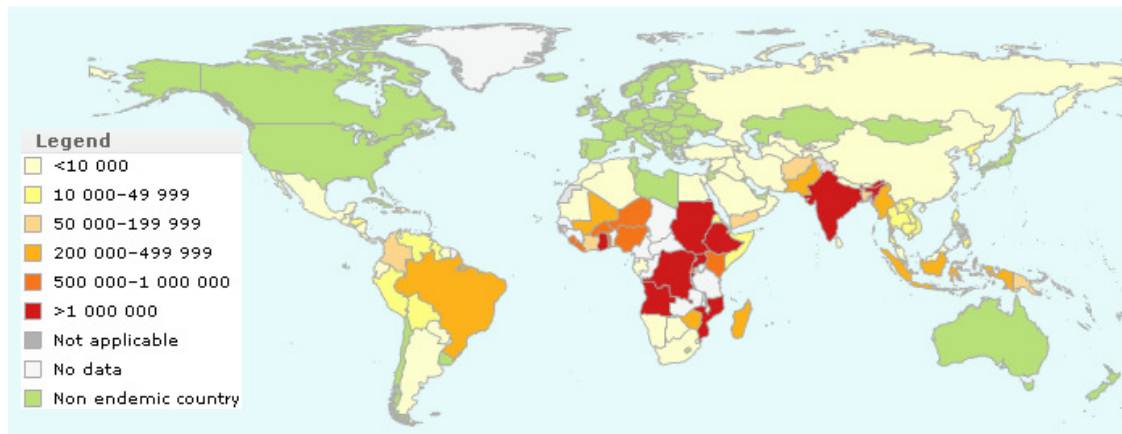


Figura 1. Mapa mundial da ocorrência da malária. (fonte: OMS, 2010)

Os países que mais sofrem com a malária carecem de estrutura e financiamento necessários para combater a doença e o vetor. Segundo o Relatório Mundial da Malária (2010), o financiamento internacional para o controle da malária cresceu consideravelmente na última década. Em 2010, países como os Estados Unidos chegaram a desembolsar cerca de 1,8 bilhões de dólares destinados a medidas preventivas e tratamento da doença, sendo grande parte deste valor destinado aos países epidêmicos da África.

No Brasil, a região de maior risco localiza-se na Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre (AC), Amapá (AP), Amazonas (AM), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Segundo dados do Ministério da Saúde, entre o período de 2000 a 2011, 99,7% dos casos de malária registrados no país, foram nesta região. Neste mesmo período foram notificados, cerca de 420 mil casos por ano (Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2013). O risco de

infecção em cada região é medido pela Incidência Parasitária Anual (IPA) que analisa o número de exames positivos, a cada mil habitantes, em um determinado intervalo de tempo. Este índice classifica as áreas de transmissão em regiões de alto risco para valores igual ou superiores a 50, médio quando o IPA está na faixa de 10,0 a 49,9, e baixo risco associado a valores de até 9,9. Segundo Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde e Ministério da Saúde (2013), na coleta de dados do período entre 2010 – 2011, nenhum dos estados brasileiros foi classificado como região de alto risco. No entanto os estados do Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima ainda possuem IPA elevados (Figura 2).

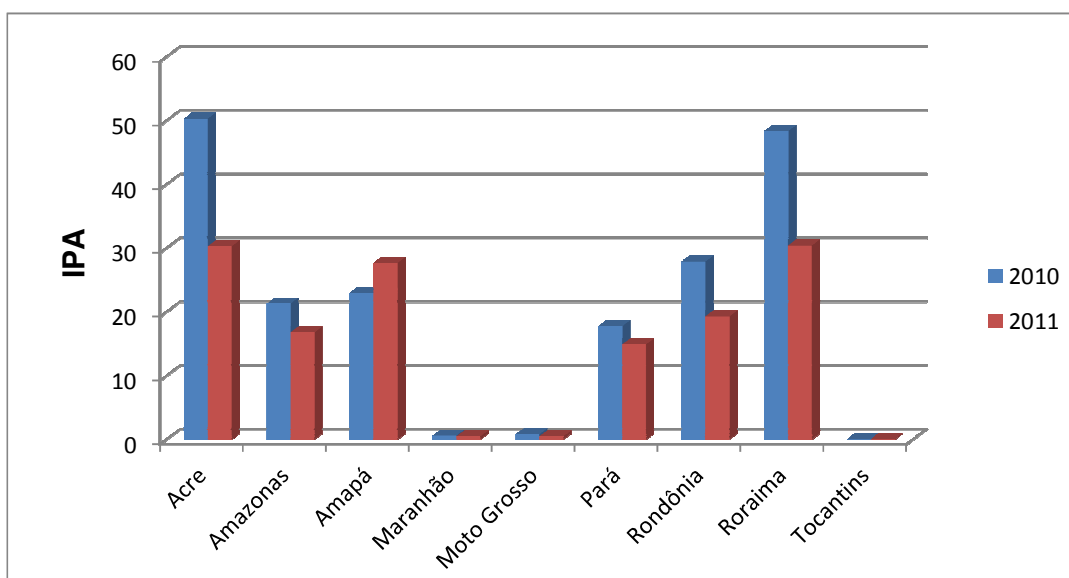


Figura 2. Gráfico com dados do Índice Parasitário Anual das áreas endêmicas no período de 2010 e 2011. [Fonte: Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2013].

Para amenizar o grande número de casos nesta região, é importante o desenvolvimento de novas pesquisas. Atualmente o número de estudos na área, vem crescendo consideravelmente, seguindo esta tendência, esse trabalho teve enfoque em produtos naturais e derivados semi-sintéticos preparados a partir da elipticina com atividade antimalárica. O primeiro relato sobre a atividade antiplasmodial da elipticina foi publicado em 2007, por Andrade-Neto e colaboradores, no qual foi comprovado que a substância possui excelente atividade em teste *in vitro* contra cepas de *Plasmodium falciparum*.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa, cujos principais sintomas são ataques de febre, com temperaturas acima de 40 °C, seguidas de calafrios, tremores e intensas dores de cabeça, além de náuseas, delírios e dores gástricas (Manual de diagnósticos da malária, 2009). A doença é causada por protozoários unicelulares do gênero *Plasmodium*. A transmissão dos parasitos ocorre por meio da picada da fêmea infectada do mosquito do gênero *Anopheles*. Os sintomas começam a aparecer entre 10 e 12 dias após a picada. Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium*, mas apenas cinco espécies podem causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Singh, 2009). No Brasil, somente as espécies *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* são encontrados. Dados recentes da Secretaria de Vigilância da Saúde e Ministério da Saúde (2013) mostram que entre 2010/2011, dos casos notificados na região amazônica, a grande maioria ocorreu por contaminação pelo *P. vivax*, como pode ser visto na figura 3.

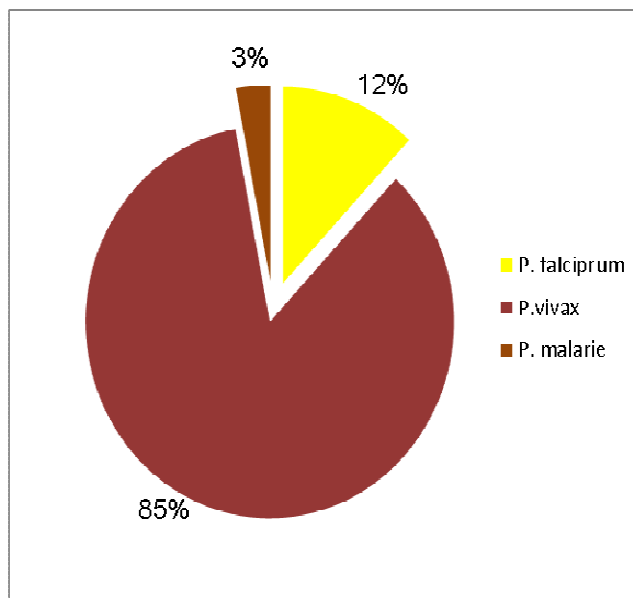


Figura 3. Proporção de casos de malária em relação aos três tipos de protozoários presentes no Brasil, entre 2010/2011. (Fonte: Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2013)

As porcentagens de cada espécie de *Plasmodium* são semelhantes em outras regiões do país. A doença causada pelo *P. vivax* é considerada de baixo risco, porém, têm gerado preocupações aos órgãos públicos devido ao crescente número de relatos do aumento da gravidade clínica e de resistência dos protozoários aos antimaláricos atuais. A malária causada pelo *Plasmodium falciparum* é o tipo mais grave, cujo principal sintoma é a destruição dos glóbulos vermelhos, provocando estados anêmicos e em alguns casos levando à morte (Valente, 2010).

1.2 CICLOS DA MALÁRIA

A malária humana apresenta dois ciclos de reprodução, um sexuado que acontece no mosquito e outro assexuado que ocorre no hospedeiro vertebrado (Figura 4). No ciclo sexuado ocorre a diferenciação dos merozoítos em gametas machos e fêmeas, a partir daí inicia-se a reprodução sexuada ou esporogônica, que ocorre no estômago do inseto. Através do cruzamento dos gametas ocorre a formação do zigoto, que origina o oocineto. Esse último migra até a parede do intestino do inseto, e forma o oocisto, onde haverá a formação dos esporozoítos. Este ciclo tem tempo de duração em média de 11 dias, dependendo da espécie do *Plasmodium*. Depois de formados, os esporozoítos migram até as glândulas salivares do mosquito e ficam prontos para serem transferidos para o hospedeiro vertebrado (Manual de diagnósticos da malária, 2009)

O ciclo assexuado, também denominado ciclo esquizogônico, ocorre no hospedeiro vertebrado e se divide em duas fases: pré-eritrocítico e eritrocítico. Através da picada do mosquito infetado ocorre a inoculação dos esporozoítos, que migram pela corrente sanguínea até atingirem os hepatócitos, dando início a fase pré-eritrocítico. Nesta etapa ocorre a formação dos esquizontes, que rompem os hepatócitos e liberam os merozoítos na corrente sanguínea. O tempo de duração desta fase varia dependendo da espécie do *Plasmodium*. Após terem sido liberados, os merozoítos se alojam nas hemácias iniciando a segunda fase do ciclo, o chamado de ciclo eritrocítico ou sanguíneo. No interior das hemácias o parasito se desenvolve num período que varia entre 48 e 72 h, decorrido o tempo necessário para a maturação ocorre a ruptura das hemácias e a liberação de novos parasitos na

corrente sanguínea. Esta fase do ciclo explica a periodicidade dos sintomas da malária nos pacientes contaminados (França *et al.*, 2008).

Alguns merozoítos sofrem modificações se transformando em gametócitos machos e fêmeas, estes gametócitos tornam-se infectantes aos mosquitos, para que ocorra a perpetuação da espécie.

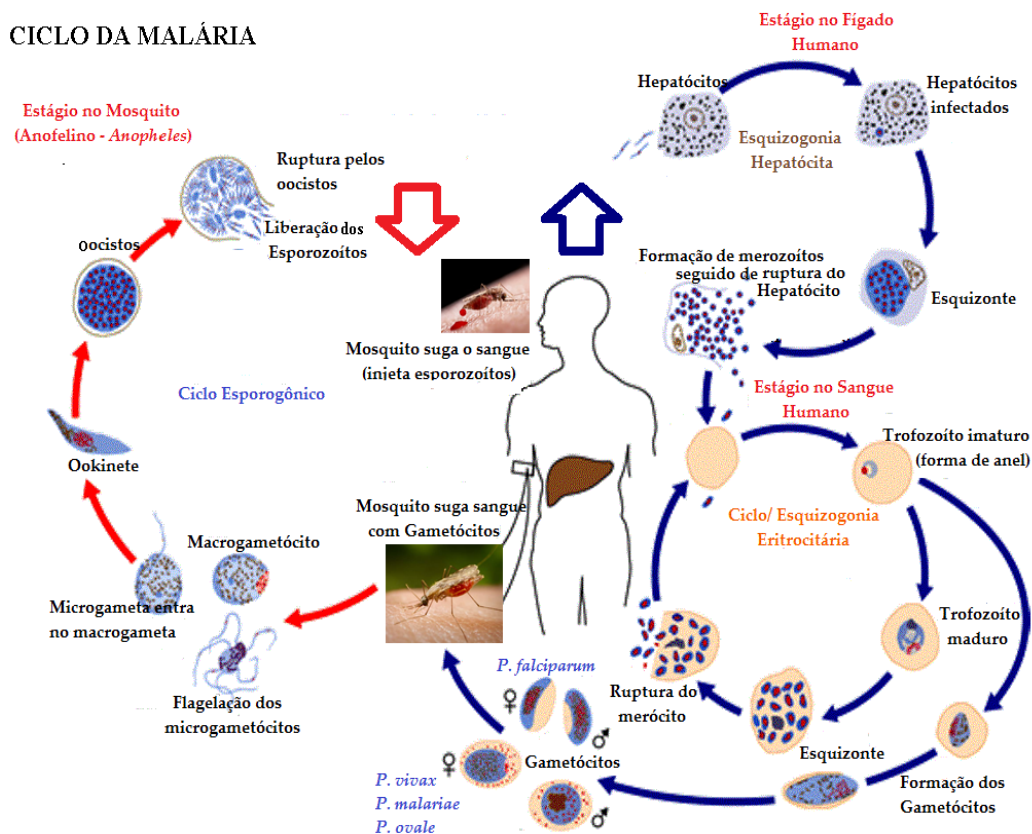


Figura 4. Ciclo de vida de espécies de *Plasmodium* [Adaptado de França *et al.*, 2008].

1.3 ANTIMALÁRICOS

Os principais antimaláricos utilizados atualmente apresentam em sua estrutura o esqueleto quinolínico. Essa subestrutura é encontrada na quinina e tem origem biossintética no aminoácido triptofano. Esse último, após sofrer uma descarboxilação, origina a triptamina, que para dar origem ao grupo quinolínico perde do grupo amino e rompe o anel indólico gerando um anel de seis membros, característicos desta classe (Dewick, 2002).

Entre os antimaláricos pertencentes ao grupo dos quinolínicos, que também são chamados de alcaloides 4-aminoquinolínicos, destaque-se a quinina (**1**), cloroquina (**2**) e mefloquina (**3**). **1** é um alcalóide que foi isolado pela primeira vez em 1829, das cascas da "cinchona" (*Cinchona* spp.) que tem origem em Peru e Bolívia e depois as sementes foram levadas para estabelecer plantios fora da América do Sul. Por volta de 1944, dois químicos americanos, Robert B. Woodward e William Von Eggers Doering (Azevedo, 2004), sintetizaram o composto **1** em laboratório, foi a primeira vez que uma molécula com tamanha complexidade teve sua síntese completa. Apesar da síntese total, devido à complexidade e custos associados à síntese, **1** hoje é obtido por isolamento de extratos das cascas de *Cinchona* spp.. Antimaláricos **2** e **3** são fármacos sintéticos. Atualmente **2** é a droga mais utilizada contra a malária em todo mundo. O crescente número de casos relatando o aparecimento de cepas de *Plasmodium* spp. Resistentes a essas drogas, tem sugerido que novas pesquisas sejam desenvolvidas, visadas descobertas de terapias alternativas.

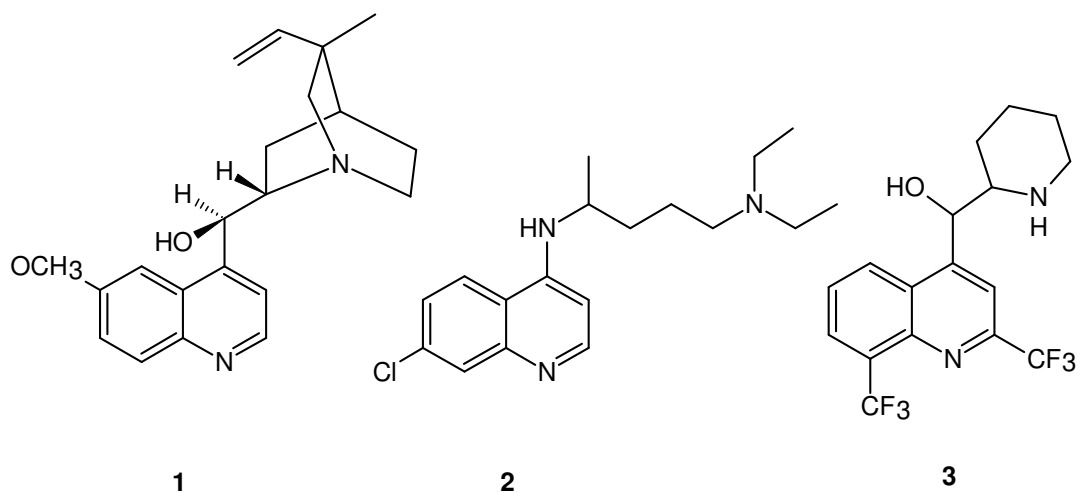


Figura 5. Compostos 4-aminoquinolínicos quinina (**1**), cloroquina (**2**) e mefloquina (**3**) (Francisco e Vargas, 2010).

Desde 2005, a Organização Mundial da Saúde passou a recomendar o uso das TCAs (terapias combinadas baseadas na artemisinina) a todos os países nos quais, existam casos de resistência à cloroquina. Essa combinação tem sido clinicamente eficaz até o momento, porém, pelo histórico associado a tratamentos antimaláricos é possível prever que é apenas uma questão de tempo até para novos

parasitas resistentes apareçam (Ekland *et al.*, 2008). A artemisinina (**4**) é uma lactona sesquiterpênica, isolada a partir da *Artemisia annua*, apresenta em sua estrutura uma ligação endoperóxido, que segundo estudos parece ser crucial para sua atividade antimalárica (Francisco e Vargas, 2010). Os derivados semi-sintéticos de **4**, artesunato de sódio (**5**), fenozan 50F (**6**), também são tóxicos ao parasito da malária (Figura 66).

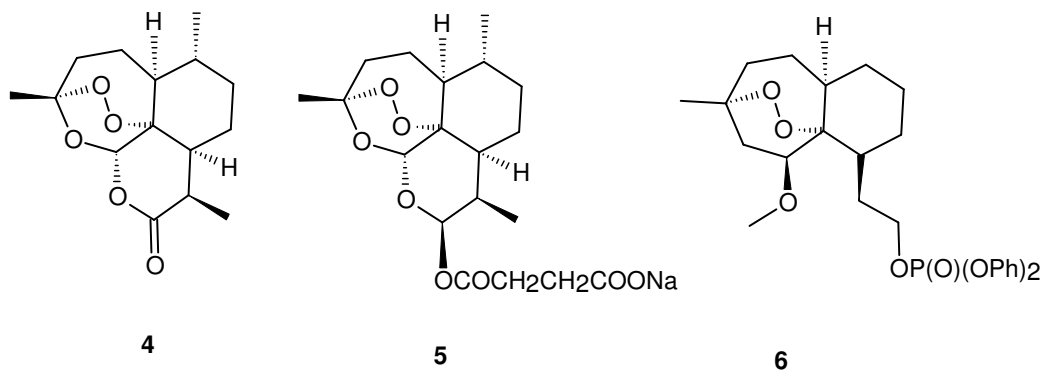


Figura 6. Estrutura da artemisinina (**4**), derivado semi-sintético **5** e análogo sintético **6** (Francisco e Vargas , 2010)

1.4 *Aspidosperma* spp.

O gênero *Aspidosperma* pertence à família *Apocynaceae*. Suas espécies podem ser encontradas em todo continente americano, se concentrando principalmente na América do Sul. No Brasil, encontram-se cerca de 50 espécies já catalogadas e distribuídas em todas as regiões do país. Popularmente são conhecidas por amargoso, carapanaúba, guatambus, pau-pereiro, perobas e quina (Jacomé *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009). Espécies deste gênero além de despertar interesse econômico, por serem fornecedoras de madeira nobre, ainda são alvos de muitas pesquisas por serem reconhecidamente bioprodutoras de alcalóides indólicos, substâncias famosas por seu grande potencial biológico (Gomes e Cavalcanti, 2000; Pereira *et al.*, 2007). Algumas substâncias que já foram isoladas do gênero são mostradas na Figura 7 (Arnd *et al.*, 1967, Robert *et al.*, 1983, Guimarães *et al.*, 2012).

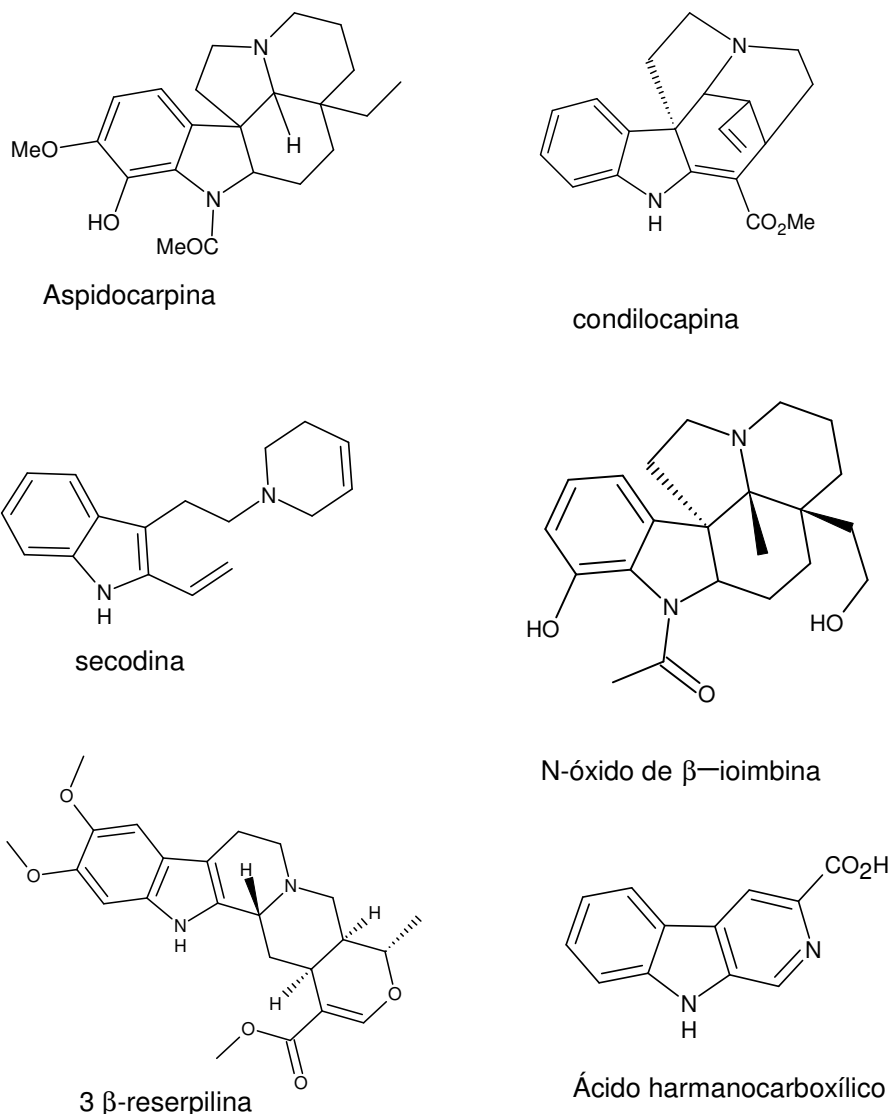


Figura 7. Alguns alcalóides que já foram isolados de espécies do gênero *Aspidosperma*.

Na medicina popular, infusões das cascas de espécies do gênero *Aspidosperma* são comumente utilizadas no tratamento de várias enfermidades, como leishshmaniose, febre, tratamento de cânceres, reumatismo (Pereira *et al.*, 2007; Aguiar *et al.*, 2010). Vários estudos científicos realizados nas últimas décadas comprovam atividades biológicas como: antibactericida, antiplasmodial, bloqueador α -adrenérgica, relaxante do músculo esquelético, antitumoral, citotóxica, parasiticida, antimicrobiana, anestésico, entre outras (Deutsh *et al.*, 1994, Tanaka *et al.*, 2006; Andrade-Neto *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2009). Muitas destas atividades são atribuídas aos alcaloides encontrados nas espécies, pois há muito tempo sabe-

se que substâncias alcalóidicas, devido sua estrutura química, atuam diretamente em sistemas biológicos.

Até meados dos anos 50, apenas quatro alcalóides indólicos eram conhecidos em *Aspidosperma* spp., na década seguinte, Gilbert e colaboradores (1965) identificaram cerca de 40 alcaloides deste tipo em 12 espécies do gênero. Recentemente Pereira *et al.*, (2007) catalogou em uma revisão, mais de 200 alcalóides indólicos de diversos tipos de esqueletos. O grande número substâncias encontradas, suas atividades biológicas e potencial farmacológico justificam o grande interesse fitoquímico, analítico, sintético em estudar e analisar *Aspidospermas* spp. em geral.

1.4.1 *Aspidosperma vargasii*

É considerada uma árvore de grande porte, podendo chegar a 20 m de altura, apresenta ramos finos com terminação estreita nas cascas. As folhas são elíptica ou oval, cujo comprimento varia entre 5-12 e 3-6 cm de largura (Figura 88). Sua distribuição se dá em toda América do Sul.



Figura 8. Sementes, folhas e tronco de *Aspidosperma vargasii*. [fonte: ecofog, 2008 e acervo pessoal]

Poucos estudos são encontrados sobre a composição química de *A. vargasii*. Segundo a literatura apenas dois grupos de substâncias já foram isolados desta espécie, o grupo das olivacinas que compreende a própria olivacina (7), além da 9-metoxiolivacina (8) e 2-metil-1,2,3,4-tetraidroolivacina (9). E o grupo das elipticinas,

sendo a elipticina, representada pela estrutura **10**, a 9-metoxielipticina (**11**) e a 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina (**12**). (Burnell e Della Casa, 1967; Pereira *et al.*, 2007, Henrique *et al.*, 2010).

Olivacinas		Elipticinas	
	R ₁	R ₂	
7	---	H	
8	---	MeO	
9	CH ₃	H	1,2,3,4 tetraidro
	R ₁	R ₂	
10	---	H	
11	---	MeO	
12	CH ₃	H	1,2,3,4 tetraidro

Figura 9. Classe das olivacinas e elipticinas isoladas a partir de *Aspidosperma vargasii*.

1.5 ALCALOIDES

O nome alcaloide, deriva do termo *alkali*, que significa “básico ou alcalino”. Em geral, os alcalóides são substâncias orgânicas normalmente de caráter básico e que apresentam uma cadeia cíclica contendo um ou mais átomos de nitrogênio (heteroátomo). A maioria destas substâncias é de origem vegetal e apenas uma pequena porcentagem é produzida por animais, como por exemplo, a samandrina, um alcaloide tóxico que é excretado pela *Salamandra maculosa* Laurenti, também conhecida por salamandra do fogo. Além deste exemplo, existem outros nos quais alcaloides são produzidos por fungos ou bactérias. (Abelha, 2009).

Esta classe de substâncias sempre despertou imenso interesse ao homem devido ao seu grande potencial biológico. Esses compostos são formados por diversos tipos de esqueleto e sua classificação pode ser dada de acordo com o

aminoácido que lhe deu origem. Segundo Dewick 2002, existem mais de 3000 substâncias com esqueleto indólico, representando a maior classe de alcalóides encontrados na natureza, sendo encontrados principalmente nas famílias *Apocynaceae*, *Loganiaceae* e *Rubiaceae*. Como já foi citado anteriormente, o triptofano sofre uma descarboxilação pela ação da enzima triptofano descarboxilase formando a triptamina, que por sua vez origina seis esqueletos diferentes, mostrado na Figura 10.

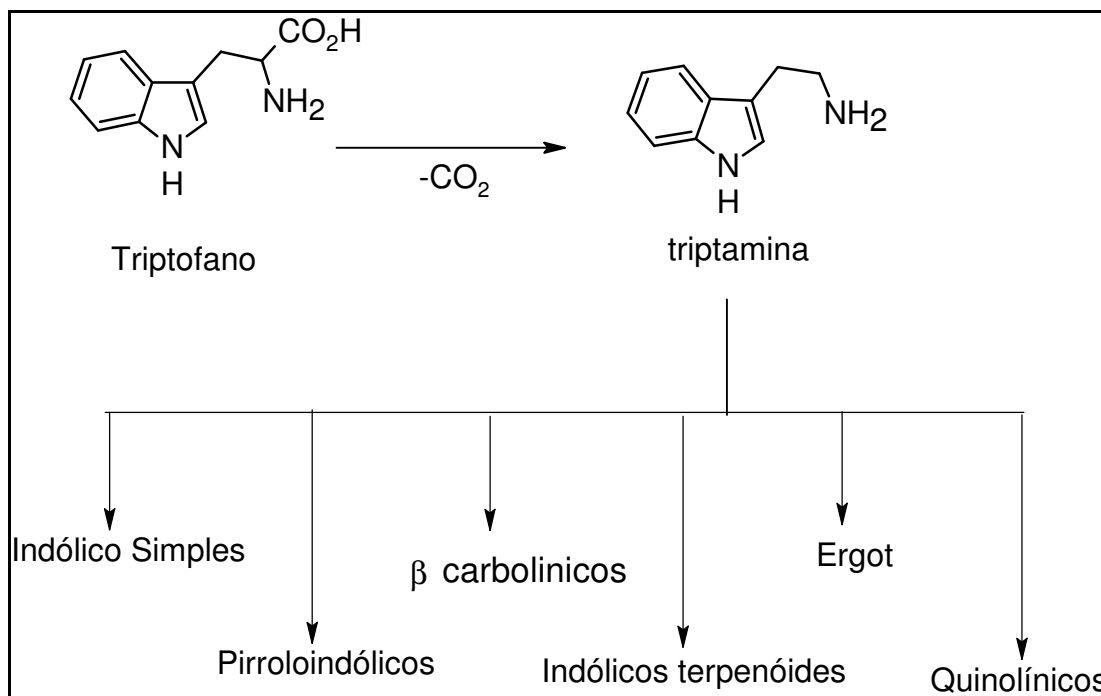


Figura 10. Classes de alcalóides derivados do aminoácido triptofano.

As substâncias **7-12** encontradas em *A. vargasii* são alcalóides indólicos monoterpênicos (alcalóides terpenóides), cujo esqueleto é formado a partir da combinação do aminoácido triptamina e do terpenóide secolaganin, pertencente ao grupo dos secoiridóides. Após uma sequência de reações dará origem ao stemmadenina. Esta estrutura é o principal precursor para obtenção deste tipo de esqueleto, também chamados de esqueletos piridocarbazólicos. O esquema para formação da elipticina pode ser observado na Figura 11 (Dewick, 1997, p.325 e 333).

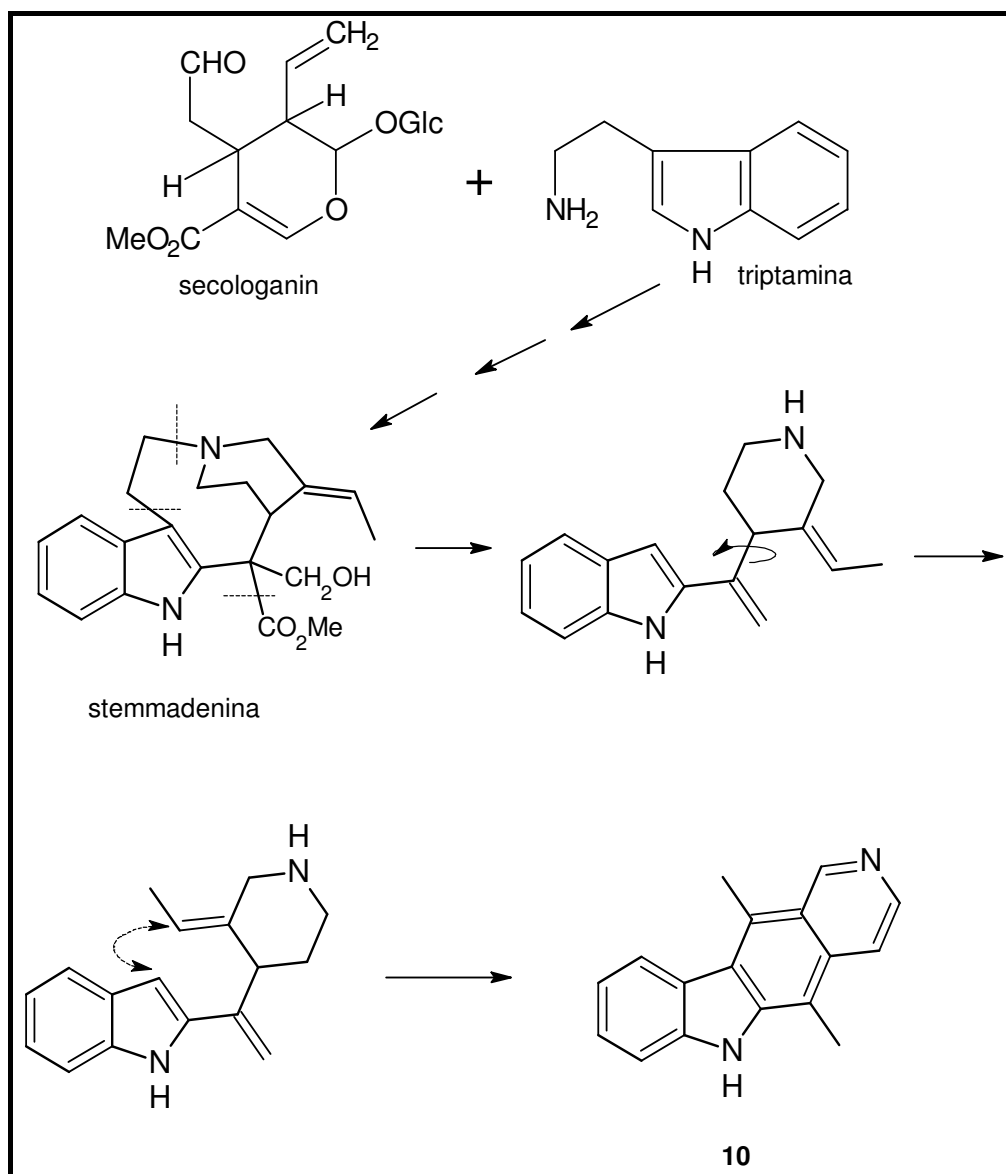


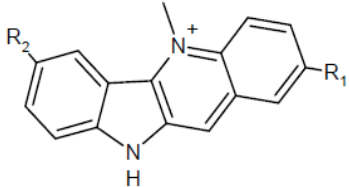
Figura 11- Biogênese para a obtenção elíptica a partir da stemmadenina. (Dewick, 2002).

1.5.1 Alcaloides com Atividade Antimalárica

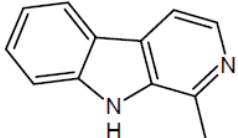
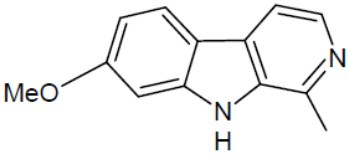
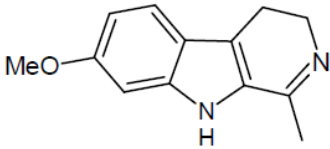
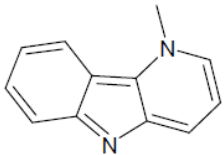
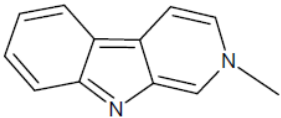
São muitos os estudos relatando atividade antimalárica *in vitro* e / ou *in vivo* de alcaloides na literatura, destes destaca-se grupos que apresentam o núcleo indólico, carbolínico e benzo-carbolínico. Em um breve levantamento foi possível identificar inúmeras substâncias com atividade comprovada, cujas fontes de obtenção variam entre compostos extraídos de plantas terrestres, algas marinhas,

esponjas ou através de reações de síntese orgânica. Na tabela 1, foram mostrados alguns destes alcaloides, organizados de acordo com sua estrutura, para cada uma foi identificados os IC₅₀ (concentração inibitória mediana) em micromolar (μM), para testes *in vitro* em cepas de *P. falciparum*.

Quadro 1. Alcaloides que apresentam núcleo indólico e atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum*.

Estrutura / Nome	Faixa de IC₅₀ (μM) e cepas <i>P. falciparum</i>	Referências
acrisorcin	0,05 – 0,31 (3D7)	Ekins <i>et al.</i> , 2011; Shahinas <i>et al.</i> , 2010.
bisnicalaterine C	0,05 (3D7)	Nugroho, 2011
 <p>13. R₁=R₂ = H criptolepina 14. R₁=Cl, R₂=Br 7-bromo-2-clorocriptolepina</p>	<p>13. 0,12 (sal HCl) 0,11 - 0,44 (K1) 14. 0,03 (K1)</p>	Baelen <i>et al.</i> , 2009; Frederich <i>et al.</i> , 2008; Galopan <i>et al.</i> , 2011; Onyeibor <i>et al.</i> , 2005
dihidrousambaresine	0,03	Frederich <i>et al.</i> , 2008
Elipticina (10)	0,07 - 1,13 e 0,60 (sal HCl)	Andrade-Neto <i>et al.</i> ,2007; Passemar, <i>et al.</i> ,2011 Rocha-Silva <i>et al.</i> , 2012
flinderole B	1,61 (K1)	Fernandez <i>et al.</i> , 2009
flinderole C	0,08 (K1)	Fernandez <i>et al.</i> , 2009

Quadro 2 (continuação). Alcaloides que apresentam núcleo indólico e atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum*.

Estrutura / Nome	Faixa de IC ₅₀ (μM) e cepas <i>P. falciparum</i>	Referências
10- metoxi-elitpticina	1,15	Passemar <i>et al.</i> , 2011
harman 	7,14 - 12,1 (W2, D6)	Azas, 2002 <i>et a.</i> ;; Ancolio <i>et al.</i> , 2002; Fiot <i>et al.</i> , 2006; Baelen <i>et al.</i> , 2009.
harmina 	0,02 - 0,05 (3D7)	Ekins <i>et al.</i> , 2001; Shahinas <i>et al.</i> , 2010; Takasu <i>et al.</i> , 2005
Harmalina 	25,1 (3D7)	Astula, <i>et al.</i> ., 2008
1-metil-δ-carbolina 	0,48 (K1) 0,38 (sal HI)	Baelen <i>et al.</i> , 2009
2-metil-β-carbolina 	0,45 0,34mM (sal HI) (K1)	Baelen <i>et al.</i> , 2009
18-hydroxysossungucine	0,14 (W2)	Frederich <i>et al.</i> , 2001
Isoborreverine	0,33 (K1)	Fernandez <i>et al.</i> , 2009
nicalaterine A	0,11 (3D7)	Nugroho <i>et al.</i> , 2011
strychonogucine	0,08	Frederich <i>et al.</i> , 2008
strychnogucine B	0,08 (W2)	Frederich <i>et al.</i> , 2001

1.5.2 Elipticina

A elipticina (**10**), de nome sistemático 5,11-dimetil-6H-pirido [4,3b] carbazol (F.M = C₁₇H₁₄N₂), foi isolada pela primeira vez das folhas da *Ochrosia elliptica* Labell (*Apocynaceae*) por Goodwin e colaboradores (1959). Entre as décadas de 60 e 70 descobriu-se sua promissora atividade citotóxica frente a diferentes linhagens de células tumorais, com efeitos colaterais reduzidos e ausência de efeitos hematológicos (Melo, 2008). Desde então, importantes estudos foram desenvolvidos, em relação à síntese da própria elipticina e / ou derivados (Dalton *et al.*, 1967, Besselière *et al.*, 1981, Devraj *et al.*, 1996, Dracinský *et al.*, 2007), além de vários estudos de ordem biológica (Kano 1981, Kibal'nyi *et al.*, 2001). Atualmente está sendo usada como droga antitumoral em teste, principalmente contra melanomas, leucemia, câncer de mama e sarcoma.

Quando se busca o desenvolvimento de novos fármacos é muito importante que se conheça o mecanismo de ação da droga no organismo. No caso da elipticina, este mecanismo ainda não foi totalmente elucidado, no entanto, sabe-se que a droga atua ligando-se ao DNA das células tumorais (Melo, 2008). A interação droga-DNA se dá por uma intercalação, que ocorrem devidos interações eletroestáticas externas a dupla hélice ou por formação de ligações covalentes (interação de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio) entre a droga e o DNA da célula cancerígena, esta interação faz com que ocorra uma diminuição torcional da dupla hélice, inibindo a ação da topoisomerase II, dificultando a multiplicação celular.

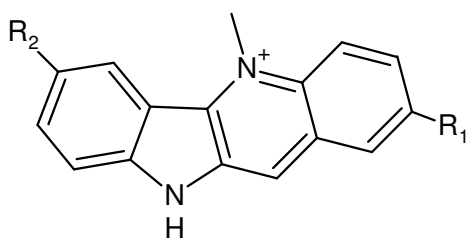
Inúmeros trabalhos científicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de sintetizar e mapear derivados da elipticina com atividade citotóxica, no entanto, pouquíssimo se sabe sobre sua atividade antimalárica. Em 2007, Andrade-Neto e colaboradores, constataram que a elipticina possui significativa inibição *in vitro* contra cepas do *Plasmodium falciparum* (concentração inibitória mediana, CI₅₀ = 73 µM) apresentando potencial antimalárico considerável (Andrade-Neto *et al.*, 2007; Polhit *et al.*, 2012). Esta atividade foi confirmada por Passemar *et al.* (2011), neste mesmo trabalho outros derivados da elipticina foram testados e se mostraram promissores. Recentemente foi verificada significativa atividade *in vivo* da elipticina e olivacina contra *Plasmodium berghei* em camundongos (Rocha e Silva *et al.*, 2012).

1.5.3 Análogos da elipticina com relevância para este trabalho

A olivacina (**7**) é um isômero da elipticina (**10**) (Figura 9), cuja estrutura difere apenas na posição de uma das metilas. Segundo literatura (Burnell e Della Casa, 1967) também pode ser encontrado na *A. Vargasii*, assim como **10**, outra semelhança observada entre estes dois compostos é o considerado potencial antitumoral (Jasztold-Howorko *et al.*, 2004).

Outra substância que apresenta bastante semelhança com a elipticina é o alcalóide indoloquinilínico criptolepina (**13**), isolado a partir da *Cryptolepis sanguinolenta* (*Periplocaceae*), originária da África, uma espécie muito utilizada na medicina tradicional contra malária. A substância **13**, seus análogos e derivados representam um grupo de substâncias amplamente explorado devido ao grande potencial contra *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*. Apesar de serem compostos com relevante atividade antiparasitária também apresentam alta citotoxicidade e toxicidade *in vivo*. (Arzel *et al.*, 2001; Jonckers *et al.*, 2002; Baelen *et al.*, 2009, Rocha e Silva *et al.*, 2012).

Os derivados bromados **14**, **15**, e **16** (Figura 12) são compostos normalmente sintetizados, pois aparentemente são estruturas com uma ótima atividade e é relativamente menos tóxico, além de apresentarem uma degradação mais lenta, fator que favorece o tempo da droga no organismo e auxilia na diminuição da dose. (Onyeibor *et al.*, 2005, Wright, 2007; Frederich *et al.*, 2008, Galopan *et al.*, 2011, Rocha e Silva *et al.*, 2012),



13. criptolepina $R_1 = R_2 = H$
 14. 7-bromo-2-clorocriptolepine $R_1 = Cl$ e $R_2 = Br$
 15. 2-bromoelipticina $R_1 = Br$ e $R_2 = H$
 16. 2,7-dibromoelipticina $R_1 = Br$ e $R_2 = Br$

Figura 12. Criptolepina (**13**) e seus derivados bromados **14**, **15** e **16**.

1.6 SÍNTESE

O processo de semi-síntese a partir de produtos naturais tem sido uma importante ferramenta para o desenvolvimento e a preparação de várias moléculas comercialmente úteis. O estudo e o desenvolvimento de novas rotas sintéticas e semi-sintéticas, além de biotransformações, tem oferecido ao mercado um grande número de novos medicamentos para o tratamento de diversas doenças, entre elas a malária (ex. cloroquina (**2**), mefloquina (**3**) e derivados da artemisinina). Desde a descoberta da elipticina como agente com potencial antitumoral em 1967, a substância tem sido alvo de inúmeros estudos, visando encontrar a síntese total da molécula e derivados. Apesar de aparentemente se tratar de uma molécula simples, as rotas sintéticas determinadas são na maioria divididas em várias etapas (Konakahara *et al.*, 2010, Miki *et al.*, 2001). Em muitos procedimentos a principal dificuldade encontrada é o baixo rendimento das reações, que pode estar sendo limitado pela baixa solubilidade da elipticina, fator que dificulta não só o processo de síntese como também de purificação. Em 1962, Cranwell e Saxton (Figura 13) propuseram uma rota sintética baseada na reação entre o 1,4 dimetilcarbazol (**A**) e o N-metilformanilida em oxiclreto de fósforo, formando o 3 formil-1,4 dimetilcarbazol (**B**), que sofre uma condensação com o 2,2-dietoxietilamina produzindo a azometina (**C**). A partir daí ocorre a ciclização da azometina que gera um intermediário saturado (**D**) que é reduzido, assim gerando como produto a elipticina (**E**). Anos depois, Dalton e colaboradores (1967) obtiveram o mesmo produto com apenas três etapas. O procedimento de ambos os grupos foram bem similares, com exceção da terceira etapa (ciclização do azometina). No primeiro caso, o fechamento do anel ocorre na presença do HCl seco, enquanto que no segundo utiliza-se o ácido ortofosfórico, esta mudança parece ser importante, pois além de diminuir etapas na reação ainda melhorou o rendimento final (Cranwell e Saxton, 1967; Dalton *et al.*, 1967).

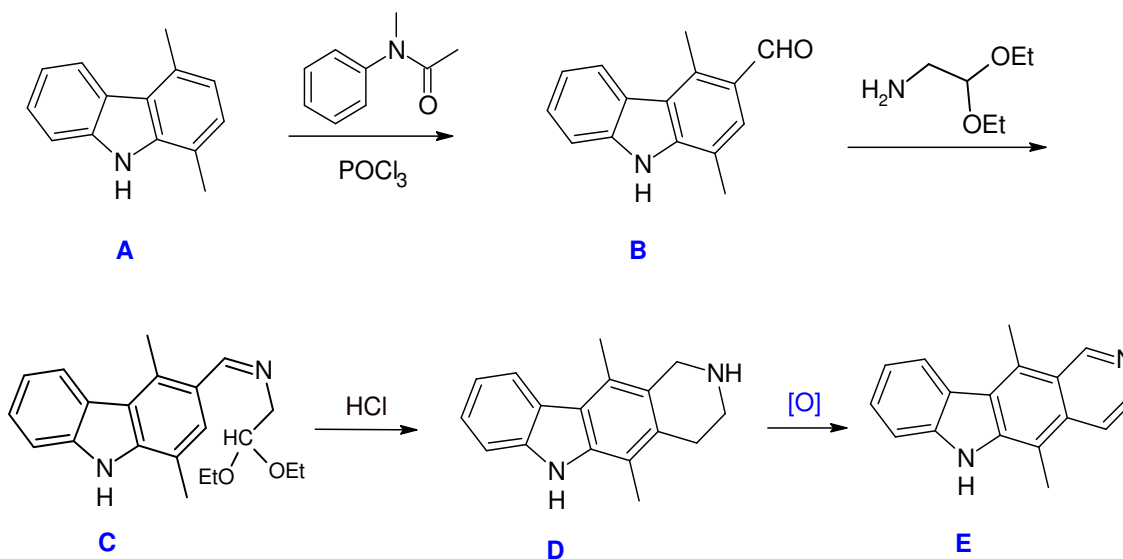


Figura 13. Resumo da rota sintética de Cranwell e Saxton (1962) para produção da elipticina.

Quando se trata de derivados da elipticina, mais de setenta já foram sintetizados, sendo que as principais modificações realizadas são através de reações de hidroxilação nas posições C7 e C9 e alquilação nos nitrogênios e/ou no C1 (Cirino *et al.*, 2005). A literatura oferece um número considerável de rotas sintéticas para à obtenção de derivados, entre elas destacam-se mecanismos para formação de compostos como: 9-metoxi, 9-nitro, 9-metil, 9-bromo e 9-metoxi-6-metil-elipticina. Porém, muitos dos artigos que descrevem procedimento sobre derivados não partem da elipticina e sim de análogos ou intermediários, obtidos em reações prévias (Cranwell e Saxton, 1967; Dalton *et al.*, 1967). Dracinsky e colaboradores (2007) descrevem derivados análogos da elipticina, a partir do 1,4 dimetilcarbazol (**A**), (Figura 14). São cinco os produtos obtidos, o primeiro **B** é formado a partir de reação de halogenação, que ocorre de acordo com o mecanismo de reação de substituição aromática, comum a este tipo de esqueleto. Para obtenção de **C**, ocorre à oxidação do carbono de uma das metilas presentes em **B**, seguido de acetilação formando o produto denominado de 4-acetoximetil-3, 6,8-tribromo-1-metilcarbazol (**C**). O composto **A** também foi submetido à reação de nitração, formando o produto dinitrado **D**, que ao reagir com cloreto de estanho em ácido clorídrico sofreu uma redução formando o produto **E**.

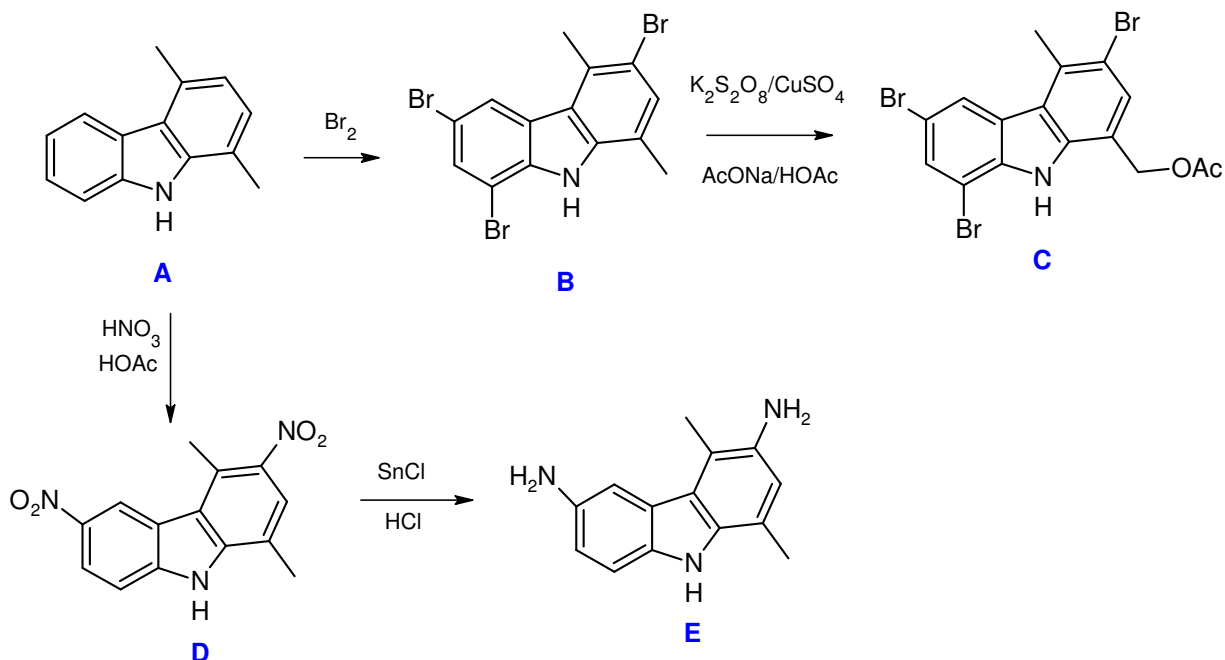


Figura 14. Rota sintética para obtenção de derivados 8-substituídos a partir do 1,4-dimetil-carbazol. [Adaptado de Dracinsky *et al.*, 2007]

A posição de entrada dos substituintes é bem clássica quando se trata de compostos indólico, isso ocorre porque compostos nitrogenados quando ligado a um anel aromático pode ser considerado um bom grupo ativante para reações de substituição eletrofílica. Essas propriedades ocorrem devido à capacidade de doação eletrônica do átomo de nitrogênio, particularidade que faz com que todo o anel fique carregado eletronicamente e mais suscetível a reações químicas.

No presente trabalho, de posse do levantamento acima, procurou-se sintetizar novos derivados da elipticina para testar a atividade antimalárica *in vitro* contra o *P. falciparum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antimalárica da elipticina e seus derivados obtidos a partir de reações de modificações estruturais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar elipticina e 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina de extratos das cascas de *Aspidosperma vargasii* utilizando técnicas cromatográficas.

Desenvolver métodos de análise qualitativa de alcaloides indólicos em infusão de *A. vargasii* por UPLC-ESI-MS.

Sintetizar derivados utilizando elipticina como material de partida em reações de acetilação, bromação, nitração e oxidação e determinar a estrutura dos produtos formados utilizando métodos espectroscópicos.

Avaliar elipticina, 2-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina e derivados sintetizados a partir da elipticina para atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*.

Avaliar elipticina e 2-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina para atividade *in vivo* contra o *Plasmodium berghei* em camundongos.

3 MATERIAIS

Este estudo gerou alguns alcaloides indólicos de origem sintética ou natural. Também, foram adquiridos alguns padrões de substâncias indólicas por doações ou por compra direta, para análises.

3.1 ALCALÓIDES INDÓLICO

3.1.1 Elipticina

- ✓ 100 mg - (Sigma-Aldrich)
- ✓ 20 mg – doação (Henrique, 2007)
- ✓ 56,45 mg – isolada de *A. vargasii*

3.1.2 Olivacina

- ✓ 150 mg doação (Dr. Angelo C. Pinto, UFRJ).

3.1.3 2-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina

- ✓ 59,9 mg (isolada *A. vargasii*)

3.1.4 Ioimbina

- ✓ Sigma-Aldrich.

3.2 MÉTODOS

- Reações sintéticas - Reações de nitração, bromação, acetilação e oxidação.
- Cromatografia em camada delgada (CCD).
- Cromatografia em coluna (CC).
- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).
- Testes antimaláricos.
 - ✓ *in vitro* - cepas K1 de *Plasmodium falciparum*. Software Microcal Origin e Biostat 1,0 MCT-CNPq.
 - ✓ *in vivo* - camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65.

- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado a Espectrometria de Massas (UPLC-MS)-Acquity Waters, espectrômetro Quattro Micro Waters, ionização por electrospray.
- Espectrometria de Massas de Alta Resolução- HRMS (marca Waters, modelo Xevo).
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)-Equipamento Varian Inova 500 MHz, e Bruker Avance, 400 MHz.

4 METODOLOGIA

4.1 ANÁLISE PARA VERIFICAR A PUREZA DA ELIPTICINA, OLIVACINA E IOIMBINA.

A elipticina comercial (Sigma-Aldrich) foi submetida a análises para verificação de sua pureza. Inicialmente foram realizadas CCD, em vários sistemas de solventes. A substância apresenta fluorescência bem característica, no comprimento de onda λ 366 nm e R_F 0,48 no sistema DCM: MeOH: Et₂NH (9,8: 0,1: 0,1). A olivacina (doadada) foi submetida aos mesmos testes para verificação da pureza. No sistema DCM: MEOH (9:1) apresentou R_F 0,57. Além disso, foram gerados os espectros de massas de alta resolução (HR-ESI-MS-XEVO) para ambas. Para a ioimbina (Sigma- Aldrich) as análises de pureza se restringiram ao uso das técnicas de UPLC-ESI-MS e HR-ESI-MS-XEVO.

4.2 ISOLAMENTO DA ELIPTICINA E 2-METIL-1, 2, 3,4-TETRAIDROELIPTICINA.

Isolamento fitoquímico foi realizado a partir de extratos / frações da casca de *Aspidosperma vargasii* do banco de extratos do LAPAAM / INPA. Estes extratos e frações foram produzidos por Marycleuma Campos Henrique durante o seu trabalho experimental de mestrado (Henrique, 2007), por maceração em EtOH/ NH₄OH 1%, filtração e evaporação. O extrato seco foi dissolvido em AcOEt e submetido à partição ácido-base, resultando em frações pH 8, 10 e 12, AcOEt e aquosa (Henrique, 2007; Henrique *et al.*, 2010).

O desenvolvimento do processo de fracionamento da *A. vargasii* foi adaptado a partir do procedimento descrito por Henrique (2010). Primeiramente foram analisados através de CCD (cromatografia de camada delgada) todos os extratos e frações de *Aspidosperma vargasii* presentes no banco de extratos do LAPAAM (Extrato MeOH, extrato H₂O e frações da partição ácido-base pH 8 e 12, AcOEt e fração H₂O), para verificar as amostras que continham elipticina. Detectou-se elipticina em todos, exceto nas frações AcOEt e H₂O. Optou-se por trabalhar especificamente com a fração de pH 8, que apresentou um perfil mais simples para o isolamento. Nas análises em CCD foi observada a presença majoritariamente de

dois alcaloides, sendo um deles a elipticina, cuja identidade foi comprovada baseada em R_f em CCD (comparação com padrão), UPLC-ESI-MS, HR ESI-MS-Xevo e RMN.

4.2.1 Fracionamento Cromatográfico da fração MHV8 (pH 8)

Para o fracionamento foram utilizados 700 mg de material submetido à cromatografia de coluna ($\phi \times h$ de 2,5 x 25 cm) com sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm mesh) previamente ativada sob temperatura de 100 °C por 4 h. Como eluente utilizou-se o sistema de solvente CHCl_3 : MeOH, em gradiente 9:1, 8:2 e 7:3, 50 frações (16 mL cada) foram coletadas e analisadas por CCD. Foram utilizados como reveladores uma câmara de iodo, solução de anisaldeído e solução de Dragendorff (revelador específico para alcalóides). As 50 frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 4 grupo (Figura 15).

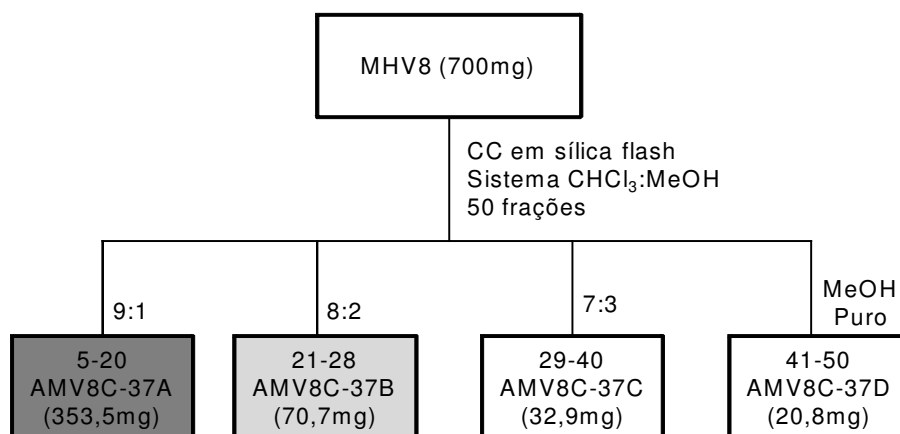


Figura 15. Fracionamento da fração MHV8

4.2.2 Fracionamento da fração AMV8C-37A (elipticina)

A fração AMV8C-37A apresentava coloração laranjada com pequenos cristais com massa de 353,5 mg. Esta fração foi submetida à cromatografia de coluna. Para o fracionamento foram utilizados 3,6 g de sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm), previamente ativada, sob a temperatura de 100 °C por 4 h. A coluna apresentava as dimensões ($\phi \times h$ de 2,5 x 25 cm). O sistema de solvente utilizado foi isocrático

CHCl_3 : MeOH: Et_2NH 9:0, 9:0, 1. Foram coletadas 33 frações (16 mL cada), as quais foram analisadas por CCD, utilizando como reveladores: câmara de iodo, solução de anisaldeído e solução de Dragendorff. Foram combinadas em cinco frações reunidas baseado no seu perfil cromatográfico (Figura 16).

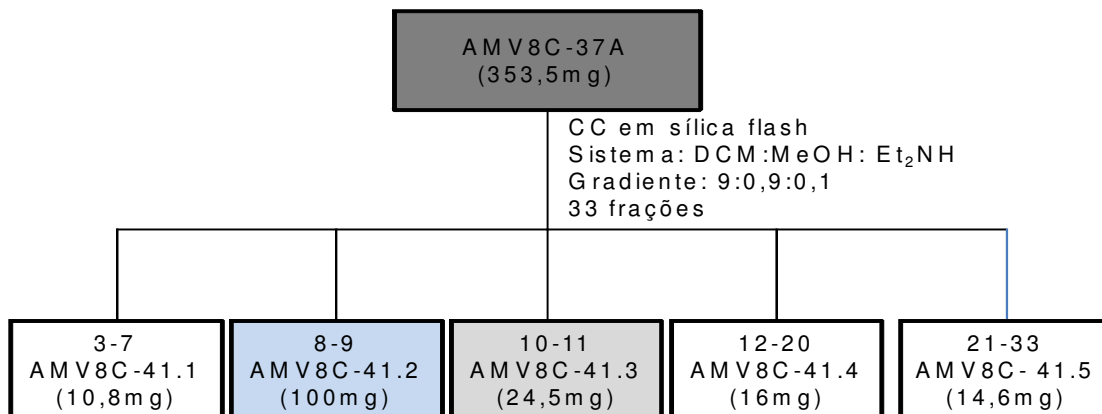


Figura 16. Fracionamento da fração AMV8-37A

4.2.3 Recristalização da amostra AMV8C-41.2 (elipticina)

Após evaporação do solvente a fração AMV8C-41.2 (100 mg) apresentava cristais amarelos que foram submetidos à CCD e apresentavam algumas impurezas. Devido à elipticina ter como característica a baixa solubilidade, optou-se por recristalização para a purificação. O solvente utilizado para a recristalização foi o diclorometano (DCM), os cristais foram dissolvidos a quente e deixado em repouso no freezer a aproximadamente -3°C , por 24 h. Decorrido este tempo os cristais formados foram separados do sobrenadante utilizando filtro e algodão, os cristais retidos no algodão foram lavados com DCM gelado e depois foram dissolvidos em CHCl_3 : MeOH 1:1. Após evaporar o solvente o resultado obtido foi 56,45 mg de cristais amarelos em forma de agulha.

4.2.4 Fracionamento das frações AMV8C-37B e MV8C-41.3 (2-metil-1, 2, 3, 4-tetraidroelipticina).

Por apresentarem o mesmo perfil cromatográfico, reuniram-se as frações AMV8C-37B (70,7 mg) e MV8C-41.3 (24,5 mg) resultantes da primeira e segunda cromatografia de coluna realizada (4.2.1 e 4.2.2), respectivamente. A amostra resultante (95,2 mg) foi fracionada por coluna cromatográfica. Foram utilizados 9,6 g de sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm mesh, Merck), previamente ativada sob a temperatura de 100 °C por 4 h. A coluna apresentava as dimensões (ϕ x h de 0,7 x 25 cm). O sistema de solvente utilizado foi DCM: MeOH: Et₂NH 9,5: 0,4: 0,1. (Figura 17)

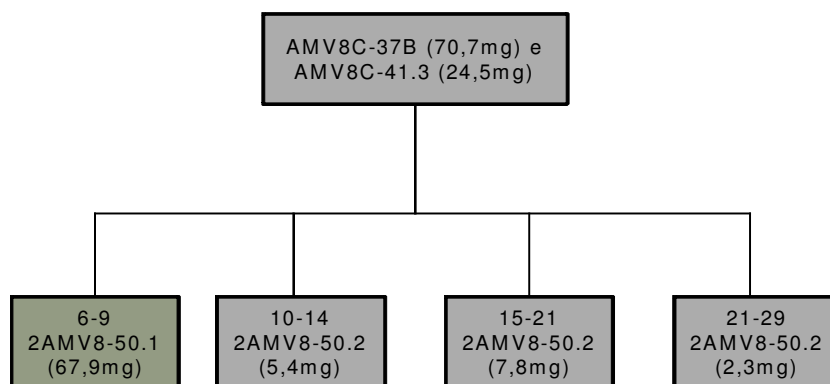


Figura 17. Fracionamento das frações MHV8C-37B e MHV8C-41.3

4.2.5 Recristalização da fração 2AMV8-50.1 (2-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina).

Verificou-se a presença de um segundo alcaloide impuro por CCD na fração 2AMV8-50.1 que cristalizava em forma de sólido branco amarelado. Os cristais foram dissolvidos em MeOH a quente e deixados em repouso no freezer a aproximadamente -3^oC, por 24 h. Decorrido este tempo o material formado foi separado do sobrenadante utilizando filtro e algodão. Após evaporar o solvente, foram obtidos 59,9 mg de sólido branco, que foi lavado com i-PrOH gelado, após a evaporação do solvente resultou em cristais brancos.

4.3 REAÇÕES

Foram testados métodos de síntese de derivados utilizando elipticina como material de partida. As reações testadas foram bromação, nitração, acetilação e oxidação.

4.3.1 Bromação

Três métodos de bromação da elipticina foram explorados.

Método 1 (baseado em Dracinsky *et al.*, 2007): A reação de elipticina (1 mg) e excesso de Br₂ em CHCl₃ a 0 °C resultou em uma mistura heterogênea e reação incompleta, fato que pode estar associado à formação do subproduto HBr, que precipita durante a reação.

Método 2 (baseado em descrição do procedimento de bromação a compostos aromáticos, descritos no livro de práticas de orgânica Vogel's (1989), foram feitas algumas alterações no procedimento 1): A elipticina (1 mg) foi solubilizada em CHCl₃ e piridina e depois houve adição do Br₂ líquido. Observou-se que ocorreu degradação do produto formado, além de não haver a conversão completa da elipticina em produtos.

Método 3 (adaptado de Holt e Petrow, 1967): Na reação foi utilizado elipticina (16,4 mg; 66,6 μmol) isolada a partir das cascas da *Aspidosperma vargasii*. A elipticina foi dissolvida em 40 μL de AcOH glacial gelado e colocada em banho de gelo. Uma segunda solução foi preparada a partir da mistura de Br₂ (168,4 mg; 1,05 mmol) e AcOH glacial gelado (450 μL). Logo em seguidas, as duas soluções foram misturadas. Imediatamente após a combinação das duas soluções, houve a formação de um precipitado de cor âmbar. O balão com a mistura foi levado ao banho-maria a 70 °C por 1 h. A reação foi acompanhada por CCD. Como reveladores foram utilizados UV 254 e 366 nm, câmara de iodo e solução de *p*-anisaldeído. O sistema de solvente utilizado foi CHCl₃: MeOH 9:1. Após 1 h, a mistura reacional foi transferida para um vidro de relógio e evaporada sob um Bécker contendo H₂O fervente até a secura total do material (Figura 18).



Figura 18. Sistema para a reação de bromação da elipticina e procedimento pós-reacional.

Essa mistura de produtos foi submetida à coluna cromatográfica em sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm mesh, Merck) utilizando o sistema isocrático de C_6H_6 : EtOH: Et₂NH (8:1: 1) baseado em literatura (Devraj *et al.*, 1996), no entanto não houve sucesso na separação dos produtos. Após a verificação de vários sistemas de solventes, o que apresentou uma melhor separação foi $CHCl_3$: EtOEt: AcOH (9:0, 5:0, 5 e 8:1: 1). Baseado em análises por CCD, a mistura de produtos foi submetida à CCDP (cromatografia de camada delgada comparativa) e CC (cromatografia de coluna). A mistura foi caracterizada por RMN de ¹H, UPLC-ESI-MS e HRMS.

4.3.2 Nitração

Em um balão de 5 mL devidamente pesado, foi adicionado 18 gotas de CH_3COOH glacial ($m = 0,2447g$), sob agitação foi adicionado 4,5 mg de elipticina de origem natural, logo após a solubilização total da elipticina foi acrescentado 425 mg HNO_3 65% gelado. A mistura foi para o banho de gelo e a reação se processou sob agitação magnética por 1 horas. Durante a reação alíquotas foram retiradas para o acompanhamento por CCD. Para interromper a reação foram adicionado 8 mL de água destilada gelada, em seguida a reação foi basificada até pH 10, com $NaCO_3$ anidro. A solução foi extraída com $CHCl_3$: MeOH 9:1 e seca com Na_2SO_4 anidro, após o solvente foi rotaevaporado.

A purificação da mistura pós-reacional foi realizada por *CC flash* utilizando como fase móvel CHCl_3 : *i*-PrOH nos gradientes 9,8: 0,2 e 9,5: 0,5. O produto obtido foi analisado por UPLC-ESI-MS e RMN ^1H , 500 MHz em $\text{DMSO}-d_6$.

4.3.3 Acetilação

O procedimento da acetilação foi basicamente adicionar elipticina em Ac_2O , sob agitação e aquecimento. A reação foi realizada várias vezes, modificando apenas três variáveis: temperatura, tempo de reação e concentração de Ac_2O . Para cada tentativa foram utilizados 1 mg (4,06 μmol) de elipticina e 182,2 mg (1,78 mmol) de Ac_2O (inicialmente). O procedimento pós-reacional para todas as reações foi realizado da mesma forma. A solução era transferida para um vidro de relógio sob um Bécker com H_2O fervente, para evaporação do excesso de Ac_2O e do CH_3COOH formado durante o processo (Figura 19). A reunião de cinco dos produtos formados por essas reações foram submetidos à CCDP de fase reversa (C-18) em ACN : H_2O + 1% CH_3COOH .

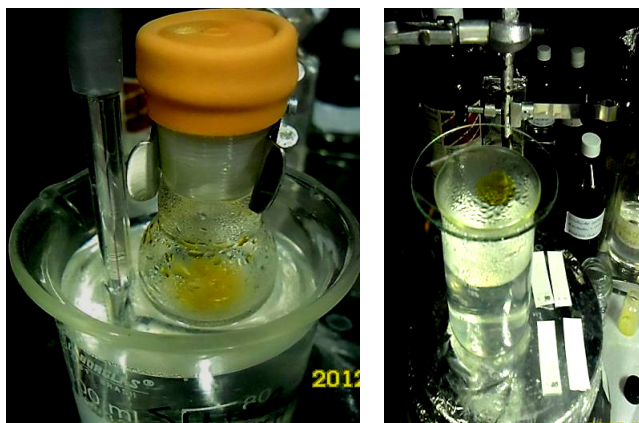


Figura 19. Experimento para reação de acetilação e evaporação do produto em um vidro de relógio.

Com caráter investigativo análises de UPLC-ESI-MS, foram realizadas sob as condições: H_2O + 0,1 % CHOOH : MeOH [t = 0 min. (90:10); t = 18 min. (5:95); t = 18,5 min. (95:5); t = 19 Min. (90:10), fluxo 0,350 mL/min., injeção de 1 μL], para verificar a formação de produto (s) acetilado (s).

4.3.4 Tentativa de Síntese de N-Óxidos da Elipticina

O procedimento para formação de N-óxido da elipticina foi realizado de acordo com metodologia descrita por Boogaard e colaboradores (1994). A elipticina (1 mg; 4,06 μmol) foi dissolvida parcialmente em DCM (0,2 mL, seco previamente com Na_2SO_4) utilizando ultrassom (1 h). A solução levada para banho de gelo e sob agitação magnética foi adicionado o ácido 3-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA; 1,5 mg; 8,69 μmol). A reação seguiu por 6 h. Para o procedimento pós-reacional, foi adicionada solução saturada de NaHCO_3 (1 mL), e deixou-se sob agitação por 30 min. Após este tempo a mistura foi deixada em repouso e foi separadas a fase aquosa e a orgânica. Para garantir que tudo havia sido extraído da fase aquosa, esta foi lavada mais 3X com CHCl_3 . As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com 1 mL de solução de NaHCO_3 (2X), seguidas de lavagens com solução de NaCl e por fim seca com Na_2SO_4 .

A mistura reacional obtida nesse procedimento foi submetida a análises de massas no UPLC-ESI-MS, por infusão direta.

4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE INFUSÕES DE *Aspidosperma vargasii*

As infusões de *A. vargasii* foram preparadas utilizando cascas secas e moídas, extraídas com água fervente, seguido de filtração e evaporação total por Marycleuma Campos Henrique durante seu trabalho experimental para o mestrado (Henrique, 2007; Henrique *et al.*, 2010). As infusões foram analisadas por UPLC-ESI-MS e os cromatogramas gerados foram comparados com cromatogramas de quatro alcalóides indólico adotados como padrões: a elipticina (**10**), 2-metil-1, 2, 3,4-tetrahydroelipticina (**12**), isoladas neste trabalho, além da olivacina (**7**) e a ioimibina (**20**). Para as análises de UPLC-ESI-MS, as amostras (infusão e padrões) foram dissolvidas em MeOH, com os volumes necessários para se obter em todas as amostras a concentração de 1 000 $\mu\text{g/mL}$. As condições utilizadas foram $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ CHOOH}$: MeOH [t = 0 min. (90:10); t = 5 min. (5:95); t = 6 min. (95:5); t = 7 min. (90:10), fluxo 0,350 mL/min., injeção de 1 μL]. A infusão foi diluída para

concentração de 200 µg/mL. Para os padrões foram preparadas quatro diluições, cujas concentrações foram: 1000, 100, 10 e 1 µg/mL.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 Teste *in vitro*

O teste antimalárico *in vitro* foi realizado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas sob a responsabilidade de Prof. Luiz Francisco Rocha e Silva e colaboradores. Nos ensaios realizados foram testados os compostos **7**, **10**, **12**, **19**, e a mistura de **17+18**. As substâncias foram analisadas frente à cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) e 3D7 sensível a cloroquina, ambas mantida em cultivo contínuo segundo método de Trager e Jensen (1976).

O período de incubação do parasita com as drogas foi de 24 h a temperatura de 37 °C. Os controles positivos usados foram cloroquina e quinina. Para o microteste foi utilizada uma parasitemia inicial de 1–2% e hematócrito de 3%. As substâncias foram dissolvidas em DMSO, na concentração estoque de 5 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção das concentrações de teste que variaram entre 100 µg/mL e $3,2 \times 10^{-3}$ µg/mL.

O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto *et al.*, (2007). As diluições das amostras foram aplicadas em poços de micro-placa contendo hemácias parasitadas. Cada concentração foi testada em triplicata. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi avaliado mediante microscopia óptica.

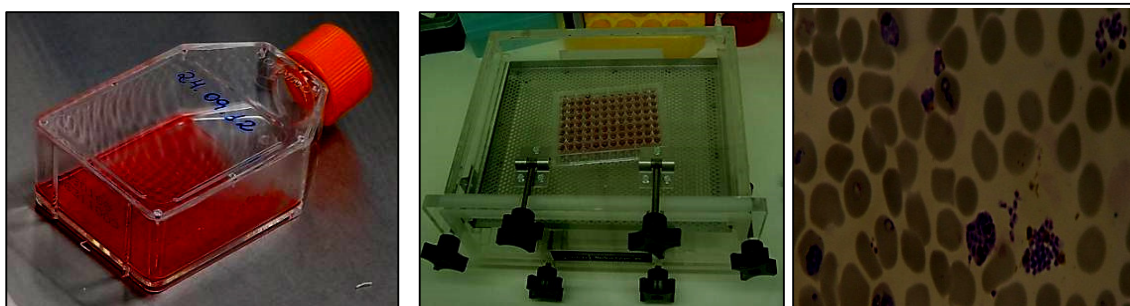


Figura 20. Garrafa com o meio de cultura e o *Plasmodium falciparum*, microplacas de teste na câmara incubadora e análise de um esfregaço no microscópio.

O efeito parasitário foi avaliado pela porcentagem de inibição do crescimento do protozoário. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra})}{\text{parasitemia do controle}} \times 100$$

4.5.2 Teste *in vivo*

O teste foi realizado no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose (LABMAT), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Valter Andrade-Neto e colaboradores. As substâncias usadas como drogas foram a elipticina (**10**) e o 2-metil-1, 2, 3,4-tetraidroelipticina (**12**).

Para realização do bioensaio foram necessários 48 camundongos albinos, com massas entre 24-32 gramas. O inoculo foi preparado com o sangue de um camundongo infectado pelo *P. berghei*, cuja parasitemia foi calculada em 25,7%. O sangue foi retirado da calda do camundongo escolhido, cerca de 2 mL e a partir deste, foi preparada uma solução com DMSO, com volume total de 14 μ L. Esta solução foi utilizada para contaminar os animais. Após 24 h iniciou-se o tratamento dos camundongos com as drogas **10** e **12**, usando duas vias de administração (oral e subcutânea).

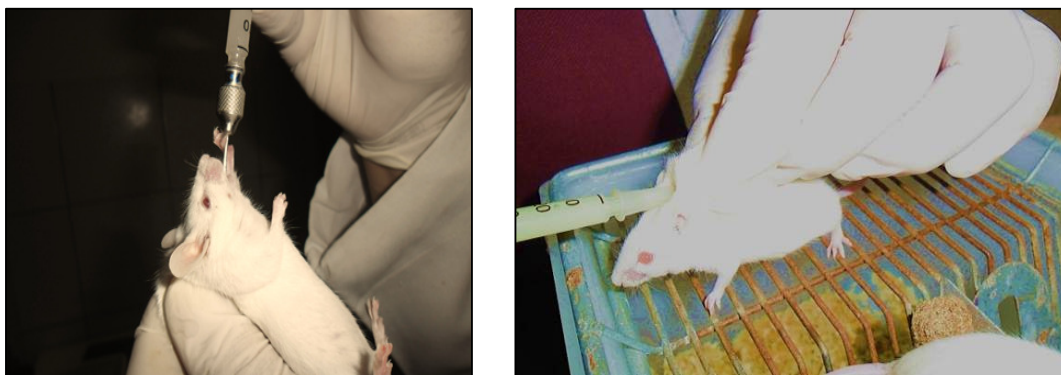


Figura 21. Administração das drogas nos testes *in vivo*, utilizando as vias oral e subcutânea.

4.6 ANÁLISES UPLC-ESI-MS E HRMS

UPLC-ESI-TQ-MS: marca Acquity Waters Quattro Micro Waters, ionização por eletrospray (ES+) Accurate Mass, solventes MeOH + 0,1% HCO₂H:H₂O grau HPLC. Volume da injeção entre 1 µL e 5 µL, energia de ionização 0,2 eV, temperatura 40 °C, HRMS: Waters Xevo QToF (Central Analítica, Instituto de Química, UNICAMP), Analisador de massas TOF. Programa para tratamento dos dados MassLynx 4.1 SCN 714.

Condições para análises das substâncias **10** e **12**: tempo total de análise 7 minutos, injeção 1 µL, concentração 1 µg/ mL, sistema de solventes: H₂O com 0,1% de ácido fórmico (bomba A) e MeOH (bomba B). Fluxo da injeção 0,35 mL/min. Faixa de massa selecionada *m/z* 150-300. A rampa foi obtida com a seguinte variação do gradiente: tempo 0 min (90:10); 5 min (5:95); 6 min (5:95); 7 min (90:10). Para os produtos (**17+18**) e o **19** as condições foram as seguintes: 12 min de tempo de análise, injeção automática de 5 µL, concentração 1 µg/ mL, sistema de solventes: H₂O com 0,1% de ácido fórmico (bomba A) e MeOH (bomba B). Fluxo da injeção 0,35 mL/min., com variação do gradiente de acordo com tempo [t=0 min. (90:10). t = 12 min. (5:95); t = 12,5 min. (5:95) e t = 13 min. (90:10)]. Faixa de massa selecionada *m/z* 150-600.

Apenas para elipticina e olivacina comercial foram obtidos espectros de massas de alta resolução (HR-ESI-MS-XEVO).

4.7 ANÁLISES DE RMN

Equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear marca - Varian Inova (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C) e Bruker Avance [400 MHz e 100 MHz (¹³C)]. Solvente para solubilizar as amostras: CD₃OD ou DMSO-*d*₆.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES DE PUREZA DA ELIPTICINA, OLIVACINA, IOIMBINA E ALCALÓIDE 12

Para a olivacina (natural) e elipticina (comercial), o espectro de massas HR-ESI-MS-XEVO (Figura 22 e 23) apresentou o íon molecular $[M+H]^+$ m/z 247,1222 (valor teórico calculado para $C_{17}H_{15}N_2^+$ m/z 247,1229; $\Delta = 2,83$ ppm). Outra técnica utilizada para identificação e verificação de pureza foi UPLC-ESI-MS, além da olivacina (**7**) e da elipticina comercial (**10**), também foram gerados espectrogramas para a ioimbina (**27**) (Sigma-Aldrich) e para 2-metil -1, 2,3 4-tetrahydroelipticina (**12**), isolado, confirmando a pureza a autenticidade das quatro substâncias (Figura 24).

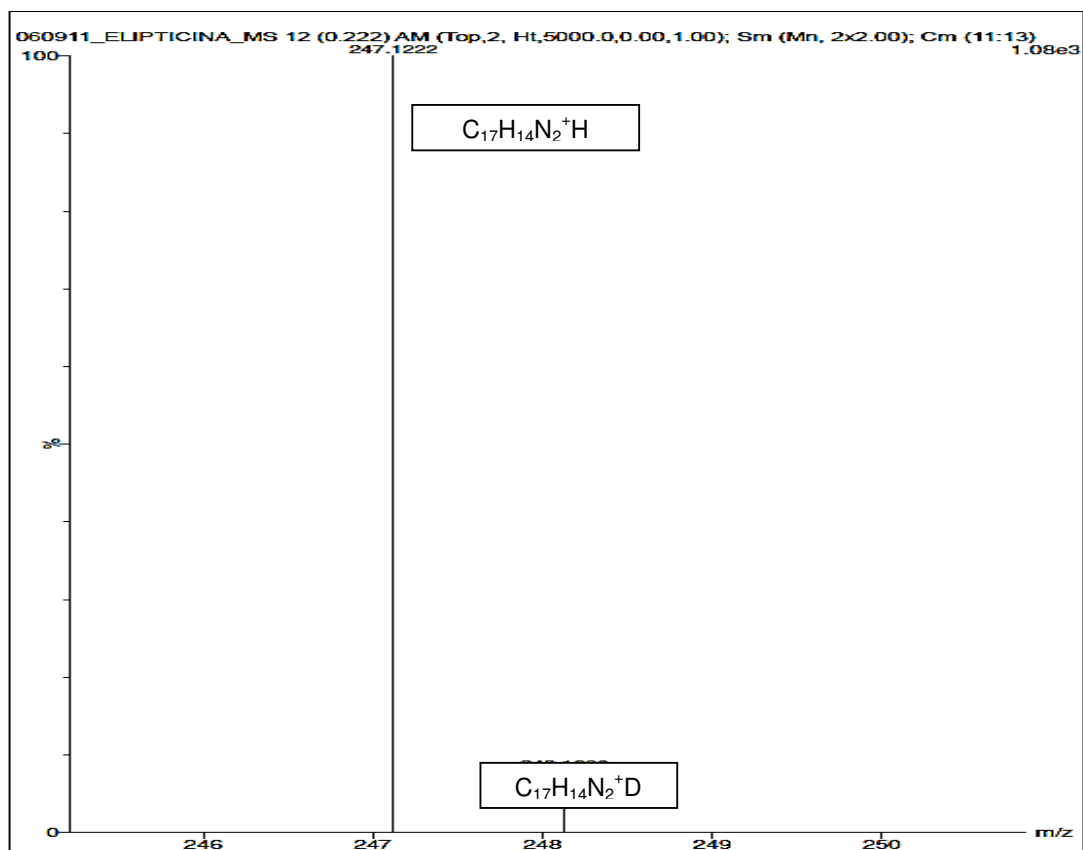


Figura 22. HRMS da elipticina $C_{17}H_{14}N_2^+$ (Sigma-Aldrich), HR-ESI-MS-XEVO, $[M+H]^+$ m/z 247,1222

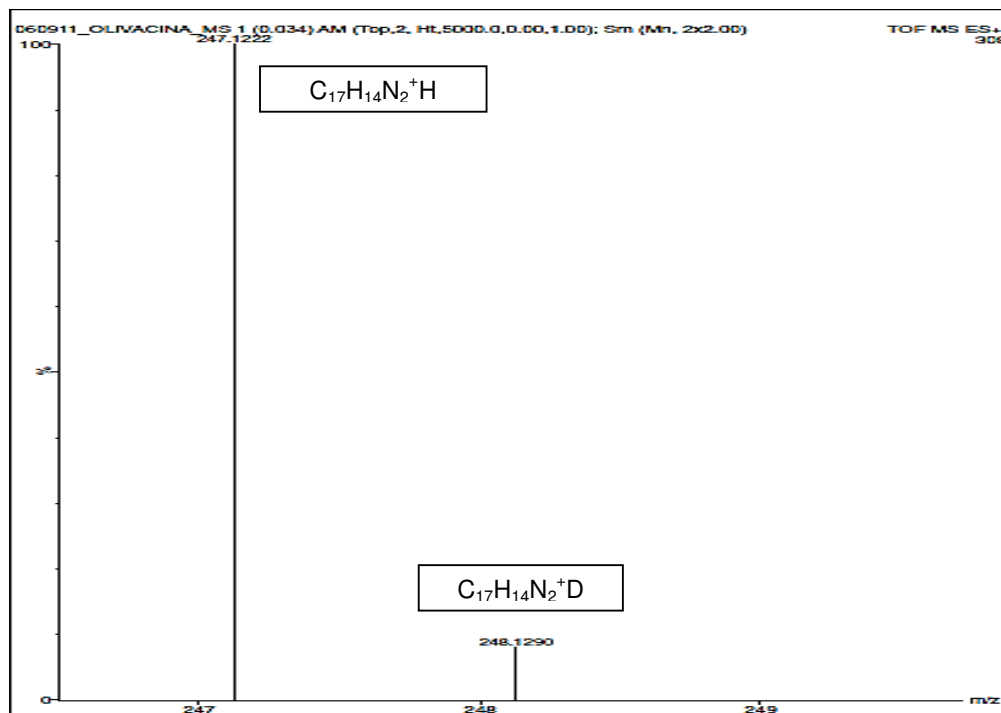


Figura 23. HRMS da olivacina isolada $C_{17}H_{14}N_2^+$, HR-ESI-MS-XEVO, $[M+H]^+$ m/z 247,1222.

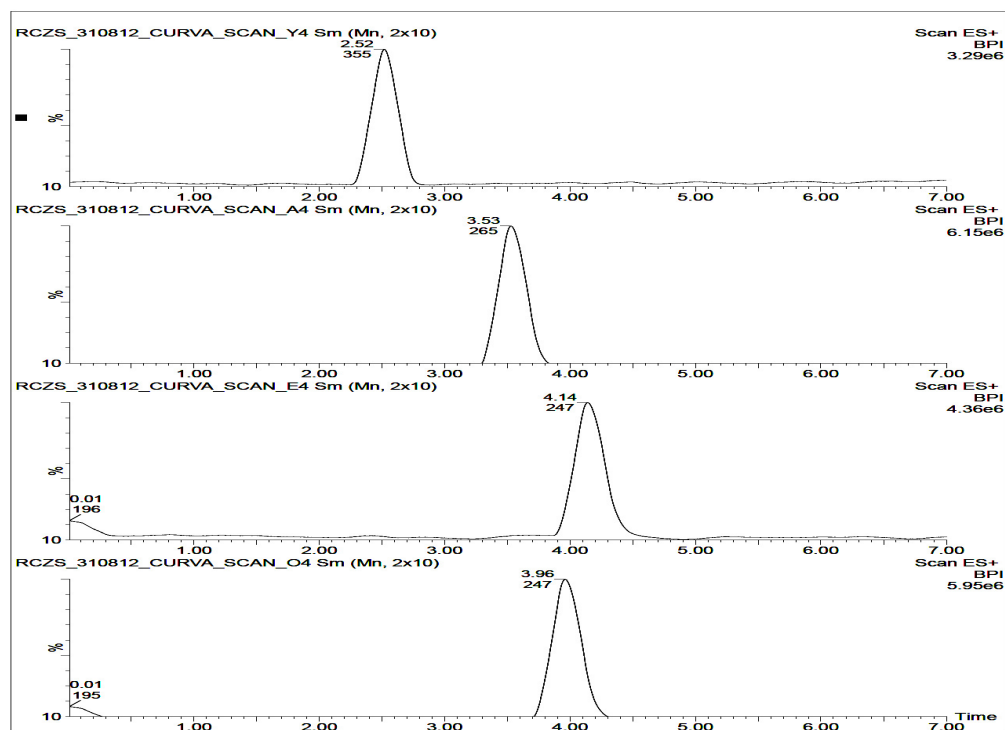


Figura 24. Espectrograma UPLC-ESI-MS da ioimbina (Sigma-Aldrich), 2-metil-1, 2,3 4-tetrahydroelipticina (natural), elipticina (Sigma-Aldrich), olivacina (natural), respectivamente.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ALCALOIDES ISOLADOS (SUBSTÂNCIAS 10 E 12)

O fracionamento cromatográfico levou ao isolamento de dois alcaloides, sendo um deles caracterizado por cristais em formato de agulhas de cor amarelo intenso, e o outro sólido amorfo de coloração branca. Ambos os compostos foram submetido a análises em CCD com co-eluição com padrão de elipticina comercial.

5.2.1 Análises dos dados obtidos para elipticina

Através da co-eluição em CCD da elipticina padrão (**10**) (Sigma-Aldrich) com os extratos/frações (pH 8, 10 e 12), sabia-se de antemão que a fração pH 8 do extrato das cascas de *A. vargasii* continha uma substância com as mesmas características físicas/cromatográficas de **10**, como R_F e fluorescência na luz UV-vis 366 nm. Após o isolamento (56, 45 mg), foram utilizadas técnicas de UPLC-ESI-MS e MS/MS para confirmação dos dados obtidos por CCD e explorar as propriedades de fragmentação de **10**.

O espectrograma obtido por UPLC-ESI-MS (Figura 25), mostrou um pico com t_R de 4,14 minutos com íon aduto $[M+H]$ m/z 247, valor consistente com a massa da fórmula $C_{17}H_{15}N_2^+$ $[M+H]^+$ referente a molécula de elipticina protonada.

Analisando o espectro MS/MS (Figura 26), destacam-se os íons em m/z 247,1, 232,1 e 204,1. A primeira perda de 15 unidades $[M^+H - 15]$ indica a saída de uma metila (m/z 232,1 referente ao íon $[C_{16}H_{12}N_2^+]$). O m/z 231,1 refere-se à perda de um hidrogênio. À medida que o íon m/z 231,1 vai sendo formado é possível verificar a presença de um novo fragmento de m/z 204,1 $[C_{15}H_{10}N^+]$, indicando a perda de HCN $[M^+H - 27]$. Estas fragmentações ocorrem segundo mecanismo de retro Diels-Alder. As condições utilizadas foram: energia de colisão de 50 eV, íons selecionado para fragmentação: 247,5, 231,3 e 204,4; tempo de retenção (tr) selecionado 4 - 4,6 min.

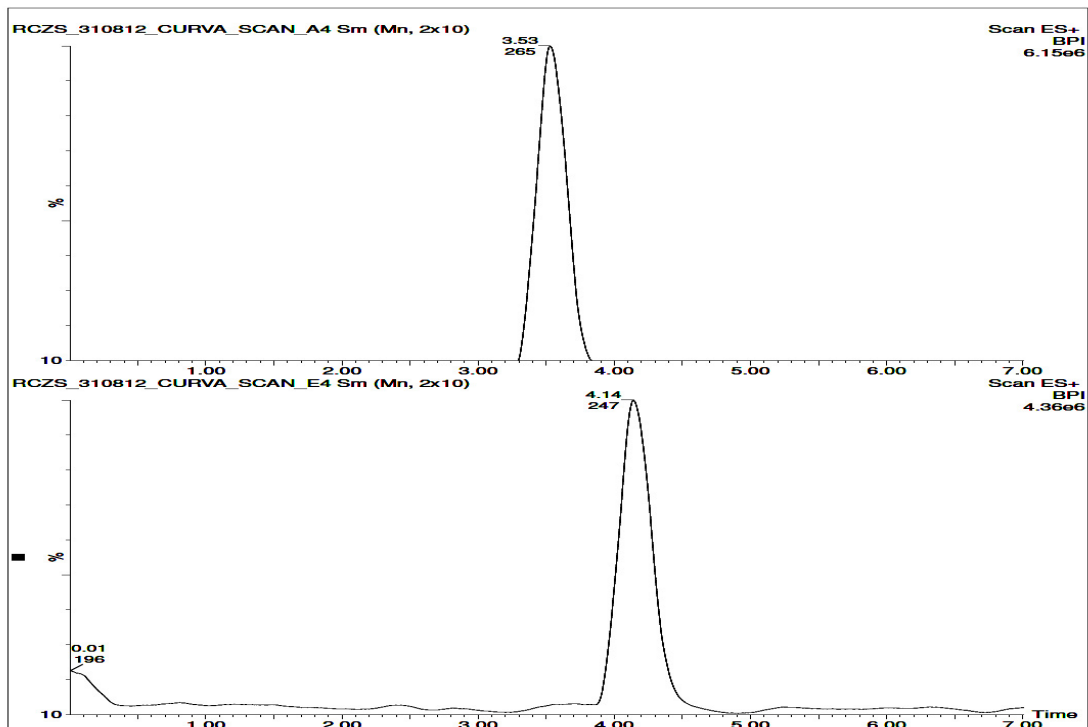


Figura 25. Espectrograma UPLC-ESI-MS sistema: H₂O + 0,1 % de CHOOH: MeOH do 2-metil-1, 2,3 4-tetrahydroelipticina (natural) (**12**) e elipticina natural (**10**), respectivamente.

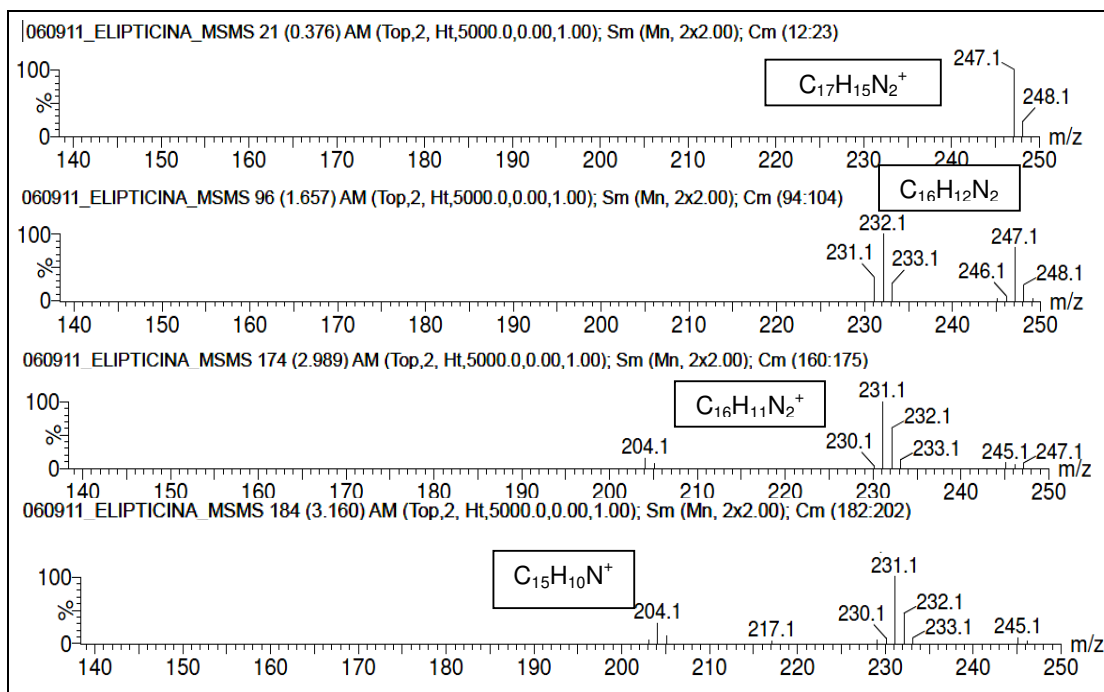


Figura 26. Espectro MS-MS da elipticina (**10**), selecionando a fragmentação dos principais m/z 247,5; 231,3; 204,1.

5.2.2 Análise dos dados obtidos para 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina.

O segundo alcaloide foi isolado, na forma de um sólido branco amorfo, cuja massa obtida foi de 59,9 mg. Para elucidação estrutural foram utilizadas técnicas de RMN ^1H e ^{13}C e comparados os dados com os da literatura (Henrique, 2007; Henrique *et al.*, 2010), além de dados analíticos de UPLC-ESI-MS (figura 25), que apresentou um pico com t_R de 3,53 min e $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 265, referente ao 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina (**12**). Ao analisar o perfil de fragmentação (Figura 27), observam-se majoritariamente os m/z 265,4, 236,3 e 222,3. O m/z 265,4 indica a fórmula molecular protonada $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2]^+$, o segundo fragmento m/z 236,3, $[\text{M}^+\text{H} - 29]$ referente à saída do grupo N-CH₃. O m/z 222,3 referente ao íon $[\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}^+]$, este valor mostra a perda de 43 unidades $[\text{M}+\text{H} - 43]$, indicando a saída do grupamento $[\text{CH}_3\text{-CH}=\text{NH}$ ou $\text{H}_2\text{C}=\text{N-CH}_3]$. A fragmentação também ocorre segundo mecanismo de retro Diels-Alder.

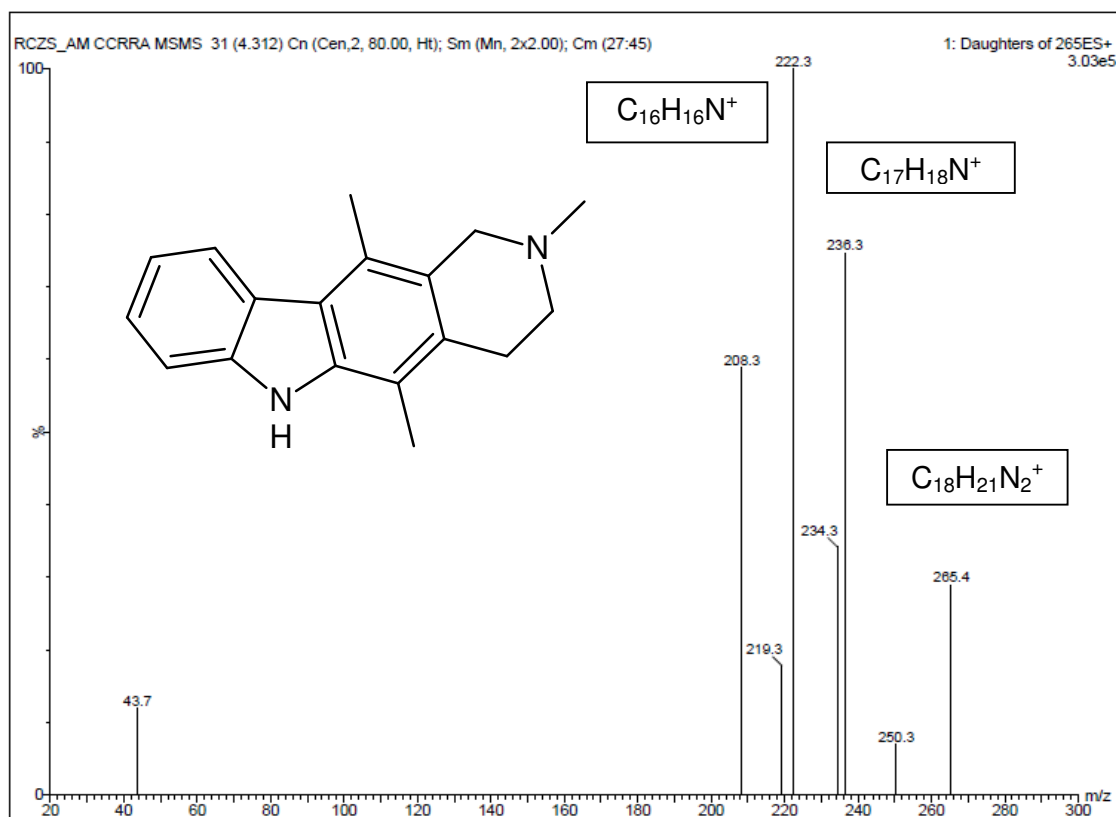


Figura 27. Espectro MS-MS da substância **12**, selecionando a fragmentação dos principais m/z 265,5, 236, 3 e 222,4.

Para elucidação estrutural da molécula, a substância foi submetida à experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. No espectro de RMN ^{13}C (ANEXO 1) observaram-se 18 sinais de carbonos referentes ao alcaloide. Analisando a ampliação da região δ 107 a 142, região característica de carbonos aromáticos, é possível verificar a presença de 12 sinais de carbonos (Figura 28). Os outros seis carbonos no espectro de RMN de ^{13}C estão na região característica de carbonos alifáticos como pode ser observado na ampliação (Figura 29). Observa-se também a presença de um pico com δ 53, este sinal é de resquícios de DCM, o solvente utilizado na recristalização da amostra. Estes dados foram comparados com a literatura (Tabela 2) e estão de acordo com os dados para a substância 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina (**12**).

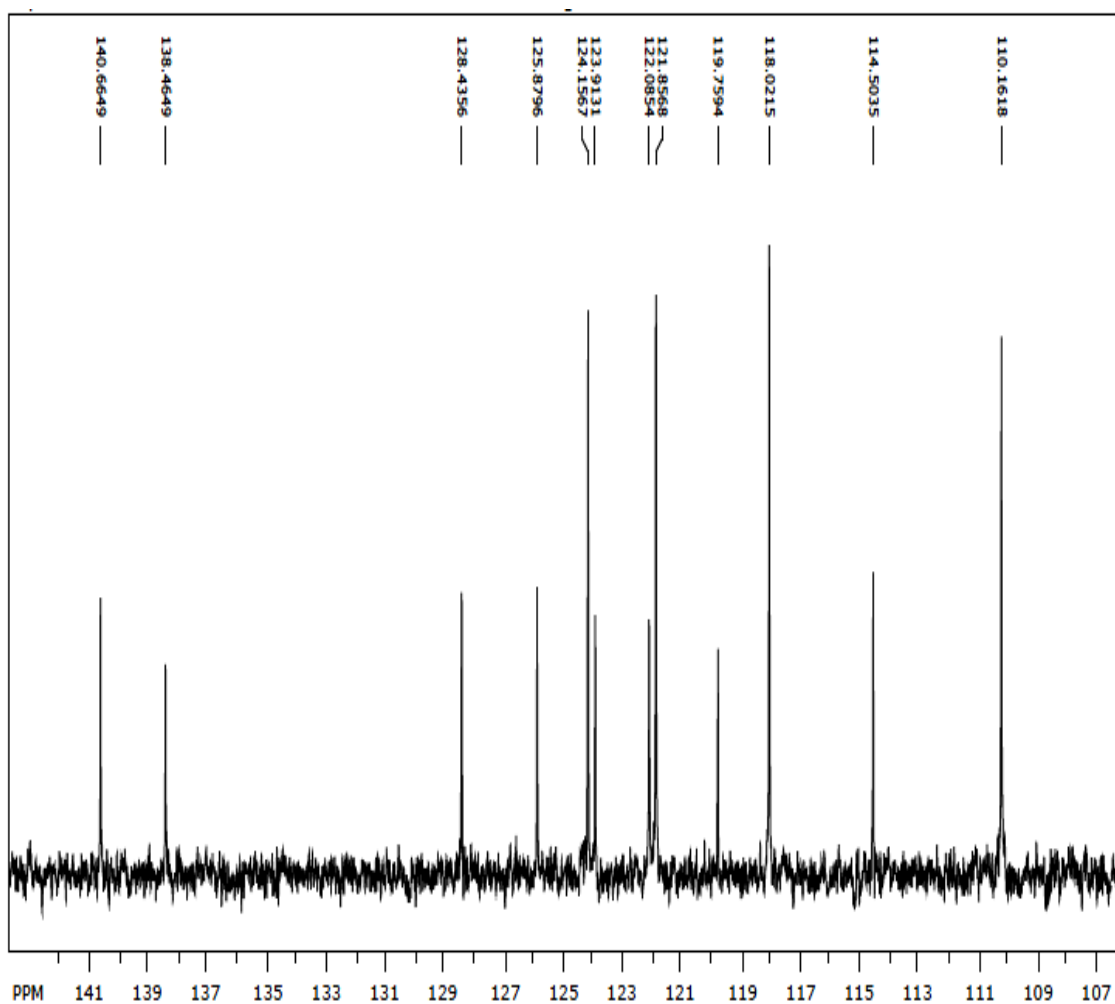


Figura 28. Ampliação da região aromática do espectro de RMN ^{13}C (150MHz) em CD_3OD do composto **12**.

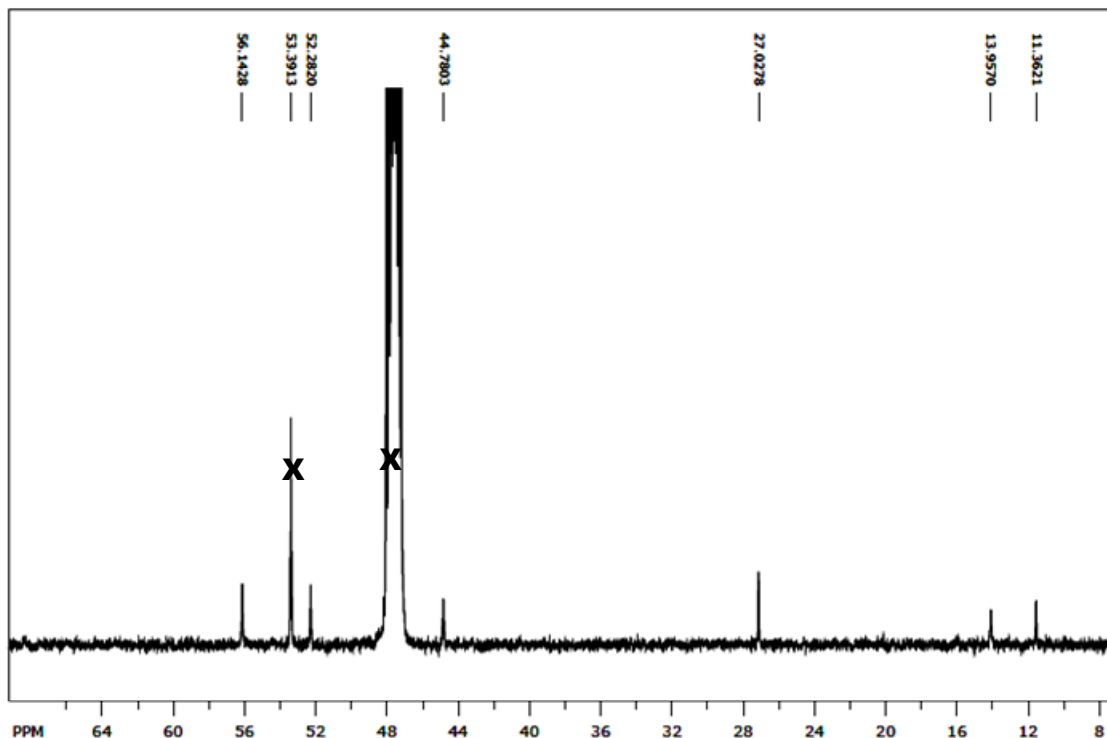
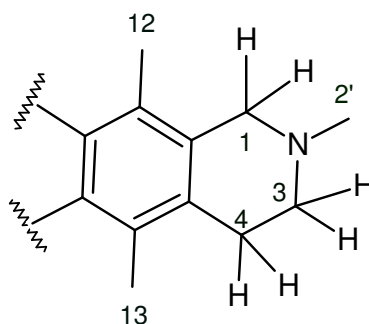


Figura 29. Ampliação da região δ 8-64 de RMN ^{13}C (150MHz) em CD_3OD do composto **12**. As impurezas (x) são DCM e CD_3OD .

Espectro “full” de RMN ^1H (ANEXO 2). Para um melhor detalhamento algumas regiões do espectro foram ampliadas e estão apresentadas no texto. Analisando a região entre δ 2,40 e 2,70 observa-se a presença de três singletos, integrando para 3H cada um (δ 2,4, 2,5 e 2,6), indicando se tratar dos hidrogênios metílicos, os quais foram atribuídos a H-13, H-2'e H-12, respectivamente (Figura 30). Entre δ 2,80 e 3,10 foram observados dois tripletos, ambos com $J = 6$ Hz e δ 2,8 e 3,0, integrando para dois hidrogênios, que foram atribuídos aos H-3 e H-4 do anel piperidínico, mais deslocado observa-se o sinal do H-1 na forma de um singlete em δ 3,7.



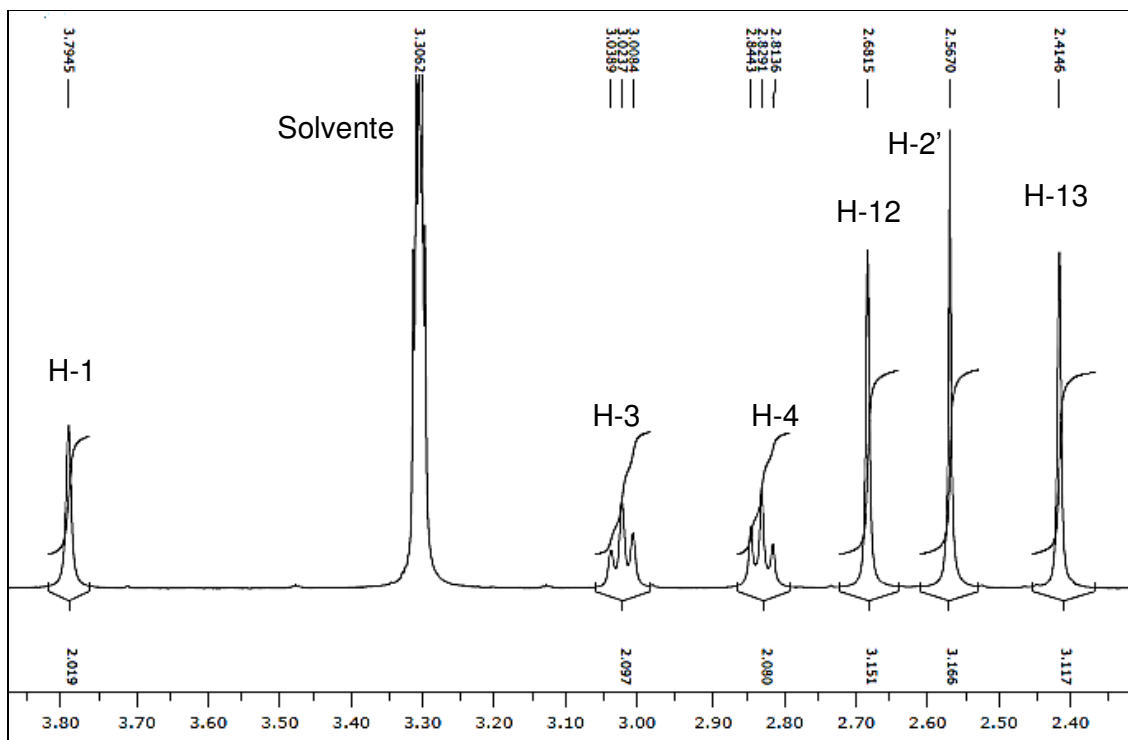
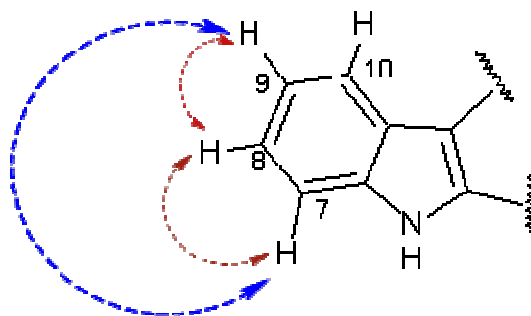


Figura 30. Região de δ 2,40 a 3,80 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CD_3OH do composto **12**.

Em δ 7,1 e 7,3 observam-se dois multipletos complexos que tem a forma de dois duplo duplo dubletos (*ddd*), ambos com $J_1 \sim J_2 = 8$ Hz e $J_3 = 1$ Hz, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-9 e H-8. O H-8 acopla com o H-7 e H-9 e a longa distância com H-10, o mesmo ocorre com o H-9, que acopla como H-10 e H-8 e a longa distancia com o H-7, esta característica faz com que ambos sejam apresentados na forma de um multipletos, que lembra um *ddd* (Figura 31). Em δ 7,45 e 8,13 nota-se a presença de dois dubletos com integração para 1H, ambos com $J = 8,0$ Hz, os quais, foram atribuídos aos H-10 e H-7 (Figura 32).



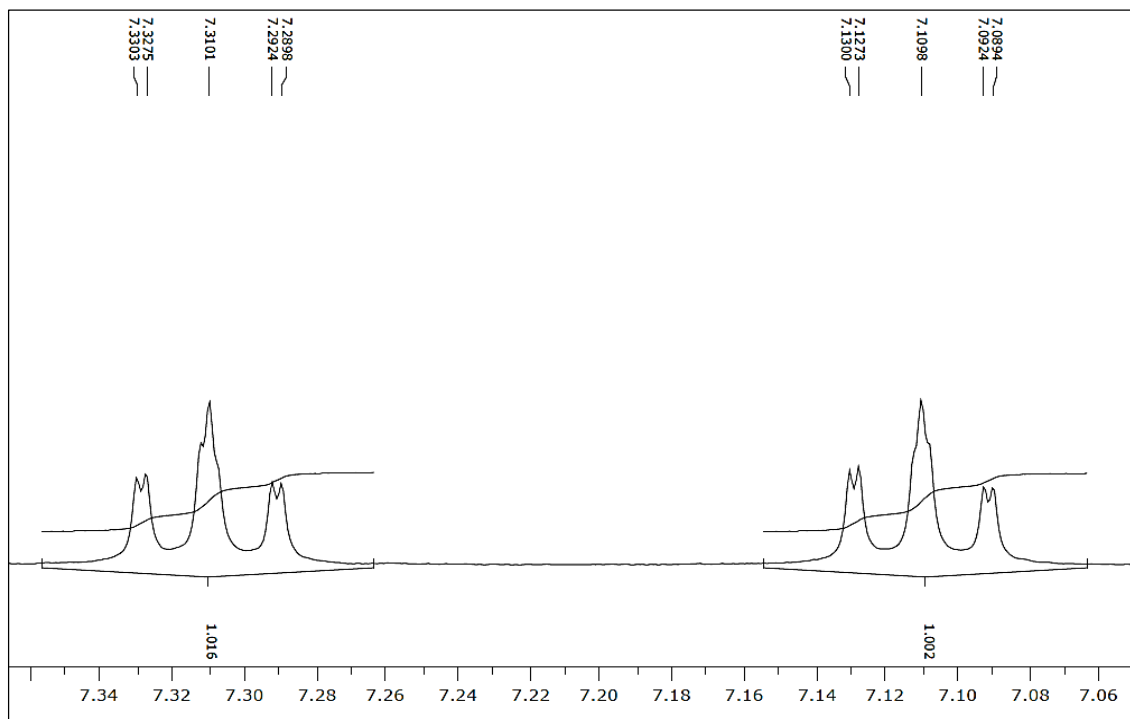


Figura 31. Ampliação da região de δ 7,0 a 7,35 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CD_3OH do composto **12**.

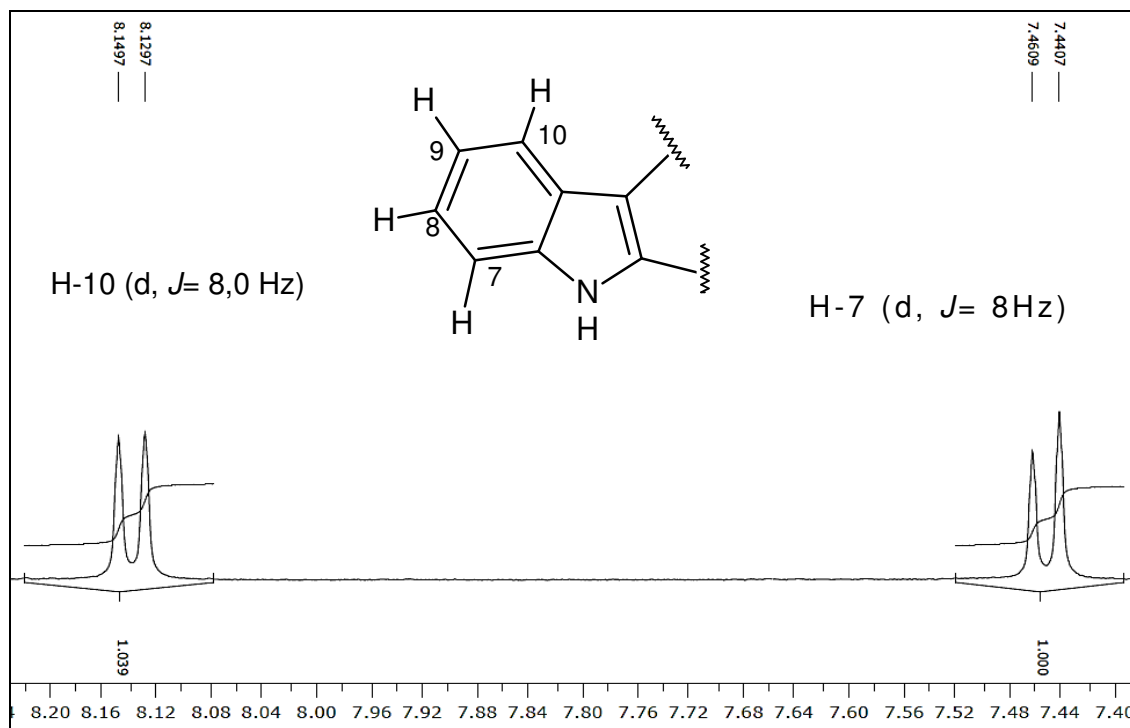


Figura 32. Ampliação da região de δ 6,9 a 8,30 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CD_3OH do composto **12**.

Após as análises realizadas e comparando os dados obtidos com a literatura (Henrique *et al.*, 2010) (Tabela 3), foi possível concluir que o segundo alcaloide isolado é o 2-metil-1,2,3,4-tetrahydroelipticina (Figura 33).

Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) obtidos para o alcalóide **12** em comparação com o 2-metil-1,2,3,4-tetrahydroelipticina da literatura.

N^o	Composto 12	2-metil-1,2,3,4-tetrahydroelipticina
C	(CD₃OD, 100 MHz)	CDCl₃:CD₃OD, 125 MHz
	δ	δ
6a	140,6	140,8
5a	138,4	138,7
4a	128,4	128,6
11	125,8	126,3
8	124,1	124,6
10a	123,9	124,1
10	122,0	122,3
1a	121,8	122,2
11a	119,7	120,1
9	118,0	118,4
5	114,5	114,9
7	110,1	110,6
1	56,1	56,5
3	52,2	52,5
2'	44,8	45,4
4	27,0	27,3
12	14,0	14,7
13	11,3	12,1

Tabela 3. Dados de RMN ^1H (400 MHz) para o alcaloide isolado **12** para o 2-metil-1,2,3,4 tetrahydroelipticina da literatura.

No. de H	Composto 12 (CD_3OD , 400 MHz)	2-metil-1,2,3,4-tetrahydroelipticina ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz), (Henrique <i>et al.</i> , 2010)
	δ (multiplicidade, <i>J</i>)	δ (multiplicidade, <i>J</i>)
H-13	2,4 (s)	2,4 (s)
H-2	2,5 (s)	2,6 (s)
H-12	2,6 (s)	2,7 (s)
H-3	2,8 (t, 6 Hz)	2,8 (t, 6 Hz)
H-4	3,0, (t, 6 Hz)	3,0 (t, 6 Hz)
H-1	3,7 (s)	3,8 (s)
H-7	7,4 (d, 8 Hz)	7,4 (d, 8 Hz)
H-8	7,3 (m)	7,3 (t, 8 Hz)
H-9	7,1 (m)	7,1 (t, 8 Hz)
H-10	8,1 (d, 8 Hz)	8,2 (d, 8 Hz)

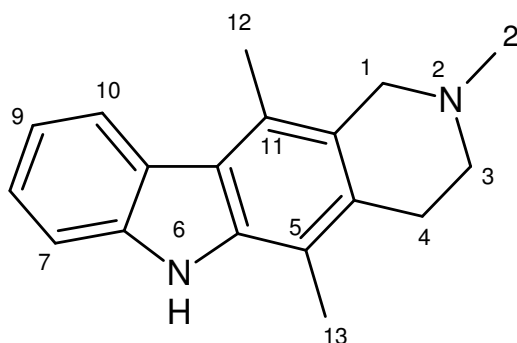


Figura 33. Estrutura numerado do 2-metil 1,2,3,4-tetrahydroelipticina (**12**)

5.3 REAÇÃO

As reações foram executadas em geral em escala de um (1) miligrama de material de partida e os produtos da reação foram analisados basicamente por CCD e UPLC-ESI-MS. Depois as escalas foram aumentadas para obter produtos para caracterização por RMN de ^1H e ensaios biológicos. Foi necessário determinar procedimentos com condições reacionais favoráveis à obtenção dos produtos desejados. A obtenção dos derivados aqui descritos foi de acordo com mecanismos

de reações de substituição eletrofílica aromática em que o nitrogênio do núcleo indólico ao mesmo tempo ativa o anel de benzeno do indol e direciona as substituições para as posições *orto* e *para*. Tal direcionamento de substituições eletrofílicas aromáticas estruturas indólicas é conhecida em trabalhos anteriores por outros (Devraj *et al.*, 1996, Dracinsky *et al.*, 2007)

5.4 BROMAÇÃO

Inicialmente as tentativas de realizar a bromação direta da elipticina foram adaptadas do procedimento de Dracinsky e colaboradores (2007) que efetuaram a bromação de 1,4-dimetil-carbazol (**21**, análogo estrutural da elipticina) gerando o produto tribromado **22** com rendimento de 100% sob as condições de agitação a temperatura ambiente, por 20 min (Figura 34). Tais condições de reação aplicadas à elipticina não levaram à formação de produtos bromados em bons rendimentos (abaixo de 10%).

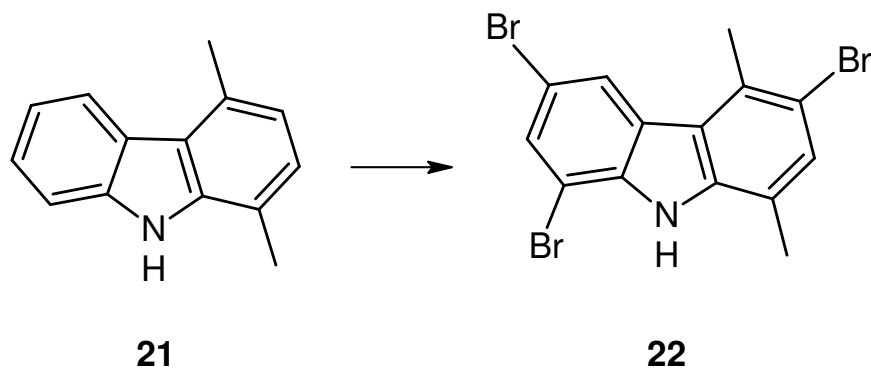


Figura 34. Bromação de 1,4 dimetil-carbazol por Dracynský *et al.* (2007).

Na bromação da elipticina, esperar-se-ia, *a priori*, a formação principalmente de três produtos bromados em que o bromo deverá se ligar nas posições *orto* e *para*, em relação ao átomo de N do núcleo indólico, conforme esboçado na Figura 35. Nesse raciocínio, o anel piridínico estaria desativado para reações de substituição eletrofílica aromática pelo átomo de N piridínico ser eletronegativo. Por outro lado, o átomo de N do núcleo indólico deverá ativar o anel do indol, direcionando a regioquímica das bromações.

Importante no caso da elipticina é a doação de elétrons do átomo de N indólico gerando cargas negativas nas posições *orto* e *para* favorecendo a adição

inicial do E^+ (eletrófilo, Br^+) nestas posições (seguida da eliminação de H^+ para completar a substituição). Substituição eletrofílica nas posições *meta* em relação ao átomo de N indólico não são observados em reações de elipticina e estruturas análogas (Chaitanya e Nagarajan, 2011). Por analogia, o trabalho de Dracynský e colaboradores (2007), (Figura 34) mostrou que no caso da elipticina, poder-se-ia esperar a formação de produto dibromado **17**.

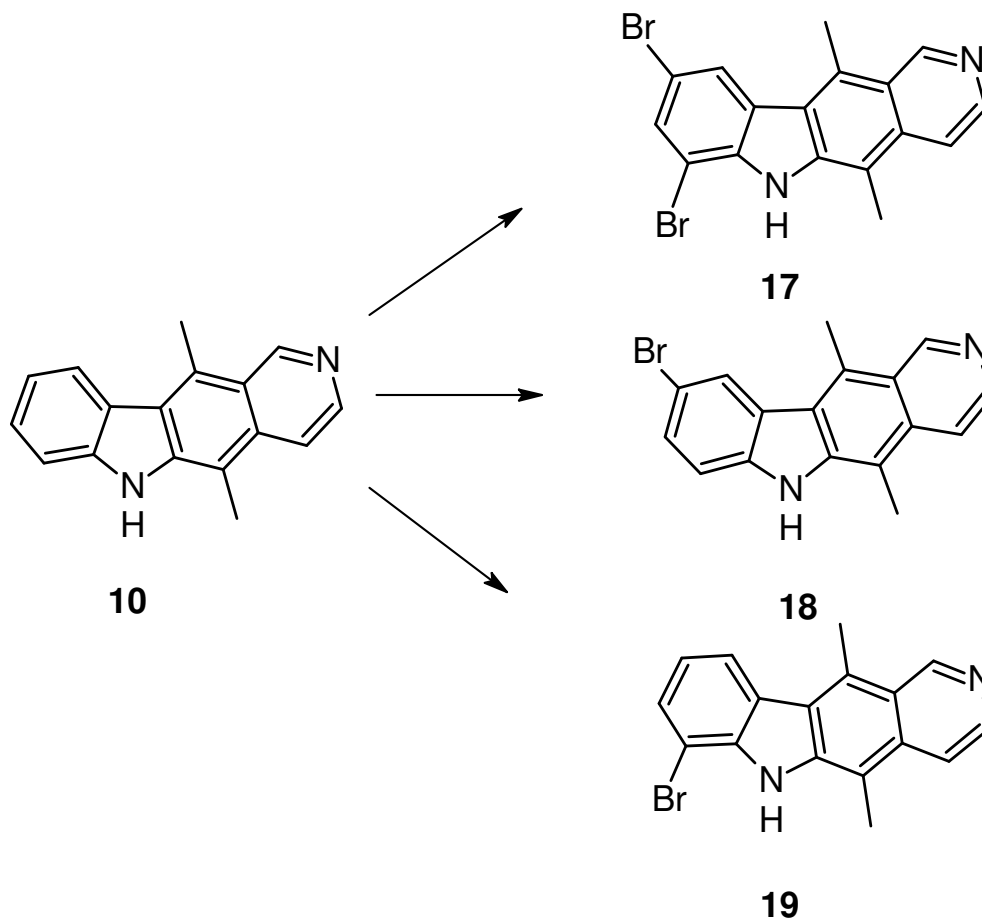


Figura 35. Produtos previstos *a priori* na bromação direta da elipticina.

O procedimento adotado para a bromação da elipticina foi adaptado de Holts e Pettrow (1947) que efetuaram a bromação da quindolina (**23**), um alcaloide que foi muito estudado antigamente devido sua atividade antitumoral e que possui bastante analogia estrutural com a elipticina. No procedimento de Holts e Pettrow, a bromação ocorre em meio ácido e com aquecimento por 1 h e o resultado é a 7-bromo-quindolina (**24**) (Figura 36).

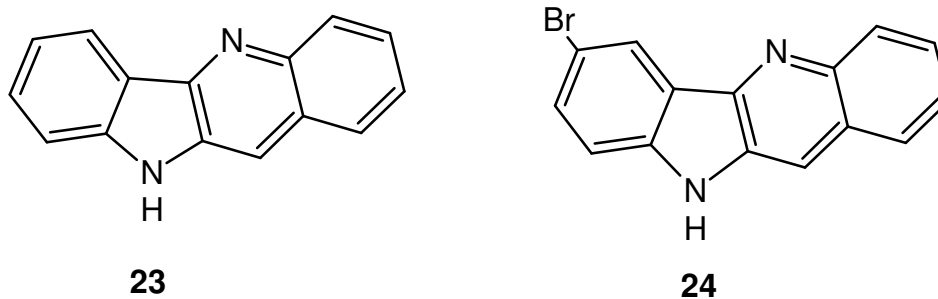


Figura 36. A quindolina e seu derivado bromado, descrito por Holts e Pettrow (1947)

A mistura formada na bromação da elipticina, utilizando o procedimento de Holts e Pettrow (1947), adaptado, foi caracterizada por um sólido amorfo amarelo, de baixa solubilidade em diversos solventes (EtOH; MeOH, CHCl₃, DCM, Acetona, AcOet, iPrOH) e misturas de solventes orgânicos. A dissolução dos produtos ocorreu minimamente em uma mistura de AcOH e CHCl₃ (1:1). A baixa solubilidade dos produtos formados parece ser uma característica da reação (Dalton *et al.*, 1967). Este foi um dos fatores que impossibilitou a separação cromatográfica e dificultou o trabalho em geral com a mistura de produtos bromados.

Foram obtidos 28,1 mg de resíduo seco, que submetido a CCD com o padrão (elipticina R_F 0,37), no sistema de solvente CHCl₃:MeOH (9:1) verificou-se a presença de dois produtos, com R_F 0,71 e 0,42. Análises de UPLC-ESI-MS (Figura 37) confirmaram o observado por CCD e revelaram um pico com m/z 405 [M+H]⁺, referente a um produto dibromado **17** e um pico apresentando m/z 325 [M+H]⁺, referente a um produto monobromado **18**. Pelos dados obtidos foi possível verificar que a reação de bromação levou à formação de uma mistura de dois compostos bromados. Com tempos de retenção de 8,63 min para o produto monobromado (m/z 325) e de 10,25 min para o produto dibromado (m/z 405).

Para os picos dos produtos monobromado (t_R = 8,63 min.) e dibromado (t_R = 10,25 min.), os espectros de massas correspondentes foram de acordo com os respectivos espectros simulados utilizando o software da UPLC-ESI-MS (Waters) e as fórmulas.

O espectro de massas do produto monobromado apresenta o par de sinais (m/z 325 e 327) (Figura 38) na proporção de *ca.* 1:1, devido à presença dos isótopos ⁸¹Br e ⁷⁹Br na sua abundância natural característica. No espectro de MS do produto

dibromado (Figura 39), observam-se os sinais característicos de moléculas contendo 2 átomos de ^{81}Br (m/z 407, intensidade 1), 1 átomo de ^{79}Br + 1 átomo de ^{81}Br (m/z 405, intensidade 2) e 2 átomos de ^{79}Br (m/z 403, intensidade 1).

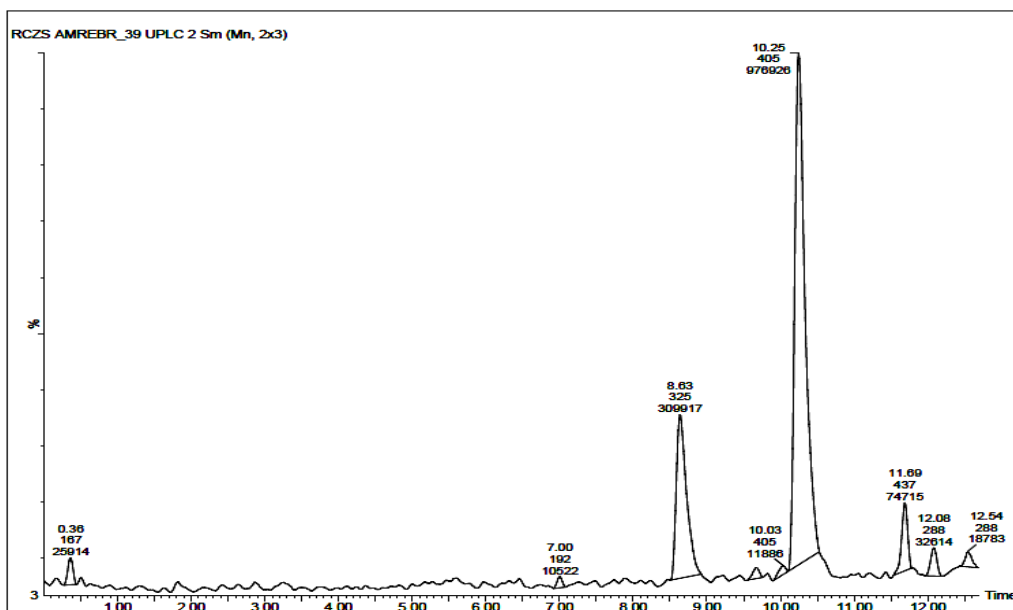


Figura 37. Cromatograma UPLC-ESI-MS, sistema: H_2O + 0,1 % de CHOOH : MeOH da mistura de bromados.

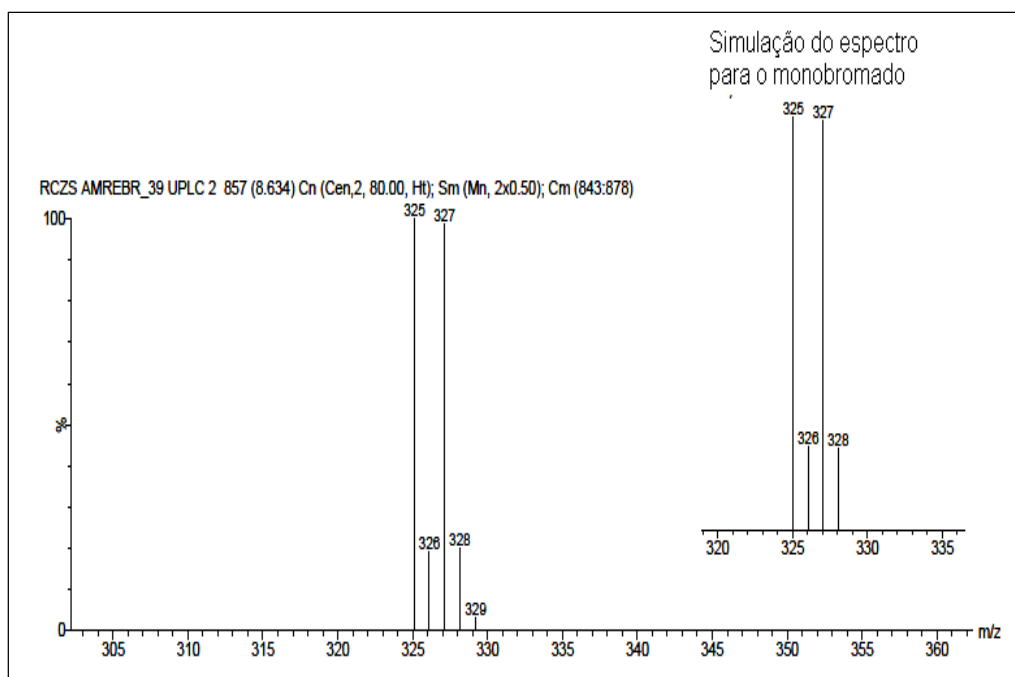


Figura 38. Espectro de massas UPLC-ESI-MS do produto monobromado **18**.

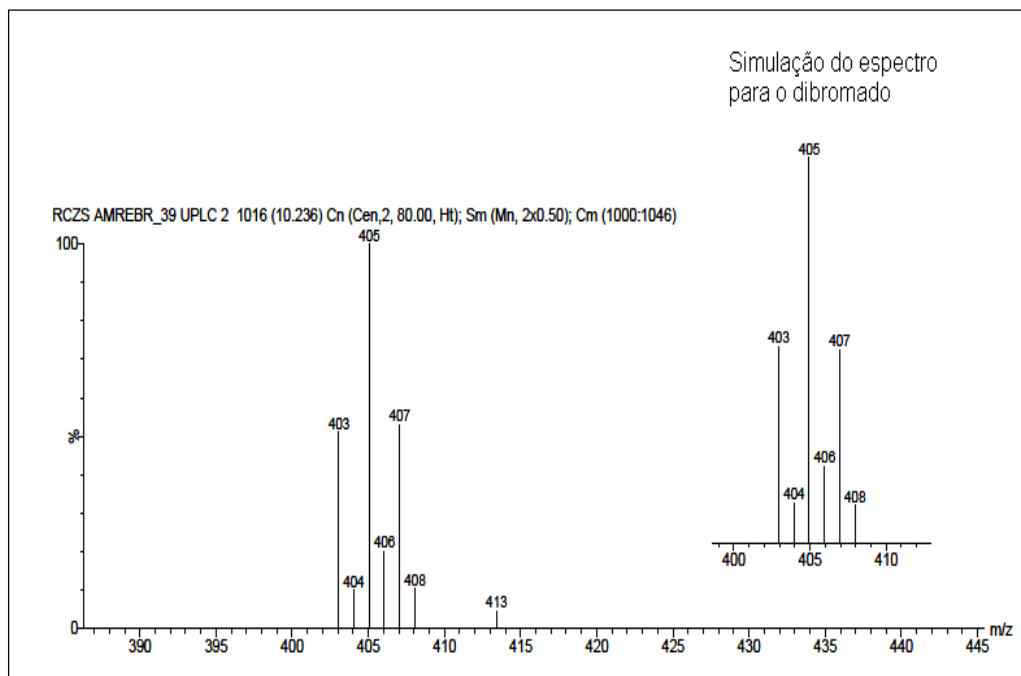


Figura 39. Espectro de massas UPLC-ESI-MS do produto dibromado 17.

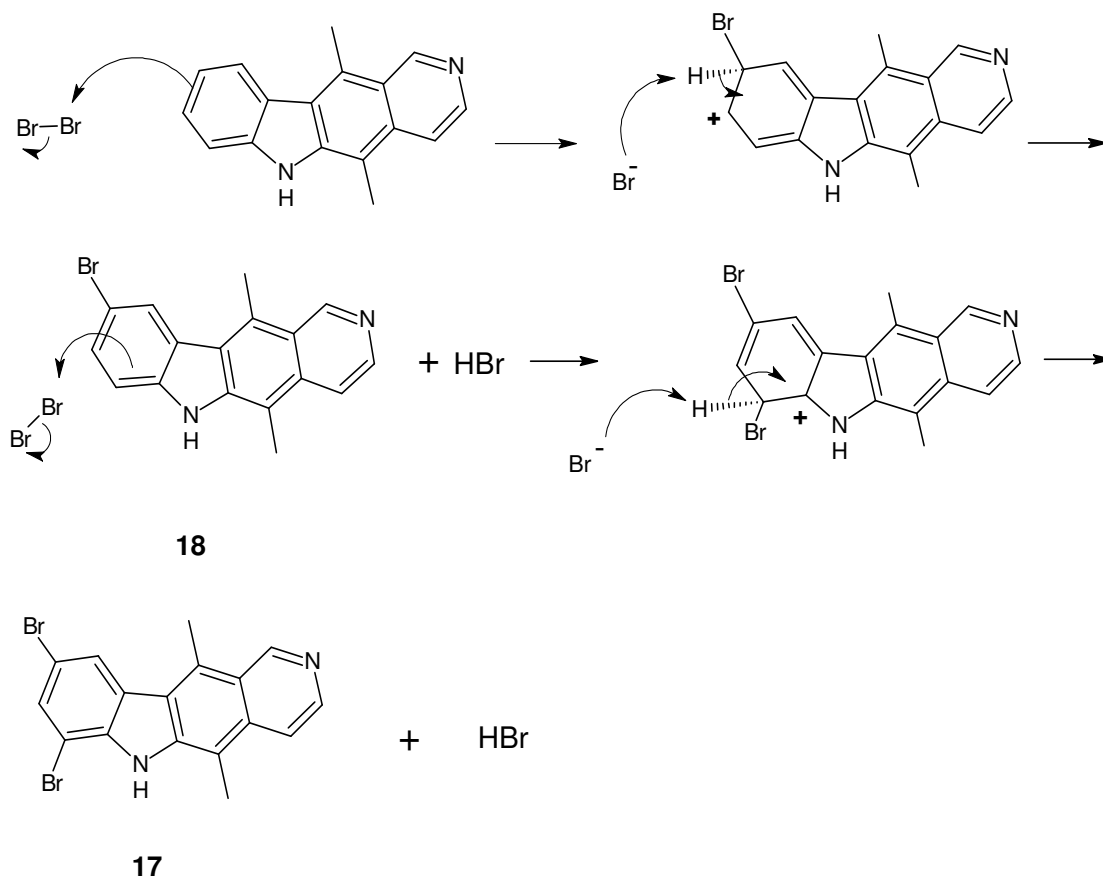


Figura 40. Mecanismo de reação para a formação dos produtos bromados.

O mistura reacional foi submetida a análises de RMN ^1H (ANEXO 3). Para facilitar a discussão algumas ampliações do espectro foram colocadas no texto. A partir dos dados obtidos e em comparação a literatura (Devraj *et al.*, 1996), foi possível atribuir os sinais dos produtos monobromado e dibromado, baseado nas integrais dos picos. A relação existente entre os sinais do composto majoritário dibromado e do minoritário monobromado estão na ordem de 3:1. Os dados de RMN de ^1H obtidos e da literatura para o 9-bromoelipticina estão apresentados na Tabela 3. Analisando a ampliação (Figura 41) da região entre 2,72 e 3,20 ppm observa-se três singletos, dois deles com integral para valores menor que 1 e um com integral para 6H. Os dois singletos com δ 2,89 e 3,17 são hidrogênio atribuídos ao produto minoritário (m/z 325), ou seja, o composto **18**, enquanto o sinal em δ 2,99 é atribuído ao produto majoritário, o produto **17**. Todos esses sinais mostrados na Figura 41 referem-se aos hidrogênios metílicos H-12 e H-13, sendo que os deslocamentos em δ 2,89 e 3,17, foram atribuídos aos hidrogênios do composto monobromado (**18**) e o sinal em 2,99 foi atribuído as metilas do produto dibromado (**17**).

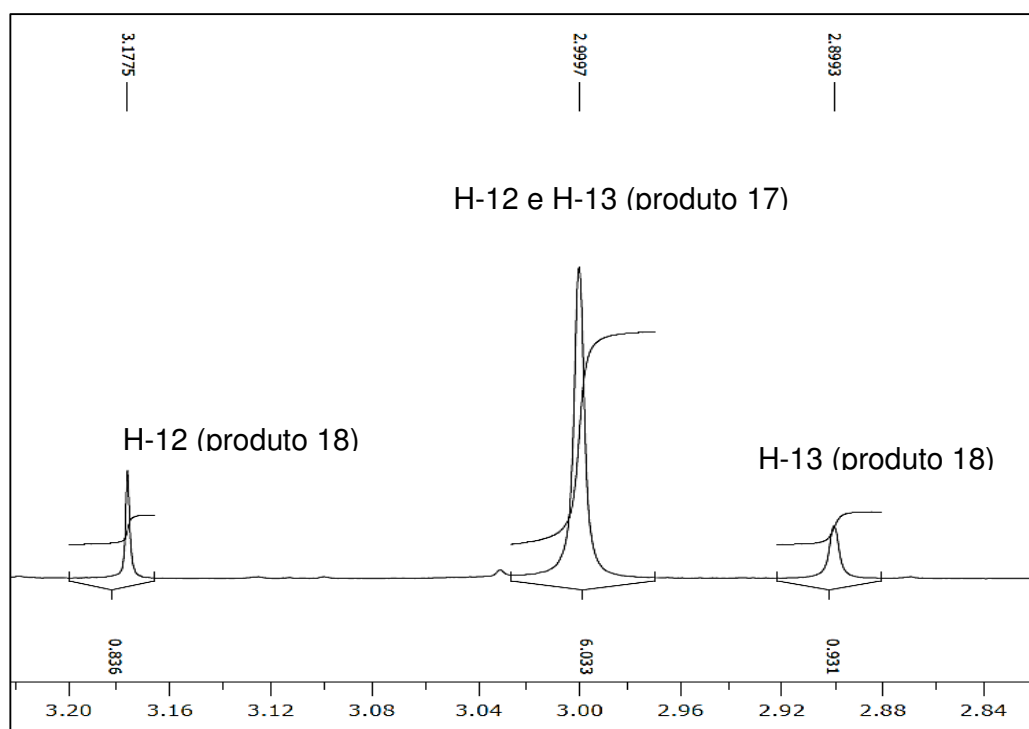


Figura 41. Ampliação d faixa de δ 2,72 a 3,20 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 da mistura de bromados.

Na faixa entre δ 10,10 e 10,05, (Figura 43-A) observou-se a presença de dois singletos, na proporção aproximada de 1:3, ou seja, um destes sinais corresponde ao H-1 do produto majoritário (**17**) e o outro ao H-1 do minoritário (**18**), de acordo com a literatura. O multipletto observado em δ 8,52, indica que ocorre a sobreposição de picos refere-se aos hidrogênios dos dois produtos (Figura 41-B). Esse tipo de sinal também foi observado por Devraj e colaboradores (1996) ao identificar o composto 9-bromoelipticina (**18**) discutido em seu trabalho, baseado neste dado e nas integrais observadas, pode se concluir que este multipletto refere-se aos hidrogênios piridínicos H-3 e H-4 de ambos os produtos (**17** e **18**).

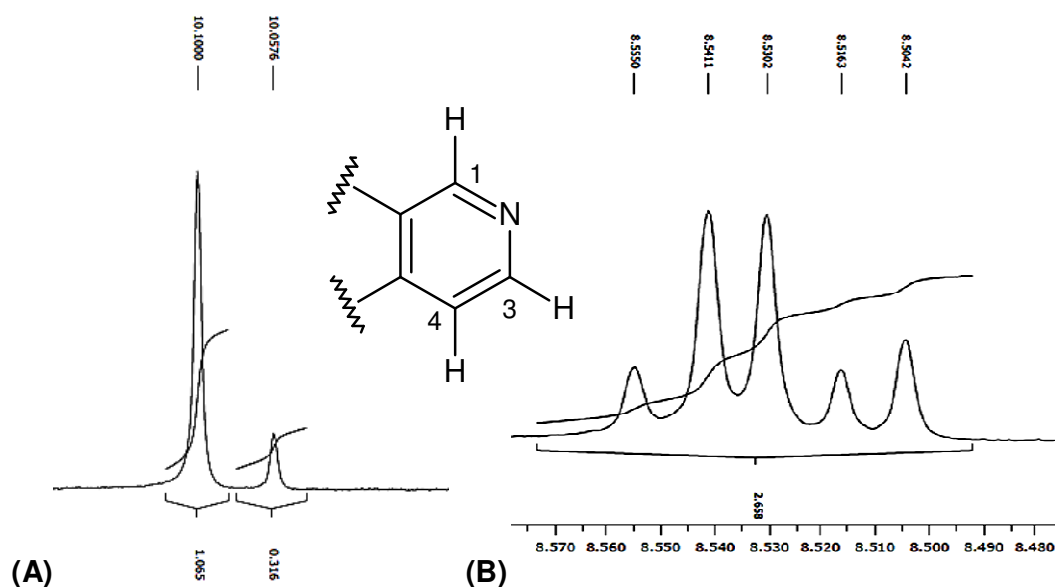


Figura 42. Ampliação das regiões referentes ao anel piridínicos do espectro de RMN ¹H (500 MHz) em DMSO-*d*₆ da mistura de bromados.

Os outros dois sinais mostrados na Figura 44 refere-se a hidrogênios do anel benzênico do grupo indólico. Através da ampliação destas regiões observam-se a presença de um dubleto em δ 8,60, com integração para 1,4 H, cuja constante de acoplamento é de $J = 1,6$ Hz, esse valor de J indica acoplamento *meta*, este sinal foi atribuído ao H-10, no caso a interação ocorre entre o H-10 e o H-8 (Figura 44-A)

Analisando a ampliação entre δ 7,60 e 7,86 (Figura 44-B) é possível observar a presença de dois sinais, sendo um deles um duplo dubleto em δ 7,82, atribuído ao H-8, com $J = 1,9$ Hz e 8,6 Hz. Estes valores de constantes de acoplamento sugerem acoplamento em *orto* ($J = 8,6$ Hz) e em *para* ($J = 1,9$ Hz). O segundo sinal

observado é um dubleto em δ 7,66 e $J = 8,6$ Hz que foi atribuído ao H-7. E para finalizar a estrutura observa-se um pequeno singlete em δ 12,3 (s), pertence ao NH do anel indólico. Após estas análises e a comparação com dados da literatura (Tabela 3) é possível concluir que o produto monobromado **18** formado é o 9-bromoeliptcina.

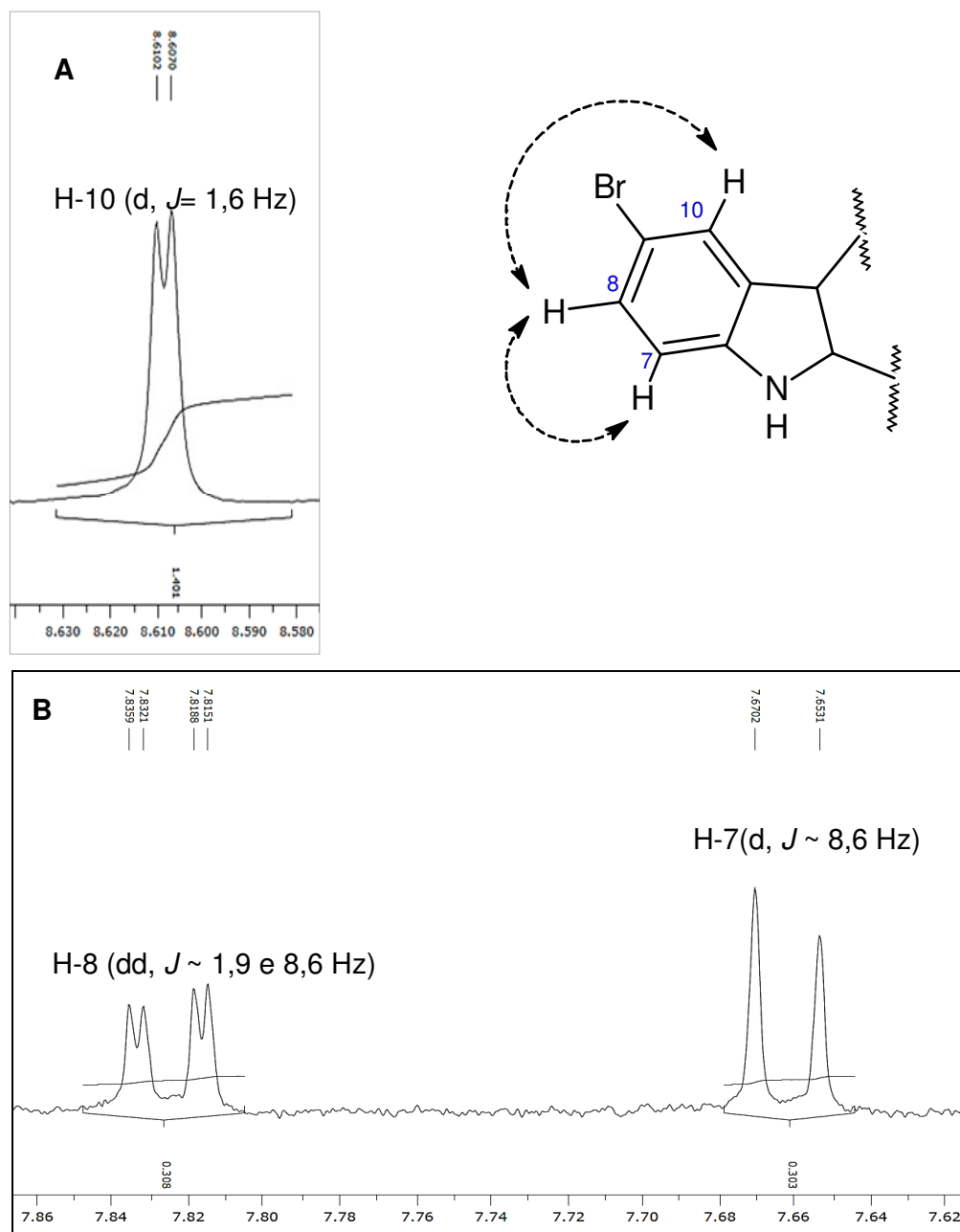


Figura 43. Ampliação do anel substituído do espectro de RMN ^1H da mistura de bromados.

Para confirmar a estrutura do produto dibromado, foi crucial observar a ausência do sinal referente à H-7, indicando que o C-7 estaria substituído. Junto a

isso, um duplete em δ 8,10 com $J = 1,6$ Hz, característico de acoplamento *meta*, foi atribuindo ao H-8, confirmando assim a estrutura do produto 17, como sendo a substância 7,9-dibromoelipticina, inédita na literatura química. O sinal em δ 11,8 foi atribuído ao NH do anel indólico.

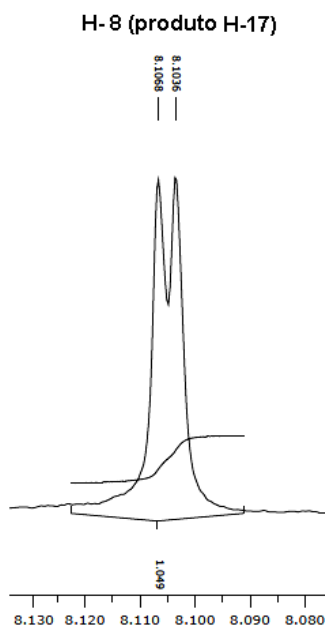
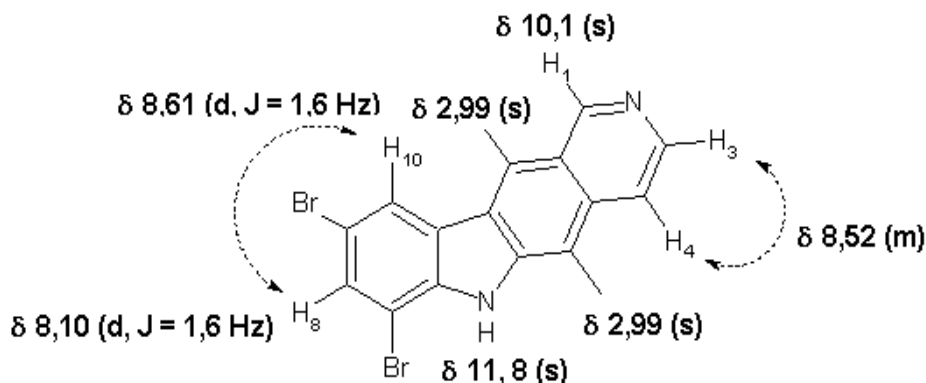
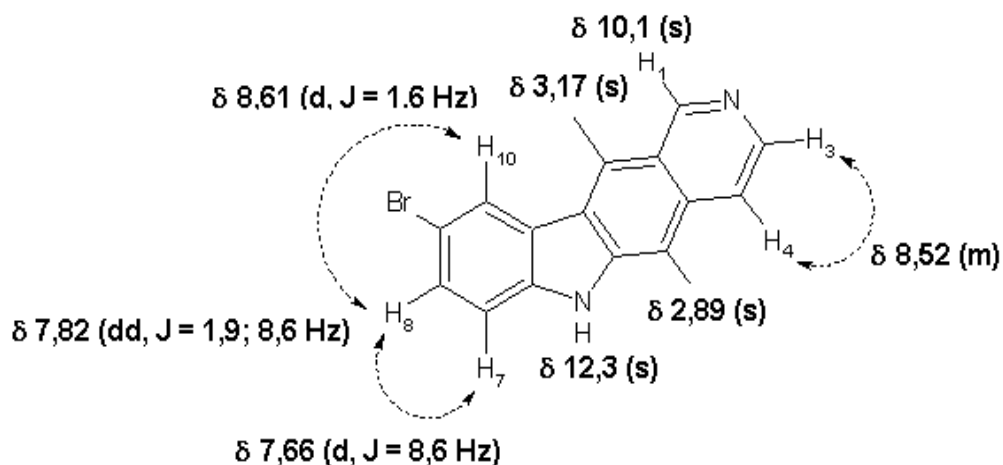


Figura 44. Região de δ 8,08 a 8,13 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 da mistura de bromados.



17

Figura 45. 7,9-bromoelipticina com os sinais atribuídos, multiplicidades e constantes de acoplamento de RMN ^1H , 500 MHz em DMSO- d_6 .



18

Figura 46. 9-dibromoelipticina com os deslocamentos, multiplicidades e constantes de acoplamento de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6).

Tabela 3. Dados de RMN ^1H (500 MHz) para o 9-bromoelipticina e 7,9-bromoelipticina em comparação com dados da Literatura.

N° H	9-bromoelipticina (DMSO- d_6 , 500 MHz) (18)	7,9-bromoelipticina (DMSO- d_6 , 500 MHz) (17)	Devraj et al., 1996 9-bromoelipticina (DMSO- d_6 , 300 MHz)
	δ , multiplicidade, J	δ , multiplicidade, J	δ , multiplicidade, J
13	2,89, s		2,76, s
12	3,17, s	3,00 s	3,20, s
9	----	---	----
7	7,66, d, 8,6 Hz	---	7,50, d, 8,5 Hz
8	7,82, dd, 1,8 e 8,6 Hz	8,10, d, 1,6 Hz	7,66, dd, 1,5 e 8,5 Hz
10	8,61, d, 1,8 Hz	8,61, d, 1,6 Hz	7,91, d, 6 Hz
3 e 4	8,52 (sobrepostos)	8,52, m 8,54, m	8,43 (sobrepostos)
1	10,10, s	10,10, s	9,69, s
6	12,30, s	11,80, s	11,53, s

5.5 NITRAÇÃO

Alguns procedimentos obtendo a elipticina nitrada já foram descritos na literatura, no entanto observa-se que geralmente o produto de partida não é a elipticina e sim um precursor biossintético ou sintético da mesma (Dalton *et al.*, 1967), ou compostos com estruturas similares (Holt e Petrow, 1947). Dracinsky e colaboradores (2007) relataram o procedimento de nitração a partir da elipticina e HNO₃ e AcOH em banho de gelo, sob agitação por 45 min, com rendimento de 73%. O mesmo procedimento foi reproduzido neste trabalho, mas o resultado não foi totalmente reprodutível. Assim que o HNO₃ entrava em contato com solução de AcOH e elipticina havia a formação de um precipitado. Inicialmente a reação era interrompida com água e neutralizada com NaHCO₃ até pH 8, depois se passou a utilizar Na₂CO₃ até pH 10 e observou-se uma maior rendimento final. O procedimento adotado apresentou baixo rendimento (28%). Isto deve estar relacionado à baixa solubilidade, tanto da elipticina quanto do produto formado. Além de apresentar discrepâncias nos dados de rendimento, o produto obtido na reação realizada por Dracinsky e colaboradores (2007) formou produto diferente do obtido no presente trabalho, como será mostrado mais abaixo.

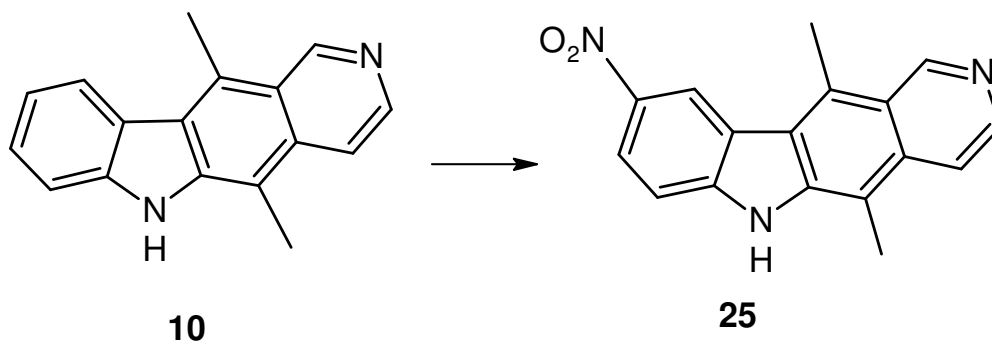


Figura 47. Produto obtido por Dracinsky e colaboradores (2007)

Foram obtidos 39,5 mg de produto bruto, o qual foi purificado em uma coluna cromatográfica *flash* utilizando como fase móvel CHCl₃:*i*-PrOH em um gradiente 9,8:0,2 e 9,5:0,5. Foram obtidos 1,5 mg de mistura de produtos (R_F 0,42), 1 mg do produto nitrado puro (**19**, 30 %, R_F 0,65) e 1,7 mg de elipticina (62 % de conversão da elipticina, R_F 0,31). O sistema usado para determinar os R_F foi C HCl₃:MeOH 9:1. Fatores que dificultam esta reação é o baixo rendimento, característica que pode ser

atribuída à baixa solubilidade tanto da elipticina quanto do produto formado, já que uma das características desta reação é que assim que se adiciona o HNO_3 ocorre à precipitação de parte do material de partida. Análises de UPLC-ESI-MS revelaram um pico cromatográfico majoritário com $t_R = 6,58$ min contendo como íon aduto $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 292, íon de um produto mononitrado, cuja estrutura a priori, acreditava-se ser uma das duas mostradas abaixo (Figura 49).

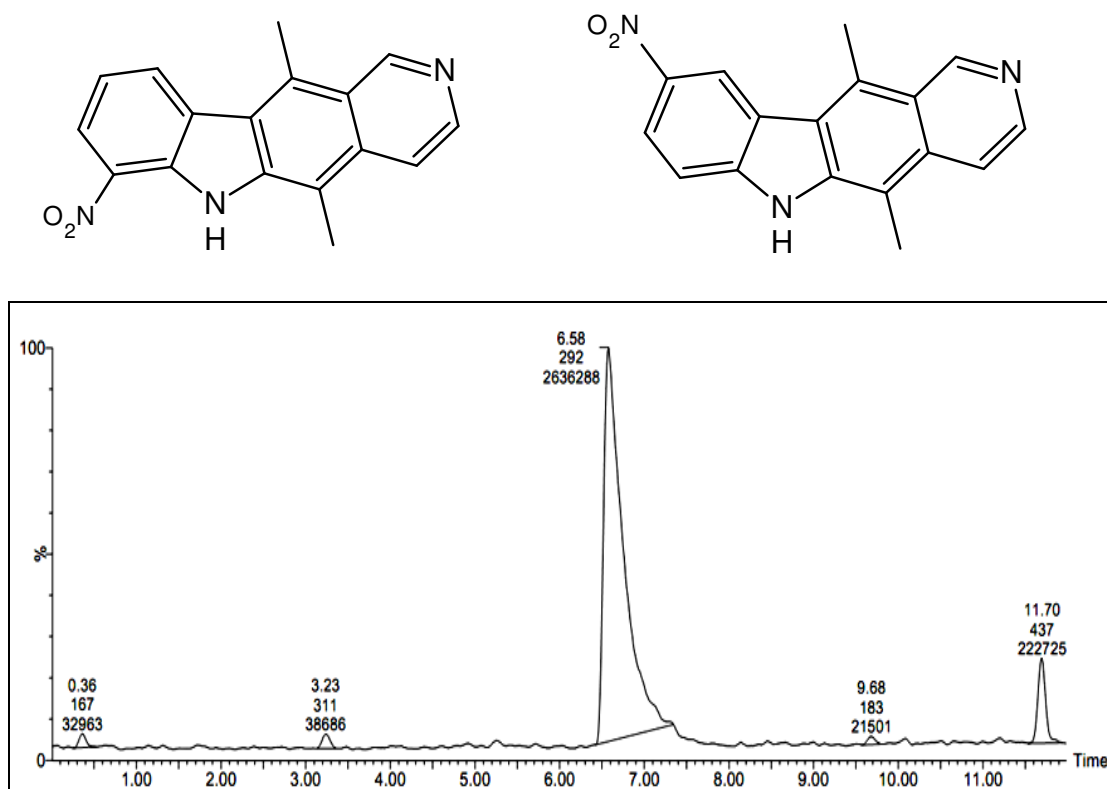


Figura 48. Cromatograma UPLC-ESI-MS, sistema: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ de CHOOH : MeOH e estrutura de possíveis produtos nitrados.

O produto com m/z 292 foi analisado por RMN de ^1H , para se determinar a estrutura. O espectro integral é mostrado no ANEXO 4. Para uma melhor discussão as ampliações mais importantes para a elucidação da molécula são apresentadas no texto. Os sinais em δ 3,3 e 2,51, são atribuídos a HDO (impureza comum quando se utiliza $\text{DMSO}-d_6$), e resquícios de solvente residual, respectivamente (Gottlieb, 1997). Em δ 2,95 observou-se a presença de um singlete com integração para 3H, que foi atribuído a uma das metilas características da elipticina, a segunda metila foi encoberta pelo sinal de HDO (Figura 49).

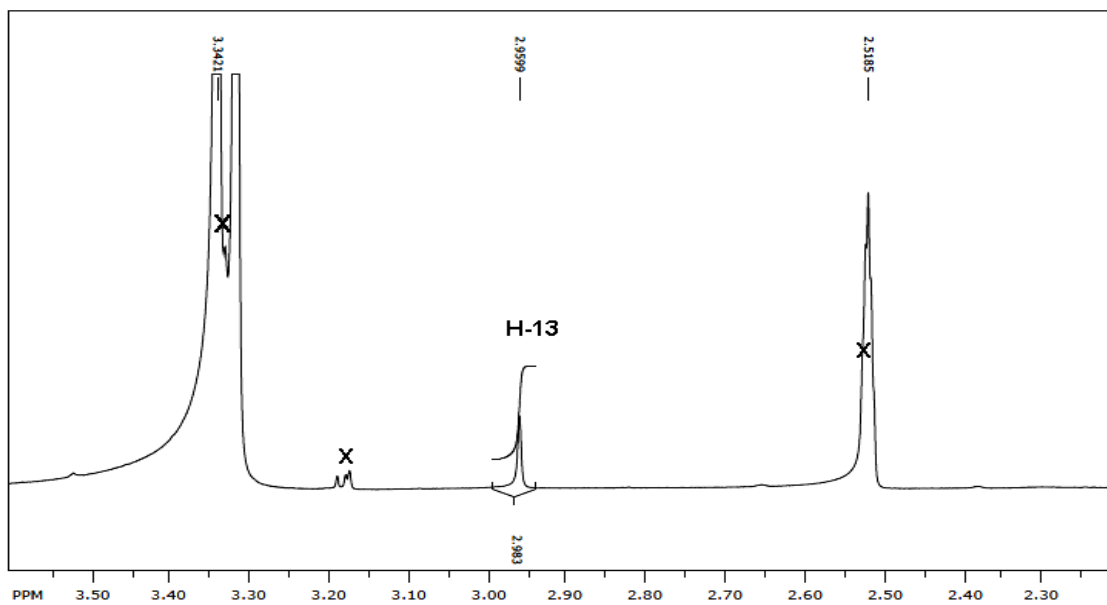


Figura 49. Região de δ 2,20 a 3,60 do espectro de RMN ^1H da substância 18 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Para elucidar a estrutura do produto nitrado a região mais importante está na faixa entre δ 7,4 e 11,5 (Figura 51). O deslocamento de 11,25 ppm foi atribuído ao NH do anel indólico. Ampliações na região δ 7,4 e 9,88 são mostradas figuras 52 e 53.

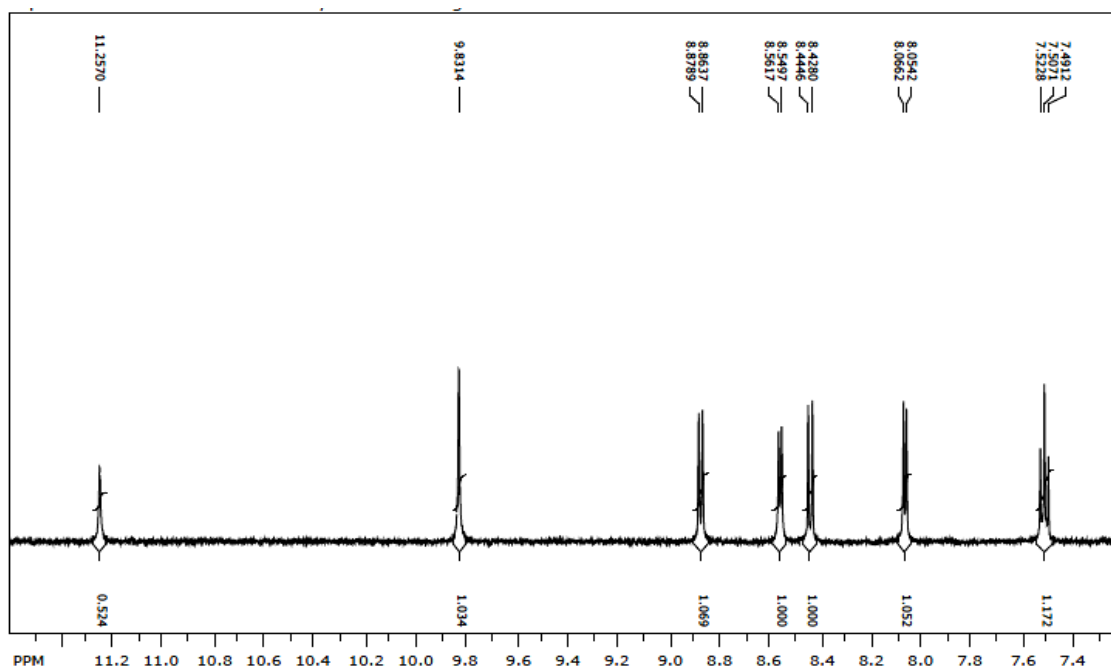


Figura 50. Região de δ 7,4 a 11,6 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 do produto nitrado 18.

Analisando a região atribuída aos hidrogênios pirídínicos (Figura 51), observa-se a presença de dois dubletos em δ 8,55 e 8,06, ambos com integral para 1H e $J = 6,0$ Hz, indicando acoplamento entre si, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, o singlete em δ 9,83 foi atribuído ao H-1.

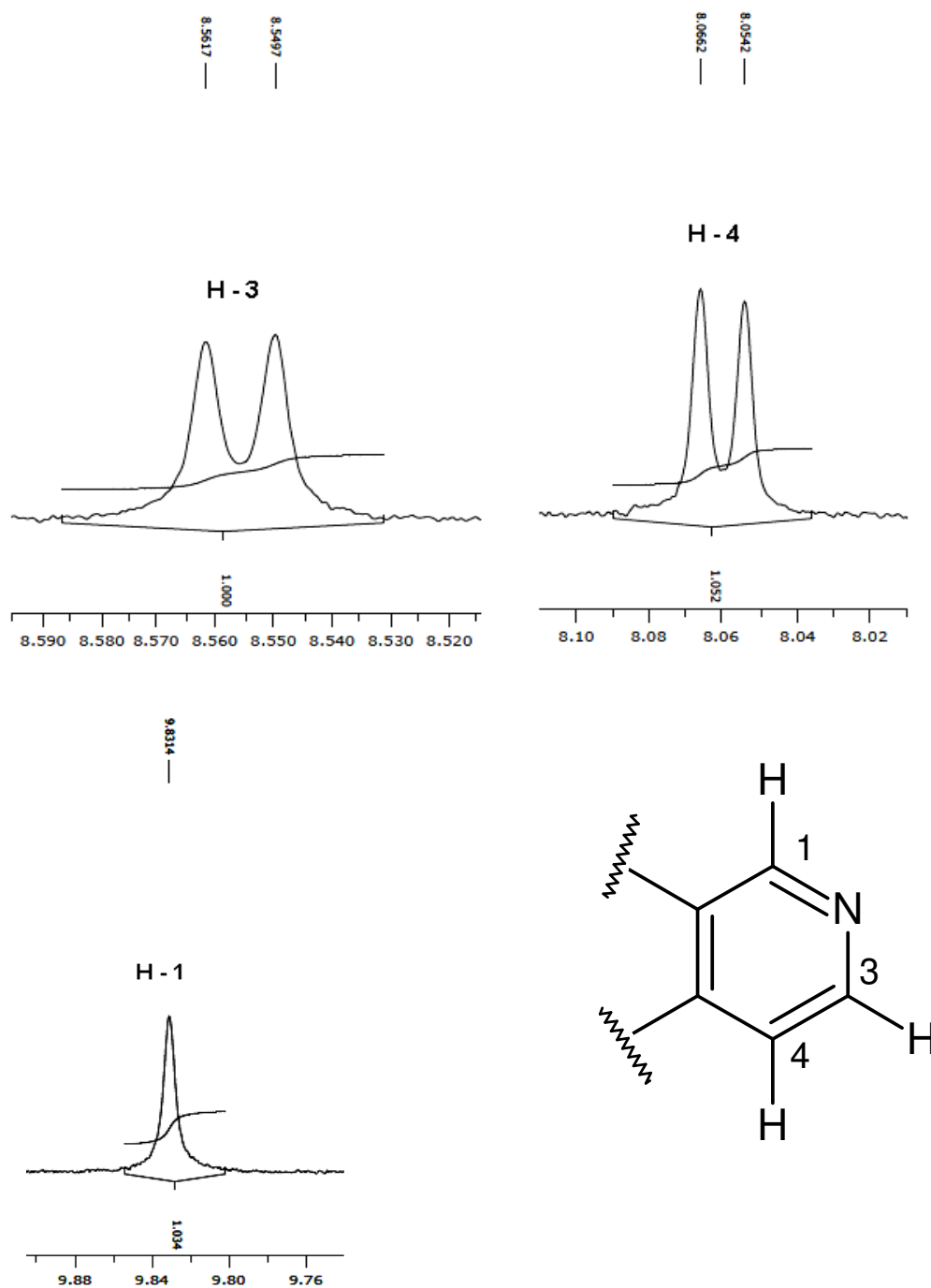


Figura 51. Ampliações dos picos de RMN ^1H (500 MHz) em $\text{DMSO}-d_6$ correspondentes aos hidrogênios pirídínicos do produto mononitrado.

De acordo com o mecanismo da reação o grupo nitro poderia se ligar em posições *orto* e/ou *para*, ou seja, no C-7 e/ou C9, respectivamente. Esperava-se a formação do produto 9-nitrado, como em Dracinsky *et al.* (2007). No entanto pelo padrão de acoplamento e multiplicidades observados a posição que foi substituída na reação efetuada no presente trabalho foi a C-7. Isso foi constatado pela presença do tripleto em δ 7,5 ($J = 8$ Hz) e dois dubletos em δ 8,43 ($J = 8$ Hz) e 8,86 ($J = 7,6$ Hz). O tripleto citado corresponde ao H-9 e os dois dubletos estão relacionados aos H-10 e H-8 (Figura 53). Estes dados foram cruciais para determinar a estrutura do composto **20**, como sendo o 7-nitroelipticina, composto inédito na literatura.

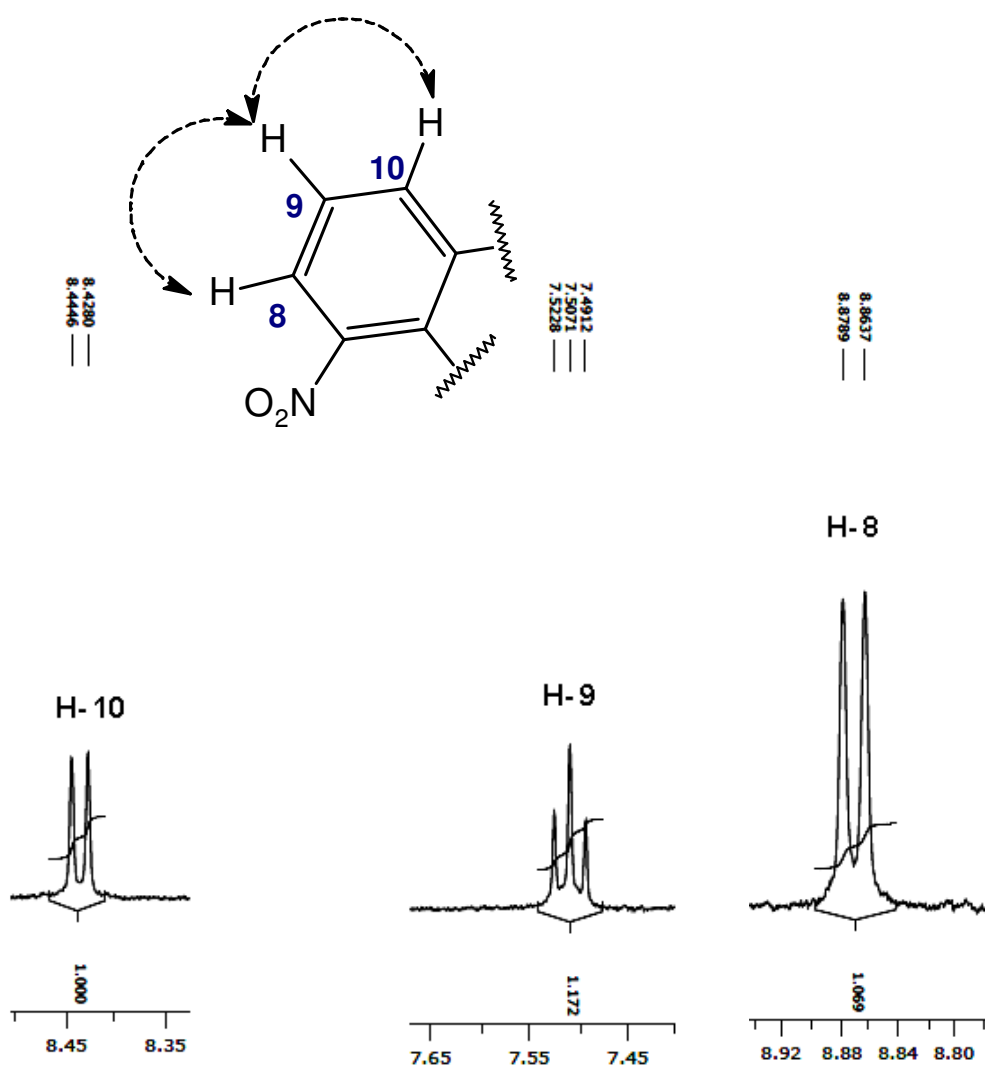


Figura 52. Ampliação do espectro de RMN ^1H da região dos hidrogênios indólicos do produto mononitrado

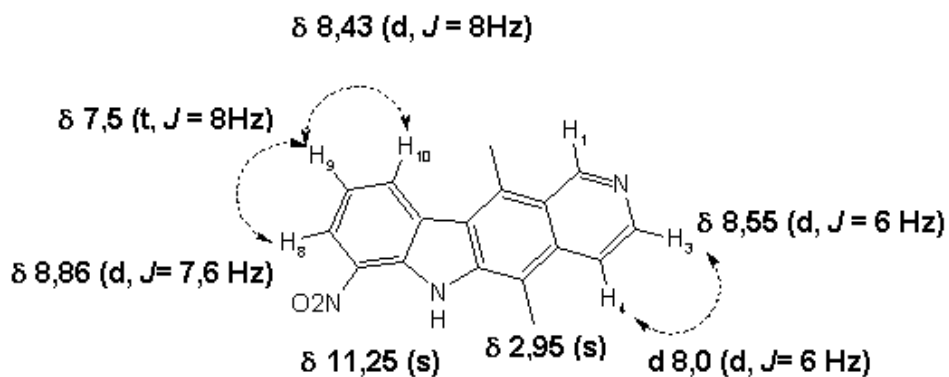


Figura 53. Estrutura do 7-nitroelipticina (**20**), com os deslocamentos, multiplicidade e constante de acoplamento de RMN ^1H , 500 MHz em DMSO- d_6 .

O mecanismo de reação (Figura 55) sugerido para obtenção do produto 7-nitroelipticina **20** inicia-se com a formação do íon nitrônio (NO_2^+) seguido do ataque do par de elétrons π do anel benzênico do grupo indol, formando um complexo π , este por sua vez perde um H para uma base, no caso o acetato presente no sistema, restabelecendo a aromaticidade do anel e formando o produto **20**.

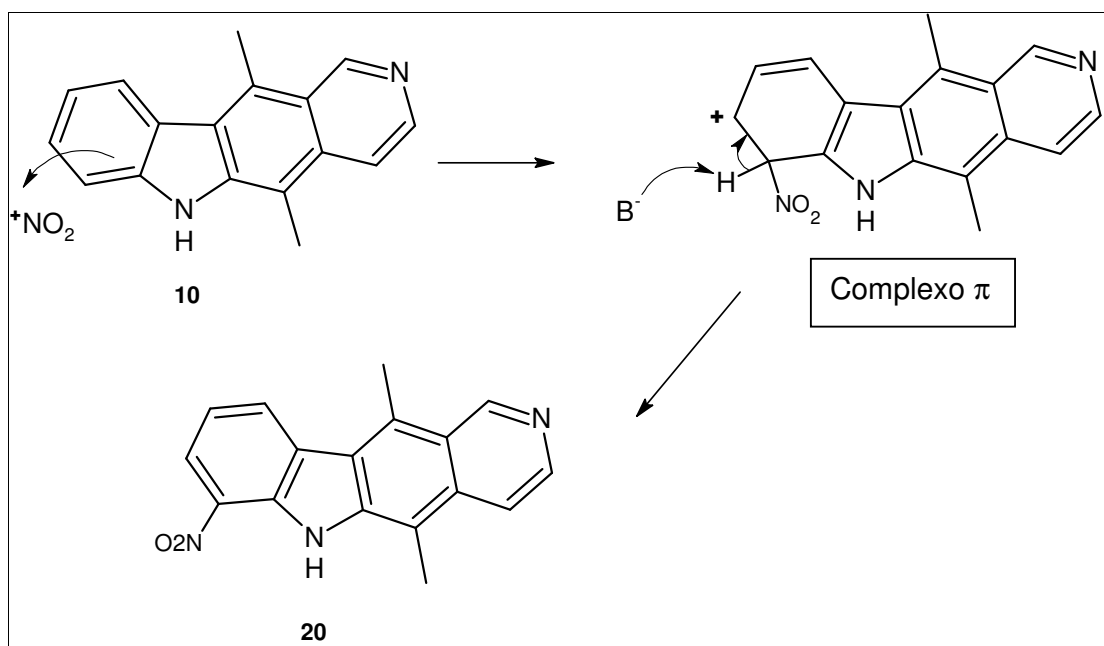


Figura 54. Mecanismo de reação para formação de 7-nitroelipticina.

Tabela 4. Comparação dos dados de RMN ^1H 500 MHz, solvente DMSO-*d*6 com literatura para o 7-nitroelipticina (**20**).

N^o H	7-nitroelipticina (20) (DMSO-<i>d</i>6, 500 MHz)	Dracinský <i>et al.</i>, 2007 9-nitroelipticina (DMSO-<i>d</i>6, 400 MHz)
	δ, multiplicidade, J.	δ, multiplicidade, J.
H-13	2,95, s	2,81, s,
H-12	-----	3,26, s
H-9	7,5, t, 8 Hz	-----
H-7	-----	7,65, d, 7,8 Hz
H-4	8,55, d, 6 Hz	7,93, d; 6,2 Hz
H-8	8,86, d, 8 Hz	8,38; dd; 9,0 Hz e 2,0 Hz
H-3	8,00, d, 6 Hz	8,47, d, 6,1 Hz
H-10	8,43, d 8 Hz	9,07, d, 2,0Hz
H-1	9,83, s	9,73, s
H-6	11,25, s	12,16, s

5.6 ACETILAÇÃO

O produto formado (AMRAc 57 -1) na acetilação foi um sólido amorfo de coloração amarela, solúvel em MeOH. Dos produtos sintetizados neste trabalho, este foi o que apresentou melhor solubilidade.

Com caráter investigativo análises de UPLC-ESI-MS, para verificar se houve a formação de produto (s) acetilado (s), e segundo os resultados obtidos foi possível confirmar que ocorre a acetilação da elipticina. Este fato foi constatado pela presença do íon aduto $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 289 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 11,08 min. A amostra analisada foi a AMRAc 57 -1 (1,1 mg), que aparentemente estava mais pura (Figura 55).

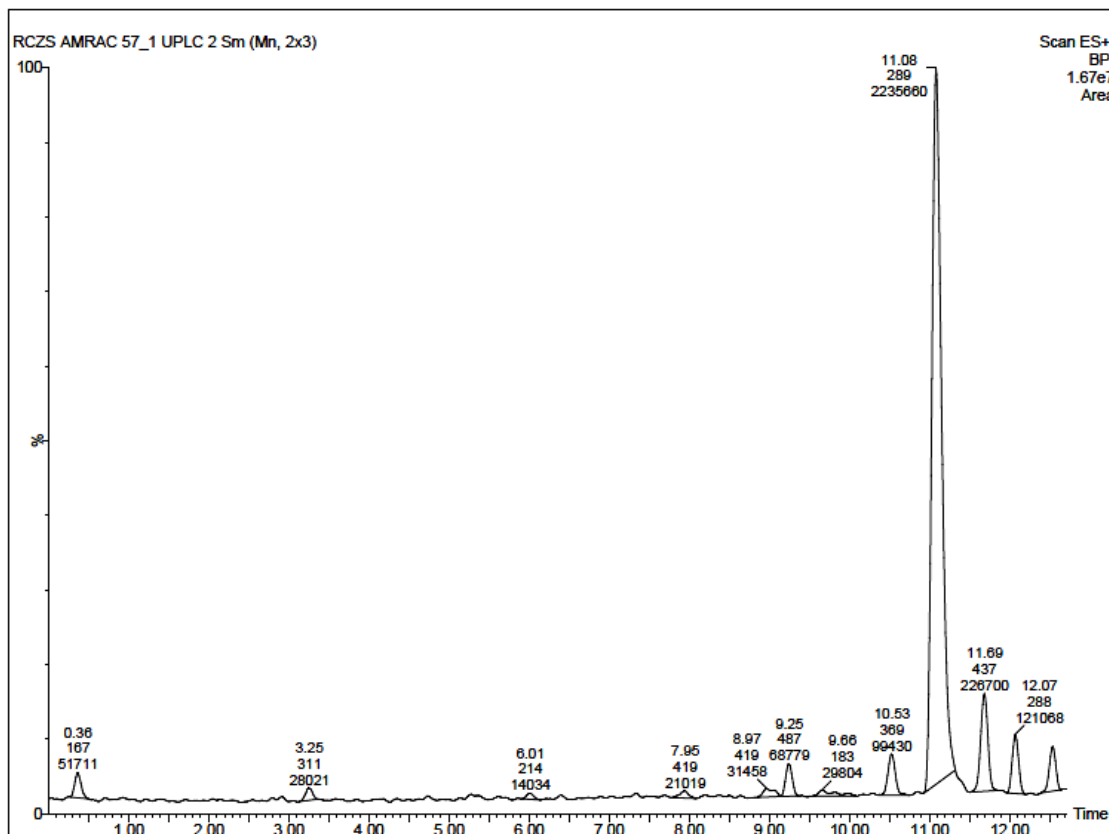


Figura 55. Cromatograma UPLC-ESI-MS sistema: H₂O + 0,1 % de CHOOH: MeOH do produto da reação de acetilação da elipticina.

De acordo com o resultado obtido nas análises de UPLC-ESI-MS foi possível verificar que ocorre a entrada de um grupo acetil na molécula de elipticina, fato observado pela presença do íon aduto [M+H] m/z 289 majoritariamente. A elucidação da estrutura do produto monoacetilado, no entanto não foi possível, pois o produto não estava puro o suficiente pra realizar outras análises, além disso, não havia massa suficiente para tentar uma nova purificação.

A reação de acetilação segue o mesmo mecanismo das anteriores, trata-se de uma substituição eletrofílica aromática, onde o eletrófilo é o grupo acetil, que ataca a priori os carbonos C7 e C9. É possível que ocorra o ataque aos nitrogênios do anel indólico e também do anel piridínico, se o grupo acetato substituir o hidrogênio do anel indólico estará formando uma amida, grupo funcional bastante estável, já no caso do ataque ao nitrogênio do anel piridínico o mesmo não pode ser dito, já que formaria um sal quaternário, com carga positiva (Figura 57).

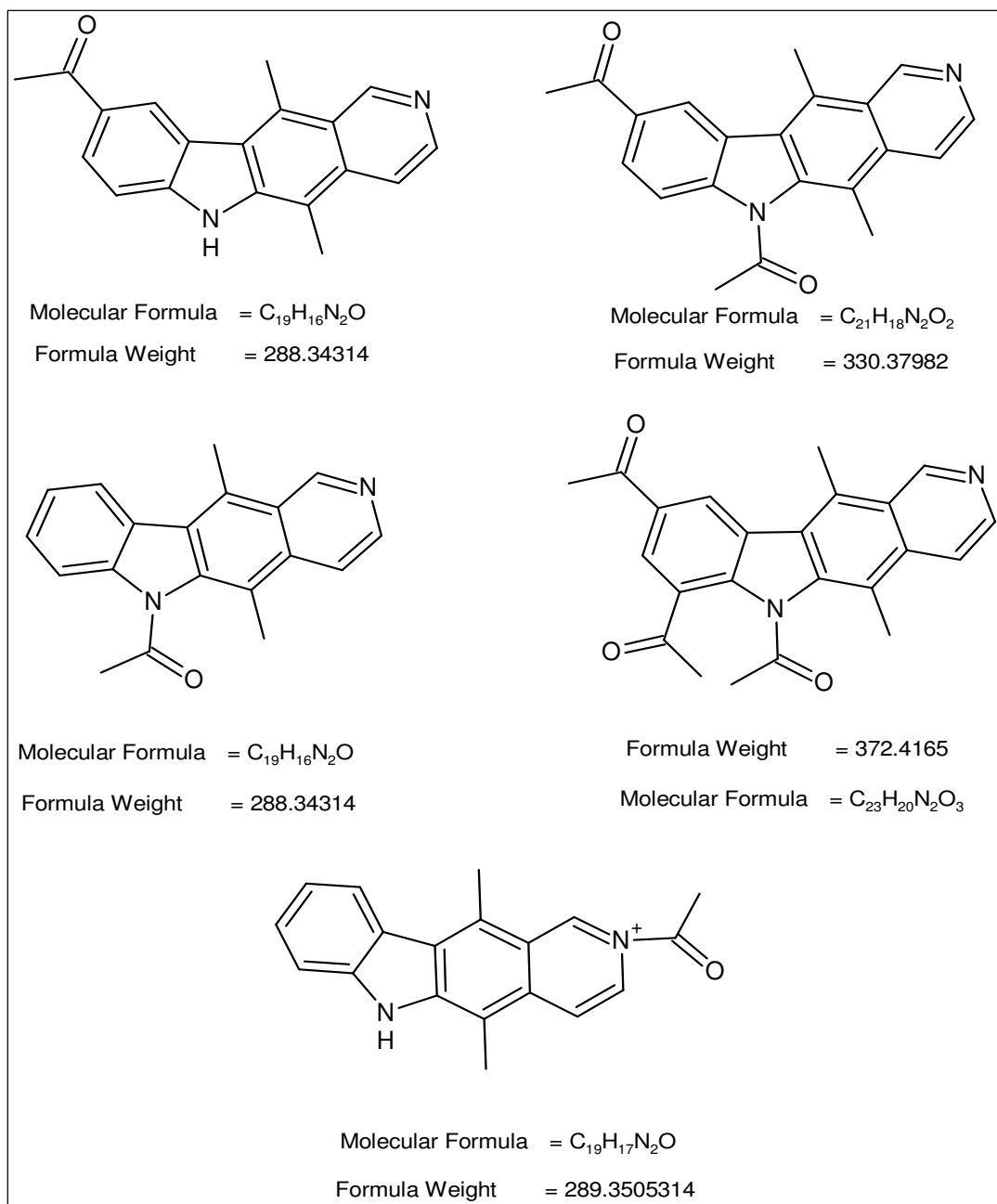


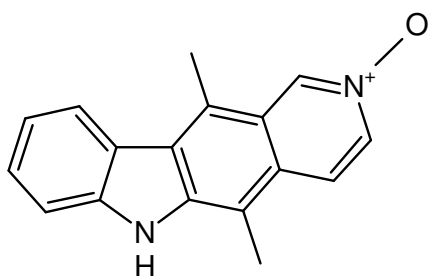
Figura 56. Alguns produtos possíveis para a reação de acetilação.

5.7 N-ÓXIDO

Á metodologia adotada para esta reação foi de acordo com o procedimento descrito por Boogaard *et al.* (1994), e visava a obtenção do produto **26**. A mistura

reacional obtida nesse procedimento foi submetida a análises em CCD e em UPLC-ESI-MS, por infusão direta (

Figura 58). Nas placas de CCD foi possível verificar que havia a formação de um produto, mas sobrava muita elipticina no sistema (RF elipticina 0,68 e para o produto formado 0,42, sistema DCM:MeOH 8:2). O espectro de MS gerado confirmou a formação a do N-óxido ($[M+H]^+$ m/z 246) e da elipticina ($[M+H]^+$ m/z 247)



26

Figura 57. Estrutura do N-óxido obtido por Boogaard *et al.* (1994).

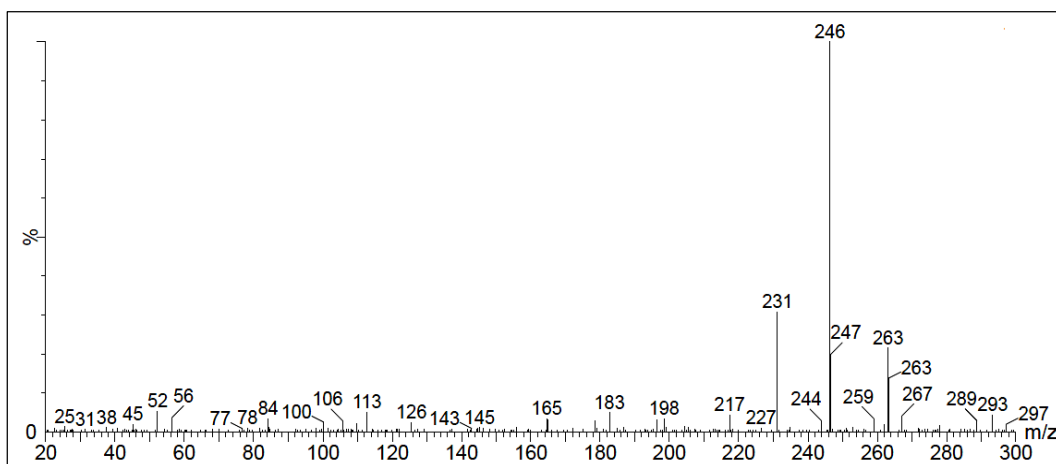


Figura 58. Espectro de massas UPLC-ESI-MS por infusão direta da mistura reacional de formação do N-óxido.

6 ANÁLISE POR UPLC-ESI-MS DA INFUSÃO DAS CASCAS DE *Aspidosperma vargasii*.

De acordo com a literatura, o gênero *Aspidosperma* é grande bioprodutor alcaloides indólico, compostos com esse tipo de esqueleto são considerados marcadores quimiotaxonômicos de espécies deste gênero (Oliveira *et al.*, 2009). A

caracterização da infusão implica em identificar e quantificar os alcaloides majoritários a partir de padrões, seja eles isolados da planta ou não. Para análises foi utilizado a técnica de UPLC-ESI-MS, na qual a amostra da infusão foi avaliada em com quatro padrões, elipticina (10), olivacina (7), 2-metil-1,2,3,4 tetrahydroelipticina (12), ioimbina (27), todos estes alcaloides já foram isolados de alguma espécie de *Aspidosperma* (Burnell e Della Casa, 1967; Henrique et al., 2010, Pereira et al., 2007).

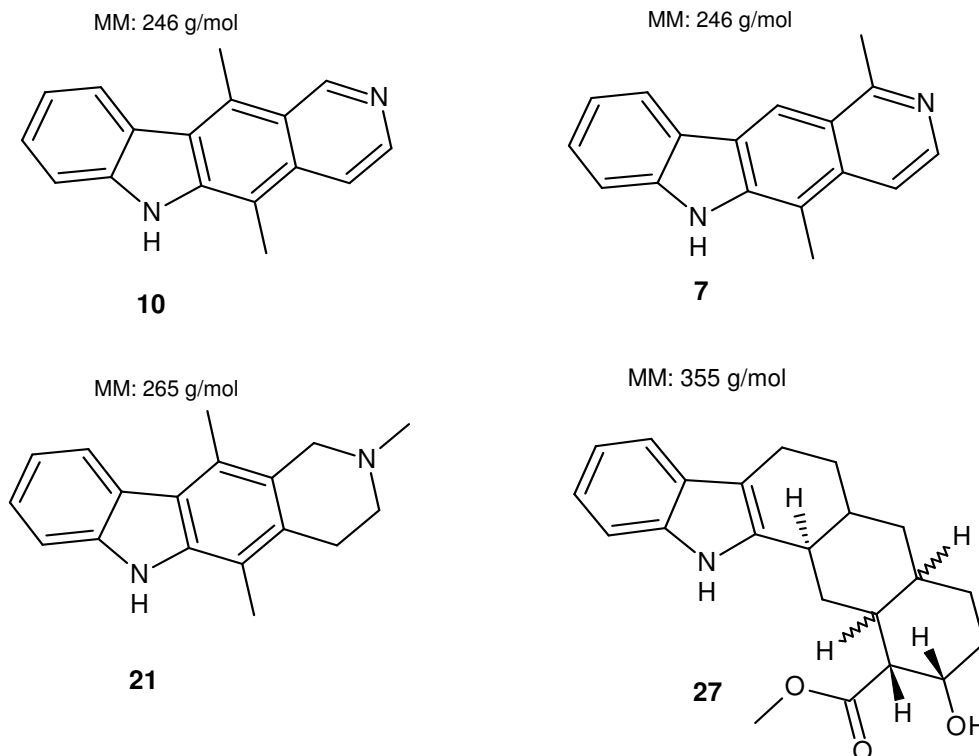


Figura 59. Alcaloides usados como padrão para determinação do perfil cromatográfico das *Aspidospermas*.

Já se imaginava que dois dos alcaloides (10 e 21) usados como padrão estariam presentes na infusão. Mas de acordo com a literatura, substâncias como a olivacina ou derivados também poderia estar presente na espécie (Burnell e Della Casa, 1967). No entanto, de acordo com as análises realizadas confirmou-se majoritariamente a presença do pico com tr 3,51 minutos e m/z 265, além destes destacam-se os picos com tr 2,11 m/z 369, tr 3,09 m/z 281 e o tr 4,15 e m/z 247, para cada padrão foi estabelecido uma faixa de limite de detecção (Anexos 5-8) sendo que, para elipticina, 2-metil-1,2,3,4-tetridroelipticina, ioimbina não foram

detectados com concentração abaixo de 100 µL/mL (Anexo 12, 13 e 14) , para a olivacina o limite de detecção observado em concentrações abaixo de 10 µg/ mL.

O injeção dos padrões mostrou quatro picos m/z 355 (tr 2,51) pertence a **27**, m/z 265 (tr 3,52) refere-se a estrutura **12**, m/z 247 (tr 3,98) é a substancia (**7**) e o m/z 247 (tr 4,15) pertencente a substância **10**, cada um deste padrões foi analisado separadamente. Baseado em comparação é possível verificar que o extrato aquoso contém o pico referente ao 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina inquestionavelmente. O pico m/z 247 foi aferido a elipticina devido ao tempo de retenção, apesar de as substâncias **7** e **10** apresentarem a mesma massa, o tempo de retenção entre elas difere, sendo possível diferenciá-las (Figura 61).

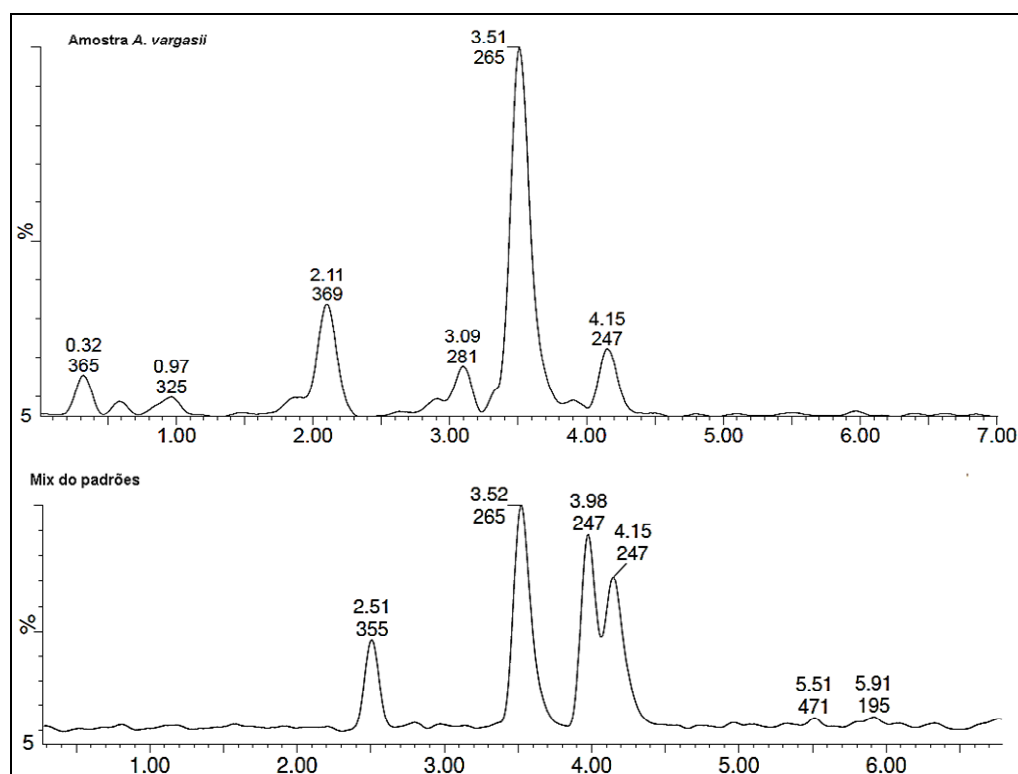


Figura 60. Cromatograma UPLC-ESI-MS da infusão das cascas de *A.vargasii*, utilizando os solventes H₂O + 0,1 HCOOH:MeOH e o mix dos padrões 7,10,12,e 27.

Com objetivos de fazer uma estimativa sobre os picos m/z 369 e 281, foi feito uma busca bibliográfica sobre estruturas indólicas isoladas de *Aspidospermas* spp. na tentativa de aferir alguma informação sobre este picos e foram encontrado dois alcaloides, sendo eles a 3,4,5,6 - tetradesidroioimbina (C₂₂H₂₈N₂O₃) com m/z 367, e

o razinilam ($C_{19}H_{24}N_2$) com m/z 281, ambas as substâncias já foram isoladas da espécie *A. marcgravianum* (Pereira *et al.*, 2007).

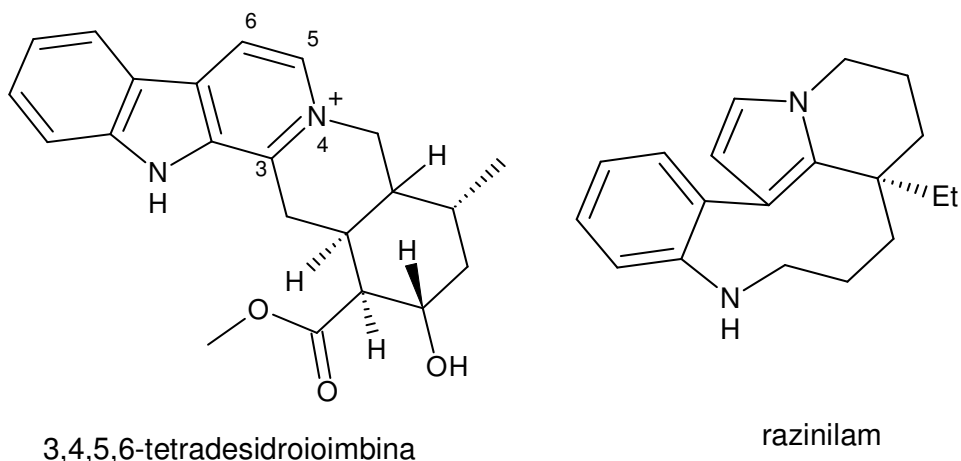


Figura 61. Estrutura de dos alcaloides indólicos 3,4,5,6-tetradesidroioimbina sendo com m/z 357 e o razinilam m/z 281.

7 ENSAIO *in vitro*

Para realização do teste *in vitro* contra *P. falciparum* foram utilizadas três substâncias puras: elipticina (**10**), 2 - metil-1, 2, 3, 4 - tetraidroelipticina (**12**), 7 - nitroelipticina (**20**) e a mistura de bromados (**17** e **18**), a cloroquina foi usada com droga padrão. Para os ensaios foram utilizados dois tipos de cepas diferentes, sendo elas a K1 (resistente à cloroquina) e a 3D7 (sensível à cloroquina), os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5. Os testes de citotoxicidade foram realizados com fibroblastos de pulmão fetal e o resultado mostrou que todas as substâncias apresentam baixa citotoxicidade.

Para uma substância ser considerada ativa, seu CI_{50} deve ser inferior a 1 $\mu g/mL$. Os valores encontrados nos testes *in vitro* reforçam o trabalho já realizado por Andrade-Neto *et al.*, (2007) em relação à elipticina, além de mostrar que os derivados sintéticos da elipticina continuam ativos contra o *Plasmodium*.

Tabela 5. Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum* frente às substâncias abaixo.

Substância	CI ₅₀ (µg/mL) DP		Citotoxicidade (CI ₅₀)
	K1	3D7	
17+18	0,3	0,2	> 50 µg/ml
20	3,9	4,9	> 50 µg/ml
10	0,19	0,08	> 50 µg/ml
12	1,1	3,5	> 50 µg/ml
Cloroquina	0,17	0,06	

*Bertani et al. (2005) adotaram a seguinte classificação: IC₅₀ < 0,1 µg/mL = muito ativo; entre 0,1 a 5 µg/mL = ativo; entre 5 a 10 µg/mL = atividade moderada; > 11 µg/mL = inativo.

8 ENSAIO *in vivo*.

Para os ensaios *in vivo*, dados foram coletados no quinto e sétimo dia após a infecção dos camundongos. A parasitemia foi medida a partir de uma relação, entre o número de hemácias totais pelo número de hemácias parasitadas. A elipticina demonstrou excelente atividade *in vivo* contra *P. berghei* em via oral, com inibição de 90% da parasitemia, no quinto dia. Por motivo ainda desconhecido houve um crescimento da parasitemia no sétimo dia. Já na via subcutânea o processo foi inverso, no sétimo dia houve uma diminuição da parasitemia. Esses dados revelaram o grande potencial para substância **10** (Rocha e Silva *et al.* 2012).

Os testes *in vivo* com os produtos obtidos via síntese não foram possíveis devido à pequena quantidade de produtos obtidos nas reações.

Recentemente o 2-metil-1,2,3,4-tetrametileliptica (12) foi testada em dose única de 25 mg/Kg/dia, e a substância se mostrou inativa nesta concentração. Futuramente novos testes serão realizados com uma concentração maior.

Tabela 6. Resultados dos ensaios para o teste *in vivo* contra *P. berghei*.

Substância / dose	Via oral		Via subcutânea	
	Inibição			
	5º dia	7º dia	5º dia	7º dia
Elipticina 10 mg/Kg/ dia	92	42	22	70
Elipticina 1mg/Kg/ dia	67	61	0	40
Cloroquina 10 mg/Kg/dia	90	98	99	99

9 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou o isolamento de dois alcaloides indólico obtidos a partir da *Aspidosperma vargasii*, sendo eles a elipticina e a 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina, que após o isolamento foram usadas junto com outros alcaloides indólico (olivacina e ioimbina) como padrões para o desenvolvimento de um método para análise qualitativa de infusão de espécies de *Aspidosperma spp.* A partir da elipticina foram propostos 4 derivados, sendo que um deles foi isolado e identificado como sendo o 7-nitroelipticina, substância inédita na literatura. Também foram obtidos dois produtos bromados na forma de mistura, identificados com sendo 7-bromoelipticina e o 7,9-bromoelipticina, sendo a segunda substância inédita na literatura, além destas também foram sintetizados produtos acetilados e um produto N-óxido que ainda estão sendo estudados.

Foi confirmada a atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *Plasmodium falciparum* e *P.berghei*, respectivamente da elipticina e o 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina. O derivado nitrado e a mistura de dibromado demonstraram importante atividade antimalárica *in vitro*. Todas as substâncias estudadas possuem atividade antimalárica *in vitro* significativa devido à presença do núcleo indólico presumivelmente. De todas as substâncias estudadas neste trabalho, a elipticina foi a que apresentou maior potencial para ser usada no desenvolvimento de novos fármacos.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelha, C. A. M. Aplicações Sintéticas da Reação de Morita-Baylis-Hillman: 1. Estudos de uma Nova Abordagem para a Síntese do Alcalóide (\pm)-8-a-etoxiprecrivelina. 2. Estudos Visando a Síntese Assimétrica de Alcalóides Indolizidínicos. 3. Monitoramento do Mecanismo da Formação de Bases de Tröger por ESI-(MS/MS). 2009. 294f. Tese (Doutorado em Química), Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos, Unicamp, São Paulo.

Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A.; Luz, G. F.; Oliveira, V. B.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* by electrospary ionozation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 24, p. 295-308, 2010.

Ahmed, S. A.; Gogal-Jr, R. M.; Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3 H] thymidine incorporation assay. *Journal Immunol Methods*, vol.15, p. 211-224, 1994.

Ancolio, N.; Azas, V.; Mahiou, E.; Ollivier C.; Di Giogio, A.; Keita, P.; Timon-David, P.; Balansard, G. Antimalarial Activity of Extracts and Alkaloids Isolated from Six Plants Used in Traditional Medicine in Mali and Sao Tome. *Phytotherapy. Research*, vol.16, p. 646–649, 2002.

Andrade-Neto, V. F.; Pohlit, A. M; Pinto, A. C. S.; Silva, E. C; Nogueira, K. L; Melo, M. R; Henrique, M. C; Amorim R. C; Silva, L. F; Costa, M. R; Nunomura, R C; Nunomura S. M; ALecrim, W. D; Alecrim M. G; Chaves, F. C; Vieira P. P. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants, vol. 3, p. 359-360, 2007.

Arnd, R. R.; Brown, S. H.; Ling, N. C.; Roller, P.; Djerassi, C. Alkaloid, Studies LVIII: The alkaloids of six *Aspidosperma* species. *Phytochemistry*, vol. 6, p. 1653-1658, 1967.

Arzel, E.; Rocca, P.; Grellier, P. M.; Labae, M.; Frappier, F.; Gueritte, F.; Gaspard, C.; Marsais, F.; Godard, A.; Quéguiner, G. New Synthesis of Benzo- δ -carbolines, Cryptolepines, and Their Salts: In Vitro Cytotoxic, Antiplasmodial, and Antitrypanosomal Activities of δ -Carbolines, Benzo- δ -carbolines, and Cryptolepines. *Journal Med. Chemistry*, vol. 44, p. 949-960, 2001.

Astula, A.; Zaima, K.; Matsuno, Y.; Hirasawa, Y.; Ekasari, W.; Widyawaruyanti, A.; Zaini, N.C.; Morita, H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Journal Natural Medicine*. vol. 62, p. 470–472, 2008

Azas, N.; Laurencin, N.; Delmas, F.; Giorgio, C.; Gasquet, M.; Lage, T. M.; Timon-David, P. Synergistic *in vitro* antiplasmodial activity of plants extracts used as traditionals herbal remedies in Mali. *Parasitol Res.*, vol. 88, p. 165-171, 2002.

Azevedo, J. P. Estudo da síntese de fármacos antimaláricos derivados do salicilaldeído. Relatório de Seminário em Química Orgânica. Faculdade de Ciência da Universidade do Porto, 2004.

Baelen, G.; V., Hostyn, S.; Dhooghe, L.; Tapolcsányi, P.; Mátyus, P.; Lemièrre, G.; Dommissse, R.; Kaiser, M.; Brun, R.; Cos, P.; Maes, L., Hajos, G.; Ried, Z., Nagy, I.; Maes, B. U. W. M.; Pieters, L. Structure–activity relationship of antiparasitic and cytotoxic indoloquinoline alkaloids, and their tricyclic and bicyclic analogues, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 17, p. 7209–7217, 2009.

Besselièvre, R.; Husson, H. P. Syntheses in the ellipticine-olivacine series: A possible biogenetic model. *Tetrahedron*, vol. 37, p. 241- 246, 1981.

Boorgaard, A. T.; Pandit, U. K.; Koomen, G. J. Ring D modification of ellipticine. Part 2: Chlorination of ellipticine via its N-oxide and synthesis and selective acetylation of 5,6,11 trimethyl-5H-benzo[b]carbazole. *Tetrahedron*, vol. 50, p. 4811-4828, 1994.

Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ministério da Saúde. Brasil. 2013, vol. 44.

Burnell, R. H.; Della Casa, D. Alkaloids of *Aspidosperma vargasii* A. DC. *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 45, p. 89-92, 1967.

Cirino, J. J. V.; Belletato, P.; Dantas, S. O.; Ribeiro, L.; Ferreira, G. R.; Santos, H.F. Estrutura e propriedades das elipticinas. *Quimica Nova*, vol. 28, p. 30-36, 2005.

Chaitanya, T. K.; Nagarajan, R. Synthesis of functionalized ellipticinium and ellipticine derivatives *via* electrophilic cyclization. *Organic Biomolecules Chemistry*, vol. 9, p. 4662- 4670, 2011.

Cranwell, P. A.; Saxton, J. E. A Synthesis of Ellipticine. doi:10.1039/JR9620003482, vol. 45, p. 3482-3487, 1962.

Dalton, L. K.; Demerac, S.; Elmes, B. C.; Loder, W.; Swan, M.; Teitei, T. Synthesis of the tumour-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-methoxyellipticine, and related pyrid[4,3-b]carbazoles. *Journal Chemistry*, vol. 20, p. 2715-27, 1967.

Devraj, R.; Barrett, J. F.; Fernandez, J. A.; Katzenellenbogen, J. A.; Cushman, M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Ellipticine-Estradiol Conjugates. *Journal Med. Chem.*, vol. 39, p. 3367-3374, 1996.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2^o ed. Reino Unido, 1997, vol. 1, p. 325 - 333.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2^o ed. Reino Unidos, 2002, vol. 1, p. 361 - 515.

Dracínský, M.; Sejbál, J.; Rygerova, B.; Stiborova, M. An efficient modification of ellipticine synthesis and preparation of 13-hydroxyellipticine. *Tetrahedron Letters*, vol. 48, p. 6893–6895, 2007.

Ekins, S.; Williams, A. J.; Krasowski, M. D.; Freundlich, J. S. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discovery Today*, vol. 16, p. 298-310, 2011.

Ekland, E. H.; Fidock, D. A. *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *International Journal for Parasitology*, vol. 38, p. 743–747, 2008.

Fernandez, L. S.; Sykes, M. L.; Andrews, K. T.; Avery, V. M. Antiparasitic activity of alkaloids from plant species of Papua New Guinea and Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 36, p. 275–279, 2009.

Fiot, J.; Sanon, S.; Azas, N.; Mahioua, V.; Jansen, O.; Angenot, L.; Balansard, G.; Ollivier, E. Phytochemical and Pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (*Combretaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 106, p. 173–178, 2006.

França, C. C.; Santos, M. G.; Figueroa-Villar, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova*, vol. 31, p. 1271-1278, 2008.

Francisco A. I.; Vargas, M. D. Ferroquina: o antimalárico do future. *Revista Virtual de Química*, vol. 2, p 118- 129, 2010.

Frederich, M.; Hayette, M. P.; Tits, M.; Mol, P.; Angenot, L. Reversal of chloroquine and mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* by the two monoindole alkaloids, icajine and isoretuline. *Planta Med.*, vol. 67, p. 523 – 527, 2001.

Frederich, M.; Tits, M.; Angenot, L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. vol. 102, p.11-19, 2008.

Galopan, R. C.; Emerceb, E.; Wright, C. W.; Karahalilb, B.; Karakayab, A. E.; Anderson, D. Effects of the anti-malarial compound cryptolepine and its analogues in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Toxicology Letters*. vol. 207, p. 322– 325, 2011.

Gilbert B.; Duarte, A. P.; Nakagawa, Y.; Joule, J. A.; Flores, S. E.; Brissollese, J. A.; Campelo, J.; Carrazzoni, E. P.; Owellen, R. J.; Blossey, E. C.; Brown-Jr, K. S.; Djerassi, C. Alkaloids Studies: The Alkaloids of twelve *Aspidosperma* Species. *Tetrahedron*, vol. 21, p. 1141-1166, 1965.

Gomes, S. M.; Cavalcanti, T. B. Morfologia floral de *Aspidosperma* Mart & Zucc (*Apocynaceae*). *Acta Botânica do Brasil*, vol. 15, p. 73-78, 2000.

Goodwin, S.; Smith A. F., Horning, E. C. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *Journal American Chemistry Society*, vol. 81, p. 1903 - 1908, 1959.

Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurity. *Journal. Organic Chemistry*, vol. 62, p. 7512-7515, 1997.

Guimarães, H. A.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C. ¹H and ¹³C-NMR data of the simplest plumeran indole alkaloids isolated from *Aspidosperma* species. *Molecules*, vol. 17, p. 3025-3043, 2012.

Henrique, M. C. Estudo sobre a química e atividade biológico das cascas de *Aspidosperma Desmanthum* e *Aspidosperma vargasii* (*Apocenacea*). 2007. 238f. Dissertação (Mestrado em Química de produtos Naturais), Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Henrique, M. C.; Nunomura, S. M.; Pohlit, A. M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova*, vol. 33, p. 284-287, 2010.

Holt, S.; Petrow, V. Carbazoles, Carbolines, and Related Compounds. Quindoline Derivatives part I, doi:10.1039/JR9470000607, p. 607- 611, 1947.

Jacomé, R. L. R. P.; Oliveira, A. B. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (Pau-Pereira). *Química Nova*, vol. 27, p. 897-900, 2004.

Jasztold-Howorko, R.; Croisy, A.; Carrez, D.; Jaroszewicz, I.; Nasulewicz, A.; Pelczynska, M.; Opolsk, A. Synthesis, Structure, and Cytostatic Properties of New Olivacine Derivatives. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, vol. 337, p. 599–604, 2004.

Jonckers, T. H. M.; Miert, S. V.; Cimanga, K.; Bailly, C.; Colson, P.; Pauw-Gillet, M. C.; Heuvel, H. V.; Filip, M.; Lemièrre M. F.; Esmans, E. L.; Rozenski, J.; Quirijnen, L.; Maes, L.; Dommissie, R.; Lemièrre, G. L. F.; Vlietinck, A.; Pieters, L. Synthesis, cytotoxicity, and antiplasmodial and antitrypanosomal activity of new neocryptolepine derivatives. *Journal Med. Chemistry*, vol. 45, p. 3497-3508, 2002.

Kana, S.; Sugino, E.; Shibuya, S.; Hibino, S. A New synthesis of the antitumor 6H-pyrido[4,3-b]carbazole alkaloid ellipticine. *Journal Organic Chemistry*, vol. 46, p. 2979-298, 1981.

Kibal'nyi, A. V.; Kharaneko, O. I.; Dulenko, V. I. New approach to ellipticine analogs. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, vol. 37, p. 1310-131, 2001.

Konakahara, T.; Kiran, Y. B.; Okuno Y.; Ikeda, R.; Sakai N. An expedient synthesis of ellipticine via Suzuki–Miyaura coupling. *Tetrahedron Letters*, vol. 51, p. 2335–2338, 2010.

Lacerda, M. V. G.; ZAckiewicz, C.; Alecrim, W.D.; Alecrim, M. G. C. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol 40, p. 489-490, 2007.

Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Ministério da Saúde e Secretária de Vigilância da Saúde, Distrito Federal, 2009.

Melo, L. C. Estrutura eletrônica de drogas antitumorais, 2008. 143f. Tese (Doutorado em Física), Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro.

Miki, Y.; Hachiken, H.; Yanase, N. Synthesis of ellipticine by reaction of 1-(4-methoxybenzyl)indole-2,3-dicarboxylic anhydride with (3-bromo-4-pyridyl)-triisopropoxytitanium. *Journal Chemistry Society*, vol. 1, p. 2213–2216, 2001.

Nugroho, E. A.; Sugai, M.; Hirasawa, Y.; Hosoya, T.; Awang, K.; Hamid, A.; Hadi, A.; Ekasari, W.; Widyawaruyanti, A.; Morita, H. New antiplasmodial indole alkaloids from *Hunteria zeylanica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 21, p. 3417–3419, 2011.

Oliveira, V. B.; Freitas, M. S. M; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (*Apocynaceae*): uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, vol. 11, p. 92-99, 2009.

Organização Mundial da Saúde. The spatial distribution of *Plasmodium falciparum* endemic in 2010 world. *Malária Journal*, Malaria Atlas Project, 2011.

Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report 2010. Disponível em: http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/malaria/deaths/atlas.html.

Acesso em: 01 de março de 2013.

Onyeibor, O., Croft, S. I.; Dodson, H.; I.; Feiz-Haddad, M.; Kendrick, H.; Millington, N. J.; Parapini, S.; Phillips, R. M.; Seville, S.; Shnyder, S. D.; Taramelli, D.; Wright, C. W. Synthesis of some cryptolepine analogues, assessment of their antimalarial and cytotoxic activities, and consideration of their antimalarial mode of action. *Journal Medicinal Chemistry*, vol. 48, p.1-2709, 2005.

Passemar, C.; Salér, M.; Soh, M. P. N.; Linas, M. D.; Ahond, A.; Poupat, C.; Benoit-Vical, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. *Phytomedicine*, vol. 18, p. 1118– 1125, 2011.

Pereira, M. M.; Jacomé, R. L. R. P.; Alcântara, A. F. C.; Alves, R.B.; RASTAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (*Apocynaceae*). *Quimica Nova*, vol. 30, p. 970-983, 2007.

Pohlit, A.M.; Rocha e Silva, L.F.; Henrique, M.C.; Montoia, A.; Amorim, R.C.N.; Nunomura, S.M.; Andrade-Neto, V.F. Antimalarial activity of ellipticine. *Phytomedicine*, vol. 19, p. 1049, 2012.

Robert, G. M. T.; Ahond, A.; Poupat, P.; Potier, P. *Aspidosperma Guyane: Aspidosperma de guyane: Alcaloides de Aspidosperma*. *Journal of Natural Products*, vol. 46, p. 694-707, 1983.

Rocha e Silva, L. F.; Montoia, A.; Amorim, R. C. N.; Melo, M. R.; Henrique, M. C.; Nunomura, S. M.; Costa, M. R. F.; Andrade-Neto, V. F.; Costa, D. S.; Danta, G.; Lavrado, J.; Moreira, R.; Paulo, A.; Pinto, A. C.; Tadei, W. P.; Zacardi, R. S.; Eberlin, M. N.; Pohlit, A. M. Comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. *Phytomedicine*, vol. 20, p. 71-76. 2012.

Shahinas, D.; Liang, M. D. A.; Pillai, D. A. Repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90. *J. Med. Chem*, vol. 53, p. 3552–3557, 2010.

Singh, J.C. Knowlesi malaria in Vietnam. *Malaria Journal*, vol. 8, p. 268-269, 2009.

Takasu, K., Tsubasa, S., Saiin, C., Kim, H., S., Wataya, Y., Brun. R., Ihara, M. Synthesis and evaluation of π -carbolinium cations as new antimalarial agentes based on p. delocalized lipophilic cation (DLC) hypothesis. *Pharmaceutical Society of Japan*, v. 53, p. 653-661, 2005.

Tanaka, J.,C.,A., Silva, C., C., Oliveira, A., J., B., Nakamura, C., V., Dias Filho, B.,P. Antibacterial activity of índole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*, *Brasilian Journal Medical and Biological Research*, v. 39, p. 387-391, 2006.

Thakur, R., D. A., Chakraborty, A.; Photophysical and photodynamical study of ellipticine: an anticancer drug molecule in bile salt modulated in vitro created liposomew. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v.14, p.15369–15378, 2012.

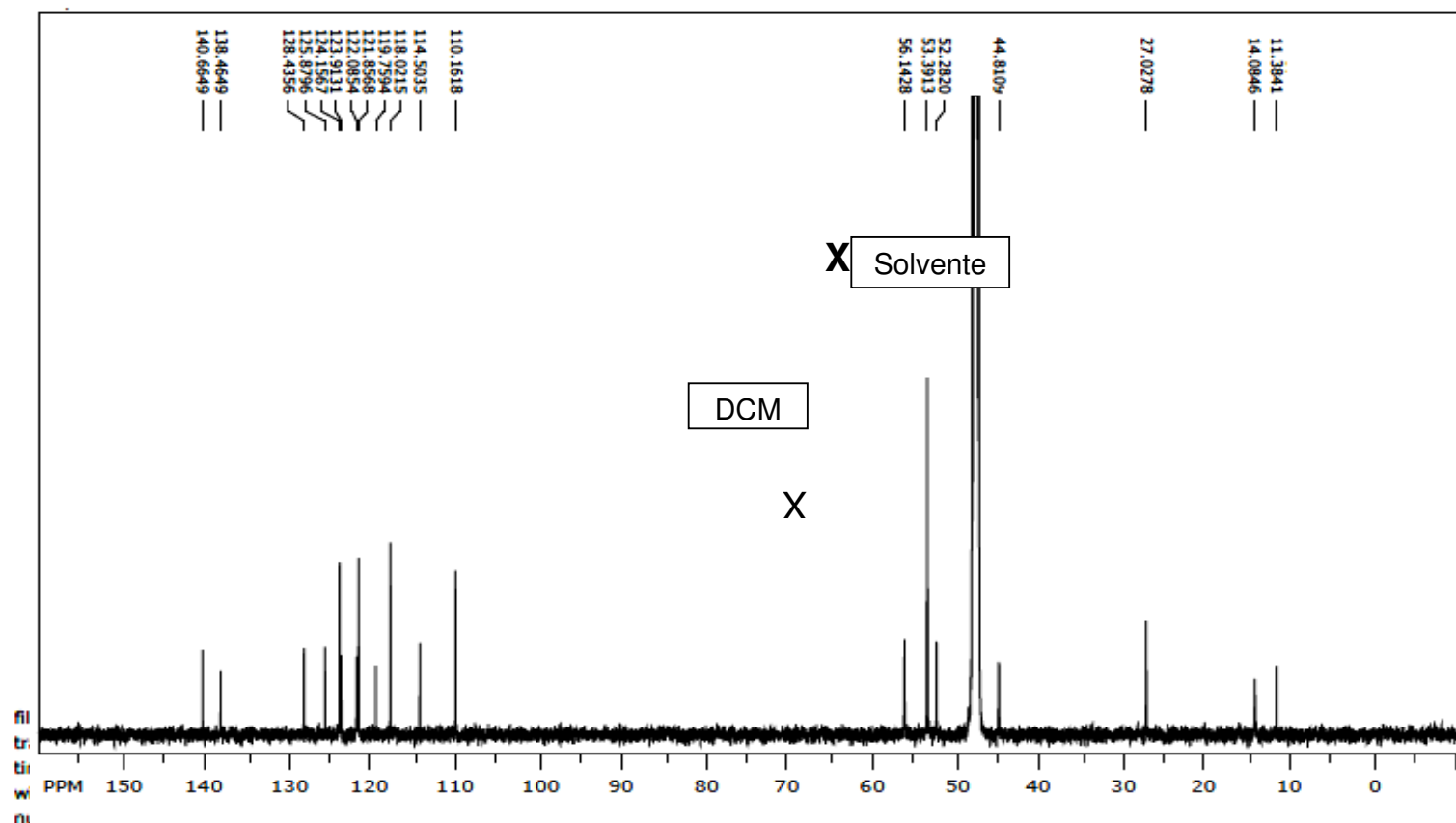
Thomas R. Hoye, T., R., Hanson, P., R., Vyvyanlb, J., R., A Practical Guide to First-Order Multiplet Analysis in ^1H NMR Spectroscopy. *Journal Org. Chemistry* , v. 59, p. 4096-4103, 1994.

Trager, W., Jensen, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, vol. 193, p. 673-675, 1976.

Valente, C., O. Desenvolvimento de um biossensor a base de hemina para análise de amodiaquina em leite materno, *Dissertação (Mestrado em Química)*, Universidade Federal do Sergipe, São Cristovão, Sergipe, 2010.

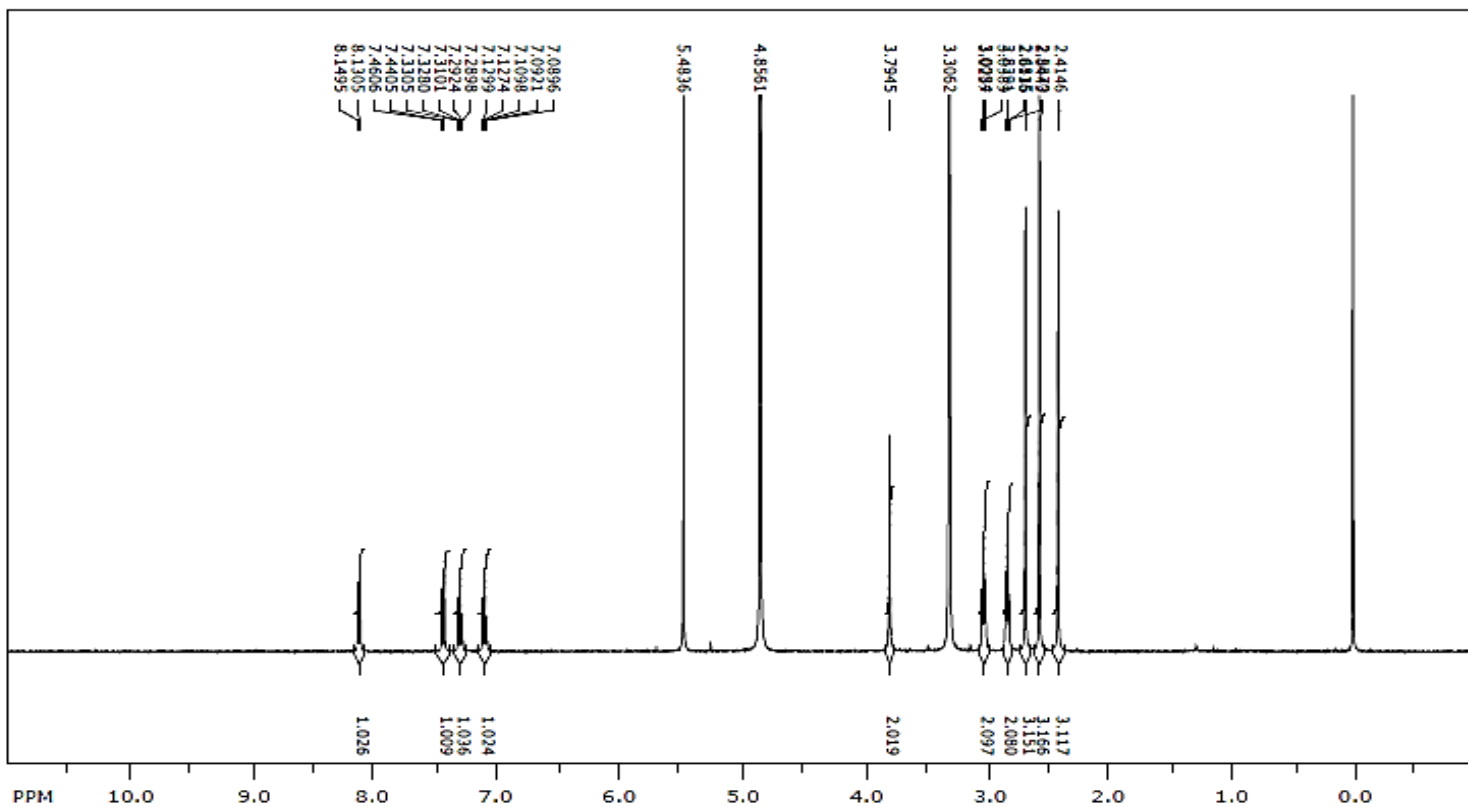
Vogel's, A. I. *Texttbook of Practical Organic Chemistry*, 5. ed. Reino Unido: Longman Scientific e Technical, 1989. P. 850-861.

ANEXOS

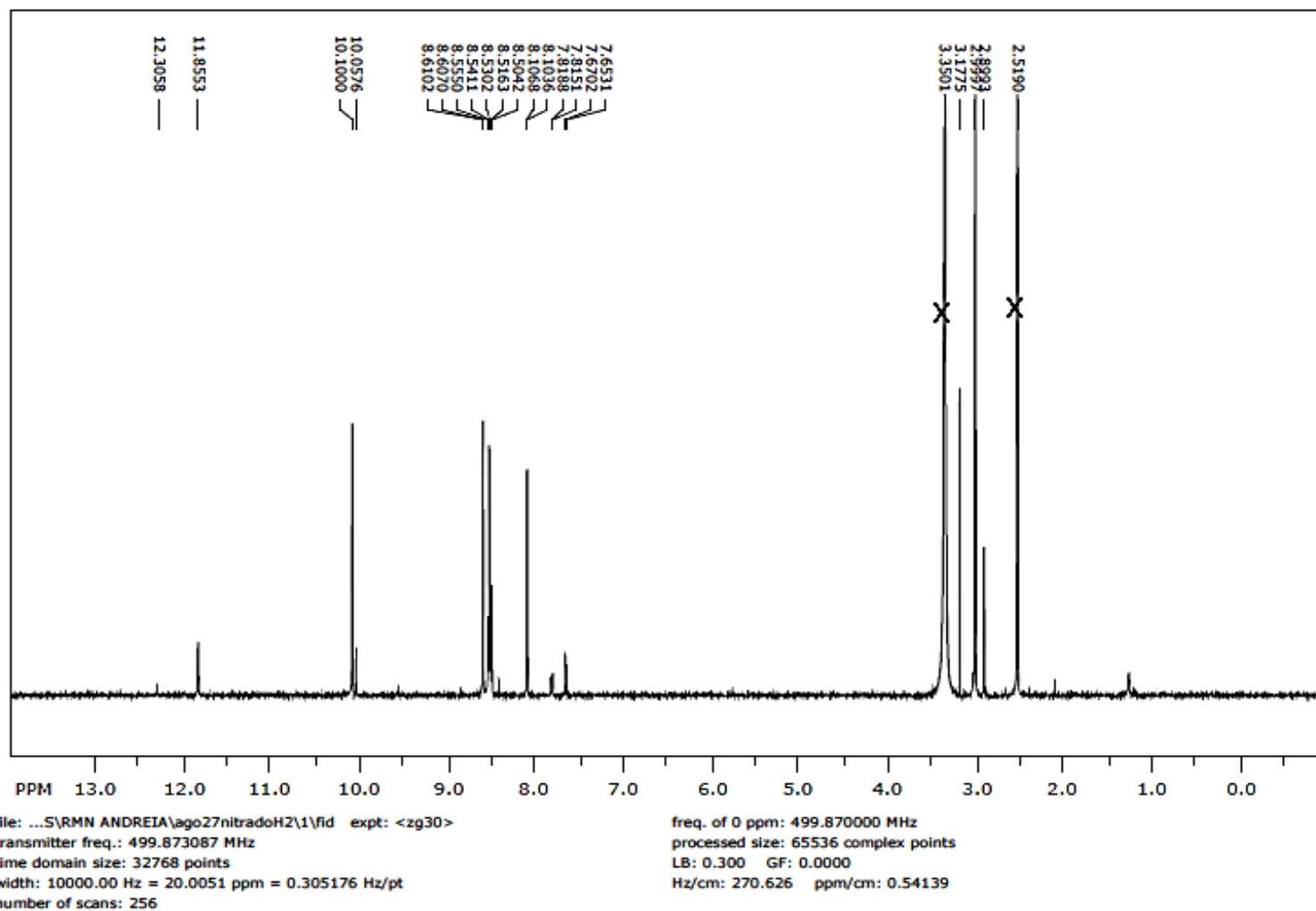


ANEXO 1. Espectro completo de RMN ^{13}C (150MHz) em CD_3OD , para o composto 12 (2-metil-1,2,3,4 tetrahydroelipticina)

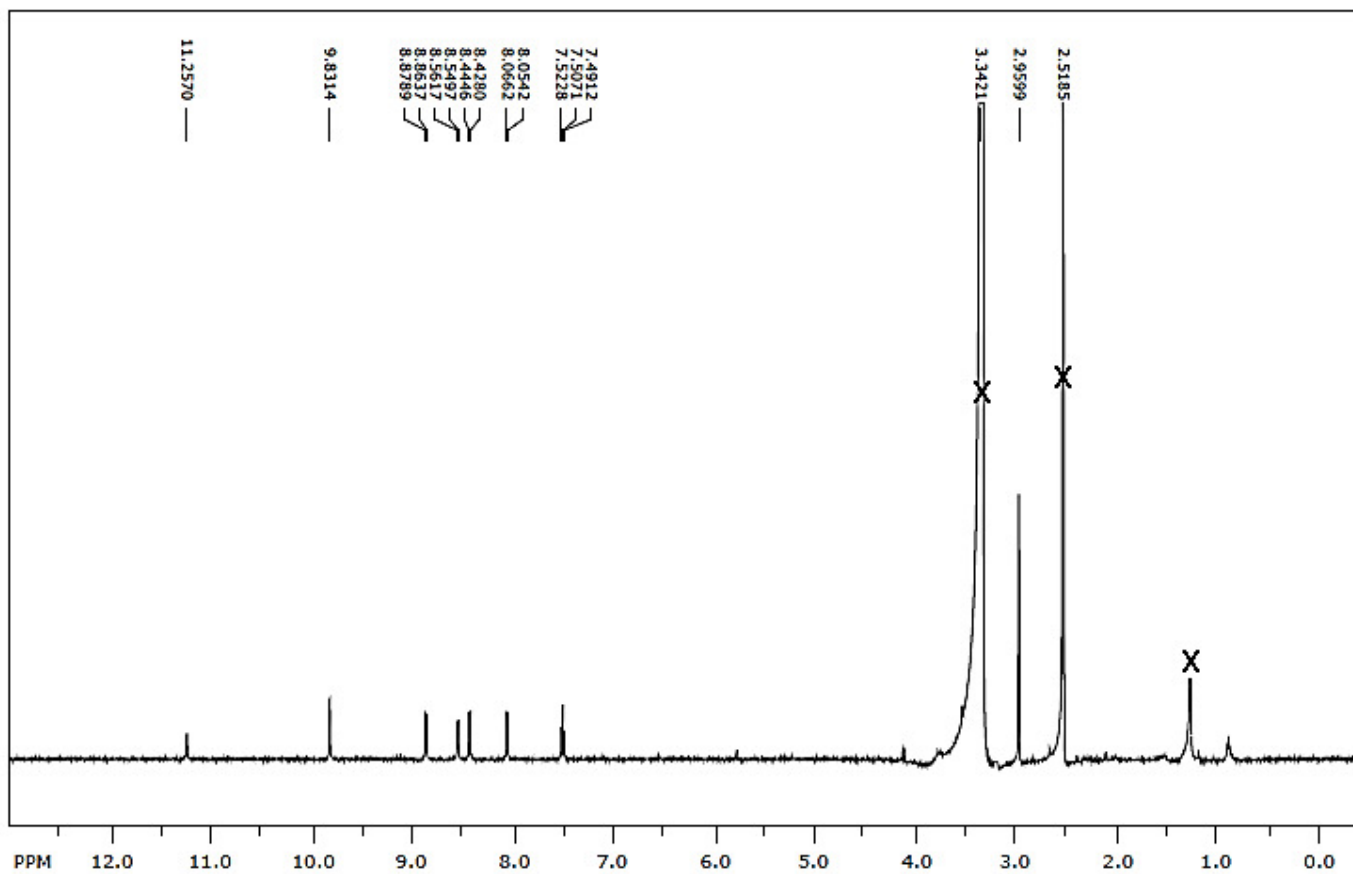
file: ... DISSER
transmitter freq
time domain si
width: 8223.68
number of scan



Anexo 2- Espectro integral de RMN ¹H (400 MHz) em CD₃OH do composto **12** (2-metil-1,2,3,4 tetrahydroelipticina)



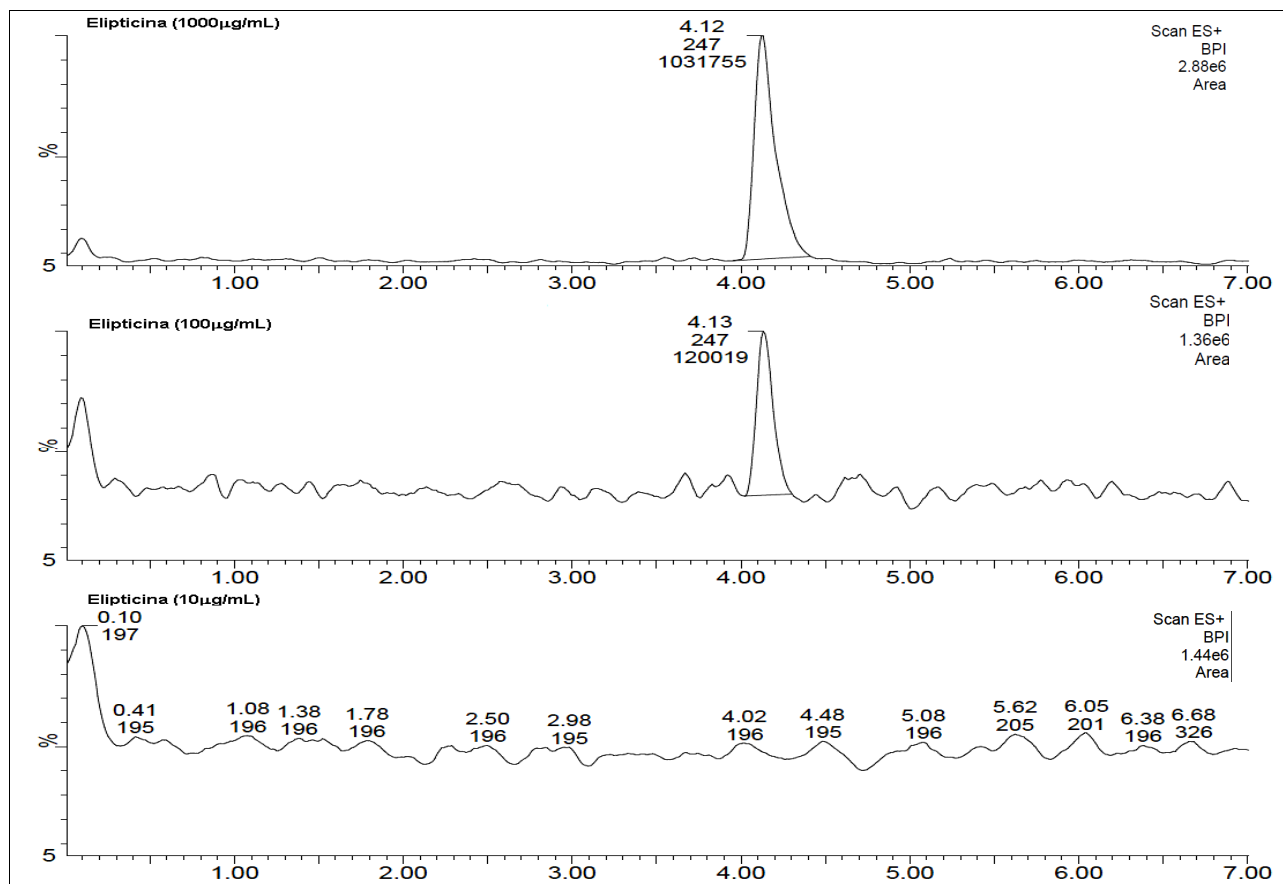
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H de 500 MHz em DMSO- d_6 , mistura de bromados (17 e 18).



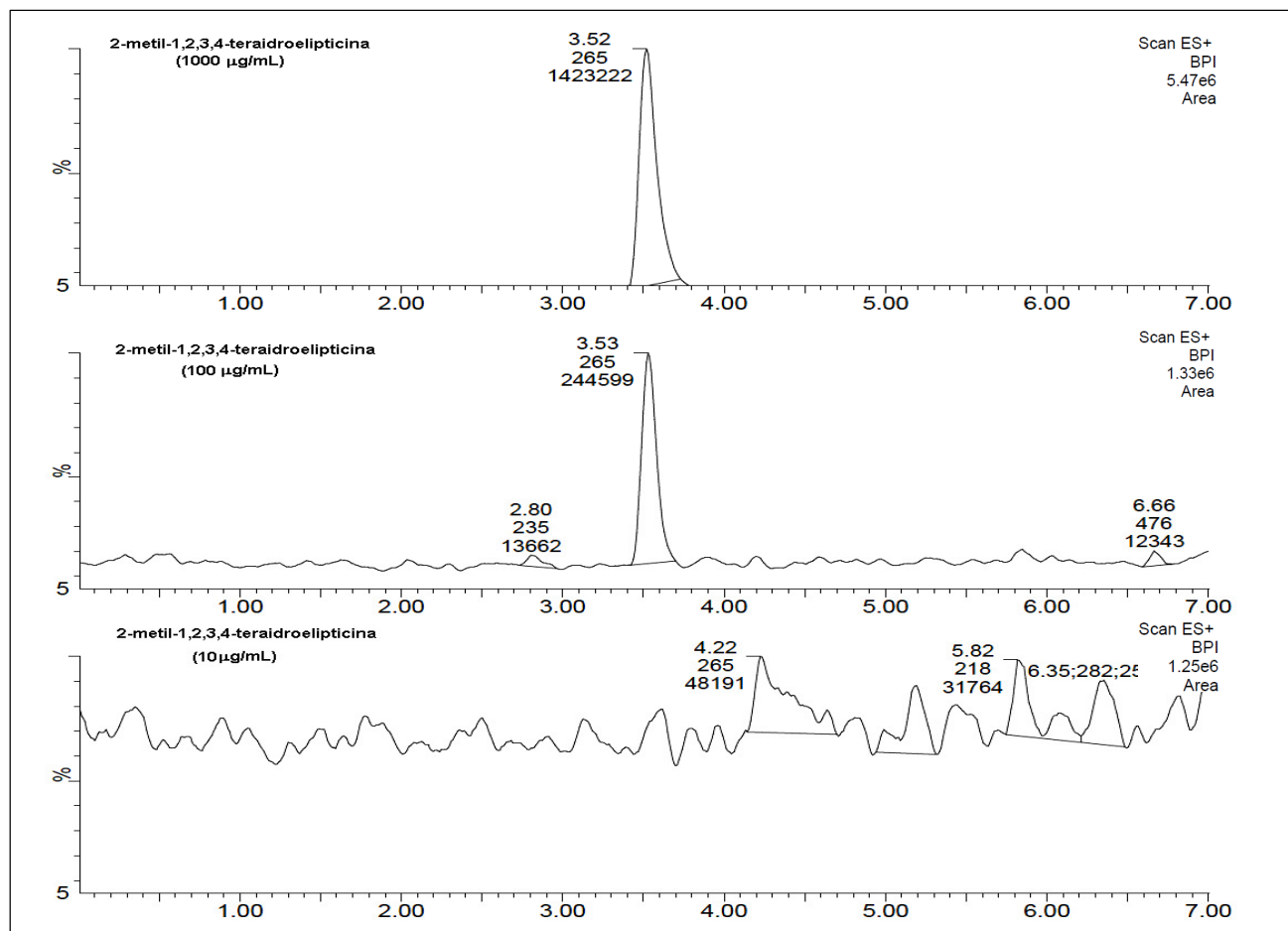
file: ...S\RMN ANDREIA\ago27nitroH2\1\fid exp: <zg30>
 transmitter freq.: 499.873087 MHz
 time domain size: 32768 points
 width: 10000.00 Hz = 20.0051 ppm = 0.305176 Hz/pt
 number of scans: 256

freq. of 0 ppm: 499.870000 MHz
 processed size: 65536 complex points
 LB: 0.300 GF: 0.0000
 Hz/cm: 270.626 ppm/cm: 0.54139

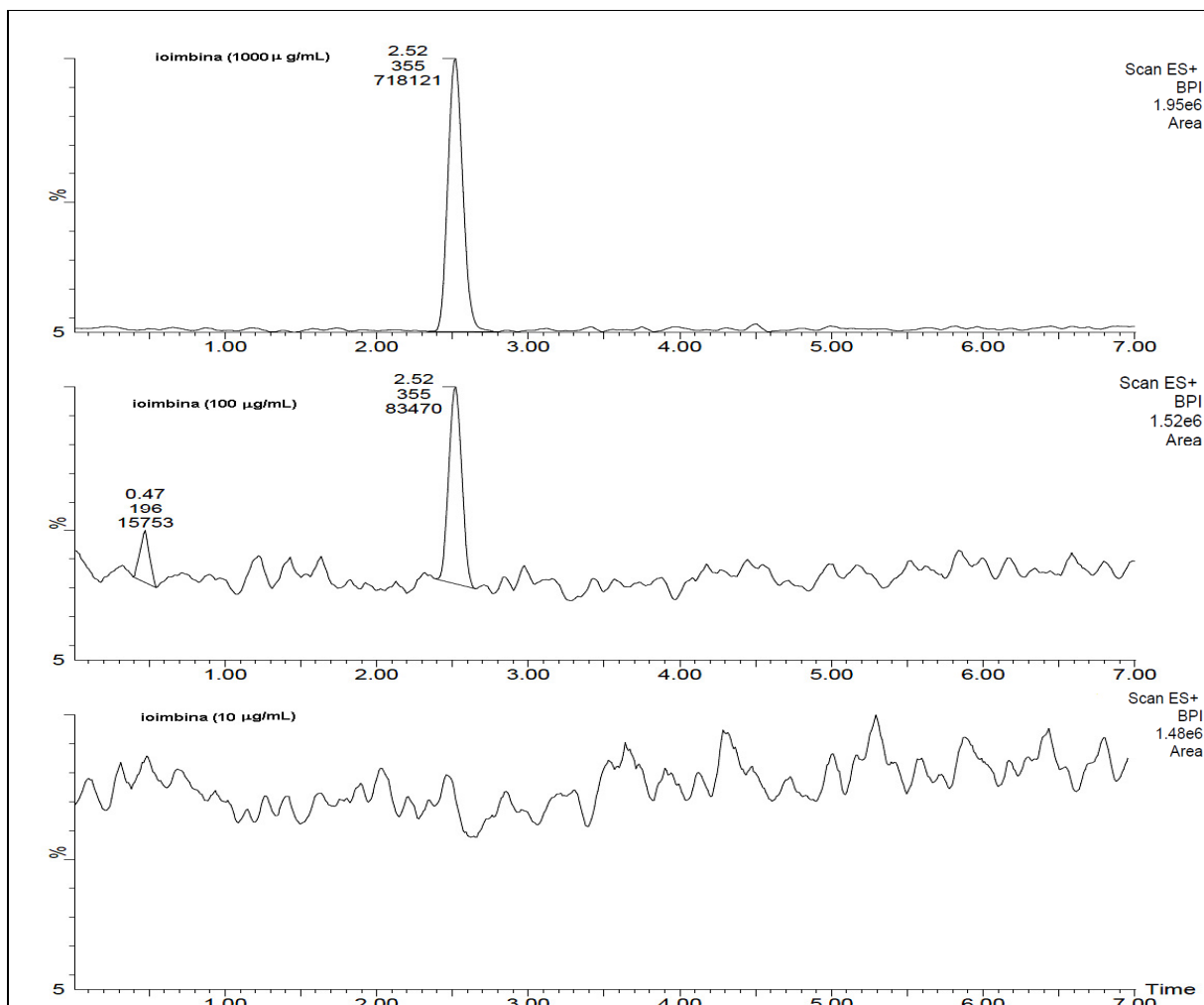
Anexo 4. Espectro de 1H de 500 MHz em DMSO-*d*6, do produto 7-nitroelipticina.



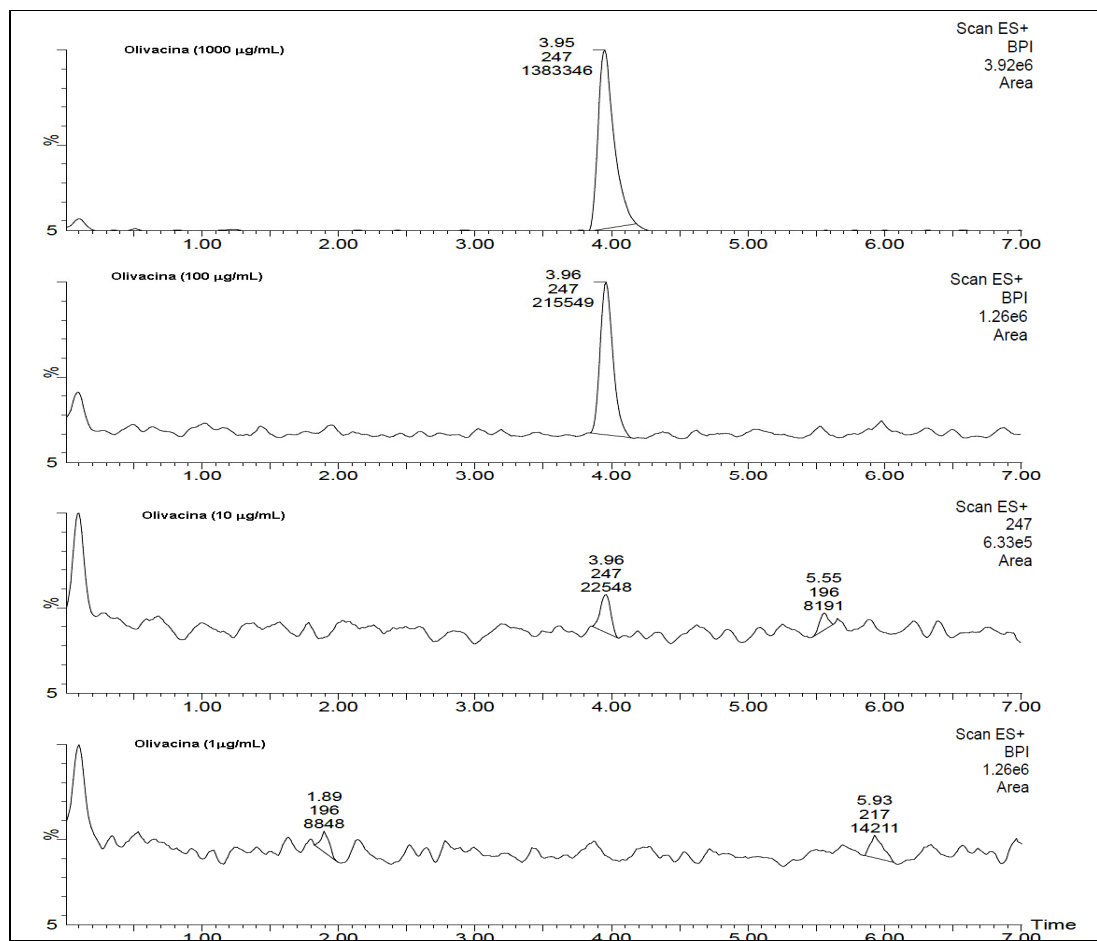
ANEXO 5. Cromatogramas de UPLC-ESI-MS da elíptica (10) em três diluições para determinar o limite de detecção.



ANEXO 6. Cromatograma UPLC-ESI-MS do 2-metil-1,2,3,4-tetraidroelipticina (**12**) em três diluições para determinar o limite de detecção.



ANEXO 7. Cromatograma UPLC-MS, de ionização por *eletrospray* da ioimbina (**27**) e o limite de detecção.



ANEXO 8. Cromatograma UPLC-MS, de ionização por *eletrospray* da olivacina (**7**) e o limite de detecção.