

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM  
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA – LABB**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE)**

**DAIANE MARTINS**

**MANAUS**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM  
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA – LABB**

**DAIANE MARTINS**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia – PPGBiotec da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez**

**MANAUS**

**2014**



158ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 25 fevereiro de 2014 às 14h no Auditório do Bloco “M” Setor Sul - UFAM. **Daiane Martins**, defendeu sua Tese de Doutorado intitulada “**Estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**”

**Banca de Examinadores:**

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Cecília Veronica Nunez – (Orientadora)	Aprovado (x) Reprovado ( )	
Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro -(UFAM)	Aprovado (x) Reprovado ( )	
Dr. Cristovão Alves Costa -(INPA)	Aprovado (v) Reprovado ( )	
Dr. João Vicente Braga de Souza – (INPA)	Aprovado (x) Reprovado ( )	
Dr. Afonso Duarte Leão de Souza– (UFAM)	Aprovado (x) Reprovado ( )	

Manaus, 25 de fevereiro de 2014.

**Resultado Final:** Aprovado (x)  
Reprovado ( )

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia  
  
Prof. Dr. Esmar Verde Andre  
Coordenador do PPGBIOTEC

Coordenador do PPGBIOTEC

## FICHA CATALOGRÁFICA

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Martins, Daiane

M739e      Estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla* Huber  
(Rubiaceae) / Daiane Martins. – Manaus, 2014.

231f. il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Verônica Nunes

1. Química vegetal 2. Rubiaceae 3. Antioxidante 4. Alcaloides I Nunez, Cecília Verônica (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 1997 582.972(043.3)

***DEDICO ESTE TRABALHO***

*Ao meu esposo Cleverson Agner Ramos,  
pelo amor, abnegação e apoio nos  
mínimos gestos e nos máximos  
esforços.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder tantas conquistas e permitir que este momento tão especial acontecesse.

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez, um exemplo de profissional e dedicação. Agradeço pela orientação, apoio, incentivo, compreensão e amizade. Agradeço também por possibilitar a execução deste trabalho, pela confiança depositada em mim e pelos valiosos ensinamentos.

A TODOS os colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, em especial a Lorena, Nerilson, Pierre, Fábio, Maitê, Manoel, Giselle, Laila, Izabel...

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela infraestrutura essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela a oportunidade de realizar o curso de doutorado. E aos docentes pelos ensinamentos, principalmente à Profa. Dra. Maria Lúcia Belém pela oportunidade de realizar o estágio docente na disciplina de Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos, no curso de Química.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, processo 142201/2010-3, pela bolsa de doutorado concedida e ao Programa Ciência sem Fronteiras pela bolsa de doutorado sanduíche concedida sob processo 237514/2012-5.

Aos professores Dr. François Bailleul, Dr. Thierry Hennebelle, Dr. Vincent Roumy, Dra. Céline Rivière e Dra. Sevsen Sahpaz do Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille, France, pela atenção, orientação e pelo espaço cedido para a realização do doutorado sanduíche.

Ao professor Andersson Barison e ao colega Kahlil Schwanka Salomé da Universidade Federal do Paraná (UFPR) pelo auxílio nas análises de RMN. Ao professor Pedro Eduardo Almeida da Silva da Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) pela colaboração para a realização dos ensaios antimicobacteriano. A professora Marne Carvalho de Vasconcellos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela parceria e colaboração para realizar o ensaio antitumoral.

E a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

## RESUMO

As espécies pertencentes à família Rubiaceae revelaram grande diversidade de metabólitos secundários, os quais são responsáveis por uma gama de atividades biológicas. Entre estas espécies encontra-se *Duroia macrophylla* Huber, endêmica da Floresta Amazônica, conhecida popularmente como cabeça-de-urubú, apuruí ou puruí-grande-da-mata. A escassez de estudos de plantas do gênero *Duroia* e a ausência de estudos químicos e de atividade biológica para *D. macrophylla*, instigaram este trabalho, cujo o objetivo foi isolar os constituintes químicos e avaliar os extratos e substâncias isoladas quanto às atividades: antioxidante, toxicidade frente à *Artemia salina*, antibacteriana, antimicobacteriana e antitumoral. Foram realizadas duas coletas desta espécie, extraída com diclorometano (DCM) ou hexano (Hex) e metanol (MeOH). Os extratos foram testados como antioxidante, citotóxico, antibacteriano, antimicobacteriano e antitumoral, com intuito de ampliar as chances de obter moléculas ativas e/ou protótipos de fármacos. As substâncias isoladas foram identificadas por métodos espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais) e por espectrometria de massas e testadas como antimicobacteriana e antitumoral. Na prospecção fitoquímica todos os extratos apresentaram indícios de terpenos e apenas os extratos DCM de folhas e galhos da 1ª coleta não apresentaram capacidade antioxidante frente ao revelador DPPH. Os extratos MeOH de ambas as coletas apresentam compostos aromáticos. A presença de alcaloides foi detectada apenas nos extratos dos galhos da 2ª coleta. Foram isoladas e identificadas quatro substâncias dos extratos da 1ª coleta: dois triterpenos do extrato DCM das folhas (ácido oleanólico e ácido ursólico), uma chalcona do extrato MeOH das folhas (4,4'-dihidroxi-3'-chalcona) e um ácido fenólico do extrato MeOH dos galhos (ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico). Dos extratos da 2ª coleta foram identificados oito alcaloides indólicos monoterpênicos: 10-metoxi-ajmalicina, 11-metoxi-ajmalicina, 11-metoxi-3-isoajmalicina, 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, 9-metoxi-3-isoajmalicina, 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, 10-metoxi-3-isorauniticina e 10-metoxi-rauniticina. Todas as substâncias isoladas neste estudo estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Duroia*. A atividade antioxidante dos extratos MeOH de folhas e galhos de ambas as coletas foi bastante significativa. No ensaio citotóxico frente *A. salina* apenas o extrato metanólico das folhas da 2ª coleta apresentou toxicidade na concentração letal ( $\text{CL}_{50}$ ) de 120  $\mu\text{g/mL}$ . Os extratos apresentaram atividade bacteriostática sobre as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnare*, *Salmonella enteridis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Das substâncias testadas apenas o ácido oleanólico apresentou atividade antibacteriana frente à *Nocardia brasiliensis* e *Serratia marcescens*, com uma CIM de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Dos extratos submetidos ao bioensaio antimicobacteriano, o extrato DCM das folhas (1ª coleta) apresentou melhor resultado frente às três cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, com uma CMI de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  para a cepa INHr, de 25  $\mu\text{g/mL}$  para a cepa RMPr e  $\leq 6,25$   $\mu\text{g/mL}$  para a cepa H37Rv. Os alcaloides 10-metoxi-ajmalicina, a mistura de 9-metoxi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, 10-metoxi-3-isorauniticina e 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina foram ativos frente ao *M. tuberculosis* (cepa INHr). Os extratos e alcaloides apresentaram baixo potencial citotóxico sobre as linhagens de células neoplásicas: HCT116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (carcinoma de mama), SK-Mel-19 (melanoma humano) e sobre a linhagem não neoplásica: MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano).

**Palavras-chave:** alcaloides, antioxidantes, antibacteriana, antimicobacteriana, antitumoral.

## ABSTRACT

The species of Rubiaceae revealed great diversity of secondary metabolites, which are responsible for a range of biological activities. Among these species is *Duroia macrophylla* Huber, endemic to the Amazon Rainforest, popularly known as “cabeça-de-urubú, apuruí ou puruí-grande-da-mata”. The absence of studies of plants of the genus *Duroia* and the absence of chemical studies and biological activity to *D. macrophylla*, the aim of this work was to isolate the chemical constituents and evaluate the extracts and compounds isolated on activities: antioxidant, toxicity against *Artemia salina*, antibacterial, antimycobacterial and antitumor. The plant material was collected two times, dried, grounded and extracted with dichloromethane or hexane and methanol. The extracts were subjected to phytochemical screening by comparative thin layer chromatography and to determine specific telltale signs of chemical classes. The extracts were tested as antioxidant, cytotoxic, antibacterial, antimycobacterial and antitumor, to increase the chances of obtaining active molecules and/or prototypes of drugs. The isolated compounds were identified by spectroscopic methods ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and two-dimensional NMR) and mass spectrometry and essayed as antimicrobial and antitumor. All extracts showed signs of terpenes and only the dichloromethane extracts of leaves and branches of the 1<sup>st</sup> collection did not reveal with DPPH. The methanol extracts of both collections showed aromatic compounds. The presence of alkaloids was detected only in extracts from the branches of the 2<sup>nd</sup> collection. There were isolated and identified four substances of the extracts of the 1<sup>st</sup> collection: two triterpenes from dichloromethane extract of the leaves (oleanolic acid and ursolic acid), one chalcone from methanol extract of the leaves (4,4'- dihydroxy-3'-chalcone) and a phenolic acid from methanol extract of the branches (*m*-methoxy-*p*-hydroxy-benzoic acid). Were identified of the extracts of the 2<sup>nd</sup> collection, eight monoterpene indole alkaloids: 10-methoxy-ajmalicine, 11-methoxy-ajmalicine, 11-methoxy-3-isoajmalicine, 9-methoxy-3-isoajmalicine, 9-methoxy-19-epi-3-isoajmalicine, 10-methoxy-19-epi-3-isoajmalicine, 10-methoxy-3-isorauniticine and 10-methoxy-rauniticine. All compounds isolated in this study were described for the first time in the genus *Duroia*. The methanol extracts from leaves and branches in both collections showed a good antioxidant activity. In cytotoxic assay against *A. salina* only the methanol extract of the leaves (2<sup>nd</sup> collection) presented toxicity at lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of 120 mg/mL. The extracts showed bacteriostatic activity against the bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnare*, *Salmonella enteridis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Of the substances tested only oleanolic acid showed antibacterial activity against *Nocardia brasiliensis* and *Serratia marcescens*, with a MIC of 500 mg/mL. Extracts subjected to antimycobacterial bioassay, the dichloromethane extract of the leaves (1<sup>st</sup> collection) showed better results against all strains of *Mycobacterium tuberculosis* with an MIC of 6.25 mg/mL for INHr strain, 25 mg/mL for the strain RMPPr and  $\leq 6.25$  mg/ml for H37Rv strain. Only the alkaloids 10-methoxy-3-isorauniticine, the mixture of 9-methoxy-3-isoajmalicine with 9-methoxy-19-epi-3-isoajmalicine, 10-methoxy-3-isorauniticine and 10-methoxy-rauniticine tested against *M. tuberculosis* (strain INHr) showed better results rather those obtained from crude extracts. The extracts and alkaloids showed low cytotoxic potential on neoplastic cell lines: HCT116 (human colorectal carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), SK -Mel-19 (human melanoma) and on the non-neoplastic line: MRC-5 (human lung fibroblast).

**Keywords:** alkaloids, antioxidant activity, antimycobacterial activity.



## RÉSUMÉ

Les espèces de Rubiaceae révèlent une grande diversité de métabolites secondaires, qui sont responsables pour une gamme d'activités biologiques. Parmi ces espèces se trouve *Duroia macrophylla* Huber, endémique à la Forêt Amazonienne, populairement connue sous le nom de "cabeça-de-Urubú, apurú ou Purui-grande-da-mata". Au vu de l'absence d'études de plantes du genre *Duroia* et l'absence d'études chimiques et l'activité biologique de *D. macrophylla*, le but de ce travail était d'isoler les constituants chimiques et d'évaluer les extraits et les composés isolés de *D. macrophylla* sur les activités: antioxydantes, la toxicité contre la *Artemia salina*, antibactérienne, antimycobactérienne et antitumorale. Deux échantillons de cette espèce ont été réalisés, les organes végétaux ont été séchés, broyés et extraits avec du dichlorométhane, de l'hexane et du méthanol. Les extraits ont ensuite été soumis à un criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince et comparative pour déterminer des signes révélateurs spécifiques de classes chimiques. Les extraits ont été testés comme antioxydant, cytotoxique, antibactérien, antimycobactérien et antitumoral, pour augmenter les chances d'obtenir des molécules et/ou des prototypes de médicaments actifs. Les composés isolés ont été identifiés par des méthodes spectroscopiques (RMN <sup>1</sup>H et RMN à deux dimensions et la spectrométrie de masse) et l'extrait dichlorométhanique a été identifié comme antimicrobien et antitumoral. Tous les extraits ont montré des signes de terpènes et seuls les extraits de dichlorométhane de feuilles et de brindilles de la 1<sup>ère</sup> collection n'ont rien révélé avec le DPPH. Les extraits au méthanol de deux collections ont marqué la présence de composés aromatiques. La présence d'alcaloïdes a été détectée seulement dans les extraits des branches de la deuxième collection: quatre substances. Ont été isolés et identifiés des extraits de la première collection: deux triterpènes à partir de l'extrait de dichlorométhane des feuilles (acide oléanolique et l'acide ursolique), une chalcone à partir de l'extrait au méthanol des feuilles (4,4'-dihydroxy-3'-chalcone) et un acide phénolique à partir de l'extrait au méthanol des branches (*m*-méthoxy-*p*-hydroxy-benzoïque). Huit alcaloïdes indoliques monoterpènes ont été identifiées des extraits de la deuxième collection, huit alcaloïdes indoliques monoterpènes: 10-méthoxy-ajmalicine, 11-méthoxy-ajmalicine, 11-méthoxy-3-isoajmalicine, 9-méthoxy-19-épi-3-isoajmalicine, 9-méthoxy-3-isoajmalicine, 10-méthoxy-19-épi-3-isoajmalicine, le 10-déméthoxy-3-isorauniticine et 10-méthoxy-rauniticine. Tous les composés isolés dans cette étude ont été décrits pour la première fois dans le genre *Duroia*. Les extraits au méthanol des feuilles et des branches dans les deux collections ont montré une bonne activité antioxydante. En test cytotoxique contre l'*A. salina*, seul l'extrait de méthanol des feuilles (2<sup>ème</sup> collection) a présenté une toxicité à la concentration létale (CL50) de 120 mg/ml. Tous les extraits ont montré une activité bactériostatique contre les bactéries *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnaire*, *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi les substances que l'acide oléanolique testés ont montré une activité antibactérienne contre *Nocardia brasiliensis* et *Serratia marcescens*, avec une CMI de 500 mg/mL. Sur les Extraits soumis à l'essai biologique antimycobactérien, l'extrait de dichlorométhane des feuilles (1<sup>er</sup> collection) a montré de meilleurs résultats contre toutes les souches de *Mycobacterium tuberculosis* avec une CMI de 6,25 mg/ml pour la souche INHr, 25 mg / ml pour la souche RMPr et ≤ 6,25 mg/ml pour la souche H37Rv. Seule les alcaloïdes 10- méthoxy-ajmalicine, le mélange de 9-méthoxy-3-isoajmalicine avec le 9-méthoxy- 19-épi-3-ajmalicine, 10-méthoxy-3-isorauniticine et 10-méthoxy-rauniticine testé contre *M. tuberculosis* (souche INHr) a montré de meilleurs résultats plutôt que ceux obtenus à partir d'extraits bruts. Les extraits d' alcaloïdes ont démontré un potentiel cytotoxique faible sur des lignées cellulaires néoplasiques : HCT116 (carcinome colorectal humain), MCF-7 (cancer du sein), SK-Mel-19 (mélanome humain) et sur la ligne non - néoplasique : MRC- 5 (humaine fibroblastes pulmonaires).

**Mots-clés:** alcaloïdes, activité antioxydante, activité antimycobactérienne.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Subfamílias e tribos com representantes no Brasil, com destaque para o gênero estudado no presente trabalho. ....	3
<b>Figura 2:</b> Algumas substâncias identificadas em Rubiaceae. ....	7
<b>Figura 3:</b> Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae. ....	10
<b>Figura 4:</b> Imagens da espécie <i>D. macrophylla</i> . ....	34
<b>Figura 5:</b> Fluxograma da preparação dos extratos de galhos e folhas de <i>Duroia macrophylla</i> . ....	41
<b>Figura 6:</b> Fracionamento do extrato DCM das folhas da 1ª coleta. ....	51
<b>Figura 7:</b> Extração líquido-líquido de folhas e galhos dos extratos metanólico da 1ª coleta. ....	52
<b>Figura 8:</b> Fracionamento da fase DCM do extrato MeOH das folhas da 1ª coleta. ....	55
<b>Figura 9:</b> Fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH das folhas da 1ª coleta. ....	57
<b>Figura 10:</b> Fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos da 1ª coleta. ....	58
<b>Figura 11:</b> Fracionamento do extrato DCM dos galhos da 2ª coleta. ....	63
<b>Figura 12:</b> Fracionamento do extrato MeOH dos galhos da 2ª coleta. ....	69
<b>Figura 13:</b> Estrutura do ácido oleanólico e suas correlações no HMBC. ....	79
<b>Figura 14:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ácido oleanólico em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	80
<b>Figura 15:</b> Mapa de contorno HSQC do ácido oleanólico em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	81
<b>Figura 16:</b> Mapa de contorno HMBC do ácido oleanólico em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	82
<b>Figura 17:</b> Estrutura do Ácido ursólico e suas correlações no HMBC. ....	84
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ácido ursólico em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	85
<b>Figura 19:</b> Mapa de contorno HSQC do ácido ursólico em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	86
<b>Figura 20:</b> Mapa de contorno HMBC do ácido ursólico em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	87
<b>Figura 21:</b> Estrutura da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona e suas correlações no HMBC. ....	89
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ...	90
<b>Figura 23:</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ....	91
<b>Figura 24:</b> Mapa de contorno HSQC da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ..	92
<b>Figura 25:</b> Mapa de contorno HMBC da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em CDCl <sub>3</sub> (400 MHz). ..	93
<b>Figura 26:</b> Estrutura do ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzoico e suas correlações no HMBC. ....	95

<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzoico, em $\text{CDCl}_3$ (400 MHz). 96	96
<b>Figura 28:</b> Mapa de contorno HSQC do ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzoico em $\text{CDCl}_3$ (400 MHz). 97	97
<b>Figura 29:</b> Mapa de contorno HMBC do ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzoico em $\text{CDCl}_3$ (400 MHz). 98	98
<b>Figura 30:</b> Estereoquímica relativa dos centros estereogênicos C-3, C-15 e C-20, que caracteriza a estereoquímica do anel D dos alcaloides indólicos nas séries <i>normal</i> , <i>pseudo</i> , <i>allo</i> e <i>epiallo</i> . 100	100
<b>Figura 31:</b> Estrutura da 10-metoxi-ajmalicina e suas correlações no HMBC. 104	104
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da 10-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 106	106
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT da 10-metoxi-ajmalicina, com destaque para deslocamentos que definem a estereoquímica (125 MHz). 107	107
<b>Figura 34:</b> Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 108	108
<b>Figura 35:</b> Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 109	109
<b>Figura 36:</b> Mapa de contorno COSY da 10-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 110	110
<b>Figura 37:</b> Estrutura da 11-metoxi-ajmalicina e suas correlações no HMBC. 113	113
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da 11-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 115	115
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT da 11-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (125 MHz). 116	116
<b>Figura 40:</b> Mapa de contorno HSQC da 11-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 117	117
<b>Figura 41:</b> Mapa de contorno HMBC da 11-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 118	118
<b>Figura 42:</b> Mapa de contorno COSY da 11-metoxi-ajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 119	119
<b>Figura 43:</b> Estrutura da 11-metoxi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC. 121	121
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da 11-metoxi-3-isoajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 123	123
<b>Figura 45:</b> Mapa de contorno HSQC da 11-metoxi-3-isoajmalicina, com destaque para alguns deslocamentos que definem a estereoquímica em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 124	124
<b>Figura 46:</b> Mapa de contorno HMBC da 11-metoxi-3-isoajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 125	125
<b>Figura 47:</b> Mapa de contorno COSY da 11-metoxi-3-isoajmalicina em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (500 MHz). 126	126
<b>Figura 48:</b> Estrutura da 9-metoxi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC. 130	130
<b>Figura 49:</b> Estrutura da 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC. 130	130
<b>Figura 50:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (500 MHz). 133	133
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (125 MHz). 134	134

<b>Figura 52:</b> Mapa de contorno HSQC da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-akuamigina, com destaque para alguns dos deslocamentos que definem a estereoquímica, em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N (500 MHz).....	135
<b>Figura 53:</b> Mapa de contorno HMBC da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina, com destaque para alguns dos deslocamentos que definem a estereoquímica, em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N (500 MHz).....	136
<b>Figura 54:</b> Mapa de contorno COSY da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N (500 MHz).....	137
<b>Figura 55:</b> Estrutura da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC. ....	139
<b>Figura 56:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N (500 MHz)...	141
<b>Figura 57:</b> Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, com destaque para os deslocamentos que definem a estereoquímica, em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	142
<b>Figura 58:</b> Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N (500 MHz).	143
<b>Figura 59:</b> Mapa de contorno COSY da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N (500 MHz).	144
<b>Figura 60:</b> Estrutura da 10-metoxi-3-isorauniticina e suas correlações no HMBC. ....	146
<b>Figura 61:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 10-metoxi-3-isorauniticina em CDO <sub>3</sub> D (500 MHz). ....	148
<b>Figura 62:</b> Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-3-isorauniticina em CDO <sub>3</sub> D (500 MHz).....	149
<b>Figura 63:</b> Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-3-isorauniticina em CDO <sub>3</sub> D (500 MHz). ....	150
<b>Figura 64:</b> Mapa de contorno COSY da 10-metoxi-3-isorauniticina em CDO <sub>3</sub> D (500 MHz).....	151
<b>Figura 65:</b> Estrutura da 10-metoxi-rauniticina e suas correlações no HMBC. ....	153
<b>Figura 66:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 10-metoxi-rauniticina em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz). ....	154
<b>Figura 67:</b> Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-rauniticina em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	155
<b>Figura 68:</b> Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-rauniticina em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz). ....	156
<b>Figura 69:</b> Atividade antioxidante do extrato dos galhos da 1ª coleta. ....	158
<b>Figura 70:</b> Atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas da 2ª coleta. ....	159
<b>Figura 71:</b> Atividade antioxidante do extrato metanólico dos galhos da 2ª coleta. ....	159
<b>Figura 72:</b> Estrutura molecular da Isoniazida (INH). ....	170
<b>Figura 73:</b> Estrutura molecular da Rifampicina (RMPPr). ....	170

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Algumas classes de metabólitos identificados em espécies de Rubiaceae.....	5
<b>Tabela 2:</b> Monoterpenos .....	10
<b>Tabela 3:</b> Ácidos fenólicos .....	11
<b>Tabela 4:</b> Iridoides .....	11
<b>Tabela 5:</b> Diterpeno .....	15
<b>Tabela 6:</b> Triterpenos.....	15
<b>Tabela 7:</b> Saponinas.....	19
<b>Tabela 8:</b> Triterpenos cicloartano .....	22
<b>Tabela 9:</b> Esteróide glicosilado .....	23
<b>Tabela 10:</b> Carotenoides .....	23
<b>Tabela 11:</b> Flavonoides .....	25
<b>Tabela 12:</b> Derivados fenólicos .....	26
<b>Tabela 13:</b> Proantocianidinas .....	27
<b>Tabela 14:</b> Lignanas glicosiladas.....	29
<b>Tabela 15:</b> Cumarinas.....	30
<b>Tabela 16:</b> Glicosídeos cianogênicos .....	30
<b>Tabela 17:</b> Alcaloide .....	30
<b>Tabela 18:</b> Ácidos graxos .....	31
<b>Tabela 19:</b> Substâncias relatadas para espécies do gênero em estudo.....	32
<b>Tabela 20:</b> Dados da coleta de <i>Duroia macrophylla</i> e número de <i>voucher</i> no herbário do INPA.....	40
<b>Tabela 21:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento do extrato FDCM .....	43
<b>Tabela 22:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 1-4 .....	44
<b>Tabela 23:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 6-12 .....	44
<b>Tabela 24:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 6-12.38-63 .....	45
<b>Tabela 25:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 17-21 .....	45
<b>Tabela 26:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 17-21.1-5 .....	46

<b>Tabela 27:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 25-40 .....	47
<b>Tabela 28:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 25-40.6 .....	47
<b>Tabela 29:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 25-40.7 .....	48
<b>Tabela 30:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 45.....	49
<b>Tabela 31:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 46-56 .....	49
<b>Tabela 32:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 57.....	50
<b>Tabela 33:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fase FMeOH-DCM.....	52
<b>Tabela 34:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração FMeOH-DCM 7-10.....	53
<b>Tabela 35:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração FMeOH-DCM 13-25.....	54
<b>Tabela 36:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração FMeOH-DCM 13-25.110-187 .....	55
<b>Tabela 37:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fase FMeOH-AcOEt.....	56
<b>Tabela 38:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GMeOH-AcOEt .....	57
<b>Tabela 39:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GDCM.....	58
<b>Tabela 40:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GDCM 54-62.....	59
<b>Tabela 41:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GDCM 133-136.....	61
<b>Tabela 42:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GDCM 137-43.....	62
<b>Tabela 43:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GMeOH-DCM.....	64
<b>Tabela 44:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 8.....	65
<b>Tabela 45:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 9-10 .....	65
<b>Tabela 46:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 9-10. 22-23.	66
<b>Tabela 47:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 22-25 .....	67
<b>Tabela 48:</b> Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GMeOH-AcOEt .....	68
<b>Tabela 49:</b> Quantidade de massa e rendimento dos extratos.....	75
<b>Tabela 50:</b> Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e correlações heteronucleares do ácido oleanólico.....	78
<b>Tabela 51:</b> Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e correlações heteronucleares do ácido ursólico.....	83

<b>Tabela 52:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) e correlações heteronucleares da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona.....	89
<b>Tabela 53:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) e correlações heteronucleares do ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzoico. ....	94
<b>Tabela 54:</b> Deslocamentos químicos típicos para C-3 e C-6 para alcaloides de esqueleto ioimbina.....	100
<b>Tabela 55:</b> Deslocamentos químicos típicos para C-14 e C-20 para alcaloides de esqueleto ioimbina.....	101
<b>Tabela 56:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-ajmalicina.....	103
<b>Tabela 57:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de 10-metoxi-ajmalicina. ....	105
<b>Tabela 58:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 11-metoxi-ajmalicina.....	112
<b>Tabela 59:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da 11-metoxi ajmalicina.....	113
<b>Tabela 60:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 11-metoxi-3-isoajmalicina.....	120
<b>Tabela 61:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da 11-metoxi-3-isoajmalicina. ....	122
<b>Tabela 62:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 9-metoxi-3-isoajmalicina.....	128
<b>Tabela 63:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina. ....	129
<b>Tabela 64:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da 9-metoxi-3-isoajmalicina. ....	131
<b>Tabela 65:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da 9-metoxi-3-isoajmalicina. ....	131
<b>Tabela 66:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina. ....	138
<b>Tabela 67:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina.....	140
<b>Tabela 68:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-3-isorauniticina.....	145

<b>Tabela 69:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) com as correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da 10-metoxi-3-isorauniticina.....	147
<b>Tabela 70:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-rauniticina.....	153
<b>Tabela 71:</b> Resultado das reações dos extratos de <i>Duroia macrophylla</i> com o oxidante DPPH. ....	157
<b>Tabela 72:</b> Resultados da análise de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> dos extratos de <i>Duroia macrophylla</i> . ....	160
<b>Tabela 73:</b> CIM dos extratos de <i>Duroia macrophylla</i> frente às bactérias testadas. ....	163
<b>Tabela 74:</b> CIM das substâncias isoladas de <i>Duroia macrophylla</i> frente às bactérias testadas. ....	164
<b>Tabela 75:</b> Determinação da CIM dos extratos de <i>D. macrophylla</i> frente ao <i>M. tuberculosis</i> . ....	166
<b>Tabela 76:</b> Determinação da CIM das frações do extrato DCM dos galhos da 1 <sup>a</sup> coleta.....	167
<b>Tabela 77:</b> Determinação da CIM das frações do extrato MeOH das folhas da 1 <sup>a</sup> coleta.....	168
<b>Tabela 78:</b> Determinação da CIM das frações do extrato MeOH dos galhos da 1 <sup>a</sup> coleta....	168
<b>Tabela 79:</b> Determinação da CIM das frações do extrato DCM dos galhos da 2 <sup>a</sup> coleta.....	169
<b>Tabela 80:</b> Determinação da CIM das frações do extrato MeOH dos galhos da 2 <sup>a</sup> coleta,...	169
<b>Tabela 81:</b> Determinação da CIM das substâncias isoladas de <i>D. macrophylla</i> .....	171
<b>Tabela 82:</b> Determinação da viabilidade celular das substâncias isoladas de <i>D. macrophylla</i> em linhagens de células tumorais. ....	173



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN= Acetonitrila  
AcOEt = Acetato de etila  
ANT = Antirrhoideae  
APT= Teste do Hidrogênio Ligado  
CC = Coluna Cromatográfica  
CCDC = Cromatografia em Camada Delgada Comparativa  
CCDP = Cromatografia em Camada Delgada Preparativa  
CDCl<sub>3</sub>= Clorofórmio Deuterado  
CDO<sub>3</sub>D= Metanol Deuterado  
C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O= Acetona Deuterada  
C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N= Piridina Deuterada  
CIM = Concentração Inibitória Mínima  
CBM = Concentração Bactericida Mínima  
CIN = Cinchonoideae  
CI<sub>50</sub> = Concentração Inibitória  
CL<sub>50</sub> = Concentração Letal  
CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
COSY= Espectroscopia de Correlação Homonuclear  
COTI= Coordenação de Tecnologia e Inovação  
DCM = Diclorometano  
DMSO = Dimetilssulfóxido  
DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazila  
Hex = Hexano  
HMBC= Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de Múltiplos Quanta  
HSQC= Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de um Único Quantum  
INH = Isoniazida  
IXO = Ixoroideae  
MeOH = Metanol  
Rt = Tempo de retenção  
REMA= *Resazurin Microtitre Assay*  
RMP = Rifampicina  
RMN = Ressonância Magnética Nuclear  
RPPN = Reserva Particular de Patrimônio Natural  
RUB = Rubioideae  
UV = Ultra-violeta  
TB= Tuberculose

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 A Família Rubiaceae .....	2
2.1.1 Características Botânicas.....	2
2.1.2 Aspectos Químicos, Biológicos e Botânicos.....	3
2.1.3 Quimiosistemática .....	8
2.1.4 Tribo Gardeniae.....	10
2.1.5 Características do gênero <i>Duroia</i> .....	31
2.1.6 A espécie <i>Duroia macrophylla</i> Huber.....	33
2.1.7 Atividades Química e Biológica.....	34
3. OBJETIVOS .....	39
3.1 Geral.....	39
3.2 Específicos .....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
4.1. Coleta do Material e Preparo dos Extratos.....	40
4.2. Especificações dos Equipamentos e Materiais Utilizados.....	41
4.3. Estudo Fitoquímico dos Extratos da 1ª Coleta .....	43
4.3.1. Fracionamento dos Extratos Diclorometânico das Folhas .....	43
4.3.2. Fracionamento dos Extratos Metanólico de Folhas e Galhos .....	52
4.4. Estudo Fitoquímico dos Extratos da 2ª Coleta .....	58
4.4.1. Fracionamento dos Extratos Diclorometânico dos Galhos .....	58
4.4.2. Fracionamento dos Extratos Metanólico dos Galhos .....	64
4.5. Atividades Química e Biológica .....	69
4.5.1. Atividade Antioxidante .....	69
4.5.2. Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> .....	70
4.5.3. Atividade Antibacteriana.....	71
4.5.4. Atividade Antimicobacteriana.....	72
4.5.5. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	73

RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
5.1. Prospecção Fitoquímica .....	75
5.2. Identificação das Substâncias Isoladas dos Extratos da Primeira Coleta de <i>Duroia macrophylla</i> .....	76
5.2.1 Identificação dos triterpenos .....	77
5.2.2 Identificação da Sustância III.....	88
5.2.3 Identificação da Sustância IV.....	94
5.3. Identificação das Substâncias Isoladas dos Extratos da Segunda Coleta de <i>Duroia macrophylla</i> .....	99
5.3.1. Identificação da Substância V .....	102
5.3.2. Identificação da Substância VI.....	111
5.3.3. Identificação da Substância VII .....	120
5.3.4. Identificação das Substâncias VIII e IX.....	127
5.3.5. Identificação da Substância X.....	138
5.3.6. Identificação da Substância XI.....	145
5.3.7. Identificação da Substância XII .....	152
5.4. Atividades Química e Biológica .....	157
5.4.1. Atividade Antioxidante .....	157
5.4.2. Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> .....	160
5.4.3. Atividade Antibacteriana.....	161
5.4.4. Atividade Antimicobacteriana.....	165
5.4.5. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	171
5. CONCLUSÕES.....	174
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	176
7. ANEXOS.....	213

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos na área de produtos naturais têm sido desenvolvidos com o biomonitoramento de seus extratos vegetais, fato que otimiza as pesquisas de substâncias bioativas de interesse econômico. Portanto, há uma demanda de estudos científicos que envolvam plantas com atividade biológica, de modo que tal prática deve ser incentivada, constituindo um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos medicamentos. Estes novos produtos podem, além de trazer divisas, oferecer oportunidade para geração de emprego ao longo da cadeia produtiva, não só na zona urbana, mas, sobretudo, na zona rural, contribuindo para a desconcentração de renda e, conseqüentemente, para a interiorização do desenvolvimento da Amazônia (ENRÍQUEZ, 2010).

A grande diversidade vegetal da Amazônia abriga centenas de espécies pertencentes a diferentes famílias, entre elas estão as espécies da família Rubiaceae, uma das famílias mais representativas da flora brasileira. Estas plantas possuem importância econômica, agrícola, ornamental e medicinal (JOLY, 1983), além de contribuir com a bioprodução de metabólitos especiais com um grande potencial farmacológico (HEITZMAN *et al.*, 2005).

A família Rubiaceae destaca-se pela produção de alcaloides bioativos que originam diversos fármacos, sendo estes ainda considerados marcadores quimiotaxômicos de determinadas subfamílias e gêneros (BARREIRO, 1990 e FARIAS, 2006). A quantidade de produtos descritos, sua diversidade estrutural e variadas atividades farmacológicas fazem dos alcaloides, junto com antibióticos, um dos grupos mais importantes entre as substâncias naturais com interesse terapêutico (CORDELL *et al.*, 2001).

Ao escolher as plantas a serem investigadas devem-se considerar as informações botânicas e quimiotaxonômicas, pois a probabilidade de encontrar substâncias bioativas sejam elas inéditas, ou já descritas na literatura é bem maior. Estas fontes de biodiversidade menos exploradas ou inexploradas estão frequentemente associadas à nova diversidade química (CLARDY e WALSH, 2004). Entre estas fontes, podem ser citadas algumas espécies endêmicas da Floresta Amazônica que ainda permanecem sem estudo químico e/ou biológico como é o caso da espécie *Duroia macrophylla*. Com base nestas informações e devido à escassez de estudos sobre o gênero *Duroia* este trabalho propõe o estudo químico e de atividade biológica de *Duroia macrophylla* Huber.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

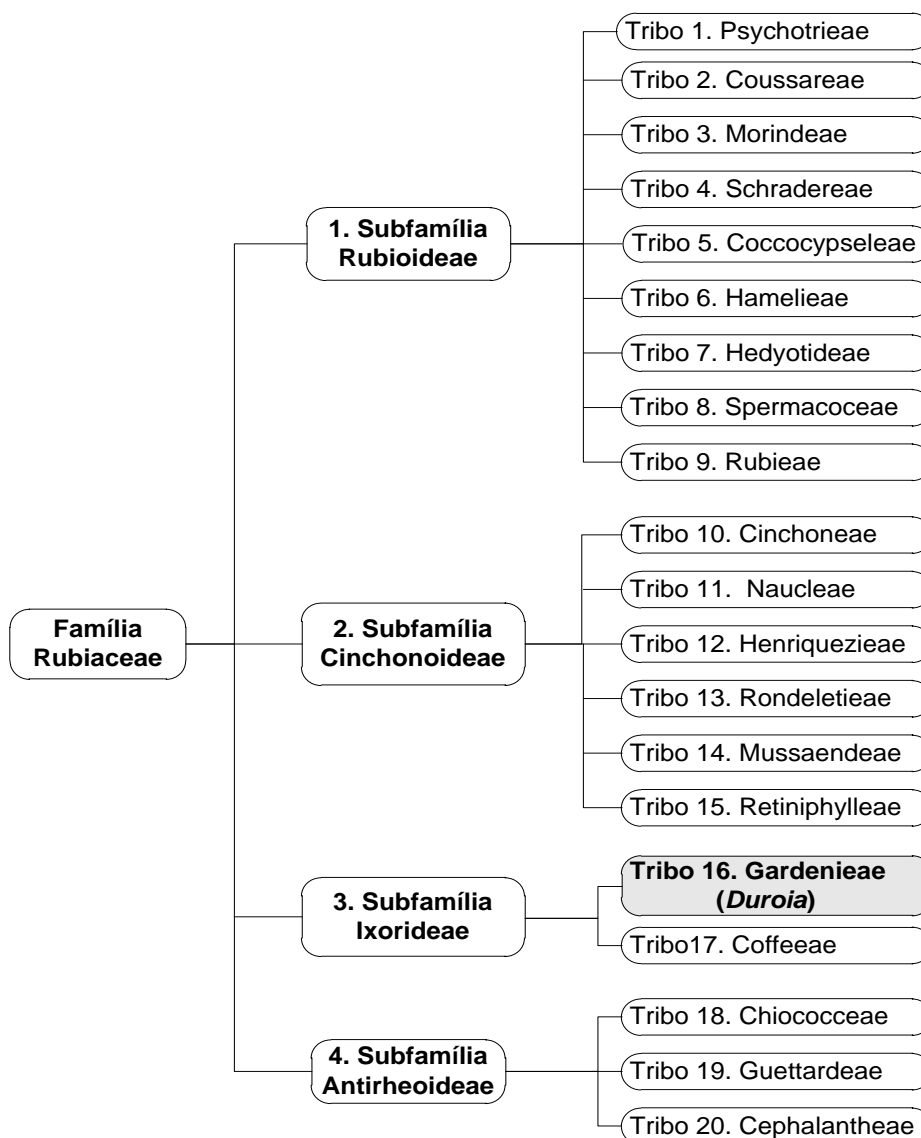
### **2.1 A Família Rubiaceae**

#### **2.1.1 Características Botânicas**

A família Rubiaceae possui distribuição cosmopolita, concentrada nos trópicos, é uma das maiores da classe Magnoliopsida, ocupando o quarto lugar em diversidade de espécies entre as Angiospermas (MABBERLEY, 1997). Inclui aproximadamente 637 gêneros e 10.700 espécies e 39 tribos, as quais estão principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (PEREIRA *et al.*, 2007; MONGRAND *et.al*, 2005). No Brasil ocorrem cerca de 130 gêneros e 1.500 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora e ocorrendo como um importante elemento em quase todas as formações naturais (SOUZA e LORENZI, 2008).

Esta família está dividida em quatro subfamílias (Rubioideae, Antirheoideae, Ixoridae e Cinchonoideae) e 44 tribos. As subfamílias e tribos com representantes no Brasil estão relacionadas na Figura 1 (JOLY, 1983; ROBRECHT, 1988).

As espécies possuem os mais variados portes e hábitos, desde ervas, subarbustos, arbustos, árvores e raramente lianas. As folhas são opostas, menos frequentemente verticiladas, simples, quase sempre com estípulas interpeciolares, ocasionalmente transformadas em espinhos e a margem é inteira. As flores geralmente são vistosas e os frutos do tipo cápsula, drupa ou baga (SOUZA e LORENZI, 2008).



**Figura 1:** Subfamílias e tribos com representantes no Brasil, com destaque para o gênero estudado no presente trabalho. Fonte: BARROSO *et al.* (1991).

### 2.1.2 Aspectos Químicos, Biológicos e Botânicos

A família Rubiaceae destaca-se pela produção de alcaloides bioativos e por sua taxonomia complexa (FARIAS, 2006). Segundo Hoehne (1939), os três principais alcaloides da medicina provêm desta família: a quinina, a emetina e a cafeína. Os alcaloides são exemplos de metabólitos secundários que originam diversos fármacos (BARREIRO, 1990). A quantidade de produtos descritos, sua diversidade estrutural e variadas atividades

farmacológicas fazem dos alcaloides, junto com antibióticos, um dos grupos mais importantes entre as substâncias naturais com interesse terapêutico (CORDELL *et al.*, 2001).

Estudos fitoquímicos revelaram que os alcaloides das rubiáceas pertencem a mais de dez classes diferentes, destacando-se os isoquinolínicos, com 44 substâncias descritas; os quinolínicos, com 70 alcaloides; e os indólicos, com 391 compostos isolados (CORDELL *et al.*, 2001). Os alcaloides indólicos são os principais marcadores químicos desta família (CARBONEZI *et al.*, 2004). Além destes compostos, também foram evidenciados agliconas e heterosídeos de iridoídeos, antraquinonas, saponina triterpênica, flavonoides, lignoides, terpenoides e derivados fenólicos (HAMERSKI *et al.*, 2005a; SILVA *et al.*, 2006).

Os alcaloides indólicos são derivados do metabolismo do triptofano que são característicos em Rubiaceae (BRUNETON e BARTON, 1991). Os alcaloides exercem uma função importante na elucidação de efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos.

Muitas destas substâncias foram e continuam sendo empregadas no tratamento de diferentes enfermidades (CORDELL *et al.*, 2001). Exemplos destes alcaloides são: cafeína (*Coffea arabica*); emetina (*Cephaelis ipecacuanha*) com atividade anti-emética e amebicida; quinidina (*Cephaelis ledgeriana*) anti-arrítmico; quinina (*Cinchona ledgeriana*) anti-malárica e tônica e ioimbina (*Pausinystalia yoimba*) afrodisíaca (CORDELL *et al.*, 2001).

*Cephaelis ipecacuanha* Rich. é uma planta clássica brasileira usada na medicina mundial. Desta espécie, em 1817, Pelletier e Magandie isolaram o princípio ativo emetina, substância largamente utilizada no tratamento de desinterias. A droga da ipecacuanha possui efeito anti-emético apreciável e expectorante em doses atenuadas, sob a forma de pó ou xarope. O Brasil exportava suas raízes secas e já produziu emetina cristalizada (HOEHNE, 1939; RIZZINI e MORS, 1995).

A quinina foi isolada no ano de 1820, por Pelletier e Caventou, durante aproximadamente 200 anos esta substância foi o único princípio ativo contra a malária, e pode ser considerado como responsável pelo desenvolvimento dos antimaláricos sintéticos (BARREIRO, 1990; VIEGAS *et al.*, 2006).

A *Psychotria viridis* Ruiz et Pavón, mais conhecida como “chacrona”, é utilizada em cerimônias e rituais religiosos em associação com o cipó *Banisteriopsis caapi* (Spruce) Morton (“caapi”), uma Malpighiaceae, no preparo de uma bebida com propriedades alucinógenas conhecida como “ayahuasca”, que significa “vinho das almas”. A mistura é utilizada em várias regiões da floresta Amazônica pelas comunidades do “Santo Daime” e “União do Vegetal” (CALLAWAY *et al.*, 1996; GROB *et al.*, 1996). O efeito alucinógeno da

bebida é devido à presença do alcaloide *N,N*-dimetiltryptamina (DMT), encontrado nas folhas da “chacrona” e que tem atividade agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (serotonina) em associação com alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolínicos (a harmina, a harmalina e a tetraidroarmina) presentes nas cascas de “caapi”. O alcaloide harmalina é um potente inibidor da monoaminoxidase tipo A (MAO-A), enzima que promove a degradação da DMT no organismo. Como consequência deste mecanismo, observa-se um aumento da biodisponibilidade oral da DMT intensificando e prolongando seus efeitos alucinógenos (DEULOFEU, 1967; FREEDLAND e MANSBACH, 1999).

Do fruto do genipapo (*Genipa americana* L.) foi isolado a genipina, iridoide incolor, mas que produz cor preta após reagir com as proteínas da pele, a matéria corante era utilizada pelos indígenas nas tatuagens. Este mesmo fruto atualmente é utilizado para fazer vinhos, licores, compotas, refrescos, etc. (PINTO, 1995; RIZZINI e MORS, 1995).

A família caracteriza-se pela produção de metabólitos especiais com um grande potencial farmacológico, dentre os quais podemos citar: anti-inflamatório, tóxico, antiviral, propriedades antioxidantes, efeitos em doenças vasculares e do sistema nervoso central, mutagenicidade, atividade antibacteriana (HEITZMAN *et al.*, 2005) e atividade analgésica (TAKAYAMA, 2004).

Foi realizado o levantamento bibliográfico de trabalhos publicados sobre a fitoquímica da família Rubiaceae de 1990 a 2013 (Anexo 1). Com base nos dados de literatura, foi observada a ocorrência principalmente de alcaloides indólicos, antraquinonas, ácidos fenólicos, iridoides, triterpenoides e glicosídeos variados, estas substâncias foram isoladas das mais diversas espécies de Rubiaceae. Porém, as espécies com maior número de estudos fitoquímico registrados nesses anos, pertencem aos gêneros *Cephaelis*, *Galium*, *Gardenia*, *Hedyotis*, *Morinda*, *Ophiorrhiza*, *Psychotria* e *Uncaria*. Algumas das estruturas destas substâncias isoladas de espécies pertencentes à família Rubiaceae encontram-se na Tabela 1 e Figura 2.

**Tabela 1:** Algumas classes de metabólitos identificados em espécies de Rubiaceae

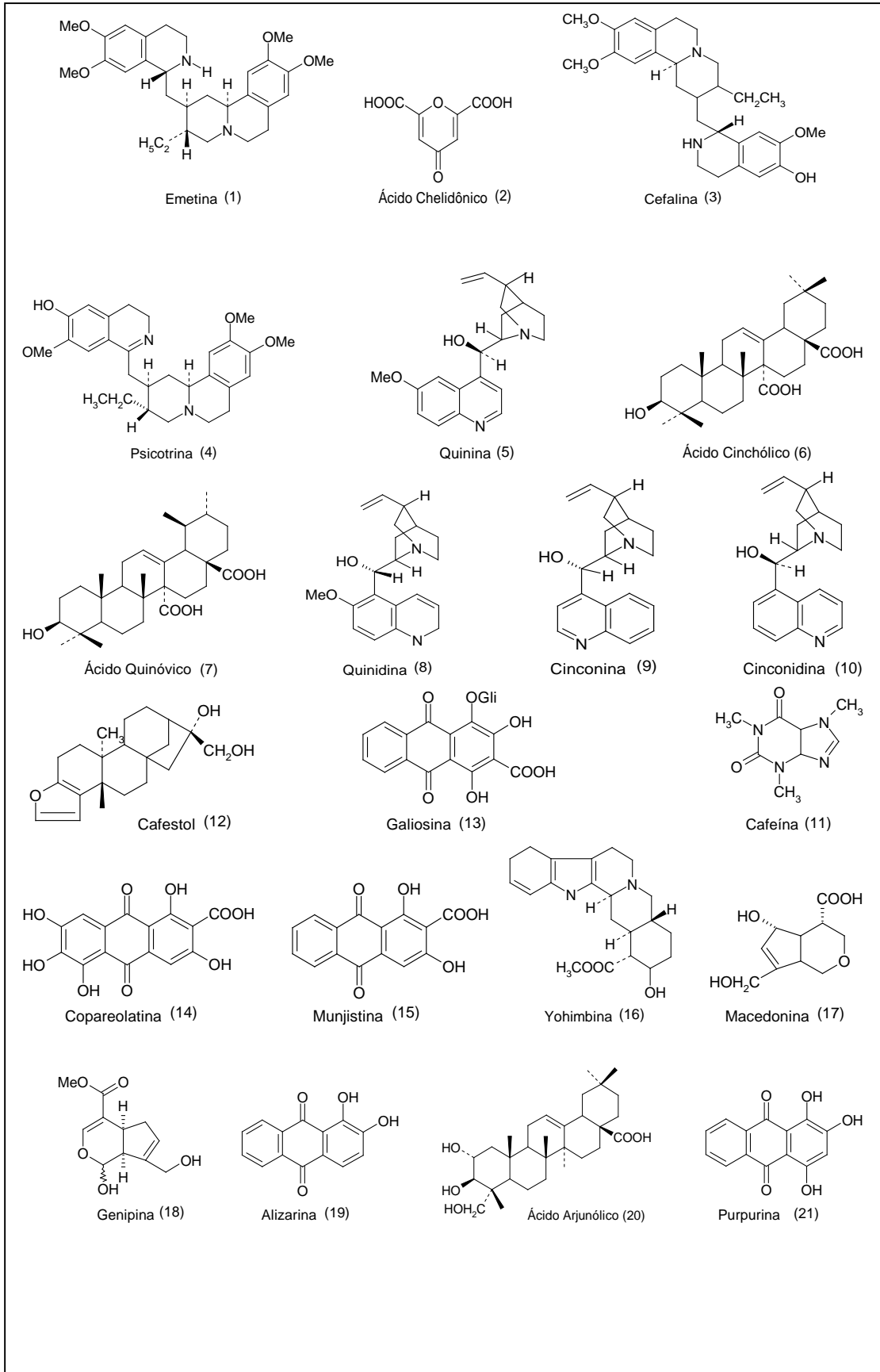
<i>Gêneros</i>	<i>Classe</i>	<i>Substância</i>	<i>Número</i>
<i>Cephaelis</i>	Alcaloide	Emetina	1
	Lactona	Ácido Chelidônico	2
	Alcaloide	Cefalina	3
	Alcaloide	Psicotrina	4



continuação da Tabela 1.

<i>Cinchona</i>	Alcaloide	Quinina	5
	Triterpeno	Ácido Cinchólico	6
	Triterpeno	Ácido Quinóvico	7
	Alcaloide	Quinidina	8
	Alcaloide	Cinconina	9
	Alcaloide	Cinconidina	10
<i>Coffea</i>	Metil-xantina	Cafeína	11
	Diterpeno	Cafestol	12
	Antraquinona	Galiosina	13
	Antraquinona	Copareolatina	14
	Antraquinona	Munjistina	15
<i>Corynanthe</i>	Alcaloide	Yohimbina	16
<i>Galium</i>	Iridoide	Macedonina	17
<i>Genipa</i>	Monoterpeno	Genipina	18
<i>Hedyotis</i>	Antraquinona	Alizarina	19
<i>Landerbergia</i>	Alcaloide	Quinidina	8
	Alcaloide	Cinconina	9
	Alcaloide	Cinconidina	10
<i>Morinda</i>	Antraquinona	Alizarina	19
<i>Mussaenda</i>	Triterpeno	Ácido Arjunólico	20
<i>Oldenlandia</i>	Antraquinona	Alizarina	19
<i>Psychotria</i>	Alcaloide	Psicotrina	4
	Alcaloide	Cefalina	3
<i>Relbunium</i>	Antraquinona	Purpurina	21
<i>Remijia</i>	Alcaloide	Quinidina	8
	Alcaloide	Cinconina	9
	Alcaloide	Cinconidina	10
<i>Rubia</i>	Antraquinona	Purpurina	21
	Antraquinona	Alizarina	19

Fonte: Zuleta, 1997.



**Figura 2:** Algumas substâncias identificadas em Rubiaceae.

### 2.1.3 Quimiosistemática

A subdivisão mais importante da família Rubiaceae foi feita por Robbrecht (1988), que a dividiu em quatro subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae. O autor introduziu, para sua análise filogenética, caracteres como placentação, morfologia e anatomia de frutos e sementes. Entretanto, ficou determinado que o posicionamento das subfamílias e a determinação das tribos, gêneros e espécies ainda permanecia difícil, em geral devido à falta de informação acerca da distribuição geográfica e de caracteres morfoanatômicos de diversas espécies.

Com a crescente preocupação em se obter uma classificação mais confiável das subfamílias e tribos, a definição de metabólitos secundários é bem consolidada e neste caso fator imprescindível na classificação taxonômica desta família (BREMER, 1996). Uma boa correlação entre as vias biossintéticas e os aspectos morfológicos das subfamílias Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae, são obtidos pela avaliação dos dados químicos, aliados aos parâmetros citados por Robbrecht (1988). Cada uma destas subfamílias apresenta um perfil diferente e típico para alcaloides indólicos, iridoídeos, e antraquinonas, que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae. Já na subfamília Antirheoideae não foi observada uma ocorrência padronizada de nenhum desses marcadores químicos (BOLZANI *et al.*, 2001), conforme ilustrado na Figura 3.

Na subfamília Ixoroideae, os iridoídeos são encontrados como marcadores quimiotaxonômicos exclusivos. São exemplos de espécies de Ixoroideae: o gênero *Coffea*, do café (cafeeiro (*Coffea arabica*), fonte de uma das bebidas mais famosas e apreciadas no Brasil, assim como de vários compostos de com atividade farmacológica; *Genipa*, do jenipapo brasileiro; e *Gardenia*, importante fonte de espécies ornamentais (BOLZANI *et al.*, 2001; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2003).

Em Cinchonoideae os alcaloides indólicos predominam. As espécies de *Cinchona* são fonte de quinino e outros compostos de valor terapêutico (BOLZANI *et al.*, 2001; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2003).

As espécies de Rubioideae possuem antraquinonas como a principal classe de metabólitos secundários. Nesta subfamília estão os gêneros: *Psychotria*, que inclui várias espécies com substâncias de ação no SNC e muito usadas em rituais. *Cephaelis* da conhecida *C. ipecacuanha*, importante fonte de emetina e outros constituintes e *Palicourea* responsável por cerca da metade das mortes por intoxicação natural em bovinos no País. A intoxicação é atribuída ao ácido monofluoroacético, substância de alta toxidez para diversos mamíferos,

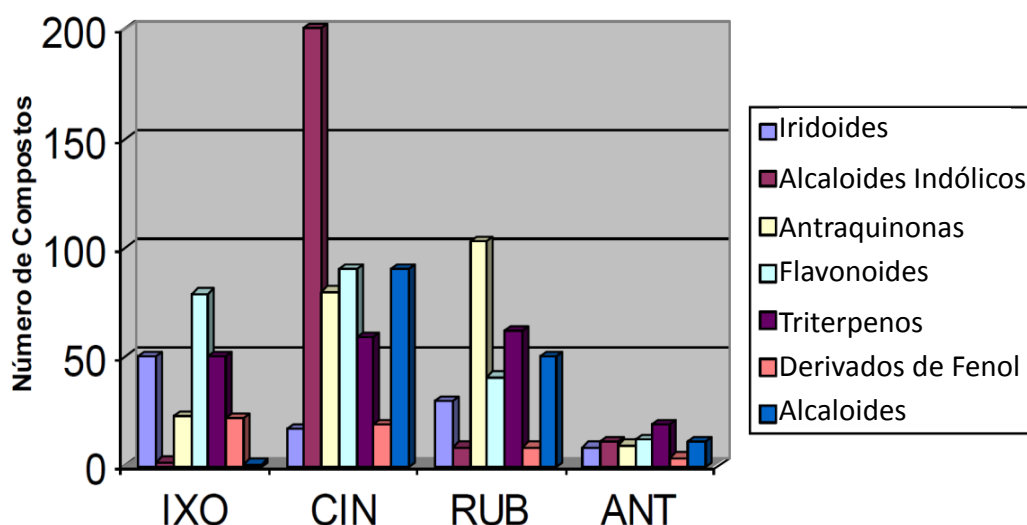
inclusive o homem. A utilização indiscriminada para fins medicamentosos de plantas do gênero *Palicourea* por grande parte da população, sem conhecimento ou preocupação com possíveis efeitos tóxicos, despertou o interesse químico e farmacológico de plantas deste gênero (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2003; DE-MORAES-MOREAU *et al.*, 1995).

Já na subfamília Antirheoideae não há a ocorrência de nenhum destes marcadores químicos, o que é consistente com a divisão proposta por Robbrecht, considerando somente as informações morfológicas (BOLZANI *et al.*, 2001).

Em um estudo quimiotaxonômico foi realizada uma triagem para iridoides glicosilados em várias espécies e baseado em dados obtidos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas pode-se concluir que estes metabólitos estão presentes em todas as subfamílias de Rubiaceae (INOUYE *et al.*, 1988).

Os Alcaloides indólicos ocorrem essencialmente nas famílias que pertencem à ordem Gentianales (Loganiaceae, Rubiaceae, Naucleaceae e Apocynaceae), onde são observados principalmente alcaloides indólicos monoterpênicos. A ocorrência de alcaloides indólicos fora da ordem Gentianales é bastante rara e, quando encontrados, são normalmente alcaloides indólicos simples (SCHRIPSEMA *et al.*, 2004).

Considerando o perfil químico da família Rubiaceae, existem muitas espécies sem qualquer estudo, o que impede que os taxonomistas realizem divisões na família e subfamília (BOLZANI *et al.*, 2001). Sendo assim, o conhecimento aprofundado da família Rubiaceae, de grande diversidade metabólica e pronunciado potencial farmacológico pode abrir perspectivas para a química, farmacologia e quimiotaxonomia desta família. Sendo estes estudos uma ferramenta importante para a classificação quimiotaxônômica das espécies dentro dos gêneros. A distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae está ilustrada na Figura 3.



**Figura 3:** Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae. IXO: Ixoroideae, CIN: Cinchonoideae, RUB: Rubioideae, ANT: Antirheoideae (BOLZANI *et al.*, 2001).

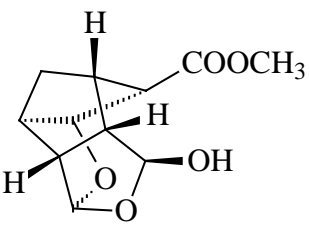
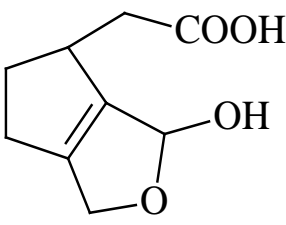
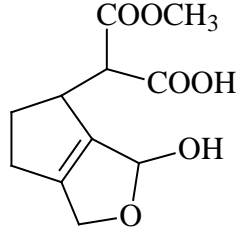
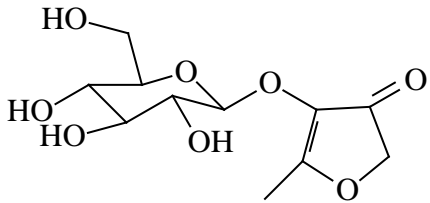
#### 2.1.4 Tribo Gardenieae

Dado aos poucos estudos encontrados para o gênero *Duroia* e considerando que a tribo é o clado intermediário entre a subfamília e gênero, realizou-se um levantamento bibliográfico das espécies estudadas que pertencem à tribo Gardenieae. Estudos morfológicos e moleculares relatam 40 gêneros pertencentes a esta tribo (ANDREASEN e BREMER, 1996; BREMER, 2009) os quais possuem distribuição pantropical e a maioria apresenta hábito arbóreo ou arbustivo (CHIQUIERI *et al.*, 2004). Segundo Robbrecht *et al.* (1996) os iridoides são considerados o principal marcador quimiotaxonômico desta tribo. Algumas das substâncias isoladas de espécies desta tribo estão descritas nas Tabelas de 2 a 18.

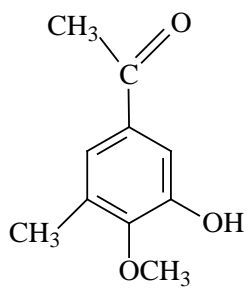
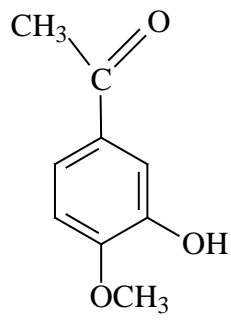
**Tabela 2:** Monoterpenos

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Genipa americana</i>	Genipacetal (22)	ONO <i>et al.</i> , 2006
	Ácido genípico (23)	TALLENT, 1964
	Ácido genipínico (24)	
<i>Psydrax livida</i>	Psidrina (25)	NAHRSTEDT <i>et al.</i> , 1995

continuação da Tabela 2.

<p>22</p> 	<p>23</p> 
<p>24</p> 	<p>25</p> 

**Tabela 3:** Ácidos fenólicos

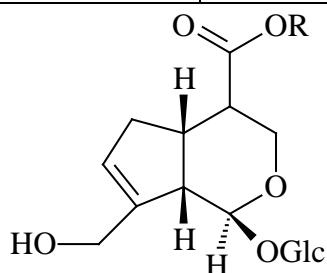
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<p><i>Lamprothamnus zanguebaricus</i></p>	<p>1-(3-Hidroxi-4-metoxi-5-metilfenil)-etanona (26)</p>	<p>KHAN <i>et al</i>, 2003</p>
	<p>1-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-etanona (27)</p>	
<p>26</p> 	<p>27</p> 	

**Tabela 4:** Iridoides

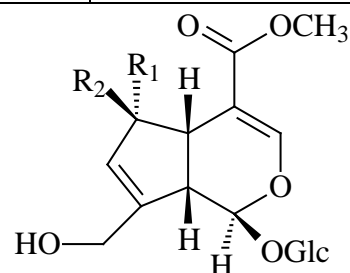
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<p><i>Alibertia sessilis</i></p>	<p>Ácido geniposídico (28)</p>	<p>SILVA <i>et al.</i>, 2007</p>
	<p>Geniposídeo (29)</p>	
	<p>6<math>\alpha</math>-Hidroxigeniposídeo (30)</p>	
	<p>6<math>\beta</math>-Hidroxigeniposídeo (31)</p>	
<p><i>Burchellia bubalina</i></p>	<p><math>\beta</math>-Gardiol (32)</p>	<p>DREWES <i>et al.</i>, 1999</p>
	<p><math>\alpha</math>-Gardiol (33)</p>	
	<p>Garjasmine (34)</p>	
<p><i>Canthium gilfillanii</i></p>	<p>Ácido geniposídico (28)</p>	<p>NAHRSTEDT <i>et al.</i>, 1995</p>

continuação da Tabela 4.

<i>Feretia apodanthera</i>	Gardenosídeo (35)	BAILLEUL <i>et al.</i> , 1980	
	Éster acetílico do ácido desacetil asperulosídico (36)		
<i>Gardenia jasminoides</i>	Genipina 1- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -isomaltoside (37)	CHEN <i>et al.</i> , 2009	
	Genipina 1,10-di- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranoside (38)		
	Genipina 1- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -gentiobioside (39)		
	Geniposídeo (29)	ENDO e TAGUCHI, 1973	
	Éster metílico escandoside (40)		
	Éster metílico do ácido deacetilasperulosídico (41)		
	Éster metílico do ácido 6- <i>O</i> -etildeacetilasperulosídico(42)		
	<i>Genipa americana</i>	Gardenosídeo (35)	FARID <i>et al.</i> , 2002
		Genipaol (43)	ONO <i>et al.</i> , 2007
Genipina (44)		TALLENT, 1964	
Tarenosídeo (45)			
Ácido geniposídico (28)			
Geniposídeo (29)			
Genamesídeo A (46)			
Genamesídeo B (47)			
<i>Genipa americana</i>	Genamesídeo C (48)	TALLENT, 1964	
	Genamesídeo D (49)		
	Genipina gentiobiosídeo (50)		
	Gardenosídeo (51)		
	Gardendiol (52)		
	Shanzhisídeo (53)		
<i>Rothmannia globosa</i>	$\alpha$ -Gardiol (33)	JENSEN, 1983	
	$\beta$ -Gardiol (32)		
<i>Tocoyena formosa</i>	$\alpha$ -Gardiol (33)	KARIKAS <i>et al.</i> 1987	
	$\beta$ -Gardiol (32)		
	Gardenosídeo (35)		

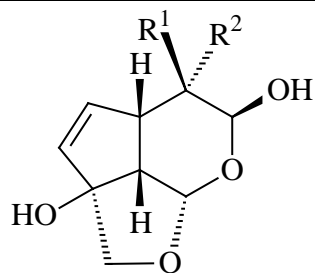


28 R=H  
29 R=CH<sub>3</sub>

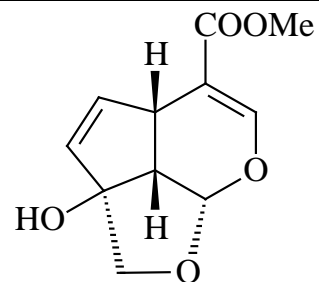


30 R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H  
31 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH

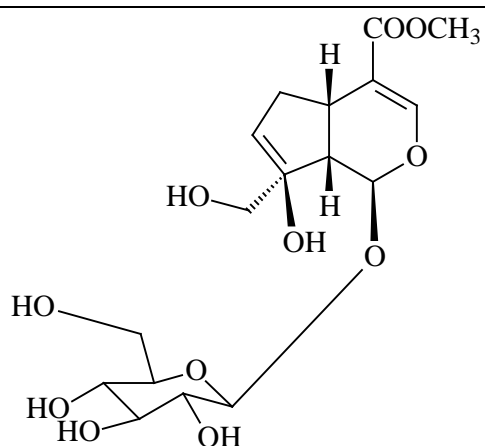
continuação da Tabela 4.



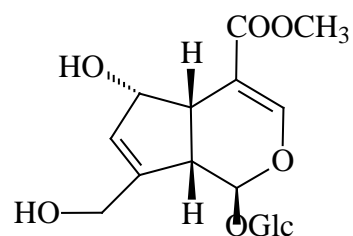
32:  $R_1=COOMe$ ,  $R_2=H$   
33:  $R_1=H$ ,  $R_2=COOMe$



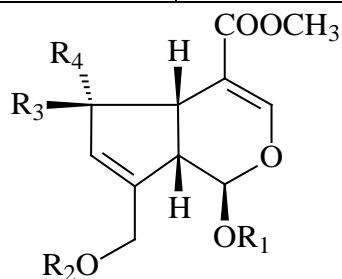
34



35



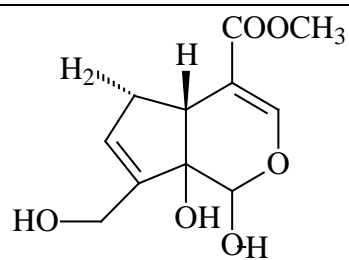
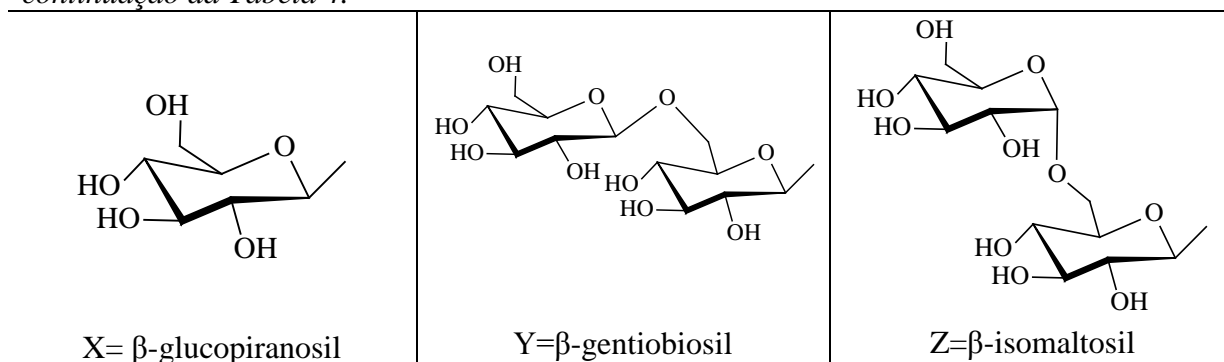
36



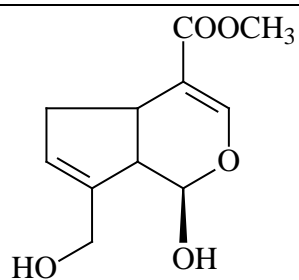
37:  $R_1=Z$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$   
37a:  $R_1=Z(Ac)_7$ ,  $R_2=Ac$ ,  $R_3=R_4=H$   
38:  $R_1=R_2=X$ ,  $R_3=R_4=H$   
38a:  $R_1=R_2=R_3=R_4=H$   
39:  $R_1=Y$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$   
40:  $R_1=X$ ,  $R_2=R_4=H$ ,  $R_3=OH$   
41:  $R_1=X$ ,  $R_2=R_3=H$ ,  $R_4=OH$   
42:  $R_1=X$ ,  $R_2=R_3=H$ ,  $R_4=OCH_3$



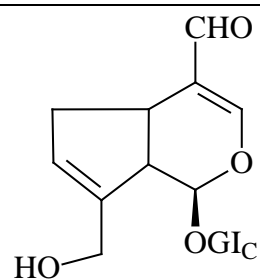
continuação da Tabela 4.



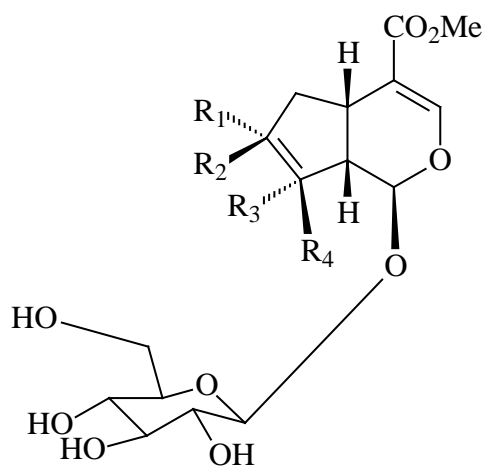
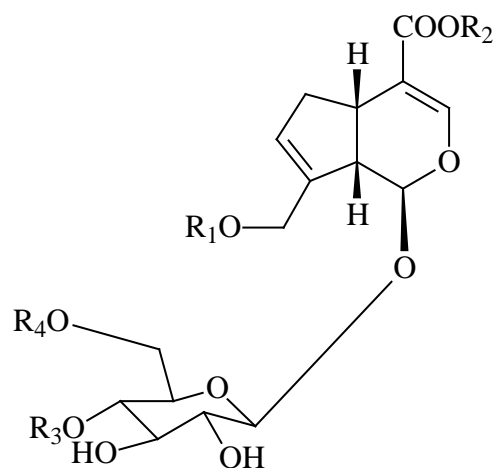
43



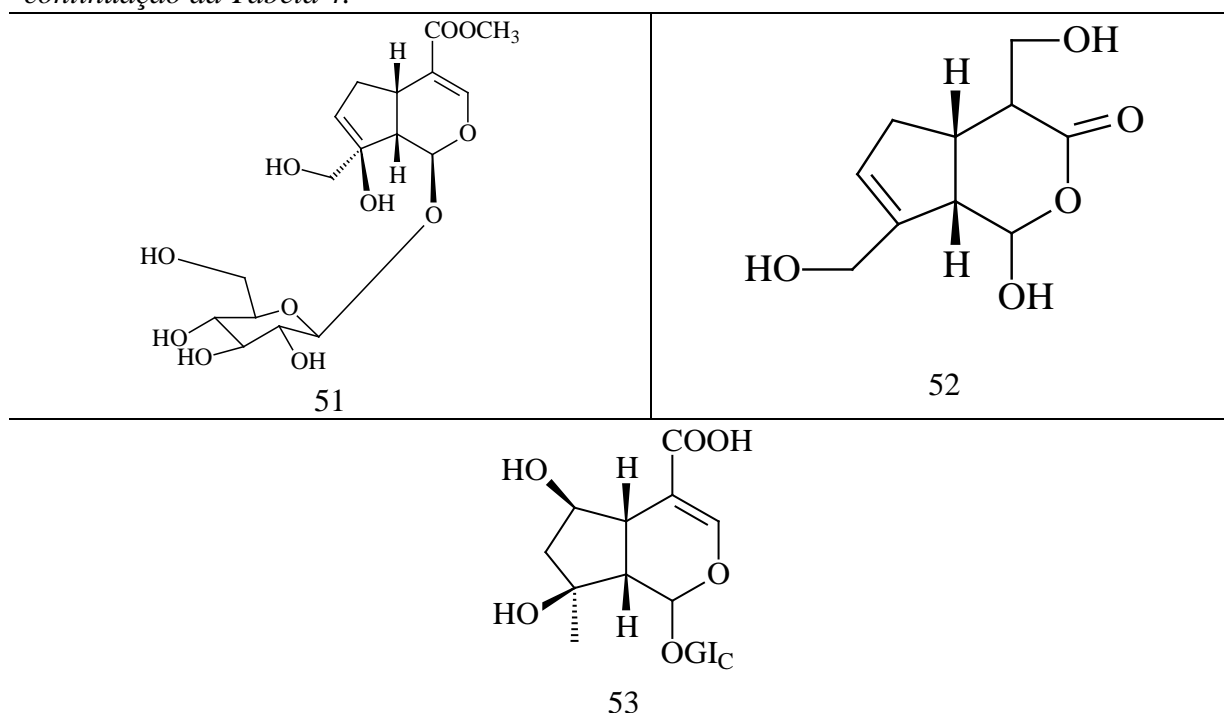
44



45

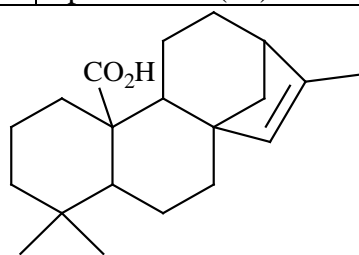
46:  $R_1=R_4=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=CH_2OH$ 47:  $R_1=H$ ,  $R_2=R_3=OH$ ,  $R_4=CH_2OH$ 48:  $R_1=R_4=H$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_3=Glc$ 49:  $R_1=Glc$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_3=R_4=H$ 50:  $R_1=R_3=H$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_4=Glc$

continuação da Tabela 4.



**Tabela 5:** Diterpeno

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Amaioua guianensis</i>	tipo caurano (54)	OLIVEIRA, 2009



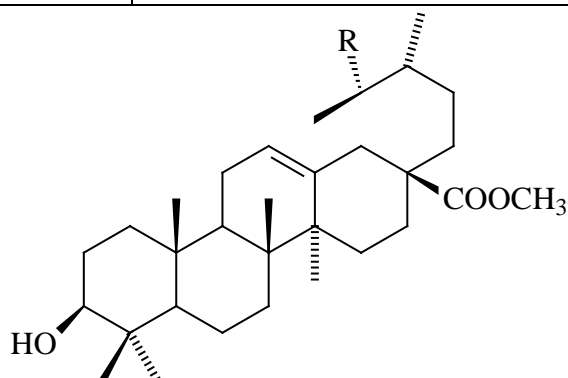
54

**Tabela 6:** Triterpenos

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Alibertia myrciifolia</i>	Éster metílico de ácido pomólico (55)	AHMAD, 1994
	Éster metílico do ácido ursólico (56)	
	Éster metílico do ácido oleanólico (57)	
<i>Amaioua guianensis</i>	3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 19 $\alpha$ , 23 tetrahydrolean-12-en-28-óico (58)	OLIVEIRA, 2009
	3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 19 $\alpha$ , 23 tetrahydrours-12-en-28-óico (59)	

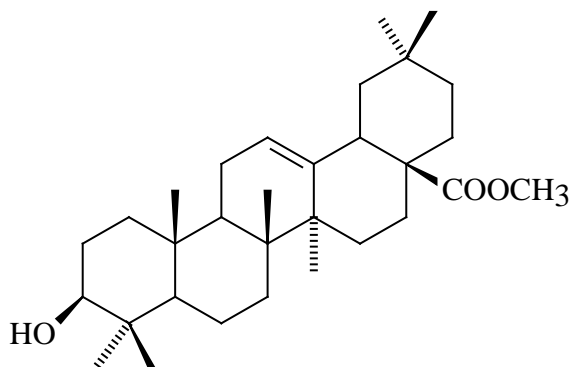
continuação da Tabela 6.

<i>Gardenia collinsae</i>	20R,24R-epoxy-3-oxo-dammarane-25ξ, 26-diol (60)	NUANYAI <i>et al.</i> , 2011
	Epímero do 60 no C-24 (61)	
	20R,24R-ocotillone (62)	
<i>Gardenia saxatilis</i>	Lupenona (63)	SUKSAMRARN <i>et al.</i> , 2003
	Lupeol (64)	
	Ácido betulinico (65)	
<i>Gardenia saxatilis</i>	Ácido (27- <i>O</i> -feruloilobetulinico) (66)	SUKSAMRARN <i>et al.</i> , 2003
	Ácido messagenico A (67)	
	Ácido messagenico B (68)	
	Ácido oleanólico (69)	
	Ácido ursólico (70)	
	Ácido uncarinico E (Ácido 27- <i>O</i> - <i>p</i> -( <i>E</i> )-coumaroiloxioleanólico) (71)	
	27- <i>O</i> - <i>p</i> -( <i>E</i> )- Ácido coumaroiloxiursólico (72)	
<i>Oxyanthus pallidus</i>	Ácido oleanólico (60)	TIGOUFACK <i>et al.</i> , 2010



55: R=OH

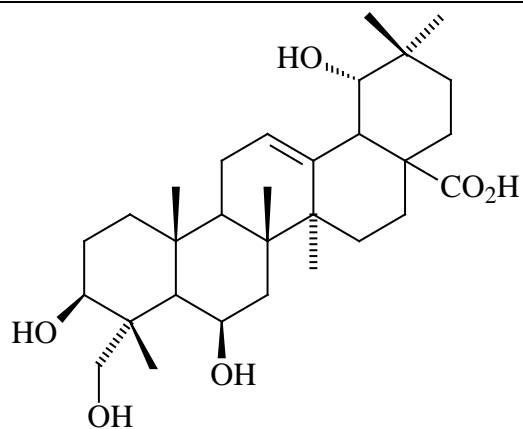
56: R=H



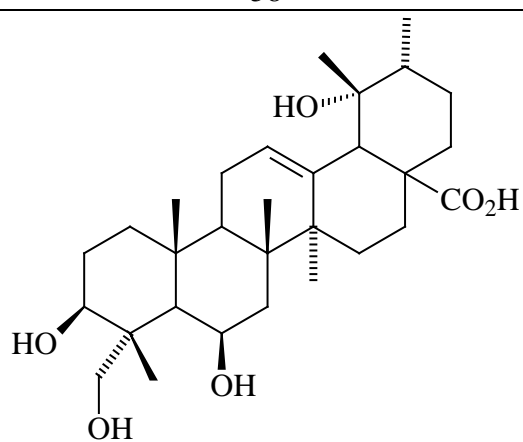
57

continuação da Tabela 6.

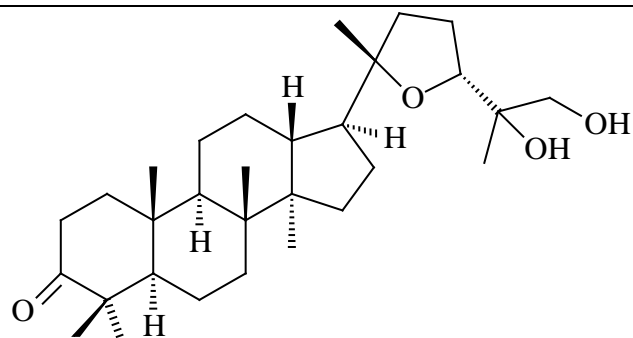
---

58

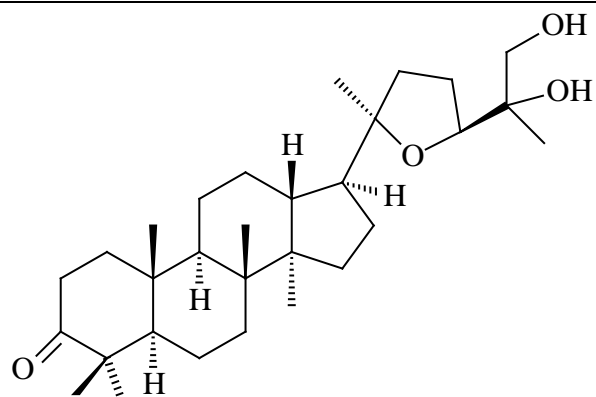
---

59

---

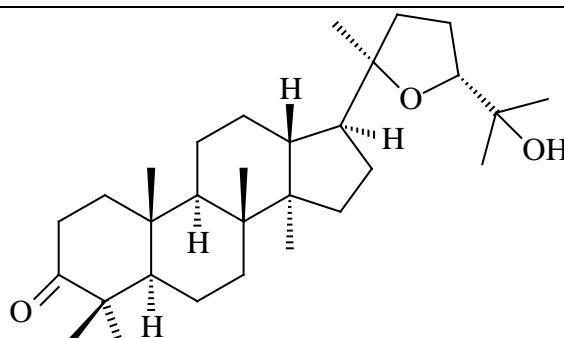
60

---

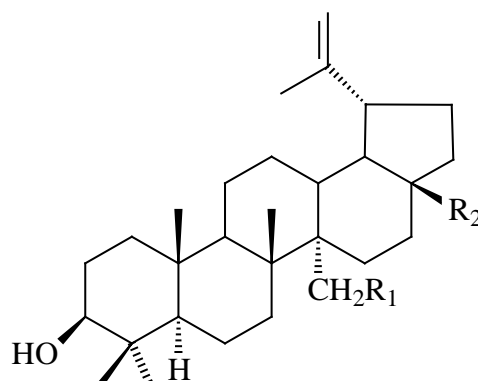
61

---

continuação da Tabela 6.



62



63: C-3 dideidro análogo de 64

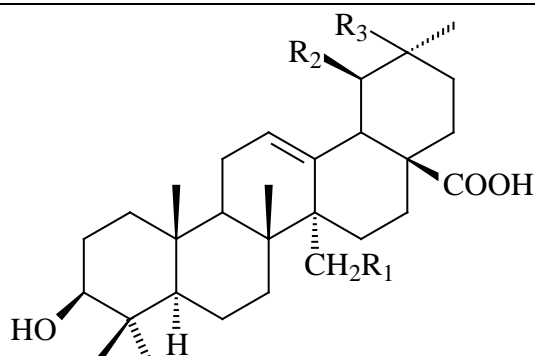
64:  $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$

65:  $R_1=H$ ,  $R_2=COOH$

66:  $R_1=A$ ,  $R_2=COOH$

67:  $R_1=B$ ,  $R_2=COOH$

68:  $R_1=C$ ,  $R_2=COOH$



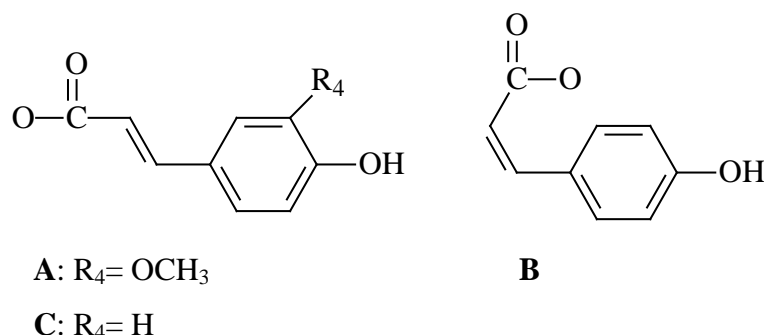
69:  $R_1=R_2=H$ ,  $R_3=CH_3$

70:  $R_1=R_3=H$ ,  $R_2=CH_3$

71:  $R_1=C$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=CH_3$

72:  $R_1=C$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_3=H$

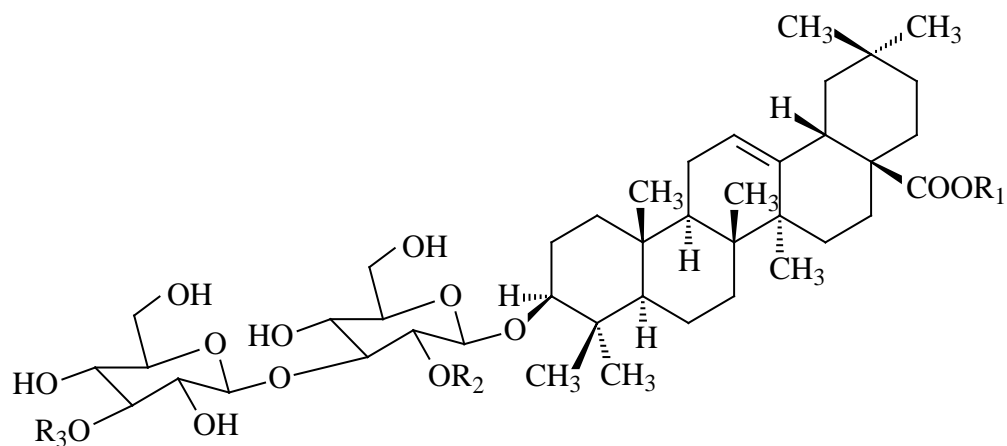
continuação da Tabela 6.



**Tabela 7:** Saponinas

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Catunaregam nilotica</i>	Oleanolate 28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -Glucopiranosil-3- <i>O</i> { <i>O</i> -α- <i>L</i> -ramnopiranosil-(1→3)- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosil}-(1→3)]-β- <i>D</i> -glucopiranosil} (73)	LEMMICH <i>et al.</i> , 1995
	Ácido oleanólico 3- <i>O</i> -[2',3'-di- <i>O</i> -(β- <i>D</i> -glucopiranosil)-β- <i>D</i> -glucopiranosil] (74)	
	ácido oleanólico 3- <i>O</i> -{ <i>O</i> -α- <i>L</i> -ramnopiranosil-(1→3)- <i>O</i> -[ <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosil-(1→3)]-β- <i>D</i> -glucopiranosil} (75)	
	ácido oleanólico 3- <i>O</i> -[ <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosil-(1→3)]-β- <i>D</i> -glucopiranosil] (76)	
	Ácido 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosídeo-quinóvico (77)	
	Ácido 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -quinovopiranosídeo-cinchólico (78)	
	<i>Catunaregam spinosa</i>	
Catunarosídeo B (80)		
Catunarosídeo C (81)		
Catunarosídeo D (82)		
Swartziatríosídeo (83)		
Aralia-saponina V (84)		
Aralia-saponina IV (85)		
<i>Tocoyena brasiliensis</i>	Ácido 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -quinovopiranosídeo-quinóvico (86)	AQUINO <i>et al.</i> , 1988
<i>Tocoyena brasiliensis</i>	Ácido 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -quinovopiranosídeo-cinchólico (78)	HAMERSKI <i>et al.</i> , 2005
	Ácido 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> glucopiranosídeo-quinóvico (87)	YÉPES <i>et al.</i> , 1991
	Ácido 28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosídeo-quinóvico (88)	SOUSA <i>et al.</i> , 1984

continuação da Tabela 7

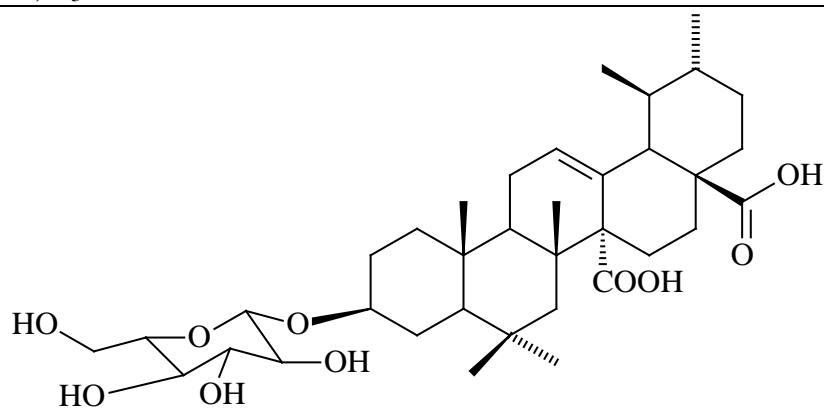


73:  $R_1 = \beta\text{-D-Gluc}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \alpha\text{-L-Rap}$

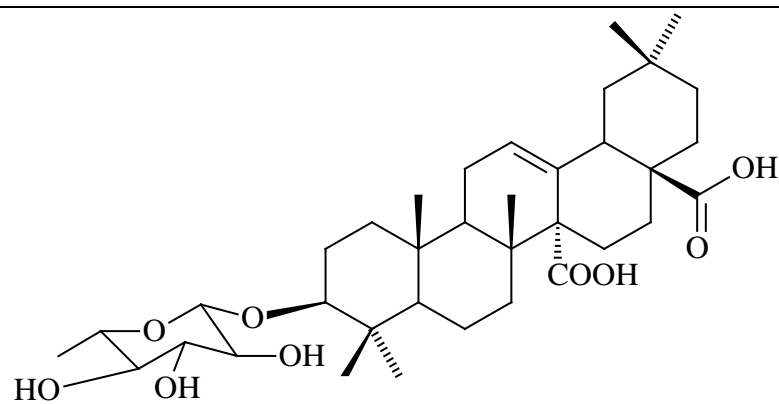
74:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \beta\text{-D-Gluc}$ ,  $R_3 = \text{H}$

75:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \alpha\text{-L-Rap}$

76:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$

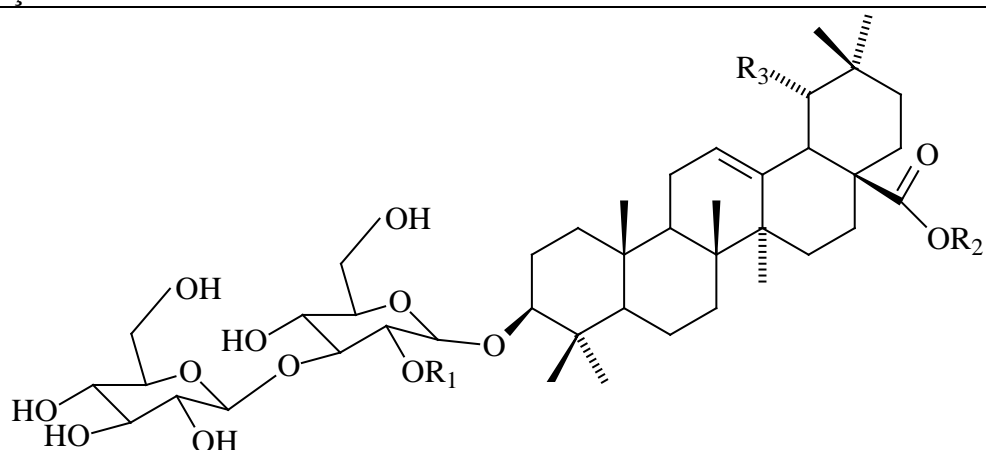


77



78

continuação da Tabela 7



79: R<sub>1</sub>=β-*D*-Xil, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH

80: R<sub>1</sub>=α-*L*-Rap, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H

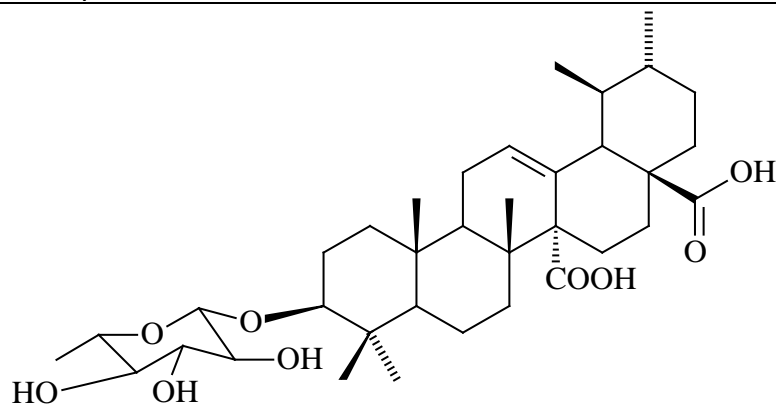
81: R<sub>1</sub>=α-*L*-Rap, R<sub>2</sub>=β-*D*-Glc, R<sub>3</sub>=OH

82: R<sub>1</sub>=β-*D*-Xil, R<sub>2</sub>=β-*D*-Glc, R<sub>3</sub>=OH

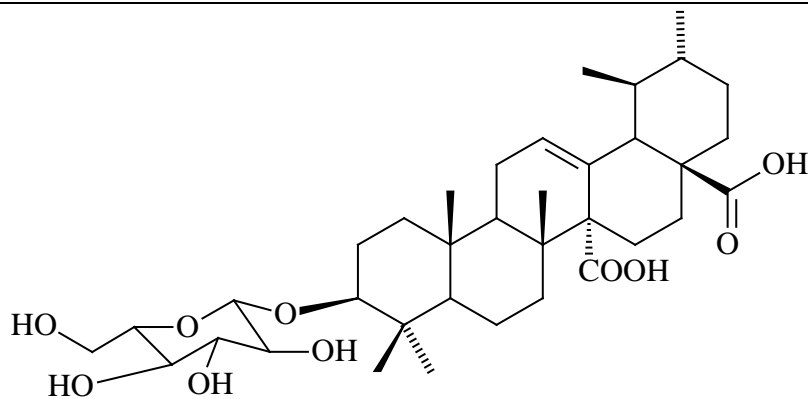
83: R<sub>1</sub>=β-*D*-Xil, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H

84: R<sub>1</sub>=β-*D*-Glc, R<sub>2</sub>=β-*D*-Glc, R<sub>3</sub>=H

85: R<sub>1</sub>=β-*D*-Xil, R<sub>2</sub>=β-*D*-Glc, R<sub>3</sub>=H



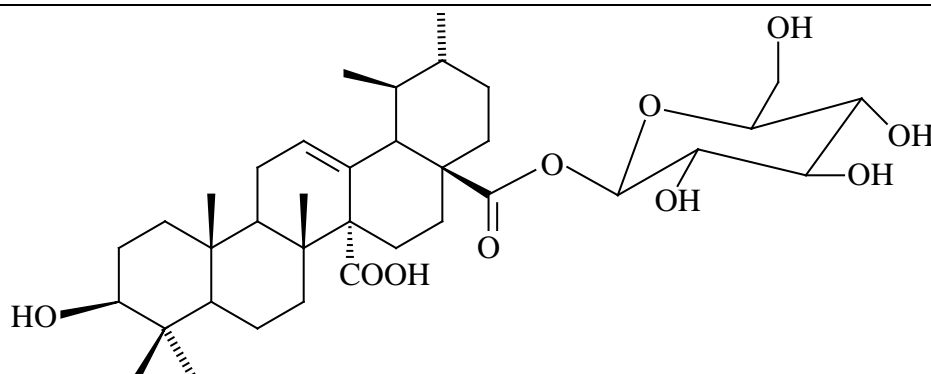
86



87



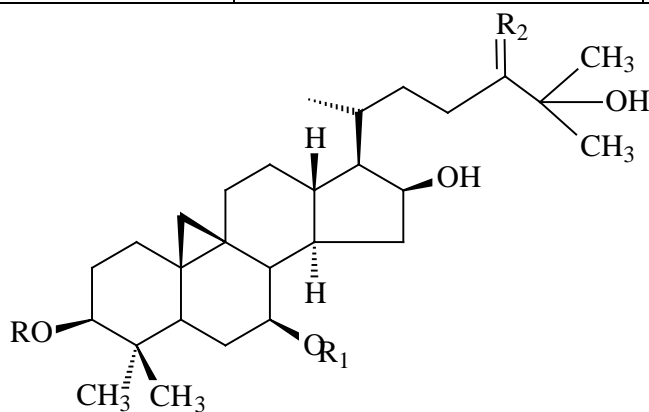
continuação da Tabela 7



88

**Tabela 8:** Triterpenos cicloartano

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Oxyanthus pallidus</i>	Palidioside A (89)	TIGOUFACK <i>et al.</i> , 2010
	Palidioside B (90)	
	Palidioside C (91)	



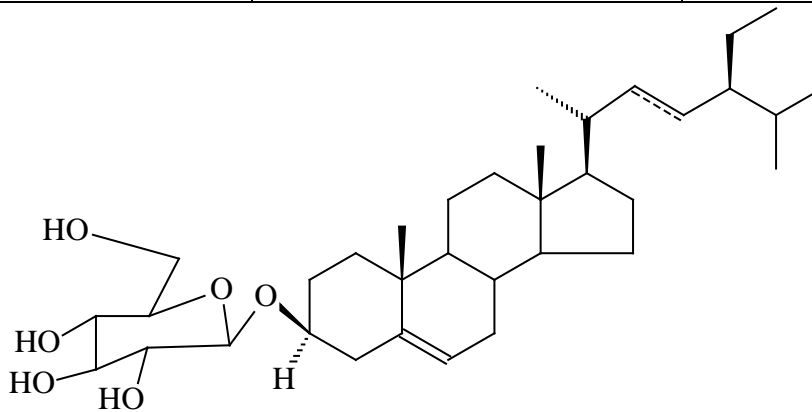
89: R=H, R<sub>1</sub>=Glc, R<sub>2</sub>=O

90: R=H, R<sub>1</sub>=Glc, R<sub>2</sub>=H/  $\alpha$ -OH

91: R=H, R<sub>1</sub>=Glc, R<sub>2</sub>=H/ $\beta$ -OH

**Tabela 9:** Esteróide glicosilado

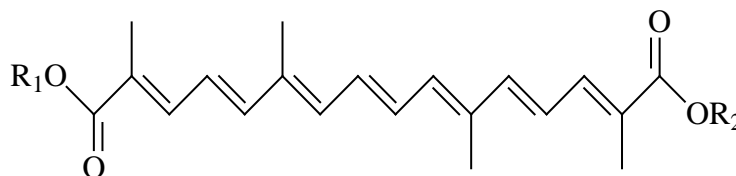
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Oxyanthus pallidus</i>	3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicopiranosil sitosterol (92)	TIGOUFACK <i>et al.</i> , 2010



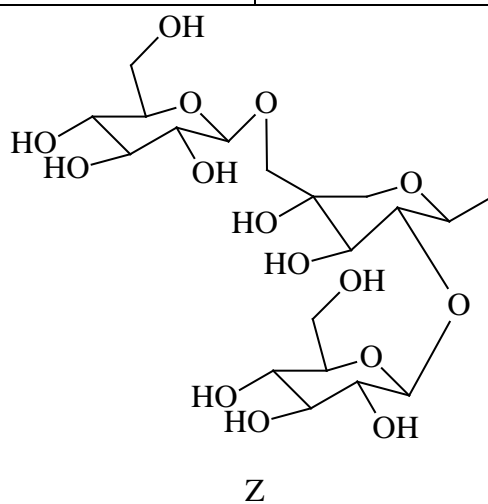
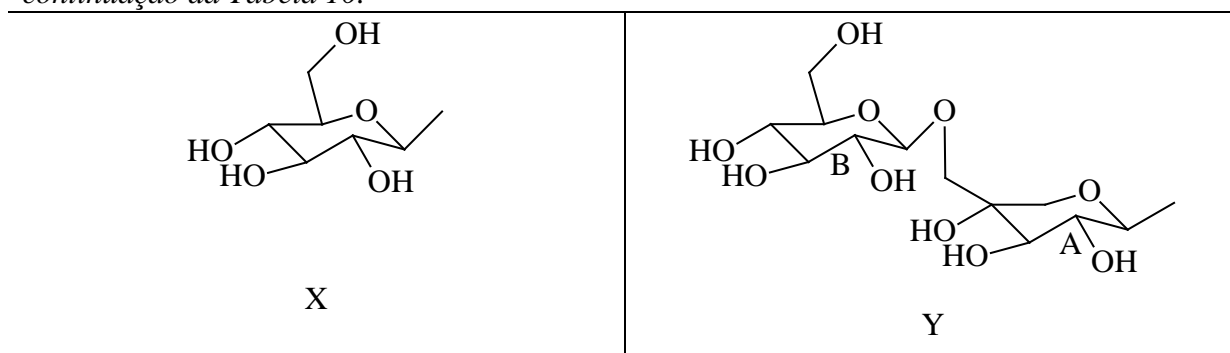
92

**Tabela 10:** Carotenoides

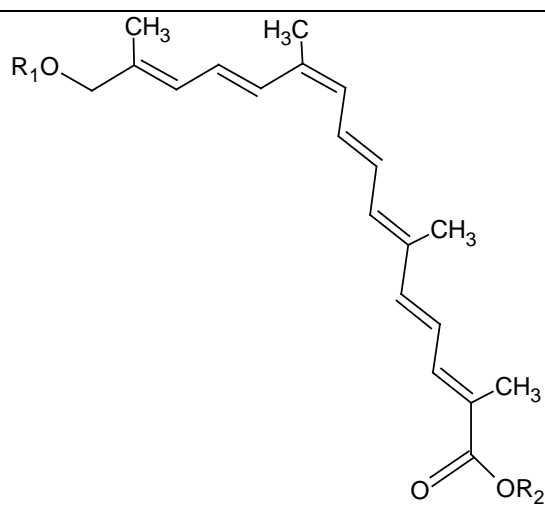
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Gardenia jasminoides</i>	Crocetina (93)	PFISTER <i>et al.</i> , 1996
	Éster crocetina mono (β- <i>D</i> -glucosil) (94)	
	Éster crocetina di (β- <i>D</i> -glucosil) (95)	
	Éster crocetina mono (β-gentiobiosil) (96)	
	Éster crocetina (β- <i>D</i> -glucosil)-(β-gentiobiosil) (97)	
	Éster crocina [crocetina-di- (β- gentiobiosil)] (98)	
	Éster crocetina (β-gentiobiosil)-(β-neapolitanosil) (99)	
	Éster crocetina-di (β-neapolitanosil) (100)	
	13 <i>Z</i> -crocina (101)	SPERANZA <i>et al.</i> , 1984



continuação da Tabela 10.



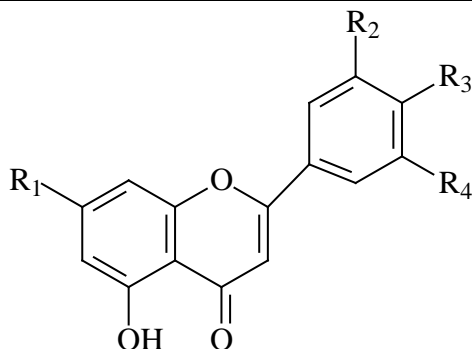
- 93:  $R_1=R_2=H$   
 94:  $R_1=H, R_2=X$   
 95:  $R_1=R_2=X$   
 96:  $R_1=H, R_2=Y$   
 97:  $R_1=X, R_2=Y$   
 98:  $R_1=R_2=Y$   
 99:  $R_1=Y, R_2=Z$   
 100:  $R_1=R_2=Z$



- 101:  $R_1=R_2=Y$

**Tabela 11:** Flavonoides

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Alibertia myrciifolia</i>	Corimbosina (102)	ZANI <i>et al.</i> , 1995
	Letedocina (103)	
	Apometzgerina (104)	ROFI e POMILIO, 1985
	Acacetina (105)	AGRAWAL e BANSAL, 1989
	Apigenina (106)	
<i>Tocoyena brasiliensis</i>	Ramanzina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (107)	AGRAWAL e BANSAL, 1989



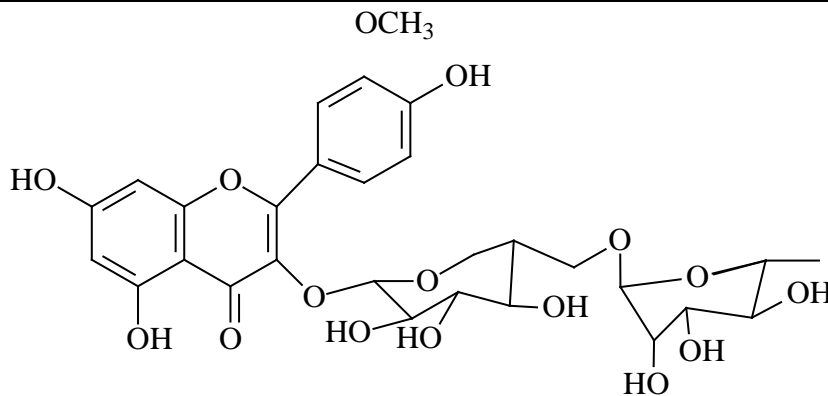
102:  $R_1=R_2=R_3=R_4=OCH_3$

103:  $R_1=R_2=R_3=OCH_3$ ;  $R_4=OH$

104:  $R_1=R_4=OH$ ;  $R_2=R_3=OCH_3$

105:  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_4=H$ ;  $R_3=OCH_3$

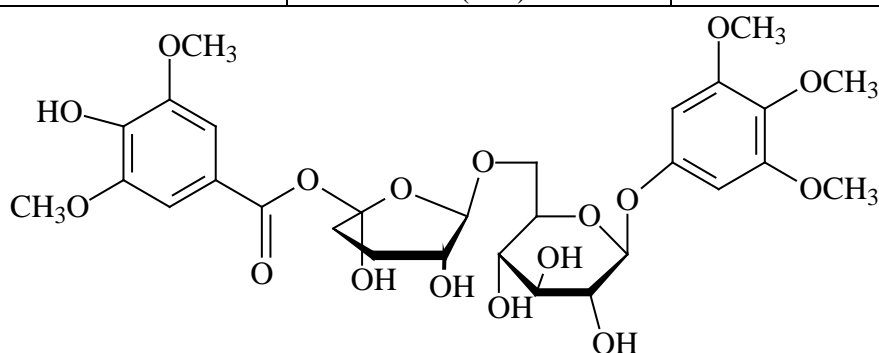
106:  $R_1=R_3=OH$ ;  $R_2=R_4=H$



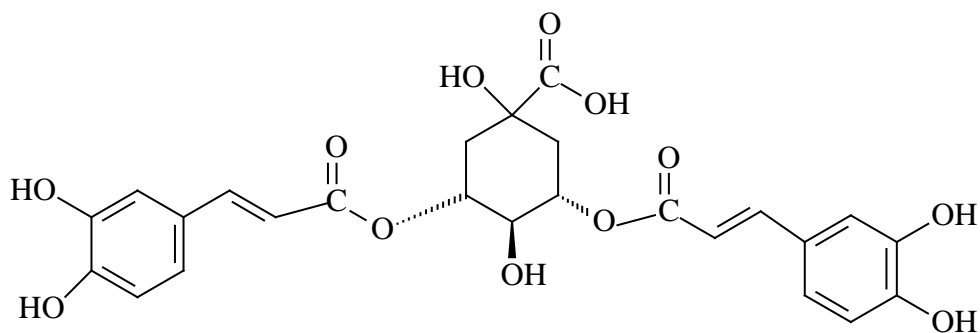
107

Tabela 12: Derivados fenólicos

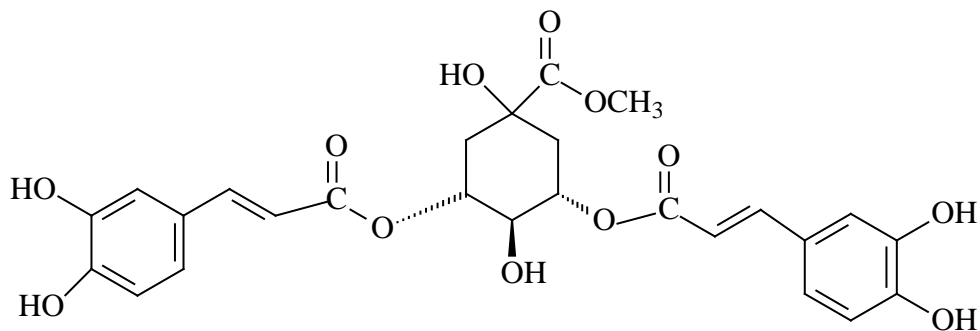
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Alibertia sessilis</i>	3,4,5-trimetoxifenil-1- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -(5- <i>O</i> siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ - <i>D</i> -glicopiranosideo (108)	SILVA <i>et al.</i> , 2007
<i>Amaioua guianensis</i>	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (109)	OLIVEIRA, 2009
	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquinato-de metila (110)	
<i>Oxyanthus speciosus</i> subsp. <i>gerrardii</i>	2-(2-hidroxi)-etanol- $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosideo (111)	NAHRSTEDT <i>et al.</i> , 1995
<i>Psydrax lívida</i>	Psidrosideo (112)	



108

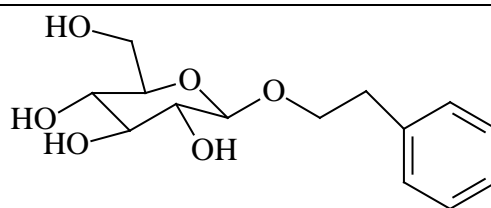


109

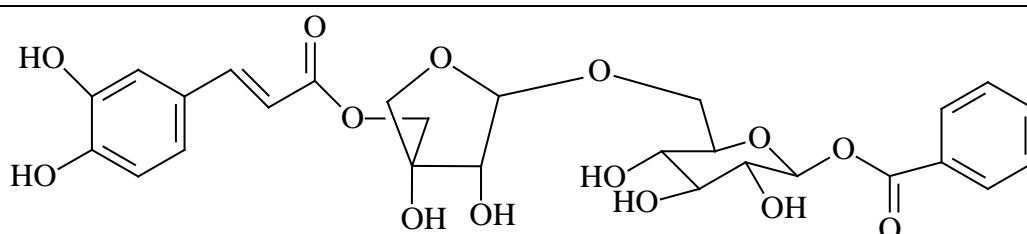


110

continuação da Tabela 12.



111

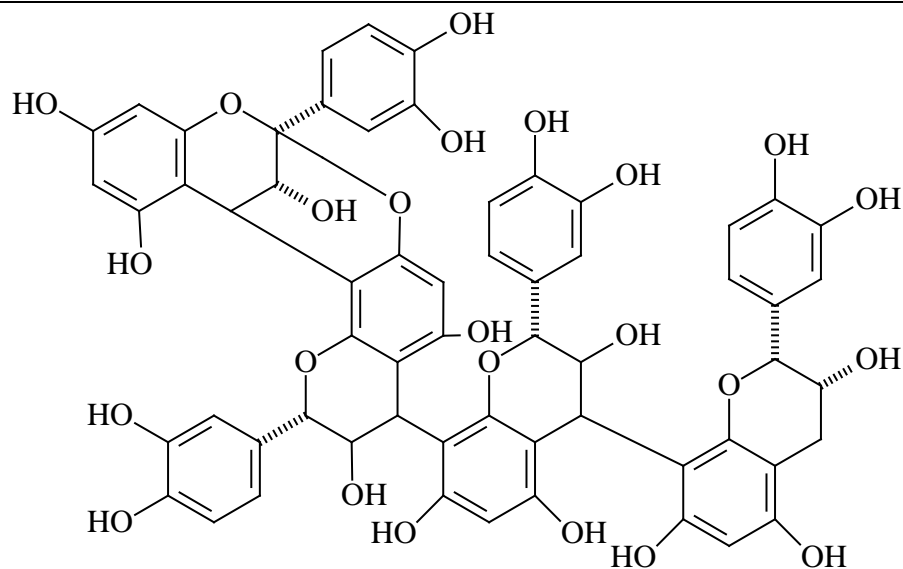


112

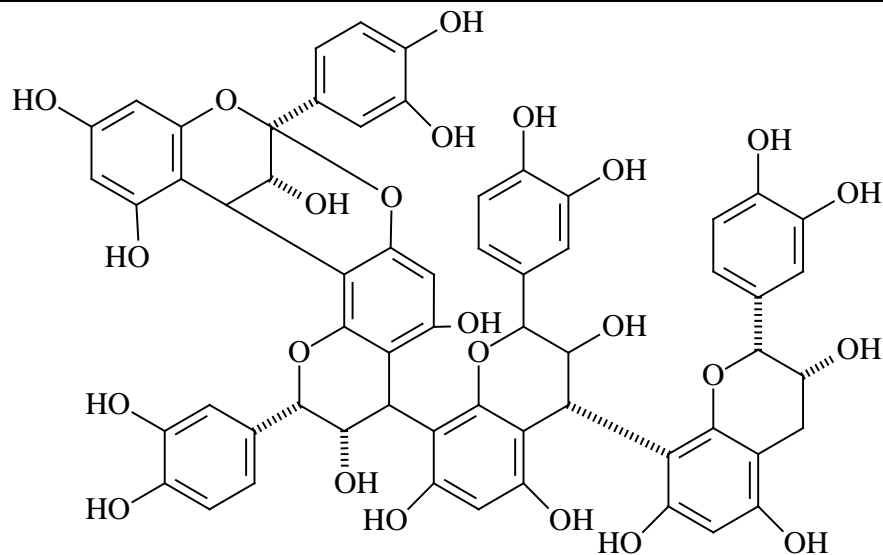
**Tabela 13:** Proantocianidinas

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Pavetta owariensis</i>	epicatequin-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-ent-epicatequin-(4 $\alpha$ →8,2 $\alpha$ →O→7)-ent-catequina (113)	BALDE <i>et al.</i> , 1991
	epicatequin-(4 $\beta$ →6)-epicatequin-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-epicatequin-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (114)	
<i>Pavetta owariensis</i>	epiafzelequin-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-epicatequin-(4 $\beta$ →8)-epicatequin-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (115)	BALDE <i>et al.</i> , 1991
	epiafzelequin-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-ent-afzelequin-(4 $\alpha$ →8)-ent-epicatequin-(4 $\alpha$ →8,2 $\alpha$ →O→7)-ent-catequina (116)	
	epiafzelequin-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-ent-catequin-(4 $\alpha$ →8)-ent-epicatequin-(4 $\alpha$ →8,2 $\beta$ →O→7)-ent-catequina (117)	

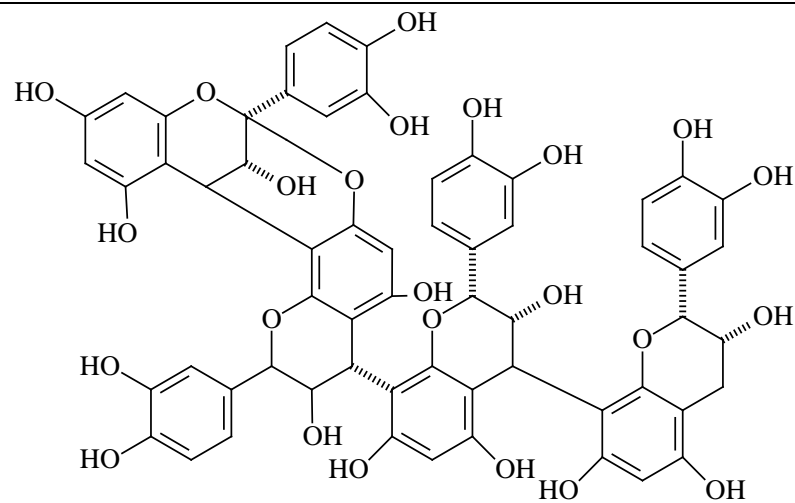
continuação da Tabela 13.



113

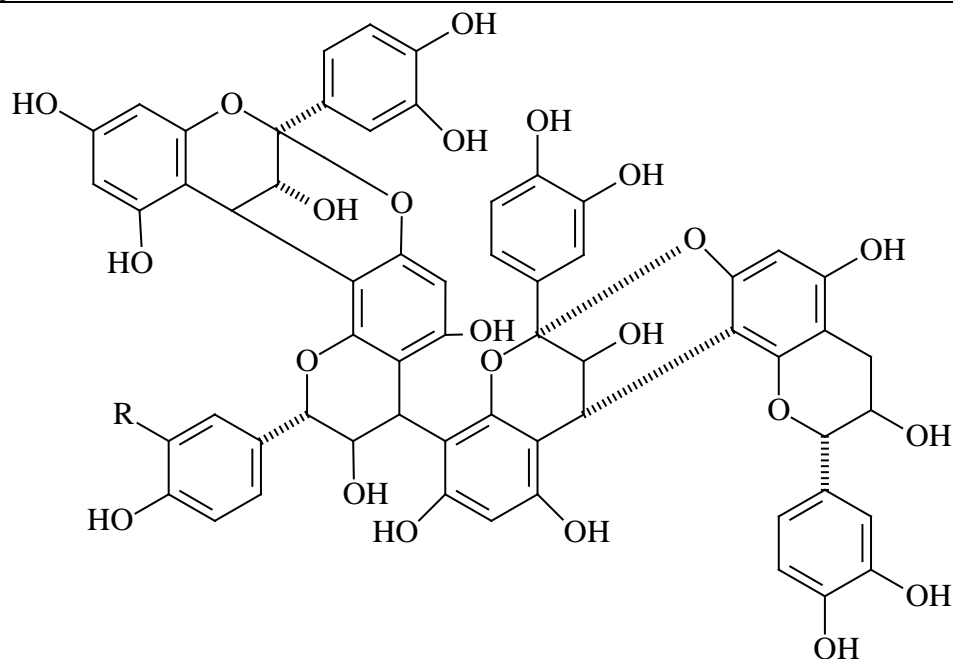


114



115

continuação da Tabela 13.



116: R=H

117: R=OH

**Tabela 14:** Lignanas glicosiladas

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Alibertia sessilis</i>	(+)-lioniresinol-3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (118)	SILVA <i>et al.</i> , 2007
	(-)-lioniresinol-3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (119)	
	<p style="text-align: center;">118</p>	<p style="text-align: center;">119</p>



Tabela 15: Cumarinas

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Alibertia myrciifolia</i>	Escopoletina (120)	SILVA <i>et al.</i> , 2004
<i>Amaioua guianensis</i>	Escoparona (121)	OLIVEIRA, 2009

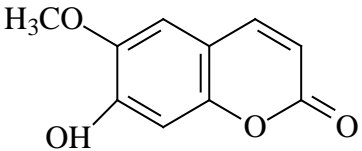
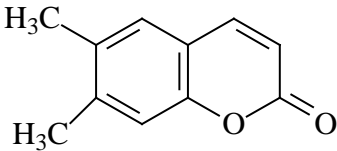
 <p>120</p>	 <p>121</p>
--	---

Tabela 16: Glicosídeos cianogênicos

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Oxyanthus pyriformis</i> subsp. <i>pyriformis</i>	Prunasina (122)	ROCKENBACH <i>et al.</i> , 1992
	Amigdalina (123)	
<i>O. speciosus</i> subsp. <i>gerrardii</i>	Holocalina (124)	

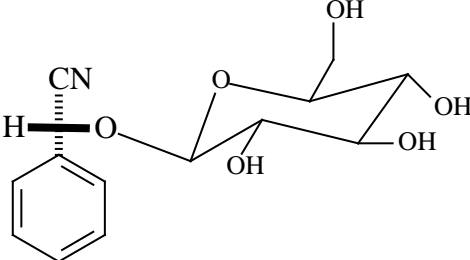
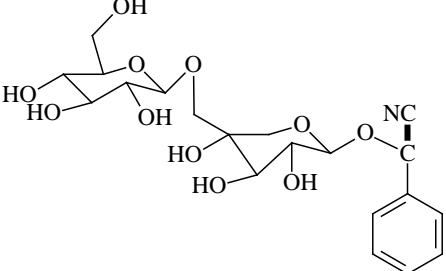
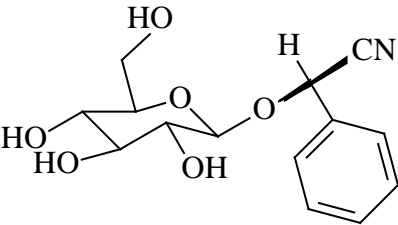
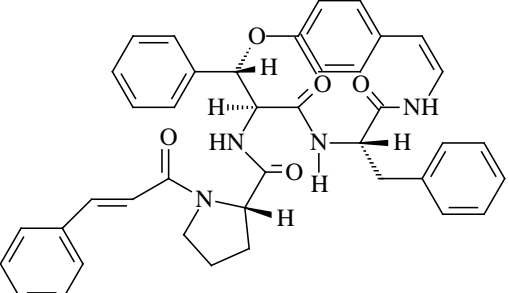
 <p>122</p>	 <p>123</p>
 <p>124</p>	

Tabela 17: Alcaloide

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Amaioua guianensis</i>	Amaiouina (125)	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009

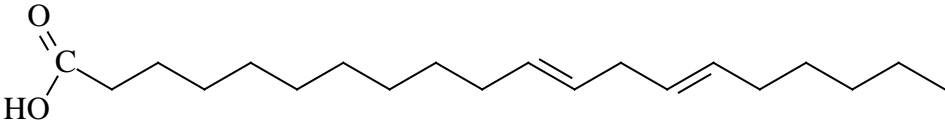
  

 <p>125</p>
---

**Tabela 18:** Ácidos graxos

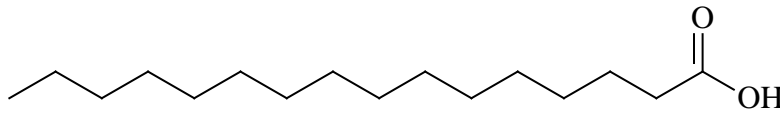
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Catunaregam spinosa</i>	Ácido 11, 14-eicosadienoico (126)	ZENG <i>et al.</i> , 2005
	Ácido palmítico (127)	
	Ácido esteárico (128)	
	Ácido mirístico (129)	



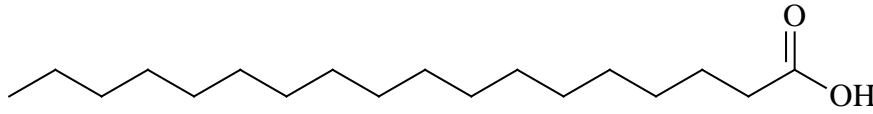
126

---



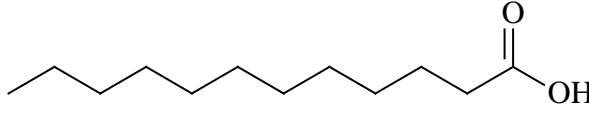
127

---



128

---



129

### 2.1.5 Características do gênero *Duroia*

*Duroia* apresenta cerca de 30 espécies neotropicais, sendo uma localizada na Costa Rica e as demais na América do Sul (TAYLOR *et al.* 2004). Estudos moleculares de filogenia verificaram que este gênero é muito próximo ao *Amaioua*, tornando difícil a diferenciação entre eles (BREMER, 2009). Porém, flores pistiladas e frutos solitários são características exclusivas a *Duroia* (TAYLOR e CAMPOS, 2007). Geralmente são árvores, arvoretas ou arbustos. Ramos quadrangulares ou cilíndricos, frequentemente fistulosos, glabros ou pilosos. Estípulas unidas num capuz cônico sobre a gema terminal, decíduas, seríceas ou pilosas. Folhas opostas ou verticiladas, decussadas, sésseis ou pecioladas, às vezes dotadas de protuberâncias basais cuja presença está associada com a presença de formigas. Inflorescências estaminadas terminais, cimosas, fasciculadas ou capitadas. Frutos bacáceos, bem desenvolvidos, ovoides ou oblongos, coriáceos ou lenhosos, geralmente pardos; sementes numerosas, comprimidas ou suborbiculares, envolvidas numa polpa gelatinosa

(TAYLOR e CAMPOS, 2007). A posição taxonômica deste gênero está elucidada na Figura 1 (pág. 3).

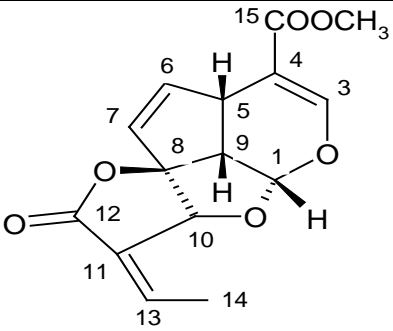
São comuns as associações com formigas, a maioria ocorrendo em ramos ociosos, os quais servem de abrigo para as várias espécies de formigas que os utilizam. Em alguns casos, as formigas constroem ninhos em várias partes externas da planta, como ramos, folhas, e até mesmo frutos (RIBEIRO *et al.*, 1999). Como é o caso da simbiose existente entre *Duroia hirsuta* e a formiga *Mymelachista schumanni* (FREDERICKSON, 2005). Enquanto a formiga vive no interior do caule da planta, se beneficiando do abrigo que esta lhe confere, *D. hirsuta* é beneficiada pelo ácido fórmico sintetizado pela *M. schumanni* como um herbicida natural, impedindo que outras plantas cresçam ao seu redor, assim, eliminando as espécies competitivas. Os cientistas imaginavam que as árvores de *D. hirsuta* secretavam alguma substância que mataria outras plantas (alelopatia), mas descobriram que é o primeiro caso em que o ácido fórmico é empregado pelos insetos como herbicida. Isso, no entanto, não exclui a possibilidade da ocorrência simultânea da alelopatia (FREDERICKSON *et al.*, 2005).

Poucos estudos têm sido encontrados na literatura para *Duroia*. Dentre as poucas espécies estudadas está *D. hirsuta* que é utilizada pela população como cicatrizante e apresentou atividade antibacteriana *in vitro* (LOPEZ *et al.*, 2001), atividade antivirótica contra HSV (*Herpes simplex virus*) (KHAN *et al.*, 2005). E do extrato de suas folhas foram isolados flavona, iridoide lactona e um flavonol (AQUINO *et al.*, 1999) e um iridoide tetracíclico (PAGE *et al.*, 1994), mostrados na Tabela 19. Porém um grande número de espécies ainda permanece sem qualquer estudo químico e/ou biológico.

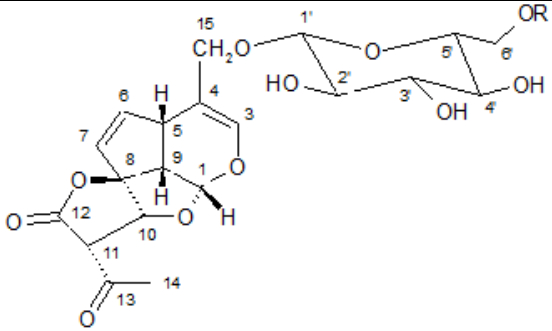
**Tabela 19:** Substâncias relatadas para espécies do gênero em estudo.

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referência</i>
<i>Duroia hirsuta</i>	Duroina (130), éteres flavonol-3- <i>O</i> -metil (131 e 132), novo flavonol (133)	AQUINO <i>et al.</i> , 1999;
	Plumericina (134)	PAGE <i>et al.</i> , 1994

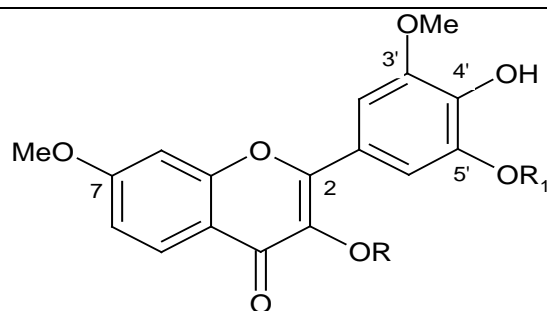


Plumericina 134



Duroina 130

continuação da Tabela 19.



(131) R = R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, éter flavonol-3-*O*-metil

(132) R = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = H, éter flavonol-3-*O*-metil

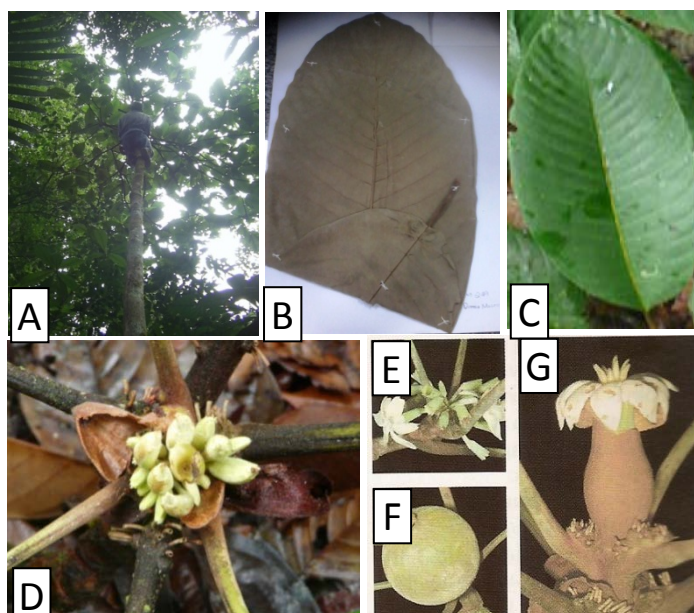
(133) R = H, R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> flavonol

### 2.1.6 A espécie *Duroia macrophylla* Huber

É conhecida popularmente como cabeça-de-urubú, apuruí ou puruí-grande-da-mata e sua sinonímia é *Coupou brasiliensis* Wernham (TAYLOR e CAMPOS, 2007; The plant list, 2013). É uma árvore de subdossel, variando de 15–20 m de altura e 12–25 cm diâmetro. Tronco circular, base às vezes acanalada, digitada. Ritidoma marrom a marrom avermelhado, levemente fissurado, escamoso; exterior da casca marrom ou bege; casca internamente marrom, alaranjada ou rosada; odor forte. Os ramos são quadrangulares, espessos, fistulosos, ferrugíneo-hirsutos. Folhas ternadas, longamente pecioladas; pecíolo 5– 8,5 cm compr.; lâmina ovada a lanceolada, 30–40 × 14–24 cm, coriácea, ápice acuminado, base obtusa, face adaxial glabra exceto as nervuras seríceas, face abaxial com as nervuras tomentosas; nervuras laterais 18–21 pares, impressas na face adaxial. Flores estaminadas pediceladas e corola creme. Bagas solitárias, sésseis e ferrugíneo-tomentosas; sementes orbiculares, comprimidas e pubescentes (TAYLOR e CAMPOS, 2007). A Figura 4 ilustra detalhes da espécie como seu aspecto geral, folhas, detalhe da estípula, inflorescência e frutos.

É uma espécie endêmica da Amazônia, ocorrendo especialmente na porção centro-sul, no Peru, Venezuela e Brasil. Habita tanto a mata virgem de terra firme como a campinarana, como planta de sub-bosque, sendo rara e pouco conhecida. Segundo Campos e Brito (1999), esta espécie ocorre nas florestas de baixio, vertente e platô e floresce em novembro a dezembro e frutifica de janeiro a junho. É uma frutífera tipicamente silvestre, não cultivada, de valor em situações de sobrevivência na floresta. A polpa dos frutos é acidulada, bastante agradável, lembrando o tamarindo. Os registros de herbário indicam frutificação nos meses de outubro a fevereiro (CAVALCANTE, 1996; BAZE *et al.*, 2003).

Desta espécie foram isolados alcaloides indólicos, sendo um deles inédito na literatura (NUNEZ *et al.*, 2009, 2012), dentre estes alcaloides, o de caráter inédito apresentou alta atividade antitumoral e baixa toxicidade em células saudáveis, devido a este potencial químico-biológico da espécie em estudo, foi depositada a patente: "novo alcaloide antitumoral de *Duroia macrophylla*" (NUNEZ e VASCONCELOS, 2012). Até o momento, não foi encontrado nenhum estudo químico e nem de atividade biológica de *Duroia macrophylla* na literatura consultada, salvo estes, realizados pelo grupo de pesquisa. Com base nestas informações e devido à escassez de estudos sobre o gênero *Duroia*, este trabalho propõe o estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla*.



**Figura 4:** Imagens da espécie *D. macrophylla*. (A) aspecto geral da árvore, (B) exsicata, (C) folha, (D) detalhe da estípula, (E) inflorescência, (F) frutos (G) flor. **Fonte:** RIBEIRO *et al.* (1999)<sup>E,F,G</sup>; FOTOS: MARTINS, D<sup>A, B, C, D</sup>.

### 2.1.7 Atividades Química e Biológica

Mesmo com o desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, muitos fármacos continuaram sendo obtidos a partir de fontes vegetais, seja pela dificuldade de se obter moléculas com a mesma estereoquímica, como pela inviabilidade econômica de produzi-los sinteticamente (GUERRA e NODARI, 2003; SCHENKEL *et al.*, 2003).

Devido a esta busca por novos fármacos, os produtos naturais destacam-se pela diversidade estrutural e, assim, as plantas são candidatas importantes para *screening* de novos

compostos bioativos. Ao considerar as informações etnobotânicas e quimiotaxonômicas, a escolha das plantas a serem investigadas aumenta as probabilidades de novas descobertas de substâncias bioativas sejam elas inéditas, ou já descritas na literatura.

Considerando esse conjunto de fatores, a família Rubiaceae, desponta como uma fonte promissora de novas substâncias bioativas. Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos vegetais na procura de substâncias bioativas. Dentre estes bioensaios realizados neste trabalho, encontra-se, antioxidante, toxicidade sobre *Artemia salina*, antibacteriano, antimicobacteriano e antitumoral *in vitro*.

#### **2.1.7.1 Atividade Antioxidante**

Entre as atividades produzidas pelos metabólitos secundários das plantas destaca-se a atividade antioxidante. O interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros efeitos indesejáveis (YILDIRIM *et al.*, 2001; ZHENG e WANG, 2001; MELO e GUERRA, 2002; SIMÃO, 1985). A adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática constante, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novas substâncias com capacidade antioxidante (SILVA *et al.*, 1999).

Estas substâncias, com ação comprovada contra o efeito nocivo de radicais livres, atuam como inibidores dos processos de peroxidação e de envelhecimento dos tecidos, assim como, também podem agir de modo a complexar o ferro, suprimindo um dos processos catalisadores da oxidação da vitamina C e dos lipídios. Está provado que a maior parte das substâncias polifenólicas tem atividade antioxidante e que podem ser administradas para prevenir e tratar algumas doenças (DA CUNHA e DA GRAÇA, 2005).

Muitos destes efeitos benéficos relacionados à prevenção de diversas enfermidades estão associados à própria natureza química deste grupo de moléculas, devido à sua estrutura, polifenóis são em geral bons agentes redutores e juntamente com outros agentes redutores encontrados na dieta tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos (MAURÍCIO, 2006).

### 2.1.7.2 Toxicidade sobre *Artemia salina*

O ensaio da letalidade de organismos simples, como o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, permite a avaliação da toxicidade geral e o biomonitoramento de extratos vegetais e metabólitos especiais com potencial atividade biológica (MEYER *et al.*, 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000).

Este ensaio é um método rápido, confiável e de baixo custo, que pode ser empregado para a determinação de toxicidade. Utilizando-se a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) é possível determinar e avaliar a atividade biológica (toxicidade) de uma molécula, fração ou de extratos vegetais. A toxicidade sobre *Artemia salina* pode ser correlacionada com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MACBAE *et al.*, 1988), entre outras.

Os resultados podem ser interpretados observando o valor médio (CL<sub>50</sub>). Assim, quanto menor o valor de CL<sub>50</sub>, mais tóxico é o composto perante um organismo-teste e maior é a sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral (ANDRIOLLI *et al.*, 2009).

### 2.1.7.3 Atividade Antibacteriana

O desenvolvimento da resistência de micro-organismos a antibióticos tem sido rápido e progressivo. Este problema, associado à baixa taxa de descoberta de novas substâncias com potencial antimicrobiano, confirma a necessidade de estudos de novas moléculas, de fonte natural ou sintética, com atividade antimicrobiana (WHITE *et al.*, 2003). Sendo assim, a diversidade de moléculas encontradas em plantas faz destas, uma fonte promissora de novos agentes antimicrobianos (LEITÃO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007, 2008; COUTINHO *et al.*, 2008).

Dentre as inúmeras bactérias patogênicas estão *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corummare*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Edwardsella tarda*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Nocardia brasiliensis*. No entanto, o uso de antibióticos contra esses micro-organismos tem selecionado linhagens resistentes, levando assim, à busca por novas substâncias bioativas (HOSHINA *et al.*, 1962; COSTA *et al.*, 2003; POWELL *et al.*, 2009). Portanto, a busca de novos antibacterianos constitui-se num campo de investigação aberto, amplo e contínuo.

#### 2.1.7.4 Atividade Antimicobacteriana

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada por uma bactéria em forma de bacilo pertencente ao gênero *Mycobacterium*, descoberta por Robert Koch, em 1882 e denominada de *Mycobacterium tuberculosis* (SMITH, 2003).

*Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, sendo 25 identificadas como patogênicas ao homem. Além do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*) existem espécies saprófitas e outras que atuam como patógenos oportunistas causando enfermidades denominadas de micobacterioses (POZNIAK *et al.*, 1996; RAYNAUD *et al.*, 1998; CORTINAS *et al.*, 2002).

Conforme WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO] (2009), o número anual de novos casos de tuberculose é estimado em 8,7 milhões, 80% estão concentrados em 22 países, dentre eles o Brasil. Em 1999, cerca de 1/3 dos infectados pelo HIV eram também pelo bacilo de Koch e juntas constituem, hoje, uma calamidade sem precedentes na história. O impacto desta inter-relação se faz criticamente alarmante quando se tem presente que o HIV, na atualidade, é o maior fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose em pessoas previamente infectadas. No Brasil, houve grande expansão da epidemia de AIDS o que acabou refletindo na epidemiologia da tuberculose e o principal problema relacionado é a resistência aos fármacos, a associação desta doença à infecção por HIV e o longo tempo de duração da terapia (BETHLEM *et al.*, 1990).

Segundo as estimativas do Banco Mundial, se o controle da tuberculose não se efetivar de forma satisfatória e não houver inovações terapêuticas e profiláticas, em 2020 a tuberculose contribuirá com 55% das mortes observadas em adultos nos países em desenvolvimento (LAXMINARAYAN *et al.*, 2007).

O aumento na prevalência de cepas resistentes, a co-infecção com HIV, somados ao fato de que nenhum novo antimicrobiano específico para a TB foi introduzido nos últimos 40 anos, reforçam a necessidade de desenvolver novos medicamentos que sejam mais eficazes frente a cepas resistentes, reduzam o tempo de tratamento e que possam atuar frente ao bacilo em estado de latência (O'BRIEN e NUNN, 2001). Assim, apesar do arsenal existente de quimioterápicos de combate à tuberculose, o problema de resistência requer a busca constante por novas drogas eficazes no combate a essa doença (ROSSETTI *et al.*, 2002).

Mesmo com o desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, muitos fármacos continuaram sendo obtidos a partir de fontes vegetais, seja pela dificuldade de se obter moléculas com a mesma estereoquímica, como pela



inviabilidade econômica de produzi-los sinteticamente (GUERRA e NODARI, 2004; SCHENKEL *et al.*, 2003). Desta forma, a pesquisa por produtos biologicamente ativos que possam atuar de maneira mais eficaz para o controle da TB e a diversidade química dos produtos de origem vegetal tem mostrado novas opções terapêuticas (SWENSON *et al.*, 1985; PIETRO *et al.*, 2000; CANTRELL *et al.*, 2001; CALIXTO e YUNES, 2001; JANÚARIO *et al.*, 2002).

Esses dados mostram a necessidade de realizar estudos para a descoberta de novas drogas para o tratamento da tuberculose. Principalmente por drogas que sejam de tratamento mais simples, que permitam maior adesão do paciente ao tratamento.

#### **2.1.7.5 Atividade Antitumoral**

A atividade antitumoral das substâncias isoladas pode ser estabelecida em cultura de células tumorais de várias linhagens. Para o desenvolvimento de novas drogas bioativas são necessários modelos adequados para a identificação de alvos moleculares que sejam essenciais para o crescimento celular seja *in vitro* ou *in vivo* (MACIEL *et al.* 2002). O câncer, por ser doença crônico-degenerativa, tem evolução prolongada e progressiva (BARBOSA, 2008), fato que incentiva a busca por novas drogas eficazes no seu tratamento.

Muitos dos fármacos utilizados no tratamento de câncer são derivados de produtos naturais, como o taxol que possui eficácia clínica no tratamento de câncer de ovário, mama, pulmão e próstata (WALL e WANI, 1996), os alcaloides da vinca (*Catharanthus*), vincristina e vimblastina, que são utilizados como agentes antitumorais para o tratamento de leucemia, linfomas e alguns tumores sólidos, esses alcaloides agem impedindo a divisão celular durante a metáfase das células tumorais (SCHRIPEMA *et al.*, 2004).

Atualmente a busca por substâncias antitumorais sintéticas ou naturais tem sido desenvolvida por meio de uma triagem utilizando diversas linhagens de células tumorais *in vitro*, possibilitando a análise de muitas substâncias em diferentes linhagens (NEIDLE *et al.*, 2005). Portanto, a pesquisa de novas substâncias bioativas que possam gerar novos produtos (moléculas ativas ou protótipos de fármacos) é de fundamental importância, dada a variedade de estruturas químicas de produtos naturais que certamente irão desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novas gerações de drogas antitumorais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ❖ Realizar o estudo fitoquímico dos extratos de *Duroia macrophylla* e avaliar suas atividades química e biológica.

#### 3.2 Específicos

- Purificar as substâncias presentes nos extratos de folhas e galhos de *D. macrophylla*;
- Testar extratos, frações e substâncias isoladas de *D. macrophylla* frente ao *Mycobacterium tuberculosis* e sobre células tumorais: carcinoma colorretal humano, carcinoma de mama, melanoma humano e fibroblasto de pulmão humano.
- Avaliar os extratos de *D. macrophylla* quanto às atividades biológica e química: toxicidade (sobre *Artemia salina*), antioxidante e antibacteriana;
- Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas através da combinação de métodos espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , mono e bidimensionais, UV, IV) e espectrométricos (CLAE/EM e CG/EM), conforme as características estruturais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

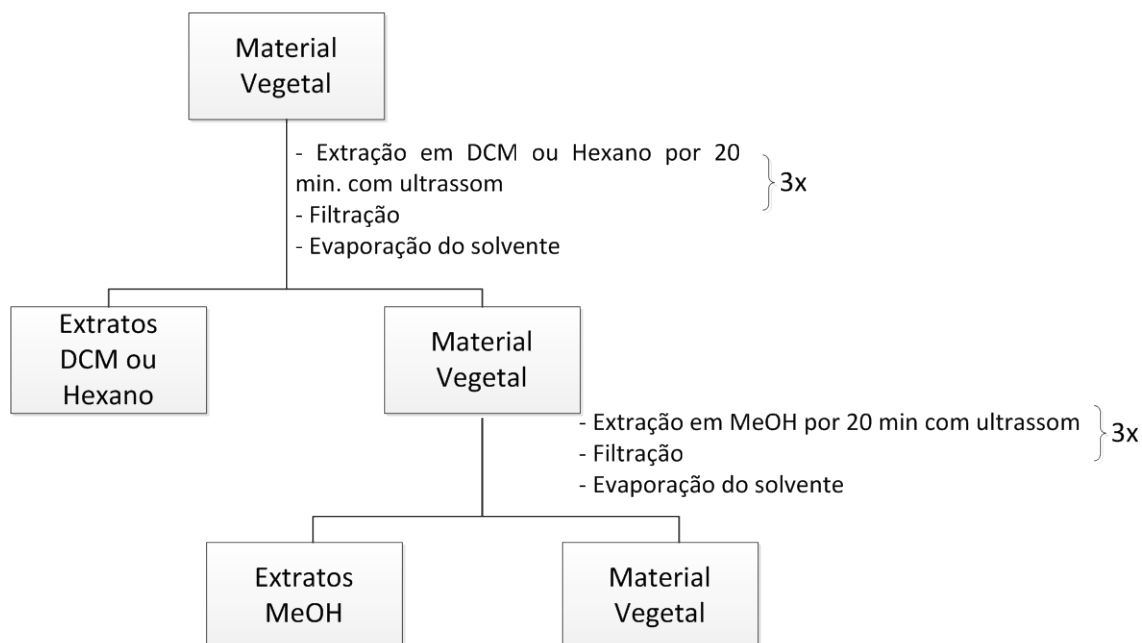
### 4.1. Coleta do Material e Preparo dos Extratos

Para obtenção do material vegetal, foram realizadas duas coletas: a primeira na Reserva Florestal A. Ducke uma área de 100 km<sup>2</sup>, localizada a 26 km NE de Manaus, na rodovia AM-010 e a segunda em uma Reserva Particular de Patrimônio Natural – RPPN, Cachoeira da Onça, localizada no município de Presidente Figueiredo, AM. O material botânico de *D. macrophylla* foi identificado e depositado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA (Tabela 20).

**Tabela 20:** Dados da coleta de *Duroia macrophylla* e número de *voucher* no herbário do INPA.

Local da coleta	Data da coleta	Registro herbário
Reserva Ducke-Manaus	05/12/2008	222501
RPPN – Presidente Figueiredo	18/05/2011	238337

O material vegetal (folhas e galhos) foi seco em estufa a 50 °C e posteriormente triturado em moinho de facas. Folhas e galhos foram submetidos à extração com solventes de polaridade crescente (diclorometano ou hexano, metanol e água). Foram realizadas três extrações utilizando banho de ultrassom por 20 minutos. Após filtração, os extratos diclorometânico ou hexânico e metanólico foram concentrados em rota-evaporador (Figura 5). Em 2008, o laboratório ainda adotava diclorometano como solvente de baixa polaridade, mas por motivos ecológicos, esse solvente foi substituído por hexano, salvo em casos como a extração dos galhos da 2<sup>a</sup> coleta, na qual foi utilizada DCM, devido ao pouco rendimento obtido com o hexano.



**Figura 5:** Fluxograma da preparação dos extratos de galhos e folhas de *Duroia macrophylla*.

#### 4.2. Especificações dos Equipamentos e Materiais Utilizados

Para a evaporação dos solventes, utilizou-se rota-evaporador a vácuo (FISATOM). E para o preparo dos extratos utilizou-se banho de ultrassom (UNIQUE).

Os solventes utilizados para as extrações, fracionamentos em coluna aberta e análises cromatográficas em camada delgada possuíam grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia - LABB (INPA).

Os extratos obtidos foram analisados por CCDC a fim de detectar as classes químicas existentes e também determinar o sistema de eluição adequado para o fracionamento cromatográfico. Estes extratos foram submetidos a uma série de cromatografias em coluna, utilizando a fase estacionária mais adequada dependendo da composição amostral e sistemas de eluição determinados por CCDC. Todas as frações obtidas dos fracionamentos foram reunidas por características químicas semelhantes.

Para a Cromatografia em Camada Delgada (CCDC), utilizaram-se cromatoplasmas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV254, com 0,20 mm de espessura (MACHEREY – NAGEL -MN). As quais foram eluídas com sistemas apropriados e reveladas com luz UV ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm), DPPH, anisaldeído sulfúrico, sulfato de cério (IV) ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) e cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ). As frações obtidas que

se apresentaram mais interessantes quimicamente e que possuíam maiores quantidades de massa foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  (60 MHz), a fim de conhecer a sua composição química, bem como direcionar o fracionamento para a purificação de suas moléculas.

As fases estacionárias (FE) empregadas para a cromatografia em coluna (CC) para o fracionamento dos extratos da 1ª coleta foram: Sílica Gel 60 (230-400 mesh – ASTM) e cartucho de Florisil Sep-pak (10g/60 mL) Phenomenex. As colunas cromatográficas variaram de acordo com a quantidade de amostra, mas a proporção de amostra/sílica manteve-se em torno de 1:70.

O fracionamento dos extratos da 2ª coleta foi realizado no Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille, France. As FE utilizadas para o fracionamento foram: Sílica Gel 60 (0,063-0,2 mm - Merck KGaA) para fracionamento de extratos brutos e Sílica Gel 60 (0,015-0,04 mm – Machery-Nagel) para o fracionamento de frações.

Algumas das frações semi-puras foram analisadas e purificadas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nesta técnica, os solventes utilizados foram degaseificados e ultrafiltrados, e tinham grau espectroscópico (TEDIA). O equipamento utilizado da marca Shimadzu possui Degaseificador DGU-14A, injetor automático modelo SIL-10AF; duas bombas do modelo LC 6AD, um Coletor FRC 10A, e Interface modelo SCL 10AVP. O detector possui arranjo de fotodiodos (DAD), modelo SPDM20A. Foram utilizadas colunas analíticas (250 x 4,5 mm), semipreparativas (250 x 10 mm) e pré-colunas, todas da marca Phenomenex, com partículas de 5 $\mu$ . A fase estacionária utilizada foi a ciano (amino-propil-ciano).

Para o ensaio da atividade antioxidante, utilizaram-se os reagentes: ácido ascórbico P.A (VETEC) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (SIGMA ALDRICH). A leitura da absorvância foi feita em um espectrofotômetro FENTOM (modelo Cirrus 80ST).

As substâncias isoladas foram analisadas por Espectrometria de Massas em equipamento LC-MS 8030 (Shimadzu), com fonte de ionização por elétrons (EI) e analisador do tipo quadrupolo. Foram solubilizados 1 mg de cada amostra em 100  $\mu\text{L}$  de metanol e, dessa solução, 1  $\mu\text{L}$  foi injetado por injeção direta.

As frações que apresentaram elevado grau de pureza foram analisadas por RMN, sendo as substâncias I, II, III e IV analisadas em aparelho Varian Inova (400 MHz) e as substâncias V, VI, VII, VIII, IX, X, XI e XII em aparelho Bruker Avance (500 MHz).

Os experimentos foram realizados a 30 °C, utilizando solventes deuterados conforme a solubilidade das amostras: acetona ( $C_3D_6O$ ), clorofórmio ( $CDCl_3$ ), metanol ( $CDO_3D$ ) e piridina ( $C_5D_5N$ ), e calibrados em relação ao TMS como referência interna (0,00 ppm). Para o espectro de RMN de  $^1H$ , foi utilizada a sequência de pulsos s2pul, tempo de relaxamento de 1,0 seg, pulso de 45,0°, tempo de aquisição de 7,3925 seg, janela espectral de 4432,49 Hz, intervalo entre os pulsos de 1,0 seg, com 32 repetições e largura da banda de 0,2 Hz. As análises de correlação  $^1H$ - $^{13}C$  (HSQC e HMBC) foram otimizados para uma constante de acoplamento média  $^1J(C,H)$  de 140 Hz e  $LRJ(C,H)$  de 8 Hz, respectivamente.

### 4.3. Estudo Fitoquímico dos Extratos da 1ª Coleta

#### 4.3.1. Fracionamento dos Extratos Diclorometânico das Folhas

O extrato diclorometânico das folhas (FDCM) com 9 g foi fracionado em cromatografia em coluna (CC) aberta (150 x 3,2 cm), recheada com sílica gel (332g). O sistema de eluição utilizado foi AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 21). O volume de cada eluente da fase móvel da coluna cromatográfica foi de 900 mL e para as frações foram recolhidos volumes de 50 a 100 mL. Foram coletadas 99 frações, e aquelas que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas e novamente analisadas em CCDC para a escolha do método cromatográfico de refractionamento, da fase estacionária e dos eluentes mais eficientes na separação.

Após, foram fracionadas em CC aberta, em sílica gel, utilizando como fase móvel um sistema de gradiente de hexano, DCM e MeOH. Foram fracionadas as frações reunidas 1-4,6-12, 14-16, 17-21, 25-40, 45, 46-56 e 57.

**Tabela 21:** Eluentes utilizados para o fracionamento do extrato FDCM

Frações coletadas	Eluentes
1-18	Hex/AcOEt 85:15
19-29	Hex/AcOEt 75:25
30-46	Hex/AcOEt 65:35
47-58	Hex/AcOEt 35:75
59-70	AcOEt 100%
71-80	AcOEt/MeOH 8:2

<i>continuação da Tabela 21.</i>	
80-89	AcOEt/MeOH 1:1
90-99	MeOH 100%

A fração FDCM 1-4 (2 g) foi fracionada em CC aberta (85 x 1,8 cm) com sílica gel (75 g) com gradiente de polaridade crescente de hexano, DCM e MeOH (Tabela 22). O volume de cada eluente adicionado à CC foi de 400 mL, enquanto que os volumes das 92 frações recolhidas variaram de 30 a 60 mL.

**Tabela 22:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 1-4

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-13	Hex/DCM 9:1
14-24	Hex/DCM 8:2
25-35	Hex/DCM 7:3
36-44	Hex/DCM 1:1
45-53	DCM 100%
54-62	DCM/MeOH 9:1
63-71	DCM/MeOH 8:2
72-78	DCM/MeOH 7:3
79-85	DCM/MeOH 1:1
86-92	MeOH 100%

A fração FDCM 6-12 (1 g) foi fracionada em CC aberta (70 x 1,8 cm) com sílica gel (70 g) com gradiente de DCM em hexano, MeOH em DCM até MeOH 100% (Tabela 23). O volume de cada eluente adicionado à CC foi de 260 mL e o volume das 63 frações recolhidas foi de 30 a 50 mL. As frações foram reunidas por semelhança química em CCDC.

**Tabela 23:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 6-12

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-9	Hex/DCM 7:3
10-15	Hex/DCM 6:4
16-23	Hex/DCM 1:1

*continuação da Tabela 23.*

24-31	DCM 100%
32-39	DCM/MeOH 9:1
40-44	DCM/MeOH 8:2
45-50	DCM/MeOH 7:3
51-56	DCM/MeOH 1:1
57-63	MeOH 100%

Destas frações reunidas, a fração 38-63 (60 mg) foi fracionada em CC aberta (18 x 1,0 cm) de sílica gel (6 g) e eluída em AcOEt e MeOH em diferentes proporções (Tabela 24). As 26 frações obtidas foram reunidas após serem analisadas por CCDC.

**Tabela 24:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 6-12.38-63

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	Hex/DCM 7:3
4-5	Hex/DCM 1:1
6-8	DCM 100%
9-11	DCM/MeOH 9:1
12-15	DCM/MeOH 8:2
16-18	DCM/MeOH 7:3
19-21	DCM/MeOH 6:4
22-24	DCM/MeOH 1:1
25-26	MeOH 100%

A fração FDCM 17-21 (150 mg) foi fracionada em cartuchos de Sep-pak Florisil (10 g) e eluída com fase móvel em gradiente de polaridade crescente, combinando hexano, AcOEt e MeOH 100% (Tabela 25). O volume de cada eluente foi de 50 mL e o volume recolhido de cada fração foi de aproximadamente 25 mL.

**Tabela 25:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 17-21

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-2	Hex/AcOEt 8:2
3-5	Hex/AcOEt 7:3



*continuação da Tabela 25.*

6-7	Hex/AcOEt 6:4
8-10	Hex/AcOEt 1:1
11-12	AcOEt 100%
13-14	AcOEt/MeOH 9:1
15-16	AcOEt/MeOH 8:2
17-18	AcOEt/MeOH 7:3
19-20	AcOEt/MeOH 6:4
21-22	AcOEt/MeOH 1:1
23-25	MeOH 100%

Após reunião das frações semelhantes, a fração 1-5 (85 mg) foi fracionada em CC aberta (20 x 1,2 cm) de sílica gel (8 g) e eluída com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 26). O volume de cada eluente foi de 50 mL, e recolhidos 25 mL de 33 frações. A fração 14 mostrou-se pura quando analisada por CCDC e por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Tabela 26:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 17-21.1-5

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	Hex/AcOEt 9:1
4-6	Hex/AcOEt 8:2
7-10	Hex/AcOEt 7:3
11-14	Hex/AcOEt 6:4
15-17	Hex/AcOEt 1:1
18-20	AcOEt 100%
21-22	AcOEt/MeOH 9:1
23-24	AcOEt/MeOH 8:2
25-26	AcOEt/MeOH 7:3
27-28	AcOEt/MeOH 6:4
29-30	AcOEt/MeOH 1:1
31-33	MeOH 100%

A fração FDCM 25-40 (900 mg) foi fracionada em CC aberta (81 x 1,6 cm) com 90 g de sílica gel e gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH

100% (Tabela 27). O volume de cada eluente foi de 250 mL, e os volumes das 42 frações recolhidas de 20 a 50 mL.

**Tabela 27:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 25-40

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	Hex/AcOEt 9:1
4-5	Hex/AcOEt 8:2
6-7	Hex/AcOEt 7:3
8-10	Hex/AcOEt 6:4
11-12	Hex/AcOEt 1:1
13-18	AcOEt 100%
19-23	AcOEt/MeOH 9:1
24-30	AcOEt/MeOH 8:2
31-35	AcOEt/MeOH 7:3
36-39	AcOEt/MeOH 1:1
40-42	MeOH 100%

Destas, a fração 6 (130 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica aberta (91 x 1,6 cm) com sílica gel (17 g), eluída com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 28). O volume de cada eluente foi de 20 mL, e o volume das 19 frações recolhidas foi de 10 mL.

**Tabela 28:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 25-40.6

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-2	Hex/AcOEt 8:2
<b>3-4</b>	<b>Hex/AcOEt 7:3</b>
5-6	Hex/AcOEt 6:4
7-8	Hex/AcOEt 1:1
9-10	AcOEt 100%
11-12	AcOEt/MeOH 9:1
13-14	AcOEt/MeOH 8:2
15-16	AcOEt/MeOH 7:3

*continuação da Tabela 28.*

17-18	AcOEt/MeOH 1:1
19	MeOH 100%

A fração FDCM 25-40.6.4 (4 mg) mostrou elevado grau de pureza quando analisada por CCDC, então foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e experimentos 2D (HSQC e HMBC). Esta análise indicou que se tratava de uma mistura de dois triterpenos, a qual foi purificada utilizando CLAE. A amostra foi dissolvida em acetonitrila (ACN) e analisada em coluna analítica cianopropil (Phenomenex®; 250 x 4 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) com volume de injeção de 25  $\mu\text{L}$  e fluxo de 1 mL/min. A purificação foi realizada em coluna semi-preparativa cianopropil (Phenomenex®; 250 x 4 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) com volume de injeção de 35  $\mu\text{L}$  e fluxo de 5 mL/min. A análise foi realizada no modo normal de eluição, no sistema isocrático utilizando ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (90:10). Foram observados dois picos com tempo de retenção muito próximo,  $t\text{R} = 11.5$  e 12 min. As frações obtidas correspondentes a cada pico foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais (HSQC e HMBC) e denominadas de **substância I** e **substância II**.

A fração FDCM 25-40.7 (100 mg) foi fracionada em CC aberta (81 x 1,6 cm) de sílica gel (10 g) com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 29). O volume de cada eluente adicionado à coluna cromatográfica foi de 20 mL, e o volume de cada uma das 42 frações recolhidas foi de 20 mL.

**Tabela 29:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 25-40.7

Frações coletadas	Eluentes
1-5	Hex/AcOEt 8:2
6-10	Hex/AcOEt 7:3
11-13	Hex/AcOEt 6:4
14-16	Hex/AcOEt 1:1
17-21	AcOEt 100%
22-25	AcOEt/MeOH 9:1
26-29	AcOEt/MeOH 8:2
30-34	AcOEt/MeOH 7:3
35-38	AcOEt/MeOH 1:1
39-42	MeOH 100%

A fração FDCM 45 (700 mg) foi fracionada utilizando cartucho Sep-pak de Florisil (10 g) e eluída AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 30). O volume de cada sistema de eluição foi de 50 mL, e o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 10 mL.

**Tabela 30:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 45

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1	Hex/AcOEt 9:1
2	Hex/AcOEt 8:2
3	Hex/AcOEt 7:3
4	Hex/AcOEt 6:4
5	Hex/AcOEt 1:1
6	AcOEt 100%
7	AcOEt/MeOH 9:1
8	AcOEt/MeOH 8:2
9	AcOEt/MeOH 7:3
10	AcOEt/MeOH 1:1
11	MeOH 100%

A fração FDCM 46-56 (320 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica aberta (22 x 1,8 cm) de sílica gel (26 g) e eluída com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 31). O volume de cada eluente adicionado à CC foi de 80 mL, e o volume de cada uma das 27 frações recolhidas foram de 20 a 40 mL.

**Tabela 31:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 46-56

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-4	Hex/AcOEt 8:2
5-7	Hex/AcOEt 7:3
8-11	Hex/AcOEt 6:4
12-14	AcOEt 100%
15-17	AcOEt/MeOH 9:1
18-20	AcOEt/MeOH 8:2
21-23	AcOEt/MeOH 7:3

*continuação da Tabela 31.*

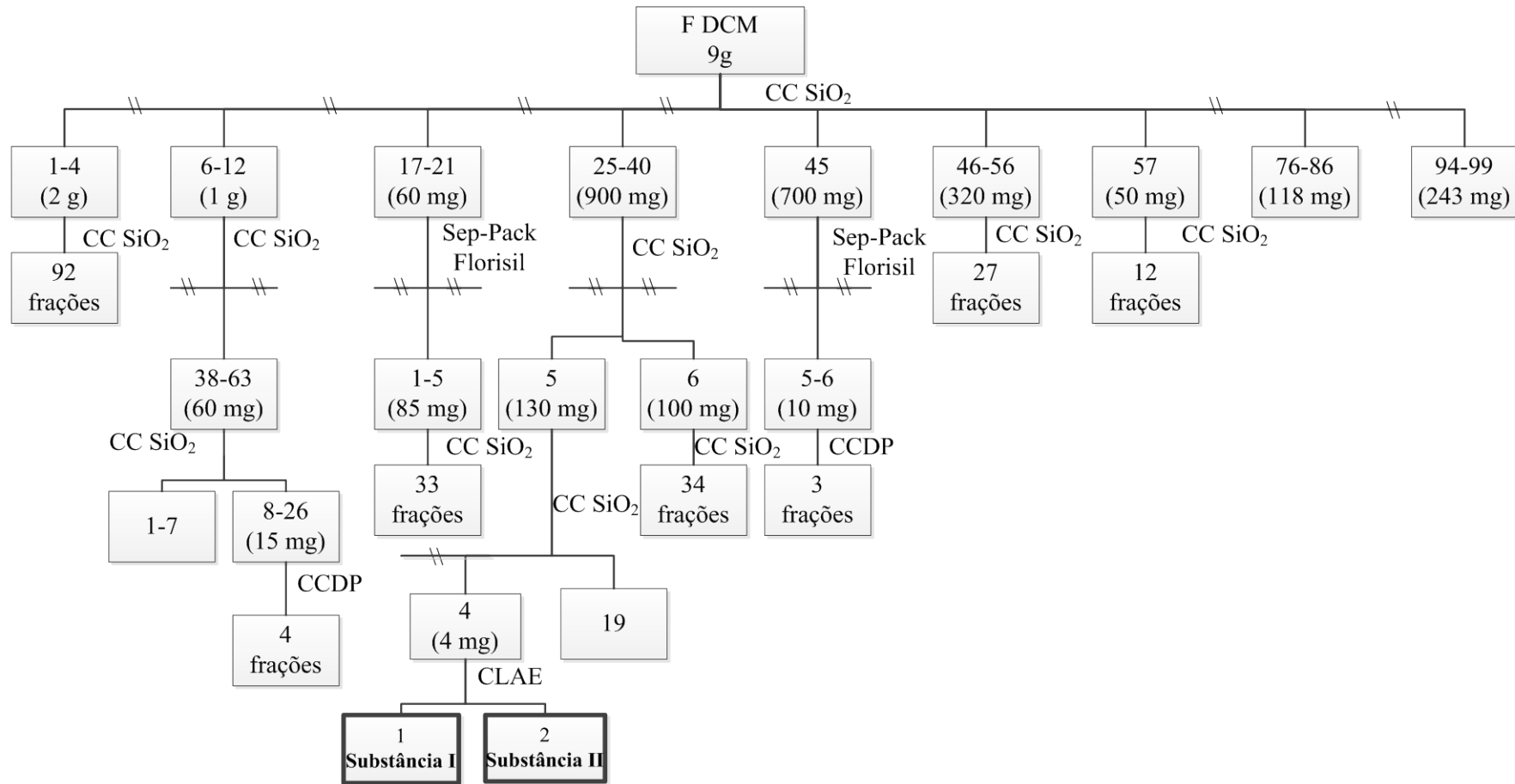
24-25	AcOEt/MeOH 1:1
26-27	MeOH 100%

A fração FDCM 57 (50 mg) foi fracionada em cartucho Sep-pak de Florisil e eluída AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 32). Tanto o volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica quanto os volumes das 12 das frações recolhidas foi de 10 mL.

**Tabela 32:** Eluentes utilizados para o fracionamento da FDCM 57

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1	Hex/AcOEt 8:2
2	Hex/AcOEt 7:3
3	Hex/AcOEt 6:4
4	Hex/AcOEt 1:1
5	AcOEt 100%
6	AcOEt/MeOH 9:1
7	AcOEt/MeOH 8:2
8	AcOEt/MeOH 7:3
9	AcOEt/MeOH 6:4
10	AcOEt/MeOH 1:1
11-12	MeOH 100%

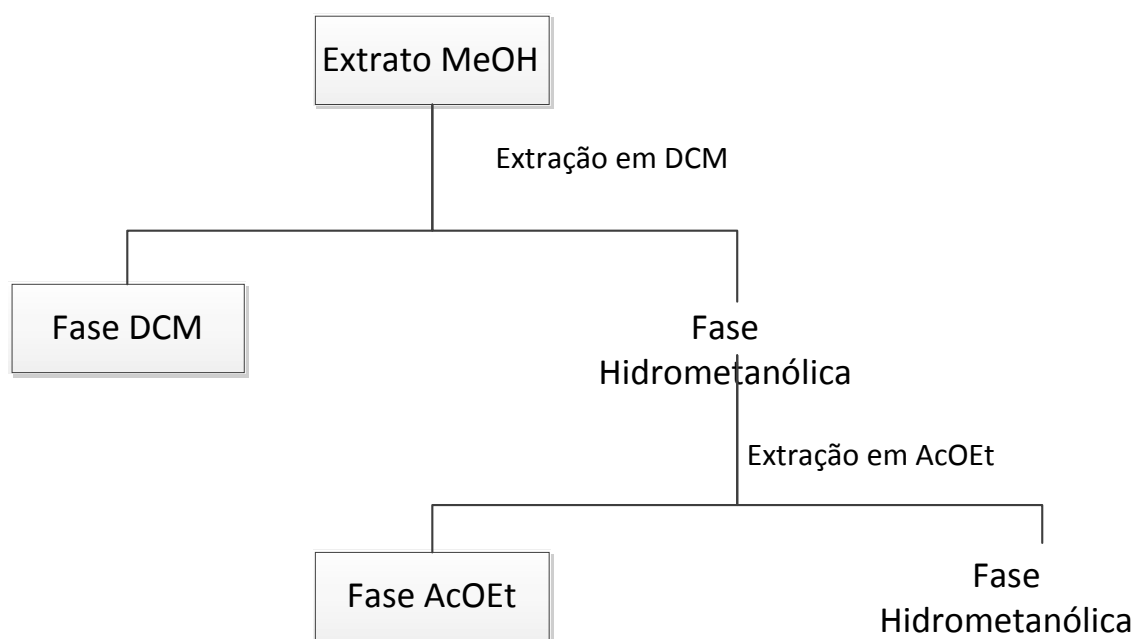
O fracionamento do extrato FDCM da 1<sup>a</sup> coleta está sumarizado na Figura 6.



**Figura 6:** Fracionamento do extrato DCM das folhas da 1<sup>a</sup> coleta.

### 4.3.2. Fracionamento dos Extratos Metanólico de Folhas e Galhos

Através da análise em CCDC pode-se perceber que os extratos metanólicos apresentaram substâncias com polaridade muito distinta, portanto foram submetidos à extração líquido-líquido. Foi utilizada a mesma metodologia para os extratos das folhas (10 g) e dos galhos (13 g). Cada extrato foi solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O 1:9 e particionado com DCM (500 mL; 3x) e depois com AcOEt (500 mL; 3x). A fase hidrometanólica foi liofilizada (Figura 7).



**Figura 7:** Extração líquido-líquido de folhas e galhos dos extratos metanólico da 1<sup>a</sup> coleta.

A fase DCM do extrato metanólico das folhas (FMeOH-DCM) (2 g) foi fracionada em CC aberta (100 cm x 2,5 cm) de sílica (120 g), com gradiente de AcOEt em DCM, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 33).

**Tabela 33:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fase FMeOH-DCM

Frações coletadas	Eluentes
1-12	Hex/DCM 9:1
<b>13-22</b>	<b>Hex/DCM 8:2</b>
23-32	Hex/DCM 7:3

*continuação da Tabela 33.*

33-42	Hex/DCM 6:4
43-51	Hex/DCM 1:1
52-60	DCM 100%
61-70	DCM/MeOH 9:1
71-79	DCM/MeOH 8:2
80-89	DCM/MeOH 7:3
90-98	DCM/MeOH 6:4
98-107	DCM/MeOH 1:1
108-111	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 400 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas variou de 40 a 60 mL, foram obtidas 111 frações, as quais foram analisadas por CCDC e foram reunidas. Destas frações reunidas obtidas do fracionamento do extrato FMeOH-DCM, foram fracionadas a frações 7-10, 12-14 e 13-25 conforme demonstrado na Figura 8.

A fração 7-10 (130 mg) foi fracionada em CC aberta (29 x 0,9 cm) de sílica (9 g), com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 34).

**Tabela 34:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração FMeOH-DCM 7-10

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	Hexano 100%
4-6	Hex/AcOEt 9:1
7-9	Hex/AcOEt 8:2
10-12	Hex/AcOEt 7:3
13-15	Hex/AcOEt 6:4
16-18	Hex/AcOEt 1:1
19-20	AcOEt 100%
21-22	AcOEt/MeOH 9:1
23-24	AcOEt/MeOH 8:2
25-27	AcOEt/MeOH 7:3
28-30	AcOEt/MeOH 6:4
31-32	AcOEt/MeOH 1:1



*continuação da Tabela 34.*

33-34	MeOH 100%
-------	-----------

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 30 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 15 mL, foram obtidas 34 frações, as quais foram analisadas por CCDC e foram reunidas.

A fração 12-14 (13 mg) foi submetida a CCDCP de sílica gel e eluída com o sistema Hexano/AcOEt 6:4. Foram obtidas quatro frações.

A fração 13-25 (500 mg) foi fracionada em CC (1 m x 1,8 cm) de sílica (35 g) com gradiente de AcOEt em DCM, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 35).

**Tabela 35:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração FMeOH-DCM 13-25

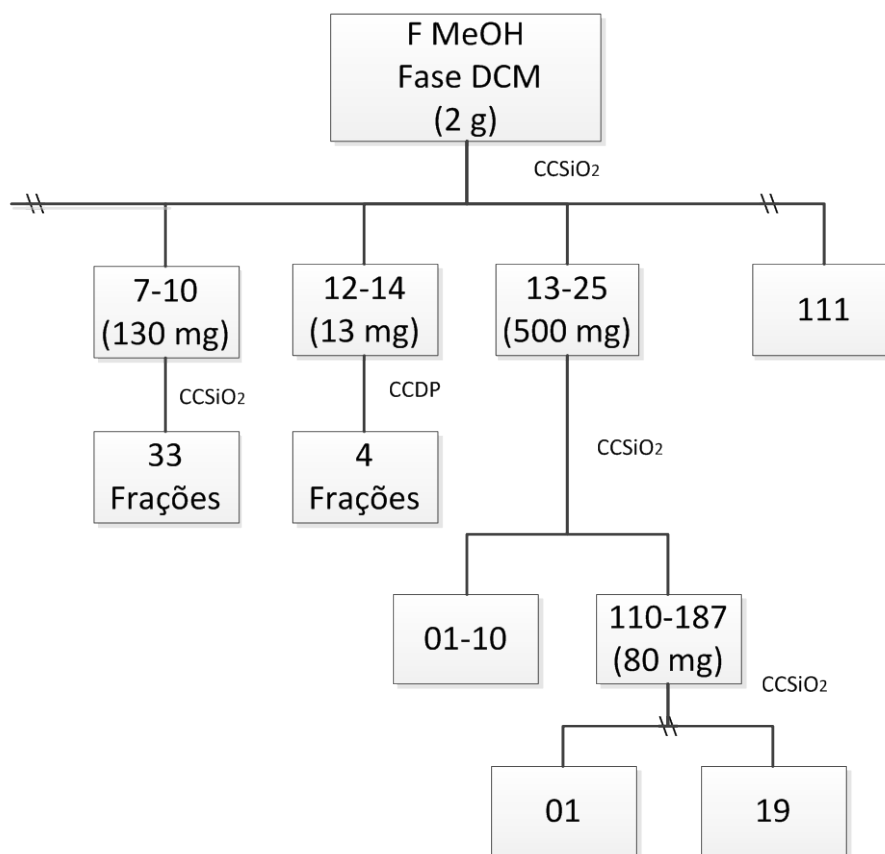
Frações coletadas	Eluentes
1-19	Hex/AcOEt 9:1
20-30	Hex/AcOEt 8:2
31-40	Hex/AcOEt 7:3
41-52	Hex/AcOEt 6:4
53-61	Hex/AcOEt 1:1
62-71	Hex/AcOEt 4:6
72-81	Hex/AcOEt 3:7
82-94	Hex/AcOEt 2:8
95-98	AcOEt 100%
99-119	AcOEt/MeOH 8:2
120-127	AcOEt/MeOH 7:3
128-140	AcOEt/MeOH 6:4
143-158	AcOEt/MeOH 1:1
159-187	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 200 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de 8 a 15 mL. Foram obtidas 187 frações, as quais foram analisadas por CCDC e foram reunidas. Desta reunião, a fração 110-187 (80 mg) foi fracionada em CC (20 cm x 0,9 cm) de sílica gel (6 g), com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 36).

**Tabela 36:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração FMeOH-DCM 13-25.110-187

Frações coletadas	Eluentes
1	Hex/AcOEt 7:3
2-3	Hex/AcOEt 6:4
<b>4-6</b>	<b>Hex/AcOEt 1:1</b>
7-8	AcOEt 100%
9-11	AcOEt/MeOH 9:1
12-13	AcOEt/MeOH 8:2
14-16	AcOEt/MeOH 7:3
17-18	AcOEt/MeOH 1:1
19	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 40 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 20 mL. Foram obtidas 19 frações, as quais foram analisadas por CCDC e foram reunidas.



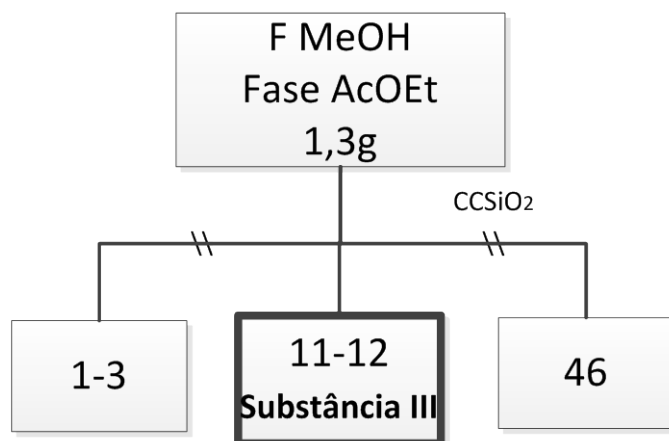
**Figura 8:** Fracionamento da fase DCM do extrato MeOH das folhas da 1ª coleta.

A fase AcOEt do extrato metanólico das folhas (FMeOH-AcOEt) com 1,3 g foi fracionada em CC (70 cm x 1,3 cm) de sílica (70 g), com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 37).

**Tabela 37:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fase FMeOH-AcOEt

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	Hex/AcOEt 8:2
4-6	Hex/AcOEt 7:3
7-10	Hex/AcOEt 6:4
<b>11-12</b>	<b>Hex/AcOEt 1:1</b>
13-15	AcOEt 100%
16-18	AcOEt/MeOH 9:1
19-24	AcOEt/MeOH 8:2
25-29	AcOEt/MeOH 7:3
30-34	AcOEt/MeOH 6:4
35-39	AcOEt/MeOH 1:1
40-46	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 100 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de 30 a 60 mL, as 46 frações foram analisadas por CCDC e foram reunidas. A fração 11-12 (2 mg) mostrou elevado grau de pureza quando observada sob luz visível, UV 254 e 365 nm e reveladas com anisaldeído sulfúrico. Após analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e experimentos 2D (400 MHz) esta fração foi identificada como sendo uma chalcona (**substância III**). O fluxograma que descreve o fracionamento do extrato MeOH das folhas fase AcOEt da 1<sup>a</sup> coleta está ilustrado na Figura 9.



**Figura 9:** Fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH das folhas da 1ª coleta

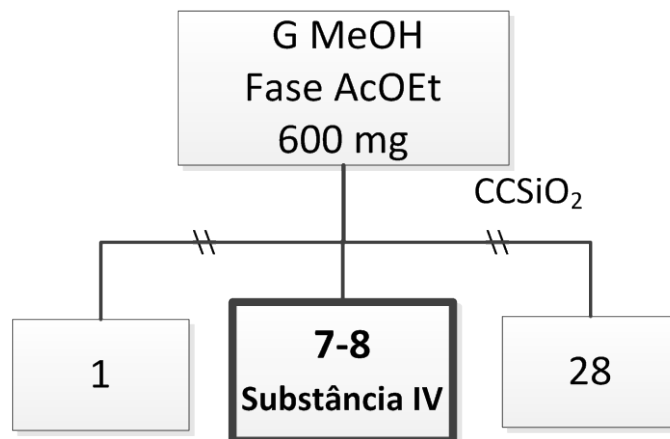
A fase AcOEt do extrato metanólico dos galhos (GMeOH-AcOEt) (600 mg) foi fracionada em coluna aberta (70 cm x 1,3 cm) de sílica gel (30 g), com gradiente de AcOEt em DCM, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 38 e Figura 10).

**Tabela 38:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GMeOH-AcOEt

Frações coletadas	Eluentes
1	DCM/AcOEt 9:1
2-3	DCM/AcOEt 8:2
4-6	DCM/AcOEt 7:3
<b>7-9</b>	<b>DCM/AcOEt 6:4</b>
10-11	DCM/AcOEt 1:1
12-13	AcOEt 100%
14-15	AcOEt/MeOH 9:1
16-19	AcOEt/MeOH 8:2
20-21	AcOEt/MeOH 7:3
22-24	AcOEt/MeOH 1:1
25-28	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 60 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de 15 a 30 mL. Foram coletadas 28 frações, destas a fração 7-8 (3 mg) apresentou alto grau de pureza quando

analisada nas cromatoplasas e através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais foi possível a identificação de um ácido fenólico denominado ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico (**substância IV**).



**Figura 10:** Fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos da 1ª coleta

#### 4.4. Estudo Fitoquímico dos Extratos da 2ª Coleta

##### 4.4.1. Fracionamento dos Extratos Diclorometânico dos Galhos

Foram fracionados 4 g do extrato diclorometânico dos galhos (GDCM) através de CC aberta (95 x 2,2 cm), recheada com sílica gel (135 g), com gradiente AcOEt em DCM, MeOH em AcOEt até MeOH 100%, sendo adicionado 0.01% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  na fase móvel, obtendo-se pH 9 em cada sistema (Tabela 39). O fluxograma de todo o fracionamento deste extrato encontra-se na Figura 11.

**Tabela 39:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GDCM

Frações coletadas	Eluentes
1-9	DCM 100%
10-21	DCM/AcOEt 9:1
22-32	DM/AcOEt 8:2
33-42	DCM/AcOEt 7:3
43-49	DCM/AcOEt 6:4
50-56	DCM/AcOEt 1:1
<b>57-63</b>	<b>DCM/AcOEt 4:6</b>
64-72	DCM/AcOEt 3:7

*continuação da Tabela 39.*

73-81	DCM/AcOEt 2:8
82-94	DCM/AcOEt 1:9
95-103	AcOEt 100%
104-111	AcOEt/MeOH 9:1
112-118	AcOEt/MeOH 8:2
119-126	AcOEt/MeOH 7:3
127-135	AcOEt/MeOH 6:4
136-144	AcOEt/MeOH 1:1
145-168	MeOH 100%

Foram obtidas 168 frações e o volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 250 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de 20 mL. Ao analisar por CCDC, observou-se alto grau de pureza da fração 57 (47 mg), a qual apresentou coloração laranja ao ser revelada com Dragendorff, indicando a presença de alcaloides, esta fração foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY), sendo identificada como 10-metoxi-ajmalicina (**substância V**).

Após serem analisadas por CCDC, as frações semelhantes foram reunidas. Destas, foram selecionadas as frações ricas em alcaloides para serem refractionadas: 54-62, 133-136 e 137-143.

A fração 54-62 (350 mg) foi fracionada através de CC aberta (66 x 1 cm), com 20 g sílica gel, com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100%, sendo adicionado 0.01% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  na fase móvel, obtendo-se pH 9 em cada sistema (Tabela 40). Foram obtidas 94 frações cada uma com 20 mL.

**Tabela 40:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GDCM 54-62

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	Hex/AcOEt 95:05
4-7	Hex/AcOEt 9:1
8-10	Hex/AcOEt 85:15
11-16	Hex/AcOEt 8:2
17-20	Hex/AcOEt 75:25

*continuação da Tabela 40.*

21-23	Hex/AcOEt 7:3
24-26	Hex/AcOEt 6:4
<b>27-31</b>	<b>Hex/AcOEt 1:1</b>
<b>32-35</b>	<b>Hex/AcOEt 4:6</b>
36-38	Hex/AcOEt 3:7
39-41	Hex/AcOEt 2:8
42-45	Hex/AcOEt 1:9
46-48	AcOEt 100%
49-52	AcOEt/MeOH 9:1
53-56	AcOEt/MeOH 8:2
57-61	AcOEt/MeOH 7:3
62-66	AcOEt/MeOH 6:4
67-72	AcOEt/MeOH 1:1
73-75	AcOEt/MeOH 4:6
76-79	AcOEt/MeOH 3:7
80-83	AcOEt/MeOH 2:8
84-89	AcOEt/MeOH 1:9
90-94	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 100 mL, enquanto que o volume das 94 frações recolhidas foi de 20 mL. Através da análise de CCDC verificou-se que as frações 31 a 35 apresentavam alto grau de pureza, portanto estas foram submetidas a análise de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY). A fração 31 (2 mg) foi identificada como 11-metoxi-ajmalicina (**substância VI**), a fração 32-33 (3 mg) corresponde ao alcaóide 11-metoxi-3-isoajmalicina (**substância VII**), e a fração 34-35 (30 mg) foi caracterizada como 10-metoxi-ajmalicina (**substância V**), a qual já havia sido isolada em fracionamentos anteriores.

A fração 133-136 (200 mg) foi fracionada em CC aberta (35 x 1,8 cm), com 20 g sílica gel, com gradiente de AcOEt em DCM, MeOH em AcOEt até MeOH 100%, a cada sistema foi adicionado 0.01% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , foi verificado o pH em 9 para cada sistema (Tabela 41).

**Tabela 41:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GDCM 133-136

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-3	DCM/AcOEt 9:1
4-6	DM/AcOEt 8:2
7-9	DCM/AcOEt 7:3
10-12	DCM/AcOEt 6:4
13-18	DCM/AcOEt 1:1
19-21	DCM/AcOEt 4:6
22-24	DCM/AcOEt 3:7
25-27	DCM/AcOEt 2:8
28-31	DCM/AcOEt 1:9
32-35	AcOEt 100%
36-38	AcOEt/MeOH 9:1
39-41	AcOEt/MeOH 8:2
42-44	AcOEt/MeOH 7:3
45-47	AcOEt/MeOH 6:4
48-56	AcOEt/MeOH 1:1
57	AcOEt/MeOH 4:3
58-60	AcOEt/MeOH 3:7
61-63	AcOEt/MeOH 2:8
64-65	AcOEt/MeOH 1:9
66-71	MeOH 100%

Foram obtidas 71 frações e o volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 100 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de 20 mL.

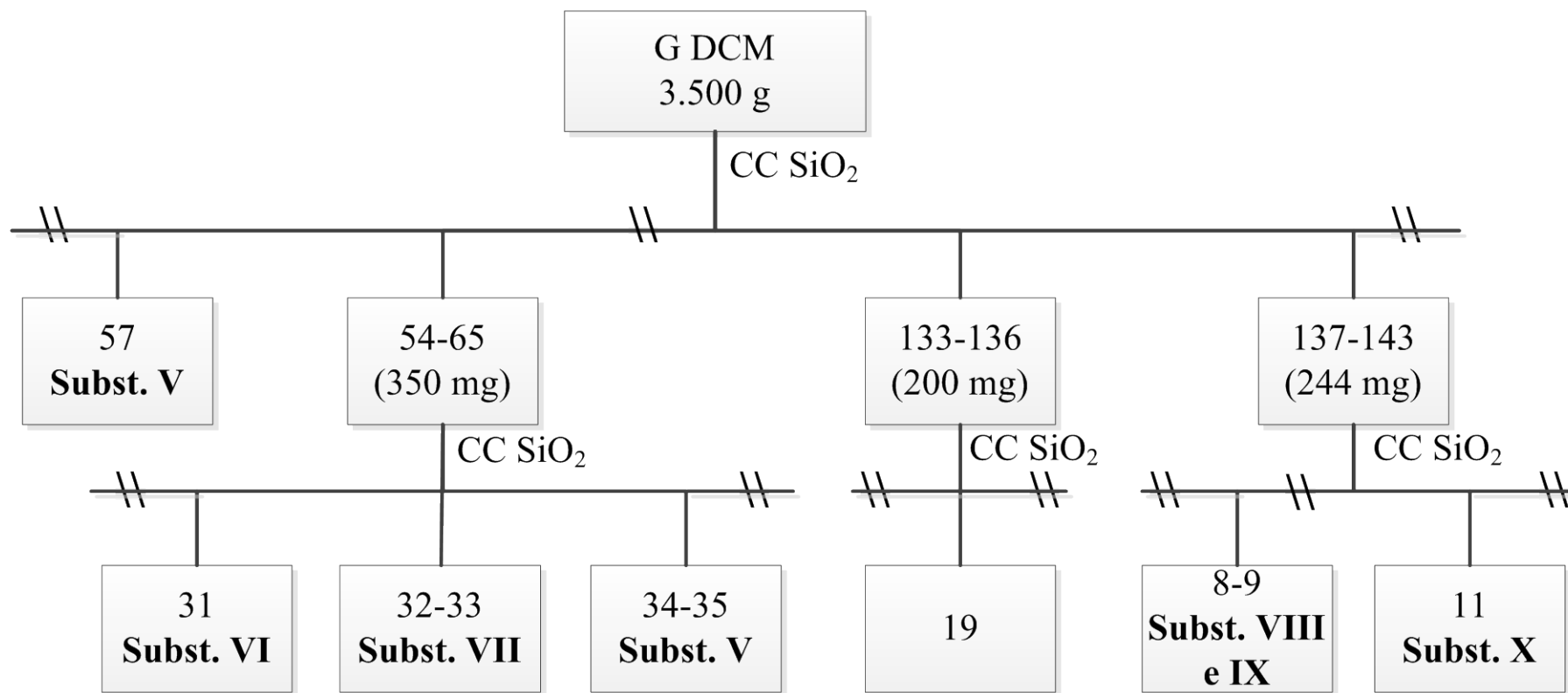
A fração 137-43 (244 mg) foi fracionada através de cromatografia em coluna aberta (36 x 2 cm), com 45 g sílica gel, com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% com 0.01% de NH<sub>4</sub>OH à um pH 9 (Tabela 42).



**Tabela 42:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GDCM 137-43

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1	Hex/AcOEt 1:1
2	Hex/ AcOEt 4:6
3-4	Hex/ AcOEt 3:7
5	Hex/ AcOEt 2:8
6	Hex/ AcOEt 1:9
<b>7-8</b>	<b>AcOEt 100%</b>
<b>9-10</b>	<b>AcOEt/MeOH 95:05</b>
<b>11-12</b>	<b>AcOEt/MeOH 9:1</b>
13	AcOEt/MeOH 85:15
14	AcOEt/MeOH 8:2
15	AcOEt/MeOH 75:25
16	AcOEt/MeOH 7:3
17	AcOEt/MeOH 6:4
18	AcOEt/MeOH 1:1
19	AcOEt/MeOH 4:6
20	AcOEt/MeOH 3:7
21	AcOEt/MeOH 2:8
22	AcOEt/MeOH 1:9
23-24	MeOH 100%

O volume coletado das 24 frações foi de 20 mL, sendo que em cada sistema de eluição foram adicionados 90 mL. As frações 8, 9 e 11 mostraram alto grau de pureza ao serem analisadas por CCDC, e após comparar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  observou-se que os espectros das frações 8 e 9 eram idênticos, portanto estas foram reunidas e identificadas como a mistura de dois isômeros: 9-metoxi-3-isoajmalicina e 9-metoxi-19-epi-3-iso-ajmalicina (**substância VIII e IX**) e a fração 11 (2 mg) foi identificada como 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (**substância X**).



**Figura 11:** Fracionamento do extrato DCM dos galhos da 2ª coleta.

#### 4.4.2. Fracionamento dos Extratos Metanólico dos Galhos

O extrato metanólico dos galhos da segunda coleta foi submetido a uma extração líquido-líquido, a massa inicial foi de 10 g solubilizados numa mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O 1:9. A solução foi extraída com 500 mL de DCM em funil de separação (repetindo 3 vezes) e com 500 mL AcOEt (repetindo 3 vezes) e roto-evaporadas. Ao final as fases foram concentradas em rota-evaporador. O fracionamento do extrato GMeOH da 2<sup>a</sup> coleta está sumarizado na Figura 12.

A fase DCM do extrato metanólico dos galhos (GMeOH-DCM) com 660 mg foi fracionada em coluna aberta (33 x 1 cm) de sílica (60 g), com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100%, obtendo um total de 26 frações (Tabela 43).

**Tabela 43:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GMeOH-DCM

Frações coletadas	Eluentes
1-2	Hex/AcOEt 95:05
3-4	Hex/AcOEt 9:1
5-6	Hex/AcOEt 8:2
6-7	Hex/AcOEt 7:3
8-9	Hex/AcOEt 1:1
10-11	AcOEt 100%
12-14	AcOEt/MeOH 9:1
16-18	AcOEt/MeOH 8:2
20-21	AcOEt/MeOH 7:3
21-24	AcOEt/MeOH 1:1
25-26	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 40 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 20 mL. Quando analisadas por CCDC e reveladas com Dragendorff, todas as frações apresentaram a cor laranja, indicando a possível presença de alcaloides. Estas foram submetidas à análise de RMN de <sup>1</sup>H (60 MHz). As frações 8, 9-10 e 22-25 apresentaram sinais característicos de alcaloides, portanto, estas foram refracionadas.

A fração 8 do extrato metanólico dos galhos fase DCM com 20 mg foi fracionado em coluna aberta (24 x 1,5 cm) de sílica (2 g), com gradiente de DCM em hexano, MeOH em DCM até MeOH 100%, obtendo um total de 32 frações (Tabela 44).

**Tabela 44:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 8

Frações coletadas	Eluentes
1-2	Hex/DCM 6:4
3-4	Hex/DCM 55:45
5-6	Hex/DCM 1:1
6-7	DCM 100%
8-9	DCM/MeOH 95:05
10-11	DCM/MeOH 9:1
12-14	DCM/MeOH 85:15
15-18	DCM/MeOH 8:2
19-20	DCM/MeOH 75:25
21-24	DCM/MeOH 7:3
25-26	DCM/MeOH 65:35
27-28	DCM/MeOH 6:4
29-30	DCM/MeOH 1:1
31-32	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 20 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 10 mL.

A fração 9-10 (200 mg) da fase DCM do extrato metanólico dos galhos, rica em alcaloides, foi fracionada em CC aberta (100 x 1,5 cm) em sílica (20g), utilizando como fase móvel AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 45).

**Tabela 45:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 9-10

Frações coletadas	Eluentes
1-5	Hex/AcOEt 8:2
6-9	Hex/AcOEt 7:3
10-15	Hex/AcOEt 6:4
16-18	Hex/AcOEt 1:1

*continuação da Tabela 45*

19-21	Hex/AcOEt 4:6
<b>22-24</b>	<b>AcOEt 100%</b>
<b>25-29</b>	<b>AcOEt/MeOH 9:1</b>
30-34	AcOEt/MeOH 8:2
40-43	AcOEt/MeOH 7:3
44-46	AcOEt/MeOH 1:1
47-48	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 100 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 20 mL. Ao analisar as frações por CCDC pôde-se perceber um certo grau de pureza nas frações 24 (3 mg) e 28 (15 mg), após analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais, estas foram identificadas como 10-metoxi-3-isorauniticina (**substância XI**) e 10-metoxi-rauniticina (**substância XII**), respectivamente.

Das 48 frações obtidas, as frações 22 e 23 foram reunidas e analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , o qual indicou a presença de alcaloides. A fim de purificar estes alcaloides, a fração 22-23 (40 mg) foi refractionada em CC aberta (45 x 1,5 cm) de sílica (4 g), com gradiente de AcOEt em DCM, MeOH em AcOEt até MeOH 100% sendo adicionados 0.01% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (ph 9) a cada sistema de eluição (Tabela 46).

**Tabela 46:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 9-10. 22-23

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1	DCM/AcOEt 95:05
2-3	DM/AcOEt 9:1
4	DCM/AcOEt 85:15
5-6	DCM/AcOEt 8:2
7-8	DCM/AcOEt 75:25
9	DCM/AcOEt 7:3
10-11	DCM/AcOEt 6:4
12	DCM/AcOEt 1:1
13-14	DCM/AcOEt 4:6
15-16	DCM/AcOEt 3:7

*continuação da Tabela 46.*

17-18	DCM/AcOEt 2:8
19	DCM/AcOEt 1:9
20-21	AcOEt 100%
22	AcOEt/MeOH 9:1
23	AcOEt/MeOH 8:2
24	AcOEt/MeOH 7:3
25	AcOEt/MeOH 6:4
26-27	AcOEt/MeOH 1:1
28	AcOEt/MeOH 4:3
29	AcOEt/MeOH 3:7
30	AcOEt/MeOH 2:8
31	AcOEt/MeOH 1:9
32	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 15 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de aproximadamente 10 mL.

A reunião 22-25 (34 mg) da fase DCM do extrato metanólico dos galhos foi fracionada em CC aberta (40 x 1,5 cm) de sílica (3 g), com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100%, obtendo um total de 12 frações (Tabela 47).

**Tabela 47:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fração GMeOH-DCM 22-25

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1	Hexano 100%
2	Hex/AcOEt 9:1
3	Hex/AcOEt 8:2
4	Hex/AcOEt 7:3
5	Hex/AcOEt 1:1
6	AcOEt 100%
7	AcOEt/MeOH 9:1
8	AcOEt/MeOH 8:2
9	AcOEt/MeOH 7:3

*continuação da Tabela 47.*

10	AcOEt/MeOH 1:1
11-12	MeOH 100%

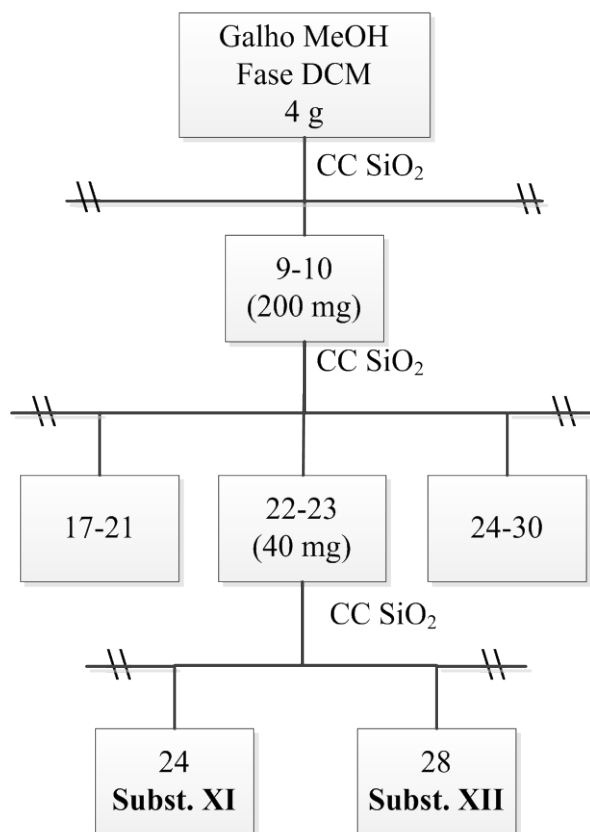
O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de 10 mL, recolhidas em frascos também de 10 mL.

A fase AcOEt do extrato metanólico dos galhos (GMeOH-AcOEt) com 900 mg foi fracionado em coluna aberta (39 x 2,5 cm) de sílica (50 g), com gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100%, obtendo um total de 28 frações (Tabela 48).

**Tabela 48:** Eluentes utilizados para o fracionamento da fase GMeOH-AcOEt

<b>Frações coletadas</b>	<b>Eluentes</b>
1-2	Hex/AcOEt 9:1
3-4	Hex/AcOEt 8:2
5-6	Hex/AcOEt 7:3
7-8	Hex/AcOEt 1:1
9-10	AcOEt 100%
11-13	AcOEt/MeOH 9:1
14-16	AcOEt/MeOH 8:2
17-19	AcOEt/MeOH 7:3
20-21	AcOEt/MeOH 6:4
22-23	AcOEt/MeOH 1:1
24-28	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 70 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas foi de 15 a 35 mL.



**Figura 12:** Fracionamento do extrato MeOH dos galhos da 2ª coleta

#### 4.5. Atividades Química e Biológica

##### 4.5.1. Atividade Antioxidante

Na análise qualitativa da atividade antioxidante os extratos foram testados em placas cromatográficas e revelados com solução de 0,2% de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) que revela a capacidade de sequestrar radicais livres. As regiões que adquiriram cor branco-amarelada após 30 minutos da aplicação indicaram a presença de substâncias com atividade antioxidante (CUENDET *et al.*, 1997).

No teste quantitativo, os extratos foram testados quanto à capacidade de descolorir o oxidante DPPH, visto que o mesmo apresenta coloração violeta, e os resultados obtidos foram comparados em termos de equivalente com ácido ascórbico, utilizado como antioxidante padrão. Na presença de um redutor, o DPPH de coloração violeta ( $\Delta_{\max} = 517 \text{ nm}$ ) é convertido a DPPH de coloração amarelo pálido. O ensaio foi realizado em triplicata e as amostras foram solubilizadas em metanol grau P.A com concentração de 30 mg/mL. A quantificação foi feita através da leitura da absorbância em espectrofotômetro. A solução de DPPH foi preparada na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$



utilizando metanol grau P.A para a dissolução. A reação foi iniciada pela adição de 990  $\mu\text{L}$  desta solução e 10  $\mu\text{L}$  de amostra (1mg/mL), realizado em triplicata com leituras após 30 minutos. O preparo do branco consistiu em adicionar 10  $\mu\text{L}$  de MeOH com 990  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH ( $\Delta\text{ABS}$  branco).

A inibição da coloração é expressa em % de atividade sequestradora, através da fórmula:

$$\% \text{ AS} = 100 \times \Delta h_x$$

$$\Delta h_x = h_c - h_x$$

$h_c$  = absorbância controle (DPPH + MeOH)

$h_x$  = absorbância teste (DPPH + extrato)

Inicialmente, os extratos foram avaliados a uma concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , os que apresentaram atividade nesta concentração foram avaliados em sua relação dose/dependência em diferentes concentrações (5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,1562  $\mu\text{g/mL}$ ). A potência da atividade sequestradora foi obtida através de gráficos de concentração x resposta inibitória (%). A concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ), ou seja, a concentração da amostra que causa 50% de redução da concentração inicial de DPPH foi obtida por regressão linear (LEE *et al.*, 2003).

#### 4.5.2. Toxicidade frente a *Artemia salina*

Os testes frente ao microcrustáceo *Artemia salina* indicam o potencial de toxicidade dos extratos, frações e substâncias. A técnica e sua utilização sistemática, como meio de se obterem compostos ativos a partir de extratos vegetais é descrita por Meyer e colaboradores (1982). Para o teste, utilizou-se como meio de crescimento uma solução salina (3,8%). Foram adicionados 10 mg dos cistos de *Artemia salina* para a eclosão dos mesmos. As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação com lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após esse período, as larvas foram repassadas para placas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *Artemia salina* em cada poço, realizado em triplicata. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avaliou-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles

quanto no teste. Inicialmente, os extratos foram testados na concentração de 1000 µg/mL e diluídos até encontrar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>).

### **4.5.3. Atividade Antibacteriana**

#### **4.5.3.1. Cepas testadas**

As análises foram realizadas frente às bactérias: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Flavobacterium corumnare* (ATCC 49512), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Providencia rettgeri* (ATCC 29944), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Nocardia brasiliensis* (ATCC 19296).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos/substâncias foram realizadas conforme metodologia descrita por Eloff (1998a) e CLSI (2003).

#### **4.5.3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os extratos/substâncias foram primeiramente solubilizados em dimetilssulfóxido (DMSO) a 5%, e em seguida foram realizadas diluições sucessivas para a obtenção das concentrações de 1000 µg/mL a 15,6 µg/mL. Em seguida, cada concentração foi adicionada em poços (microplaca de 96 poços). Foram adicionados 95 µL de cada concentração do extrato e 5 µL do inóculo (McFarland 0,5 contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$ ) diluída 10 vezes. Para o controle negativo foram utilizados 95 µL de caldo DMSO e o inóculo. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina nas concentrações de 125 µg/mL a 0,97 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida a placa foi agitada e incubada a 29 °C. A CIM foi detectada com o auxílio do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2 mg/mL), foi adicionada uma quantidade de 40 µL deste revelador em cada poço. Micro-organismos metabolicamente ativos coram-se de vermelho. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que não houve mudança de coloração.

#### **4.5.3.3. Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Foi realizada também a análise para a determinação da CBM, que determina onde não houve crescimento bacteriano a partir da CIM. Primeiramente, foram retirados 10 µL de cada concentração que não demonstrou crescimento microbiano na CIM e posteriormente foi semeada em Ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a temperatura de 29 °C por um período de 18 a 24 horas. Foi considerada a CBM a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

#### **4.5.4. Atividade Antimicobacteriana**

##### **4.5.4.1. Teste da Sensibilidade aos Extratos Vegetais**

Os ensaios colorimétricos que empregam indicadores de oxidação-redução para determinar o perfil de susceptibilidade foram anteriormente usados com micobactérias (PALOMINO *et al.*, 2002). O método REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) é um deles, rápido e simples, no qual se utiliza a resazurina como um indicador de oxi-redução para avaliar a viabilidade e a contaminação bacteriana, além de testar a atividade antimicrobiana (PALOMINO *et al.*, 2002).

##### **4.5.4.2. Preparação da Suspensão e do Inóculo Micobacteriano**

A atividade dos extratos, frações e substâncias foram avaliadas frente a três cepas de *Mycobacterium tuberculosis*: uma pan-sensível H37Rv (ATCC 27294), outra monorresistente ao antibiótico isoniazida (INH, ATCC 35822) com mutação em *katG*, códon S315T (AGC-ACC) e outra monorresistente a rifampicina (RMP, ATCC 35338), com mutação em *rpoB*, códon H526T (CAC-TAC). Isoniazida e Rifampicina são considerados os principais antibióticos para cepas *M. tuberculosis* sensíveis e possuem padrões de CIM de 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL. As cepas foram cultivadas em meio Ogawa-Kudoh por aproximadamente 14 dias a uma temperatura de 37 °C. Uma suspensão bacteriana de cada cepa foi preparada em um tubo estéril contendo pérolas de vidro e homogeneizada com água destilada para o ajuste da turbidez segundo o tubo da Escala de McFarland. Em seguida a suspensão bacteriana foi adicionada ao caldo Middlebrook 7H9 na proporção de 1:20 (FRANZBLAU *et al.*, 1998).

#### **4.5.4.3. Preparação das Placas de *screening***

As amostras foram testadas frente às cepas de *M. tuberculosis*, onde foi avaliada a sensibilidade do micro-organismo utilizando uma concentração fixa de 200 µg/mL, em uma microplaca de 96 cavidades. Nas cavidades periféricas foram adicionados 200 µL de água destilada estéril, para evitar a evaporação do meio líquido quando incubado na estufa. Nos poços de teste, adicionaram-se 75 µL de meio - 7H9 enriquecido com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) para *M. tuberculosis*, 75 µL do extrato e 75 µL do inóculo. Assim, a concentração da amostra em cada poço foi de 200 µg/mL, devido a sua diluição no meio e no inóculo. Posteriormente, a placa foi incubada na estufa a 37 °C.

#### **4.5.4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Após a triagem, foram selecionados os extratos que apresentaram atividade antimicobacteriana na concentração de 200 µg/mL, para avaliar a CIM (FRANZBLAU *et al.*, 1998). Foram adicionados 200 µL de água destilada estéril nos poços da periferia com o propósito de evitar a evaporação do meio líquido. Em seguida, em todos os poços de CMI, foram adicionados 100 µL do meio, 100 µL do extrato partindo-se de uma concentração de 200 µg/mL no primeiro poço (microdiluição 1:2) e 100 µL do inóculo bacteriano em todos os poços. Após isso, a placa foi incubada na estufa a 37 °C por sete dias.

#### **4.5.4.5. Análises pelo Método de Colorimetria**

Após a incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,02% em cada poço dos ensaios, incubando-se por mais dois dias na estufa a 37 °C. O corante age como um indicador da viabilidade celular. A leitura foi baseada na mudança de cor, do azul para o rosa quando ocorre oxi-redução do corante devido ao crescimento bacteriano (PALOMINO *et al.*, 2002).

#### **4.5.5. Avaliação da citotoxicidade *in vitro***

#### 4.5.5.1. Linhagens Celulares

Foram utilizadas linhagens de células neoplásicas: HCT116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (carcinoma de mama), SK-Mel-19 (melanoma humano) e uma linhagem não neoplásica: MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). As quais foram cultivadas em meio DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram dissolvidas em DMSO na concentração estoque de 5 mg/mL para as substâncias puras e de 50 mg/mL para os extratos brutos.

#### 4.5.5.2. Teste do Alamar blue

O Alamar Blue é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox e em células em proliferação o Alamar Blue é reduzido. A forma oxidada é azul e não-fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade celular das células testadas na presença de diferentes concentrações das substâncias e dos extratos testados. As células cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços. A cada poço foram adicionadas  $1 \times 10^4$  células em 200 µL de meio de cultura. A placa foi incubada por 24h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, as células foram tratadas, por 72 h. Como controle positivo foi utilizada a Doxorrubicina a 5µg/mL. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das substâncias e extratos. Após 24 h de tratamento, 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque a 0,4% 1:5 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue, retirou-se da estufa meia hora antes do término e a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de Elisa (Beckman e Coulter®).

Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O cálculo da CI<sub>50</sub> e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *Graph Prism* (versão 5).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Prospecção Fitoquímica

Na triagem fitoquímica para detecção das classes de metabólitos secundários presentes em cada extrato, através de análises por CCDC, foram observadas diferenças significativas nas composições químicas dos extratos das duas coletas. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato de que a 1ª coleta foi realizada em dezembro, época chuvosa na região Norte e a 2ª coleta em maio, época de seca, ou pelas coletadas terem sido feitas em locais diferentes. Os resultados são coerentes com as observações de especialistas de que a variedade e complexidade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas sofrem influência dos estímulos ambientais, bastante variáveis, de natureza química, física e biológica sobre sua composição química (ALVES, 2001; GOBBONETO e LOPES, 2007). De fato, a quantidade e a natureza dos metabólitos variam durante o ano, e até mesmo durante o dia. Assim, um estudo que visa encontrar substâncias bioativas de vegetais, deve considerar todos os fatores que possam influenciar a produção ou o acúmulo da(s) substância(s) de interesse, tendo cuidado especial com relação à época e local da coleta, secagem, transporte etc (CALIXTO, 2001). Os dados de rendimento dos extratos estão descritos na Tabela 49.

**Tabela 49:** Quantidade de massa e rendimento dos extratos

Extrato	Material seco e moído (g)	Massa do Extrato (g)	Rendimento %
<b>1ª COLETA</b>			
Folhas DCM	493,15	13,3453	2,70
Folhas MeOH	475,00	19,7568	4.15
Galhos DCM	488,76	1,5923	0.32
Galhos MeOH	467,00	13,3447	2.85
<b>2ª COLETA</b>			
Folhas Hexano	649,00	8,7421	1.34
Folhas MeOH	630,18	50,4682	8.00
Galhos DCM	1.086,00	7,4318	0.68
Galhos MeOH	890,00	49,9935	5.60

Nos ensaios fitoquímicos os extratos de baixa polaridade (hexânico e DCM) dos galhos e das folhas da 1ª e 2ª coleta, observou-se a presença de substâncias terpênicas em todos os extratos, por revelar com sulfato de cério (IV) (WAGNER e BLADT,

2001) e anisaldeído sulfúrico. A possível presença de alcaloides foi detectada apenas nos extratos DCM dos galhos da 2ª coleta, enquanto que a presença de taninos só foi observada nos extratos DCM das folhas (1ª coleta). Nos extratos metanólicos de folhas e galhos (1ª coleta) verificou-se a presença de substâncias fenólicas, possivelmente flavonoides, quando reveladas com cloreto de alumínio, pois ao analisar no UV 365 nm, observou-se intensificação da fluorescência. Os extratos DCM dos galhos de ambas as coletas, quando revelados com DPPH adquiriram uma coloração amarela sugerindo a presença de substâncias antioxidantes.

Nos extratos MeOH dos galhos da 1ª coleta e das folhas da 2ª coleta mostraram a presença de terpenos, ao serem reveladas com sulfato cérico e de taninos hidrolisáveis pela cor azulada em cloreto férrico (SIMÕES *et al.*, 2004). Apenas os extratos DCM e MeOH dos galhos da 2ª coleta revelaram manchas de cor laranja em Dragendorff, indicando a presença de alcaloides. Segundo alguns autores os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, porém pode haver um acúmulo preferencial em determinados órgãos (PELLETIER, 1988). As cromatoplasmas quando reveladas com cloreto de alumínio, pode-se observar intensificação da fluorescência sob luz UV 365 nm, caracterizando possivelmente compostos flavonoídicos. Ao reagirem com DPPH, todos os extratos metanólicos apresentaram a coloração amarelada, indicando a presença de substâncias com atividade antioxidante (CONFORTI *et al.*, 2002) As análises em CCDC além de confirmarem algumas classes de metabólitos, indicaram a presença de substâncias fluorescentes sob luz UV, sugerindo a existência de compostos aromáticos.

## 5.2. Identificação das Substâncias Isoladas dos Extratos da Primeira Coleta de *Duroia macrophylla*

Dentre os extratos obtidos de *D. macrophylla*, iniciou-se o fracionamento com o extrato FDCM da 1ª coleta, devido sua elevada atividade antimicobacteriana. Após o fracionamento em coluna cromatográfica e análise das frações obtidas, constatou-se que nenhuma das frações apresentou alto grau de pureza. Portanto, as frações com maior quantidade de massa foram novamente analisadas em CCDC para a escolha de um novo sistema de fracionamento. A fração 17-21.1-5.14 após ser analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi identificada como sendo a mistura do  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol**. A fração 25-40.6.4 mostrou elevado grau de pureza quando analisada por RMN de  $^1\text{H}$  (60 MHz), no

entanto, mostrou ser constituída por uma mistura de dois ácidos triterpênicos, os quais foram purificados por CLAE e identificados por RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) como **ácido oleanólico** (substância I) e **ácido ursólico** (substância II).

Após análise detalhada dos espectros de RMN (mono e bidimensionais) a fração 11-12 (2 mg) obtida através do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das folhas foi identificada como **4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona** (substância III).

Do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico dos galhos foi obtida a fração 7-8 (3 mg), a qual foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC. Através destas análises e comparação com dados da literatura (TOMAZ *et al.*, 2008) foi possível identificar esta substância como **ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico** (substância IV).

### 5.2.1 Identificação dos triterpenos

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 25-40.6.4 (4 mg) mostraram a presença de sinais entre  $\delta$  0,7 e 1,2 (singletos), característicos de hidrogênios metílicos de triterpenos; dois sinais em  $\delta$  5,31 (*t*;  $J = 3,5$  Hz) e 5,27 (*t*;  $J = 3,5$  Hz) característicos de hidrogênio olefínico e também dois sinais em  $\delta$  3,23 (*d*;  $J = 5,0$  Hz) e 3,21 (*d*;  $J = 5,3$  Hz) referentes a hidrogênios carbinólicos (H-3). Estes dados confirmavam que esta fração se tratava da mistura de dois triterpenos com esqueleto oleanano.

Após a purificação dos dois triterpenos por CLAE-DAD, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 14) da primeira fração (25-40.6.4.1) mostrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,31 (*t*;  $J = 3,5$  Hz) e da segunda fração (25-40.6.4.2) em  $\delta$  5,27 (*t*;  $J = 3,5$  Hz), sinalizando para a presença dos hidrogênios olefínicos em C-12 deste tipo de triterpenos.

#### 5.2.1.1 Identificação da substância I

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 14) do primeiro triterpeno (25-40.6.4.1), verificou além da presença do tripleto em  $\delta$  5,31 ( $J = 3,5$  Hz; 1H); um *dd* em  $\delta$  3,23 ( $J = 10,7$  e  $4,7$  Hz; 1H) e dois dubletos largos em  $\delta$  2,82 e 2,87 ( $J = 4,0$  e  $5,0$  Hz), caracterizando o esqueleto oleanano da **substância I** (Figura 13).

O mapa de contorno HSQC (Figura 15) mostra as correlações entre o hidrogênio em  $\delta$  5,31 com o carbono em  $\delta$  122,8, característico de carbono vinílico C-12 do ácido oleanólico (Figura 14). No mapa de contorno HMBC (Figura 16) foi possível observar a

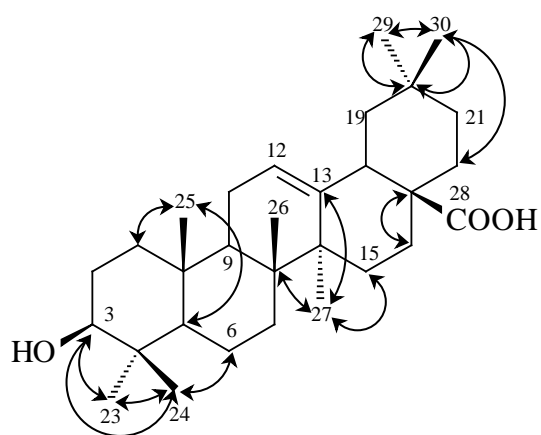


correlação do hidrogênio em  $\delta$  0,94 com o carbono do grupo carboxílico em  $\delta$  180,0 (C-28).

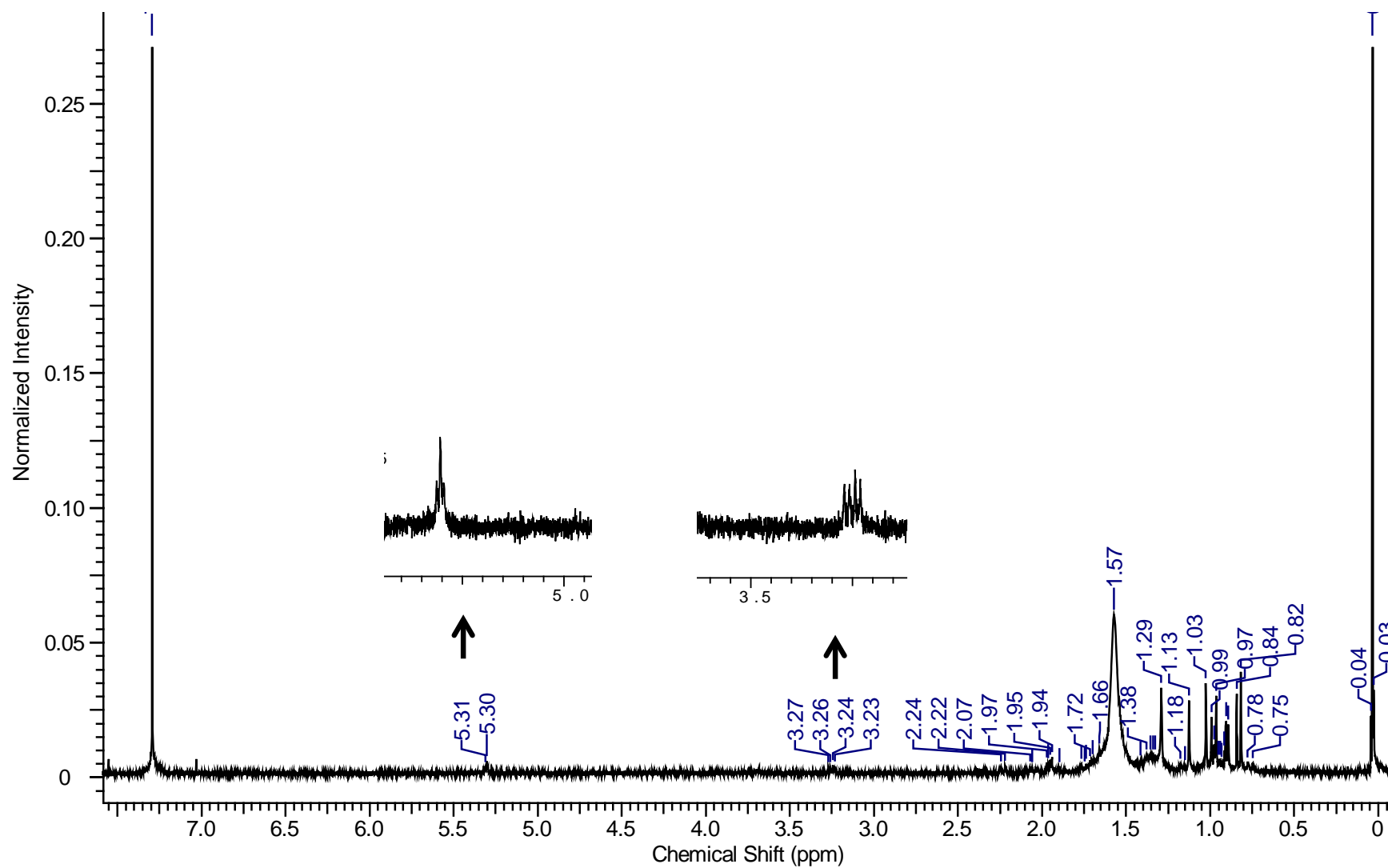
A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais (Tabela 50) e o espectro de massas, o qual mostrou um pico do íon molecular em  $m/z$  456 e um padrão de fragmentação comum de triterpenos (OGUNKOYA, 1981), confirmaram a identificação desta substância como sendo o ácido oleanólico (**substância I**). (MAHATO & KUNDU 1994).

**Tabela 50:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e correlações heteronucleares do ácido oleanólico.

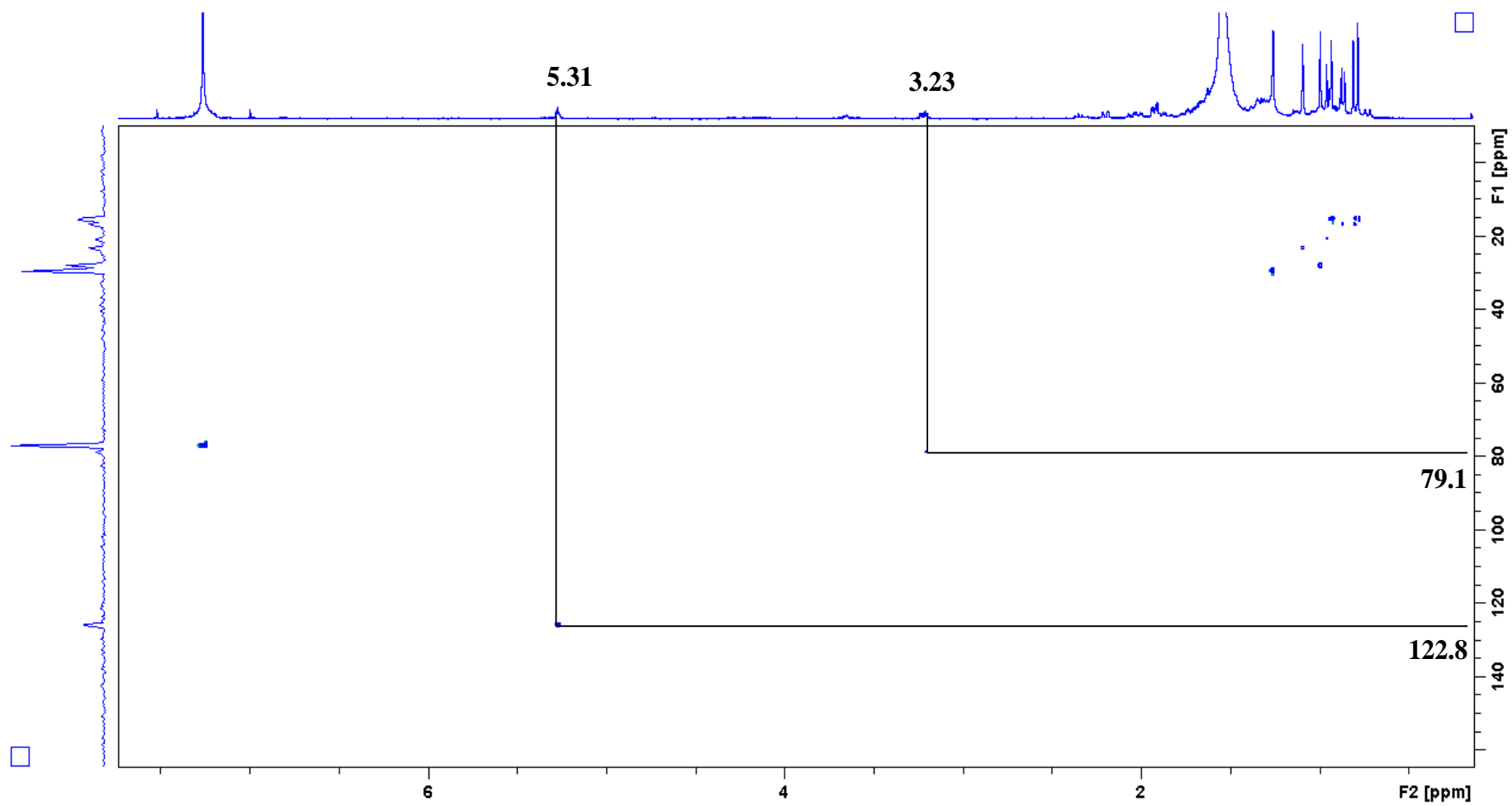
Posição	$\delta_{\text{C}}$	HSQC	HMBC
		$\delta_{\text{H}}$ ( $m$ ; $J$ em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
1	38,5	1,63 ( <i>m</i> )	
2	28,1	1,60 ( <i>m</i> )	
3	79,1	3,23 ( <i>dd</i> ; 10,7; 4,7)	
4	38,8	-	
5	55,3	0,74 ( <i>d</i> ; 11)	
6	18,8	1,54 ( <i>m</i> )	
7	32,7	1,49 ( <i>m</i> )	
8	39,3	-	
9	47,6	1,54 ( <i>m</i> )	
10	37,0	-	
11	23,8	0,94 ( <i>m</i> )	
12	122,8	5,31 ( <i>t</i> ; 3,5)	
13	143,5	-	
14	41,5	-	
15	17,3	1,60 ( <i>m</i> )	
16	23,7	0,94 ( <i>m</i> )	C-17
17	47,3	-	
18	41,2	2,82 ( <i>dl</i> ; 4,0)	
19	41,5	2,87 ( <i>dl</i> ; 5,0)	
20	31,0	-	
21	32,6	1,62 ( <i>m</i> )	
22	33,9	1,30 ( <i>m</i> )	
23	28,0	1,00 ( <i>s</i> )	C-3, C-24
24	16,8	0,79 ( <i>s</i> )	C-3, C-6
25	15,3	0,93 ( <i>s</i> )	C-1 C-5
26	15,5	0,79 ( <i>s</i> )	
27	26,0	1,16 ( <i>s</i> )	C-8, C-13
28	180,0	-	
29	33,1	0,92 ( <i>s</i> )	C-20, C-30
30	23,7	0,94 ( <i>s</i> )	C-20, C-22



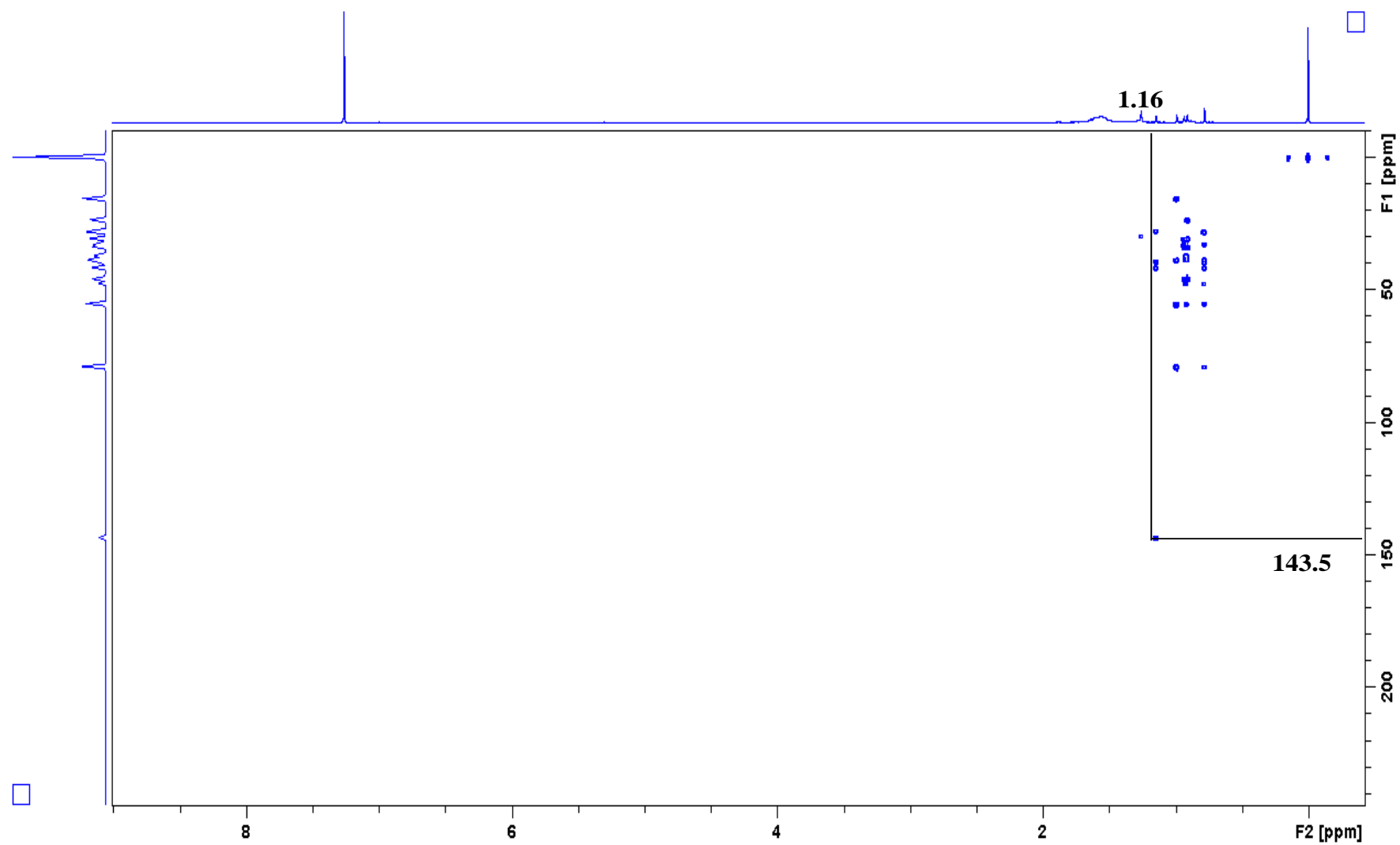
**Figura 13:** Estrutura do ácido oleanólico e suas correlações no HMBC.



**Figura 14:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido oleanólico em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



**Figura 15:** Mapa de contorno HSQC do ácido oleanólico em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



**Figura 16:** Mapa de contorno HMBC do ácido oleanólico em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).

### 5.2.1.2 Identificação da Substância II

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18) do segundo triterpeno (25-40.6.4.2) mostrou sinais na região entre  $\delta$  0,79 e 1,72 característicos de hidrogênios metílicos e  $\delta$  1,91 (2H; *dd*;  $J = 8,6$  e  $3,6$  Hz), além dos sinais observados em  $\delta$  3,22 (*dd*;  $J = 10,8$  e  $4,9$  Hz) e 5,31 (*t*;  $J = 3,6$  Hz) estes sinais são característicos de esqueleto ursano da **substância II** (Figura 17).

Através dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC pôde-se definir que sete sinais correspondem aos carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), nove sinais aos carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), sete aos carbonos metínicos ( $\text{CH}$ ) e sete C quaternários (C), resultando em 30 carbonos característicos de triterpenos pentacíclicos.

No mapa de contorno HMBC (Figura 20) foram observadas as correlações que indicaram a presença dos carbonos do ácido carboxílico em  $\delta$  179,6 (C-28), olefínicos em  $\delta$  125,9 e 137,9 (C-12 e C-13), respectivamente. Por estes dados, assim como pelos deslocamentos químicos observados no mapa de contorno HSQC (Figura 19) e a comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU 1994) o triterpeno como foi identificado como ácido ursólico (Tabela 51).

É comum isolar a mistura do ácido ursólico com ácido oleanólico, devido à grande semelhança química entre estas moléculas. Apenas de algumas diferenças entre elas permitem distingui-las por meio de RMN: os deslocamentos químicos dos H-18, C-18, C-12, C-13 e C-29 (KONTOGIANNI *et al.*, 2009) e, principalmente, a multiplicidade dos H-29, um dubleto no ácido ursólico e um singleto no ácido oleanólico. Este é o primeiro relato da ocorrência destes dois triterpenos no gênero *Duroia*.

**Tabela 51:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e correlações heteronucleares do ácido ursólico.

Posição	HSQC		HMBC
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , $J$ em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
<b>1</b>	36,8	1,72 ( <i>m</i> )	
<b>2</b>	27,7	1,60 ( <i>m</i> )	
<b>3</b>	78,7	3,22 ( <i>dd</i> ; 10,6; 5)	
<b>4</b>	38,5	-	
<b>5</b>	55,2	1,34 ( <i>m</i> )	

continuação da Tabela 51.

6	18,3	1,60 (m)	
7	32,9	1,72 (m)	
8	39,5	-	
9	47,3	1,60 (m)	
10	38,0	-	
11	23,1	1,91 (dd; 8,6; 3,6)	
12	125,9	5,28 (t; 3,6)	
13	137,9	-	
14	41,2	-	
15	27,7	1,60 (m)	
16	25,0	1,34 (m)	
17	48,1	-	
18	52,3	2,2 (d; 10,8)	
19	38,5	1,00 (s)	
20	38,5	0,95 (s)	
21	30,3	1,27 (br s)	
22	36,7	1,72 (m)	
23	28,9	1,00 (s)	C-5
24	15,6	0,79 (s)	C-2, C-3, C-4
25	15,4	0,94 (s)	C-4, C-5
26	16,8	0,82 (s)	C-8, C-14
27	23,5	1,10 (s)	C-8, C-13, C-14, C-15
28	179,6	-	
29	17,0	0,87 (d; 6,4)	C-18, C-20
30	21,4	0,97 (s)	C-20, C-21

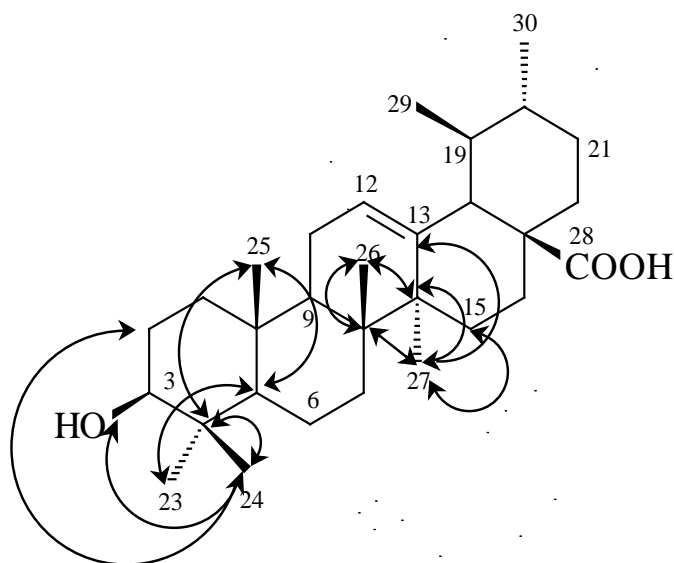
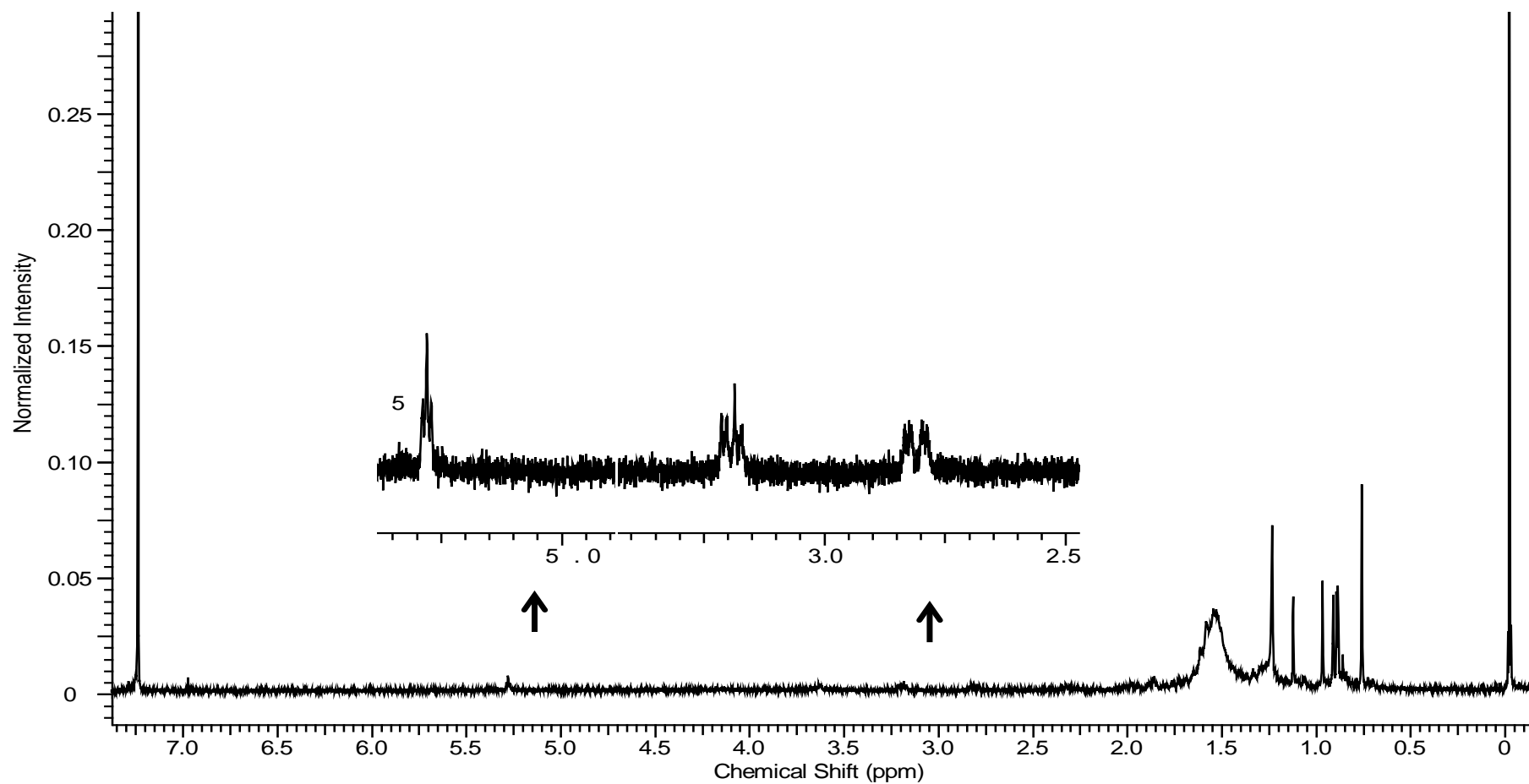
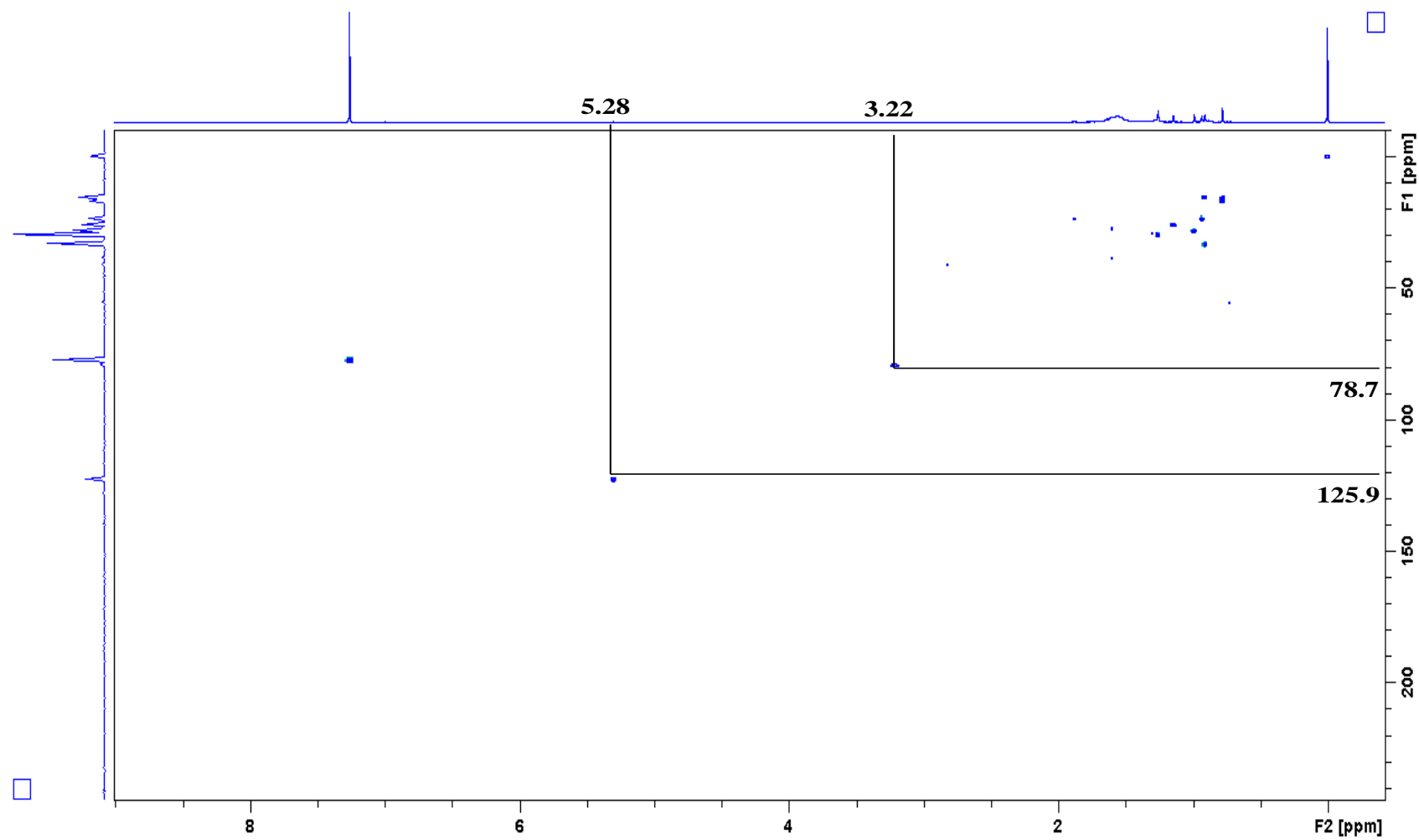


Figura 17: Estrutura do Ácido ursólico e suas correlações no HMBC..

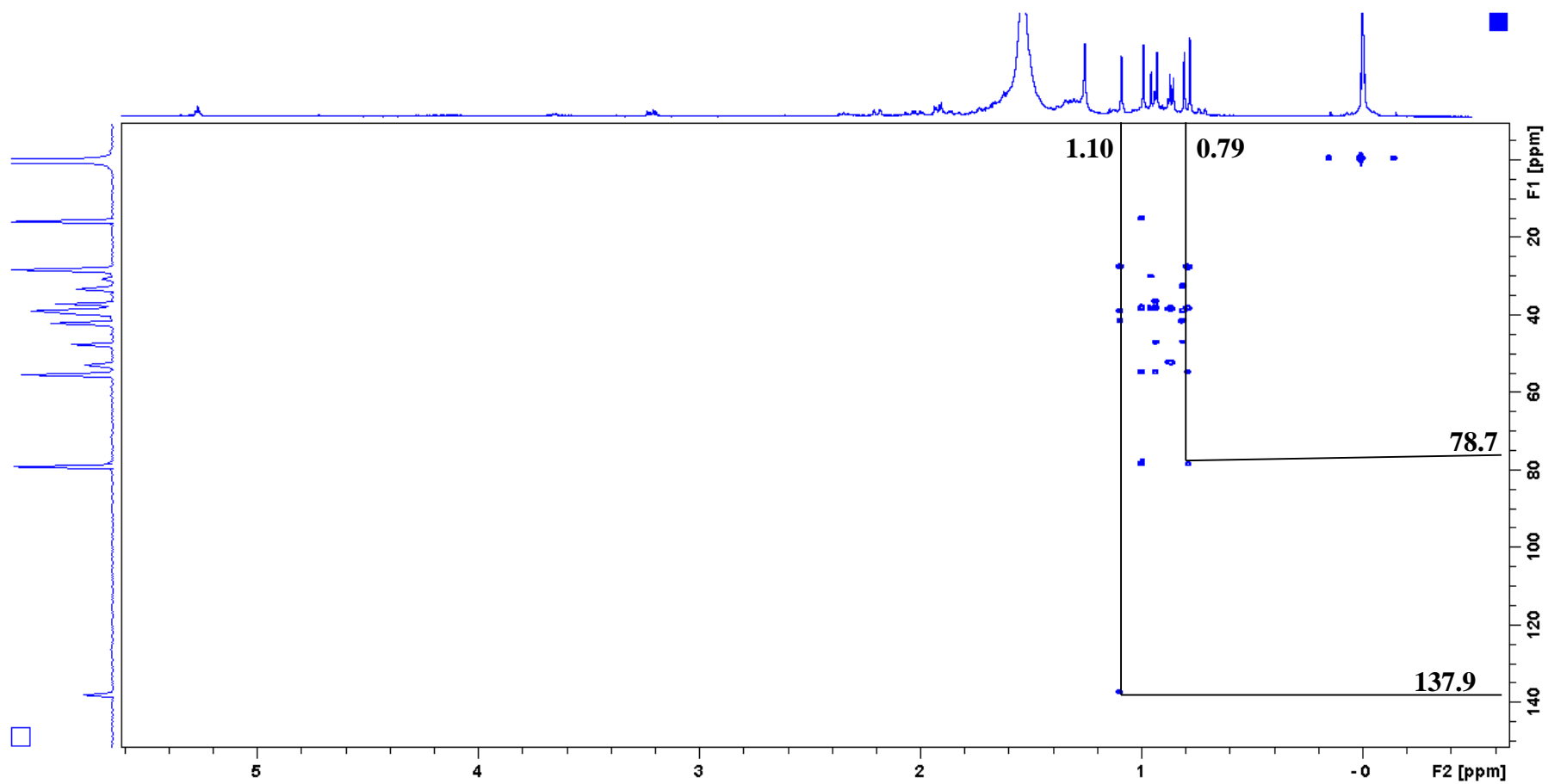


**Figura 18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido ursólico em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).





**Figura 19:** Mapa de contorno HSQC do ácido ursólico em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



**Figura 20:** Mapa de contorno HMBC do ácido ursólico em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).

### 5.2.2 Identificação da Sustância III

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 22 e 23) da substância III, foram observados dois dubletos em  $\delta$  6,29 e 7,71, ambos com  $J = 15,9$  Hz e integral para 1H, enquanto que, um singleto em  $\delta$  3,96 com integral para 3H caracterizou o grupo substituinte metoxila. Foram observados dois dubletos em  $\delta$  6,86 e 7,46, ambos com  $J = 8,6$  Hz e com integral para 2H, caracterizando os hidrogênios homotópicos H-3 e H-5, H-2 e H-6, respectivamente. Observou-se um duplo dubleto em  $\delta$  7,70, com constantes de acoplamento de 8,4 e 1,9 Hz corresponde ao hidrogênio 6', acoplando em *meta* com o dubleto em  $\delta$  7,58 (H-2') e em *orto* com o dubleto em  $\delta$  6,86 (H-5'), caracterizando um derivado benzênico *para*-dissubstituído.

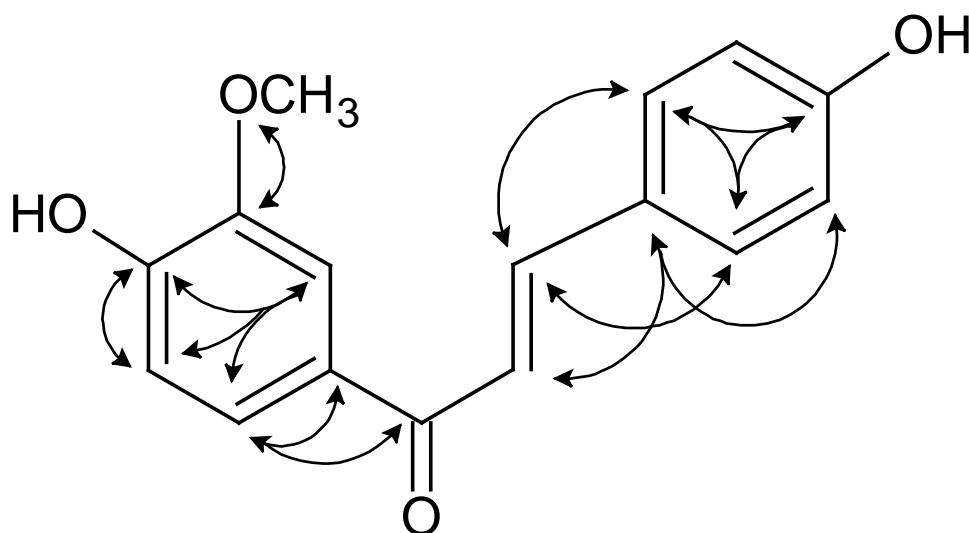
Com a análise detalhada do mapa de contorno de HSQC (Figura 24) observou-se 10 acoplamentos entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos em  $\delta$  130,4 correspondem aos carbonos C-2 e C-6, em  $\delta$  115,7 aos C-3 e C-5, os carbonos olefinicos  $\alpha$  e  $\beta$  foram observados em  $\delta$  146,6 e 146,8, respectivamente; em  $\delta$  121,0 corresponde ao C-2', em  $\delta$  114,3 ao C-5', em  $\delta$  125,2 ao C-6' e em  $\delta$  56,6 ao carbono da metoxila.

No mapa de contorno de HMBC (Figura 25) foram observados os acoplamentos de longa distância que permitiram localizar os substituintes na estrutura. Além dos acoplamentos  $^3J$  observado entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de suma importância para definir a posição da metoxila e das duas hidroxilas, levou a definir os carbonos quaternários em  $\delta$  171,4 (C=O), em  $\delta$  127,0 (C-1), em  $\delta$  158,0 (C-4), em  $\delta$  112,3 (C-1'), em  $\delta$  146,2 (C-3') e em  $\delta$  150,8 (C-4'). As correlações no HMBC, HSQC e os dados de  $^1\text{H}$  e estão descritas na Tabela 52.

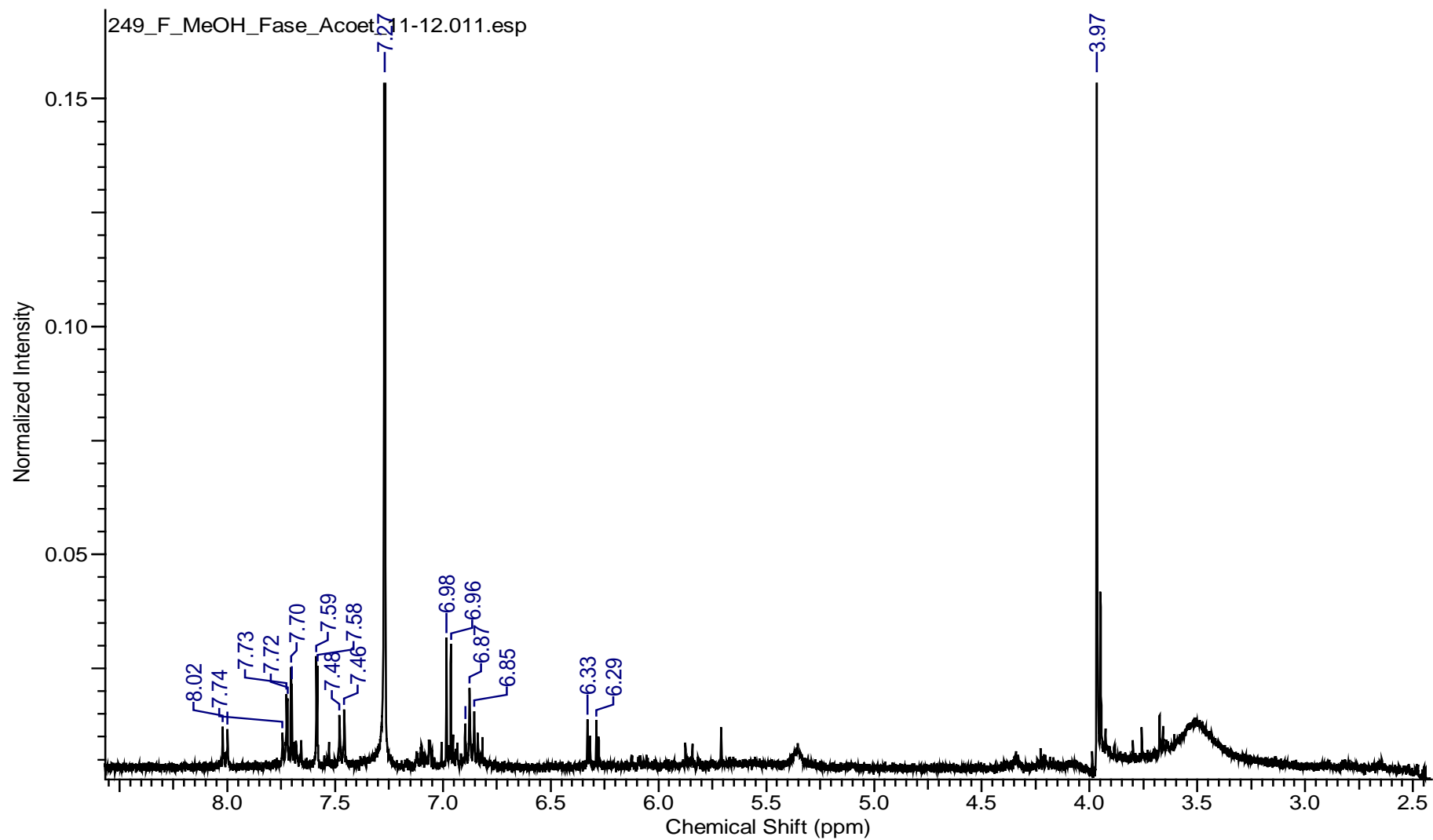
A análise minuciosa dos dados obtidos por RMN e comparação com os dados existentes na literatura (KAWAI *et al.*, 2012) foi possível identificar esta chalcona como **4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona** (Figura 21), sendo o 1º relato no gênero *Duroia*.

**Tabela 52:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e correlações heteronucleares da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona.

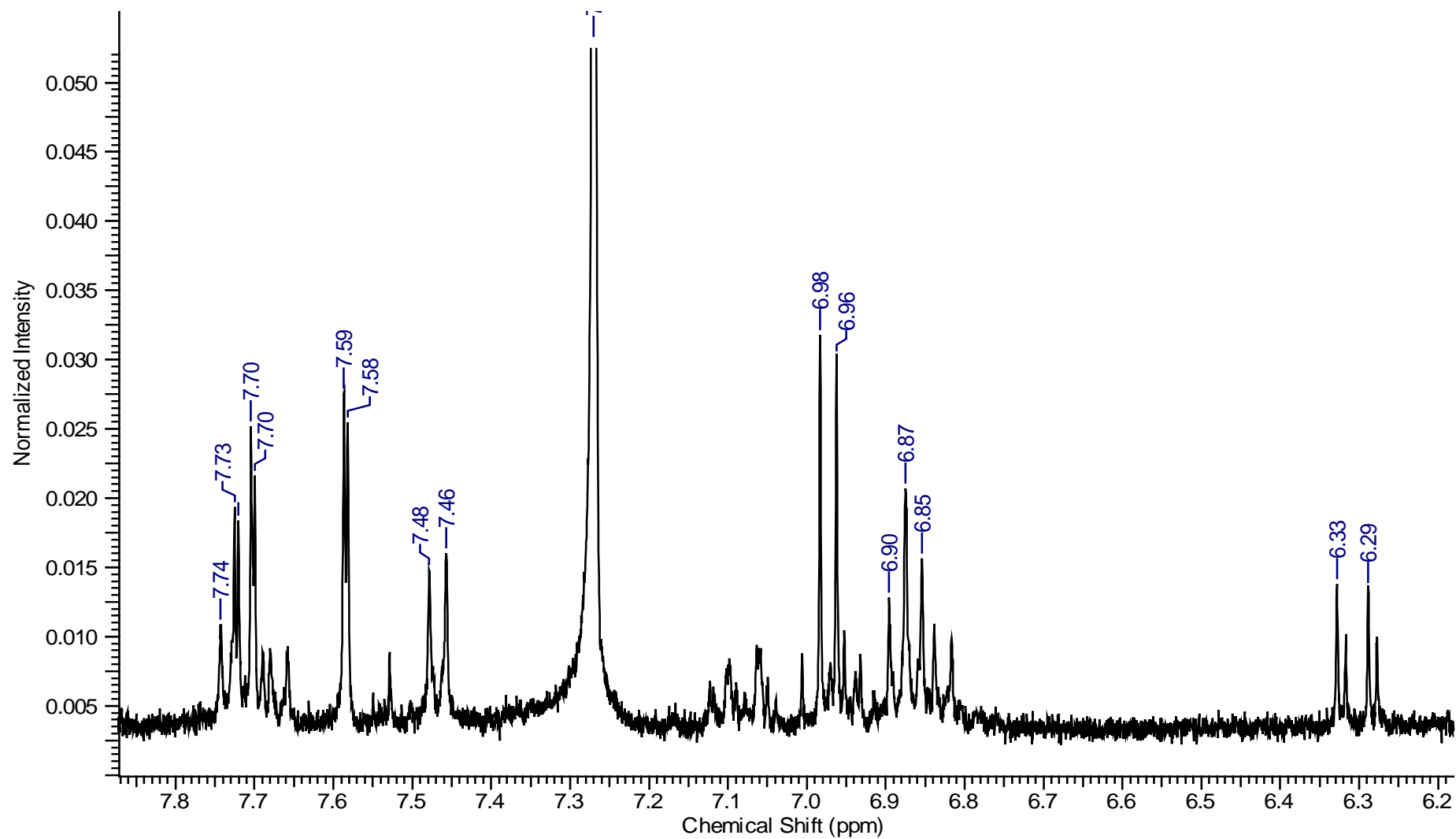
Posição	C	HSQC		HMBC $^{2-4}J_{\text{C,H}}$
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> em Hz)	
1	C	127,0		
2	CH	130,4	7,46 ( <i>d</i> , 8,6)	C-6, C- $\beta$ , C-4
3	CH	115,7	6,86 ( <i>d</i> , 8,6)	C-1
4	C	158,0		
5	CH	115,7	6,86 ( <i>d</i> , 8,6)	C-1
6	CH	130,4	7,46 ( <i>d</i> , 8,6)	C-2, C- $\beta$ , C-4
$\beta$	CH	146,8	7,70 ( <i>d</i> , 15,9)	C-6
$\alpha$	CH	146,6	6,29 ( <i>d</i> , 15,9)	C-1
1'	C	112,3		
2'	CH	121,0	7,58 ( <i>d</i> , 1,9)	C-4', C-6'
3'	C	146,2		
4'	C	150,8		
5'	CH	114,3	6,96 ( <i>d</i> , 8,4)	C-2', C-4'
6'	CH	125,2	7,73 ( <i>dd</i> , 8,4; 1,9)	C-1', C=O
OMe	CH <sub>3</sub>	56,2	3,96 ( <i>s</i> )	C-3'
C=O		171,4		



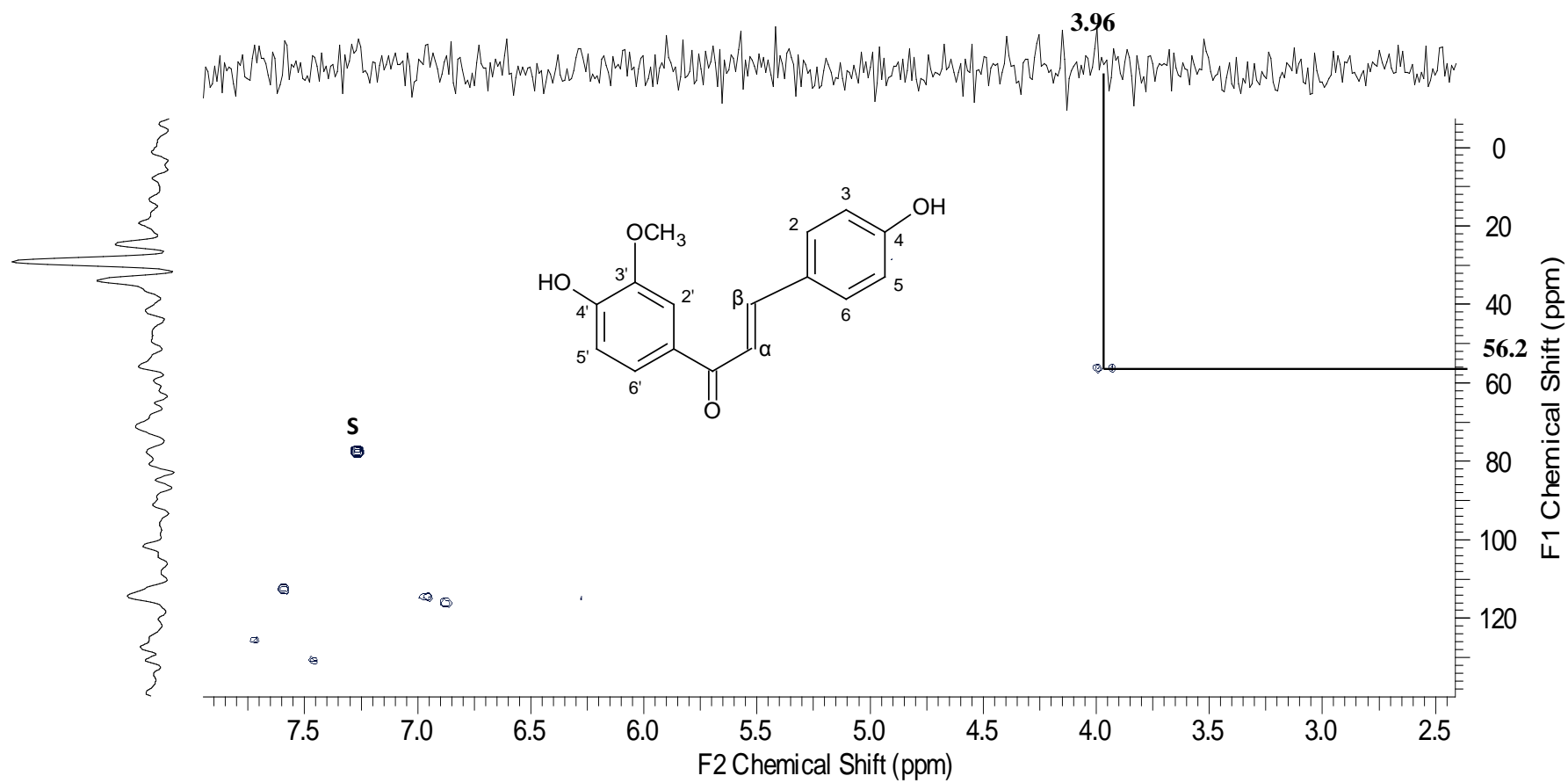
**Figura 21:** Estrutura da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona e suas correlações no HMBC.



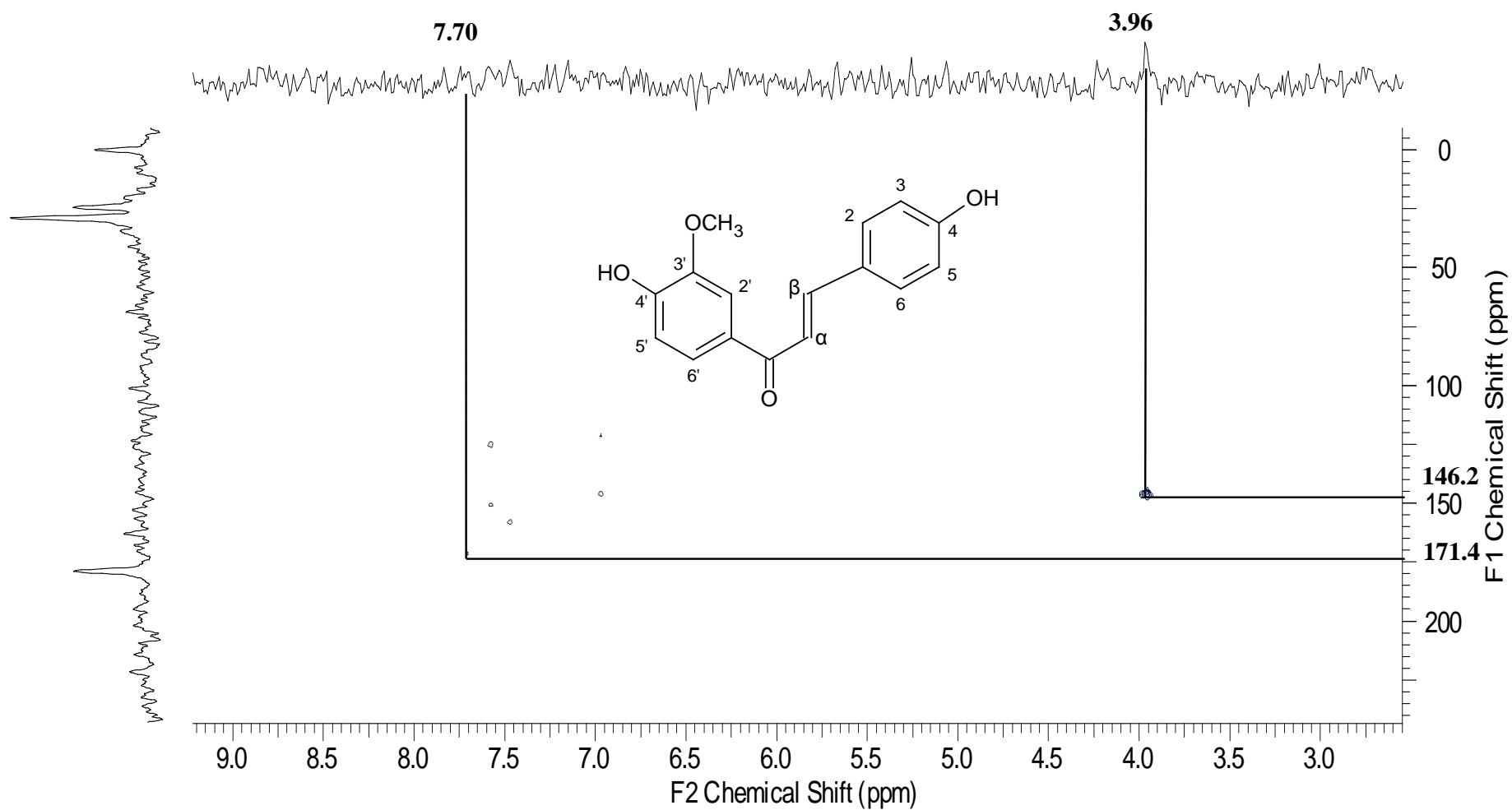
**Figura 22:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



**Figura 23:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



**Figura 24:** Mapa de contorno HSQC da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz). S: solvente.



**Figura 25:** Mapa de contorno HMBC da 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



### 5.2.3 Identificação da Sustância IV

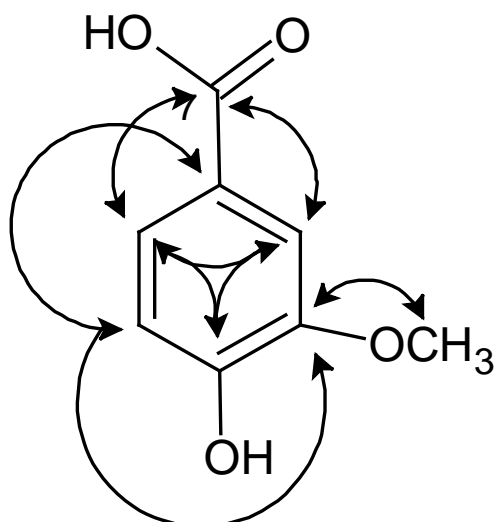
Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27) da substância IV mostraram a presença de sinais característicos de anel aromático em  $\delta$  7,57 (*d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2), 6,97 (*d*,  $J=8,4$  Hz, H-5) e 7,69 (*dd*,  $J=8,4$  e 1,8 Hz, H-6). O acoplamento em *orto* ( $J = 8,4$  Hz) de H-5 e H-6 e em *meta* ( $J=1,8$  Hz) de H-2 e H-6 evidenciaram substituição em C-1, C-3 e C-4. Foi observada também a presença de um grupamento metoxila através do singlete em  $\delta$  3,98 (Tabela 53).

O mapa de contorno HSQC (Figura 28) mostra as correlações dos carbonos metínicos do anel aromático:  $\delta$  7,57 (H-2) x  $\delta$  112,5 (C-2);  $\delta$  6,97 (H-5) x  $\delta$  114,6 (C-5);  $\delta$  7,69 (H-6) x  $\delta$  125,5 (C-6) e entre os hidrogênios em  $\delta$  3,98 com o carbono em  $\delta$  56,2. Através da análise do mapa de contorno HMBC (Figura 29) foi possível determinar o padrão de substituição no anel aromático, assim como os carbonos quaternários. O sinal em  $\delta$  168,4 foi atribuído ao grupo carboxílico (C-7) e em  $\delta$  154,0 (C-4) ao carbono com o grupo hidroxila (OH).

A análise dos dados espectrais de RMN aliado à comparação com dados da literatura (TOMAZ *et al.*, 2008) permitiu identificar a substância IV como sendo o **ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico** (Figura 26), relatada pela 1ª vez para uma espécie do gênero *Duroia*.

**Tabela 53:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e correlações heteronucleares do ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico.

Posição	$\delta_{\text{C}}$	HSQC	HMBC
		$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> em Hz)	$^{2,4}J_{\text{C,H}}$
1	121,1		
2	112,0	7,57 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-4, C-6, C-7
3	146,1		
4	150,7		
5	114,1	6,97 ( <i>d</i> ; 8,4)	C-1, C-3
6	125,1	7,69 ( <i>dd</i> ; 1,8; 8,4)	C-2, C-4, C-7
7	171,0		
H <sub>3</sub> CO	56,1	3,98 ( <i>s</i> )	C-3



**Figura 26:** Estrutura do ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico e suas correlações no HMBC.

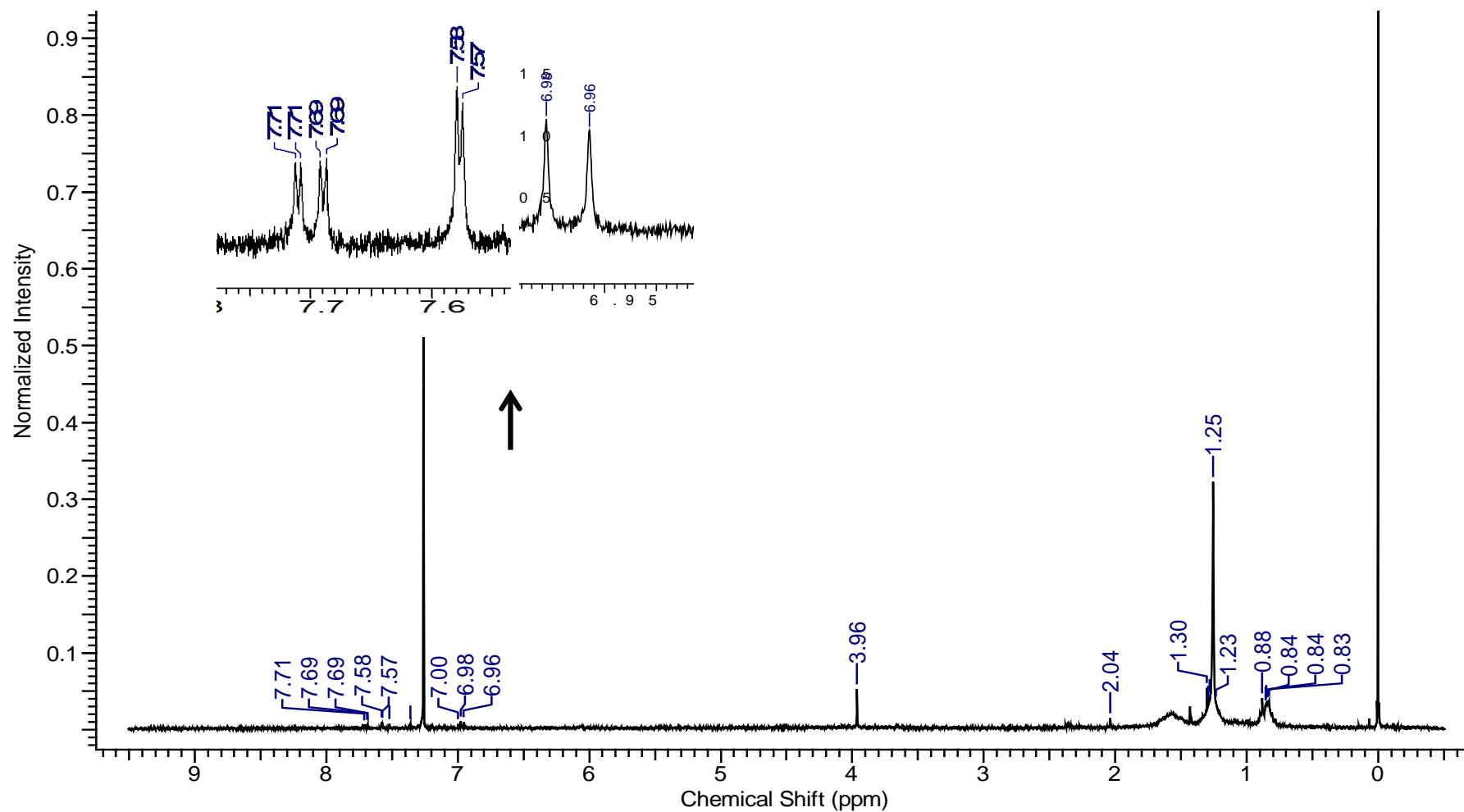
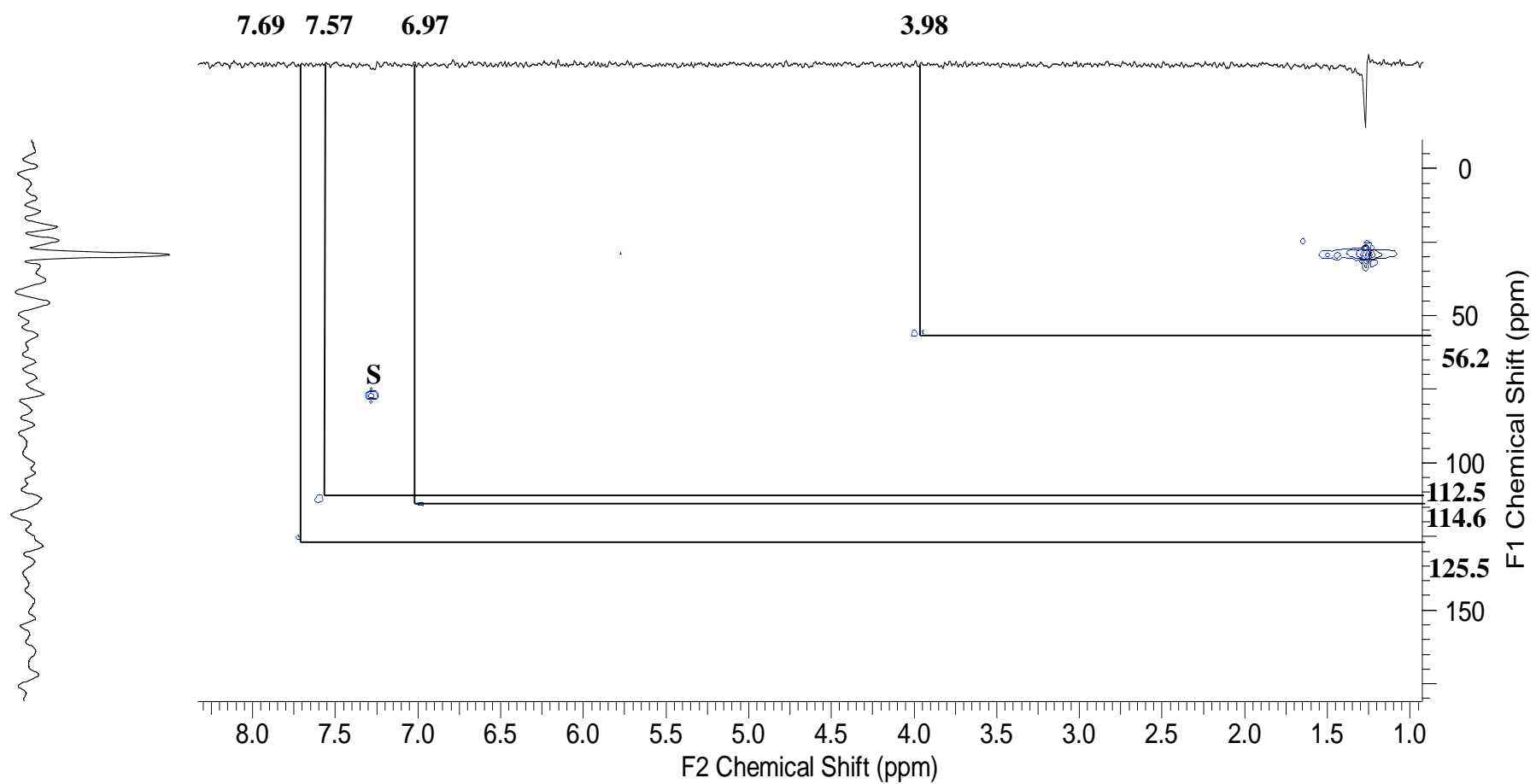
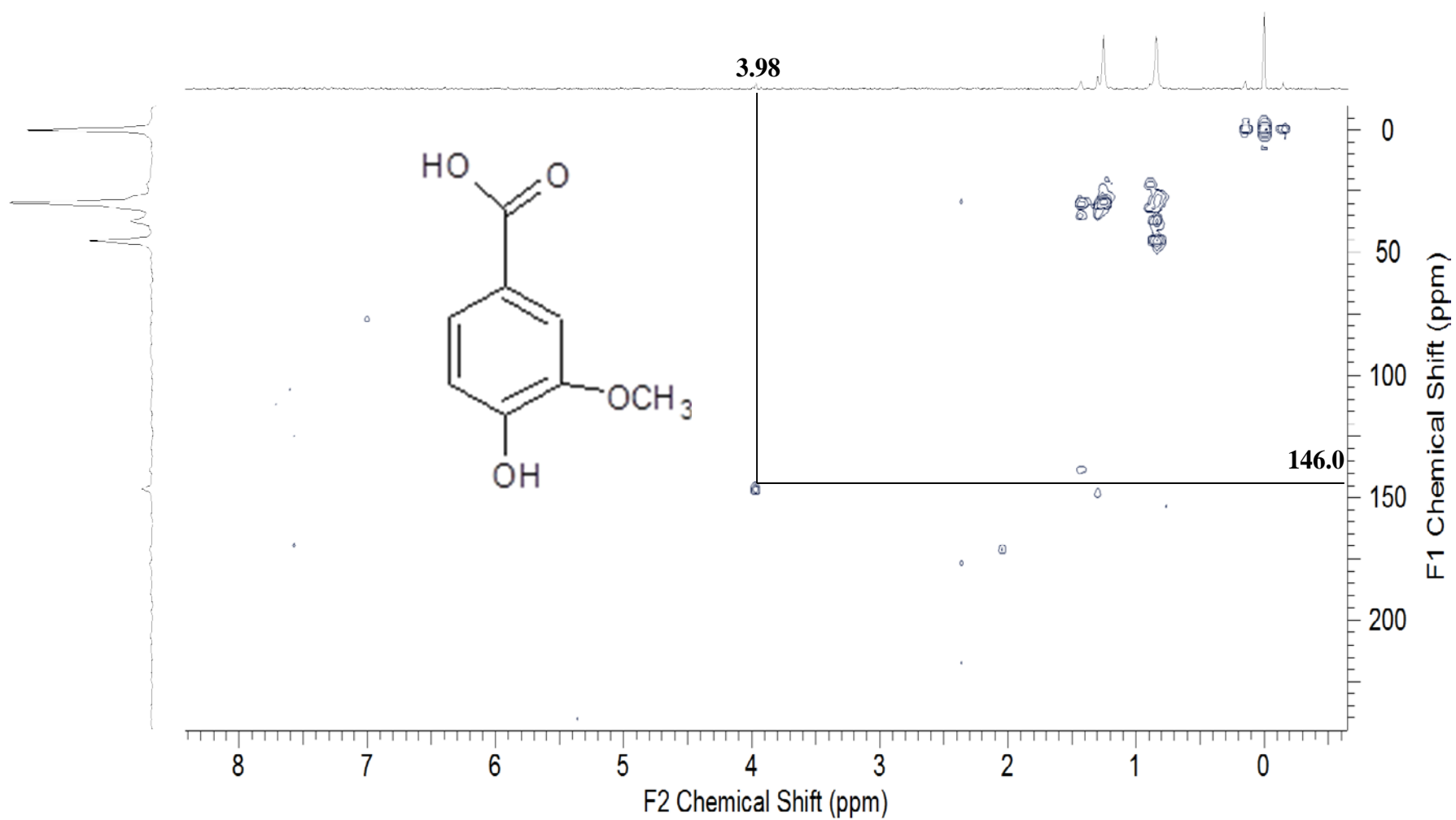


Figura 27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico, em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



**Figura 28:** Mapa de contorno HSQC do ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz). Legenda: S=solvente.



**Figura 29:** Mapa de contorno HMBC do ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico em CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).

### 5.3. Identificação das Substâncias Isoladas dos Extratos da Segunda Coleta de *Duroia macrophylla*

Foram identificados oito alcaloides indólicos monoterpênicos dos extratos diclorometânico e metanólico dos galhos de *D. macrophylla*, sendo o primeiro registro destes alcaloides no gênero *Duroia*. Os espectros de massas (Anexo 2) mostraram o íon molecular  $m/z$  368 para todos os alcaloides. Com análise dos dados de espectrometria de massas aliados aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , DEPT, HSQC, HMBC e COSY (Anexo 3) conclui-se que todos os alcaloides possuem a fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ .

Os alcaloides dessa classe apresentam quatro carbonos estereogênicos (C-3, C-15, C-19 e C-20) e 16 estereoisômeros possíveis. Entretanto, como H-15 é biogeneticamente  $\alpha$ , o número de estereoisômeros é reduzido a oito, além de o substituinte  $\text{CH}_3$ -18 dessa classe de substâncias pode estar nas posições  $\alpha$  ou  $\beta$  (SHAMMA, 1963). Segundo a literatura, os dois grupos de estereoisômeros resultantes foram classificados da seguinte forma:

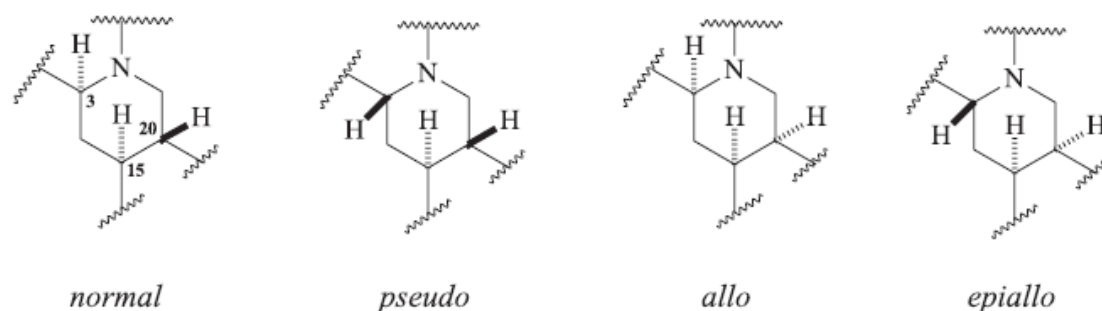
*normais* (H-3 $\alpha$ ; H-20 $\beta$ ; H-19 $\beta$ ) (H-3 $\alpha$ ; H-20 $\beta$ ; H-19 $\alpha$ )

*pseudos* (H-3 $\beta$ ; H-20 $\beta$ ; H-19 $\beta$ ) (H-3 $\beta$ ; H-20 $\beta$ ; H-19 $\alpha$ )

*allos* (H-3 $\alpha$ ; H-20 $\alpha$ ; H-19 $\beta$ ) (H-3 $\alpha$ ; H-20 $\alpha$ ; H-19 $\alpha$ )

*epiallos* (H-3 $\beta$ ; H-20 $\alpha$ ; H-19 $\beta$ ) (H-3 $\beta$ ; H-20 $\alpha$ ; H-19 $\alpha$ )

Dependendo da estereoestereoquímica dos centros estereogênicos C-3, C-15 e C-20, os alcaloides indólicos pentacíclicos podem apresentar configurações distintas nas junções dos anéis C/D/E dando origem às conformações conhecidas como *normal*, *pseudo*, *allo* e *epiallo* (WENKERT *et al.*, 1976). A Figura 30 ilustra alguns exemplos de alcaloides indólicos pentacíclicos das séries mencionadas. A definição das conformações desses alcaloides é extremamente importante não apenas para a determinação de suas estruturas moleculares, mas principalmente, para o estudo de seus mecanismos de ação farmacológica.

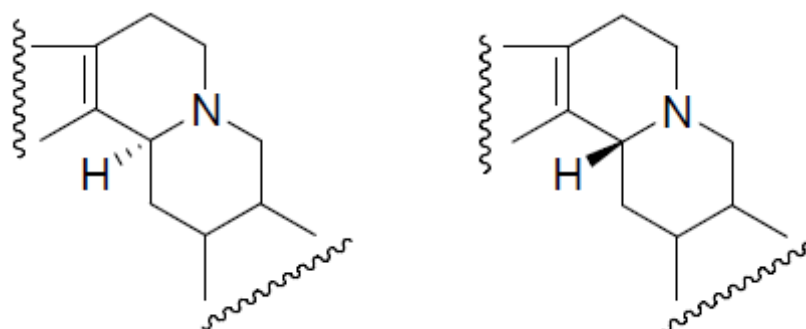


**Figura 30:** Estereoquímica relativa dos centros estereogênicos C-3, C-15 e C-20, que caracteriza a estereoquímica do anel D dos alcaloides indólicos nas séries *normal*, *pseudo*, *allo* e *epiallo*.

De acordo com as sínteses orgânicas de ioimbinas, pode-se determinar entre os isômeros C/D *trans* [*normal/allo*] e os isômeros C/D *cis* [*pseudo/epiallo*] dos derivados da ioimbina pelo deslocamento químico no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos carbonos C-3 e C-6, no qual o primeiro grupo apresenta valores maiores que o segundo grupo, conforme a Tabela 54 (WENKERT *et al.*, 1961). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  os isômeros que apresentam configurações H-3 $\beta$  (*epiallo* e *pseudo*) mostram deslocamento químico em aproximadamente  $\delta$  4,4 indicando uma união de anéis na forma *trans*-quinolizidina. Na configuração H-3 $\alpha$  (*allo* e *normal*) o deslocamento químico é menor, sendo observado em aproximadamente  $\delta$  3,4 (WENKERT *et al.*, 1961; MANSKE, 1965).

**Tabela 54:** Deslocamentos químicos típicos para C-3 e C-6 para alcaloides de esqueleto ioimbina.

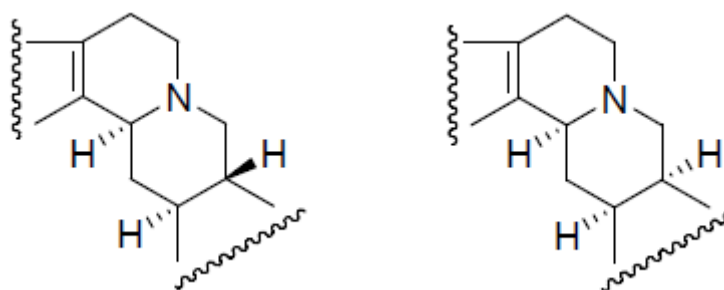
	<i>Normal/allo</i> ( $\delta$ )	<i>Pseudo/epiallo</i> ( $\delta$ )
C-3	$60 \pm 1$	$53,5 \pm 1$
C-6	$21,5 \pm 1$	$16,5 \pm 1$



Para diferenciar entre *normal* e *allo* observam-se os deslocamentos do C-14 e C-20, em *normal* (junção D/E *trans*), os deslocamentos químicos apresentam valores maiores que em *allo* (junção D/E *cis*), como mostra na Tabela 55 (HONTY *et al.*, 1982).

**Tabela 55:** Deslocamentos químicos típicos para C-14 e C-20 para alcaloides de esqueleto ioimbina.

	<i>Normal</i> ( $\delta$ )	<i>Allo</i> ( $\delta$ )
C-14	34 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1
C-20	40 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1



O valor de deslocamento químico do H-19 fornece uma indicação sobre a posição relativa desse hidrogênio. Quando seu valor de  $\delta_H$  se encontra em aproximadamente  $\delta$  4,4, ele pertence à série H-19 $\beta$ , 20 $\alpha$ , posição *trans*. Entretanto, se esses átomos estiverem dispostos em posição *cis*, o valor de  $\delta_H$  do H-19 estará em aproximadamente  $\delta$  3,4 (BRUYN *et al.*, 1989).

A maioria dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  registrados na literatura para os alcaloides indólicos pentacíclicos foram obtidos por técnicas unidimensionais. Com a disponibilidade de técnicas de RMN bidimensionais (homo e heteronucleares), a elucidação estrutural destas substâncias complexas pôde ser esclarecida, principalmente no que concerne aos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos hidrogênios ligados aos carbonos  $sp^3$ . Com base nas informações fornecidas dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , principalmente pelos experimentos de HMBC, HMQC e COSY, foi realizado um estudo sobre a estrutura, configuração e conformação dos alcaloides isolados de *D. macrophylla*.



### 5.3.1. Identificação da Substância V

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 32) apresentou os sinais do NH em  $\delta$  9,86 e dos hidrogênios aromáticos do núcleo indólico em  $\delta$  6,89 (*d*;  $J=2,3$  Hz; H-9),  $\delta$  6,68 (*dd*;  $J=8,7$  e  $2,3$  Hz; H-11) e  $\delta$  7,18 (*d*;  $J=8,7$  Hz; H-12), O acoplamento de H-11 em *orto* ( $J=8,7$  Hz) com H-12 e em *meta* ( $J=2,3$  Hz) com H-9 evidenciou substituição no carbono 10. Também foram observados: um duplete em  $\delta$  1,37 ( $J=6,0$  Hz) relacionado ao grupo  $\text{CH}_3$ -18; um duplo quarteto em  $\delta$  4,48 ( $J=10,2$  e  $6,0$  Hz) relacionado ao H-19, um singleto correspondente ao H-17 em  $\delta$  7,51; dois singletos das duas metoxilas em  $\delta$  3,68 e 3,77, com integral para 3 hidrogênios; o duplo duplo duplete (*ddd*) em  $\delta$  1,40 ( $J=12,3;12,3;12,3$ ) correspondente ao H-14 $\beta$ ; os multipletos (*m*) relacionados ao H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$  em  $\delta$  2,61 e 2,83, respectivamente; um duplete relativo ao H-3 em  $\delta$  3,30 ( $J=11,3$  Hz); um duplete em  $\delta$  3,17 ( $J=12,0$ ) e um multiplete em  $\delta$  2,69 dos H-21 $\alpha$  e H-21 $\beta$ , respectivamente (Tabela 56).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura 33) foram observados 22 sinais, oito sinais relativos à CH, quatro correspondentes a  $\text{CH}_2$ , três referentes a  $\text{CH}_3$  e sete de carbonos quaternários, Os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  136,9 (C-2), 108,7 (C-7), 128,6 (C-8), 101,0 (C-9), 154,9 (C-10), 111,4 (C-11), 112,4 (C-12) e 132,8 (C-13) foram atribuídos ao núcleo indólico, Os sinais em  $\delta$  111,1 (C-16) e 156,0 (C-17) correspondem à dupla ligação do sistema carbonílico  $\alpha$ - $\beta$  insaturado; o sinal em  $\delta$  168,0 corresponde a C=O de éster; os sinais em  $\delta$  18,8 ( $\text{CH}_3$ -18) e em  $\delta$  51,3 relativo a metoxila (MeO-23) com os demais sinais em  $\delta$  32,4 (C-15), 39,5 (C-20), 73,3 (C-19) caracterizam a unidade secologanínica.

A posição da metoxila no grupamento indólico foi determinada com base nos valores de constante de acoplamento ( $J$ ) entre os hidrogênios do anel benzênico. Através da análise das correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 35) foi possível determinar as posições das metoxilas: a correlação entre a metoxila em  $\delta$  3,77 (H-24) e carbono quaternário (C-10) em  $\delta$  154,9, diferenciando-se da outra metoxila em  $\delta$  3,68 (H-23), a qual acopla com o carbono do éster (C-22) em  $\delta$  168,0.

Com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT e HSQC (Figura 34) foi possível identificar qual é a configuração dos esqueletos da porção secologanina da molécula, podendo determinar se ela é *normal*, *allo*, *pseudo* ou *epiallo*. Conforme Wenkert e colaboradores (1961) a ausência de um singleto largo em aproximadamente  $\delta$  4,4 referente à H-3

indica uma união de anéis na forma *trans*-quinolizidina. De acordo com as sínteses orgânicas de ioimbinas, pode-se diferenciar entre os isômeros C/D *trans* [*normal/allo*] e os isômeros C/D *cis* [*pseudo/epiallo*] dos derivados da ioimbina pelos sinais no espectro de RMN-<sup>13</sup>C dos carbonos C-3 e C-6, no qual o primeiro grupo apresenta os sinais de C-3 e C-6 com valores maiores que o segundo grupo (WENKERT *et al.*, 1976).

Como os valores encontrados de deslocamentos químicos de C-3 e C-6 foram  $\delta$  61,3 e 22,8, respectivamente, indica que a junção do anel C/D é do tipo *trans*. Para diferenciar os isômeros entre normal e *allo* observam-se os deslocamentos do C-14 e C-20. Em normal (junção D/E *trans*) os deslocamentos químicos estão em aproximadamente  $\delta$  34 e 40, respectivamente, e para a configuração *allo* (a junção D/E *cis*), os deslocamentos químicos do C-14 está em torno de  $\delta$  31 e do C-20 em  $\delta$  32 (HONTY *et al.*, 1982).

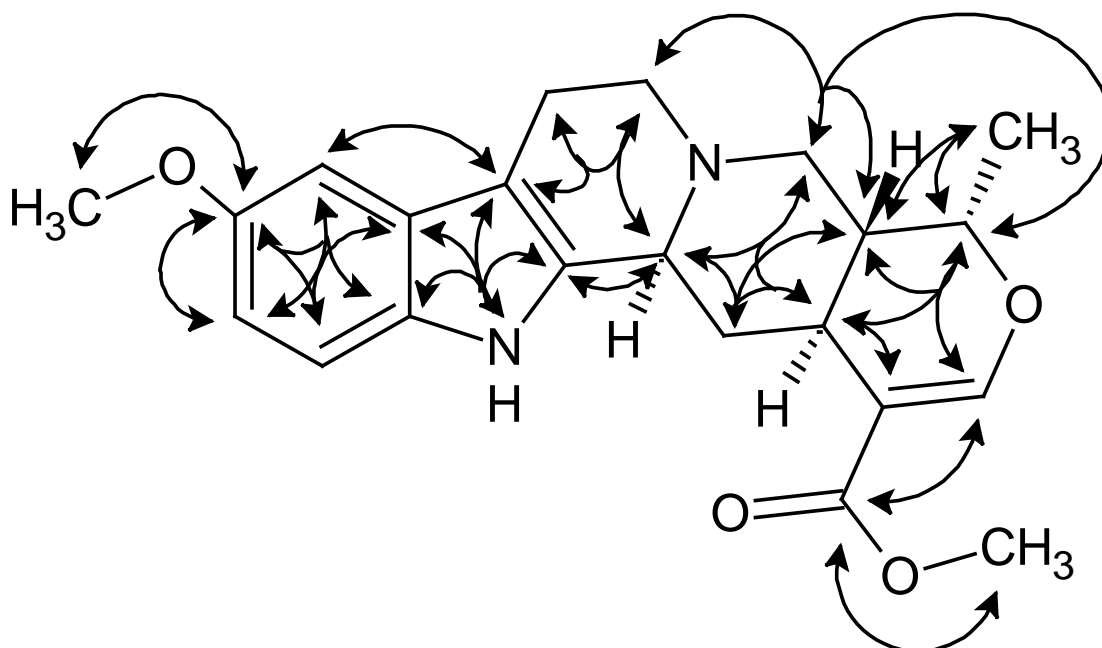
Os dados de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC e COSY), aliados a espectrometria de massas, o qual apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 382 (Anexo 2) e a comparação com dados da literatura (GRETHE *et al.*, 1971; NUNEZ *et al.*, 2012) confirmaram a identificação desta substância como sendo o alcaloide 10-metoxi-ajmalicina, o qual pertence a série *normal* (Figura 31).

**Tabela 56:** Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-ajmalicina.

Posição	C	HSQC		HMBC
		$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> em Hz)	<sup>2-4</sup> <i>J</i> <sub>C,H</sub>
2	C	136,9		
3	CH	61,3	3,30 ( <i>d</i> ; 11,3)	C-2
5	CH <sub>2</sub>	54,4	2,49 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 3,01 ( <i>m</i> ) $\beta$	C-3, C-6, C-21
6	CH <sub>2</sub>	22,8	2,61 ( <i>m</i> ) 2,83 ( <i>m</i> )	C-5, C-7
7	C	108,3		
8	C	128,6		
9	CH	101,0	6,89 ( <i>d</i> ; 2,3)	C-7, C-10, C-11, C-13
10	C	154,9		
11	CH	111,4	6,68 ( <i>dd</i> ; 8,7; 2,3)	C-9, C-10, C-11
12	CH	112,4	7,18 ( <i>d</i> ; 8,7)	C-8, C-9, C-10
13	C	132,8		
14	CH <sub>2</sub>	34,4	2,58 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 1,40 ( <i>ddd</i> ; 12,3) $\beta$	C-3, C-15, C-20
15	CH	32,4	2,70 ( <i>m</i> )	C-14, C-15, C-16, C-19
16	C	111,1		

continuação da Tabela 56.

<b>17</b>	CH	156,0	7,51 (s)	C-19, C-22
<b>18</b>	CH <sub>3</sub>	18,8	1,37 (d; 6,0)	C-19, C-20
<b>19</b>	CH	73,3	4,46 (dq; 10,2; 6,0)	C-15, C-18, C-20
<b>20</b>	CH	39,5	1,69	
<b>21</b>	CH <sub>2</sub>	57,1	3,17 (d; 12,0) $\alpha$ 2,69 (m) $\beta$	C-20 C-3, C-5, C-15, C-19
<b>22</b>	C	168,0		
<b>23</b>	CH <sub>3</sub>	51,3	3,68 (s)	C-22
<b>24</b>	CH <sub>3</sub>	56,1	3,77 (s)	C-10
<b>NH</b>			9,86 (s)	

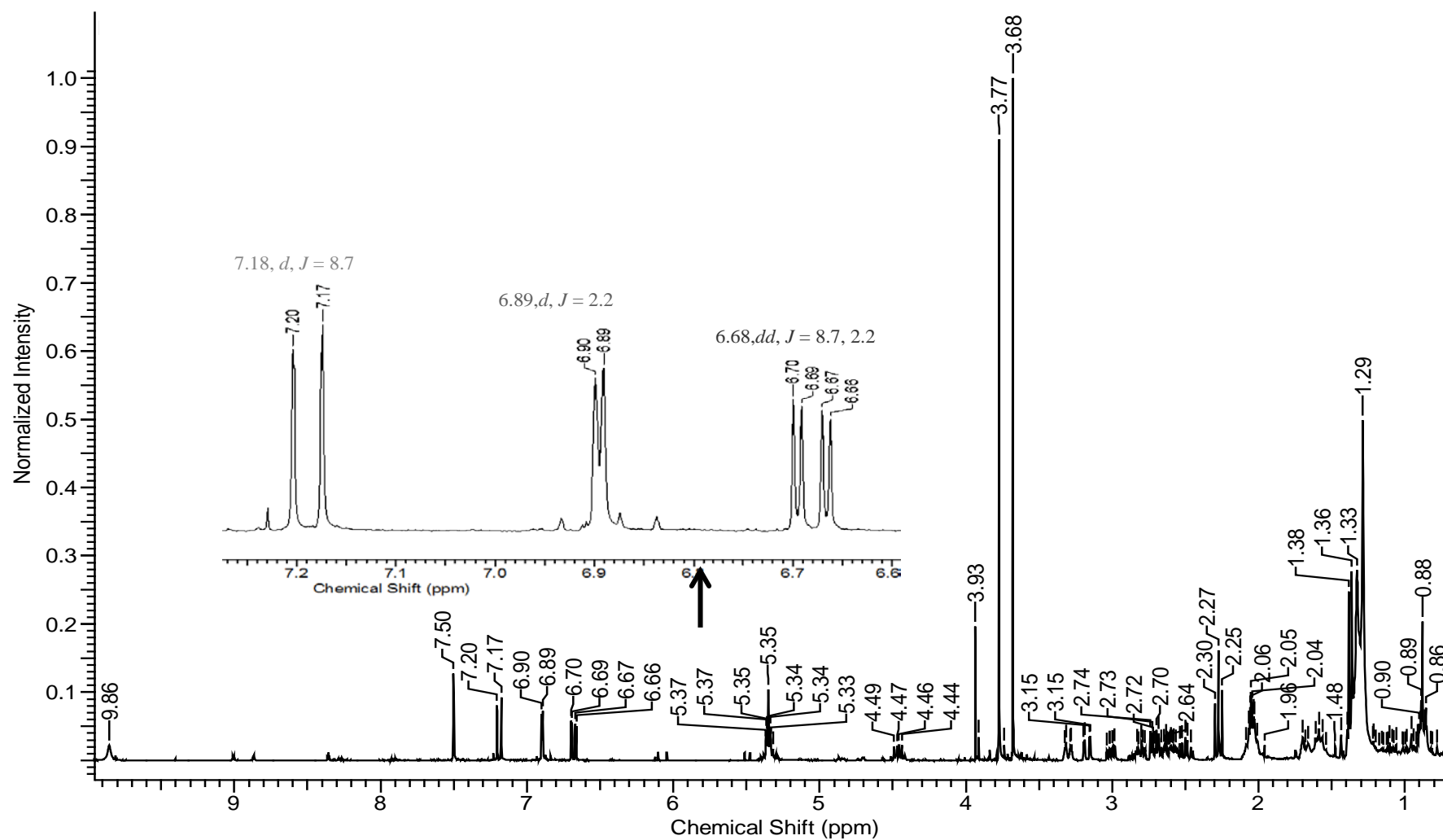


**Figura 31:** Estrutura da 10-metoxi-ajmalicina e suas correlações no HMBC.

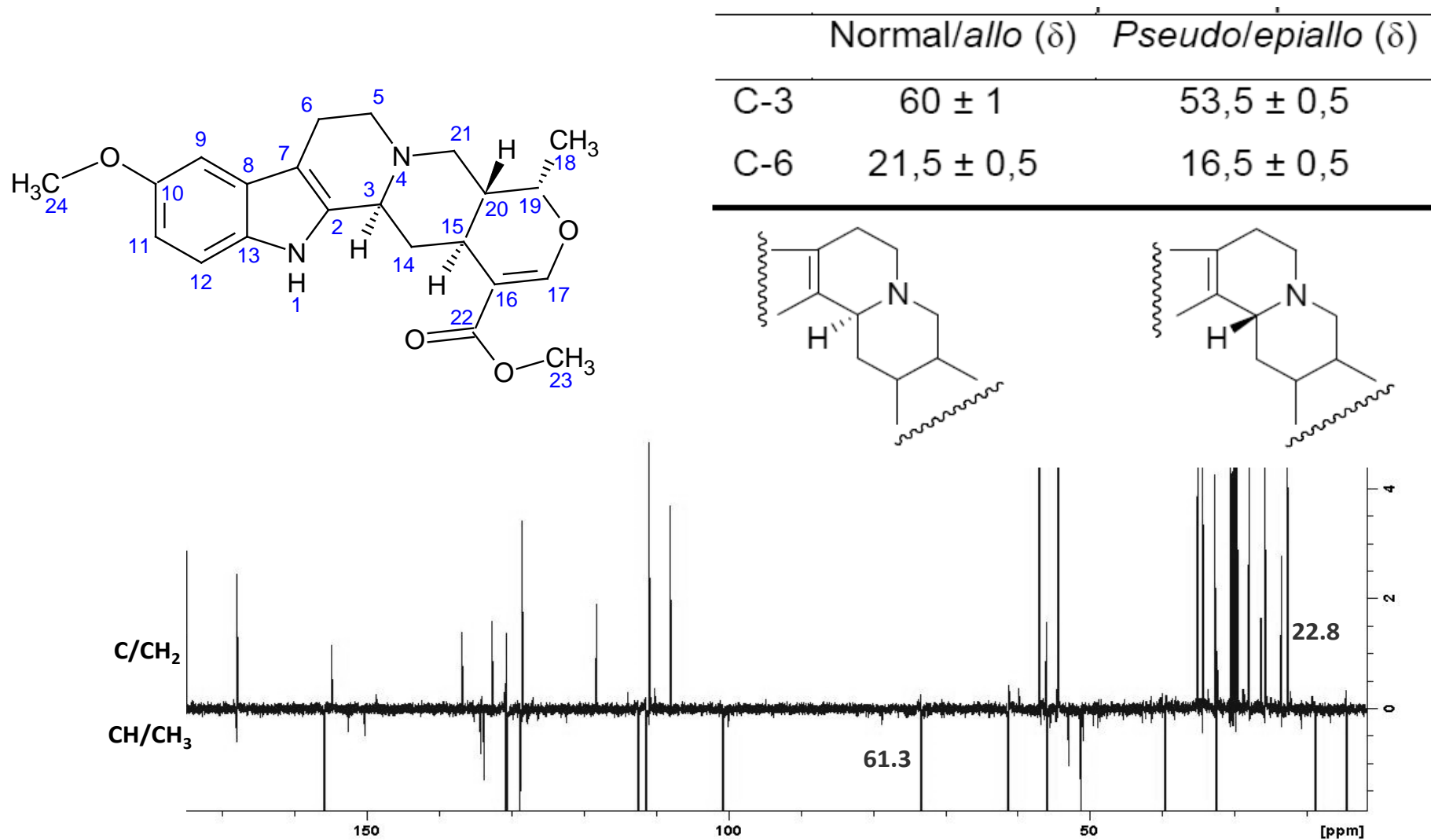
O mapa de contorno COSY (Figura 36) apresentou correlações homonucleares confirmando a estrutura proposta. A análise dos dados obtidos revelou correlações entre os hidrogênios aromáticos do núcleo indólico em  $\delta$  6,68 (H-11) com  $\delta$  6,89 (H-9) e com  $\delta$  7,18 (H-12); entre os hidrogênios da unidade de secologanínica em  $\delta$  4,46 (H-19) e 1,37 (CH<sub>3</sub>-18); em  $\delta$  4,46 (H-19) e 1,69 (H-20); e entre os hidrogênios quinolizidínicos em  $\delta$  2,61 e 2,83 (H-6) com  $\delta$  2,49 e 3,01 (H-5); em  $\delta$  1,40 e 2,58 (H-14) com  $\delta$  2,70 (H-15); em  $\delta$  3,17 e 2,69 (H-21) com 1,69 (H-20) conforme a Tabela 57.

**Tabela 57:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) com as correlações  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  COSY de 10-metoxi-ajmalicina.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	Correlações COSY
3	3,30 ( <i>d</i> ; 11,3)	
5	2,49 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$
	3,01 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-5 $\alpha$ , H-6 $\beta$
6	2,61 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-5 $\alpha$ , H-6 $\beta$
	2,83 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-5 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$
9	6,89 ( <i>d</i> ; 2,3)	H-11
11	6,68 ( <i>dd</i> ; 8,7; 2,3)	H-9, H-12
12	7,18 ( <i>d</i> ; 8,7)	H-11
14	2,58 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-14 $\beta$ , H-15
	1,40 ( <i>ddd</i> ; 12,3) $\beta$	H-14 $\alpha$ , H-15
15	2,70 ( <i>m</i> )	H-14 $\alpha$ , H-14 $\beta$ , H-20
17	7,51 ( <i>s</i> )	H-18, H-21 $\beta$
18	1,37 ( <i>d</i> ; 6,0)	H-19
19	4,46 ( <i>dq</i> ; 10,2; 6,0)	H-18, H-20
20	1,69	H-15, H-19, H-21 $\alpha$ , H-21 $\beta$
21	3,17 ( <i>d</i> ; 12,0) $\alpha$	H-20, H-21 $\alpha$
	2,69 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-20, H-21 $\beta$
23	3,68 ( <i>s</i> )	
24	3,77 ( <i>s</i> )	
NH	9,86 ( <i>s</i> )	



**Figura 32:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 10-metoxi-ajmalicina em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (500 MHz).



**Figura 33:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT da 10-metoxi-ajmalicina, com destaque para deslocamentos que definem a estereoquímica (125 MHz).

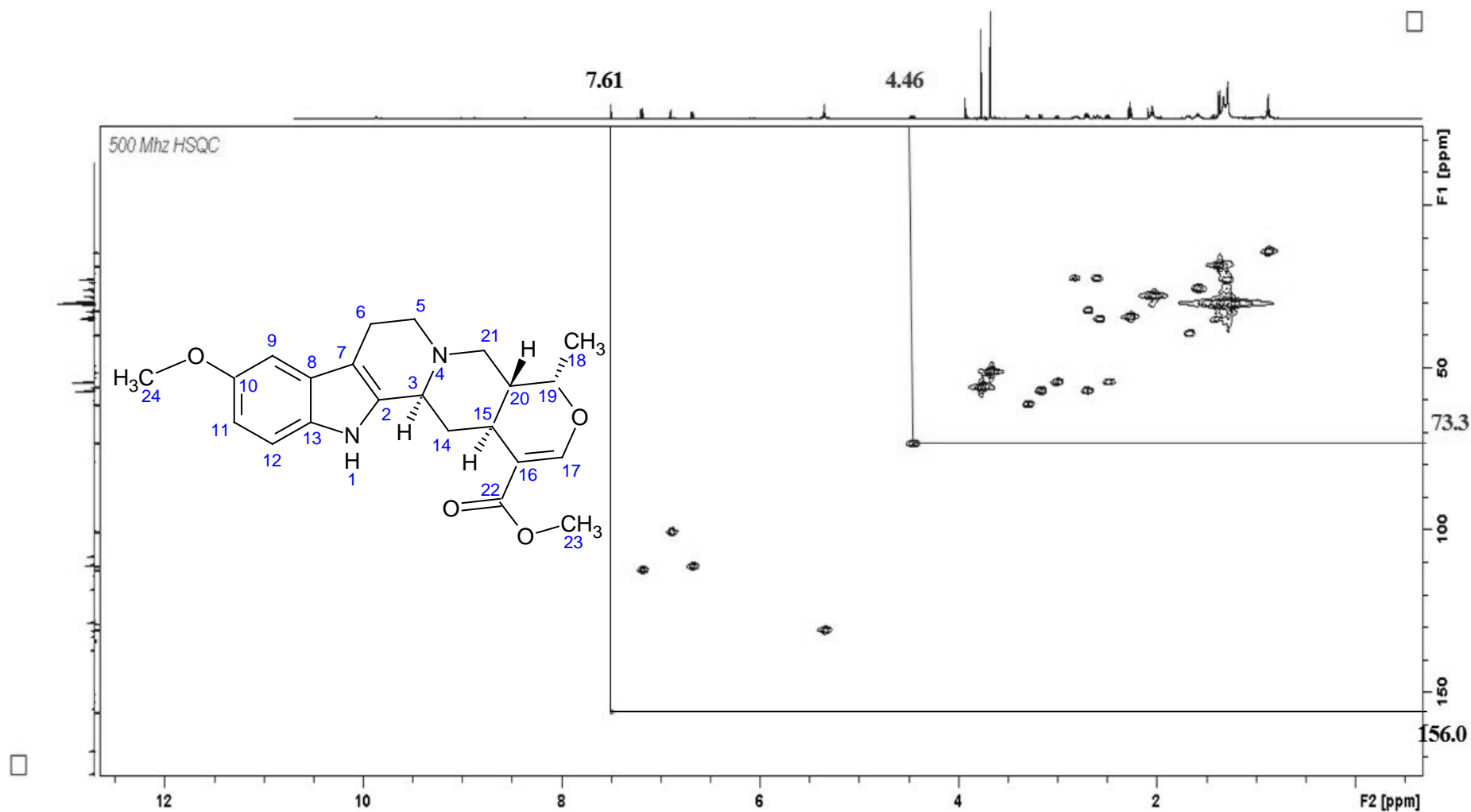
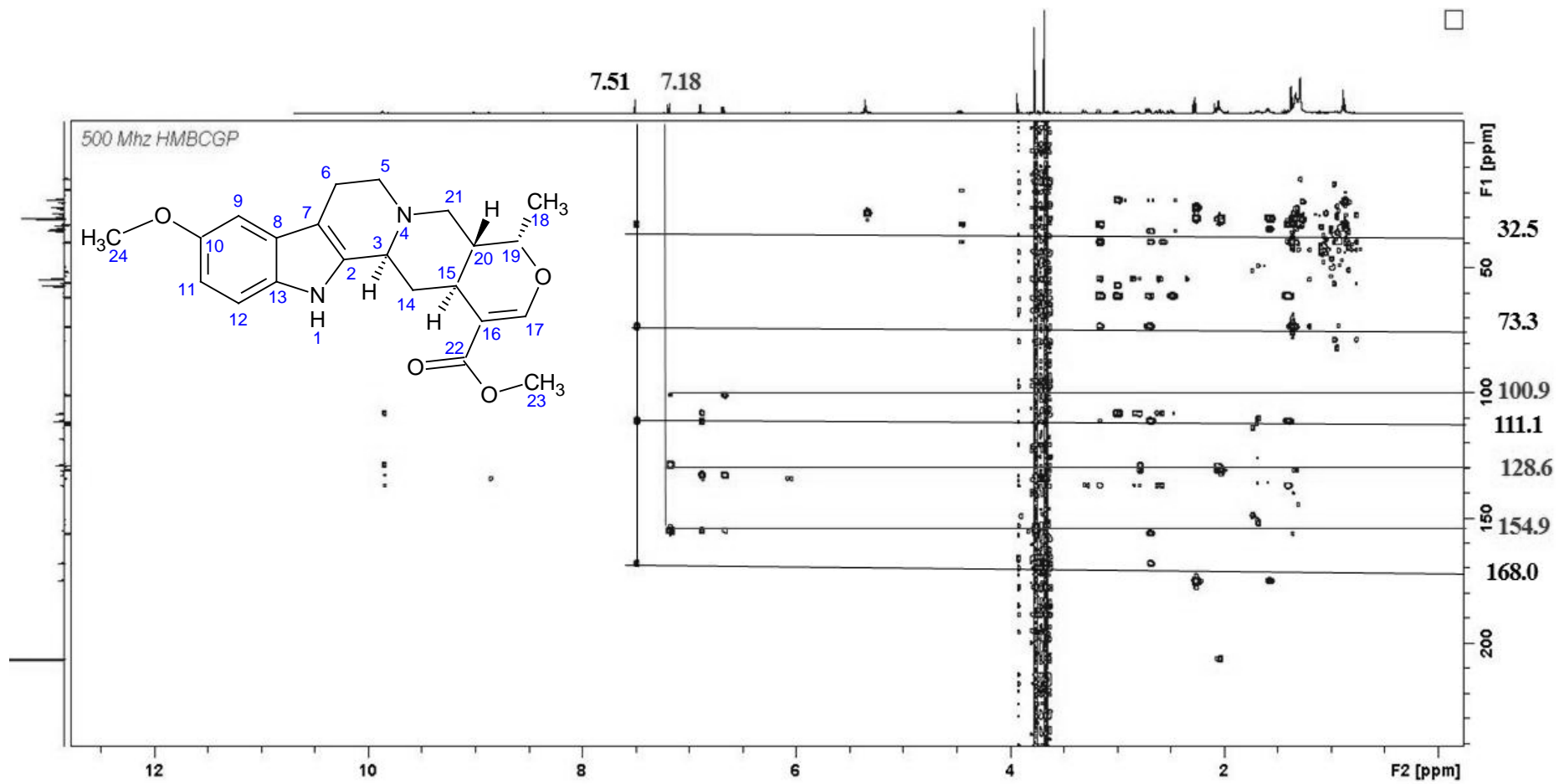


Figura 34: Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-ajmalicina em C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O (500 MHz).



**Figura 35:** Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-ajmalicina em C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O (500 MHz).



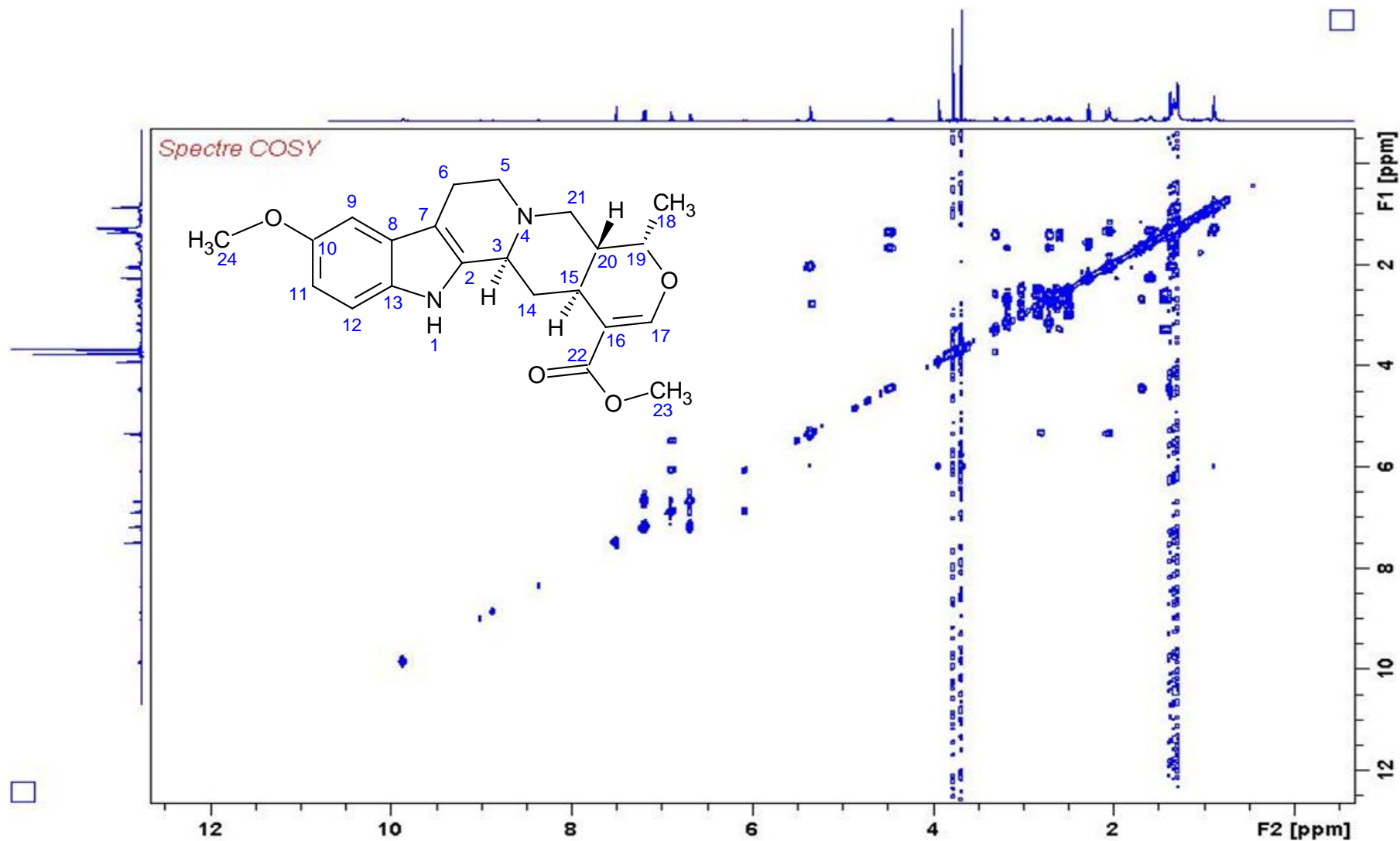


Figura 36: Mapa de contorno COSY da 10-metoxi-ajmalicina em C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O (500 MHz).

### 5.3.2. Identificação da Substância VI

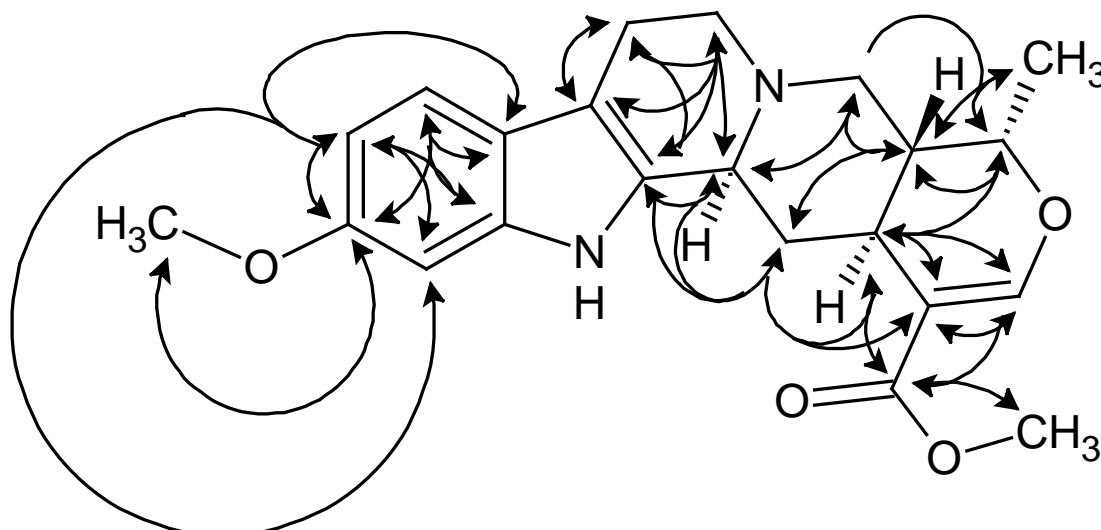
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 38) apresentou sinais do anel aromático (parcialmente encoberto) em  $\delta$  6,89 (*d*;  $J=5,5$  Hz; H-9),  $\delta$  6,42 (*dd*;  $J=5,5$ ; 2,3 Hz, H-10) e  $\delta$  6,90 (*d*;  $J=2,3$  Hz; H-12). A constante de acoplamento *orto* ( $J=5,5$  Hz) de H-9 e H-10 e a constante de acoplamento *meta* ( $J=2,3$  Hz) para H-11 e H-10 evidenciam um padrão de substituição em H-11. Além destes, também mostrou um dubleto em  $\delta$  1,36 ( $J=6,0$  Hz) relacionado ao grupo  $\text{CH}_3$ -18; um duplo quarteto em  $\delta$  4,47 ( $J=10,2$ , 6,3 Hz) relacionado a H-19, um singleto correspondente a H-17 em  $\delta$  7,51, e dois singletos relacionados a duas metoxilas em  $\delta$  3,67 e 3,84. Os dubletos largo (*dl*) em  $\delta$  2,46 ( $J=4,2$ ) e em  $\delta$  2,95 ( $J=6,0$ ) correspondente ao H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$ , respectivamente; os multipletos (*m*) relacionados ao H-6 em  $\delta$  2,98 e 1,24; um dubleto largo relativo a H-3 em  $\delta$  3,31 ( $J=12,0$  Hz); um duplo dubleto em  $\delta$  3,16 ( $J=12,0$ , 2,0) e dubleto em  $\delta$  2,72 correspondente a H-21 $\alpha$  e H-21 $\beta$ . O sinal do H-19, um duplo quarteto em  $\delta$  4,47 e valores de  $J=10,2$  e 6,3 Hz, indica que esse átomo de hidrogênio acopla com os hidrogênios da metila, na posição 18, com  $3J_{19,18}=6,2$  Hz e, portanto a outra constante de acoplamento se refere ao acoplamento entre esse hidrogênio e o da posição 20. O valor de deslocamento químico do H-19 fornece uma indicação sobre a posição relativa desse hidrogênio. Quando seu valor de  $\delta_{\text{H}}$  se encontra entre 4,2 e 4,5 ppm, ele pertence à série H-19 $\beta$ , 20 $\alpha$  (BRUYN *et al.*, 1989). O valor encontrado de  $\delta$  4,47 (*dq*; 10,2; 6,3 Hz) para esta substância corrobora para esse resultado.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 39) mostrou 22 sinais, oito sinais relativos a CH, quatro correspondentes a  $\text{CH}_2$ , três referentes a  $\text{CH}_3$  e sete de carbonos quaternários. Os valores dos deslocamentos químicos relativos ao anel aromático em  $\delta$  122,2 (C-9), em  $\delta$  99,9 (C-10) e  $\delta$  105,0 (C-12) confirmaram o padrão de substituição em H-11. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT e HSQC (Figura 40) permitiram a determinação da configuração da molécula. Como os valores encontrados de deslocamentos químicos de C-3 e C-6 foram  $\delta$  61,0 e 24,8, respectivamente, portanto a junção do anel C/D é do tipo *trans* (**a**), e os deslocamentos do C-14 em  $\delta$  34,7 e de C-20 em  $\delta$  39,3, conclui-se que a **substância VI** apresenta configuração *normal*. As correlações no HMBC (Figura 41) juntamente com a análise dos dados de RMN (Tabela 58) e dados da literatura (ADIBATTI *et al.*, 1991, SRIVASTAVA *et al.*, 2010,

MAURYA *et al.*, 2013) confirmam que a **Substância VI** trata-se do alcaloide **11-metoxi-ajmalicina** (Figura 37).

**Tabela 58:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 11-metoxi-ajmalicina.

Posição	C	HSQC		HMBC
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
2	C	139,5		
3	CH	61,0	3,31 ( <i>dl</i> ; 12,0)	C-2
5	CH <sub>2</sub>	54,4	2,46 ( <i>d</i> ; 4,2) $\alpha$ 2,95 ( <i>dl</i> ; 6,0) $\beta$	C-3, C-6 C-2, C-3, C-6, C-7, C-21
6	CH <sub>2</sub>	24,8	2,98 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 1,24 ( <i>m</i> ) $\beta$	C-2, C-7
7	C	108,6		
8	C	134,4		
9	CH	122,2	6,89 ( <i>d</i> ; 5,5)	C-8, C-11, C-13
10	CH	99,9	6,42 ( <i>dd</i> ; 5,5, 2,3)	C-8, C-11, C-13
11	C	155,7		
12	CH	105,0	6,90 ( <i>d</i> ; 2,3)	C-10
13	C	139,5		
14	CH <sub>2</sub>	34,7	2,55 ( <i>dt</i> ; 12,0) $\alpha$ 1,39 ( <i>d</i> ; 6,3) $\beta$	C-15, C-20 C-2, C-3, C-15, C-16
15	CH	32,5	2,70 ( <i>sept.</i> )	C-16, C-17, C-22
16	C	111,2		C-15, C-20 C-2, C-3, C-15, C-16
17	CH	156,0	7,51 ( <i>s</i> )	C-15, C-16, C-22
18	CH <sub>3</sub>	18,2	1,36 ( <i>d</i> ; 6,0)	C-19, C-20
19	CH	73,6	4,47 ( <i>dq</i> ; 10,2; 6,3)	C-15, C-20
20	CH	39,3	1,67 ( <i>m</i> )	-
21	CH <sub>2</sub>	57,0	3,16 ( <i>dd</i> ; 12,0; 2,0) $\alpha$ 2,72 ( <i>d</i> ; 3,5) $\beta$	C-5, C-20 C-3, C-19, C-20
22	C	168,4		C-22
23	CH <sub>3</sub>	51,1	3,67 ( <i>s</i> )	C-11
24	CH <sub>3</sub>	55,2	3,84 ( <i>s</i> )	C-22
NH			9,99 ( <i>s</i> )	



**Figura 37:** Estrutura da 11-metoxi-ajmalicina e suas correlações no HMBC.

O mapa de contorno COSY (Figura 42) da **substância VI** apresentou correlações homonucleares entre os hidrogênios aromáticos do núcleo indólico (H-9, H-10 e H-12); entre os hidrogênios da unidade secologanínica (H-19 e CH<sub>3</sub>-18) e (H-19 e H-20); assim como entre os hidrogênios quinolizidínicos (H-6 e H-5), (H-14 e H-15) e (H-20 e H-21), as demais correlações estão descritas na Tabela 59.

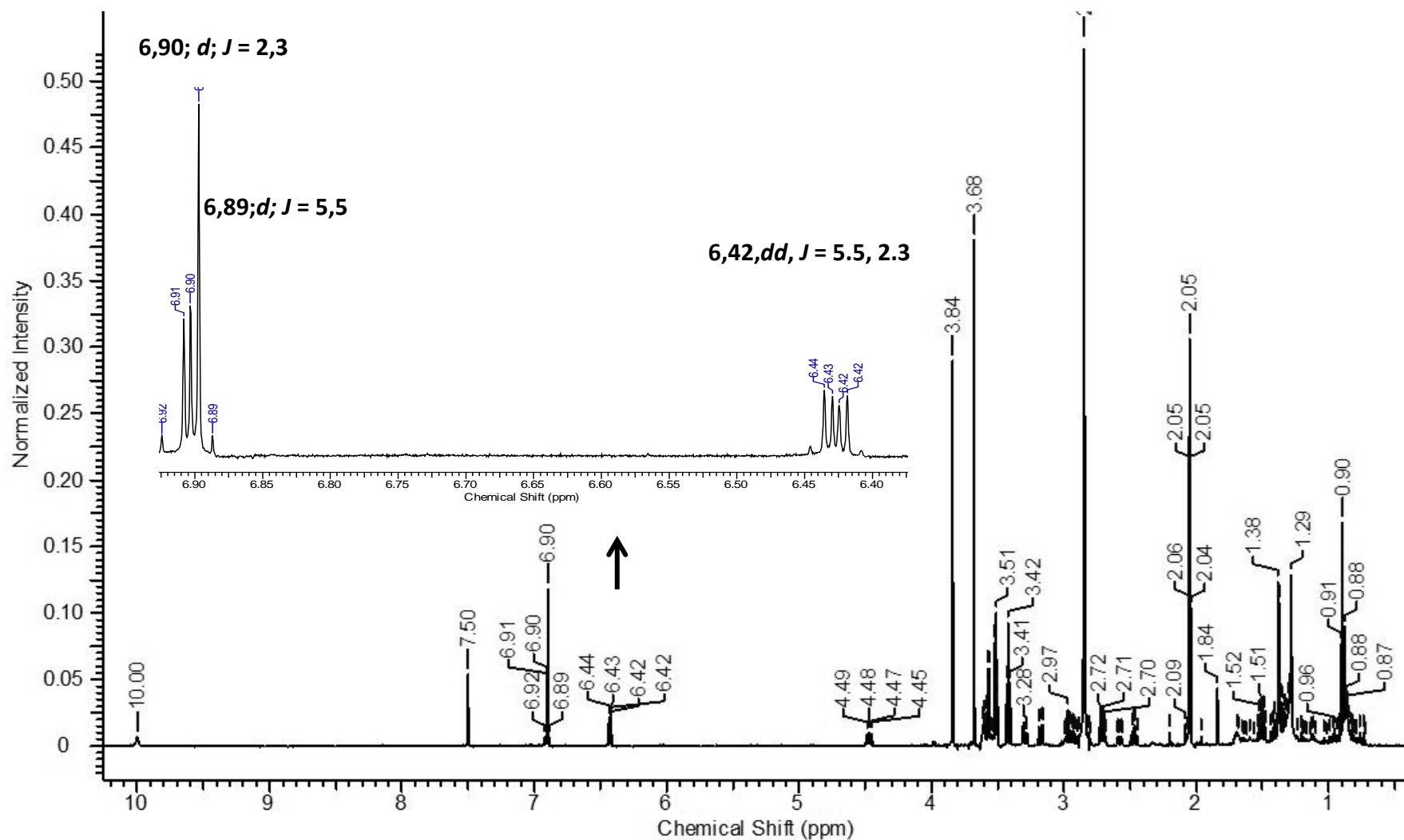
Todos os sinais foram atribuídos às posições correspondentes na molécula com base nas correlações observadas nos espectros em 1D/2D, os quais foram fundamentais para a determinação da estereoquímica dos hidrogênios da porção terpênica. A diferença entre essa **substância V** (10-metoxi-ajmalicina) e a **substância VI** (11-metoxi-ajmalicina) está somente na substituição do átomo de hidrogênio da posição 11 por um grupamento metoxila.

**Tabela 59:** Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) com as correlações <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY da 11-metoxi-ajmalicina.

Posição	$\delta_H$ ( <i>m, J</i> em Hz)	Correlações COSY
3	3,31 ( <i>dl</i> ; 12,0)	H-14 $\beta$
5	2,46 ( <i>d</i> ; 4,2) $\alpha$ 2,95 ( <i>dl</i> ; 6,0) $\beta$	H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$ H-5 $\alpha$
6	2,98 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 1,24 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-5 $\beta$
9	6,89 ( <i>d</i> ; 5,5)	
10	6,42 ( <i>dd</i> ; 5,5; 2,3)	H-12
12	6,90 ( <i>d</i> ; 2,3)	H-10
14	2,55 ( <i>dr</i> ; 12,1) $\alpha$ 1,39 ( <i>d</i> ; 6,3) $\beta$	H-3, H-14 $\beta$ H-3,14 $\alpha$ , H-15

*continuação da Tabela 59.*

<b>15</b>	2,70 ( <i>sept.</i> )	H-14 $\beta$ , H-20
<b>17</b>	7,51 ( <i>s</i> )	H-18, H-19
<b>18</b>	1,36 ( <i>d</i> ; 6,0)	H-17, H-19
<b>19</b>	4,47 ( <i>dq</i> ; 10,2, 6,3)	H-18, H-20
<b>20</b>	1,67	H-19, H-21 $\alpha$ , H-21 $\beta$
<b>21</b>	3,16 ( <i>dd</i> ; 12,0, 2,0) $\alpha$	H-20, H-21 $\beta$
	2,72 ( <i>d</i> ; 3,5) $\beta$	H-20, H-21 $\alpha$
<b>23</b>	3,67 ( <i>s</i> )	
<b>24</b>	3,84 ( <i>s</i> )	
<b>NH</b>	9,99 ( <i>sl</i> )	



**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 11-metoxi-ajmalicina em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (500 MHz).

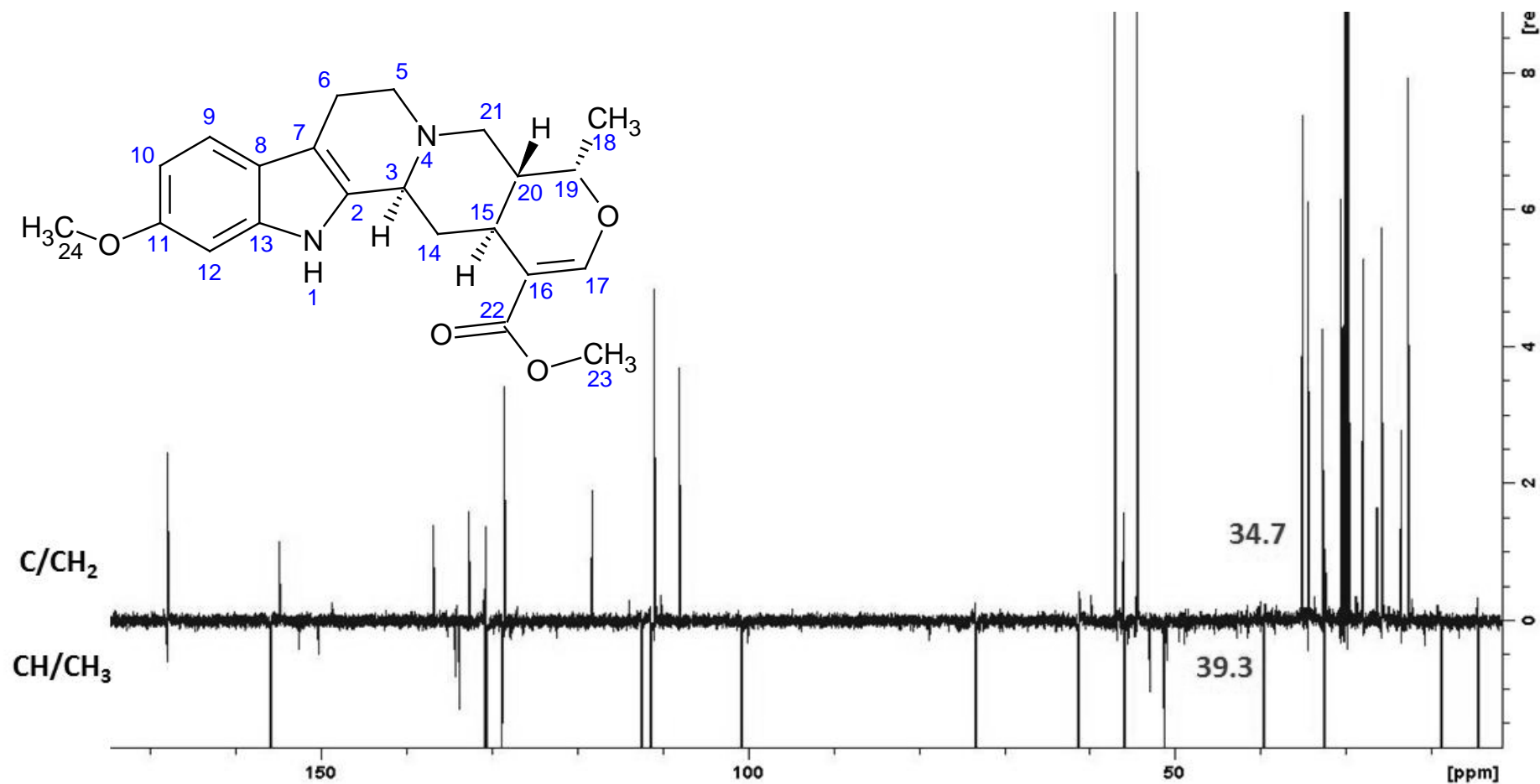


Figura 39: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT da 11-metoxi-ajmalicina em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (125 MHz).

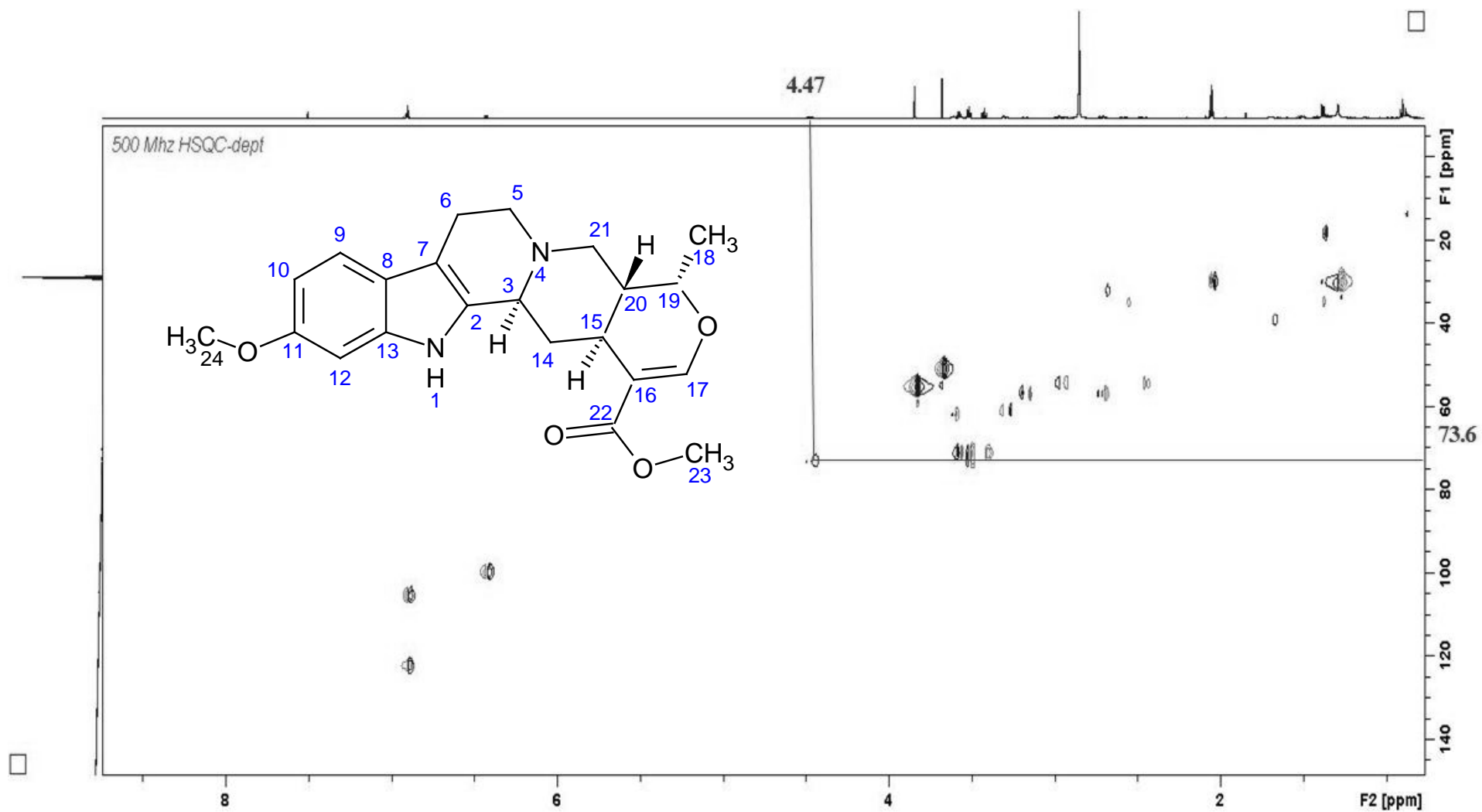
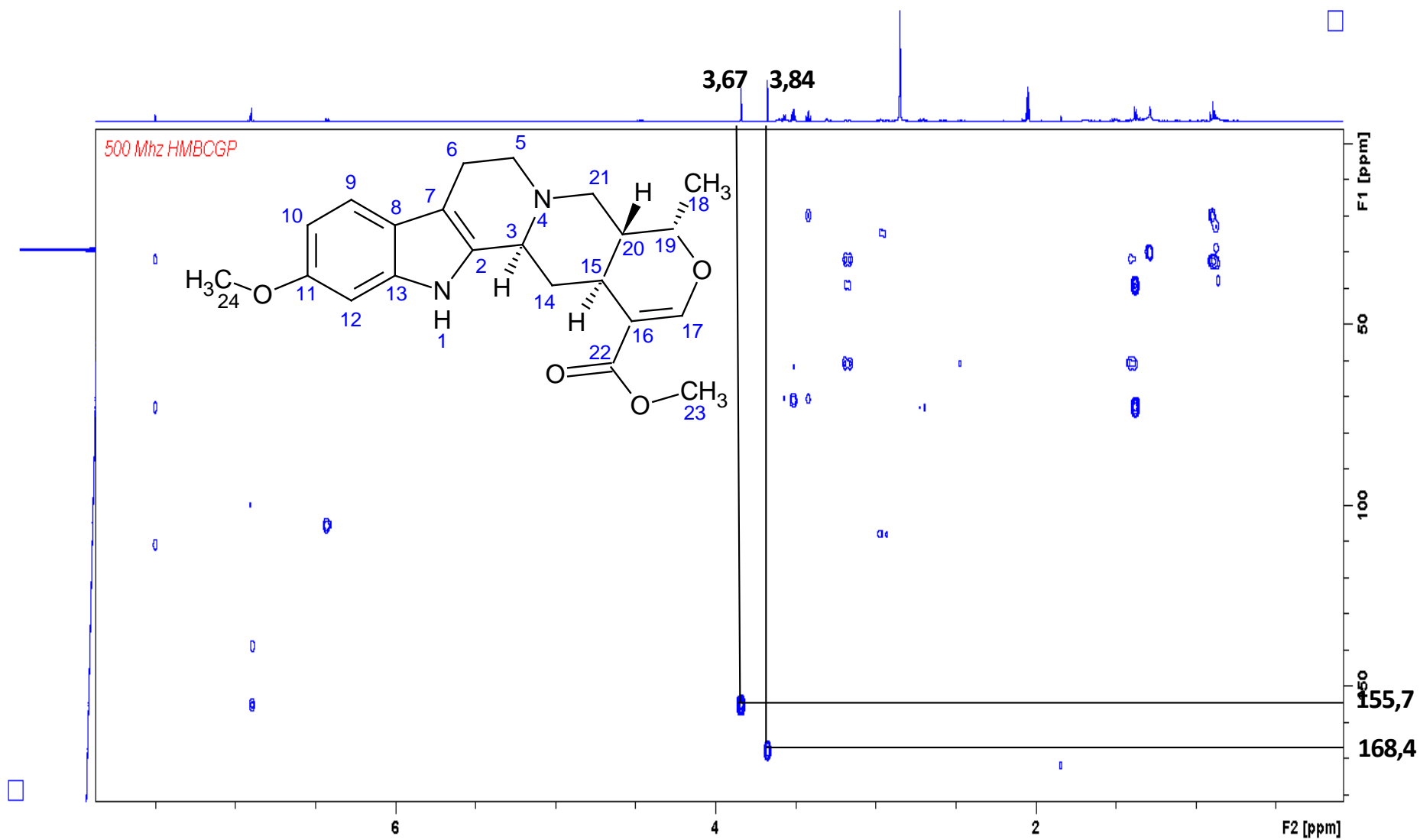


Figura 40: Mapa de contorno HSQC da 11-metoxi-ajmalicina em  $C_3D_6O$  (500 MHz).





**Figura 41:** Mapa de contorno HMBC da 11-metoxi-ajmalicina em  $C_3D_6O$  (500 MHz).

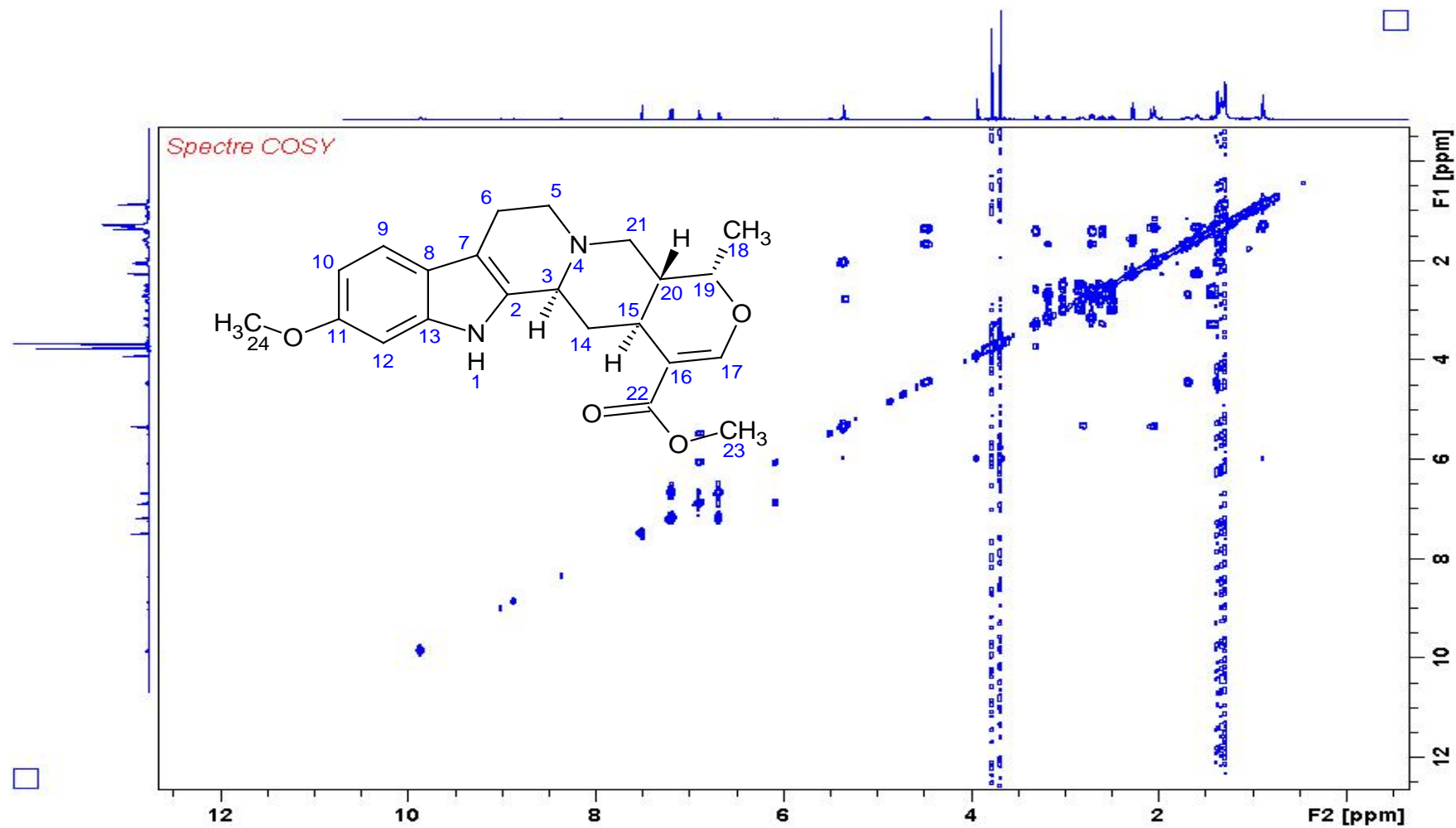


Figura 42: Mapa de contorno COSY da 11-metoxi-ajmalicina em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (500 MHz).

### 5.3.3. Identificação da Substância VII

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 44) apresentou sinais característicos de anel aromático:  $\delta$  6,89 (*d*;  $J=5,5$  Hz; H-9),  $\delta$  6,42 (*dd*;  $J=5,5$ ; 2,3 Hz, H-10) e  $\delta$  6,90 (*d*;  $J=2,3$  Hz; H-12). A constante de acoplamento *orto* ( $J = 5,5$  Hz) de H-9 e H10 e a constante de acoplamento *meta* ( $J=2,3$  Hz) para H-11 e H-10 evidenciam um padrão de substituição em H-11 (Tabela 60).

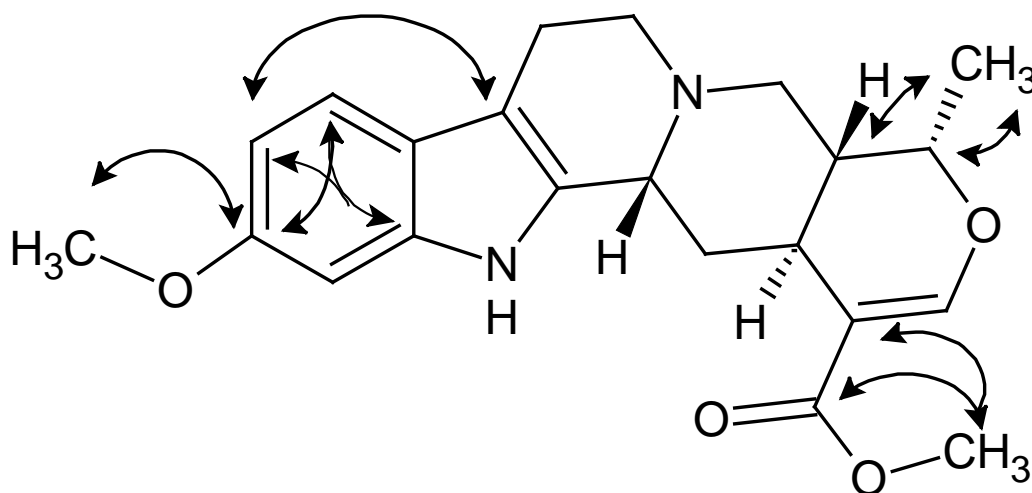
A comparação dos dados de RMN do mapa de contorno HSQC (Figura 45) destas substâncias sugeriu a estereoquímica de um isômero *pseudo* (H-3 $\beta$ ; H-20 $\beta$ ). Esta estereoquímica é confirmada pelo deslocamento químico do carbono na posição 3, em  $\delta$  55,4 e do carbono na posição 20, em  $\delta$  38,1, diferenciando-se do isômero *normal* (**substância VI**) em que o deslocamento do C-3 está em  $\delta$  61,0. O carbono em  $\delta$  55,4 e o hidrogênio em  $\delta$  3,31, correspondentes ao C-3 e H-3, apesar de apresentarem sinais semelhantes com os sinais das metoxilas ( $\delta$  51,1 -  $\delta$  3,66 e  $\delta$  55,1 - 3,79) pôde-se determinar com exatidão, devido à multiplicidade dos sinais e integrais no espectro de  $^1\text{H}$  e confirmada pelas correlações no HMBC (Figura 46). A presença de dois singletos bem intenso e integral para 3 hidrogênios, indica a existência de dois grupos metoxila, entretanto o sinal correspondente ao H-3 apresenta-se como um dubleto largo (12,0 Hz) e integral para 1 hidrogênio. A comparação dos dados apresentados pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC e COSY com os descritos na literatura para a akuamigina (JORGE, 2005) confirmaram a estrutura da substância VII como sendo **11-metoxi-3-isoajmalicina** (Figura 43).

**Tabela 60:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 11-metoxi-3-isoajmalicina.

Posição	C	HSQC		HMBC
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
2	C	134,5		
3	CH	55,4	3,31 ( <i>dl</i> 12,0)	
5	CH <sub>2</sub>	50,0	2,67 ( <i>m</i> ) 3,11 ( <i>m</i> )	
6	CH <sub>2</sub>	22,9	2,95 ( <i>m</i> ) 1,30 ( <i>m</i> )	
7	C	108,6		
8	C	134,4		
9	CH	122,2	6,89 ( <i>d</i> ; 5,5)	C-11, C-13

continuação da Tabela 60.

10	CH	99,5	6,42 ( <i>dd</i> ; 5,5; 2,3)	C-7, C-13
11	C	154,9		
12	CH	105,0	6,90 ( <i>d</i> ; 2,3)	
13	C	137,5		
14	CH <sub>2</sub>	33,5	2,46 ( <i>m</i> ) 1,45 ( <i>m</i> )	
15	CH	32,5	2,65 ( <i>sept.</i> )	
16	C	111,2		
17	CH	156,0	7,50 ( <i>s</i> )	
18	CH <sub>3</sub>	18,2	1,33 ( <i>d</i> ; 6,0)	C-19, C-20
19	CH	73,6	4,45 ( <i>dq</i> ; 10,2; 6,3)	
20	CH	38,1	1,67	
21	CH <sub>2</sub>	57,0	2,98 ( <i>dd</i> ; 12,0; 2,0) $\alpha$ 2,50 ( <i>m</i> ) $\beta$	
22	C	168,4		
23	CH <sub>3</sub>	51,1	3,66 ( <i>s</i> )	C-16, C-22
24	CH <sub>3</sub>	55,2	3,79 ( <i>s</i> )	C-11
NH			9,99 ( <i>s</i> )	

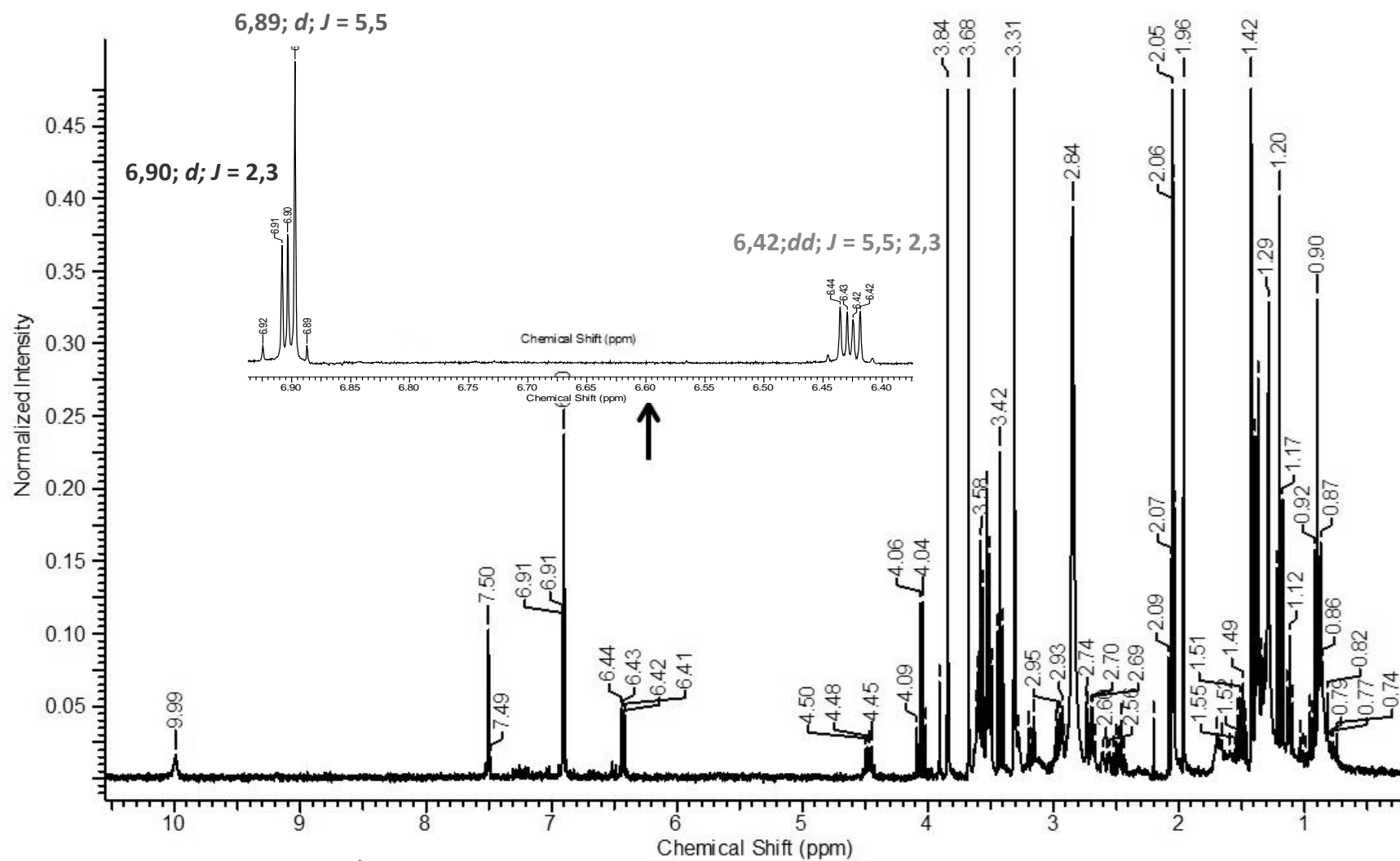


**Figura 43:** Estrutura da 11-metoxi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC.

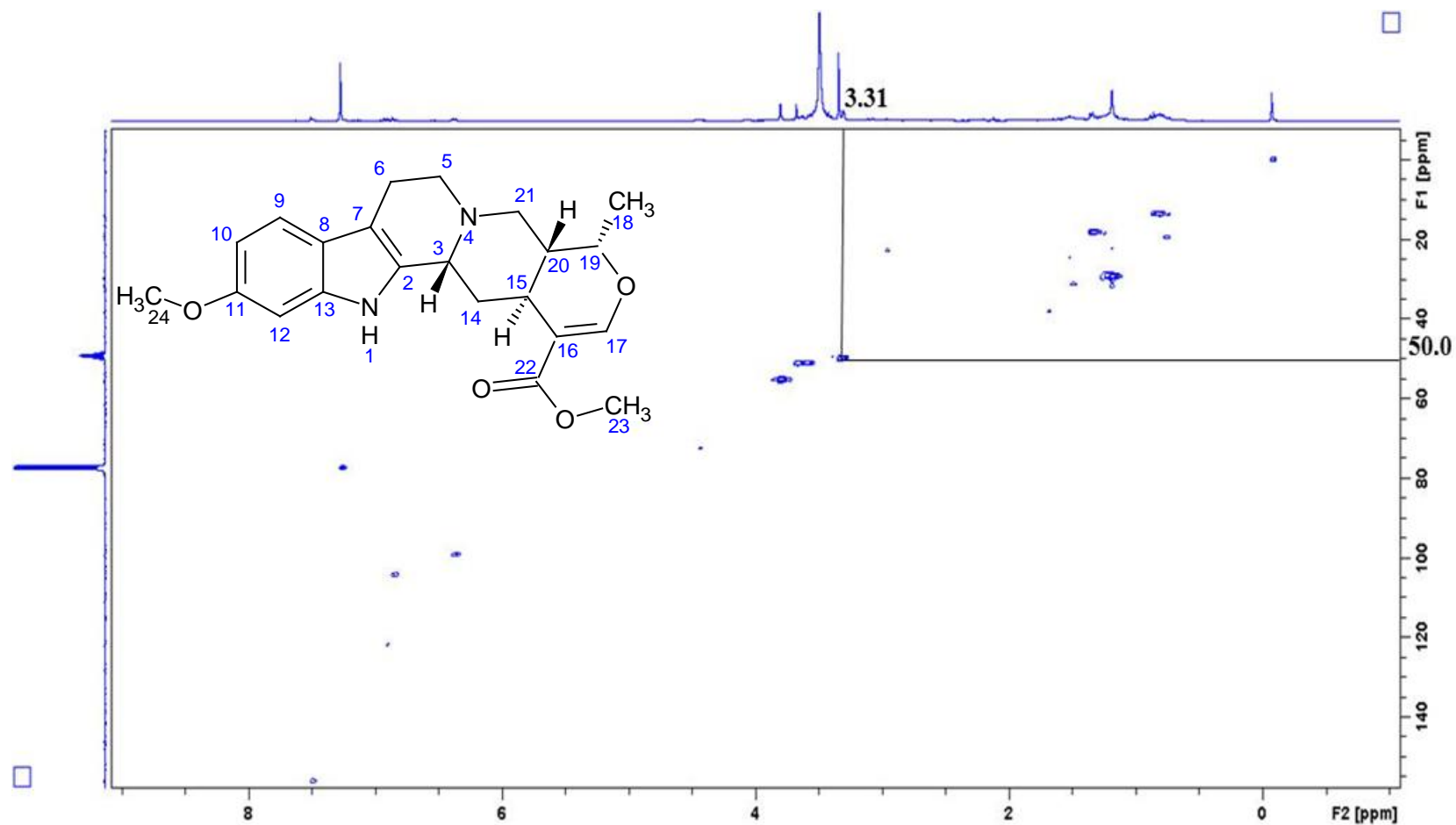
As correlações observadas no mapa de contorno COSY (Figura 47) entre os hidrogênios aromáticos do núcleo indólico H-10 com H-9 e H-12; entre os hidrogênios da unidade secologanínica (H-19 e CH<sub>3</sub>-18) e (H-19 e H-20) e as demais correlações estão descritas na Tabela 61.

**Tabela 61:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) com as correlações  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  COSY da 11-metoxi-3-isoajmalicina.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , Hz)	Correlações COSY
<b>3</b>	3,31 ( <i>dl</i> ; 12,0)	
<b>5</b>	2,67 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-5 $\beta$
	3,11 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-5 $\alpha$
<b>6</b>	2,95 ( <i>m</i> ) $\alpha$	
	1,30 ( <i>m</i> ) $\beta$	
<b>9</b>	6,89 ( <i>d</i> ; 5,5)	H-10
<b>10</b>	6,42 ( <i>dd</i> ; 5,5, 2,3)	H-9, H-12
<b>12</b>	6,90 ( <i>d</i> ; 2,3)	H-10, H-24
<b>14</b>	2,46 ( <i>m</i> )	
	1,45 ( <i>m</i> )	
<b>15</b>	2,65 ( <i>sept</i> )	
<b>17</b>	7,50 ( <i>s</i> )	
<b>18</b>	1,33 ( <i>d</i> ; 6,0)	H-19
<b>19</b>	4,45 ( <i>dq</i> ; 10,2; 6,3)	H-18, H-20
<b>20</b>	1,67 ( <i>m</i> )	H,18, H-21 $\beta$
<b>21</b>	2,98 ( <i>dd</i> ; 12,0; 2,0) $\alpha$	H-21 $\alpha$
	2,50 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-20, H-21 $\beta$
<b>23</b>	3,66 ( <i>s</i> )	
<b>24</b>	3,79 ( <i>s</i> )	H-12
<b>NH</b>	9,99 ( <i>s</i> )	



**Figura 44:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 11-metoxi-3-isoajmalicina em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (500 MHz).



**Figura 45:** Mapa de contorno HSQC da 11-metoxi-3-isoajmalicina, com destaque para alguns deslocamentos que definem a estereoquímica em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (500 MHz).

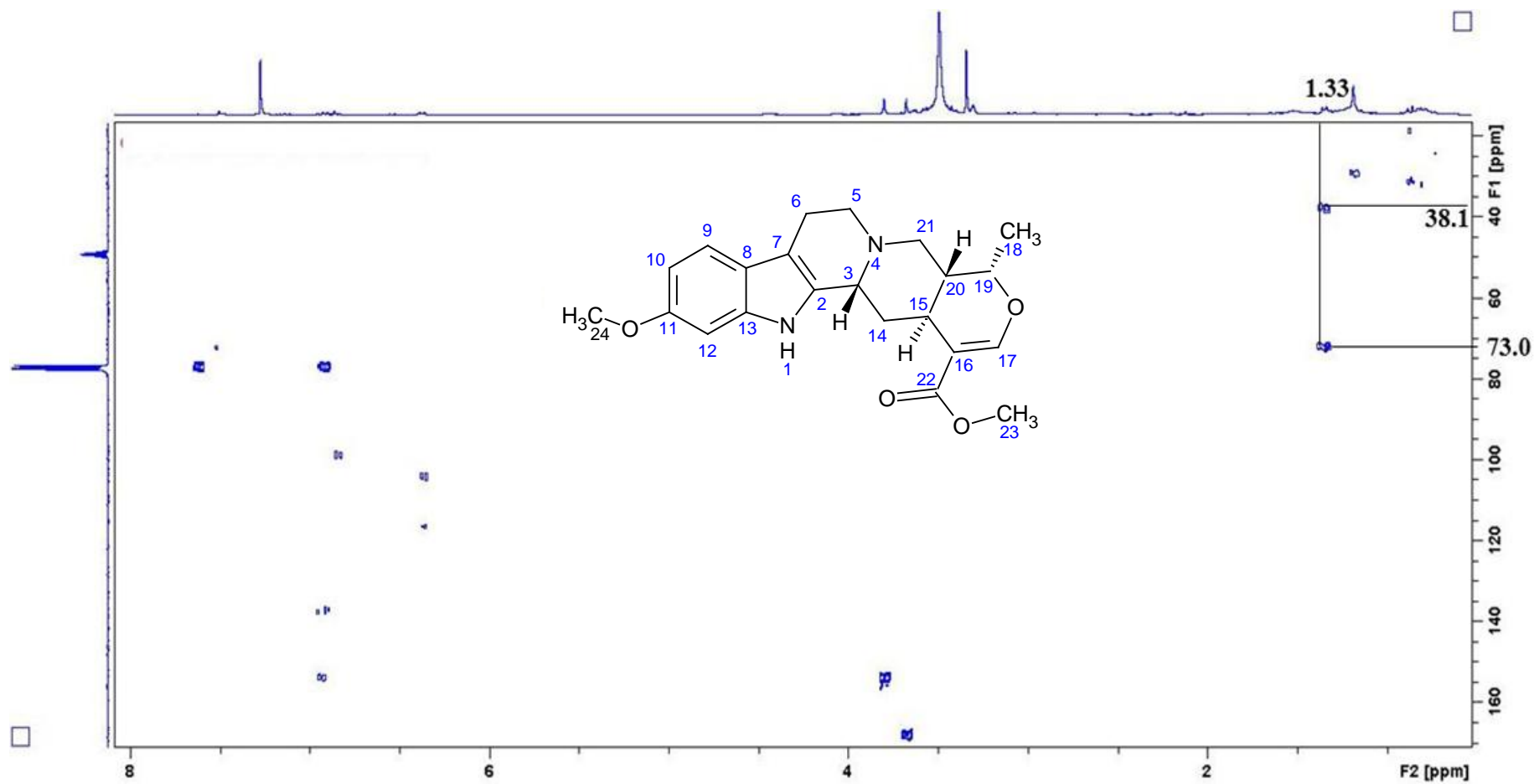


Figura 46: Mapa de contorno HMBC da 11-metoxi-3-isoajmalicina em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  (500 MHz).



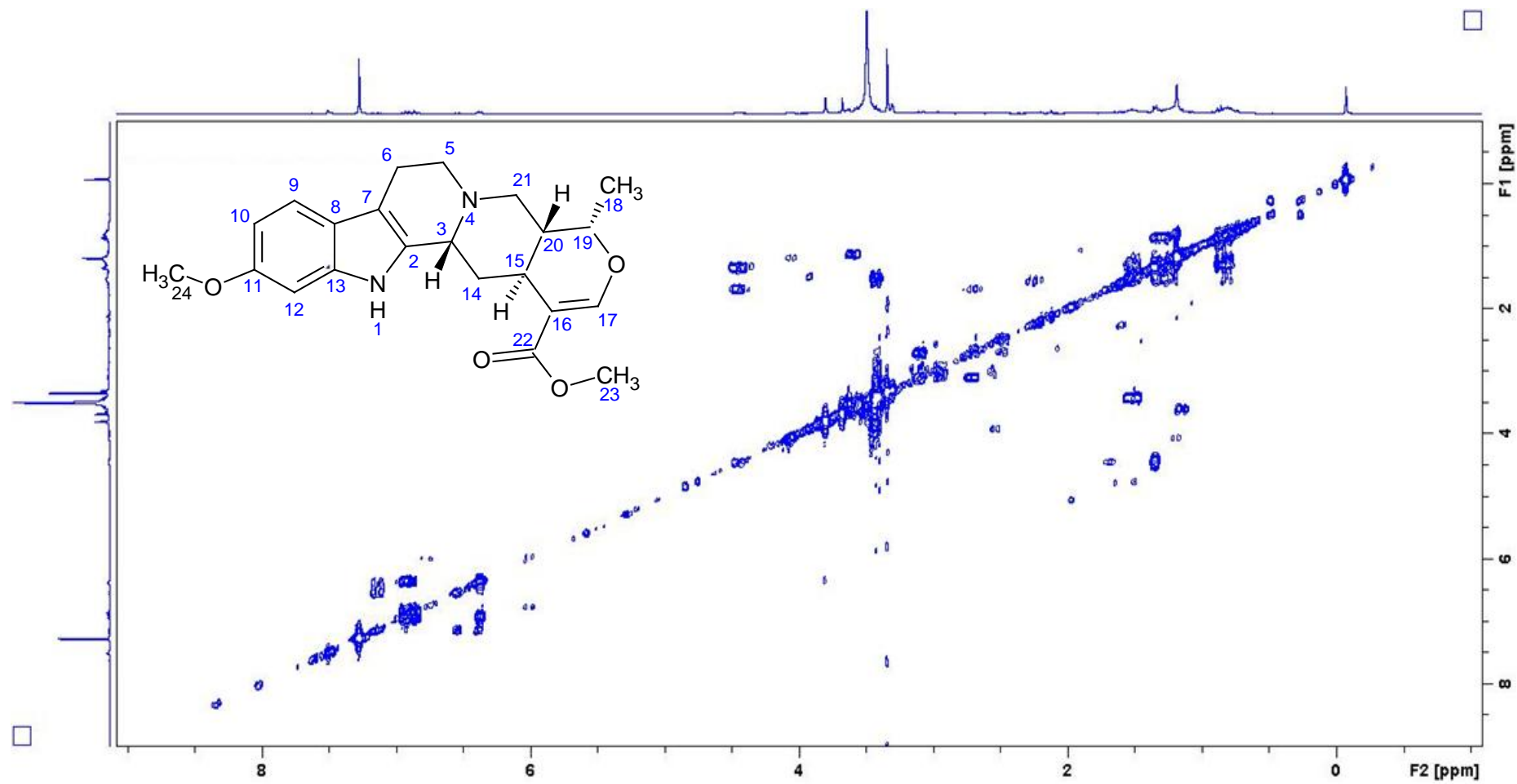


Figura 47: Mapa de contorno COSY da 11-metoxi-3-isoajmalicina em C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O (500 MHz).

### 5.3.4. Identificação das Substâncias VIII e IX

A análise detalhada dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY evidenciaram a mistura de dois alcaloides: **9-metoxi-3-isoajmalicina** (substância VIII) e **9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina** (substância IX).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 50) foram observados sinais comuns para ambas às substâncias: um singlete em  $\delta$  7,52 (H-17), seguido dos sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,66 (H-10),  $\delta$  7,15 (H-11) e  $\delta$  7,20 (H-12); dois singletos em  $\delta$  3,59 e 3,91 referentes a duas metoxilas; um dubleto em  $\delta$  1,23 ( $J=6,0$  Hz) relacionado ao grupo  $\text{CH}_3$ -18. Os sinais dos hidrogênios metilênicos indicam a presença de duas substâncias, sendo confirmadas pela ocorrência dos sinais atribuídos aos hidrogênios na posição 19 (H-19): para **9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina** em  $\delta$  3,66, indicando que esta pertence à série H-19 $\beta$ , 20 $\alpha$ , posição *trans* e para **9-metoxi-3-isoajmalicina** em  $\delta$  4,40, o que corresponde à posição  $\alpha$  em relação ao plano. Conforme o deslocamento químico do C-19 foi possível definir a configuração do grupo metílico para cada uma das substâncias, o qual se encontra em  $\delta$  76 para 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, indicando que o grupo metílico em C-19 está  $\beta$ -orientado e em 9-metoxi-3-isoajmalicina este é observado em  $\delta$  74,0, correspondendo à posição  $\alpha$ . Essas diferenças exercem um grande efeito na estrutura tridimensional da molécula, sem alterar seu espectro de UV e massa molecular.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura 51) mostrou sinais referentes à mistura de duas substâncias:  $\delta$  54,6 e  $\delta$  55,1 (C-3),  $\delta$  47,4 e  $\delta$  48,6 (C-5),  $\delta$  20,0 e  $\delta$  24,9 (C-6),  $\delta$  33,5 e  $\delta$  38,8 (C-14),  $\delta$  31,7 e  $\delta$  32,4 (C-15),  $\delta$  74,0 e  $\delta$  76,0 (C-19),  $\delta$  39,1 e  $\delta$  43,8 (C-20), estes sinais sugerem a mistura dos dois alcaloides. Os demais sinais em  $\delta$  106,2 (C-16) e 156,2 (C-17) correspondem à dupla ligação do sistema carbonílico; o sinal em  $\delta$  167,5 corresponde a C=O de éster; os sinais em  $\delta$  18,3 ( $\text{CH}_3$ -18) e em  $\delta$  50,9 (MeO-23) e em  $\delta$  55,4 (MeO-24) são idênticos nas duas substâncias.

Através da observação dos deslocamentos químicos referentes a C-3 e C-14 no espectro HSQC (Figura 52) foi possível definir a configuração do esqueleto da porção secologanina nas duas moléculas, onde ambas as substâncias pertencem à série *pseudo*.

Com o espectro de HMBC (Figura 53) foi possível confirmar quais hidrogênios estavam sobrepostos na região mais protegida e atribuir hidrogênios e carbonos para cada uma das substâncias. Através dos acoplamentos: C-3 com H-6, H-20 e H-21; C-15 com H-17, H-20 e H-21; C-18 com H-19 e H-20; C-21 com H-14 foi identificado o

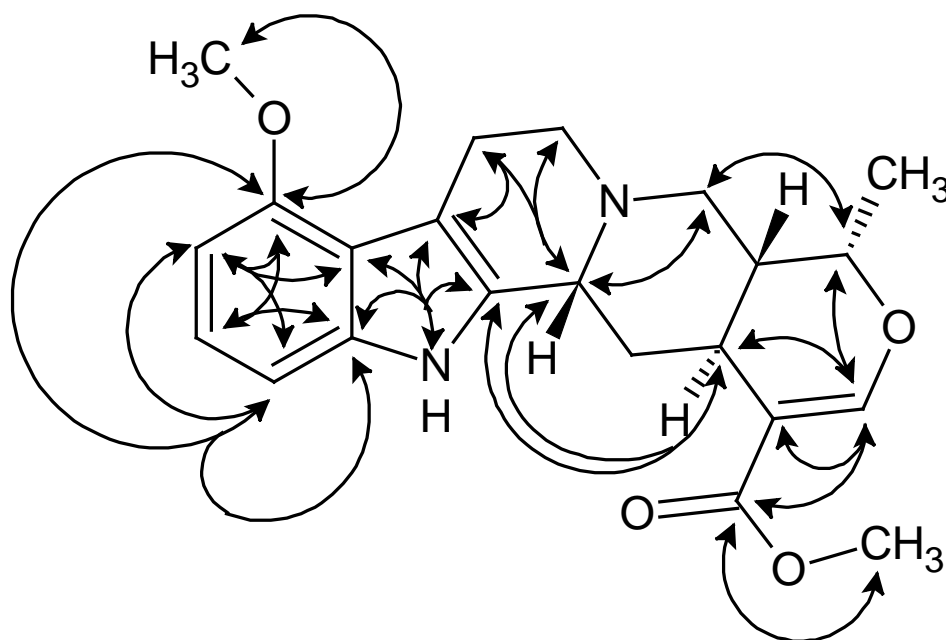
alcaloide **9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina** (Tabela 62, Figura 48 ). E os acoplamentos do C-3 com H-5, H-6 e H-15; C-19 com H-17 e H-21; C-15 com H-17; C-21 com H-3 permitiram a identificação da **9-metoxi-3-isoajmalicina** (Tabela 63, Figura 49). A identificação das substâncias foi confirmada através da espectrometria de massas e comparação com dados da literatura (SHELLARD *et al.*, 1966; SHELLARD e SARPONG, 1969; XIN *et al.*, 2008).

**Tabela 62:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 9-metoxi-3-isoajmalicina.

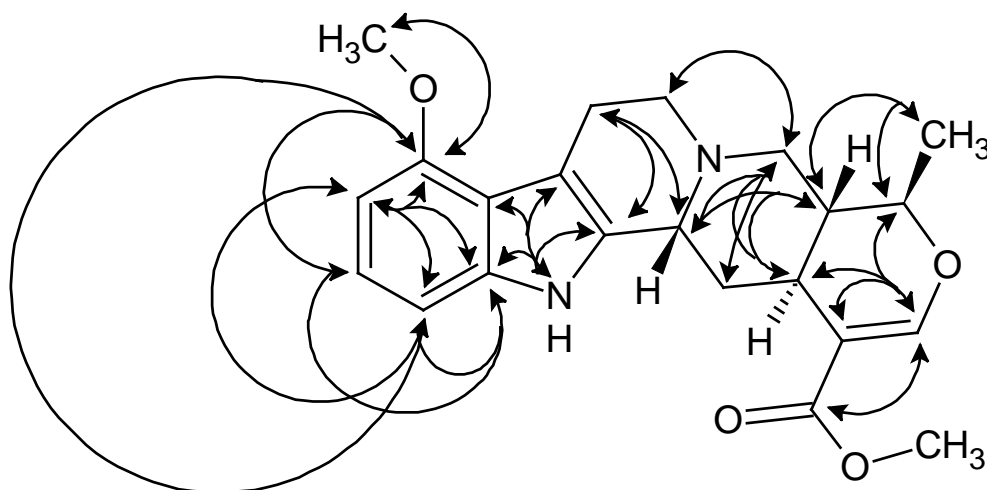
Posição	C	HSQC		HMBC
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
2	C	138,9		
3	CH	54,6	4,60 ( <i>d</i> ; 12,0)	C-21
5	CH <sub>2</sub>	47,4	2,80 ( <i>dd</i> ; 10,9; 3,6) $\alpha$ 2,60 ( <i>t</i> ) $\beta$	C-3 C-3
6	CH <sub>2</sub>	20,0	3,05 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 3,36 ( <i>m</i> ) $\beta$	C-3, C-7
7	C	107,5		
8	C	118,8		
9	C	155,1		
10	CH	99,9	6,66 ( <i>d</i> ; 8,0)	C-8, C-9, C-12
11	CH	122,2	7,15 ( <i>d</i> ; 8,0)	C-9, C-13
12	CH	105,8	7,20 ( <i>d</i> ; 8,0)	C-9, C-10, C-13
13	C	132,5		
14	CH <sub>2</sub>	33,5	1,35 ( <i>d</i> ; 8,0) $\alpha$ 1,65 ( <i>m</i> ) $\beta$	
15	CH	32,4	1,73 ( <i>m</i> )	C-2, C-3
16	C	109,2		
17	CH	156,2	7,69 ( <i>s</i> )	C-15, C-16, C-19, C-22
18	CH <sub>3</sub>	18,3	1,23 ( <i>d</i> ; 6,5)	C-19, C-20
19	CH	74,0	4,40 ( <i>d</i> ; 3,8)	
20	CH	39,1	1,58 ( <i>m</i> )	
21	CH <sub>2</sub>	63,4	3,98 ( <i>d</i> ; 12,0) $\alpha$ 4,66 ( <i>d</i> ; 12,0) $\beta$	C-19
22	C	167,5		C-3, C-15
23	CH <sub>3</sub>	50,9	3,59 ( <i>s</i> )	C-22
24	CH <sub>3</sub>	55,4	3,91 ( <i>s</i> )	C-9
NH			11,57 ( <i>s</i> )	C-2, C-7, C-8, C-13

**Tabela 63:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina.

Posição	C	HSQC		HMBC $^{2-4}J_{\text{C,H}}$
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	
2	C	138,9		
3	CH	55,1	3,78 ( <i>d</i> ; 11,0)	
5	CH <sub>2</sub>	48,6	1,80 ( <i>m</i> ) 2,01 ( <i>m</i> )	C-3
6	CH <sub>2</sub>	24,9	1,75 ( <i>m</i> ) 2,05 ( <i>m</i> )	C-2, C-3
7	C	107,5		
8	C	118,8		
9	C	155,1		
10	CH	99,9	6,66 ( <i>d</i> ; 8,0)	C-8, C-9, C-12
11	CH	122,2	7,15 ( <i>d</i> ; 8,0)	C-9, C-13
12	CH	105,8	7,20 ( <i>d</i> ; 8,0)	C-9, C-10, C-13
13	C	132,5		
14	CH <sub>2</sub>	38,8	1,58 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 1,06 ( <i>m</i> ) $\beta$	C-21
15	CH	31,7	2,23 ( <i>m</i> )	
16	C	109,2		
17	CH	156,2	7,69 ( <i>s</i> )	C-15, C-16, C-19, C-22
18	CH <sub>3</sub>	18,3	1,23 ( <i>d</i> ; 6,5)	C-19, C-20
19	CH	76,0	3,66 ( <i>d</i> ; 3,8)	
20	CH	43,8	1,70 ( <i>m</i> )	
21	CH <sub>2</sub>	63,4	4,24 ( <i>d</i> ; 11,0) $\alpha$ 4,87 ( <i>d</i> ; 11,0) $\beta$	C-19
22	C	167,5		C-3, C-15
23	CH <sub>3</sub>	50,9	3,59 ( <i>s</i> )	C-22
24	CH <sub>3</sub>	55,4	3,91 ( <i>s</i> )	C-9
NH			11,57 ( <i>s</i> )	C-2, C-7, C-8, C-13



**Figura 48:** Estrutura da 9-metoxi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC.



**Figura 49:** Estrutura da 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC.

A análise dos dados obtidos do mapa de contorno COSY (Figura) foi essencial na determinação dos sinais de cada alcaloide. As correlações observadas no mapa de contorno COSY entre os hidrogênios em  $\delta$  4,60 (H-3) e  $\delta$  1,73 (H-15),  $\delta$  2,80 (H-5  $\alpha$ ) e 2,60 (H-5  $\beta$ ),  $\delta$  3,05 (H-6  $\alpha$ ) e 3,36 (H-6  $\beta$ ),  $\delta$  1,35 (H-14  $\alpha$ ) e 1,65 (H-14  $\beta$ ),  $\delta$  7,69 e 1,73,  $\delta$  1,58 (H-20) e 1,73 (H-15),  $\delta$  3,98 (H-21  $\alpha$ ) e 4,66 (H-21  $\beta$ ), foram atribuídas a **9-metoxi-3-isoajmalicina** (substância IX) (Tabela 64).

**Tabela 64:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) com as correlações  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  COSY da 9-metoxi-3-isoajmalicina.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	Correlações COSY
3	4,60	H-15
5	2,80 ( <i>dd</i> ; 10,9, 3,6) $\alpha$	H-5 $\beta$
	2,60 ( <i>t</i> ) $\beta$	H-5 $\alpha$
6	3,05 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-6 $\beta$
	3,36 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-6 $\alpha$
10	6,66 ( <i>d</i> ; 8,0)	H-12
11	7,15 ( <i>d</i> ; 8,0)	
12	7,20 ( <i>d</i> ; 8,0)	H-10
14	1,35 ( <i>d</i> ; 8,0) $\alpha$	H-14 $\beta$
	1,65 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-14 $\alpha$
15	1,73 ( <i>m</i> )	H-3, H-17, H-20
17	7,69 ( <i>s</i> )	H-15
18	1,23 ( <i>d</i> ; 6,5)	
19	4,40 ( <i>d</i> ; 3,8)	H-20
20	1,58 ( <i>m</i> )	H-15
21	3,98 ( <i>d</i> ; 11,0) $\alpha$	H-21 $\beta$
	4,66 ( <i>d</i> ; 11,0) $\beta$	H-21 $\alpha$
23	3,59 ( <i>s</i> )	
24	3,91 ( <i>s</i> )	
NH	11,57( <i>s</i> )	

As correlações entre os hidrogênios em  $\delta$  4,24 e 4,87 (H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$ ), entre  $\delta$  1,58 e 1,06 (H-14 $\alpha$  e H-14 $\beta$ ),  $\delta$  2,23 (H-15) com  $\delta$  7,69 (H-17) e 1,70 (H-20), entre  $\delta$  1,23 (H-18) e 3,66 (H-19); entre os hidrogênios aromáticos do núcleo indólico em  $\delta$  7,20 (H-12) com  $\delta$  6,66 (H-10); conforme Figura 54 e Tabela 65.

**Tabela 65:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) com as correlações  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  COSY da 9-metoxi-3-isoajmalicina.

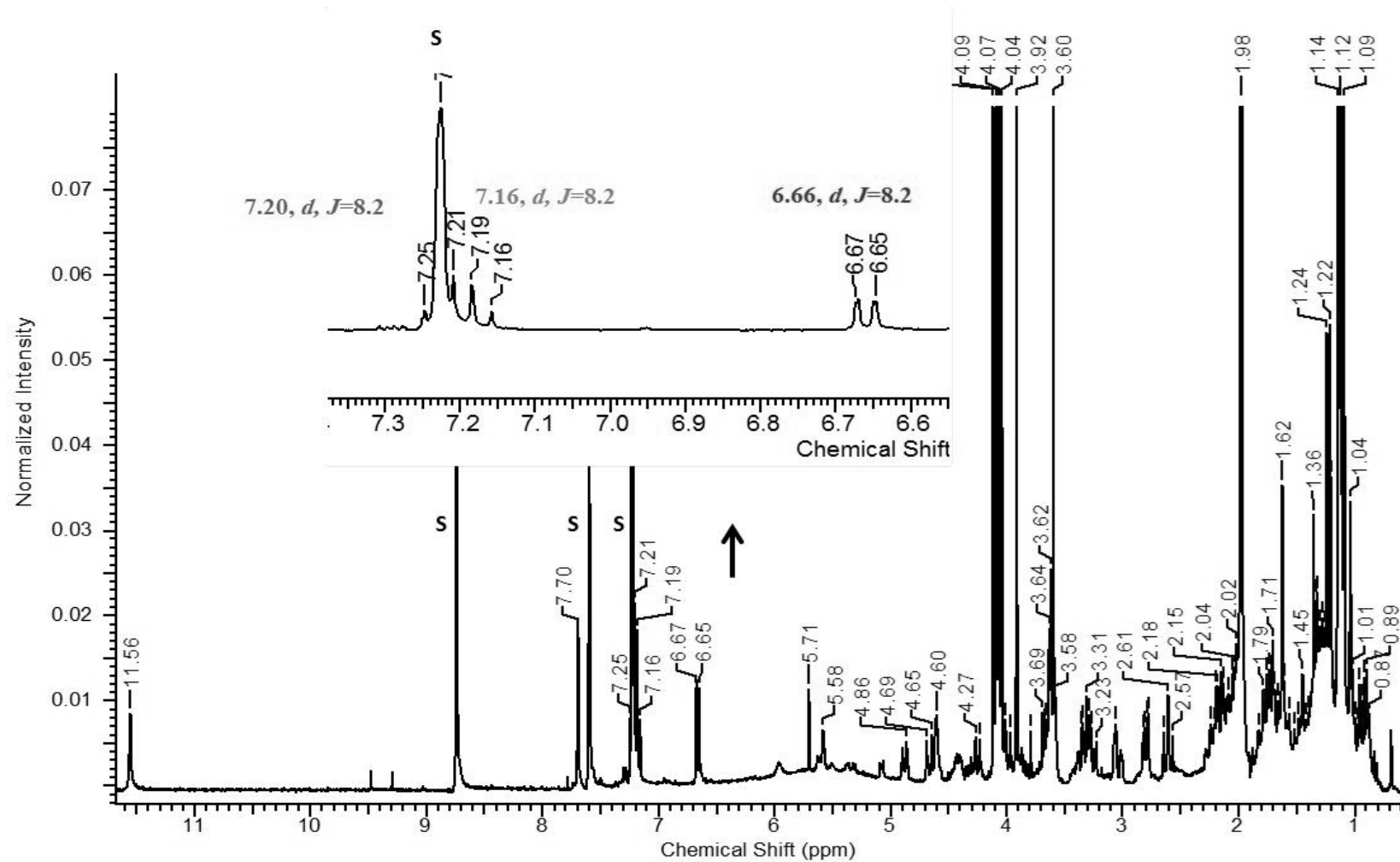
Posição	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	Correlações COSY
3	3,78 ( <i>d</i> ; 11,0)	
5	1,80 ( <i>m</i> ) $\alpha$	
	2,01 ( <i>m</i> ) $\beta$	
6	1,75 ( <i>m</i> )	
	2,05 ( <i>m</i> )	
10	6,66 ( <i>d</i> ; 8,0)	H-12
11	7,15 ( <i>d</i> ; 8,0)	
12	7,20 ( <i>d</i> ; 8,0)	H-10
14	1,58 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-14 $\beta$
	1,06 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-14 $\alpha$
15	2,23 ( <i>m</i> )	H-17, H-20

*continuação da Tabela 65.*

---

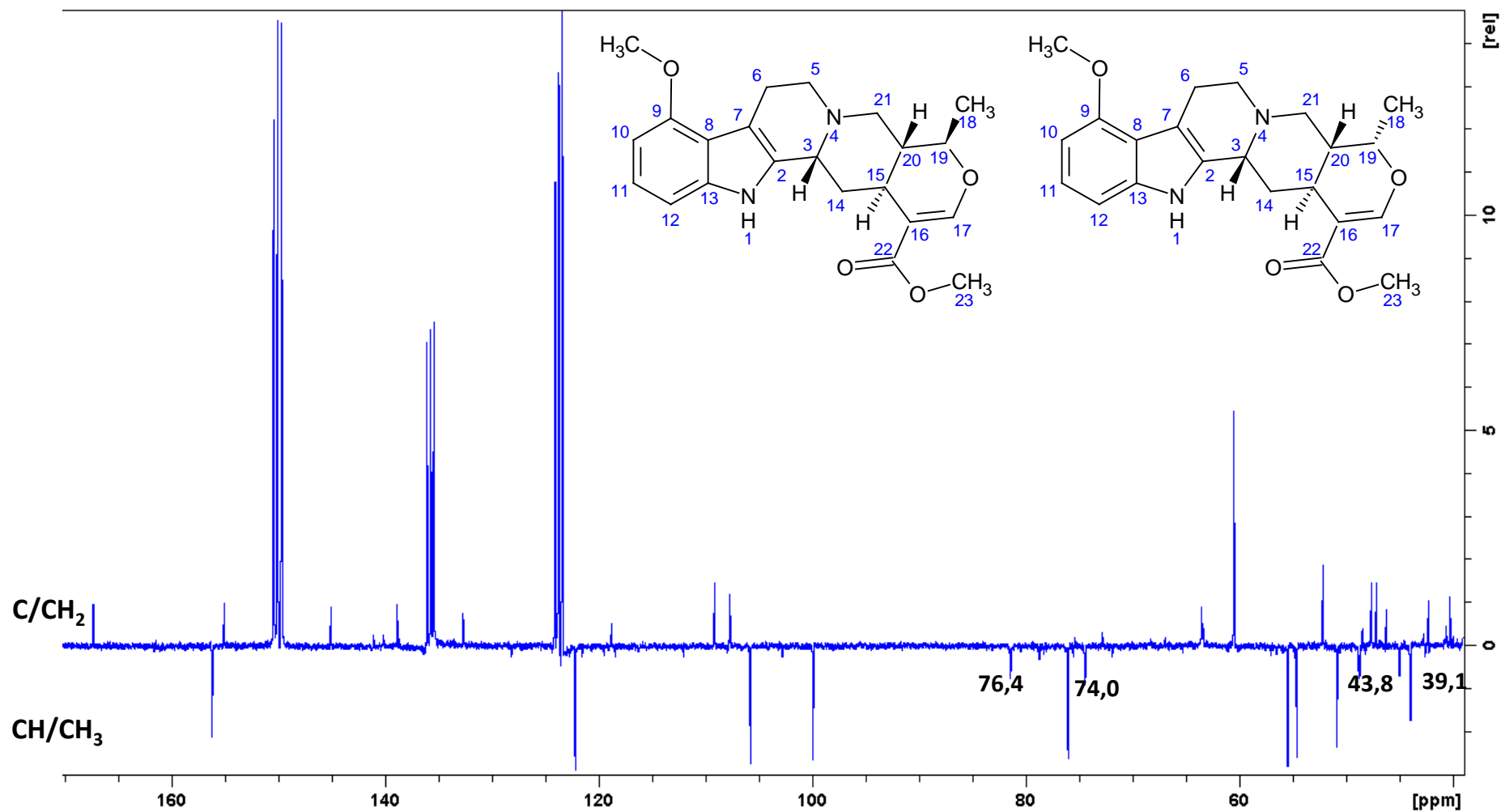
<b>17</b>	7,69 ( <i>s</i> )	H-15
<b>18</b>	1,23 ( <i>d</i> ; 6,5)	H-19
<b>19</b>	3,66 ( <i>d</i> ; 3,8)	H-18, H-20
<b>20</b>	1,70 ( <i>m</i> )	H-15, H-19
<b>21</b>	4,24 ( <i>d</i> ; 10,5) $\alpha$	H-21 $\beta$
	4,87 ( <i>d</i> ; 10,5) $\beta$	H-21 $\alpha$
<b>23</b>	3,59 ( <i>s</i> )	
<b>24</b>	3,91 ( <i>s</i> )	
<b>NH</b>	11,57 ( <i>s</i> )	

---

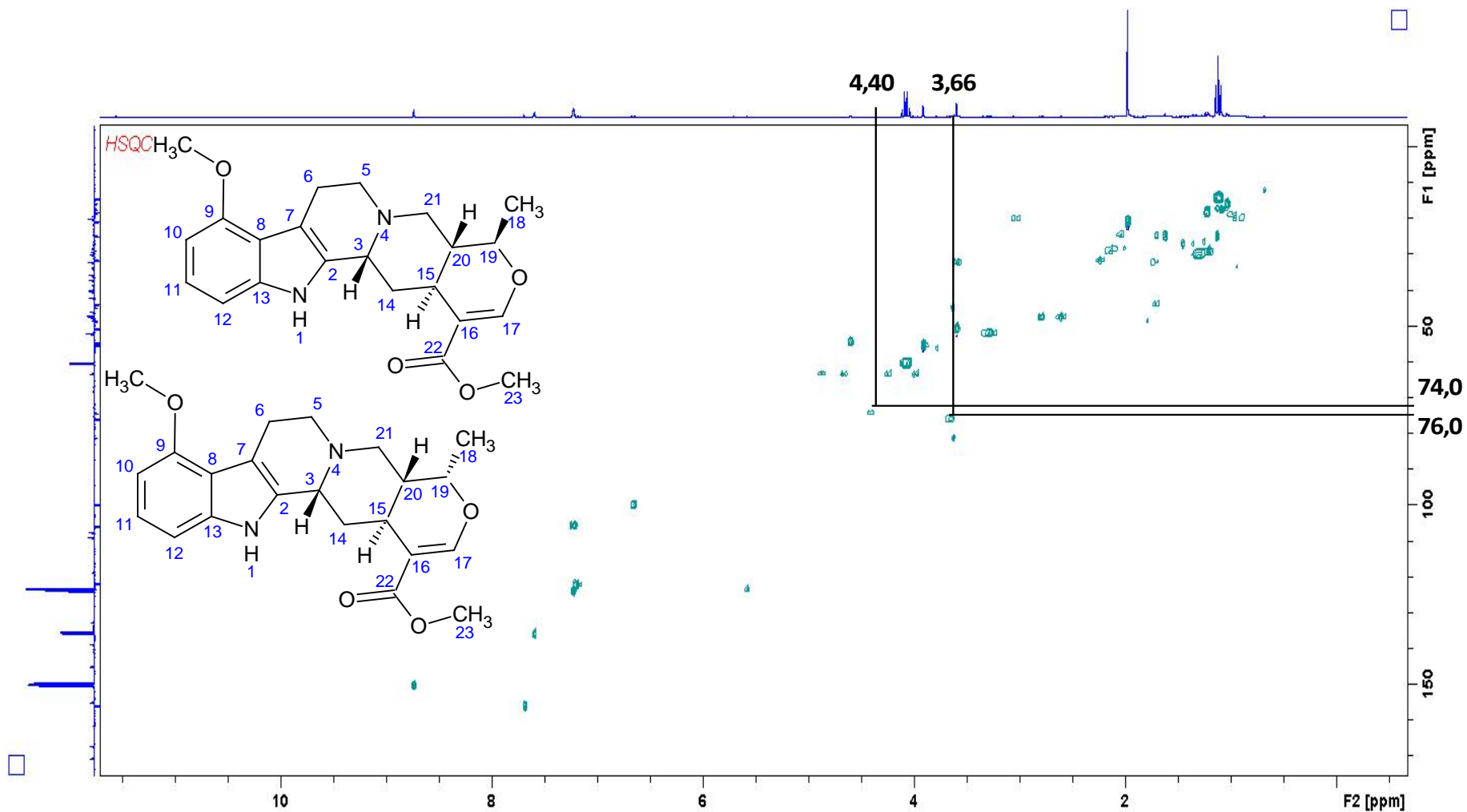


**Figura 50:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (500 MHz).

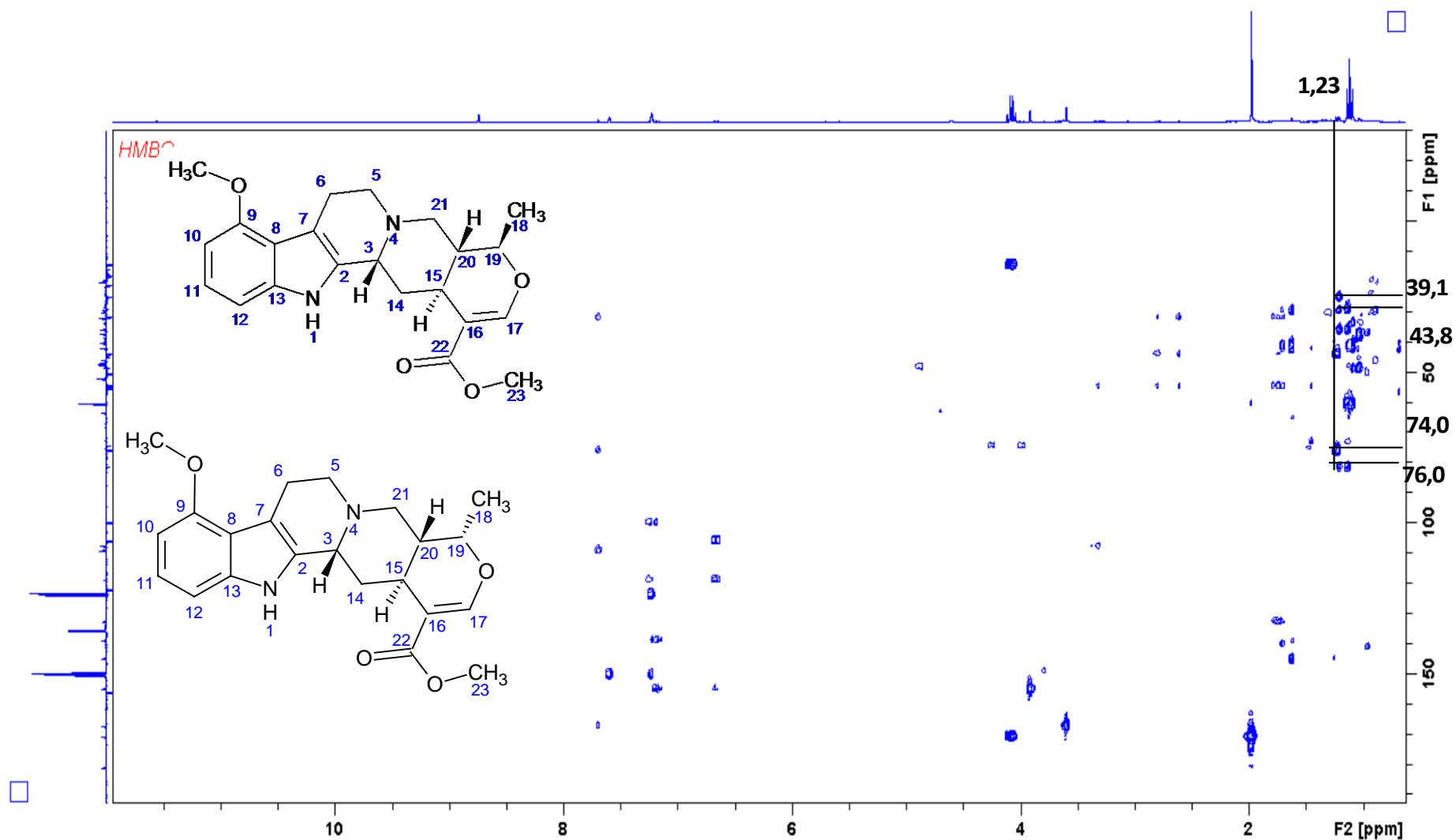




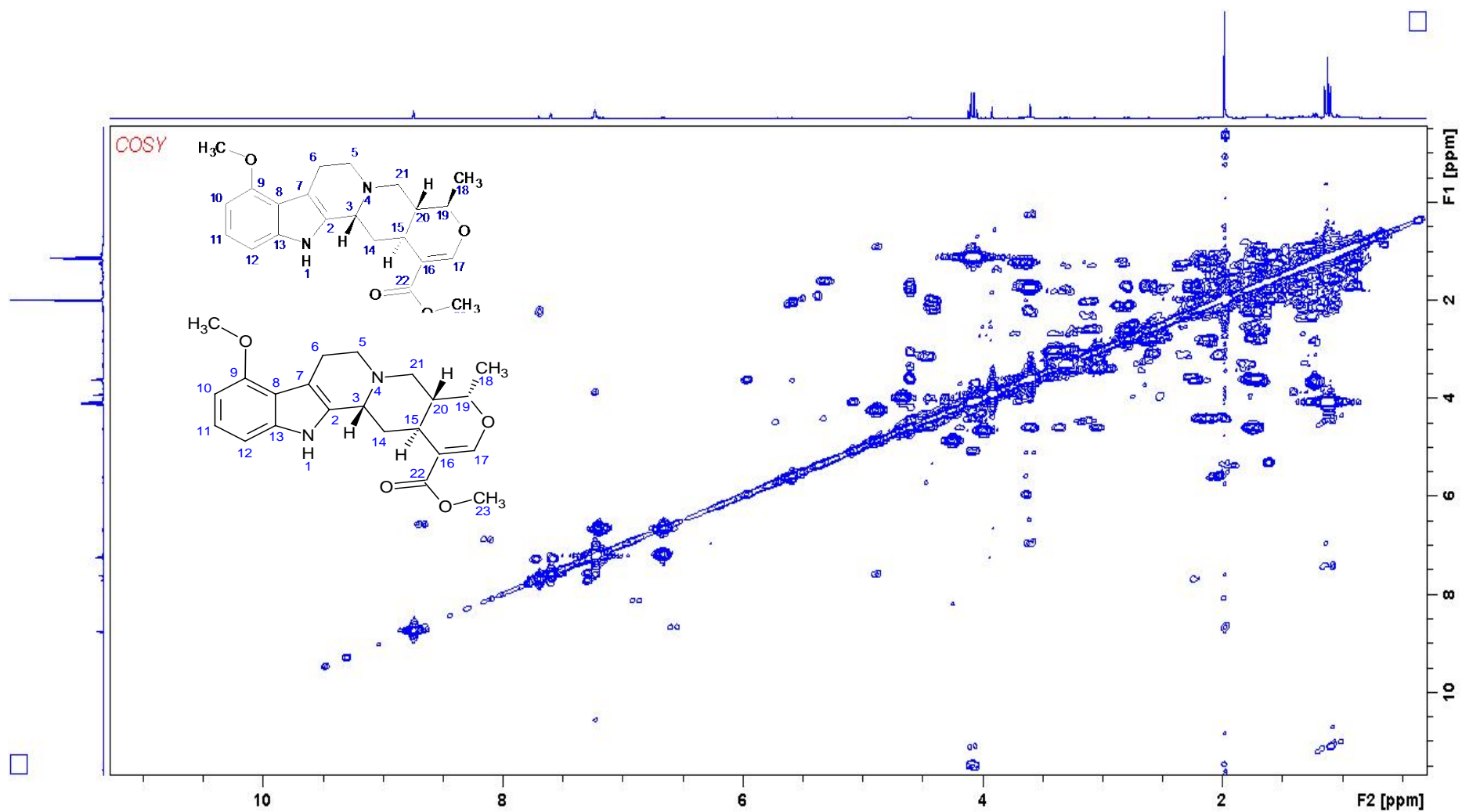
**Figura 51:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (125 MHz).



**Figura 52:** Mapa de contorno HSQC da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-akuamigina, com destaque para alguns dos deslocamentos que definem a estereoquímica, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (500 MHz).



**Figura 53:** Mapa de contorno HMBC da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina, com destaque para alguns dos deslocamentos que definem a estereoquímica, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (500 MHz).



**Figura 54:** Mapa de contorno COSY da mistura de 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-3-isoajmalicina em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N (500 MHz).

### 5.3.5. Identificação da Substância X

Foi possível observar no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 56) da substância X os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,35 (*d*;  $J=2,5$  Hz; H-9),  $\delta$  7,09 (*dd*;  $J=8,8$ ;  $2,5$  Hz; H-11) e  $\delta$  7,49 (*d*;  $J=8,8$  Hz; H-12), com um padrão de substituição em H-10, além de sinais de hidrogênios metínicos e metilênicos e o hidrogênio referente ao NH em  $\delta$  11,4 (Tabela 66).

O mapa de contorno HSQC (Figura 57) desta substância mostra o deslocamento em  $\delta$  55,8 referente ao C-3, que corresponde a posição  $\beta$ , ou seja, posicionado em relação ao plano, juntamente com a observação dos deslocamentos em  $\delta$  17,6 (C-6),  $\delta$  31,7 (C-14) e  $\delta$  44,2 (C-20) pôde-se confirmar a estereoquímica desta substância pertencente à série *pseudo*.

No mapa de contorno HMBC (Figura 58), além das correlações heteronucleares  $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$  entre os carbonos aromáticos do núcleo indólico (C-8, C-9 e C-10) e o hidrogênio (H-11), apresentou também correlações correspondentes à unidade secologanínica de C-20 com os hidrogênios metílicos ( $\text{CH}_3$ -18); de C-16 com o hidrogênio olefínico (H-17) e da carbonila do grupo éster (C-22) com os respectivos hidrogênios da metoxila.

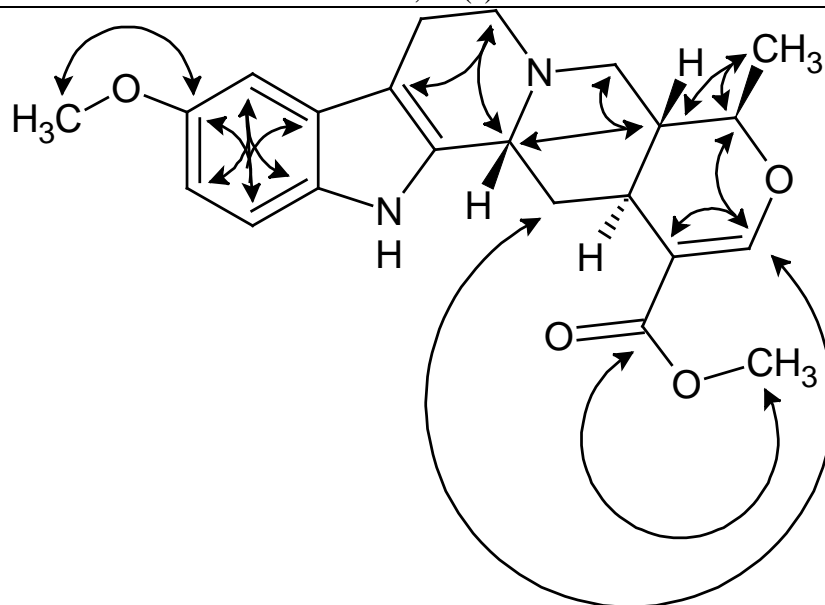
Os dados de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY), o dado obtido com a espectrometria de massas (íon molecular em  $m/z = 382$ ) interpretados juntamente com as informações obtidas nas referências bibliográficas (SALKIN *et al.*, 1961; ARBAIN *et al.*, 1993; JORGE *et al.*, 2006) confirmaram a identificação desta substância como sendo 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (Figura 55).

**Tabela 66:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina.

Posição	C	$\delta\text{C}$	HSQC	HMBC
			$\delta\text{H}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
2	C	135,9		
3	CH	55,8	3,70 ( <i>s</i> )	
5	CH <sub>2</sub>	50,6	3,62 ( <i>d</i> ; 2,0) $\alpha$ 3,30 ( <i>d</i> ; 6,0) $\beta$	C-3, C-7
6	CH <sub>2</sub>	17,6	2,61 ( <i>m</i> ) 2,55 ( <i>m</i> )	C-5, C-7
7	C	108,0		
8	C	129,1		

continuação da Tabela 66.

9	CH	100,7	7,35 ( <i>d</i> ; 2,5)	C-13
10	C	155,0		
11	CH	111,3	7,09 ( <i>dd</i> ; 8,8; 2,5)	C-8, C-9, C-10
12	CH	112,8	7,49 ( <i>d</i> ; 8,8)	
13	C	132,4		
14	CH <sub>2</sub>	31,7	2,20 ( <i>m</i> ) 2,27 ( <i>m</i> )	
15	CH	32,5	2,40 ( <i>m</i> )	
16	C	109,0		
17	CH	156,3	7,68 ( <i>d</i> ; 2,0)	C-14, C-16, C-19
18	CH <sub>3</sub>	18,2	1,22 ( <i>d</i> ; 6,0)	C-19, C-20
19	CH	76,0	3,58 ( <i>m</i> )	
20	CH	44,2	1,63 ( <i>m</i> )	C-3
21	CH <sub>2</sub>	47,7	2,78 ( <i>dd</i> ; 10,0; 3,5) $\alpha$ 2,52 ( <i>m</i> ) $\beta$	C-20 C-20
22	C	167,4		
23	CH <sub>3</sub>	50,7	3,59 ( <i>s</i> )	C-22
24	CH <sub>3</sub>	54,0	3,87 ( <i>s</i> )	C-10
NH			11,43 ( <i>s</i> )	



**Figura 55:** Estrutura da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina e suas correlações no HMBC.

O mapa de contorno COSY (Figura 59) apresentou correlações homonucleares confirmando a estrutura proposta. A análise dos dados obtidos revelou correlações entre os hidrogênios aromáticos do núcleo indólico em  $\delta$  7,09 (H-11) com  $\delta$  7,35 (H-9) e com  $\delta$  6,49 (H-12); entre os hidrogênios da unidade secologanínica em  $\delta$  3,58 (H-19) e 1,22 (CH<sub>3</sub>-18); entre os hidrogênios quinolizidínicos H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$ ; entre H-14 $\alpha$  e H-5, entre H-14 $\beta$  e H-21 $\beta$ , os demais acoplamentos estão descritos na Tabela 67.

**Tabela 67:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) com as correlações  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  COSY da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	Correlações COSY
3	3,70 ( <i>s</i> )	
5	3,62 ( <i>d</i> ; 2,0) $\alpha$ 3,30 ( <i>d</i> ; 6,0) $\beta$	H-14 $\alpha$ , H-18, H-20
6	2,61 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 2,55 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-6 $\beta$ H-6 $\alpha$
9	7,35 ( <i>d</i> ; 2,5)	H-11
11	7,09 ( <i>dd</i> ; 8,8; 2,5)	H-9, H-12
12	7,49 ( <i>d</i> ; 8,8)	H-11
14	2,20 ( <i>m</i> ) $\alpha$ 2,27 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-5 H-21 $\beta$
15	2,40 ( <i>m</i> )	H-20
17	7,68 ( <i>d</i> ; 2,0)	
18	1,22 ( <i>d</i> ; 6,0)	H-5, H-19
19	3,58 ( <i>m</i> )	H-18
20	1,63 ( <i>m</i> )	H-5, H-15, H-21 $\beta$ , H-21 $\alpha$
21	2,78 ( <i>dd</i> ; 10,0; 3,5) $\alpha$ 2,52 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-20, H-21 $\beta$
23	3,59 ( <i>s</i> )	
24	3,87 ( <i>s</i> )	
NH	11,43 ( <i>s</i> )	

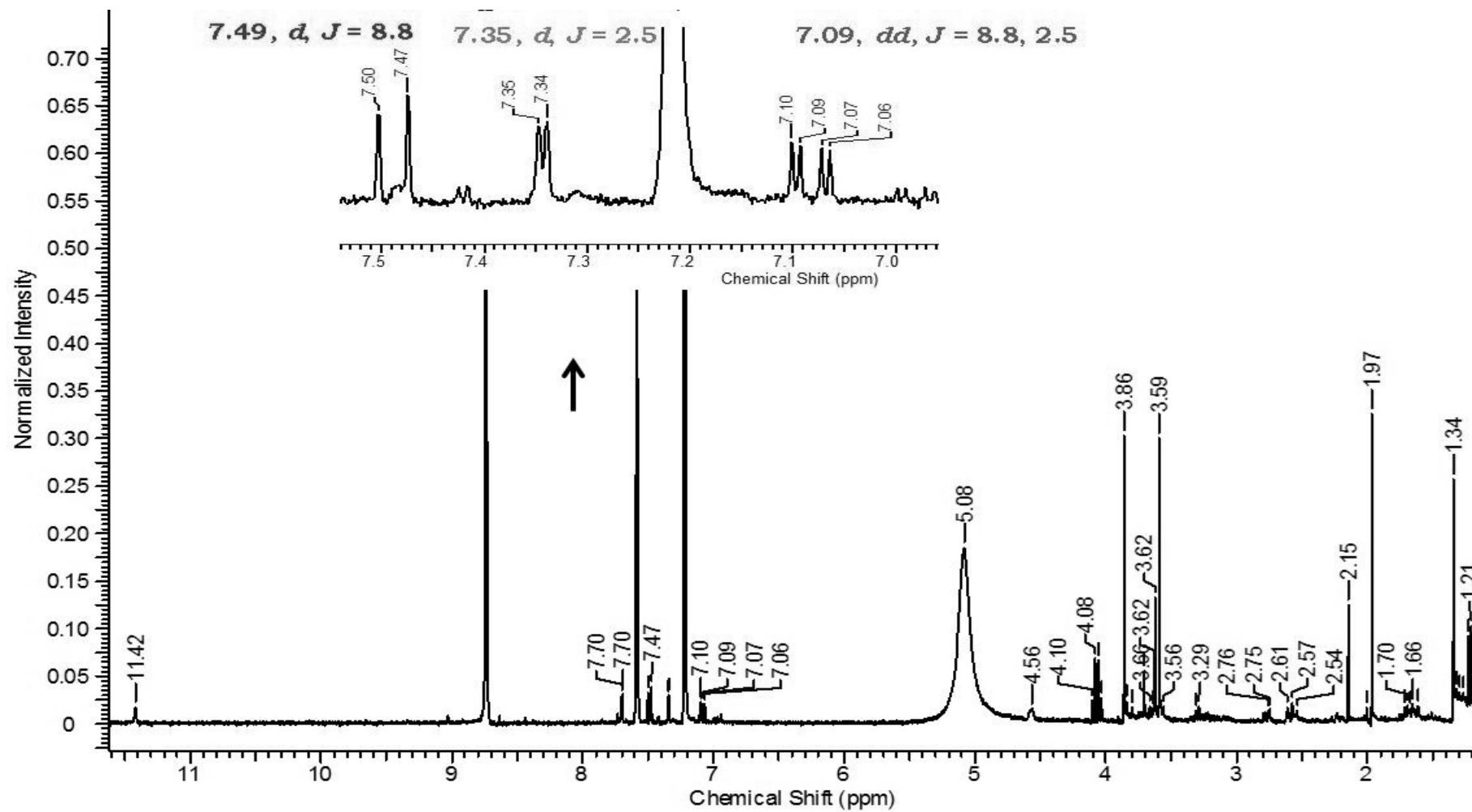
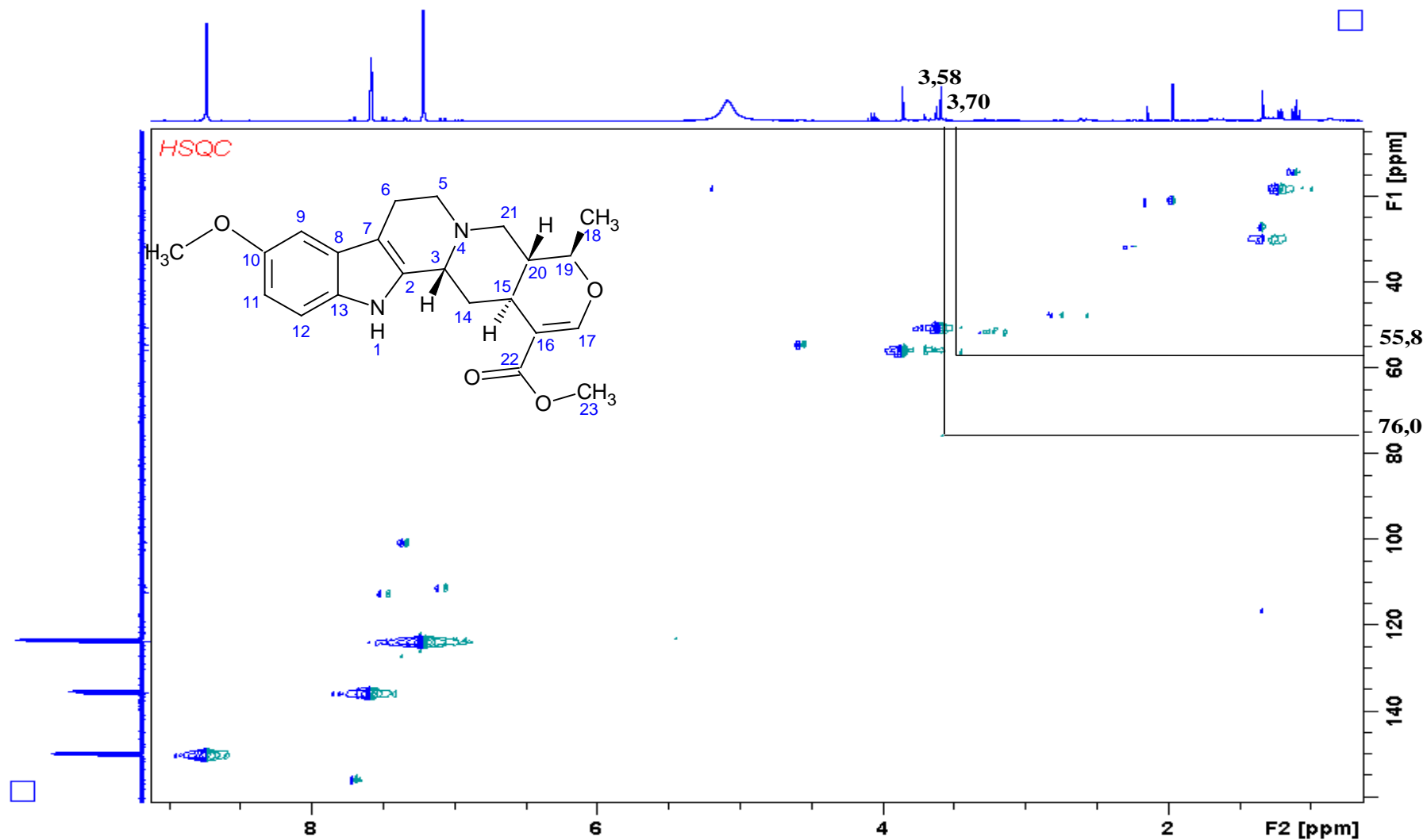


Figura 56: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (500 MHz).





**Figura 57:** Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, com destaque para os deslocamentos que definem a estereoquímica, em  $C_5D_5N$ .

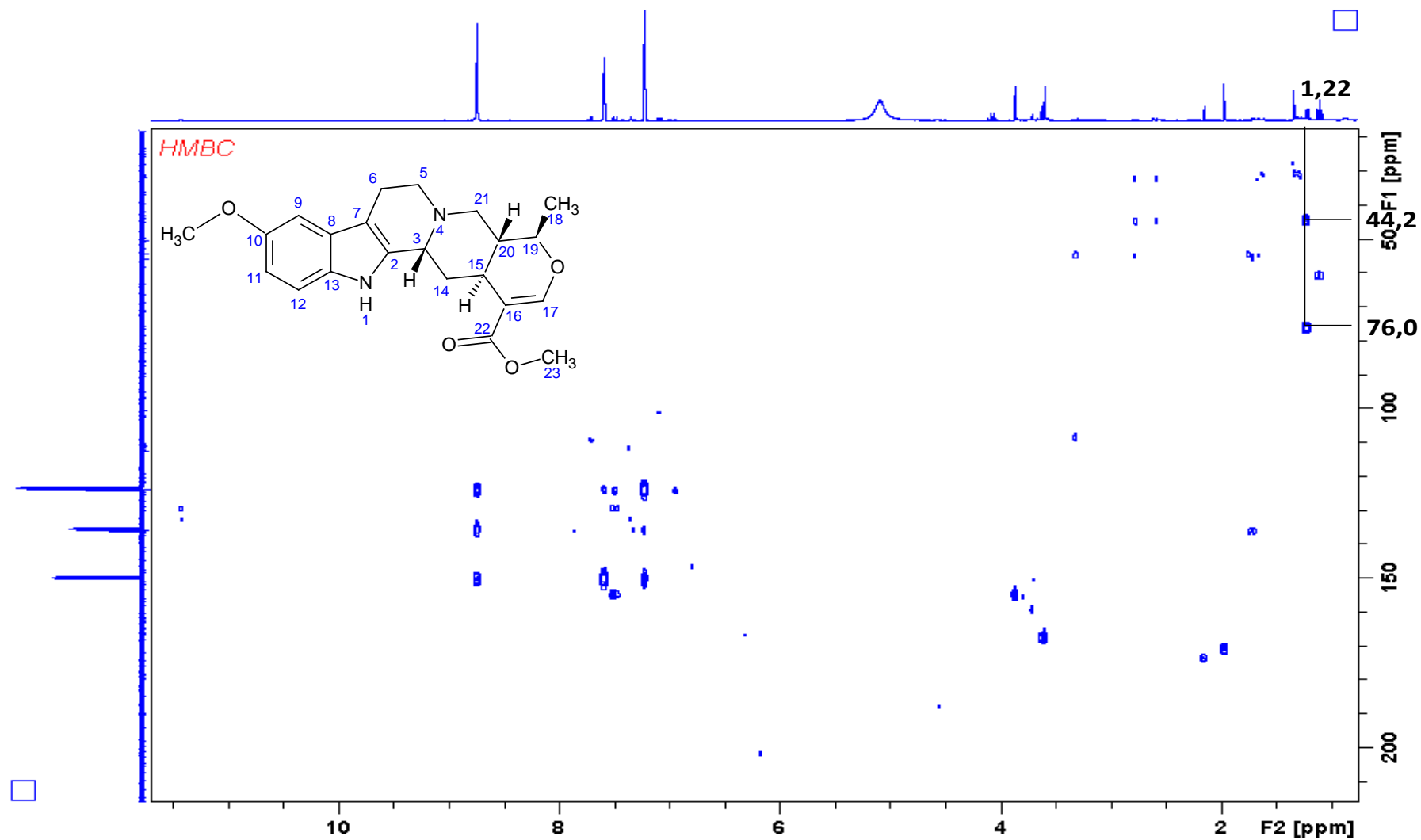
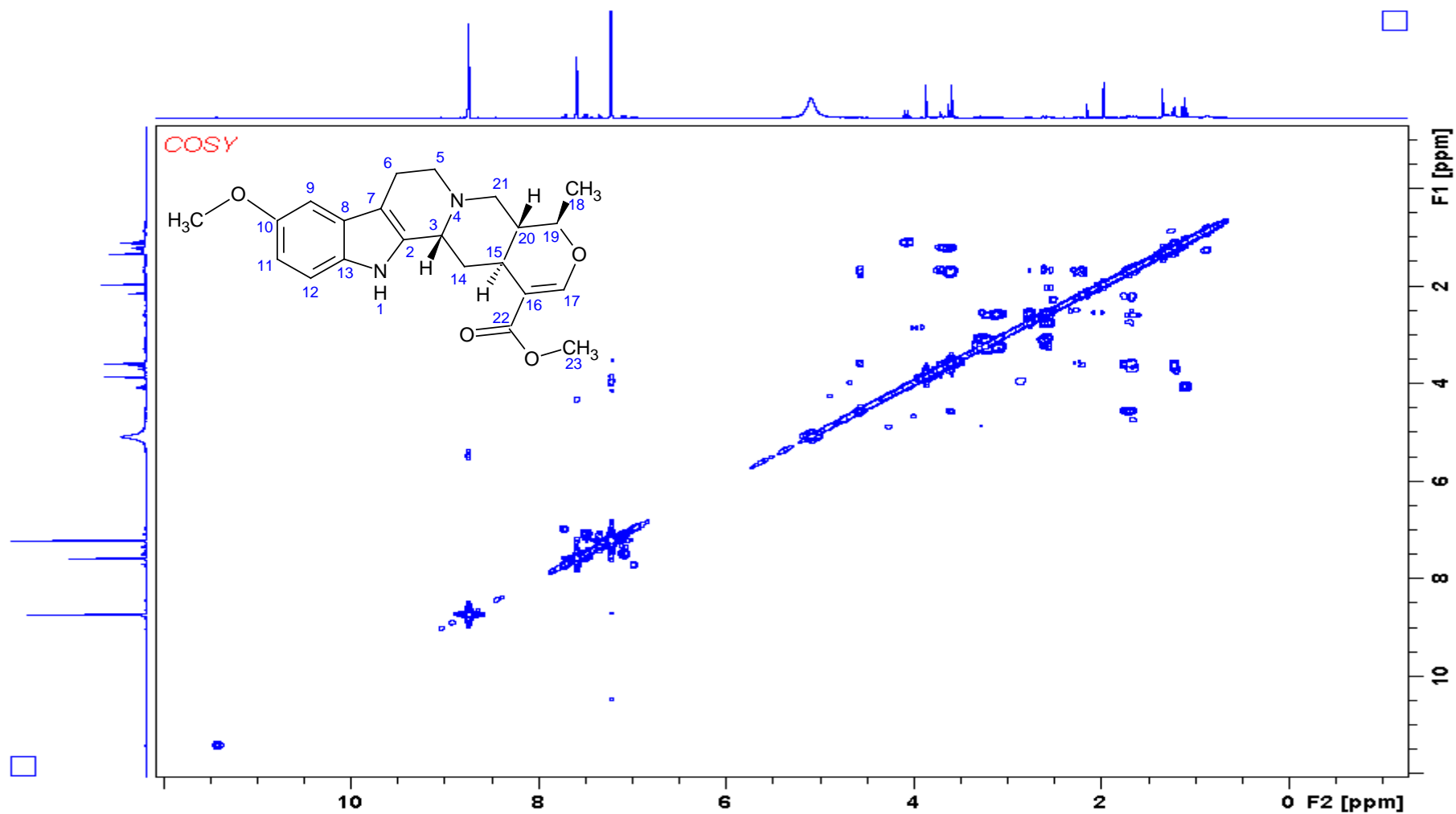


Figura 58: Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina em  $C_5D_5N$  (500 MHz).



**Figura 59:** Mapa de contorno COSY da 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N (500 MHz).

### 5.3.6. Identificação da Substância XI

A análise dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 61), bem como a constante de acoplamento dos hidrogênios do anel aromático sugere um padrão de substituição em H-11. O valor de deslocamento químico do H-19 em  $\delta$  4,15 (duplo quarteto) indica que esta substância pertence à série H-19 $\beta$ , 20 $\alpha$ .

No mapa de contorno HSQC (Figura 62) observou-se o deslocamento químico dos carbonos no anel A (C-8 e C-13) em  $\delta$  126,5 e 130,7, respectivamente; sinal de carbono de carbonila em região mais desprotegida ( $\delta$  167,3) característico de grupo éster; cinco átomos de carbono quaternários  $sp^2$ , C-2 ( $\delta$  140,0), C-13 ( $\delta$  130,7), C-7 ( $\delta$  109,9) e C-8 ( $\delta$  126,5) estes adjacentes a NH e em  $\delta$  154,2 (C-10); contém também outros quatro sinais de carbono  $sp^2$ , C-9 ( $\delta$  100,0), C-11 ( $\delta$  111,0) e C-12 ( $\delta$  111,3), em região mais protegida em relação aos carbonos aromáticos não-hidrogenados. Observaram-se sinais em  $\delta$  50,9 e em  $\delta$  55,6 característicos do grupo metoxila, em  $\delta$  17,1 (C-18) referente ao grupo metila e em  $\delta$  75,8 (C-19). Para definir a estereoquímica foram observados os centros estereogênicos: C-3 (junção do anel C e D) que para esta substância encontra-se em  $\delta$  55,1 e C-14 em  $\delta$  31,2, além dos carbonos que encontram-se na junção do anel D e E, C-15 em  $\delta$  25,1 e C-20 em  $\delta$  36,6, indicam que esta substância pertence à série *epiallo*.

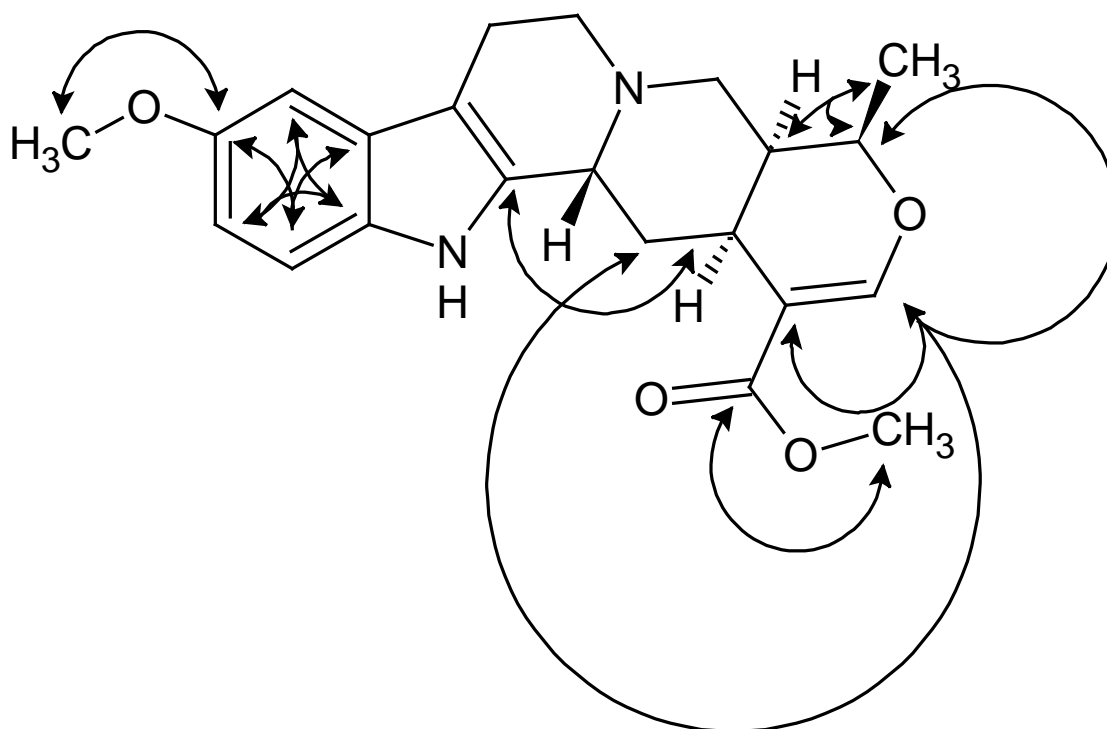
No mapa de contorno HMBC (Figura 63) foram verificadas as correlações entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 68) confirmando a estrutura proposta como sendo o alcaloide 10-metoxi-3-isorauniticina (Figura 60) segundo dados da literatura (PHILLIPSON e SUPAVITA; 1983; ADIBATTI *et al.*, 1991)

**Tabela 68:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-3-isorauniticina.

Posição	C	HSQC		HMBC
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	$^{2-4}J_{\text{C,H}}$
2	C	140,0		
3	CH	55,1	3,18 ( <i>bd</i> )	
5	CH <sub>2</sub>	49,5	2,39 ( <i>d</i> ; 12,0)	
			3,06 ( <i>m</i> )	
6	CH <sub>2</sub>	21,2	2,69 ( <i>m</i> )	
			3,02 ( <i>m</i> )	
7	C	109,9		

continuação da Tabela 68.

8	C	126,5		
9	CH	100,0	6,89 ( <i>d</i> ; 2,3)	C-11, C-13
10	C	154,3		
11	CH	111,0	6,68 ( <i>dd</i> ; 8,7, 2,3)	C-9, C-13
12	CH	111,3	7,19 ( <i>d</i> ; 8,7)	C-8, C-10
13	C	130,7		
14	CH <sub>2</sub>	31,2	1,75 ( <i>m</i> ) 3,04 ( <i>m</i> )	
15	CH	25,1	1,55 ( <i>d</i> ; 6,5)	C-2
16	C	105,4		
17	CH	157,2	7,63 ( <i>s</i> )	C-14, C-16, C-19
18	CH <sub>3</sub>	17,1	1,39 ( <i>d</i> ; 6,6)	C-19, C-20
19	CH	75,8	4,15 ( <i>dq</i> )	
20	CH	36,6	2,36 ( <i>m</i> )	
21	CH <sub>2</sub>	53,2	2,61 ( <i>m</i> ) 3,11 ( <i>m</i> )	
22	C	167,3		
23	CH <sub>3</sub>	51,0	3,75 ( <i>s</i> )	C-22
24	CH <sub>3</sub>	55,6	3,87 ( <i>s</i> )	C-10
NH			9,11 ( <i>s</i> )	



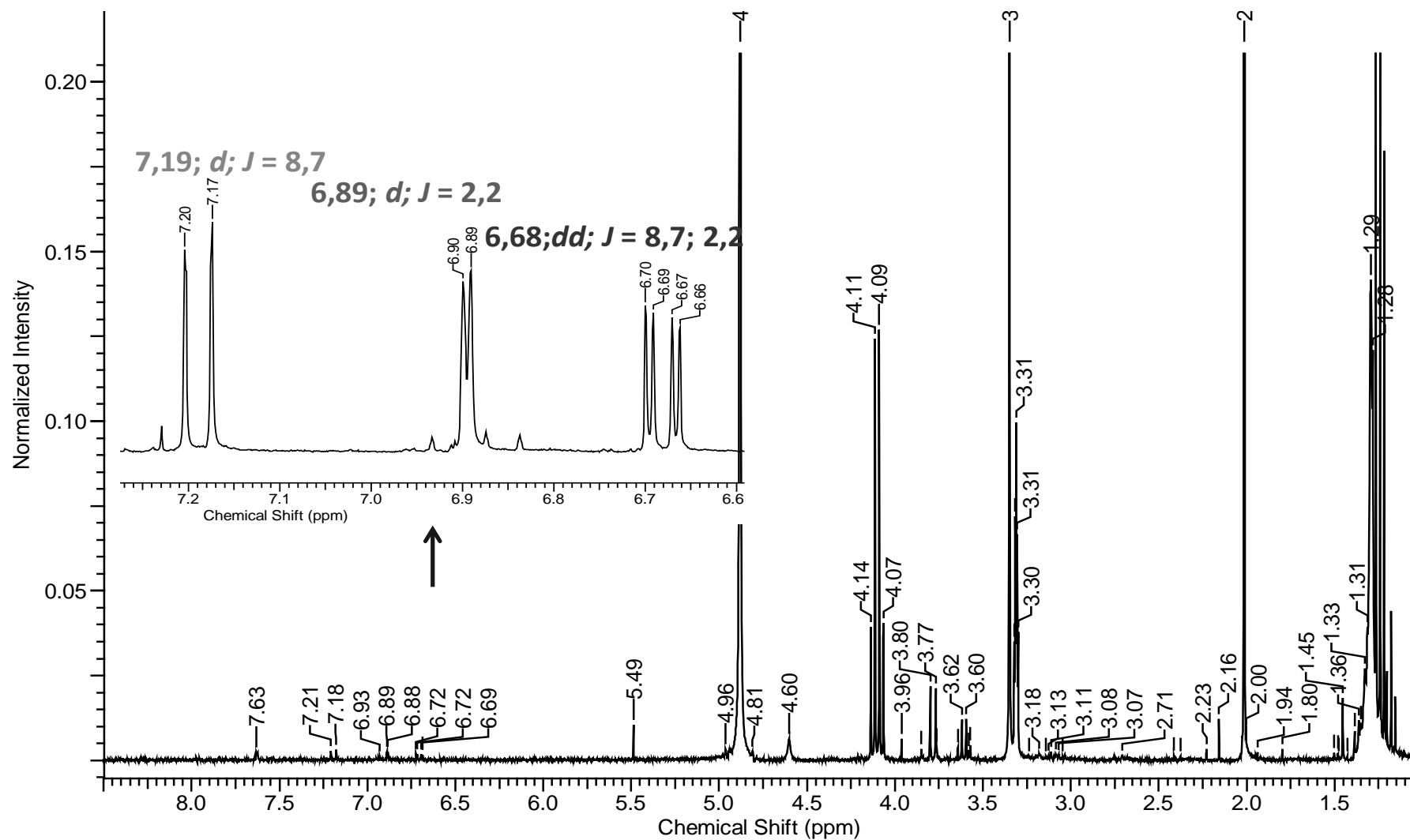
**Figura 60:** Estrutura da 10-metoxi-3-isoraunicina e suas correlações no HMBC.

O mapa de contorno COSY (Figura 64) apresentou correlações homonucleares entre os hidrogênios: H-3 e H-14 $\beta$ , H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$ ; e entre os hidrogênios aromáticos do núcleo indólico (H-11 e H-12); entre os hidrogênios da unidade

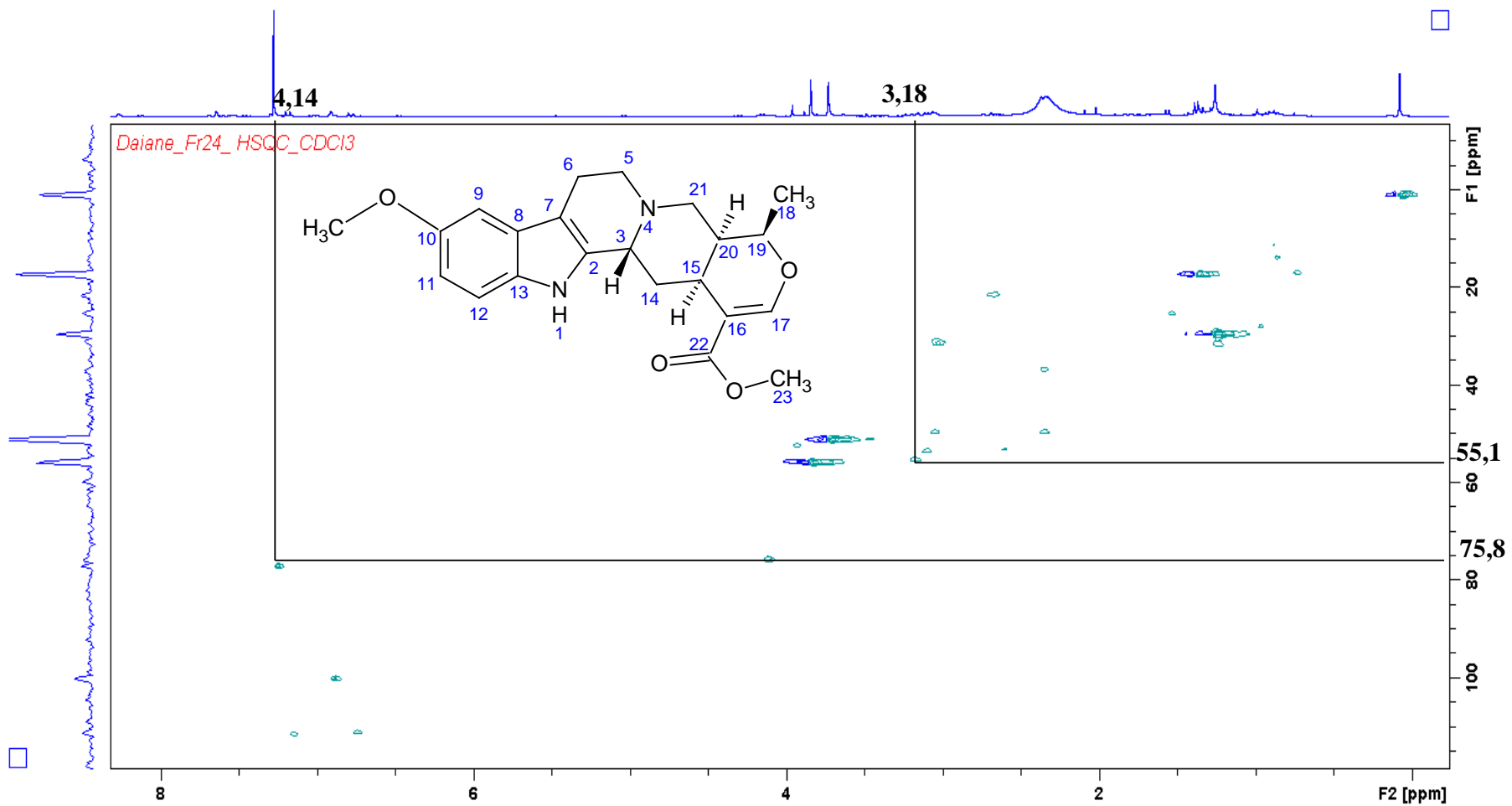
secologanínica (H-19 e CH<sub>3</sub>-18); entre os hidrogênios quinolizidínicos (H-14 e H-21) e (H-21 $\alpha$  e H-21  $\beta$ ) (Tabela 69).

**Tabela 69:** Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) com as correlações <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY da 10-metoxi-3-isorauniticina.

Posição	$\delta_H$ ( <i>m, J em Hz</i> )	Correlações COSY
<b>3</b>	3,18 ( <i>dl</i> ; 10,0)	H-14 $\beta$
<b>5</b>	2,39 ( <i>d</i> ; 12,0) $\alpha$	H-5 $\beta$
	3,06 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-5 $\alpha$
<b>6</b>	2,69 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-6 $\beta$
	3,02 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-6 $\alpha$
<b>9</b>	6,89 ( <i>d</i> ; 2,3)	
<b>11</b>	6,68 ( <i>dd</i> ; 8,7, 2,3)	H-12
<b>12</b>	7,19 ( <i>d</i> ; 8,7)	H-11
<b>14</b>	1,75 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-3, H-14 $\alpha$
	3,04 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-14 $\beta$ , H-21 $\alpha$
<b>15</b>	1,55 ( <i>d</i> ; 6,5)	
<b>17</b>	7,63 ( <i>s</i> )	14 $\alpha$ , H-19
<b>18</b>	1,39 ( <i>d</i> ; 6,6)	H-19
<b>19</b>	4,15 ( <i>dq.</i> )	H-18
<b>20</b>	2,36 ( <i>m</i> )	
<b>21</b>	3,11 ( <i>m</i> ) $\alpha$	H-14 $\beta$ , H-21 $\beta$
	2,61 ( <i>m</i> ) $\beta$	H-21 $\alpha$
<b>23</b>	3,75 ( <i>s</i> )	
<b>24</b>	3,87 ( <i>s</i> )	
<b>NH</b>	9,11 ( <i>s</i> )	

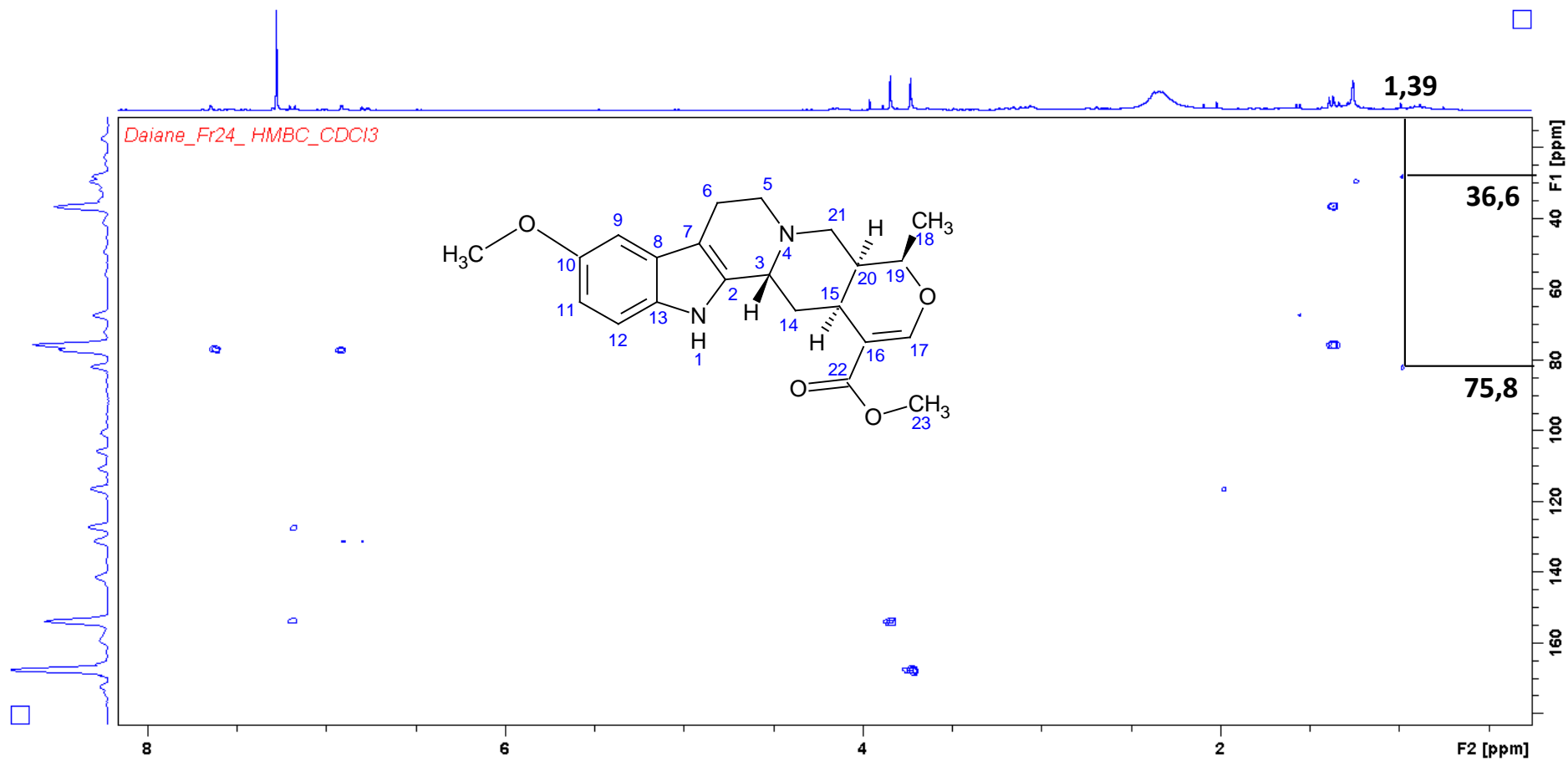


**Figura 61:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 10-metoxi-3-isoraunicina em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

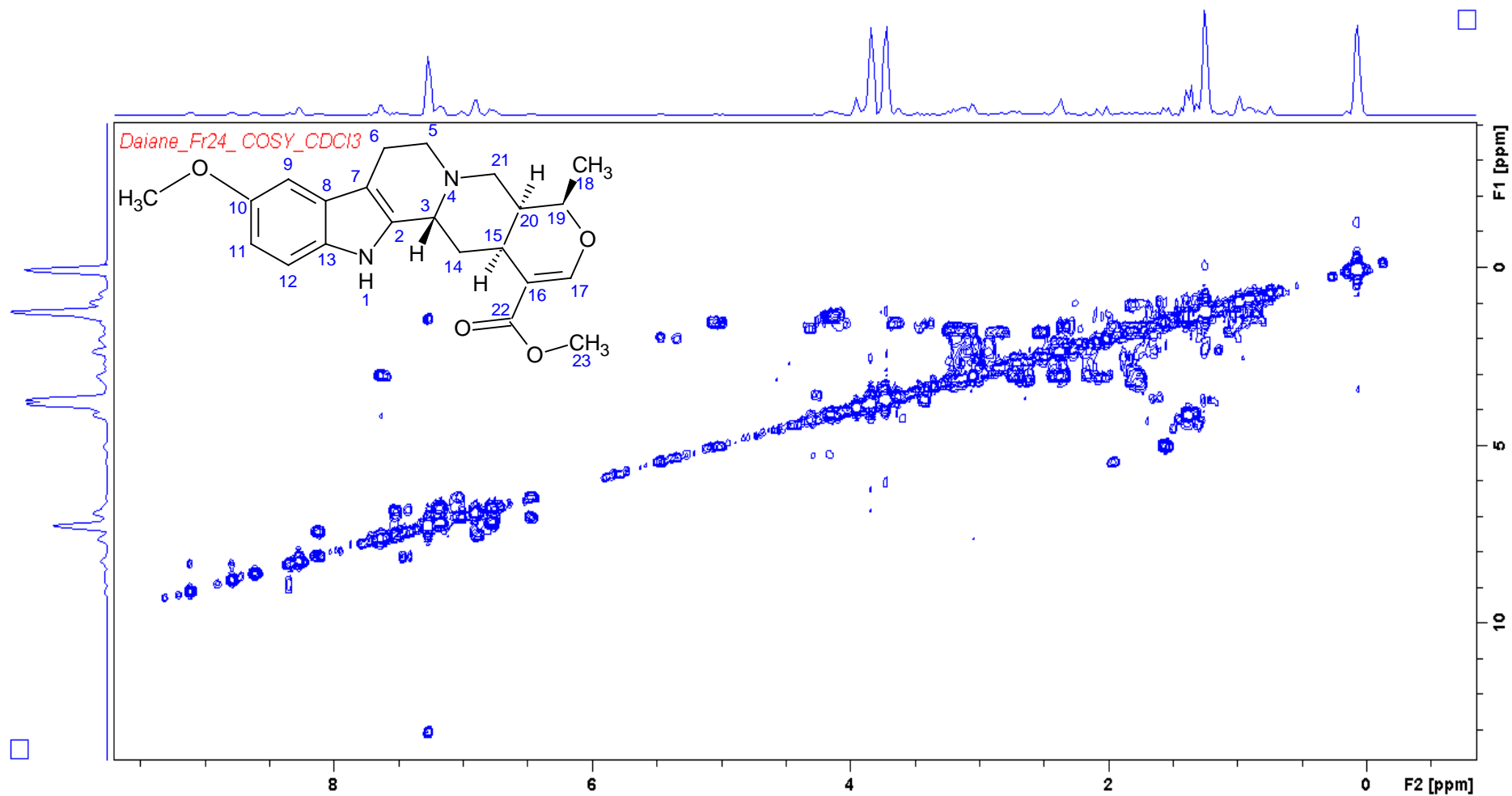


**Figura 62:** Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-3-isoraunicina em CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).





**Figura 63:** Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-3-isoraunicina em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



**Figura 64:** Mapa de contorno COSY da 10-metoxi-3-isoraunicina em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

### 5.3.7. Identificação da Substância XII

Após análise de RMN (1D e 2D) verificou-se que os sinais de deslocamento assemelhavam-se com os da substância XI (**10-metoxi-3-isorauniticina**), diferindo no deslocamento químico de C-3. Devido a esta diferença, esta substância foi identificada como **10-metoxi-rauniticina** (Figura 65).

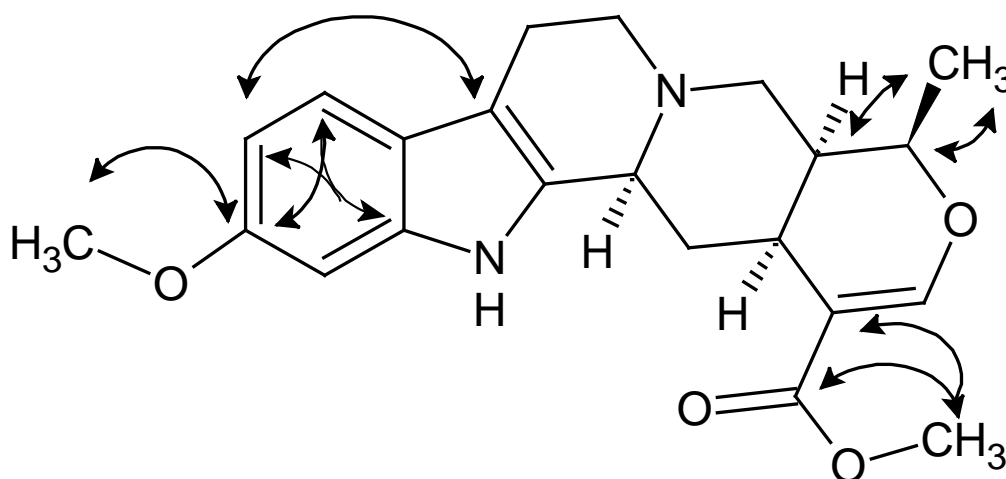
Segundo Bruyn e colaboradores (1989) o valor de deslocamento químico do H-19 fornece uma indicação sobre a posição relativa desse hidrogênio. Quando seu valor encontra-se entre  $\delta$  4,2 e 4,5, ele pertence à série H-19 $\beta$ , 20 $\alpha$ , entretanto, se esses átomos estiverem dispostos em posição *cis*, o valor de  $\delta_H$  do H-19 estará em aproximadamente  $\delta$  3,7. Com a análise do espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 66), pôde-se distinguir a **substância XI** da **substância XII**, pela diferença do deslocamento químico do hidrogênio na posição 19, em **10-metoxi-rauniticina** (substância XII) encontra-se em  $\delta$  3,67 e em **10-metoxi-3-isorauniticina** (substância XI) em  $\delta$  4,46.

A análise das correlações heteronucleares  $^{13}C \times ^1H$  no mapa de contorno HSQC (Figura 67) confirmaram a estrutura proposta como sendo **10-metoxi-rauniticina**, cujo deslocamento químico do C-3 está em  $\delta$  64,0 (posição  $\alpha$ ) enquanto para **10-metoxi-3-isorauniticina**, este se encontra em 55,1 (posição  $\beta$ ). No mapa de contorno HMBC (Figura 68) pôde-se verificar as correlações da MeO-23 em  $\delta$  3,74 com C-22 ( $\delta$  167,4) e entre a MeO em  $\delta$  3,85 e C-10 (154,0), e as correlações entre hidrogênios e carbonos do anel aromático: em  $\delta$  6,94 (H-11) com  $\delta$  131,1 (C-13); em  $\delta$  6,98 (H-12) com  $\delta$  124,3 (C-8) e com 154,0 (C-10), as quais foram imprescindíveis para determinar a posição dos mesmos (Tabela 70).

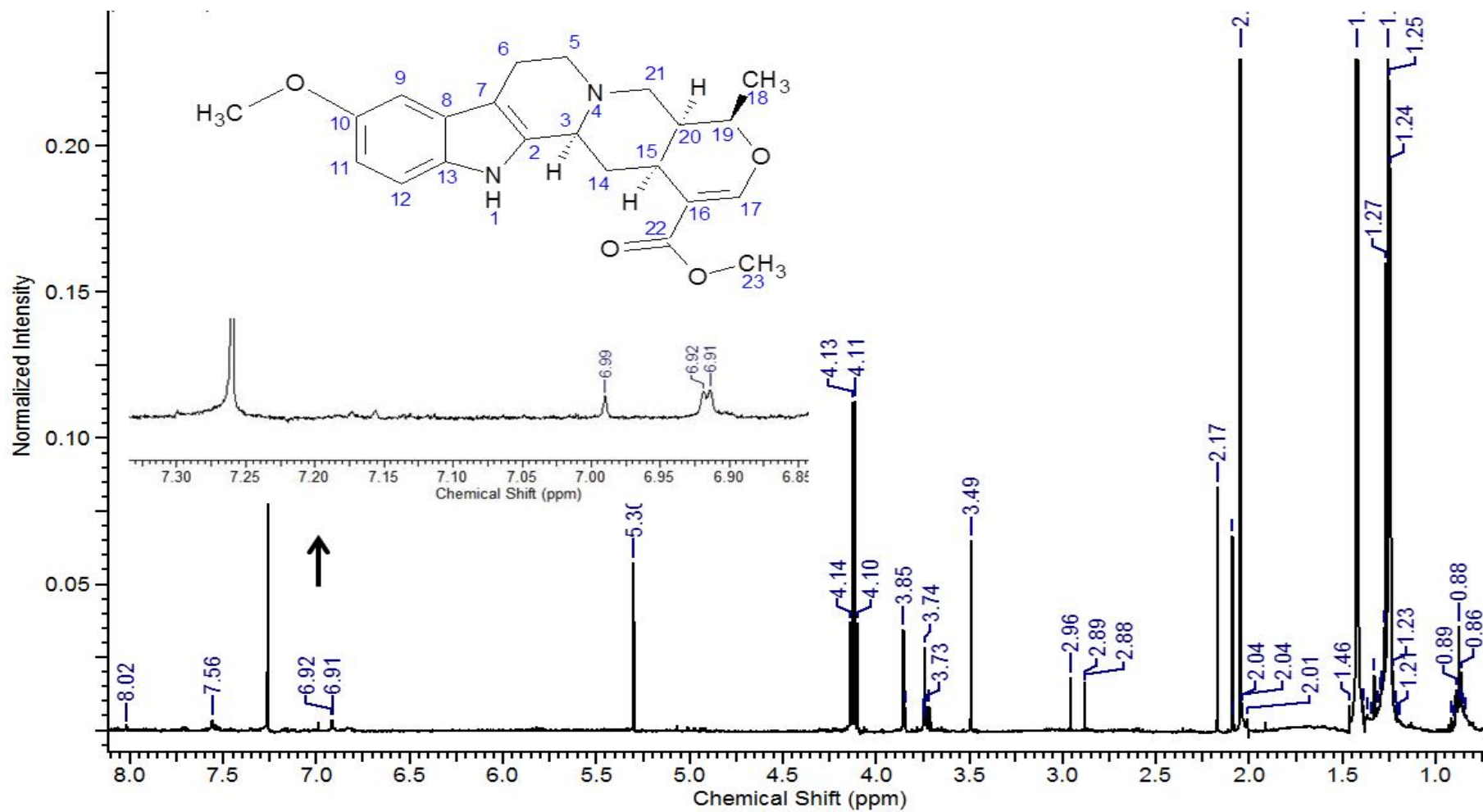
Através da análise conjunta dos espectros de RMN foi possível determinar a configuração da molécula em *allo* e ao comparar estes dados com a literatura foi possível identificá-la como sendo **10-metoxi-rauniticina** (ARBAIN *et al.*, 1998b; SALIM *et al.*, 2011).

**Tabela 70:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e correlações heteronucleares da 10-metoxi-rauniticina.

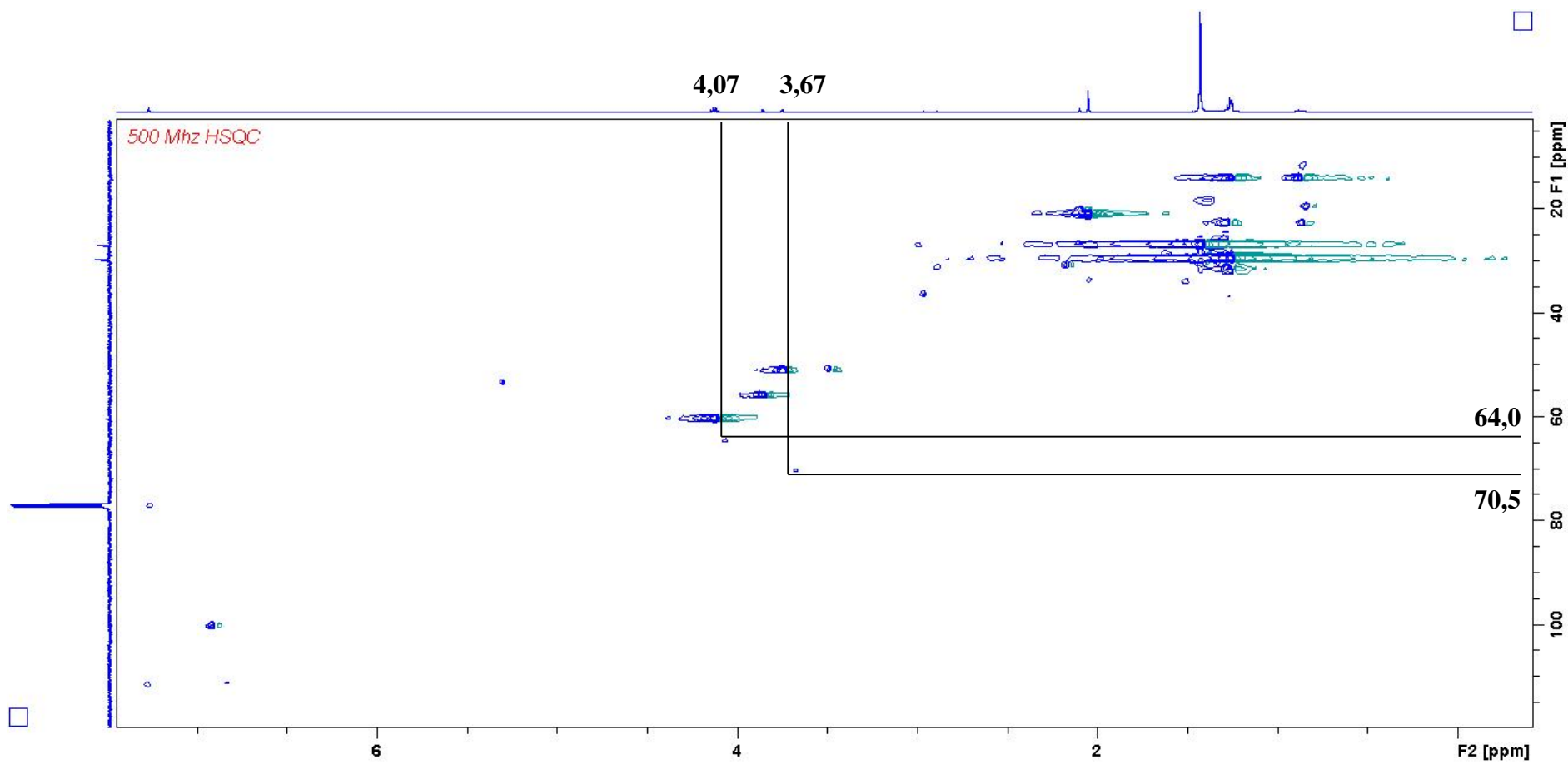
Posição	C	HSQC		HMBC $^{2-4}J_{\text{C,H}}$
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz)	
2	C	137,0		
3	CH	64,0	4,07 ( <i>m</i> )	
5	CH <sub>2</sub>	55,0	2,50 ( <i>ddd</i> ; 4,0; 4,0; 4,0)	
6	CH <sub>2</sub>	22,6	1,27 ( <i>m</i> ) 0,87 ( <i>m</i> )	
7	C	109,0		
8	C	124,3		
9	CH	111,6	7,27 ( <i>s</i> )	
10	C	154,0		
11	CH	111,4	6,94 ( <i>d</i> ; 2,0)	C-13
12	CH	100,2	6,98 ( <i>s</i> )	C-10, C-8
13	C	131,1		
14	CH <sub>2</sub>	34,0	1,54 ( <i>m</i> ) 2,07 ( <i>m</i> )	
15	CH	21,8	2,92 ( <i>m</i> )	
16	C	111,0		
17	CH	157,2	7,56 ( <i>s</i> )	
18	CH <sub>3</sub>	18,4	1,42 ( <i>d</i> ; 6,0)	
19	CH	75,7	3,67 ( <i>m</i> )	
20	CH	36,5	2,9 ( <i>m</i> )	
21	CH <sub>2</sub>	57,0	2,69 ( <i>m</i> )	
22	C	167,4		
23	CH <sub>3</sub>	51,0	3,74 ( <i>s</i> )	C-22
24	CH <sub>3</sub>	55,7	3,85 ( <i>s</i> )	C-10
NH			8,03 ( <i>s</i> )	



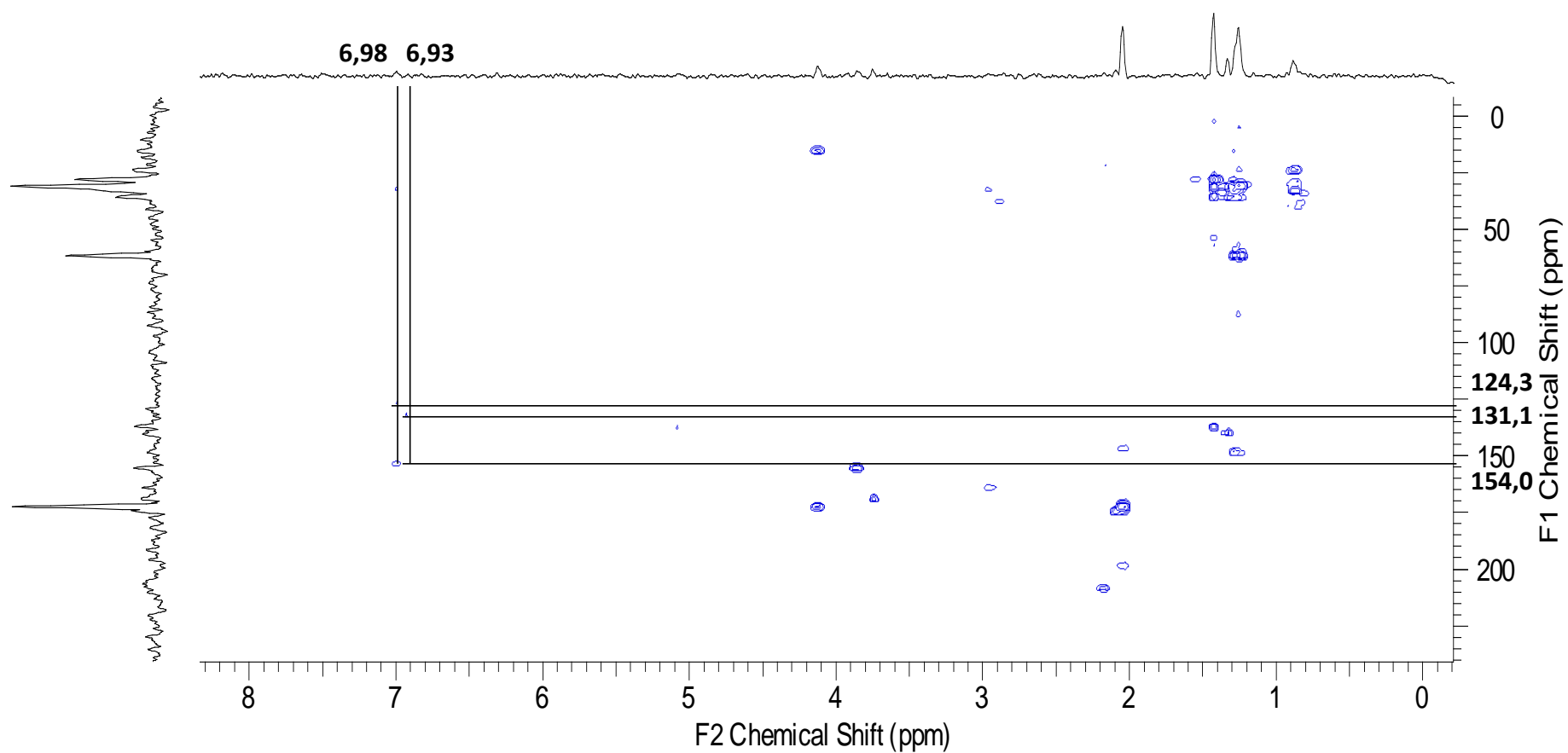
**Figura 65:** Estrutura da 10-metoxi-rauniticina e suas correlações no HMBC.



**Figura 66:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 10-metoxi-rauniticina em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



**Figura 67:** Mapa de contorno HSQC da 10-metoxi-rauicicina em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



**Figura 68:** Mapa de contorno HMBC da 10-metoxi-raunicina em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

## 5.4. Atividades Química e Biológica

### 5.4.1. Atividade Antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante, todos os extratos foram testados quanto a sua capacidade de inibir o radical de livre DPPH na concentração inicial de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 71), os resultados foram expressos como equivalente em ácido ascórbico, ou seja, quanto mais próximo de 1 significa que é mais ativo.

Analisando os resultados em termos de inibição da atividade radicalar, os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante foram os extratos metanólicos das folhas e dos galhos, com inibição de  $79\pm 0,6\%$  (galhos, 1ª coleta),  $59\pm 0,01\%$  (folhas, 2ª coleta) e  $68\pm 0,01\%$  (galhos, 2ª coleta). Devido a esta pronunciada inibição em 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , estes extratos foram testados em outras concentrações a fim de encontrar a  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração do extrato capaz de provocar a diminuição de 50% da atividade do DPPH em um período de tempo determinado. Portanto, quanto menor a  $CI_{50}$ , maior é a atividade antioxidante. Como os extratos de baixa polaridade, (diclorometânico/hexânico das folhas e galhos da 1ª e 2ª coleta) demonstraram baixa inibição em 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , não foi realizado o ensaio com as menores concentrações.

**Tabela 71:** Resultado das reações dos extratos de *Duroia macrophylla* com o oxidante DPPH.

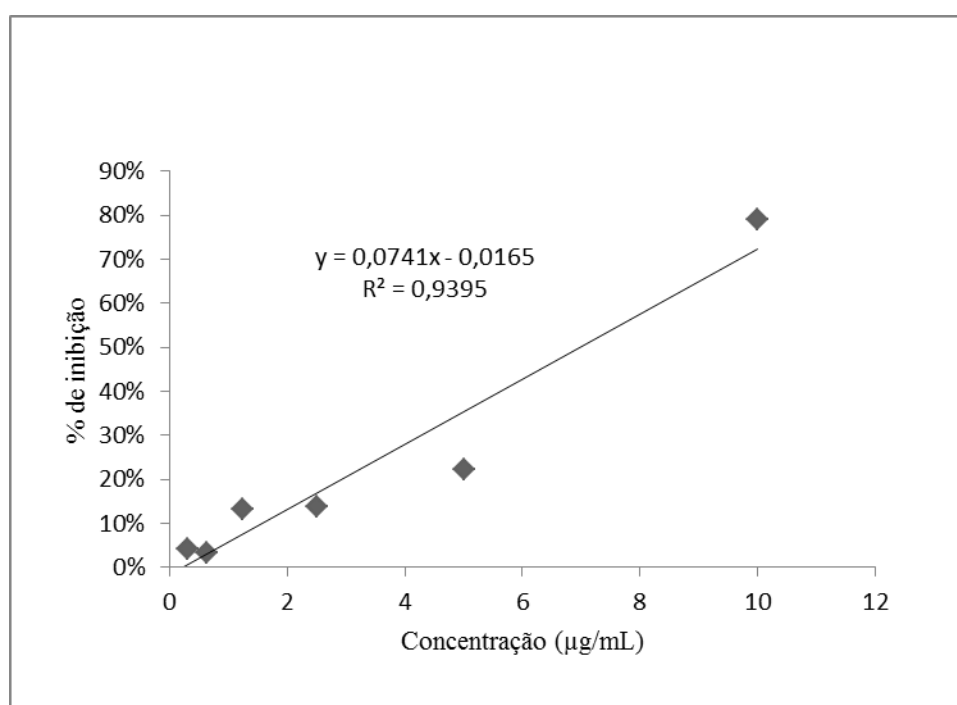
EXTRATOS	Valores médios		
	$ \Delta\text{ABS}_{517} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico)
<b>1ª COLETA</b>			
Folhas DCM	$0,027\pm 0,01$	0,303	16,8
Folhas MeOH	$0,230\pm 0,01$	1,926	2,6
Galhos DCM	$0,010\pm 0,02$	0,173	40,6
<b>Galhos MeOH</b>	<b><math>0,794\pm 0,06</math></b>	<b>6,435</b>	<b>0,8</b>
<b>2ª COLETA</b>			
Folhas Hexano	$0,010\pm 0,02$	0,173	39,4
<b>Folhas MeOH</b>	<b><math>0,684\pm 0,01</math></b>	<b>5,559</b>	<b>0,9</b>
Galhos DCM	$0,084\pm 0,00$	0,759	6,6
<b>Galhos MeOH</b>	<b><math>0,587\pm 0,01</math></b>	<b>4,780</b>	<b>1,0</b>



Estes resultados corroboram com a análise qualitativa realizada em CCDC frente ao reagente de DPPH. O aparecimento de manchas branco-amareladas que indica a possível presença de substâncias antioxidantes foi observada com maior intensidade nos extratos mais polares (MeOH), a qual pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, os quais podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres.

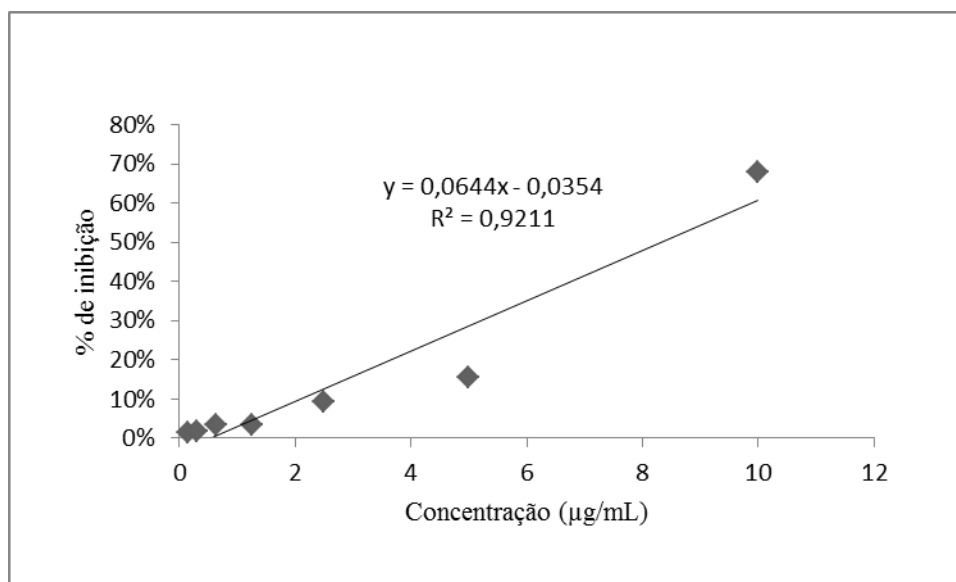
A capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos metanólicos foi verificada através da construção de uma curva para determinar a concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Os extratos que tiveram atividade significativa no teste preliminar foram avaliados em dose/dependência, em diferentes concentrações 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,1562 µg/mL. Os extratos testados nas diferentes concentrações apresentaram uma relação de dose/dependência de 5,0 a 1,562 µg/mL. Os resultados estão expressos considerando o erro padrão médio ( $\pm$ EPM).

O extrato metanólico dos galhos (1ª coleta) mostrou inibição de 22%, 14%, 13% e 4%, nas concentrações de 5; 2,5; 1,25 e 0,625 µg/mL, respectivamente (Figura 69). Uma vez que foram isoladas substâncias fenólicas, tais como o ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico (substância IV) identificado no extrato dos galhos, é possível que estas sejam as responsáveis pela atividade antioxidante destes extratos pois possuem hidroxilas fenólicas que atuam na captura dos radicais livres.

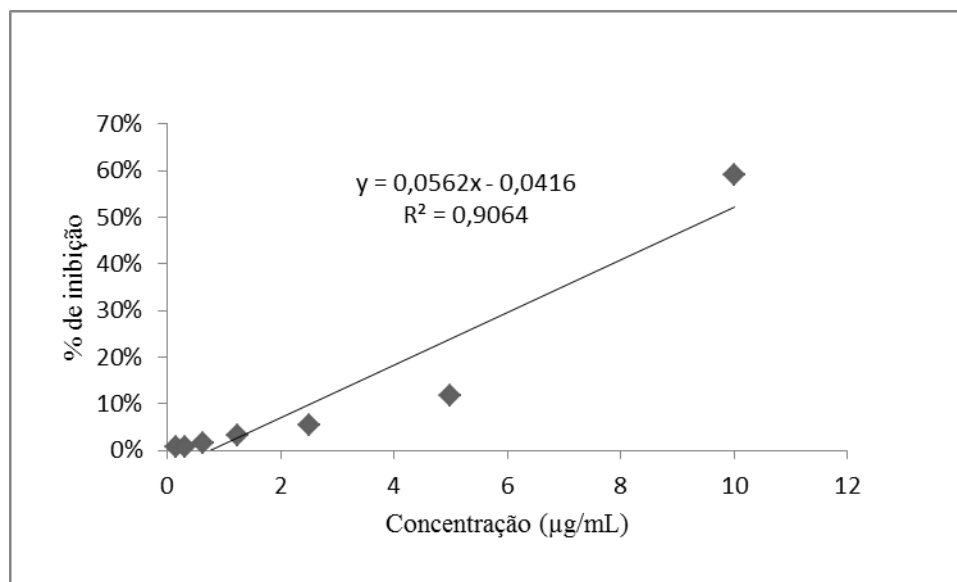


**Figura 69:** Atividade antioxidante do extrato dos galhos da 1ª coleta.

O extrato metanólico das folhas (2ª coleta) possui elevada capacidade antioxidante, apresentando uma inibição de 15%, 9%, 4%, 3%, 2% e 1%, nas concentrações testadas: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,1562 µg/mL, respectivamente (Figura 70). O extrato metanólico dos galhos (2ª coleta) manteve a mesma inibição de 1% em diferentes concentrações (0,625; 0,3125 e 0,1562 µg/mL) e de 12%, 5% e 3% nas concentrações de 5,0; 2,5 e 1,25 µg/mL, respectivamente (Figura 71).



**Figura 70:** Atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas da 2ª coleta.



**Figura 71:** Atividade antioxidante do extrato metanólico dos galhos da 2ª coleta.

#### 5.4.2. Toxicidade sobre *Artemia salina*

O extrato metanólico das folhas da 2ª coleta apresentou toxicidade na concentração letal (CL<sub>50</sub>) de 120 µg/mL, enquanto os demais extratos não foram citotóxicos (Tabela 72). No amplo espectro de atividades biológicas apresentadas pelos alcaloides indólicos monoterpênicos está a atividade citotóxica e antitumoral frente a diferentes linhagens de células tumorais (SAKAMOTO-HOJO *et al.*, 1988). Para os extratos que apresentam citotoxicidade, pode-se obter uma correlação utilizando sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de substâncias antitumorais, que são testadas em diferentes culturas de células tumorais (MCLAUGHLIN *et al.*, 1998).

A falta de citotoxicidade dos extratos sobre o microcrustáceo *A. salina* pode sugerir que estes não serão tóxicos às células de mamíferos, um resultado que seria promissor, em função de vários extratos possuírem atividade antimicrobacteriana. No entanto, vale ressaltar que este ensaio é preliminar, sendo necessárias outras metodologias para complementar o estudo citotóxico.

**Tabela 72:** Resultados da análise de toxicidade sobre *Artemia salina* dos extratos de *Duroia macrophylla*.

EXTRATOS (µg/mL)	Valores médios					
	1000	500	250	120	60	30
<b>1ª COLETA</b>						
Folhas DCM	10 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Folhas MeOH	33,33 ± 0,57	6,67 ± 0,57	6,67 ± 0,57	3,33 ± 0,57	0 ± 0	0 ± 0
Galhos DCM	20 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Galhos MeOH	30 ± 0	13,33 ± 0,57	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>2ª COLETA</b>						
Folhas Hexano	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Folhas MeOH</b>	83,33 ± 1,15	73,33 ± 1,15	53,33 ± 0,57	<b>50 ± 0</b>	46,67 ± 0,57	43,33 ± 0,57
Galhos DCM	100 ± 0	40 ± 0	20 ± 0	10 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Galhos MeOH	100 ± 0	76,67 ± 0,57	66,67 ± 0,57	20 ± 0	3,33 ± 0,57	0 ± 0

### 5.4.3. Atividade Antibacteriana

Todos os extratos foram testados contra 12 espécies de bactérias patogênicas: *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Edwardsella tarda*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Nocardia brasiliensis*.

Os extratos que apresentaram atividade antibacteriana foram: MeOH das folhas e dos galhos da 1ª coleta, DCM dos galhos da 1ª e 2ª coleta, a uma concentração de 250 µg/mL sobre *Klebsiella pneumoniae* e *Flavobacterium corumnare*. Frente a bactéria *Nocardia brasiliensis* apenas o extrato DCM das folhas (1ª coleta) foi ativo com CIM de 125 µg/mL. O extrato MeOH dos galhos (2ª coleta) apresentou CIM de 125 µg/mL frente à bactéria *Salmonella enteridis*; a CIM do extrato MeOH das folhas (2ª coleta) foi de 500 µg/mL frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Estes extratos que apresentaram atividade inibitória foram testados para determinar onde não houve crescimento bacteriano a partir da CIM, porém nenhum extrato apresentou atividade bactericida. Os demais extratos não apresentaram atividade inibitória sobre as cepas testadas (Tabela 73).

Segundo alguns autores, os extratos metanólicos apresentam maior atividade antimicrobiana por conter compostos químicos como alcaloides, aminoácidos, flavonoides, glicosídeos, fitoesteróis, saponinas, esteróides, taninos e triterpenoides (ELOFF, 1998a; LIN *et al.*, 1999; PAREKH *et al.*, 2005).

A atividade antibacteriana foi encontrada em outras espécies da família Rubiaceae: *Psychotria microlabrasta*, *Palicourea longiflora* (RAJAKARUNA *et al.*, 2002), *Richardia brasiliensis* (SOUZA *et al.*, 2004), *Gonzalagunia rosea* (NIÑO *et al.*, 2006). A extensa revisão de literatura sobre atividade antibacteriana de rubiáceas realizado por Katyayani *et al.*, (2012), mostra que os melhores resultados foram frente as bacterias *Bacillus* sp, *Staphylococcus* sp e *Pseudomonas aeruginosa*.

Foram testados os dois triterpenos (ácido oleanólico e ursólico), uma chalcona (4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona) e um derivado fenólico (ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzoico) isolados de *D. macrophylla* frente às cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia brasiliensis* e *Serratia marcescens*. Apenas o ácido

oleanólico apresentou atividade antibacteriana frente à *Nocardia brasiliensis* e *Serratia marcescens*, com uma CIM de 500 µg/mL (Tabela 74).

Muitos autores relacionam a atividade antimicrobiana de extratos brutos com a presença de derivados fenólicos, terpenos e alcaloides em sua composição química. Estes, podem estar atuando em sinergia, uma vez que quando isolados, podem diminuir ou até mesmo perder sua atividade (GUTKIND *et al.*, 1984; PERRUCHON, 2002; SINGH e SINGH, 2003; SIMÕES *et al.*, 2004; WENIGER *et al.*, 2005).

A produção de metabólitos secundários está relacionada à adaptação da planta ao ambiente. Estudos mostram que estes metabólitos podem apresentar múltiplas funções, como proteção contra herbívoros, microrganismos e outras defesas inter-espécies, aumentando a capacidade adaptativa do indivíduo ao ambiente (PEREIRA *et al.*, 2003). A mediação destes metabólitos em interações entre organismos pode indicar que estas moléculas também atuem em outros sistemas biológicos. De modo mais específico, muitas plantas desenvolveram substâncias que são verdadeiros inseticidas e antimicrobianos naturais. Como por exemplos os compostos fenólicos sintetizados pela sálvia, alecrim, tomilho, lúpulo, coentro, chá, cravo e manjerição, os quais são conhecidos por possuírem efeitos antimicrobianos contra patógenos alimentares e quando analisados *in vitro* apresentou atividade antibacteriana (AHN *et al.*, 2007). Esta correlação incentiva a busca por substâncias mais potentes, com poucos efeitos colaterais, baixa toxicidade e aos quais as bactérias patogênicas não apresentem resistência.

**Tabela 73:** CIM dos extratos de *Duroia macrophylla* frente às bactérias testadas.

EXTRATOS (µg/mL)	CEPAS											
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Flavobacterium corumare</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Edwardsella tarda</i>	<i>Salmonella enteridis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<b>1ª COLETA</b>												
Folhas DCM	500	500	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	250
Folhas MeOH	250	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Galhos DCM	250	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Galhos MeOH	250	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>2ª COLETA</b>												
Folhas HEX	500	500	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Folhas MeOH	500	500	N/A	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	500
Galhos DCM	250	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Galhos MeOH	500	500	N/A	500	N/A	N/A	125	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Legenda: N/A= não ativo

**Tabela 74:** CIM das substâncias isoladas de *Duroia macrophylla* frente às bactérias testadas.

EXTRATOS/SUBSTÂNCIAS (µg/mL)	CEPAS						
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Flavobacterium corumnare</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<b>Substâncias isoladas do extrato DCM das folhas</b>							
Extrato DCM das folhas	500	500	N/A	N/A	N/A	250	N/A
Ácido oleanólico (substância I)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	500	500
Ácido ursólico (substância II)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Substâncias isoladas do extrato MeOH das folhas</b>							
Extrato MeOH das folhas	250	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona (substância III)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Substâncias isoladas do extrato MeOH dos galhos</b>							
Extrato MeOH dos galhos	250	250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzoico (substância IV)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Legenda: N/A= não ativo

#### 5.4.4. Atividade Antimicobacteriana

Na avaliação da atividade antimicobacteriana dos extratos de *D. macrophylla* frente ao *M. tuberculosis*, apenas o extrato MeOH dos galhos (1ª coleta) não foi ativo para nenhuma das cepas testadas, os demais extratos foram ativos contra pelo menos uma cepa. O extrato DCM das folhas (1ª coleta) apresentou melhor resultado, com CIM de 6,25 µg/mL para a cepa INHr, de 25 µg/mL para a cepa RMPPr e ≤ 6,25 µg/mL para a cepa H37Rv, vale destacar que foi a partir do fracionamento deste extrato que obtiveram-se os dois triterpenos, ácido oleanólico e ursólico (substâncias I e II), e a mistura dos dois esteroides, β-sitosterol e estigmasterol. O extrato MeOH das folhas da 2ª coleta apresentou CIM de 12,5 µg/mL para a cepa INHr (Tabela 75), para este extrato foi encontrada a CL<sub>50</sub> frente a *A. salina* de 120 µg/mL.

O extrato DCM dos galhos (2ª coleta) apresentou CIM de 100 µg/mL para as três cepas testadas e a CIM do extrato MeOH dos galhos (2ª coleta) foi de 25 µg/mL para a cepa H37Rv e 50 µg/mL para a cepa INHr. De ambos os extratos foram isolados alcaloides monoterpênicos indólicos.

A elevada atividade do extrato DCM das folhas (1ª coleta) pode ser atribuída à presença de terpenos, pois estudos realizados por Newton *et al.*, (2000), Cantrell *et al.*, (2001); Copp (2003); Seidel e Taylor (2004), Aguiar *et al.*, (2005) e Higuchi *et al.*, (2008), mostraram que os terpenos são os responsáveis pela atividade antimicobacteriana das espécies vegetais estudadas. Há relatos na literatura da atividade antimicobacteriana do ácido oleanólico frente à cepa H37Rv com CIM de 50 a 69 µg/mL e 200 µg/mL para a cepa RMPPr (COPP, 2003; CANTRELL *et al.*, 2001; CALDWELL *et al.*, 2000).

Outras substâncias que têm sido alvo de testes antimicobacterianos são os esteroides como o sistosterol e estigmasterol, apresentando elevada atividade (SALUDES *et al.*, 2002; OKUNADE *et al.*, 2004). Em outros ensaios, o sitosterol proveniente de diferentes espécies vegetais apresentou atividade contra *M. tuberculosis* (CALDWELL *et al.*, 2000; JIMÉNEZ *et al.*, 2005). Testes clínicos mostraram a eficácia do β-sitosterol como co-adjuvante no tratamento da tuberculose (DONALD *et al.*, 1997).

Outras espécies de Rubiaceae foram testadas em micobactérias, como a espécie *Duroia hirsuta* que foi ativa frente ao *Mycobacterium phlei* (LOPEZ *et al.*, 2001) e *Psychotria vellosiana* que apresentou atividade frente ao *M. tuberculosis* e ao *M.*



*Kansasii* (RAMOS *et al.*, 2008). Segundo alguns autores, a atividade antimicobacteriana também pode estar ligada a presença de alcaloides, comumente encontrados em espécies de Rubiaceae (SCHRIPISEMA *et al.*, 1999; KHAN *et al.*, 2003) principalmente alcaloides indólicos derivados da ioimbina (MEDEIROS *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2006).

**Tabela 75:** Determinação da CIM dos extratos de *D. macrophylla* frente ao *M. tuberculosis*.

EXTRATOS ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M. tuberculosis</i>					
	H37Rv ( $\mu\text{g/mL}$ )		INHr ( $\mu\text{g/mL}$ )		RMPPr ( $\mu\text{g/mL}$ )	
<b>1ª COLETA</b>						
Folhas DCM	S	$\leq 6,25$	S	25	S	$\leq 6,25$
Folhas MeOH	R	$>200$	R	$>200$	S	200
Galhos DCM	S	100	S	100	S	100
Galhos MeOH	R	$>200$	R	$>200$	R	$>200$
<b>2ª COLETA</b>						
Folhas Hexano	S	200	S	50	R	$>200$
Folhas MeOH	S	100	S	12,5	S	100
Galhos DCM	S	25	S	50	R	$>200$
Galhos MeOH	S	100	S	100	S	100

Legenda: S=sensível R=resistente

Das 55 frações testadas, 33 foram ativas frente à cepa de *M. tuberculosis* H37Rv com CIM entre 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , Frente a cepa INHr, 29 frações foram ativas, com CIM entre 12,5 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que para a cepa RMPPr 27 frações apresentaram atividade com CIM entre 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , conforme tabelas 76 a 80.

A fração 25-40.6.4 obtida do fracionamento do extrato DCM das folhas (1ª coleta), corresponde a mistura do ácido oleanólico e ursólico (substâncias I e II) foi ativa frente as três cepas, com a CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$ . A mistura do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (fração 17-21.1-5.1-4.14) não apresentou atividade frente as cepas testadas, contrastando com os resultados obtidos por Saludes *et al.*, (2002), o qual testou estes esteroides isolados de *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) frente ao *M. tuberculosis*, obtendo como resultado uma CIM de 128  $\mu\text{g/mL}$  para o sitosterol e 32  $\mu\text{g/mL}$  para o estigmasterol (Tabela 76).

A fração 13-18 obtida do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH das folhas (1ª coleta) apresentou a CIM de 50, 12,5 e 50  $\mu\text{g/mL}$  para as cepas H37Rv, INHr

e RMP<sub>r</sub>, respectivamente (Tabela 77). A partir da desta fração foi isolada e identificada a substância 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona (substância IV). Esta alta atividade antimicobacteriana pode estar associada a presença de compostos fenólicos como descrevem outros autores (SIVAKUMAR *et al.*, 2007; TRIVEDI *et al.*, 2008), estes compostos estão relacionados na adaptação da planta às condições de estresse ambiental, como defesa contra microrganismos e outros patógenos (FARAH e DONANGELO, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que algumas frações testadas apresentaram atividade reduzida em relação a seu extrato bruto e algumas vezes foram inativas, enquanto outras apresentaram uma melhor atividade. Segundo Pauli e colaboradores (2005), extratos vegetais podem apresentar substâncias ativas que sejam antagonizadas ou potencializadas na presença de outras.

Este biomonitoramento demonstra a importância de um fracionamento preliminar dos extratos para a detecção da atividade antimicobacteriana, uma vez que a baixa concentração das substâncias ativas pode mascarar a detecção nos extratos brutos, apresentando uma ação minimizada pela interação com outras moléculas presentes no extrato.

**Tabela 76:** Determinação da CIM das frações do extrato DCM dos galhos da 1ª coleta.

EXTRATO/FRAÇÕES (µg/mL)	<i>M.tuberculosis</i>					
		H37Rv (µg/mL)		INHr (µg/mL)		RMP <sub>r</sub> (µg/mL)
Folhas DCM	S	6,25	S	25	S	≤ 6,25
Folhas DCM FR1-4	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR1-4.17-20	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 5	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 6-12	S	50	S	100	S	100
Folhas DCM FR 6-12.30	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 6-12.33-35	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 6-12.38-63	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR14-16	S	100	S	50	S	100
Folhas DCM FR 17-21	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM 17-21.1-5.1-4.14	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 25-40	S	200	S	200	S	200
Folhas DCM FR 25-40.6	R	>200	S	200	S	200
Folhas DCM FR 25-40.6.4	S	100	S	100	S	100
Folhas DCM FR 41-44	S	100	S	50	S	100
Folhas DCM FR 46-56	S	200	S	200	S	100

continuação da Tabela 76

Folhas DCM FR 46-56.5	S	200	S	200	S	200
Folhas DCM FR 46-56. 8-10	S	50	S	50	S	50
Folhas DCM FR 46-56.13-17	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 57.6-12	S	100	R	>200	R	>200
Folhas DCM FR 63-65	S	100	S	25	S	100
Folhas DCM FR 66-68	S	200	S	100	S	200
Folhas DCM FR 70-74	R	>200	S	200	R	>200
Folhas DCM FR 76-86	R	>200	S	200	S	200
Folhas DCM FR 87-92	S	200	S	50	S	100
Folhas DCM FR 94-99	S	200	S	200	S	100

Legenda: S=sensível R=resistente

**Tabela 77:** Determinação da CIM das frações do extrato MeOH das folhas da 1ª coleta

EXTRATO/FRAÇÕES (µg/mL)	<i>M. tuberculosis</i>					
	H37Rv (µg/mL)		INHr (µg/mL)		RMPPr (µg/mL)	
Folhas MeOH	R	>200	R	>200	S	200
Folhas MeOH AcOEt	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH AcOEt 13-18	S	50	S	12,5	S	50
Folhas MeOH AcOEt 20-21	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH FASE AcOEt 27	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH FASE AcOEt 30	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH FAcOEt 34	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH FASE AcOEt 39	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH DCM	S	>200	S	>200	S	>200
Folhas MeOH DCM 110-187,12-19	R	>200	R	>200	R	>200
Folhas MeOH BuOH	R	>200	R	>200	R	>200

Legenda: S=sensível R=resistente

**Tabela 78:** Determinação da CIM das frações do extrato MeOH dos galhos da 1ª coleta.

EXTRATO/FRAÇÕES (µg/mL)	<i>M. tuberculosis</i>					
	H37Rv (µg/mL)		INHr (µg/mL)		RMPPr (µg/mL)	
Galhos MeOH	R	>200	R	>200	R	>200
Galhos MeOH AcOEt 17	R	>200	R	>200	R	>200
Galhos MeOH AcOEt 21-23	R	>200	R	>200	R	>200
Galhos MeOH DCM	S	200	S	100	S	200

Legenda: S=sensível R=resistente

**Tabela 79:** Determinação da CIM das frações do extrato DCM dos galhos da 2ª coleta.

EXTRATO/FRAÇÕES (µg/mL)	<i>M.tuberculosis</i>					
		H37Rv (µg/mL)		INHr (µg/mL)		RMPPr (µg/mL)
Galhos DCM	S	100	S	50	S	100
Galhos DCM 1-4	R	>200	R	>200	R	>200
Galhos DCM 18-27	S	200	S	50	S	200
Galhos DCM 28-36.17-18	S	100	S	50	S	100
Galhos DCM 28-36.27-29	S	25	S	50	S	50
Galhos DCM 42-45	S	50	S	25	S	50
Galhos DCM 46-54. 1-9	S	100	S	200	S	100
Galhos DCM 55-60	S	50	S	100	S	50
Galhos DCM 82-85	S	200	S	200	S	200
Galhos DCM 86-92	S	200	S	200	S	200

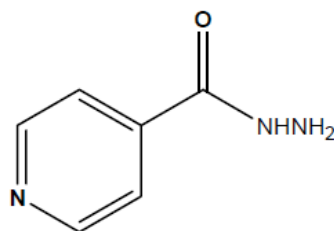
Legenda: S=sensível R=resistente

**Tabela 80:** Determinação da CIM das frações do extrato MeOH dos galhos da 2ª coleta,

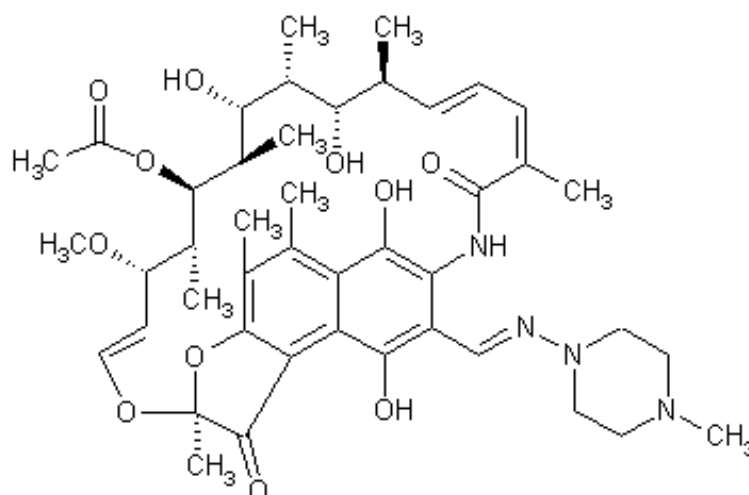
EXTRATO/FRAÇÕES (µg/mL)	<i>M.tuberculosis</i>					
		H37Rv (µg/mL)		INHr (µg/mL)		RMPPr (µg/mL)
Galhos MeOH	S	200	S	50	S	50
Galhos MeOH FR 6	S	200	S	200	R	>200
Galhos MeOH FR 7	R	>200	R	>200	R	>200
Galhos MeOH AcOEt 14-22	S	200	S	200	R	>200
Galhos MeOH AcOEt 23-28	R	>200	R	>200	R	>200
Galhos MeOH DCM 06-07	S	25	S	50	S	25

Legenda: S=sensível R=resistente

Os alcaloides isolados dos extratos DCM e MeOH dos galhos (2ª coleta) de *D. macrophylla* foram testados frente ao *M. tuberculosis* cepa pan-sensível H37Rv e para a cepa resistente a isoniazida (INHr), que é o principal e mais potente antimicobacteriano no tratamento da tuberculose (Figura 72). Devido a característica estrutural dos alcaloides, estes não foram testados frente à cepa resistente a rifampicina (RMPPr), que é um complexo macrocíclico (Figura 73).



**Figura 72:** Estrutura molecular da Isoniazida (INH).



**Figura 73:** Estrutura molecular da Rifampicina (RMP).

A comparação entre os resultados obtidos do extrato DCM dos galhos e dos alcaloides isolados a partir deste extrato, mostra que apenas o alcaloide identificado como 10-metoxi-ajmalicina (substância V) e a mistura dos alcaloides 9-metoxi-3-isoajmalicina (substância VIII) com 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substância IX) apresentaram menor CIM frente a cepa INHr (25 µg/mL) que o extrato bruto (Tabela 80).

Os alcaloides 10-metoxi-3-isoraunicina (substância XI) e 10-metoxi-raunicina (substância XII), isolados do extrato MeOH dos galhos, mostraram resultados mais satisfatórios frente a cepa INHr (CIM - 50 µg/mL) do que o obtido com extrato bruto (Tabela 80).

A determinação da CIM de um extrato pode ou não ser um indicador confiável de sucesso em isolar um agente antimicrobiano ativo. Pois, há possibilidade de existir um extrato com alta atividade (CIM relativamente baixa) que contém substâncias majoritárias com atividade moderada, enquanto outro extrato pode conter componentes minoritários com alta atividade. Entretanto, o extrato quando purificado, pode ter

atividade reduzida, apresentar uma CIM maior, ou até mesmo ser inativo. Este fato, pode ocorrer devido ao sinergismo dos componentes presentes nos extratos e frações que é a ação combinada de duas ou mais substâncias resultando em um efeito biológico superior ao efeito individual destas mesmas substâncias.

**Tabela 81:** Determinação da CIM das substâncias isoladas de *D. macrophylla*.

EXTRATOS/SUBSTÂNCIAS ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M. tuberculosis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	H37Rv	INHr
<b>Alcaloides isolados do extrato DCM dos galhos</b>		
Extrato DCM de galhos	25	50
10-metoxi-ajmalicina (substância V)	50	25
11-metoxi-ajmalicina (substância VI)	100	50
11-metoxi-3-isoajmalicina (substância VII)	100	50
Mistura da 9-metoxi-3-isoajmalicina (substância VIII) e 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substância IX)	100	25
10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substância X)	100	100
<b>Alcaloides isolados do extrato MeOH dos galhos</b>		
Extrato MeOH de galhos	100	100
10-metoxi-3-isorauniticina (substância XI)	100	50
10-metoxi-rauniticina (substância XII)	100	50

#### 5.4.5. Atividade citotóxica *in vitro*

O potencial citotóxico dos extratos e alcaloides foi avaliado em linhagens de células neoplásicas: HCT116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (carcinoma de mama), SK-Mel-19 (melanoma humano) e uma linhagem não neoplásica: MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). Tanto os extratos quanto as substâncias apresentaram baixa atividade antitumoral, apenas o alcaloide 11-metoxi-3-isoajmalicina (substância VII) apresentou resultados mais promissores como agente citotóxico sobre as linhagens de células MRC-5 e SK-Mel 19 quando comparado com os resultados obtidos dos extratos brutos (Tabela 82). Ao comparar a toxicidade dos alcaloides testados com a toxicidade da Doxorubicina (controle positivo), pode-se afirmar que estes não apresentaram atividade antitumoral significativa. A baixa toxicidade dos alcaloides sobre a linhagem de células não neoplásica (MRC-5-fibroblasto de pulmão humano) demonstra que estes não são citotóxicos para as células normais, sugerindo um resultado promissor para serem avaliados em outras atividades biológicas.

A correlação da atividade sobre o microcrustáceo *A. salina* e a atividade antitumoral foi confirmada pelos resultados obtidos dos extratos testados, os quais apresentaram baixa atividade inibitória do crescimento das linhagens de células tumorais.

Muitos alcaloides são reconhecidos por sua toxicidade, alguns possuem aplicação clínica no tratamento de tumores como o topotecano (camptotecina), vimblastina e vincristina, outros como a como a elipticina e olivacina, possuem atividade antitumoral, porém devido à alta toxicidade estas substâncias não são utilizadas na terapêutica (SCHRIPEMA *et al.*, 2004).

Segundo Shoemaker (2006) uma triagem realizada pelo *National Cancer Institute* (NCI) em busca de drogas antitumorais, relatou uma coleção de mais de 75.000 extratos vegetais, cujo mais promissores foram selecionados para testes *in vivo*. Porém, outros estudos são necessários para estabelecer a utilidade destes extratos na terapia, devido à variação de conteúdo de seus componentes ativos. Dessa maneira, o princípio ativo deve vir na sua forma purificada, o qual possibilita a sua dosagem precisa. Uma boa correlação é com os 34 alcaloides registrados no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, os quais são comercializados no Brasil, puros, em associações, em forma de derivados e outros são utilizados como matéria-prima para a síntese de fármacos.

Embora os alcaloides constituam um dos grupos de metabólitos secundários com grande potencial terapêutico, no presente estudo os alcaloides testados apresentaram baixa atividade inibitória no crescimento das linhagens de células tumorais. Porém, mesmo as substâncias que revelam baixa citotoxicidade podem subsidiar estudos de modificação estrutural e/ou protótipos de fármacos. Para esclarecer melhor efeitos benéficos deste grupo de substâncias no tratamento do câncer, é necessário estabelecer a correlação entre um ou mais bioensaios, bem como as particularidades de cada sistema biológico testado, interações e características moleculares. Desta forma, a atividade antitumoral e o bioensaio com *A. salina* funcionam como uma pré-avaliação de extratos e substâncias com potencial farmacológico sendo um forte indicativo para serem avaliados por outros bioensaios específicos tanto *in vitro* como *in vivo*.

**Tabela 82:** Determinação da viabilidade celular das substâncias isoladas de *D. macrophylla* em linhagens de células tumorais.

EXTRATOS/SUBSTÂNCIAS	VIABILIDADE CELULAR (%)			
	LINHAGENS DE CÉLULAS			
	HCT116	MCF-7	MRC-5	SK-MEL-19
Doxorrubicina (controle positivo)	10,45	21,42	10,19	16,66
DMSO (controle negativo)	100	100	100	100
<b>Alcaloides isolados do extrato DCM dos galhos</b>				
Extrato DCM de galhos	79,50	72,96	85,38	93,04
10-metoxi-ajmalicina (substância V)	85,10	78,62	92,36	100
11-metoxi-ajmalicina (substância VI)	81,49	76,18	86,04	100
11-metoxi-3-isoajmalicina (substância VII)	85,75	89,02	80,16	85,08
Mistura da 9-metoxi-3-isoajmalicina (substância VIII) e 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substância IX)	83,67	87,07	92,55	92,25
10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substância X)	87,78	84,06	93,21	96,55
<b>Alcaloides isolados do extrato MeOH dos galhos</b>				
Extrato MeOH de galhos	76,02	69,89	86,80	91,69
10-metoxi-3-isoraunicina (substância XI)	91,16	86,36	95,33	100
10-metoxi-raunicina (substância XII)	86,64	91,09	100	100



## 5. CONCLUSÕES

- ✓ O estudo fitoquímico dos extratos diclorometânico e metanólicos de folhas e galhos da 1ª coleta de *D. macrophylla* possibilitou isolar e identificar quatro substâncias, sendo dois triterpenos, uma chalcona e um ácido fenólico.
- ✓ Os extratos diclorometânico e metanólicos dos galhos da 2ª coleta mostraram-se ser uma fonte promissora de alcaloides, dos quais foram identificados oito alcaloides indólicos monoterpênicos.
- ✓ Todas as substâncias isoladas neste estudo estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Duroia*.
- ✓ Os extratos metanólicos de folhas e galhos de ambas as coletas apresentaram intensa capacidade antioxidante.
- ✓ O extrato metanólico das folhas da 2ª coleta apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* na concentração letal (CL<sub>50</sub>) de 120 µg/mL.
- ✓ A atividade bacteriostática foi observada nos extratos MeOH das folhas e dos galhos (1ª coleta) e DCM dos galhos (ambas as coletas) sobre *Klebsiella pneumoniae* e *Flavobacterium corumnare*; e no extrato MeOH dos galhos (2ª coleta) sobre *Salmonella enteridis* e no extrato MeOH folhas (2ª coleta) sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ Das substâncias testadas apenas o ácido oleanólico apresentou atividade antibacteriana frente à *Nocardia brasiliensis* e *Serratia marcescens*, com uma CIM de 500 µg/mL.
- ✓ Os extratos testados frente ao *M. tuberculosis* apresentaram resultados bastante promissores, com destaque para o extrato DCM das folhas da 1ª coleta, com uma CMI de 6,25 µg/mL para a cepa INHr, de 25 µg/mL para a cepa RMPr e ≤ 6,25 µg/mL para a cepa H37Rv e o extrato MeOH das folhas da 2ª coleta com CMI de 12,5 µg/mL contra a cepa INHr.
- ✓ Das 54 frações testadas, 33 foram ativas frente à cepa de *M. tuberculosis* H37Rv com CMI entre 25 a 200 µg/mL. Frente a cepa INHr, 29 frações foram ativas, com CMI entre 12,5 a 200 µg/mL, enquanto que para a cepa RMPr 27 frações apresentaram atividade com CMI entre 25 a 200 µg/mL.
- ✓ Os alcaloides 10-metoxi-ajmalicina, 10-metoxi-3-isorauniticina e a mistura de 9-metoxi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina apresentaram uma CIM de 25 µg/mL frente ao *M. tuberculosis* cepa INHr e o alcaloide 10-metoxi-rauniticina a CIM foi de 50 µg/mL.

- ✓ Os extratos e os alcaloides apresentaram baixo potencial citotóxico sobre as células neoplásicas (carcinoma colorretal humano, carcinoma de mama e melanoma humano) e não neoplásica (fibroblasto de pulmão humano).
- ✓ Este trabalho descreveu o primeiro estudo químico e de atividade biológica realizado com a espécie *D. macrophylla*, contribuindo para o conhecimento químico e biológico do gênero *Duroia*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M. A.; ALI, A. M.; MARZIAH, M.; LAJIS, N. H.; ARIFF, A. B. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 54(3):173-182, 1998.
- ACHENBACH, H.; LOTTES, M.; WAIBEL, R.; KARIKAS, G. A.; CORREA, M. D.; GUPTA, M. P. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. **Phytochemistry**, 38(6):1537-1545, 1995.
- ADIBATTI, N. A.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; KULOTHUNGAN, C.; VISWANATHAN, S.; AMESWARAN, L.; BALAKRISHNA, K.; SUKUMAR, E. A pyridine alkaloid from *Ceropegia juncea*. **Phytochemistry**, 30(7):2449–2450, 1991.
- AGOMUOH, A. A.; ATHAR, A.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E.; IRENUS, I. Novel Indole Alkaloids from *Nauclea latifolia* and their Renin-Inhibitory Activities. **Chemistry & Biodiversity**, 10(3):401-410, 2013.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. **The Carbon-13 NMR of Flavonoids**, Amsterdam: Elsevier, 1989, 564p.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, 66(19):2388-2392, 2005.
- AGUSTA, A. Steroids from stem bark of *Anthocephalus cadamba* Miq. (Rubiaceae). **Majalah Farmasi Indonesia**, 9( 1):24-34, 1998.
- AHMAD, V. U. **Handbook of natural products data. Volume 2: pentacyclic triterpenoids**, New York: Elsevier Science, 1994, 1556p.
- AHMAD, R.; SHAARI, K.; LAJIS, N. H.; HAMZAH, A. S.; ISMAIL, N. H.; KITAJIMA, M. Anthraquinones from *Hedyotis capitellata*. **Phytochemistry**, 66(10):1141-1147, 2005.
- AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T. A.; MOSSA, J. S. Crotalic and emarginelic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, 67(10):956-964, 2006.
- AKIHISA, T.; WATANABE, K.; YAMAMOTO, A.; ZHANG, J.; MATSUMOTO, M.; FUKATSU, M. Monoterpene glycosides from *Gardeniae fructus*. **Chemistry & Biodiversity**, 9(8):1490-1499, 2012.
- ALVES, H. D. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, 3:10-15, 2001.

- ANAM, E. M. Novel Nauclequiniine from the Root Extract of *Nauclea pobequinii* (Pob, & Pellegr, ) Petit (Rubiaceae). **Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, 36b(1):54-56, 1997.
- ANDREASEN, K.; BREMER, B. Phylogeny of the subfamily Ixoroideae (Rubiaceae). **Opera Botanica Belgica**, 7:119-138, 1996.
- ANDRIOLLI, A. C.; SANTOS, D. S.; TEIXEIRA, S. C. G.; TEIXEIRA, L. R.; BERALDO, H.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia salina*. **Revista Saúde e Ambiente**, 8(2):19-23, 2009.
- ANERO, R.; DÍAZ-LANZA, A.; OLLIVIER, E.; BAGHDIKIAN, B.; BALANSARD, G.; BERNABÉ, M. Monoterpene glycosides isolated from *Fadogia agrestis*. **Phytochemistry**, 69(3):805-811, 2008.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; DE MELLO, J. F. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, 27(9):2927-2930, 1988.
- AQUINO, R.; GAROFALO, L.; TOMMASI, N.; UGAZ, O. L.; PIZZA, C. Glucoindole alkaloids from bark of two *Sickingia* species. **Phytochemistry**, 37(5):1471-1475, 1994.
- AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; DE SIMONA, F.; PIZZA, C. Triterpenes and Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, 45(5):1035-1040, 1997
- AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; TAPIA, M.; LAURO, M. R.; RASTRELLI, L. New 3-methoxyflavones, an iridoid lactone and a flavonol from *Duroia hirsuta*. **Journal of natural products**, 62(4):560-562, 1999.
- ARBAIN, D.; LAJIS, N. H.; PUTRA, D. P.; SARGENT, M. V.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. ChemInform Abstract: A New Quaternary Corynanthe Alkaloid from *Lerchea bracteata*. **ChemInform**, 24(12):no-no, 1993.
- ARBAIN, D.; BYRNE, L. T.; EVRAYOZA, N.; SARGENT, M. V. Bracteatine, a quaternary glucoalkaloid from *Ophiorrhiza bracteata*. **Australian Journal of Chemistry**, 50(11):1111-1112, 1997a.
- ARBAIN, D.; BYRNE, L. T.; SARGENT, M. Isomalindine-16-carboxylate, a zwitterionic alkaloid from *Ophiorrhiza* cf. *communis*. **Australian Journal of Chemistry**, 50(11):1109-1110, 1997b.
- ARBAIN, D.; DACHRIYANUS, F.; SARGENT, M. V.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. Unusual indole alkaloids from *Ophiorrhiza blumeana* Korth. **Journal of the Chemical Society, Perkin**, 1(16):2537-2540, 1998a.

- ARBAIN, D.; IBRAHIM, S.; SARGENT, M. V.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. The alkaloids of *Uncaria* cf, *glabrata*. **Australian Journal of Chemistry**, 51(11):961-964, 1998b.
- ARBAIN, D.; PUTRA, D. P.; SARGENT, M. V.; SUSILA, R.; WAHYUNI, F. S. Indole alkaloids from two species of *Ophiorrhiza*. **Australian Journal of Chemistry**, 53(3):221-224, 2000.
- ARGÁEZ, R. B.; MEDINA, L. B.; PAT, F. M.; RODRIGUES, L. M. P. Merilactone, an Unusual C19 Metabolite From the Root Extract of *Chiocacca alba*. **Journal of Natural Products**, 64:228-231, 2001.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, 69(4):841-856, 2008.
- BAILLEUL, F.; DELAVEAU, P.; KOCH, M. Apodantheroside, an iridoid glucoside from *Feretia apodanthera*. **Phytochemistry**, 19(12):2763-2764, 1980.
- BALDE, A.; PIETERS, L.; GERGELY, A.; KOLODZIEJ, H.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A. A-type proanthocyanidins from stem-bark of *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, 30(1):337-342, 1991.
- BANTHORPE, D. V.; WHITE, J. J. Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*. **Phytochemistry**, 38(1):107-111, 1995.
- BARBOSA, M. B. A. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 3ª ed., 488pp., 2008.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal eo desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, 13(1):29-39, 1990.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV-Imprensa Universitária, 1991.
- BASSETTI, L.; HAGENDOORN, M.; TRAMPER, J. Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Journal of Biotechnology**, 39(2):149-155, 1995.
- BASTOS, A. B. F. D. O.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Simira glaziovii* (K, schum) steyerem, and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of ophiorine and its derivatives. **Química Nova**, 25(2):241-245, 2002.
- BAZE, A.; CORDEIRO, A. C.; BUENO, C. R.; PALÁCIO, C. A. S.; FERREIRA, C. A. C.; CRUZ, F. **Reserva Ambiental da Cachoeira da Onça**. Manaus: Fundação Rede Amazônica / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2003.

- BEGUM, B.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Caffeine from the Mature Leaves of *Coffea bengalensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31(10):1219-1220, 2003.
- BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; ROBIEN, W.; BRECKER, L.; VALANT-VETSCHERA, K. Iridoids as chemical markers of false ipecac (*Ronabea emetica*), a previously confused medicinal plant. **Journal of ethnopharmacology**, 138(3):756-761, 2011.
- BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER, H. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (= *Psychotria acuminata*, Rubiaceae). **Phytochemistry Letters**, 5(3):558-562, 2012.
- BERNHARD, M.; FASSHUBER, H.; ROBIEN, W.; BRECKER, L.; GREGER, H. Dopamine-iridoid alkaloids in *Carapichea affinis* (¼ *Psychotria borucana*) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39:232-235, 2011.
- BETHLEM, N.; SOUZA, G. R. M.; BETHLEM, E. P.; SILVA, W. A. E. SIDA/AIDS e tuberculose no Brasil; AIDS and tuberculosis in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, 64(1):28-32, 1990.
- BHATTACHARYYA, J.; CUNHA, E. V. L. A triterpenoid from the root-bark of *Chiococca alba*. **Phytochemistry**, 31(7):2546-2547, 1992.
- BLACKLEDGE, R. D.; TAYLOR, C. M. *Psychotria Viridis*-A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT). **Microgram Journal**, 1(1-2):18-22, 2003.
- BOLZANI, D. S.; IZUMISAWA, C. M.; YOUNG, M. C. M.; TREVISAN, L.; KINGSTON, D. G. I.; GUNATILAKA, A. L. Iridoids from *Tocoyena formosa*. **Phytochemistry**, 46(2):305-308, 1997.
- BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPED, M. N. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: Chemotaxonomical and biological significance. In: **Recent Research Development in Phytochemistry**, 5:10-31, 2001.
- BORGES, R. M.; VALENCA, S. S.; LOPES, A. A.; BARBI, N. S.; SILVA, A. J. R. Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their in vitro anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, 6(1):96-100, 2013
- BRAND, G.; HENRIQUES, A. T.; PASSOS, C. S.; BALDOQUI, D. C.; SANTIN, SILVANA M. O.; COSTA, W. F.; SARRAGIOTTO, M. H. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Margaritopsis cymuligera* (Muell. Arg.) C.M. Taylor (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 45:155-157, 2012.
- BREMER, B. Combined and separate analyses of morphological and molecular data in the plant family Rubiaceae. **Cladistics**, 12(1):21-40, 1996.

- BREMER, B. A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 96(1):4-26, 2009.
- BRINGMANN, G.; OCHSE, M.; WOLF, K.; KRAUS, J.; PETERS, K.; PETERS, E. M.; HERDERICH, M.; AKÉ ASSI, L.; TAYMAN, F. S. K. 4-Oxonicotinamide-1-(1'-[beta]-ribofuranoside) from *Rothmannia longiflora* Salisb, (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 51(2):271-276, 1999.
- BRINGMANN, G.; HAMM, A.; KRAUS, J.; OCHSE, M.; NOURELDEEN, A.; JUMBAM, D. N. Gardenamide A from *Rothmannia urcelliformis* (Rubiaceae)– Isolation, Absolute Stereostructure, and Biomimetic Synthesis from Genipine. **European Journal of Organic Chemistry**, 2001(10):1983-1987, 2001.
- BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia Alimentar**, 27(4):902-908, 2007.
- BRUIX, M.; RUMBERO, A.; VÁZQUEZ, P. Apodihydrocinchonamine, an indole alkaloid from *Iseritia haenkeana*. **Phytochemistry**, 33(5):1257-1261, 1993.
- BRUNETON, J.; BARTON, D. H. R. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Acribia, 1991.
- BRUYN, A.; ZHANG, W.; BUDESINSKY, M. NMR study of three heteroyohimbine derivatives from *Rauwolfia serpentina* stereochemical aspects of the two isomers of reserpiline hydrochloride. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 27:935-940, 1989.
- BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; NIKIFOROV, A.; KAUL, V.K.; WINKER, N. Volatiles of the absolute of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, 8(3):241-245, 1996.
- BUKURU, J.; NGUYEN VAN, T.; VAN PUYVELDE, L.; HE, W.; DE KIMPE, N. New pentacyclic cyclol-type naphthohydroquinone from the roots of *Pentas bussei*. **Tetrahedron**, 59(31):5905-5908, 2003.
- CAI, Y. F.; HUANG, Q. S. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Damnacanthus indicus* from different places by RP-hPLC]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 35(5):694-696, 2012.
- CALDWELL, C. G.; FRANZBLAU, S. G.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. Oleanane triterpenes from *Junellia tridens*. **Journal of Natural Products**, 63(12):1611-1614, 2000.
- CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p.77-99, 2001.

- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**, Florianópolis, SC: Argos 2001.
- CALLAWAY, J. C.; RAYMON, L. P.; HEARN, W. L.; MCKENNA, D. J.; GROB, C. S.; BRITO, G. S.; MASH, D. C. Quantitation of N, N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, 20(6):492-497, 1996.
- CAMPOS, M. T. V.; BRITO, J. M. Rubiaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G., *et al* (Ed.), **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**, Manaus, AM: Inpa, p.626-633, 1999.
- CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Médica**, 67(8):685-694, 2001.
- CARBONEZI, C. A.; MARTINS, D.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae), **Phytochemistry**, 51:781-785, 1999.
- CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; FLAUSINO JR, O. A.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcaloides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, 27(6):878-881, 2004.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6ª Ed., Belem, PA: Museu Paraense Emilio Goeldi, 1996.
- CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, 23(1):20-22, 2000.
- CHAN, H. H.; LI, C. Y.; DAMU, A. G.; WU, T. S. Anthraquinones from *Ophiorrhiza hayatana* OHWI. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 53(10):1232-1235, 2005.
- CHANDRA, U.; Ghosh, R.; Chowdhury, S.; Dinda, B. New iridoid from aerial parts of *Mussaenda roxburghii*. **Natural Product Communications**, 7(1):1, 2012.
- CHANG, P.; CHEN, C. Isolation and Characterization of Antitumor Anthraquinones from *Morinda umbellata*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 47(4):347-53, 1995.
- CHENG, Z. H.; YU, B. Y.; YANG, X. W. 27-Nor-triterpenoid glycosides from *Mitragyna inermis*. **Phytochemistry**, 61(4):379-382, 2002.
- CHEN, Q. C.; ZHANG, W. Y.; YOUNG, U. J.; KIM, H. J.; LEE, I. S.; JUNG, H. J.; NA, M. K.; MIN, B. S.; BAE, K. H. Iridoid glycosides from *Gardeniae Fructus* for treatment of ankle sprain. **Phytochemistry**, 70(6):779-784, 2009.



- CHIANG, L.; ABDULLAH, M. A. Enhanced anthraquinones production from adsorbent-treated *Morinda elliptica* cell suspension cultures in production medium strategy. **Process Biochemistry**, 42(5):757-763, 2007.
- CHIQUIERI, A.; DI MAIO, F. R.; PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss, na Flora Brasiliensis de Martius. **Rodriguésia**, 55(84):47-57, 2004.
- CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; LASURE, A.; LI, Q.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; BERGHE, D. V.; KAMBU, K.; TONA, L.; VLIETINCK, A. Flavonoid O-glycosides from the leaves of *Morinda morindoides*. **Phytochemistry**, 38(5):1301-1303, 1995.
- CIMANGA, R. K.; KAMBU, K.; TONA, L.; HERMANS, N.; APERS, S.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* Morinda morindoides leaf extracts and its isolated constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, 107(1):83-90, 2006.
- CIMANGA, R. K.; MUKENYI, P. N. K.; KAMBU, O. K.; TONA, G. L.; APERS, S.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh, (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 127(2):215-220, 2010.
- CLARDY, J.; WALSH, C. 2004. Lessons from natural molecules. **Nature**, 432:829-837, 2004.
- CLSI, W. P. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, Pennsylvania 19087-1898 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003,
- CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, 73(6):479-483, 2002.
- COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. **Natural Product Reports**, 20(6):535-557, 2003.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, 15(3):183-205, 2001.
- CORTINAS, M. N.; FERNÁNDEZ, M.; VALETA, M. I.; URIARTE, M. R.; MOGDASY, M. C. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, 18(3):230-238, 2002.
- COSTA, A. B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2003.

- COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G. M. A. FARIAS, P. A. M., VIANA, G. S. B. CUNHA, K. M. A., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., GRAMOSA, N. V., RAO, V. S. N. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, 40: 1231-1234, 2002.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18:670-675, 2008.
- CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, **Helvetica Chimica Acta**, 80(4):1144-1152, 1997.
- DA CUNHA, A. P.; DA GRAÇA, J. A. B. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.
- DAI, Y.; HARINANTENAINA, L.; BRODIE, P. J.; BIRKINSHAW, C.; RANDRIANAIVO, R.; APPLEQUIST, W.; RATSIMBASON, M.; RASAMISON, V. E.; SHEN, Y.; DYKE, K. T.; KINGSTON, D. G. Two Antiproliferative Triterpene Saponins from *Nematostylis anthophylla* from the Highlands of Central Madagascar. **Chemistry & Biodiversity**, 10(2):233-240, 2013.
- DAL PIAZ, F.; MALAFRONTI, N.; ROMANO, A.; GALLOTTA, D.; BELISARIO, M. A.; BIFULCO, G.; GUALTIERI, M. J.; SANOGO, R.; TOMMASI, N.; PISANO, C. Structural characterization of tetranortriterpenes from *Pseudocedrela kotschyi* and *Trichilia emetica* and study of their activity towards the chaperone Hsp90. **Phytochemistry**, 75:78-89, 2012.
- DALLAVALLE, S.; JAYASINGHE, L.; KUMARIHAMY, B. M. M.; MERLINI, L.; MUSSO, L.; SCAGLIONI, L. A new 3, 4-seco-lupane derivative from *Lasianthus gardneri*. **Journal of Natural Products**, 67(5):911-913, 2004.
- DAMTOFT, S.; ROSENDAL, S.; NIELSEN, B. J. <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. **Phytochemistry**, 20(12):2717-2732, 1981.
- DE-MORAES-MOREAU, R. L.; HARAGUCHI, M.; MORITA, H.; PALERMONETO, J. Chemical and biological demonstration of the presence of monofluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 28(6):685-692, 1995.
- DEULOFEU, V. Chemical compounds isolated from *Banisteriopsis* and related species. **Ethnopharmacological Search for Psychoactive Drugs, US Public Health Service Publication**. 18, 1967.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 1ª, Editora Unesp, 2003.

- DINDA, B.; DEBNATH, S.; MAJUMDER, S.; ARIMA, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. Chemical constituents of *Mussaenda incana*. **Indian Journal of Chemistry**, 44b(11):2362-2366, 2005.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. Iridoid glucosides from *Wendlandia tinctoria* roots. **Natural Product Communications**, 6(6):747, 2011a.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; MAJUMDER, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. New iridoid glucoside from *Wendlandia tinctoria* roots. **Chinese Chemical Letters**, 22(10):1233-1236, 2011b.
- DIYABALANAGE, T. K. K.; KUMARIHAMY, B. M. M.; WANNIGAMA, G. P.; JAYASINGHE, L.; MERLINI, L.; SCAGLIONI, L. Alkaloids of *Uncaria elliptica*. **Phytochemistry**, 45(8):1731-1732, 1997.
- DJOUDI, R.; BERTRAND, C.; FIASSON, K.; FIASSON, J. L.; COMTE, G.; FENET, B.; ANTOINE RABESA, Z. Polyphenolics and iridoid glycosides from *Tarenna madagascariensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35:314-316, 2007.
- DONALD, P.; LAMPRECHT, J.; FREESTONE, M.; ALBRECHT, C.; BOUIC, P.; KOTZE, D.; VAN JAARSVELD, P. A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of *Pulmonary tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 1(6):518-522, 1997.
- DONFACK, E. V.; LENTA, B. N.; KONGUE, M. D.; FONGANG, Y. F.; NGOUELA, S.; TSAMO, E.; DITTRICH, B.; LAATSCH, H. Naucleonin D. an Indole Alkaloid and other Chemical Constituents from Roots and Fruits of *Mitragyna inermis*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, B67(11):1159, 2012.
- DREWES, S. E.; HORN, M. M.; CONNOLLY, J. D.; BREDEKAMP, B. Enolic iridolactone and other iridoids from *Alberta magna*. **Phytochemistry**, 47(6):991-996, 1998.
- DREWES, S. E.; HORN, M. M.; MUNRO, O. Q.; RAMESAR, N.; OCHSE, M.; BRINGMANN, G.; PETERS, K.; PETERS, E. M. Stereostructure, conformation and reactivity of P- and a-gardiol from *Burchellia bubalina*. **Phytochemistry**, 50(3):387-394, 1999.
- EKPENDU, T. O. E.; ADESOMOJU, A. A.; EKUNDAYO, O.; OKOGUN, J. I.; LAAKSO, I. Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. **Flavour and fragrance journal**, 8(5):269-271, 1993.
- EKPENDU, T. O. E.; ADESOMOJU, A. A.; OKOGUN, J. I. Chemical Studies of *Mitracarpus villosus* (Sw, ) DC - A Medicinal Rubiaceae Weed. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, 26(1):69-71, 2001,
- EL ABBADI, N.; WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; QUIRION, J.; ANTON, R. New alkaloids of *Chiococca alba*. **Phytochemistry**, 31(7):603-604, 1989.

- EL-EMARY, N. A.; BACKHEET, E. Y. Three hydroxymethylanthraquinone glycosides from *Rubia tinctorum*. **Phytochemistry**, 49(1):277-279, 1998;
- EL-GAMAL, A. A.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; HALIM, A. F.; AMER, M. M.; SAAD, H. E. A.; AWAD, S. A. Anthraquinones from the polar fractions of *Galium sinaicum*. **Phytochemistry**, 42(4):1149-1155, 1996.
- EL-HAFIZ, A.; WENIGER, B.; QUIRON, J. C.; ANTON, N. Ketoalcohols, Lignans and Coumarins From *Chiococca alba*. **Phytochemistry**, 30(6):2029-2031, 1991.
- EL-LAKANY, A. M.; KADER. M. S. A.; SABRI, N. N, Anthraquinones with Antibacterial Activities from *Crucianella maritima* L. Growing in Egypt. **Natural Product Sciences**, 10(2):63-68, 2004.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, 64:711-713, 1998a.
- ENDALE, M.; ALAO, J. P.; AKALA, H. M.; RONO, N. K.; EYASE, F. L.; DERESE, S.; NDAKALA, A., MBUGUA, A.; WALSH, D. S.; SUNNERHAGEN, P.; YENESEW, A. Antiplasmodial Quinones from *Pentas longiflora* and *Pentas lanceolata*. **Planta medica**, 78(1):31-35, 2012a.
- ENDALE, M.; EKBERG, A.; ALAO, J. P.; AKALA, H. M.; NDAKALA, A.; SUNNERHAGEN, P.; YENESEW, A. Anthraquinones of the Roots of *Pentas micrantha*. **Molecules**, 18(1):311-321, 2012b
- ENDO, T.; TAGUCHI, H. The constituents of *Gardenia jasminoides* geniposide and genipin-gentiobioside. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, 21(12):2684-2688, 1973.
- ENRÍQUEZ, G. Amazônia–Rede de inovação de dermocosméticos Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Parcerias Estratégicas**, 14:28, 2010.
- FABRI, R. L.; GRAZUL, R. M.; CARVALHO, L. O. D.; COIMBRA, E. S.; CARDOSO, G. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. D.; SILVA, A. D.; SCIO, E. Antitumor, antibiotic and antileishmanial properties of the Pyranonaphthoquinone Psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 84(4):1081-1090, 2012.
- FAN, G. J., & HE, Z. S. Triterpenoid glycosides from *Adina rubella*. **Phytochemistry**, (44, 6):1139-1143, 1997.
- FAN, J. T.; CHEN, Y. S.; XU, W. Y.; DU, L.; ZENG, G. Z.; ZHANG, Y. M.; SU, J.; LI, Y.; TAN, N. H. Rubiyunnanins A and B. two novel cyclic hexapeptides from *Rubia yunnanensis*. **Tetrahedron Letters**, 51(52):6810-6813, 2010.

- FARIAS, M. F. *Psychotria myriantha* Mull Arg, (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqüiotáxica e sobre o sistema nervoso central. Tese de doutorado: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Rio Grande do Sul, 191pp., 2006
- FARIAS, F. M.; PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; ZUANAZZI, J. A. S.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. Monoamine levels in rat striatum after acute intraperitoneal injection of strictosidinic acid isolated from *Psychotria myriantha* Mull, Arg, (Rubiaceae). **Phytomedicine**, 17(3):289-291, 2010.
- FARIAS, F. M.; PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; BARROS, D. M.; GOTTFRIED, C.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg.(Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus. **Fitoterapia**, 83(6):1138-1143, 2012.
- FARID, H. A. R.; KUNERT, O.; HASLINGER, E.; SEGER, C. Isolation and Structure Elucidation of Iridoide and Coumarin Derivatives from *Xeromphis nilotica* (Rubiaceae). **Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly**, 133(11):1453-1458, 2002.
- FERNANDES, L. M.; GARCEZ, W. S.; MANTOVANI, M. S.; FIGUEIREDO, P. O.; FERNANDES, C. A.; GARCEZ, F. R.; GUTERRES, Z. R. Assessment of the in vitro and in vivo genotoxicity of extracts and indole monoterpene alkaloid from the roots of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae). **Food and Chemical Toxicology**, 59:405-411, 2013.
- FERREIRA, J. C.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Chemical constituents from *Spermacoce verticillata* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 44:208-211, 2012.
- FOGUE, K. S.; WEMBE, N. A.; ANKE, B.; MARC, L.; MERLIN, K. G.; MICHAEL, S. Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium multiflorum* (Rubiaceae). **Fitoterapia**, 91:199-204, 2013.
- FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, 22(3):559-566, 2008.
- FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; MCLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(2):362-366, 1998.
- FREDERICKSON, M. E. Ant species confer different partner benefits on two neotropical *Myrmecophytes*. **Oecologia**, 143(3):387-395, 2005.

- FREDERICKSON, M. E.; GREENE, M. J.; GORDON, D. M. Ecology: 'Devil's gardens' bedevilled by ants. **Nature**, 437(7058):495-496, 2005.
- FREEDLAND, C. S.; MANSBACH, R. S. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. **Drug and alcohol dependence**, 54(3):183-194, 1999.
- GAO, G.; LU, Z.; TAO, S.; ZHANG, S.; WANG, F. Triterpenoid saponins with antifeedant activities from stem bark of *Catunaregam spinosa* (Rubiaceae) against *Plutella xylostella* (Plutellidae). **Carbohydrate Research**, 346(14):2200-2205, 2011.
- GARCIA, R. M. A.; OLIVEIRA, L. O.; MOREIRA, M. A.; BARROS, W. S. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Biochemical Systematics and Ecology**, 33(3):233-243, 2005.
- GARCÍA-PRADO, E.; GIMENEZ, G.; DE LA PUERTA VÁZQUEZ, R.; ESPARTERO SÁNCHEZ, J. L.; SÁENZ RODRÍGUEZ, M. T. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, 14(4):280-284, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30(2):374-381, 2007.
- GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cadernos da Saúde Pública**, 13( Supl 1): 27-38, 1997.
- GRETHE, G.; LEE, H. L.; MITT, T.; USKOKOVIC, M. R. Synthesis of cinchona alkaloids via quinuclidine precursors. **Journal of American Chemical Society**, 93(22):5904-5907, 1971.
- GROB, C. S.; MCKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; BRITO, G. S.; NEVES, E. S.; OBERLAENDER, G.; SAIDE, O. L.; LABIGALINI, E.; TACLA, C.; MIRANDA, C. T. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. **Journal of Nervous and Mental Disease**, 184(2):86-94, 1996.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade, Fitoterápicos e Fitofármacos, In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p.489-516, 2004.
- GUTKIND, G.; NORBEDO, C.; MOLLERACH, M.; FERRADO, G.; TORRES, R. Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. **Journal of Ethnopharmacology**, 10:319-321, 1984.
- GUVENALP, Z.; KILIC, N.; KAZAZ, C.; KAYA, Y.; DEMIREZER, L. O. Chemical constituents of *Galium tortumense*. **Turkish Journal of Chemistry**, 30(4):515-523, 2006.

- HAMERSKI, L.; FURLAN, M.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; CAVALHEIRO, A. J.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M.; DA SILVA BOLZANI, V. Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 63(4):397-400, 2003.
- HAMERSKI, L.; BOMM, M. D.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; EBERLIN, M. N.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Phenylpropanoid glucosides from leaves of *Coussarea hydrangeifolia* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 66(16):1927-1932, 2005a.
- HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Triterpenoid saponins from *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**, 28(4):601-604, 2005b.
- HAMZAH, A. S.; AIMI, N.; LAJIS, N. H. J. Constituents of *Hedyotis herbacea* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 24, 1996.
- HANDJIEVA, N.; MITOVA, M.; ANCEV, M.; POPOV, S. Iridoid glucosides from *Galium album* and *G. lovcense*. **Phytochemistry**, 43(3):625-628, 1996.
- HAO, J.; FENG, S. X.; QIU, S. X. S.; CHEN, T. (2011). Anthraquinone Glycosides from the Roots of *Prismatomeris connata*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 9(1):42-45, 2011.
- HARI, L.; DE BUYCK, L. F.; DE POOTERT, H. L. Naphthoquinoid pigments from *Pentas longiflora*. **Phytochemistry**, 30(5):1726-1727, 1991.
- HAROUNA, H.; FAURE, R.; ELIAS, R.; DEBRAUWER, L.; SAADOU, M.; BALANSARD, G.; BOUDON, G. Harounoside a pentalongin hydroquinone diglycoside from *Mitracarpus scaber*. **Phytochemistry**, 39(6):1483-1484, 1995.
- HE, Z.; FANG, S. Y.; WANG, P.; GAO, J. H. 27-nor-triterpenoid glycosides from *Adina rubella*. **Phytochemistry**, 42(5):1391-1393, 1996.
- HE, Z. D.; MA, C. Y.; ZHANG, H. J.; TAN, G. T.; TAMEZ, P.; SYDARA, K.; BOUAMANIVONG, S.; SOUTHAVONG, B.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M. Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L, ) L. **Chemistry & biodiversity**, 2(10):1378-1386, 2005.
- HEITZMAN, M. E.; NETO, C. C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 66(1):5-29, 2005.
- HEMWIMON, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Separation and Purification Technology**, 54(1):44-50, 2007.
- HIGUCHI, C. T.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SATO, D. N. Triterpenes and

antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. **Química Nova**, 31(7):1719-1721, 2008.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**, São Paulo:1939.

HONTY, K.; BAITZGACS, E.; BLASKO, G.; SZANTAY, C. Synthesis of yohimbines. 4. Synthesis of (+-)-3-epi-.alpha.-yohimbine and (+-)-3, 17-epi-.alpha.-yohimbine. Carbon-13 NMR investigation of yohimbine stereoisomers. **Journal of Organic Chemistry**, 47( 26): 5111-5114, 1982.

HOSHINA, T. Studies on red-fin disease of eel. **Special Research Report of Tokyo University of Fisheries**, (6):61-105, 1962.

HOU, W. C.; LIN, R. D.; CHEN, C. T.; LEE, M. H. Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. **Journal of ethnopharmacology**, 100(1):216-220, 2005.

IDOWU, T. O.; OGUNDAINI, A. O.; SALAU, A. O.; OBUOTOR, E. M.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. **Phytochemistry**, 71(17):2092-2098, 2010.

IKRAM, A.; VERSIANI, M. A.; SHAMSHAD, S.; AHMED, S. K.; ALI, S. T.; FAIZI, S. (2013). Ixorene, a New Dammarane Triterpene from the Leaves of *Ixora coccinea* Linn. **Records of Natural Products**, 7:4, 2013.

INOUYE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid glycosides. **Phytochemistry**, 27(8):2591-2598, 1988.

IQBAL, P. F.; BHAT, A. R.; AZAM, A. Antiamoebic coumarins from the root bark of *Adina cordifolia* and their new thiosemicarbazone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, 44(5):2252-2259, 2009.

ISMAIL, N. H.; ALI, A. M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.; LAJIS, N. H. Anthraquinones from *Morinda elliptica*. **Phytochemistry**, 45(8):1723-1725, 1997.

ITO, A.; CHAI, H. B.; SHIN, Y. G.; GARCÍA, R.; MEJÍA, M.; GAO, Q.; FAIRCHILD, C. R.; LANE, K. E.; MENENDEZ, A. T.; FARNSWORTH, N. R. Cytotoxic Constituents of the Roots of *Exostema acuminatum*. **Tetrahedron**, 56(35):6401-6405, 2000.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NAYESHIRO, H. Tetrahydroisoquinoline-monoterpene glucosides from *Alangium lamarckii* and *Cephaelis ipecacuanha*, **Phytochemistry**, 36(2):383-387, 1994.

ITOH, A.; IKUTA, Y.; BABA, Y.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*. **Phytochemistry**, 52(6):1169-1176, 1999a.



- ITOH, A.; IKUTA, Y.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Structures of New Alkaloids from *Cephaelis acuminata* and *Alangium lamarckii*, Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, Hiroshima, Hiroshima University, p, 367-372, 1999b.
- ITOH, A.; BABA, Y.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Tetrahydroisoquinoline-monoterpene glycosides from *Cephaelis acuminata*. **Phytochemistry**, 59(1):91-97, 2002.
- ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NISHI, T. Two triterpenoid saponins from *Neonauclea sessilifolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 51(11):1335-1337, 2003b
- JACOBS, J.; CLAESSENS, S.; DE KIMPE, N. First straightforward synthesis of 1-hydroxy-3, 4-dihydro-1H-benz [g] isochromene-5, 10-dione and structure revision of a bioactive benz [g] isochromene-5, 10-dione from *Psychotria camponutans*. **Tetrahedron**, 64(2):412-418, 2008.
- JANGWAN, J. S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T.; SINGH, R. Isolation and in vitro cytotoxic activity of 11-methylxoside isolated from bark of *Randia dumetorum* Lamk. **Herba Polonica**, 59(1):44-52, 2013.
- JANNIC, V.; GUÉRITTE, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; MARTIN, M. T.; SÉVENET, T.; POTIER, P. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. **Journal of natural products**, 62(6):838-843, 1999.
- JANSAKUL, C.; INTARIT, K.; ITHARAT, A.; PHADUNGCHAROEN, T.; RUANGRUNGSI, N.; MERICA, A.; LANGE, G. L. Biological activity of crude extract and saponin pseudoginsenoside-RT1 derived from the fruit of *Randia siamensis*. **Pharmaceutical biology**, 37(1):42-45, 1999.
- JANUÁRIO, A.; PIETRO, R.; KASHIMA, S.; SATO, D.; FRANÇA, S. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L, (Solanaceae). **Phytotherapy Research**, 16(5):445-448, 2002.
- JENSEN, S. R. Iridoids in *Rothmannia globosa*. **Phytochemistry**, 22(8):1761-1765, 1983.
- JIMÉNEZ, A.; MECKES, M.; ALVAREZ, V.; TORRES, J.; PARRA, R. Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Phytotherapy Research**, 19(4):320-322, 2005.
- JOLY, A. B. **Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal**, 6ª, São Paulo: Editora Nacional, 777pp, 1983.
- JORGE, T. C. M.; OZIMA, A. P.; DÜSMAN, L. T.; SOUZA, M. C.; PEREIRA, G. F.; VIDOTTI, G. J.; SARRAGIOTTO, M. H. Alkaloids from *Cephalanthus glabratus* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 34(5):436-437, 2006.

- JUNQUEIRA JUNIOR, G.; BRAGA, L. M. G. D. M.; MOTTA, M. D. S.; PILLA, H. S. Modelo experimental de melanoma em camundongos. **Anais Brasileiros de Dermatologia. Dermatol**, 72( 5): 487-489, 1997.
- KAM, T. S.; LEE, K. H.; GOH, S. H. Dimeric indole alkaloids from *Uncaria callophylla*. **Phytochemistry**, 30(10):3441-3444, 1991.
- KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; SATAKE, T. New anthraquinone glycosides from the roots of *Morinda citrifolia*. **Fitoterapia**, 80(3):196-199, 2009.
- KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Iridoid and phenolic diglycosides from *Canthium berberidifolium*. **Phytochemistry**, 61(4):461-464, 2002a
- KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. **Phytochemistry**, 59(5):551-556, 2002b.
- KAN-FAN, C.; ZUANAZZI, J. A.; QUIRION, J. C.; HUSSON, H. P.; HENRIQUES, A. Deppeaninol, A New  $\beta$ -Carboline Alkaloid from *Deppea blumenaviensis* (Rubiaceae). **Natural Product Letters**, 7(4):317-321, 1995.
- KANG, W. Y.; LI, G. H.; HAO, X. J. Two New Triterpenes from *Neonauclea sessilifolia*. **Acta Botanica Sinica - Chinese Edition**, 45(8):1003-1007, 2003.
- KARAKET, N.; SUPAIBULWATANA, K.; OUNSUK, S.; BULTEL-PONCE, V.; PHAM, V. C.; BODO, B. Chemical and bioactivity evaluation of the bark of *Neonauclea purpurea*. **Natural Product Communications**, 7(2):169, 2012.
- KARIKAS, G. A.; EUERBY, M. R.; WAIGH, R. D. Constituents of the stems of *Arbutus unedo*. **Planta Médica**, 53(2):223-224, 1987.
- KATO, L. O.; CECILIA, M. A.; MELO, M. P.; FREITAS, C. S.; SCHUQUEL, I. T. A.; DELPRETE, P. G. Glucosidic iridoids from *Molopanthera paniculata* Turcz. (Rubiaceae, Posoquerieae). **Phytochemistry Letters**, 5(1):155-157, 2012.
- KATYAYANI, D. C.; MANABENDRA, D. C.; M. B. Anti Bacterial Activity of some Plants Belonging to the Family Rubiaceae: A Review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 1(3):1179-1194, 2012.
- KAWAI, K.; OSHIMI, K.; SUNAGA, T.; INOUE, K. Phenolic Compound, Epoxy Resin, Epoxy Resin Composition, Prepreg, and Cured Product Thereof." **WIPO Patent** No. 2011093474. 5 Aug. 2011.
- KHAN, M. R.; OMOLOSO, A. D.; KIHARA, M. Antibacterial activity of *Alstonia scholaris* and *Leea tetramera*. **Fitoterapia**, 74(7-8):736-740, 2003.
- KHAN, I. A.; STICHER, O.; RALI, T. New triterpenes from the leaves of *Timonius timon*. **Journal of Natural Products**, 56(12):2163-2165, 1993.

- KHAN, M. R.; RUTAIHWA, D. S. D.; MHEHE, G. L. 1-(3-Hydroxy-4-methoxy-5-methylphenyl) ethanone, a new compound from the stem bark of *Lamprothamnus zanguebaricus*. **Fitoterapia**, 74(7-8):741-742, 2003.
- KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral research**, 67(2):107-119, 2005.
- KHAN, K.; KARODI, R.; SIDDIQUI, A.; THUBE, S.; RUB, R. A. Development of anti-acne gel formulation of anthraquinones rich fraction from *Rubia cordifolia* (Rubiaceae). **International Journal of Applied Research in Natural Products**, 4(4):28-36, 2012.
- KIM, S. H.; AHN, B. Z.; RYU, S. Y. Antitumour effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa*. **Phytotherapy Research**, 12(8):553-556, 1998.
- KIM, H. K.; KWON, M. K.; KIM, J. N.; KIM, C. K.; LEE, Y. J.; SHIN, H. J.; LEE, J.; LEE, H. S. Identification of novel fatty acid glucosides from the tropical fruit *Morinda citrifolia* L. **Phytochemistry Letters**, 3(4):238-241, 2010.
- KITAGAWA, I.; WEI, H.; NAGAO, S.; MAHMUD, T.; HORI, K.; KOBAYASHI, M.; SHIBUYA, H. Indonesian Medicinal Plants. XIV. Characterization of 3'-O-Caffeoylsweroside, a new secoiridoid glucoside, and kelampayosides A and B. two new phenolic apioglucosides, from the bark of *Anthocephalus chinensis* (Rubiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 44(6):1162-1167, 1996.
- KITAJIMA, M.; FISCHER, U.; NAKAMURA, M.; OHSAWA, M.; UENO, M.; TAKAYAMA, H.; UNGER, M.; STÖCKIGT, J.; AIMI, N. Anthraquinones from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell cultures. **Phytochemistry**, 48(1):107-111, 1998.
- KITAJIMA, M.; YOKOYA, M.; HASHIMOTO, K.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N. Studies on New Alkaloid and Triterpenoids from Peruvian Una de Gato. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**, p, 437-442, 2001.
- KITAJIMA, M.; FUJII, N.; YOSHINO, F.; SUDO, H.; SAITO, K.; AIMI, N.; TAKAYAMA, H. Camptothecins and two new monoterpene glucosides from *Ophiorrhiza liukuensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 53(10):1355-1358, 2005.
- KITAJIMA, M.; OHARA, S.; KOGURE, N.; SANTIARWORN, D.; TAKAYAMA, H.  $\beta$ -Carboline-type indole alkaloid glycosides from *Ophiorrhiza trichocarpon*. **Tetrahedron**, 69(45):9451-9456, 2013.
- KONIGHEIM, B. S.; COMINI, L. R.; GRASSO, S.; AGUILAR, J. J.; MARIONI, J.; CONTIGIANI, M. S.; MONTOYA, S. C. N. Determination of non-toxic and subtoxic concentrations of potential antiviral natural anthraquinones. **Latin American Journal of Pharmacy**, 31(1):51-56, 2012.

- KONISHI, M.; HANO, Y.; TAKAYAMA, M.; NOMURA, T.; HAMZAH, A. S.; JASMANI, H. Triterpenoid saponins from *Hedyotis nudicaulis*. **Phytochemistry**, 48(3):525-528, 1998.
- KONTOGIANNI, V. G.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A.; GEROTHANASSIS, I. P. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy -Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, 635:188-195, 2009.
- KOYAMA, J.; OKATANI, T.; TAGAHARA, K.; KOUNO, I.; IRIS, H. Anthraquinones of *Damnacanthus indicus*. **Phytochemistry**, 31(2):709-710, 1992a
- LAI, Q. L.; PHAM, T. K.; VU, V. D.; CHU, P. K. Chemical components of roots of *Hedyotis capitellata* Wall, ex G. Don var, *mollis* Pierre ex Pit. **Tap Chi Duoc Hoc**, (9):9-11, 2001.
- LAMIDI, M.; OLLIVIER, E.; FAURE, R.; DEBRAUWER, L.; NZE-EKEKANG, L.; BALANSARD, G. Quinovic acid glycosides from *Nauclea diderrichii*. **Phytochemistry**, 38(1):209-212, 1995.
- LAMIDI, M.; OLLIVIER, E.; MAHIOU, V.; FAURE, R.; DEBRAUWER, L.; NZE EKEKANG, L.; BALANSARD, G. Gluco-indole alkaloids from the bark of *Nauclea diderrichii*, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of 3-5tetrahydrodeoxycordifoline lactam and cadambine acid. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 43(5):427-429, 2005.
- LATHA, P. G.; NAYAR, M. N. S.; SING, O. V.; GEORGE, K. R.; PANIKKAR, K. R.; PUSHPANGADAN, P. Isolation of antigenotoxic ursolic acid from *Ixora coccinea* flowers. **Actual Biol**, 23:21-24, 2001.
- LAUS, G.; KEPLINGER, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria guianensis* (Rubiaceae). **Phyton**, 43(1):1-8, 2003.
- LAUS, G.; TEPPNER, H. The alkaloids of an *Uncaria rhynchophylla* (Rubiaceae-Coptosapeltea). **Phyton**, 36(2):185-196, 1996.
- LAUS, G. e KEPLINGER, D. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 662(2):243-249, 1994.
- LAXMINARAYAN, R.; KLEIN, E.; DYE, C.; FLOYD, K.; DARLEY, S.; ADEYI, O. Economic benefit of tuberculosis control. **Policy research working paper**, 4295, 2007.
- LEE, D.; CUENDET, M.; AXELROD, F.; CHAVEZ, P. I.; FONG, H. H, S.; PEZZUTO, J. M.; DOUGLAS KINGHORN, A. Novel 29-nor-3, 4-seco-cycloartane triterpene methyl esters from the aerial parts of *Antirhea acutata*, **Tetrahedron**, 57(33):7107-7112, 2001.

- LEE, D.U.; PARK, C.H.; KANG, S.I.; MIN, E.G.; HAN, Y.H.; LEE, C.K. Isolation of the Component Transformed Into Blue Pigments by Aerobic Bacteria in the Fruits of *Gardenia jasminoides*. **Saengyak Hakhoechi**, 29(3):204-208, 1998.
- LEE, S. E. HWANG H J. HA J S. JEONG H S. JEONG H K. Screening medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**, 73: 167-179, 2003.
- LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. N.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R. T.; VIEIRA, R. C.; OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; MARTINO, V. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(1):6-11, 2006.
- LEMEN, J.; TAYLOR, W. I. A Uniform numbering system for indole alkaloids. **Experientia**, 21(9):508, 1965.
- LEMMICH, E.; CORNETT, C.; FURU, P.; JORSTIAN, C. L.; KNUDSEN, A. D.; OLSEN, C. E.; SALIH, A.; THILBORG, S. T. Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. **Phytochemistry**, 39(1):63-68, 1995.
- LENDL, A.; WERNER, I.; GLASL, S.; KLETTER, C.; MUCAJI, P.; PRESSER, A.; REZNICEK, G.; JURENITSCH, J.; TAYLOR, D. W. Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (sw, ) urban var, *venosa* (Bois Bandé). **Phytochemistry**, 66(19):2381-2387, 2005.
- LIEW, S. Y., MUKHTAR, M. R., HADI, A. H. A., AWANG, K., MUSTAFA, M. R., ZAIMA, K., HIROSHI, M.; LITAUDON, M. Nauclyne, a new indole alkaloid from the bark of *Nauclea officinalis*. **Molecules**, 17(4):4028-4036, 2012.
- LIN, J.; OPOKU, A. R.; GEHEEB-KELLER, M.; HUTCHINGS, A. D.; TERBLANCHE, S. E.; K JÄGER, A.; VAN STADEN, J. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 68(1):267-274, 1999.
- LIU, Q.; KIM, S. B.; AHN, J. H.; HWANG, B. Y.; KIM, S. Y.; LEE, M. K. Anthraquinones from *Morinda officinalis* roots enhance adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. **Natural Product Research**, 26(18):1750-1754, 2012a.
- LIU, M.; ZHOU, L.; CHEN, Z.; HU, C. Analgesic effect of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on spared nerve injury rat model of neuropathic pain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 102(3):465-470, 2012b.
- LIU, Y.; CHEN, B.; BAI, Y.; DUDDECK, H.; HIEGEMANN, M. Digiferiginol glycoside from *Rubia schumanniana*. **Phytochemistry**, 30(3):947-949, 1991.
- LONGO, L.; SCARDINO, A.; VASAPOLLO, G. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L. , *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 8(3):360-364, 2007.

- LOPES, S.; VON POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 32(12):1187-1195, 2004.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 77(2-3):189-196, 2001.
- LORENCE, A.; MEDINA-BOLIVAR, F.; NESSLER, C. L. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. **Plant Cell Reports**, 22(6):437-441, 2004.
- LU, H. C.; HE, J. A study on chemical constituents of *Oldenlandia diffusa* (Willd) Roxb. **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, 8(1):34-37, 1996.
- LUCIANO, J. H. S.; LIMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32(12):1227-1229, 2004.
- MABBERLEY, D. J. **The plant book. A portable dictionary of the vascular plants.** 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 858pp., 1997.
- MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of ethnopharmacology**, 22(2):143-172, 1988.
- MACHIDA, K.; TAKEHARA, E.; KOBAYASHI, H.; KIKUCHI, M. Studies on the constituents of Gardenia species, III, New iridoid glycosides from the leaves of *Gardenia jasminoides* cv, *fortuneana* Hara. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, 51(12):1417-1419, 2003.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25( 3): 429-438, 2002.
- MAEHARA, S.; SIMANJUNTAK, P.; KITAMURA, C.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bioproduction of *Cinchona* Alkaloids by the Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. Associated with *Cinchona ledgeriana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 60(10):1301-1304, 2012.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, 37(6):1517-1575, 1994.
- MANSKE, R. H. F. **Alkaloids of Pseudocinchona and Yohimbe.** In: MANSKE, R. H. F. *The Alkaloids, chemistry and physiology.* New York, London: Academic Press, VIII (The indole alkaloids), 1965.

- MAREC, F.; KOLLAROVA, I.; JEGOROV, A. Mutagenicity of natural anthraquinones from *Rubia tinctorum* in the *Drosophila* wing spot test. **Planta Médica**, 67(2):127-131, 2001.
- MATA, R.; DEL RAYO CAMACHO, M.; MENDOZA, S.; DEL CARMEN CRUZ, M. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. **Phytochemistry**, 31(9):3199-3201, 1992.
- MATSUO, H.; OKAMOTO, R.; ZAIMA, K.; HIRASAWA, Y.; ISMAIL, I. S.; LAJIS, N. H.; MORITA, H. New Vasorelaxant Indole Alkaloids, Villocarines A-D from *Uncaria villosa*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 19(13):4075-4079 2011.
- MAURICIO, A. Q. **Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético**. Instituto de Química da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- MAURYA, A.; GUPTA, S.; SRIVASTAVA, S. K. Large-scale separation of antipsychotic alkaloids from *Rauwolfia tetraphylla* L. by pH-zone-refining fast centrifugal partition chromatography. **Journal of Separation Science**, 36(2):407-413, 2013.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, 32(2):513-524, 1998.
- MEDEIROS, W. L. B.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, SCHRIPSEMA, R. A new quaternary indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana laeta* Mart. (Apocynaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, (12):368-372, 2001.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da SBCTA**, 36(1):1-11, 2002.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, 45(1):31-34, 1982.
- MITAINE-OFFER, A. C.; TAPONDJOU, L.; DJOUKENG, J.; BOUDA, H.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Glycoside derivatives of scopoletin and  $\beta$ -sitosterol from *Hymenodictyon floribundum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31(2):227-228, 2003.
- MITOVA, M. I.; ANCHEV, M. E.; PANEV, S. G.; HANDJIEVA, N. V.; POPOV, S. S. Coumarins and Iridoids from *Crucianella graeca*, *Cruciata glabra*, *Cruciata laevipes* and *Cruciata pedemontana* (Rubiaceae). **Zeitschrift für Naturforschung, C. Biosciences**, 51(9-10):631-634, 1996a.
- MITOVA, M. I.; HANDJIEVA, N. V.; ANCHEV, M. E.; POPOV, S. S. Iridoid glucosides from four Balkan endemics of the *Galium incurvum* group (Rubiaceae). **Zeitschrift fuer Naturforschung, C. Bioscience**, 51(9-10): 286-290, 1996b

- MITOVA, M.; HANDJIEVA, N.; SPASSOV, S.; POPOV, S. (1996). Macedonine, a non-glycosidic iridoid from *Galium macedonicum*. **Phytochemistry**, 42(4): 1227-1229, 1996c.
- MIYAZAWA, M.; KAWATA, J. Identification of the key aroma compounds in dried roots of *Rubia cordifolia*. **Journal of Oleo Science**, 55(1):37-39, 2006.
- MOBOT <<http://www.tropicos.org/Name/42000210?tab=maps>>, acessado em 03/01/2011.
- MOHAMMED, A. M. A.; COOMBES, P. H.; CROUCH, N. R.; MULHOLLAND, D. A. Chemical constituents from *Fadogia homblei* De Wild (Rubiaceae). **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, 9(2):116-124, 2013.
- MONGRAND, S.; BADOUC, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M.; BESSOULE, J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, 66): 549-559, 2005.
- MONTAGNAC, A.; LITAUDON, M.; PAÍS, M. Quinine-and quinicine-derived alkaloids from *Guettarda noumeana*, **Phytochemistry**, 46(5):973-975, 1997.
- MONTORO, P.; CARBONE, V.; DE DIOZ ZUNIGA QUIROZ, J.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. **Phytochemical analysis**, 15(1):55-64, 2004.
- MOON, H.I.; OH, J.S.; KIM, J.S.; CHEN, P.C.; ZEE, O.P. Phytochemical Compounds from the Underground Parts of *Gardenia jasminoides* Var. *Radicans* Makino. **Saengyak Hakhoechi**, 33(1):1-4, 2002.
- MORIMOTO, M.; TANIMOTO, K.; SAKATANI, A.; KOMAI, K. Antifeedant activity of an anthraquinone aldehyde in *Galium aparine* L. against *Spodoptera litura* F. **Phytochemistry**, 60(2):163-166, 2002.
- MOURA, V. M.; SANTOS, A. R.; NURNBERG, V.; DE SOUZA, M. C.; SANTIN, S. M. O. Iridoid glycosides from *Galianthe brasiliensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 33(4):451-453, 2005.
- MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; KHAN, R. A.; GANZERA, M.; KHAN, I. A. Investigation of Una De Gato I. 7-Deoxyloganic acid and <sup>15</sup>N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, 57(5):781-785, 2001.
- MUKHTAR, M. R.; OSMAN, N.; AWANG, K.; HAZNI, H.; QURESHI, A. K.; HADI, A.; HAMID A.; ZAIMA, K.; MORITA, H.; LITAUDON, M. Neonaucline, a new indole alkaloid from the leaves of *Ochreinauclea maingayii* (Hook. f.) Ridsd. (Rubiaceae). **Molecules**, 17:267-274, 2012.



- NAHRSTEDT, A.; ROCKENBACH, J.; WRAY, V. Phenylpropanoid glycosides, a furanone glucoside and geniposidic acid from members of the rubiaceae. **Phytochemistry**, 39(2):375-378, 1995.
- NASCIMENTO, C. A.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L. Alcalóides Indólicos Monoterpênicos Glicosilados de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão Da UFG - CONPEEX**, 2., 2005, Goiânia. Anais eletrônicos do II Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação da UFG [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005.
- NASCIMENTO, N. C.; MENGUER, P. K.; SPEROTTO, R. A.; ALMEIDA, M. R.; FETT-NETO, A. G. Early Changes in Gene Expression Induced by Acute UV Exposure in Leaves of *Psychotria brachyceras*, a Bioactive Alkaloid Accumulating Plant. **Molecular biotechnology**, 54(1):79-91, 2013.
- NEERGHEENA, V. S.; SOOBRAATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. **Journal of plant physiology**, 163(8):787-799, 2006.
- NEWTON, S. M.; LAU, C.; WRIGHT, C. W. A review of antimycobacterial natural products. **Phytotherapy Research**, 14(5):303-322, 2000.
- NGALAMULUME, T.; KILONDA, A.; TOPPET, S.; COMPERNOLLE, F.; HOORNAERT, G. An ursadienedioic acid glycoside from *Crossopteryx febrifuga*. **Phytochemistry**, 30(9):3069-3072, 1991.
- NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica de oito plantas Asteraceae e duas Rubiaceae da biodiversidade colombiana. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37(4):566-70, 2006.
- NISHIMURA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; SUGETA, N.; SAKAKURA, K.; FUJITA, K.; FUKAYA, H.; AOYAGI, Y.; HASUDA, T.; KINOSHITA, T.; HE, D. H. Tricalysiolides AF, new rearranged ent-kaurane diterpenes from *Tricalysia dubia*. **Tetrahedron**, 62(7):1512-1519, 2006.
- NUANYAI, T.; SAPPAPAN, R.; VILAIVAN, T.; PUDHOM, K. Dammarane triterpenes from the apical buds of *Gardenia collinsae*. **Phytochemistry Letters**, 4:183-186, 2011.
- NÚÑEZ MONTROYA, S. C.; COMINI, L. R.; SARMIENTO, M.; BECERRA, C.; ALBESA, I.; ARGÜELLO, G. A.; CABRERA, J. L. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 78(1):77-83, 2005.
- NUNEZ, C. V.; SANTOS, P. A.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; MESQUITA, A. S. S.; BAILLEUL, F. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Medica**, 75: 1037-1037, 2009.

- NUNEZ, C. V.; VASCONCELOS, M. C. Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. **Patente: Privilégio de Inovação**. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, título: "Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*.", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 2012.
- NUNEZ, C. V.; ROUMY, V.; MESQUITA, D. W. O.; MESQUITA, A. S. S.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; HENNEBELLE, T. Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Médica**, (78):287, 2012.
- O'BRIEN, R. J.; NUNN, P. P. The need for new drugs against tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 163(5):1055-1058, 2001.
- OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, 20: 121-126, 1981.
- OKUNADE, A. L.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, 65(8):1017-1032, 2004.
- OLIVEIRA, A. M.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M.  $\beta$ -Carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC.(Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 50:339-341, 2013.
- OLIVEIRA, P. L. **Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: Fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aubl.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- ONO, M.; UENO, M.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*, **ChemInform**, 37(12):no-no, 2006.
- ONO, M.; ISHIMATSU, N.; MASUOKA, C.; YOSHIMITSU, H.; TSUCHIHASHI, R.; OKAWA, M.; KINJO, J.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 55(4):632-634, 2007.
- ORBÁN, N.; BOLDIZSÁR, I.; SZUCS, Z.; DÁNOS, B. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. **Dyes and Pigments**, 77(1):249-257, 2008.
- OTSUKA, H.; YOSHIMURA, K.; YAMASAKI, K.; CANTORIA, M. C. Isolation of 10-O-acyl iridoid glucosides from a Philippine medicinal plant, *Oldenlandia corymbosa* L. (Rubiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 39(8):2049-2052, 1991.
- PAGE, J. E.; MADRINAN, S.; TOWERS, G. H. N. Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the allelopathic tree of the 'Devil's Garden'. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 50(9):840-842, 1994.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive

- method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(8):2720-2722, 2002.
- PANDEY, R.; SINGH, S. C.; GUPTA, M. M, Heteroyohimbinoid type oxindole alkaloids from *Mitragyna parvifolia*. **Phytochemistry**, 67(19):2164-2169, 2006.
- PANIAGUA-VEGA, D.; GARCIA-ROJAS, C. M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; RAMOS-VALDIVIA, A. C. A new monoterpenoid oxindole alkaloid from *Hamelia patens* micropropagated plantlets. **Natural Product Communications**, 7(11):1441-1444, 2012.
- PAREKH, J.; JADEJA, D.; CHANDA, S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. **Turkish Journal of Biology**, 29:203-210, 2005.
- PAULI, G. F.; CASE, R. J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N. H.; FRANZBLAU, S. G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**, 78(5):485-494, 2005.
- PEDERSEN, J. M.; BOWMAN, W. R.; ELSEGOOD, M. R. J.; FLETCHER, A. J.; LOVELL, P. J.; J. Synthesis of ellipticine: a radical cascade protocol to aryl- and heteroaryl-annulated[b]carbazoles. **The Journal of Organic Chemistry**, 70:10615, 2005.
- PELLETIER, P. J.; CAVENTOU, J. B.; **Annales de Chimie et de Physique**, XV, 289, 1820.
- PENG, J. N.; FENG, X. Z.; ZHENG, Q. T.; LIANG, X. T. A [beta]-carboline alkaloid from *Hedyotis chrysotricha*. **Phytochemistry**, 46(6):1119-1121, 1997.
- PENG, J. N.; FENG, X. Z.; LIANG, X. T. Iridoids from *Hedyotis hedyotideae*. **Phytochemistry**, 47(8):1657-1659, 1998.
- PERASSOLO, M.; QUEVEDO, C.; BUSTO, V.; IANONE, F.; GIULIETTI, A. M.; TALOU, J. R. Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, 41(1):181-185, 2007.
- PEREIRA, CG; ROSA, PTV e MEIRELES, MAA. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: Technical and economical analysis. **The Journal of Supercritical Fluids**, 40(2):232-238, 2006.
- PERRUCHON, S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. **Cosmetics & Toiletries**, 14(6):74, 2002.
- PFISTER, S.; MEYER, P.; STECK, A.; PFANDER. H. Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in Gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(9):2612-2615, 1996.

- PHAM, M. H.; NGUYEN, D. T.; DO, T. D. Isolation and Identification of Scopoletin From Roots of Nho Dong (*Morinda longissima* Y. Z. Ruan, Rubiaceae). **Tap Chi Duoc Hoc**, 45(2):12-13, 2005.
- PHILLIPSON, J.; SUPAVITA, N. Alkaloids of *Uncaria elliptica*. **Phytochemistry**, 22(8): 1809-1813, 1983.
- PHUONG, N. M.; VAN SUNG, T.; SCHMIDT, J.; PORZEL, A.; ADAM, G. Capitelline-A New Indole Alkaloid from *Hedyotis capitellata*. **Natural Product Letters**, 11(2):93-100, 1998.
- PHUONG, N. M.; VAN SUNG, T.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J.; MERZWEILER, K.; ADAM, G. [beta]-Carboline alkaloids from *Hedyotis capitellata*. **Phytochemistry**, 52(8):1725-1729, 1999.
- PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANCA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, 7(4):335-338, 2000.
- PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, 18(6):608-615, 1995.
- PIOVANO, M.; CHAMY, M. C.; GARBARINO, J. A.; NICOLETTI, M. Iridoids from *Cruckshanksia pumila* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 31(10):1201-1203, 2003.
- POWELL, D. B.; PALM, R. C.; MACKENZIE, A. P.; WINTON, J. R. Extremophile extracts and enhancement techniques show promise for the development of a live vaccine against *Flavobacterium columnare*. **Cryobiology**, 59(2):158-163, 2009.
- POZNIAK, A. L.; UTTLEY, A. H. C.; KENT, R. J. *Mycobacterium avium* complex in AIDS: who, when, where, why and how? **Journal of Applied Microbiology**, 81:40S-46S, 1996.
- QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; TANAKA, M.; DUNG, N. X.; ASAKAWA, Y. Iridoid glucosides from roots of Vietnamese *Paederia scandens*. **Phytochemistry**, 60(5):505-514, 2002.
- RAHARIVELOMANANA, P.; BIANCHINI, J. P.; RAMANOELINA, A. R. P.; RASOHARAHONA, J. R. E.; CHATEL, F.; FAURE, R. Structures of Cadinane- and Guaiane-type Sesquiterpenoids from *Enterospermum madagascariensis* (Baill. ) Homolle. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 43(12):1049-1052, 2005.
- RAJAKARUNA, N.; HARRIS, C. S.; TOWERS, G. H. N. Antimicrobial Activity of Plants Collected from *Serpentine Outcrops* in Sri Lanka. **Pharmaceutical Biology**, 40(3):235-44, 2002.

- RAMAN, V.; AVULA, B.; GALAL, A. M.; WANG, Y. H.; KHAN, I. A. (2013). Microscopic and UPLC–UV–MS analyses of authentic and commercial yohimbe (*Pausinystalia johimbe*) bark samples. **Journal of natural medicines**, 67(1(42-50), 2013.
- RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J. V.; LEITÃO, S. G.; SAID Y FERNÁNDEZ, S. L.; SILVA, P. E. A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(4):669-674, 2008.
- RASMUSSEN, L. S.; RANK, C.; JENSEN, S. R. Transfer of iridoid glucosides from host plant *Galium verum* to hemiparasitic *Euphrasia stricta*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 34(10):763-765, 2006.
- RASOANAIVO, P.; MULTARI, G.; FEDERICI, E.; GALEFFI, C. Triterpenoid diglucoside of *Enterospermum pruinosum*. **Phytochemistry**, 39(1):251-253, 1995.
- RATH, G.; NDONZAO, M.; HOSTETTMANN, K. Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae), Colloques - Institut National De La Recherche Agronomique. **Polyphenols**, 69:413-414, 1995.
- RAVEENDRAN, V. V.; VIJAYAN, F. P.; PADIKKALA, J. Antitumor activities of an anthraquinone fraction isolated from in vitro cultures of *Ophiorrhiza rugosa* var *decumbens*. **Integrative Cancer Therapies**, 11(2):120-128, 2012.
- RAYNAUD, C.; ETIENNE, G.; PEYRON, P.; LANÉELLE, M. A.; DAFFÉ, M. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, 144(2):577-587, 1998.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L.; LOHMANN, L.; ASSUNÇÃO, P.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke, Guia de identificação das plantas em uma floresta de terra firme na Amazônia central**, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA) e Department for International Development (DFID), 1999.
- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**, Rio de Janeiro: Editora Âmbito Cultural, 1995.
- ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae, **Opera Botanica Belgica**, 1(272):599-602, 1988.
- ROCKENBACH, J.; NAHRSTEDT, A.; WRAY, V. Cyanogenic glycosides from *Psydrax* and *Oxyanthus* species. **Phytochemistry**, 31(2):567-570, 1992.
- ROFI, R. D.; POMILIO, A. B. 5, 7, 3-Trihydroxy 4, 5-dimethoxyflavone and other phenolics from *Poahueca*. **Phytochemistry**, 24:2131-2132, 1985.

- ROJAS-DURAN, R.; GONZALEZ-ASPAJO, G.; RUIZ-MARTEL, C.; BOURDY, G.; DOROTEO-ORTEGA, V. H.; ALBAN-CASTILLO, J.; ROBERT, G.; AUBERGER, P.; DEHARO, E. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. **Journal of Ethnopharmacology**, 143(3):801-804, 2012.
- ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista Saúde Pública**, 36(4):525-32, 2002.
- RUIZ-MESIA, L.; RUIZ-MESÍA, W.; REINA, M.; MARTÍNEZ-DIAZ, R.; DE INÉS, C.; GUADAÑO, A.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Bioactive cinchona alkaloids from *Remijia peruviana*. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, 53(6):1921-1926, 2005.
- RUKACHAISIRIKUL, V.; NAOVANIT, S.; TAYLOR, W. C.; BUBB, W. A.; DAMPAWAN, P. A. Sesquiterpene From *Gardenia sootepensis*. **Phytochemistry**, 48(1):197-200, 1998.
- RUKACHAISIRIKUL, T.; PRABPAI, S.; CHAMPUNG, P.; SUKSAMRARN, A. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. **Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research**, 68(9):853-855, 2002.
- RUKSILP, T.; SICHAEM, J.; KHUMKRATOK, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Anthraquinones and an iridoid glycoside from the roots of *Morinda pandurifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39:888-892, 2011.
- RUMBERO, A.; VÁSQUEZ, P. Structure and stereochemistry of magniflorine, a new indole alkaloid from *Hamelia magniflora* Wernha, **Tetrahedron Letters**, 32(38):5153-5154, 1991.
- SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA, L. R.; GRAÇA, C. H.; FERREIRA, E.; HAMERSCHLAK, N.; GUERRA, J. C.; BACAL, N. S.; ANDRADE, J. A.; BOROVNIK, C. L. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista Brasileira de Hematologia Hemoter**, 27( 2): 94-101, 2005.
- SAHPAZ, S.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Triterpene saponins from *Randia formosa*. **Phytochemistry**, 54(1):77-84, 2000.
- SAITO, K.; SUDO, H.; YAMAZAKI, M.; KOSEKI-NAKAMURA, M.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N. Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*. **Plant Cell Reports**, 20(3):267-271, 2001.
- SAKAKIBARA, I.; TAKAHASHI, H.; TERABAYASHI, S.; YUZURIHARA, M.; KUBO, M.; ISHIGE, A.; HIGUCHI, M.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; MARUNO, M. Effect of oxindole alkaloids from the hooks of *Uncaria macrophylla* on thiopental-induced hypnosis. **Phytomedicine**, 5(2):83-86, 1998.

- SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I.; MOTIDOME, M. Clastogenic effect of the plant alkaloid ellipticine on bone marrow cells of Wistar rats and on human peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 199(1): 11–19, 1988.
- SALIM, F.; AHMAD, R. Alkaloids from Malaysian *Uncaria longiflora* var, pteropoda. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39:151-152, 2011.
- SALIM, F.; AHMAD, R.; ISMAIL, H.N.; HAZRINA, H.; NG, S.W. Rauniticine-allo-oxindole B methanol monosolvate. **Acta Crystallographica Section E**. 1345, 2001.
- SALKIN, R.; HOSANSKY, N.; JARET, R. Leaf alkaloids of *Rauwolfia nitida*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 50(12):1038–1041, 1961.
- SALUDES, J. P.; GARSON, M. J.; FRANZBLAU, S. G.; AGUINALDO, A. M. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). **Phytotherapy Research**, 16(7):683-685, 2002.
- SAMOYLENKO, V.; ZHAO, J.; DUNBAR, D. C.; KHAN, I. A.; RUSHING, J. W.; MUHAMMAD, I. New constituents from noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, 54(17):6398-6402, 2006.
- SANG, S.; WANG, M.; HE, K.; LIU, G.; DONG, Z.; BADMAEV, V.; ZHENG, Q. Y.; GHAI, G.; ROSEN, R. T.; HO, C. Chemical components in noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L, ) **Acs Symposium Series 803 (Quality Management of Nutraceuticals)**, pp134-150, 2003.
- SARGENT, M. V.; WAHYUNI, F. S. (+)-Isochimonanthine, a Pyrrolidinoindole Alkaloid from *Argostemma yappii* King. **Australian Journal of Chemistry**, 53(2):159-160, 2000.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R.; SIMÕES, C. M. O. Produtos de origem vegetal eo desenvolvimento de medicamentos, In: SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora da UFSC. 15:371-400, 2003.
- SCHINNERL, J.; ORLOWSKA, E. A.; LORBEER, E.; BERGER, A.; BRECKER, L. Alstrofines in Rubiaceae: Alstrofina A from *Chassalia curviflora* var. *ophioxyloides* and a novel derivative, rudgeifoline from *Rudgea cornifolia*. **Phytochemistry Letters**, 5(3):586-590, 2012.
- SCHRIPSEMA, J.; RAMOS-VALDIVIA, A.; VERPOORTE, R. Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. **Phytochemistry**, 51(1):55-60, 1999.
- SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC. p.819-46, 2004.

- SCHWARZ, B.; WRAY, V.; PROKSCH, P. A cyanogenic glycoside from *Canthium schimperianum*. **Phytochemistry**, 42(3):633-636, 1996.
- SEIDEL, V.; TAYLOR, P. W. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 23(6):613-619, 2004.
- SHAMMA, M.; RICHEY, J. M. The stereochemistry of the heteroyohimbine alkaloids. **Journal of American Chemical Society**, 85: 2507-2512, 1963.
- SHELLARD, E. J.; BECKETT, A. H.; TANTIVATANA, P.; PHILLIPSON, J. D.; LE, C. M. Alkaloids from *Mitragyna javanica*, Koord. and Valeton and *Mitragyna hirsuta*, Havil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 18(8):553-555, 1966.
- SHELLARD, E. J.; SARPONG, K. The alkaloids of the leaves of *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 21(S1):113S-117S, 1969
- SHENG-DIAN, H.; YU, Z.; MING-MING, C.; YING-TONG, D.; GUI-HUA, T.; ZONG-GEN, P.; JIAN-DONG, J.; HONG-PING, H.; XIAO-JIANG, H. Myriberine A. a new alkaloid with an unprecedented heteropentacyclic skeleton from *Myrioneuron faberi*. **Organic letters**, 15(3):590-593, 2013.
- SHIN, J. S.; YUN, K. J.; CHUNG, K. S.; SEO, K. H.; PARK, H. J.; CHO, Y. W.; BAEK, N. I.; JANG, D. S.; LEE, K. T. Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* ameliorates proinflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via NF- $\kappa$ B inactivation. **Food and Chemical Toxicology**, 53:263-271, 2013.
- SHIXIU, F.; JIJIANG, B.; SHENGXIANG, Q.; YONG, L.; TAO, C. Iridoid and phenolic glycosides from the roots of *Prismatomeris connata*. **Natural Product Communications**, 7(5):561-562, 2012.
- SHOJI, M.; PARTOMUAN, S.; YOSHIHIDE, M.; CHINAMI, K.; KAZUYOSHI, O.; HIROTAKA, S. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce *Cinchona* alkaloids. **Journal of Natural Medicines**, 67(2):421-423, 2013.
- SICHAEM, J.; SURAPINIT, S.; SIRIPONG, P.; KHUMKRATOK, S.; JONG-ARAMRUANG, J.; TIP-PYANG, S. Two new cytotoxic isomeric indole alkaloids from the roots of *Nauclea orientalis*. **Fitoterapia**, 81(7):830-833, 2010.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 22(1):94-103, 1999.



- SILVA, J. H. S.; LIMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32(12):1227-1229, 2004.
- SILVA, V. C.; SILVA, G.; BOLZANI, V. S.; LOPES, M. N. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum, (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Química**, 31(4):55-58, 2006.
- SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn, em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(4):572-577, 2007.
- SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn, over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(2):209-212, 2008.
- SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**, Nobel, 1985.
- SIMKIN, A. J.; KUNTZ, M.; MOREAU, H.; MCCARTHY, J. Carotenoid profiling and the expression of carotenoid biosynthetic genes in developing coffee grain. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48(6):434-442, 2010
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
- SINGH, B.; SINGH, S. Antibacterial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytotherapy Research**, 17(7):814-816, 2003.
- SIVA, R.; MAYES, S.; BEHERA, S. K.; RAJASEKARAN, C. Anthraquinones dye production using root cultures of *Oldenlandia umbellata* L. **Industrial Crops and Products**, 37(1):415-419, 2012.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, 16(3):463-496, 2003.
- SOARES, P. R. O.; OLIVEIRA, P. L.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; GUILLO, L. A. In vitro antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, 35(3):565-571, 2012.
- SOLÍS, P. N.; RAVELO, A. G.; ANTONIO PALENZUELA, J.; GUPTA, M. P.; GONZÁLEZ, A.; DAVID PHILLIPSON, J. Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*. **Phytochemistry**, 44(5):963-969, 1997.
- SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. **Phytochemistry**, 33(5):1117-1119, 1993.

- SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L.; VENCATO, I.; MASCARENHAS, Y. P. Triterpenoids from *Guettarda angelica*. **Phytochemistry**, 23(11):2589-2592, 1984.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; BELÉM-PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, 34(2):185-95, 2004.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 704pp. 2008.
- SPERANZA, G.; DADA, G.; MANITTO, P.; MONTI, D.; GRAMATICA, P. 13-cis-crocin: a new crocinoid of saffron. **Gazzetta Chimica Italiana**, 114:189-192, 1984.
- SRIVASTAVA, S. K.; AGRAWAL, A. K.; SINGH, S. C.; KHANNA, V. K.; SINGH, J.; NATH, C.; GUPTA, M. M.; GUPTA S.; VERMA, R. K.; PAL, A.; BAWANKULE, D. U.; SAIKIA, D.; GUPTA, A. K.; MAURYA, A.; KHANUJA, S. P. S. Antipsychotic Agents and Standardized Antipsychotic Fractions from *Rauwolfia tetraphylla* and Process of Their Isolation. U.S. **Patent Application** 13/262, 040, 31 mar. 2010.
- STAERK, D.; LEMMICH, E.; CHRISTENSEN, J.; KHARAZMI, A.; OLSEN, C. E.; JAROSZEWSKI, J. W. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. **Planta Médica**, 66(6):531-536, 2000.
- SU, B. N.; KANG, Y. H.; PINOS, R. E.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; SOEJARTO, D. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Isolation and absolute stereochemistry of coussaric acid, a new bioactive triterpenoid from the stems of *Coussarea brevicaulis*. **Phytochemistry**, 64(1):293-302, 2003.
- SUDARSONO, Asperuloside, an Iridoid Substance in *Hedyotis corymbosa* (L, ) Lamk, (Oldenlandia Corymbosa Linn, ), Family Rubiaceae. **Majalah Farmasi Indonesia**, 10(3):163-174, 1999.
- SUDARSONO, Distribution of Asperuloside, Scandoside Methyl Ester in Plant Organs of *Hedyotis corymbosa* (L, ) Lamk (Oldenlandia Corymbosa Linn) of Rubiaceae Family. **Majalah Farmasi Indonesia**, 15(2):62-67, 2004.
- SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T.; KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal of ethnopharmacology**, 88(2):275-277, 2003.
- SUN, J.; LOU, H.; DAI, S.; XU, H.; ZHAO, F.; LIU, K. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. **Phytochemistry**, 69(6):1405-1410, 2008.

- SUZUKI, S.; ENDO, Y. Studies on the Constituents of the Fruits of *Paederia scandens*, Structure of A New Iridoid, Paederia lactone. **Journal of Tohoku Pharmaceutical University**, 51:17-21, 2004.
- SWENSON, J. M.; WALLACE JR, R.; SILCOX, V. A.; THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility of five subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 28(6):807-811, 1985.
- TAKAYAMA, H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant, *Mitragyna speciosa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 52(8):916-928, 2004.
- TAKEDA, Y.; SHIMIZU, H.; MASUDA, T.; HIRATA, E.; SHINZATO, T.; BANDO, M.; OTSUKA, H. Lasianthionosides AC, megastigmane glucosides from leaves of *Lasianthus fordii*. **Phytochemistry**, 65(4):485-489, 2004.
- TALLENT, W. H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron**, 20(7):1781-1787, 1964.
- TAO, J. Y.; DAI, S. J.; ZHAO, F.; LIU, J. F.; FANG, W. S.; LIU, K. New ursane-type triterpene with NO production suppressing activity from *Nauclea officinalis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 14(2):97-104, 2012.
- TAYLOR, C. M. J. A.; STEYERMARK, P. G.; DELPRETE, A.; VINCENTINI, R.; CORTÊS, D.; ZAPPI, C.; PERSSON, C. B.; COSTA, E. J. A.; STEYERMARK, J. S.; STEYERMARK, P. E.; BERRY, B. K. Rubiaceae, Flora of the Venezuelan Guayana. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 8:497-848, 2004.
- TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Zappi Rodriguésia**, 58(3):549-616, 2007.
- TEIXEIRA, J. B. A.; NOGUEIRA, M. S. Câncer gástrico: fatores de risco em clientes atendidos nos serviços de atenção terciária em um município do interior paulista. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 11( 1): 43-8, 2003.
- TESTA, G.; OLIVEIRA, P. R. N.; SILVA, CLEUZA, C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M., A.; ARRUDA, L. L. M.; BERSANI-AMADO, C. A. Chemical constituents of the leaves and anti-inflammatory activity evaluation of extracts of roots and leaves of *Guettarda pohliana* Mull. Arg. (Rubiaceae). **Química Nova**, 35(3):527-529, 2012.
- TIGOUFACK, I. B. N.; NGNOKAM, D.; TAPONDJOU, L. A.; HARAKAT, D.; VOUTQUENNE, L. Cycloartane glycosides from leaves of *Oxyanthus pallidus*. **Phytochemistry**, 71(17):2182-2186, 2010.
- TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S. M.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. S.; CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18( 1): 47-52, 2008.

- TUCHINDA, P.; SAI, A.; POHMAKOTR, M.; YOOSOOK, C.; KASISIT, J.; NAPASWAT, C.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V. Anti-HIV-1 cycloartanes from leaves and twigs of *Gardenia thailandica*. **Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research**, 70(4):366-369, 2004.
- UDDIN, N.; HOSSAIN, M. K.; HAQUE, M. R.; HASAN, C. M. Chemical investigation of *Paederia foetida* (Rubiaceae). **Asian Journal of Chemistry**, 25(2):1163-1164, 2013.
- VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. [beta]-Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochemistry**, 52(8):1485-1489, 1999.
- VAN DE SANTOS, L.; FETT NETO, A. G.; KERBER, V. A.; ELISABETSKY, E.; QUIRION, J. C.; HENRIQUES, A. T. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Mull, Arg, (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 29(11):1185-1187, 2001.
- VEROTTA, L.; PILATI, T.; TATÒ, M.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of Natural Products**, 61(3):392-396, 1998.
- VERPOORTE, R.; PUIGROK, C. L. M.; BERARHEIM, S. A. Medicinal plants of Surinam. II- Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**, 46:149-52, 1982.
- VERPOORTE, R.; PUIGROK, C. L. M.; BERARHEIM, S. A. Medicinal plants of Surinam. **Planta Medica**, 48:283-9, 1983.
- VERSIANI, M. A., IKRAM, A., KHALID, S., FAIZI, S., & TAHIRI, I. A. Ixoroid: a new triterpenoid from the flowers of *Ixora coccinea*. **Natural Product Communications**, 7(7):831, 2012.
- VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 29(2):326-337, 2006.
- VON POSER, G. L.; TERRA SEIBT, L. Gardenoside from *Tocoyena bullata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 26(6):669-670, 1998.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2, Springer Verlag, 2001.
- WEI, X.; XIE, H.; GE, X.; ZHANG, F. Iridoids from *Dunnia sinensis*. **Phytochemistry**, 53(8):837-840, 2000.
- WEI-MIN, Z.; JUN-PING, X.; GUO-WEI, Q.; REN-SHENG, X. Two monoterpenes from fruits of *Gardenia jasminoides*. **Phytochemistry**, 37(4):1079-1081, 1994.
- WENIGER, B.; ANTON, R.; VAREA, T.; QUIRION, J. C.; BASTIDA, J.; GARCIA, R. Indole alkaloids from *Antirhea portoricensis*. **Journal of natural products**, 57(2):287-290, 1994.

- WENIGER, B.; JIANG, Y.; ANTON, R.; BASTIDA, J.; VAREA, T.; QUIRION, J. C. Oxindole alkaloids from *Neolaugeria resinosa*. **Phytochemistry**, 32(6):1587-1590, 1993.
- WENIGER, B.; RAFIK, W.; BASTIDA, J.; QUIRION, J. C.; ANTON, R. Indole alkaloids from *Antirhea lucida*. **Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research**, 61(6):569-569, 1995.
- WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B.; VONTHORON-SÉNÉCHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J.; BARAM, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytotherapy Research**, 19:75-77, 2005.
- WENKERT, E.; CHANG, C. J.; CHAWLA, H. P. S.; COCHRAN, D. W.; HAGAMAN, E. W.; KING, J. C.; ORITO, K. General methods of synthesis of indole alkaloids. Short routes of construction of yohimboid and ajmalicinoid alkaloid systems and their C-13 Nuclear Magnetic-Resonance spectral analysis. **Journal of the American Chemical Society**, 98(12):3645-3655, 1976.
- WENKERT, E.; LEICHT, C. L.; WICKBERG, B., Stereochemistry of ajmalicine and tetrahydroalstonine. **Journal of the American Chemical Society**, 83(24): 5037, 1961.
- WHITE, R. J.; MARGOLIS, P. S.; TRIAS, J.; YUAN, Z. Targeting metalloenzymes: a strategy that works. **Current Opinion in Pharmacology**, 3(5):502-507, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. **Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing, WHO report**: 303 P. 2009.
- WU, L. J.; WANG, S. X.; HUA, H. M.; LI, X.; ZHU, T. R.; MIYASE, T.; UENO, A. 6-Methoxygeniposidic acid, an iridoid glycoside from *Rubia cordifolia*. **Phytochemistry**, 30(5):1710-1711, 1991.
- WYNANTS, C.; TOPPET, S.; KILONDA, A.; HOORNAERT, G. Two triterpenoid saponins from *Heinsia crinata*. **Phytochemistry**, 36(6):1489-1492, 1994.
- XIE, S.; SHI, Y.; WU, C.; WANG, Y.; LIU, W.; FENG, F.; XIE, N. Systematic identification and quantification of tetracyclic monoterpene oxindole alkaloids in *Uncaria rhynchophylla* and their fragmentations in Q-TOF-MS spectra. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 81-82:56-64, 2013.
- XIN, W. B.; CHOU, G. X.; WANG, Z. T. Bis (monoterpenoid) indole alkaloid glucosides from *Uncaria hirsuta*, **Phytochemistry Letters**, 4:380-382, 2011.
- XIN W.B., GU P., CHOU G.X., WANG Z. T. Studies on alkaloidal constituents in leaves of *Uncaria hirsuta*. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 33(17):2124-2128, 2008.
- XU, Y. J.; FOUBERT, K.; DHOOGHE, L.; LEMIÈRE, F.; CIMANGA, K.; MESIA, K.; APERS, A.; PIETERS, L. Chromatographic profiling and identification of

two new iridoid-indole alkaloids by UPLC–MS and HPLC-SPE-NMR analysis of an antimalarial extract from *Nauclea pobeguinii*. **Phytochemistry Letters**, 5(2):316-319, 2012.

- YA-FANG, H.; CHEN, C.; KE-YI, D.; LIU, J. Research on color-forming property of three sulfur-containing iridoid-glucoside from *Paederia scandens* (Lour) Merrill (Rubiaceae) with amine-containing compounds I. preparation of iridoids, color-formation condition and property. **Pige Kexue Yu Gongcheng**, 23(1):5-10, 2013.
- YAMAZAKI, M.; MOCHIDA, K.; ASANO, T.; NAKABAYASHI, R.; CHIBA, M.; UDOMSON, N.; YAMAZAKI, Y.; GOODENOWE, D. B.; SANKAWA, U.; YOSHIDA, T.; TOYODA, A.; TOTOKI, Y.; SAKAKI, Y.; GÓNGORA-CASTILLO, E.; BUELL, C. R.; SAKURAI, T.; SAITO, K. Coupling Deep Transcriptome Analysis with Untargeted Metabolic Profiling in *Ophiorrhiza pumila* to Further the Understanding of the Biosynthesis of the Anti-Cancer Alkaloid Camptothecin and Anthraquinones. **Plant Cell Physiology**, 54(5):686-696, 2013
- YANG, L.; PENG, K.; ZHAO, S.; CHEN, L.; QIU, F. Monoterpenoids from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 50:435-437, 2013a.
- YANG, L.; PENG, K.; ZHAO, S.; ZHAO, F.; CHEN, L.; QIU, F. 2-Methyl-1-erythritol glycosides from *Gardenia jasminoides*. **Fitoterapia**, 89:126-130, 2013b.
- YÉPEZ, A. M. P.; DE UGAZ, O. L.; ALVAREZ, C. M. P.; DE FEO, V.; AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. Quinovic acid glycosides from *Uncaria guianensis*. **Phytochemistry**, 30(5):1635-1637, 1991.
- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(8):4083-4089, 2001.
- YOKOSUKA, A.; SATO, K.; MIMAKI, Y. Cycloartane glycosides from the rhizomes of *Curculigo orchioides*. **Phytochemistry**, 71(17):2174-2181, 2010.
- YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Emetic alkaloid formation in root culture of *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, 30(2):505-507, 1991.
- ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, 2(1):47-50, 1995.
- ZENG, D.; CHEN, L.; XU, H.; YANG, K. Antifeedant activity of *Catunaregam spinosa* fruit extracts against *Plutella xylostella*. **Journal of South China Agricultural University**, 28, 2005.

- ZHAO, W.; XU, J.; QIN, G.; XU, R. Saponins from *Mussaenda pubescens*. **Phytochemistry**, 39(1):191-193, 1995.
- ZHAO, W.; YANG, G.; XU, R.; QIN, G. Three monoterpenes from *Mussaenda pubescens*. **Phytochemistry**, 41(6):1553-1555, 1996.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, 49(11):5165-5170, 2001.
- ZHI-JUN, W.; JIAN-HUA, W.; DONG-MEI, F.; GUO-LIN, Z. Analysis of iridoid glucosides from *Paederia scandens* using HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of chromatography. B.**, 923-924:54-64, 2013.
- ZHOU, Z.; JIANG, S. H.; ZHU, D. Y.; LIN, L. Z.; A CORDELL, G. Anthraquinones from *Knoxia valerianoides*. **Phytochemistry**, 36(3):765-768, 1994.
- ZULETA, L. M. C. **Estudos Químicos e Biológicos das Cascas de *Calycophyllum Spruceanum* Benth**, Dissertação de Mestrado. Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 68pp.,1997.
- ZULETA, L. M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 64(2):549-553, 2003.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1** - Relação das classes de substâncias caracterizadas em espécies da família Rubiaceae (de 1990 a 2013)\*.

<b>Espécie</b>	<b>Composto (s)</b>	<b>Referência (s)</b>
<i>Adina cordifolia</i>	Cumarinas	IQBAL <i>et al.</i> , 2009
<i>Adina rubella</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. oleanólicos	FAN e HE., 1997
	Triterpenos pentacíclicos glicosilados	HE <i>et al.</i> , 1996
<i>Alberta magna</i>	Iridoides: iridolactonas Ciclopentenos dialdeídicos	DREWES <i>et al.</i> , 1998
<i>Alangium lamarckii</i>	Alcaloides de Ipeca	ITOH <i>et al.</i> , 1999b
<i>Alibertia myrciifolia</i>	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólico e ursólico Flavonoides: flavonas Cumarinas metoxiladas	LUCIANO <i>et al.</i> , 2004
<i>Anthocephalus cadamba</i>	Esteroides	AUGUSTA <i>et al.</i> , 1998
<i>Anthocephalus chinensis</i>	Iridoides e <i>seco</i> -iridoide glicosilado Apiglicosídeos fenólicos Alcaloides indólicos	KITAGAWA <i>et al.</i> , 1996
<i>Antirhea acutata</i>	Triterpeno-metilesteres: nor- <i>seco</i> -cicloartano	LEE <i>et al.</i> , 2001
<i>Antirhea lucida</i>	Alcaloides indólicos	WENIGER <i>et al.</i> , 1995
<i>Antirhea portoricensis</i>	Alcaloides indólicos	WENIGER <i>et al.</i> , 1994
<i>Argostemma yappii</i>	Alcaloides pirrolidinoindólicos	SARGENT e WAHYUNI, 2000
<i>Borreria verticillata</i>	Alcaloides bis-indólicos	BALDE <i>et al.</i> , 1991b
<i>Burchellia bubalina</i>	Iridoides	DREWES <i>et al.</i> , 1998
<i>Calycophyllum spruceanum</i>	<i>seco</i> -Iridoides glicosilados	ZULETA <i>et al.</i> , 2003
<i>Camptotheca acuminata</i>	Alcaloides: der. da camptotecina e camptotecina	LORENCE <i>et al.</i> , 2004



<i>Canthium berberidifolium</i>	Iridoides glicosilados Fenólicos diglicosilados	KANCHANAPOOM <i>et al.</i> , 2002a
<i>Canthium multiflorum</i>	Monoterpenos	FOGUE <i>et al.</i> , 2013
<i>Canthium schimperianum</i>	Glicosídeo cianogênico esterificados com iridoides glicosilados	SCHWARZ <i>et al.</i> , 1996
<i>Carapichea affinis</i>	Alcaloides e Iridoides	BERNHARD <i>et al.</i> , 2011
<i>Catunaregam nilótica</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. oleanólicos	LEMMICH <i>et al.</i> , 1995
<i>Catunaregam spinosa</i>	Saponinas triterpênicas	GAO <i>et al.</i> , 2011
<i>Cephaelis acuminata</i>	Monoterpenos tetraidroisoquinolínico glicosilado	ITOH <i>et al.</i> , 2002
	Alcaloides eméticos	ITOH <i>et al.</i> , 1999a
<i>Cephaelis acuminata</i>	Alcaloides de Ipeca	ITOH <i>et al.</i> , 1999b
<i>Cephaelis alba</i>	Iridoides <i>seco</i> -Iridoide	CARBONEZI <i>et al.</i> , 1999
<i>Cephaelis dichroa</i>	Alcaloides indólicos	SOLIS <i>et al.</i> , 1993
	Alcaloides indólicos glicosilados	
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Monoterpenos tetraisoquinolínicos glicosilados	ITOH <i>et al.</i> , 1994
	Alcaloides eméticos	YOSHIMATSU <i>et al.</i> , 1991
	<i>Nor-seco</i> -pimarano	ARGAEZ <i>et al.</i> , 2001
	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólicos	BHATTACHARYYA <i>et al.</i> , 1992
	Alcaloides quinolínicos	EL ABBADI <i>et al.</i> , 1989
<i>Cephalanthus glabratus</i>	Alcaloides oxindólico	JORGE <i>et al.</i> , 2006
<i>Chassalia curviflora var. ophioxyloides</i>	Alcaloides indólicos monoterpênicos	SCHINNERL <i>et al.</i> , 2012
<i>Chiococca alba</i>	Saponinas	BORGES <i>et al.</i> , 2013
	Cetoalcoois Fenilcumarinas Lignanas	EL-HAFIZ <i>et al.</i> , 1991
	Flavonoides Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólico e ursólico	BOLZANI <i>et al.</i> , 2001

<i>Chione venosa</i>	Acetofenonas Iridoides glicosilados Triterpenos tetracíclicos	LENDL <i>et al.</i> , 2005
<i>Cinchona ledgeriana</i>	Alcaloides cinchona	SHOJI <i>et al.</i> , 2013
	Alcaloides cinchona	MAEHARA <i>et al.</i> , 2012
<i>Cinchona robusta</i>	Antraquinonas Der. de fenilpropanoides	SCHRIPSEMA <i>et al.</i> , 1999
<i>Coffea</i> sp	Alcaloides púricos	ASHIHARA <i>et al.</i> , 2008
<i>Coffea bengalensis</i>	Alcaloide: cafeína Diterpeno (16-epicafestol)	BEGUM <i>et al.</i> , 2003
<i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea arabica</i>	Carotenoides	SIMKIN <i>et al.</i> , 2010
<i>Corynanthe pachyceras</i>	Alcaloides indólicos	STAERK <i>et al.</i> , 2000
<i>Coussarea brevicaulis</i>	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólico e ursólico	SU <i>et al.</i> , 2003
<i>Coussarea hydrangeifolia</i>	Der. glicosilados de fenilpropanoides	HAMERSKI <i>et al.</i> , 2005 <sup>a</sup>
<i>Crossopteryx febrifuga</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: derivado ursólico	NGALAMULUME <i>et al.</i> , 1991
<i>Crotalaria emarginella</i>	Triterpenos	AHMED <i>et al.</i> , 2006
<i>Crucianella graeca</i> <i>Cruciata glabra</i> <i>Cruciata laevipes</i> <i>Cruciata pedemontana</i>	Cumarinas e Iridoides	MITOVA <i>et al.</i> , 1996a
<i>Crucianella marítima</i>	Antraquinonas	EL-LAKANY <i>et al.</i> , 2004
<i>Cruckshanksia pumila</i>	Iridoides Secologanina	PIOVANO <i>et al.</i> , 2003
<i>Curculigo orchioides</i>	Glicosideos cicloartano	YOKOSUKA <i>et al.</i> , 2010
<i>Damnacanthus indicus</i>	Antraquinonas	KOYAMA <i>et al.</i> , 1992a
	triterpenos	CAI e HUANG, 2012

<i>Deppea blumenaviensis</i>	Alcaloide $\beta$ -carbolínico	KAN-FAN <i>et al.</i> , 1995
<i>Dunnia sinensis</i>	Iridoides glicosilados	WEI <i>et al.</i> , 2000
<i>Duroia hirsuta</i>	Iridoide lactona	PAGE <i>et al.</i> , 1994
<i>Enterospermum madagascariensis</i>	Sesquiterpenos: der. cadinano e guaiano	RAHARIVELOMANANA <i>et al.</i> , 2005
<i>Enterospermum pruinatum</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. oleanólicos	RASOANAIVO <i>et al.</i> , 1995
<i>Exostema acuminatum</i>	<i>nor</i> -Diterpenos 4-Fenilcumarinas	ITO <i>et al.</i> , 2000
<i>Fadogia agrestis</i>	Monoterpenos glicosilados	ANERO <i>et al.</i> , 2008
<i>Fadogia homblei</i>	Cumarinas Flavonas Triterpenos Lignanas	MOHAMMED <i>et al.</i> , 2013
<i>Fernelia buxifolia</i>	Fenóis	NEERGHEENA <i>et al.</i> , 2006
<i>Galianthe brasiliensis</i>	Iridoides glicosídeos	MOURA <i>et al.</i> , 2005
<i>Galianthe thalictroides</i>	Alcaloides indólicos monoterpênicos	FERNANDES <i>et al.</i> , 2013
<i>Galium álbum</i>	Iridoides glicosilados: der. Acetoxiloganina	HANDJIEVA <i>et al.</i> , 1996
<i>Galium lovcense</i>	Iridoides glicosilados: der. Acetoxiloganina	HANDJIEVA <i>et al.</i> , 1996
<i>Galium incurvum</i>	Iridoides glicosilados	MITOVA <i>et al.</i> , 1996b
<i>Galium macedonicum</i>	Iridoides: macedonina não glicosilada	MITOVA <i>et al.</i> , 1996c
<i>Galium sinaicum</i>	Antraquinonas, Antraquinonas glicosiladas	EL-GAMAL <i>et al.</i> , 1996
<i>Galium verum</i>	Antraquinonas	BANTHORPE <i>et al.</i> , 1995
	Iridoides glicosilados	RASMUSSEN <i>et al.</i> , 2006
<i>Gardenia collinsae</i>	Triterpenos	NUANYAI <i>et al.</i> , 2011
<i>Gardenia jasminoides</i>	Iridoides glicosilados	CHEN <i>et al.</i> , 2009
	Ácido ferrulíco	MOON <i>et al.</i> , 2002
	Iridoides glicosilados	LEE <i>et al.</i> , 1998
	Monoterpenos	WEI-MIN <i>et al.</i> , 1994

	Substâncias voláteis	BUCHBAUER <i>et al.</i> , 1996
	Monoterpenos	YANG <i>et al.</i> , 2013a
	Iridoides glicosilados	YANG <i>et al.</i> , 2013b
<i>Gardenia saxatilis</i>	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólico e ursólico	SUKSAMRARN <i>et al.</i> , 2003
<i>Gardenia sootepensis</i>	Sesquiterpeno Flavonoides: flavonas Der. do ácido benzoico	RUKACHAISIRIKUL <i>et al.</i> , 1998
<i>Gardenia thailandica</i>	Cicloartano	TUCHINDA <i>et al.</i> , 2004
<i>Gardenia fructus</i>	Monoterpenos glicosilados	AKIHISA <i>et al.</i> , 2012
<i>Genipa americana</i>	Iridoides glicosilados	ONO <i>et al.</i> , 2006
<i>Guettarda noumeana</i>	Alcaloides quinolínicos	MONTAGNAC <i>et al.</i> , 1997
<i>Guettarda pohliana</i>	Monoterpenos e triterpenos	TESTA <i>et al.</i> , 2012
<i>Hamelia magniflora</i>	Alcaloides indólicos	RUMBERO <i>et al.</i> , 1991
<i>Hamelia patens</i>	Alcaloide oxindólico monoterpênico	PANIAGUA-VEGA <i>et al.</i> , 2012
<i>Hedyotis</i>	Alcaloides <i>bis</i> - indólico	LAJIS E AHMAD, 2006
<i>Hedyotis capitellata</i>	Furanoantraquinonas	AHMAD <i>et al.</i> , 2005
	Alcaloides, saponinas, taninos e antranoides	LAI <i>et al.</i> , 2001
	Alcaloides s-carbolínicos	PHUONG <i>et al.</i> , 1999
	Alcaloides indólicos monoterpênicos	PHUONG <i>et al.</i> , 1998
<i>Hedyotis chrysotricha</i>	Alcaloides s-carbolínico	PENG <i>et al.</i> , 1997
<i>Hedyotis corymbosa</i>	Der. asperulosídeos e scandosídeos	SUDARSONO, <i>et al.</i> , 2004
	Iridoides	SUDARSONO, <i>et al.</i> , 1999
<i>Hedyotis difusa</i>	Iridoides glicosilados	XU <i>et al.</i> , 2010
<i>Hedyotis hedyotideia</i>	Iridoides	PENG <i>et al.</i> , 1998
<i>Hedyotis herbácea</i>	Flavonoides	HAMZAH <i>et al.</i> , 1996
<i>Hedyotis nudicaulis</i>	Saponinas triterpênicas: der. oleanólicos	KONISHI <i>et al.</i> , 1998
<i>Heinsia crinata</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados	WYNANTS, <i>et al.</i> , 1994

<i>Heterophyllaea pustulata</i>	Antraquinonas	NÚÑEZ-MONTOYA <i>et al.</i> , 2005
	Antraquinonas	KONIGHEIM <i>et al.</i> , 2012
<i>Hintonia latiflora</i>	Fenilcumarinas Fenilestireno	MATA <i>et al.</i> , 1992
<i>Hymenodictyon floribundum</i>	Glicosídeos: der. da scopoletina e f <sup>Δ</sup> -sitosterol	MITAINE-OFFER <i>et al.</i> , 2003
<i>Isertia haenkeana</i>	Alcaloides indólicos	BRUIX <i>et al.</i> , 1993
<i>Ixora coccínea</i>	Triterpeno pentacíclico: der. ursólico	LATHA <i>et al.</i> , 2001
	Protocianinas	IDOWU <i>et al.</i> , 2010
	Iridoides	VERSIANI <i>et al.</i> , 2012 IKRAM <i>et al.</i> , 2013
<i>Knoxia valerianoides</i>	Antraquinonas	ZHOU <i>et al.</i> , 1994
<i>Lasianthus fordii</i>	Megastigmane glicosídeos Iridoides glicosilados Megastigmane glicosídeos Iridoides glicosilados	TAKEDA <i>et al.</i> , 2004
<i>Lasianthus gardneri</i>	Triterpenos tetracíclicos: der. <i>seco</i> -lupanos	DALLAVALLE <i>et al.</i> , 2004
<i>Lerchea bracteata</i>	Alcaloide corinantano quaternário	ARBAIN <i>et al.</i> , 1993
<i>Margaritopsis cymuligera</i>	Alcaloides pirrolidinoindoline	BRAND <i>et al.</i> , 2012
<i>Mitracarpus frigidus</i>	Compostos naftoquinônicos	FABRI <i>et al.</i> , 2012
<i>Mitracarpus scaber</i>	Hidroquinona diglicosídeo	HAROUNA <i>et al.</i> , 1995
	Substâncias voláteis: ácidos	EKPENDU <i>et al.</i> , 1993
<i>Mitracarpus villosus</i>	Fitoesteróis Triterpeno pentacíclico: der. ursólico	EKPENDU <i>et al.</i> , 2001
<i>Mitragyna inermis</i>	27-Nor-triterpenos glicosilados: der. oleanólico	CHENG <i>et al.</i> , 2002
	Alcaloides indólicos	DONFACK <i>et al.</i> , 2012
<i>Mitragyna parvifolia</i>	Alcaloides oxindólicos	PANDEY <i>et al.</i> , 2006
<i>Mitragyna rotundifolia</i>	Saponinas triterpênicas	KANG e HAO, 2006
<i>Mitragyna speciosa</i>	Alcaloides indólicos	TAKAYAMA <i>et al.</i> , 2004

<i>Molopanthera paniculata</i>	Iridoides glicosilados	KATO <i>et al.</i> , 2012
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinonas glicosiladas	KAMIYA <i>et al.</i> , 2009
	Antraquinonas	HEMWIMON <i>et al.</i> , 2007
	Ácidos graxos glicosilados	KIM <i>et al.</i> , 2010
	Constituintes apolares: E-phitol, der. cicloartano, stigmasterol e sitosterol, cetoesteroides	SALUDES <i>et al.</i> , 2002
	Iridoides glicosilados	SANG <i>et al.</i> , 2003
	Antraquinonas	BASSETTI <i>et al.</i> , 1995
<i>Morinda coreia</i>	Iridoides glicosilados Fenolicos diglicosilados Seco-iridoides Antraquinonas glicosiladas	KANCHANAPOOM <i>et al.</i> , 2002b
<i>Morinda elliptica</i>	Antraquinonas	ABDULLAH <i>et al.</i> , 1998 ISMAIL <i>et al.</i> , 1997 CHIANG e ABDULLAH, 2007
<i>Morinda longíssima</i>	Scopoletina	PHAM <i>et al.</i> , 2005
<i>Morinda lucida</i>	Antraquinonas	RATH <i>et al.</i> , 1995
<i>Morinda morindoides</i>	Flavonoides O-glicosilados	CIMANGA <i>et al.</i> , 1995
	Flavonoides e iridoides	CIMANGA <i>et al.</i> , 2006
	Flavonoides e saponinas	CIMANGAA <i>et al.</i> , 2010
<i>Morinda officinalis</i>	Monoterpenos	SHIN <i>et al.</i> , 2013
	Antraquinonas	LIU <i>et al.</i> , 2012a
<i>Morinda pandurifolia</i>	Antraquinonas e iridoide glicosilado	RUKSILP <i>et al.</i> , 2011
<i>Morinda pubescens</i>	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólicos e der. oleanólicos glicosilados	SAMOYLENKO <i>et al.</i> , 2006
<i>Morinda umbellata</i>	Antraquinonas	CHANG e CHENG, 1995
<i>Mussaenda incana</i>	Iridolactona e Iridoide glicosilado	DINDA <i>et al.</i> , 2005

<i>Mussaenda roxburghii</i>	Iridoides	CHANDRA <i>et al.</i> , 2012
<i>Mussaenda pubescens</i>	Lactonas monoterpênicas	ZHAO <i>et al.</i> , 1996
	Saponinas triterpênicas: der. oleanólicos	ZHAO <i>et al.</i> , 1995
<i>Myonima obovata</i>	Fenois	NEERGHEENA <i>et al.</i> , 2006
<i>Myonima nitens</i>	Fenois	NEERGHEENA <i>et al.</i> , 2006
<i>Myrioneuron faberi</i>	Alcaloides carbolínicos indólicos	SHENG-DIAN <i>et al.</i> , 2013
<i>Nauclea diderrichii</i>	Saponinas triterpênicas: der. oleanólicos	LAMIDI <i>et al.</i> , 1995
	Alcaloides gluco-indólicos	LAMIDI <i>et al.</i> , 2005
<i>Nauclea latifolia</i>	Alcaloides indólicos	AGOMUOH <i>et al.</i> , 2013
<i>Nauclea officinalis</i>	Alcaloides indólicos	SUN <i>et al.</i> , 2008
	Alcaloides indólicos	LIEW <i>et al.</i> , 2012
	Triterpenos	TAO <i>et al.</i> , 2012
<i>Nauclea orientalis</i>	Alcaloides monoterpênico tetraidro-f $\Delta$ -carbolínicos glicosilados triterpenos pentacíclicos: der. oleanólicos	HE <i>et al.</i> , 2005
	Alcaloides indólicos	SICHAEM <i>et al.</i> , 2010
<i>Nauclea pobeguinii</i>	Alcaloides indólicos	XU <i>et al.</i> , 2012
	Iridoides	
	Nauclequiniina Alcaloides indólico	ANAM <i>et al.</i> , 1997
<i>Nematostylis anthophylla</i>	Saponinas	DAI <i>et al.</i> , 2013
<i>Neolaugeria resinosa</i>	Alcaloides oxindólicos	WENIGER <i>et al.</i> , 1993
<i>Neonauclea purpurea</i>	Alcaloides quinolínicos	KARAKET <i>et al.</i> , 2012
	Alcaloides indólicos	KARAKET <i>et al.</i> , 2012
<i>Neonauclea sessilifolia</i>	Seco-iridoides glicosilados e alcaloides indólicos glicosilados	ITOH <i>et al.</i> , 2003b
	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólicos	KANG <i>et al.</i> , 2003
	Saponinas triterpênicas: der. oleanólicos	ITOH <i>et al.</i> , 2003b
<i>Ochreinauclea maingayii</i>	Alcaloides indólicos	MUKHTAR <i>et al.</i> , 2012

<i>Oldenlandia corymbosa</i>	Iridoides glicosilados	OTSUKA <i>et al.</i> , 1991
<i>Oldenlandia difusa</i>	Triterpenos pentacíclicos: der. ursólicos	KIM <i>et al.</i> , 1998
	Triterpenos pentacíclicos: der. ursólicos e oleanólicos	LU <i>et al.</i> , 1996
<i>Oldenlandia filistipula</i>	Alcaloides normalindina	ARBAIN <i>et al.</i> , 1993
<i>Oldenlandia umbellata</i>	Antraquinonas	SIVA <i>et al.</i> , 2012
<i>Ophiorrhiza blumeana</i>	Alcaloides indólicos	ARBAIN <i>et al.</i> , 1998a
<i>Ophiorrhiza bracteata</i>	Alcaloide glucoindólico quaternário	ARBAIN <i>et al.</i> , 1997a
<i>Ophiorrhiza communis</i>	Alcaloides indólicos	ARBAIN <i>et al.</i> , 1997b
<i>Ophiorrhiza hayatana</i>	Antraquinonas	CHAN <i>et al.</i> , 2005
<i>Ophiorrhiza kunstleri</i>	Alcaloides indólicos	ARBAIN <i>et al.</i> , 2000
<i>Ophiorrhiza liukuensis</i>	Monoterpenos glicosilados	KITAJIMA <i>et al.</i> , 2005
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Alcaloides: der. camptotecinas	SAITO <i>et al.</i> , 2001
	Antraquinonas	KITAJIMA <i>et al.</i> , 1998
	Antraquinona Alcaloides	YAMAZAKI <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiorrhiza rosácea</i>	Alcaloides indólicos	ARBAIN <i>et al.</i> , 2000
<i>Ophiorrhiza rugosa var decumbens</i>	Antraquinonas	RAVEENDRAN <i>et al.</i> , 2012
<i>Ophiorrhiza trichocarpon</i>	Alcaloides indólicos	KITAJIMA <i>et al.</i> , 2013
<i>Oxyanthus pallidus</i>	Glicosídeos cicloartano	TIGOUFACK <i>et al.</i> , 2010
<i>Paederia foetidae</i>	Ácido fenólico	UDDIN <i>et al.</i> , 2013
<i>Paederia scandens</i>	Iridoides	SUZUKI e ENDO, 2004
	Iridoides glicosilados	QUANG <i>et al.</i> , 2002
	Iridoides glicosilados	ZHI-JUN <i>et al.</i> , 2013
	Iridoides glicosilados	YA-FANG <i>et al.</i> , 2013
	Iridoides glicosilados	LIU <i>et al.</i> , 2012b
<i>Palicourea acuminata</i>	Alcaloide Iridoide	BERGER <i>et al.</i> , 2012



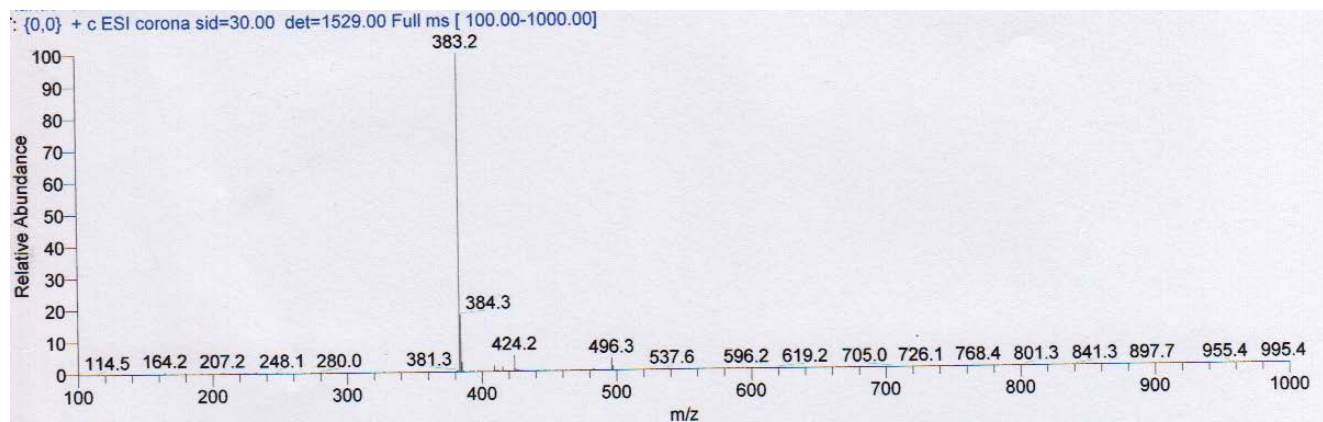
<i>Palicourea adusta</i>	Monoterpenos <i>s</i> -carbolicos glicosilados Der. do ácido hidroxicinamico	VALVERDE <i>et al.</i> , 1999
<i>Palicourea coriácea</i>	Alcaloide indólico monoterpênico glicosilado	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2005
<i>Palicourea rígida</i>	Alcaloide indolico	SOARES <i>et al.</i> , 2012
<i>Pausinystalia johimbe</i>	Alcaloides indólicos monoterpênicos	RAMAN <i>et al.</i> , 2013
<i>Pavetta owariensis</i>	Proantocianidina Flavonoides Proantocianidina Ésteres der. do ácido ferrulíco	BALDE <i>et al.</i> , 1991
<i>Pentas bussei</i>	Naftoiidroquinonas pentacíclicas	BUKURU <i>et al.</i> , 2003
<i>Pentas lanceolata</i>	Quinonas	ENDALE <i>et al.</i> , 2012a
<i>Pentas longiflora</i>	Der. naftoquinoides	HARI <i>et al.</i> , 1991
	Quinonas	ENDALE <i>et al.</i> , 2012a
<i>Pentas micranta</i>	Antraquinonas	ENDALE <i>et al.</i> , 2012
<i>Prismatomeris connata</i>	Antraquinonas glicosiladas	HAO <i>et al.</i> , 2011
	Fenolico glicosilados e iridoides	SHIXIU <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudocedrela kotschyi</i>	tetranortriterpenes	DAL-PIAZ <i>et al.</i> , 2012
<i>Psychotria barbiflora</i>	b-Carboline alkaloids	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013
<i>Psychotria brachyceras</i>	Alcaloides indólicos monoterpênicos	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2013
<i>Psychotria camponutans</i>	Naftoquinonas, Psychorubrina e quinonas	JACOBS <i>et al.</i> , 2008
<i>Psychotria colorata</i>	Alcaloides pirrolidinoindólicos	VEROTTA <i>et al.</i> , 1998
<i>Psychotria correae</i>	Alcaloides indólicos Der. C13- <i>nor</i> -isoprenoides Carotenoides	ACHENBACH <i>et al.</i> , 1995
<i>Psychotria glomerulata</i>	Alcaloides quinolínicos	SOLIS <i>et al.</i> , 1997
<i>Psychotria ipecacuanha</i>	Alcaloides emeticos	GARCIA <i>et al.</i> , 2005
<i>Psychotria leiocarpa</i>	Alcaloide indólico monoterpênico	LOPES <i>et al.</i> , 2004

<i>Psychotria myriantha</i>	Alcaloide ácido estrictosidínico	FARIAS <i>et al.</i> , 2010
	Alcaloides indólicos monoterpênicos	FARIAS <i>et al.</i> , 2012
<i>Psychotria oleoides</i> <i>P. lyciiflora</i>	Alcaloides pirrolidinoindólicos	JANNIC <i>et al.</i> , 1999
<i>Psychotria suterella</i>	Alcaloide indólico monoterpênico	VAN DE SANTOS <i>et al.</i> , 2001
<i>Psychotria umbellata</i>	Monoterpenos e alcaloide indólico	FRAGOSO <i>et al.</i> , 2008
<i>Psychotria viridis</i>	Alcaloide: dimetiltriptamina	BLACKLEDGE <i>et al.</i> , 2003
<i>Randia dumetorum</i>	Iridoides glicosilados	JANGWAN <i>et al.</i> , 2013
<i>Randia formosa</i>	Saponinas triterpênicas der. ursólicos e oleanólicos	SAHPAZ <i>et al.</i> , 2000
<i>Randia nilótica</i>	Saponinas	DANJUMA <i>et al.</i> , 2013
<i>Randia siamensis</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. oleanólicos e ursólicos	JANSKUL <i>et al.</i> , 1999
<i>Randia spinosa</i>	Iridoides glicosilados	HAMERSKI <i>et al.</i> , 2003
<i>Remijia peruviana</i>	Alcaloides da chinchona	RUIZ-MESIA <i>et al.</i> , 2005
<i>Ronabea emética</i>	Iridoides	BERGER <i>et al.</i> , 2011
<i>Rothmannia longiflora</i>	4 oxonicotinamide 1-(1'- beta-dextro ribofuranosideo)	BRINGMANN <i>et al.</i> , 1999
<i>Rothmannia urcelliformis</i>	Iridoide alcaloidal	BRINGMANN <i>et al.</i> , 2001
<i>Rubia akane</i>	Antraquinona aldeído	MORIMOTO <i>et al.</i> , 2002
<i>Rubia cordifolia</i>	Componentes do óleo essencial: mollugina, furomollugina, e ( <i>E</i> )-anetol	MIYAZAWA e KAWATA, 2006
	Naftoquinonas Antraquinonas	MIYAZAWA e KAWATA, 2006
	Iridoides glicosilados: der. geniposídeos	WU <i>et al.</i> , 1991
	Antraquinonas	KHAN <i>et al.</i> , 2012
<i>Rubia peregrina</i>	Antocianidinas	LONGO <i>et al.</i> , 2007
<i>Rubia schumanniana</i>	Digiferruginol glicosilado Antraquinonas glicosiladas	LIU <i>et al.</i> , 1991

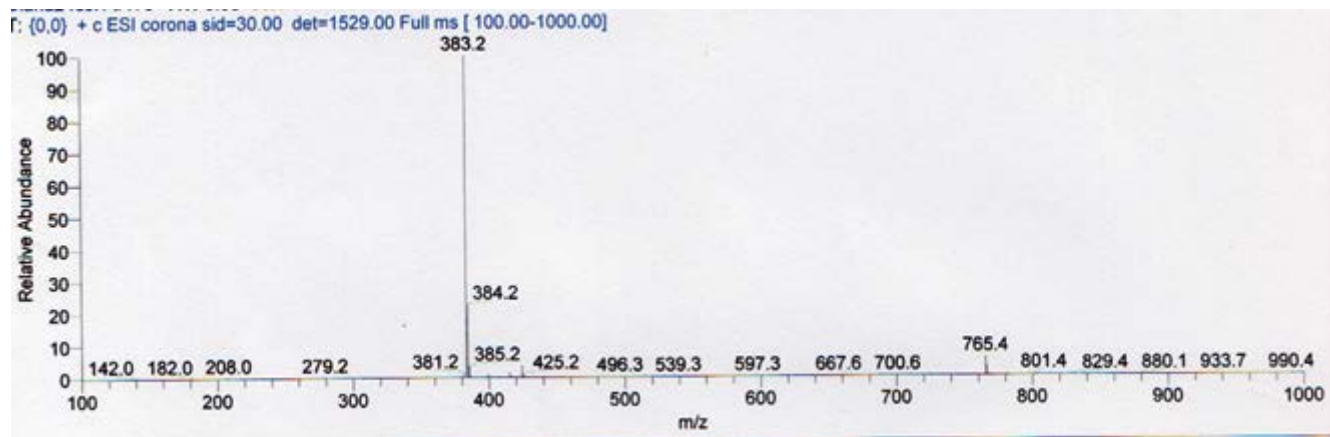
<i>Rubia tinctorum</i>	Antraquinonas	MAREC <i>et al.</i> , 2001
	Antraquinonas: Hidroximetilantraquinonas Antraquinonas glicosiladas Iridoide: asperulosideo	EL-EMARY <i>et al.</i> , 1998
	Antraquinonas	PERASSOLO <i>et al.</i> , 2007 ORBÁN <i>et al.</i> , 2008
<i>Rubia yunnanensis</i>	Hexapeptídeos cíclicos	FAN <i>et al.</i> , 2010
<i>Schumanniphyton problematicum</i>	Alcaloide quinolínico	KUMARA <i>et al.</i> , 2013
<i>Sickingia species</i>	Alcaloides glicoindolicos	AQUINO <i>et al.</i> , 1994
<i>Simira glaziovii</i>	Esteróides, alcaloides: der. harmanos e opiorinicos Monoterpenos $\beta$ -carbolínicos tetraacetilglucosídeos	BASTOS <i>et al.</i> , 2002
<i>Spermacoce verticillata</i>	Ácidos graxos Monoterpenos	EKPENDU <i>et al.</i> , 2001
	Triterpenos, flavonoides e antraquinonas	FERREIRA <i>et al.</i> , 2012
<i>Tarenna madagascariensis</i>	Iridoídes glicosilados e polifenóis	DJOUADI <i>et al.</i> , 2007
<i>Timonius timon</i>	Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólicos	KHAN <i>et al.</i> , 1993
<i>Tocoyena brasiliensis</i>	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. oleanolicos Triterpenos pentacíclicos: der. oleanólicos	HAMERSKI <i>et al.</i> , 2005
<i>Tocoyena bullata</i>	Iridoídes glicosilados	VON POSER <i>et al.</i> , 1998
<i>Tocoyena formosa</i>	Iridoídes	BOLZANI <i>et al.</i> , 1997
<i>Tricalysia dúbia</i>	Diterpenos	NISHIMURA <i>et al.</i> , 2006
<i>Trichilia emética</i>	Tetra-nor-triterpenos	DAL-PIAZ <i>et al.</i> , 2012
<i>Uncaria</i>	Alcaloides Terpenes Flavonoides Cumarinas	HEITZMAN <i>et al.</i> , 2005
<i>Uncaria callophylla</i>	Alcaloides indólicos dimericos	KAM <i>et al.</i> , 1991

<i>Uncaria elliptica</i>	Alcaloides pentacíclicos oxindólicos	DIYABALANAGE <i>et al.</i> , 1997
<i>Uncaria glabrata</i>	Glucocalcoide indólico monoterpênico	ARBAIN <i>et al.</i> , 1998b
<i>Uncaria guianensis</i>	Alcaloides	LAUS e KEPLINGER, 2003
	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. ursólicos	YÉPEZ <i>et al.</i> , 1991
<i>Uncaria hirsuta</i>	Alcaloide <i>bis</i> -indólico monoterpênico glicosilado	XIN <i>et al.</i> , 2011
<i>Uncaria longiflora</i> var. <i>pteropoda</i>	Alcaloides oxindólico pentacíclico	SALIM e AHMAD 1978
<i>Uncaria macrophylla</i>	Alcaloides oxindólicos	SAKAKIBARA <i>et al.</i> , 1998
<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Flavonoides	HOU <i>et al.</i> , 2005
	Alcaloides oxindólicos e indólicos	LAUS e TEPPNER, 1996
	Alcaloides oxindólicos	XIE <i>et al.</i> , 2013
<i>Uncaria tomentosa</i>	Alcaloides indólicos Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. oleanólico	MONTORO <i>et al.</i> , 2004
	Alcaloides indólicos glicosilados e $\beta$ -carbolínicos Triterpenos pentacíclicos: der. ursólico	KITAJIMA <i>et al.</i> , 2001
	Alcaloides oxindólicos Iridoides glicosilados	MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001
	Triterpenos pentacíclicos glicosilados: der. ursólicos	AQUINO <i>et al.</i> , 1997
	Alcaloides indólicos	LAUS e KEPLINGER, 1994
	Alcaloides oxindólicos	LAUS e KEPLINGER, 1994
	Alcaloides oxindólicos pentacíclico	GARCÍA-PRADO <i>et al.</i> , 2007
	Alcaloide oxindólico monoterpênico	ROJAS-DURAN <i>et al.</i> , 2012
<i>Uncaria villosa</i>	Alcaloides indólicos	MATSUO <i>et al.</i> , 2011
<i>Wendlandia tinctoria</i>	Iridoides glicosilados	DINDA <i>et al.</i> , 2011a
	Iridoides glicosilados	DINDA <i>et al.</i> , 2011b

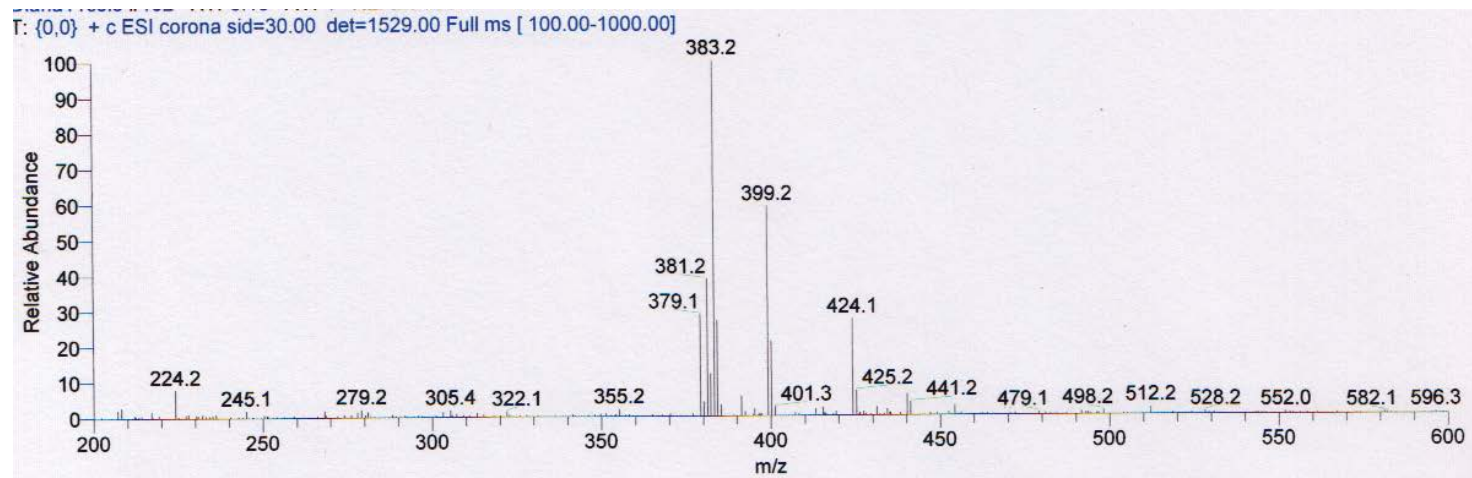
\* Essa busca foi realizada utilizando os portais [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) e CAS-Scifinder.

**Anexo 2:** Espectros de massas dos alcaloides isolados de *D. macrophylla*.

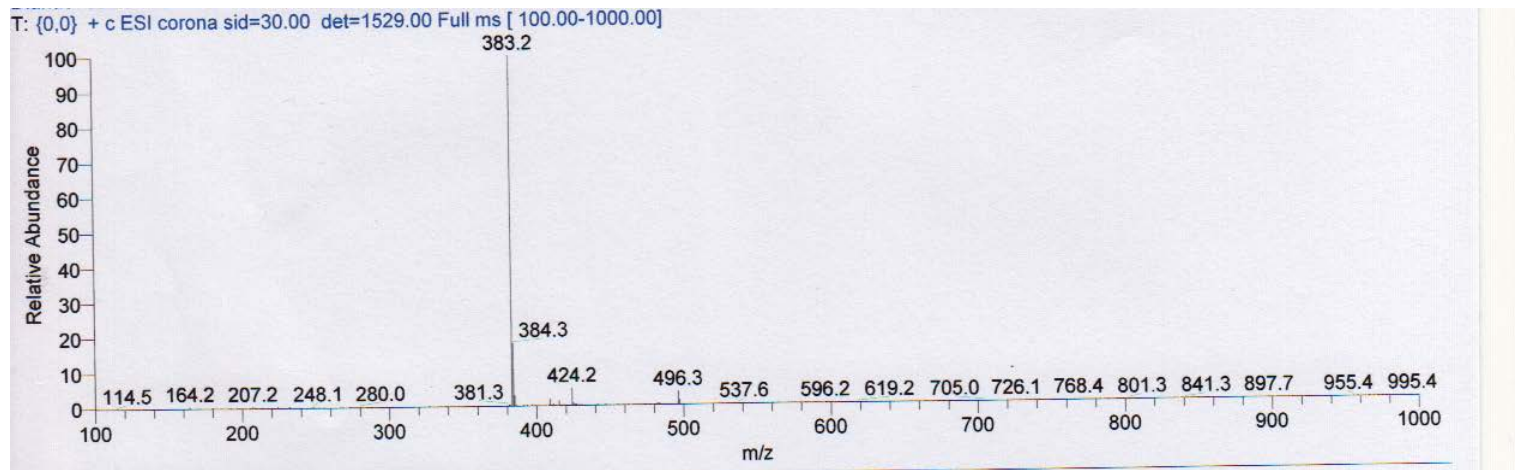
Alcaloide 10-metoxi-ajmalicina (substância V)



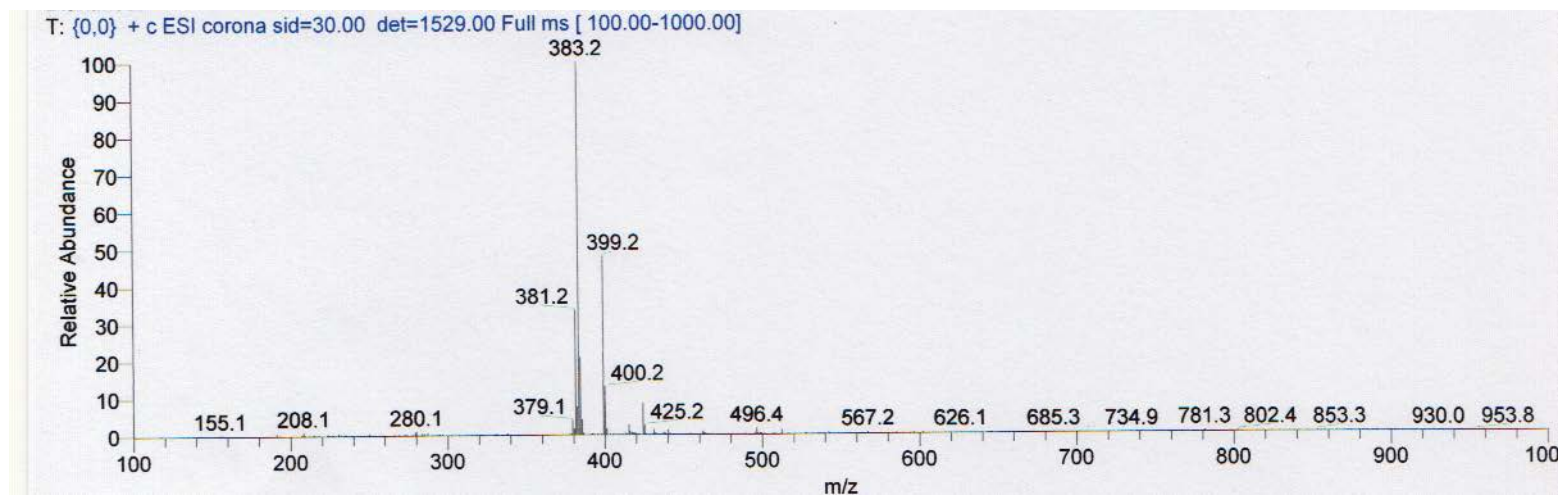
Mistura dos alcaloides 9-metoxi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substâncias VIII e IX)



Alcaloide 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina (substância X)

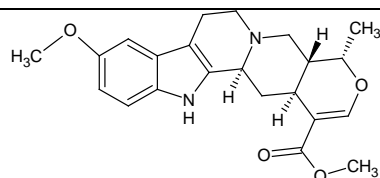


Alcaloide 10-metoxi-3-isorauniticina (substância XI)

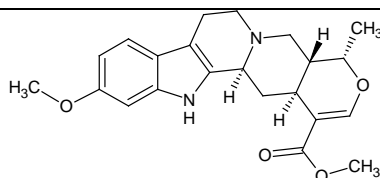


Alcaide 10-metoxi-rauniticina (substância XII)

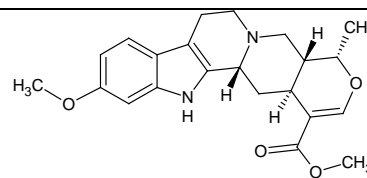
Anexo 3: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos alcaloides isolados de *D. macrophylla*.



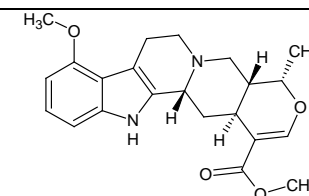
10-metoxi-ajmalicina  
(substância V)



11-metoxi-ajmalicina  
(substância VI)



11-metoxi-3-isoajmalicina  
(substância VII)

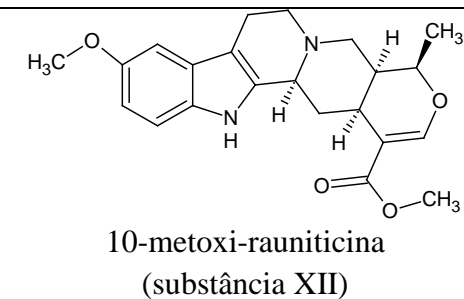
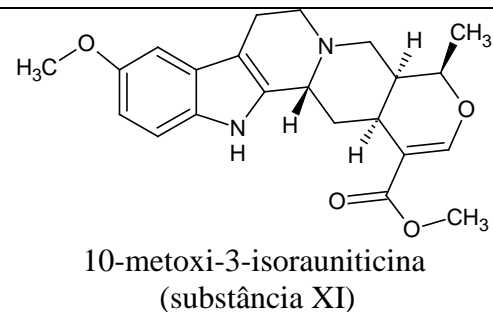
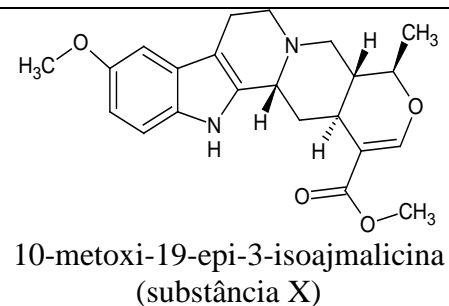
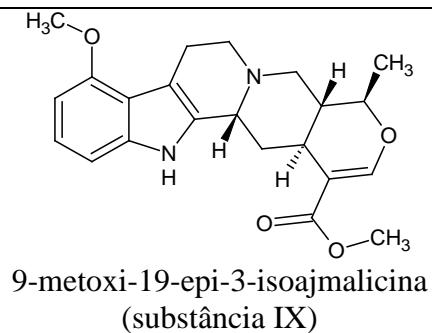


9-metoxi-3-isoajmalicina  
(substância VIII)

Posição	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
2	136,9	139,5	134,5	138,9
3	<b>61,3</b>	<b>61,0</b>	<b>55,4</b>	<b>54,6</b>
5	54,4	54,4	50,0	47,4
6	22,8	24,8	22,9	20,0
7	108,3	108,6	108,6	107,5
8	128,6	134,4	134,4	118,8
9	101,0	122,2	122,2	155,1
10	154,9	99,9	99,5	99,9
11	111,4	155,7	154,9	122,2
12	112,4	105,0	105,0	105,8
13	132,8	139,5	137,5	132,5
14	34,4	34,7	33,5	33,5
15	32,4	32,5	32,5	32,4
16	111,1	111,2	111,2	109,2
17	156,0	156,0	156,0	156,2
18	18,8	18,2	18,2	18,3
19	<b>73,3</b>	<b>73,6</b>	<b>73,6</b>	<b>74,0</b>
20	<b>39,5</b>	<b>39,3</b>	<b>38,1</b>	<b>39,1</b>
21	57,1	57,0	57,0	63,4
22	168,0	168,4	168,4	167,5
23	51,3	51,1	51,1	50,9
24	56,1	55,2	55,2	55,4



Anexo 3: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos alcaloides isolados de *D. macrophylla*.



Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	138,9	135,9	140,0	137,0
3	55,1	55,8	55,1	64,0
5	48,6	50,6	49,5	55,0
6	24,9	17,6	21,2	22,6
7	107,5	108,0	109,9	109,0
8	118,8	129,1	126,5	124,3
9	155,1	100,7	100,0	111,6
10	99,9	155,0	154,3	154,0
11	122,2	111,3	111,0	111,4
12	105,8	112,8	111,3	100,2
13	132,5	132,4	130,7	131,1
14	38,8	31,7	31,2	34,0
15	31,7	32,5	25,1	21,8
16	109,2	109,0	105,4	111,0
17	156,2	156,3	157,2	157,2
18	18,3	18,2	17,1	18,4
19	<b>76,0</b>	<b>76,0</b>	<b>75,8</b>	<b>75,7</b>
20	43,8	44,2	36,6	36,5
21	63,4	47,7	53,2	57,0
22	167,5	167,4	167,3	167,4
23	50,9	50,7	51,0	51,0
24	55,4	54,0	55,6	55,7

