



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

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *ASPIDOSPERMA nitidum* (Benth)

Maiara Lopes Ferreira Sales

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Manaus – AM

2019

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

**MAIARA LOPES FERREIRA SALES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *ASPIDOSPERMA NITIDUM* (Benth)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

**Orientadora:** Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Manaus – AM

2019

## Ficha Catalográfica

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

S163e Sales, Maiara Lopes Ferreira  
Estudo fitoquímico de *Aspidosperma nitidum* (Benth) / Maiara  
Lopes Ferreira Sales. 2019  
96 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Alcalóides. 2. carapanaúba. 3. acetilcolinesterase. 4.  
citotoxicidade. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

# **MAIARA LOPES FERREIRA SALES**

## **ESTUDO FITOQUÍMICO DE *ASPIDOSPERMA NITIDUM* (Benth)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Saraiva Nunomura**  
Universidade Federal do Amazonas- UFAM

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia de Souza Pinto Hidalgo**  
Universidade do Estado do Amazonas- UEA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Belém Pinheiro**  
Universidade Federal do Amazonas- UFAM

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença marcante na minha vida, direcionando e fortalecendo em todos os caminhos escolhidos, inclusive na busca árdua pelo conhecimento.

Ao meu pai em memória, pois sempre me incentivou e plantou em mim a curiosidade do descobrir.

A minha mãe, meu irmão e meu sobrinho pelo apoio incondicional mesmo a distância. A família, que sempre demonstrou orgulho da minha persistência.

Ao meu marido e filhos, pela paciência, companheirismo e por acreditarem junto comigo que era possível.

Aos amigos do laboratório de abertura de amostra (LAEQ/CA-UFAM) Rochelly, Ingrity, Lilian, Marcos, André e Leonard por dividirem conhecimento comigo e assim multiplicá-lo, pelas respostas as minhas mais diversas dúvidas, pelas gargalhadas e por terem deixado mais leve essa jornada.

A Rita Nunomura, que aceitou me orientar nessa empreitada e contribui muito para minha formação acadêmica.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao programa de pós-graduação em Química pela oportunidade de realizar um sonho.

A UFAM pela possibilidade de cursar o Mestrado.

E a todos que estiveram comigo nesta trajetória e contribuíram direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A região Amazônica apresenta uma vasta biodiversidade, porém pouco estudada. Utilizando a estratégia de combinar informações de conhecimento popular para o uso medicinal de espécies regionais com estudos fitoquímicos, esse projeto objetiva analisar a espécie *Aspidosperma nitidum* (Benth) pertencente à família Apocynaceae, comumente conhecida no norte do país como carapanaúba, devido a abrigar carapanãs em suas lamelas. Diante disso, este trabalho tem como objetivo contribuir com o estudo fitoquímico além de realizar ensaios biológicos dos extratos, frações e substâncias isoladas dos galhos, folhas e cascas da espécie *A. nitidum*. Os extratos foram obtidos por maceração sucessiva à temperatura ambiente com diferentes solventes, os quais foram submetidos a métodos cromatográficos clássicos e modernos, assim como a métodos espectrométricos e espectroscópicos (Espectrômetro de massas, Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia de Absorção nas Regiões do Infravermelho e UV-visível). Com isso, foi possível identificar quatro alcalóides indólicos sendo dois ainda não relatados na espécie, a carapanaubina e a desoxicordifolina, além dos já conhecidos ácido harmano carboxílico e o 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -10-Metoxi-18,19-diidro-corinanteol. Este trabalho avaliou também a atividade antioxidante, obtendo bons resultados para os extratos metanólicos, frações da partição, fase clorofórmica e hidroalcoólica e para substância isolada carapanaubina. Verificou-se que os extratos metanólico e aquoso das cascas da espécie em estudo apresentam moderado potencial de inibição da acetilcolinesterase assim como a substância isolada carapanaubina, uma promissora substância nos estudos de sínteses de novos fármacos. Entretanto, para a substância desoxicordifolina, é necessário, que haja mais isolamento da mesma, para que seja refeito seu teste, visto que na literatura relata seu alto potencial o que não pôde ser confirmado neste trabalho. Constatou-se também que a fase clorofórmica e a substância carapanaubina apresentaram atividade citotóxica promissora com valores de IC<sub>50</sub> < 40 $\mu$ g/mL.

Palavras-chaves: Alcalóides, carapanaúba, acetilcolinesterase, citotoxicidade.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplos de Alcalóides.....	14
Figura 2 - Estrutura da ioimbina com numeração proposta por LE MAN & TAYLOR, 1965.....	19
Figura 3 - Alcalóides isolados da <i>Aspidosperma</i> com atividade anticâncer e antiplasmódica. ....	21
Figura 4 - Caule da <i>Aspidosperma nitidum</i> . ....	22
Figura 5 – Alcalóides indólicos encontrados em <i>Aspidosperma nitidum</i> . ....	24
Figura 6 - Esteroides e triterpenos encontrados em <i>Aspidosperma nitidum</i> . ...	25
Figura 7- Vista aérea da área de coleta da espécie vegetal <i>A. nitidum</i> .....	28
Figura 8 - Fluxograma geral operacional utilizado para obtenção dos extratos de <i>A. nitidum</i> . ....	29
Figura 9- Fluxograma da partição líquido-líquido. ....	30
Figura 10 -- Fluxograma ilustrativo do fracionamento por CLAE da amostra PCAN_50. ....	33
Figura 11- Coluna Cromatográfica em sílica flash fase normal da amostra PCAN_8, sistema Clorofórmio/ Metanol. ....	34
Figura 12- Espectro de CLAE analítico do composto PCAN_8.2 em modo isocrático 40% MeOH/água.....	36
Figura 13- Fluxograma ilustrativo do isolamento das substâncias presentes na fração PCAN_8.2 por CLAE.....	37
Figura 14- Fluxograma ilustrativo do isolamento das substâncias presentes na fração PHAAN_20 por CLAE.....	39
Figura 15- Fracionamento do extrato metanólico por partição líquido-líquido. .	46
Figura 16 - CCD's das frações da primeira coluna da fase CHCl <sub>3</sub> revelado com Dragendorff, em destaque as frações 8 e 50. ....	47
Figura 17 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância PCAN_50.2. ....	48
Figura 18 – Fragmentação da substância PCAN_50.2. ....	48
Figura 19 - Estrutura da substância PCAN_50.2 identificada como o alcaloide do tipo harmano, cuja nomenclatura é ácido 3-harmanocarboxílico. ....	49
Figura 20- Espectro de RMN de <sup>13</sup> C em MeOD da substância em estudo PCAN_50.3 ....	50
Figura 21- Espectro de RMN <sup>1</sup> H (MeOD, 500 Mz) da substância em estudo PCAN_50.3. ....	51
Figura 22- À direita tem-se a ampliação da região do espectro de RMN de <sup>1</sup> H referente aos hidrogênios H10 e 12 , abaixo sua devida correlação em <sup>1</sup> J <sub>CH</sub> no espectro de HSQC entre os carbonos C10 e C12 respectivamente da substância PCAN_50.3. ....	51
Figura 23- À esquerda, apresenta a ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da região dos hidrogênios 5,11 e 5,09 ppm e a direita o espectro de HSQC onde evidencia a correlação entre o carbono vinílico terminal C18 e os hidrogênios em questão.....	52
Figura 24- Fragmento proposto da substância em estudo PCAN_50.3 e as correlações HMBC que corroboram com tal estrutura. ....	53

Figura 25- Fragmentação proposta da região aromática-indol da substância em estudo PCAN_50.3 e suas correlações a longa distância HMBC. ....	54
Figura 26- Espectro de massa de alta resolução da substância em estudo PCAN_50.3 .....	56
Figura 27- Fragmentação MS <sup>2</sup> da substância em estudo PCAN_50.3.....	57
Figura 28- Proposta de fragmentação da substância em estudo PCAN_50.3. ....	58
Figura 29- Proposta sugerida para substância em estudo PCAN_50.3. ....	61
Figura 30 -Espectro de Infravermelho da substância PCAN_8.2.2. ....	62
Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução da amostra PCAN_8.2.2... ..	62
Figura 32 - Espectro de massa MS-MS da substância PCAN_8.2.2.....	63
Figura 33 - Proposta de fragmentação da amostra PCAN_8.2.2. ....	64
Figura 34 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância PCAN_8.2.2. ....	65
Figura 35- Ampliação do espectro de COSY do acoplamento entre os hidrogênios δ <sub>H</sub> 4,25 e 1,23 ppm. ....	66
Figura 36- Ampliação do espectro de COSY na região dos acoplamentos entre δ <sub>H</sub> 2,01 e 2,75 ppm a direita, entre os hidrogênios δ <sub>H</sub> 2,25 e 1,12 ppm, a esquerda e entre os hidrogênios δ <sub>H</sub> 2,25 e 1,99 ppm a baixo. ....	67
Figura 37- Ampliação das regiões das correlações <sup>1</sup> J <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C dos carbonos metilênicos, do espectro de HSQC. ....	67
Figura 38- Fragmento do sistema aromático-indol da substância em estudo e correlações <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C HMBC. ....	68
Figura 39- Espectro de RMN HSQC da substância PCAN_8.2.2.....	70
Figura 40- Espectro de RMN HMBC da substância PCAN_8.2.2. ....	70
Figura 41- Ampliação dos sinais das metoxilas substituídas no anel aromático da substância PCAN_8.2.2. ....	71
Figura 42- Ampliação dos espectros de H, HSQC e HMBC das metoxilas e suas devidas correlações na substância PCAN_8.2.2. ....	72
Figura 43- Fragmento do sistema piperidina-diidropirano da substância em estudo e correlações <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C HMBC. ....	73
Figura 44- Estrutura proposta para o alcalóide PCAN_8.2.2. ....	73
Figura 45- Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância PHAAN_20.2.45.....	74
Figura 46- Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H, na região aromática referente aos hidrogênios 9, 11 e 12. ....	75
Figura 47- Espectro Bidimensional HSQC e em destaque a região de aromáticos da substância PHAAN_20.2.45.....	76
Figura 48- Espectro de RMN HMBC para a substância PHAAN_20.2.45, com ampliação das correlações entre os H 9, 11 e 12 e seus respectivos carbonos. ....	77
Figura 49- Estrutura proposta para a substância em estudo e principais correlações a longa distância HMBC. ....	77
Figura 50- Espectro de massa da substância em estudo PHAAN_20.2.45. ...	78
Figura 51-Proposta de estrutura para a substância PHAAN_20.2.45. ....	78
Figura 52-Curva analítica do padrão Quercetina para determinação do valor de % EC <sub>50</sub> . ....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> *, segundo Bolzani (1987) e Garcia (1976). .....	18
Tabela 2 - Reunião das frações da coluna da PCAN. ....	32
Tabela 3-Reunião das frações da coluna cromatográfica aberta da amostra PCAN_8. ....	35
Tabela 4- Reunião das frações da coluna cromatográfica reversa da amostra PHAAN. ....	38
Tabela 5 -Massa dos extratos e seus respectivos rendimentos percentuais. ..	44
Tabela 6 - Massas e rendimentos da partição líquido-líquido do extrato metanólico das Cascas de <i>A. nitidum</i> . ....	45
Tabela 7- Dados de RMN de <sup>1</sup> H (em ppm) para o alcalóide indólico estudado em MeOD, em comparação com dados da literatura obtido em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	49
Tabela 8- Dados dos espectros de RMN H, C e bidimensionais da substância PCAN_50.3. ....	55
Tabela 9- Dados de RMN de <sup>13</sup> C (em ppm) para o alcalóide indólico estudado (PCAN_50.3) em MeOD, em comparação com dados da literatura obtido em CDCl <sub>3</sub> . ....	60
Tabela 10- Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C incluindo correlações <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY, <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC e <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC, para a substância PCAN_8.2.2. ....	69
Tabela 11- Deslocamentos de carbono para o alcalóide estudado em comparação com a literatura (LEITE, 2016). ....	79
Tabela 12- Valores de EC <sub>50</sub> das amostras e do padrão Quercetina. ....	81
Tabela 13- Concentração inibitória da enzima acetilcolinesterase para o padrão neostigmina e as amostras selecionadas. ....	83
Tabela 14- Concentração inibitória da enzima acetilcolinesterase para as amostras selecionadas e o padrão Neostigmina. ....	84
Tabela 15- Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais. ....	85
Tabela 16- Valores de IC <sub>50</sub> para atividade citotóxica em linhagens de células tumorais versus não tumorais. Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ECHAN**- Extrato Hexânico da Casca da *Aspidosperma nitidum*.  
**EMCAN**- Extrato metanólico da Casca da *Aspidosperma nitidum*.  
**EAAN**- Extrato aquoso da Casca da *Aspidosperma nitidum*.  
**PCAN**- Partição fase clorofórmica do extrato metanólico da *A.nitidum*.  
**PHAN**- Partição fase hidroalcoólica do extrato metanólico da *A.nitidum*.  
**AcOEt**- Acetato de Etila  
**MeOH**- Metanol  
**MeOD**- Metanol deuterado  
**CH<sub>3</sub>Cl**- Clorofórmio  
**CD<sub>3</sub>Cl**- Clorofórmio deuterado  
**CC**- *Cromatografia em Coluna*  
**CCD**- Cromatografia em Camada Delgada  
**EM**- Espectrometria de Massas  
**CLAE**- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**MS**- *Mass Spectrometry*  
**MS/MS ou MS<sup>2</sup>**- Espectrometria de massa em tandem  
**ESI**- *Ionização por Eletronspray*  
**m/z**- *Relação massa/carga*  
**HPLC**- *High Performance Liquid Chromatography*  
**DAD**-Diode Array Detector  
**nm**- Nanômetro  
**RMN**- *Ressonância Magnética Nuclear*  
**HSQC**- Heteronuclear Single-Quantum Correlation  
**HMBC**- Heteronuclear Multiple Bond Correlation  
**TMS**- Tetrametilsilano  
**d**- deuterado  
**s**- singleto  
**d**- dubleto  
**dd**- duplo debleto  
**t**- tripleto  
**δ<sub>H</sub>** – deslocamento químico de hidrogênio  
**δ<sub>C</sub>** – deslocamento químico de carbono  
**DPPH**- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
**AcChE**- Atividade Inibidora da enzima Acetilcolinesterase

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão da literatura.....	15
2.1. Família Apocynaceae .....	15
2.2. Gênero <i>Aspidosperma</i> .....	17
2.2.1. <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	22
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Metodologia .....	27
4.1. Escolha da espécie vegetal .....	27
4.2. Coleta do Material.....	27
4.3. Obtenção dos extratos.....	28
4.3.1. Fracionamento dos extratos .....	29
4.4. Métodos espectrométricos e espectroscópicos.....	30
4.5. Isolamento dos principais constituintes químicos dos extratos .....	31
4.6. Ensaio Biológicos.....	39
4.6.1. Atividade Antioxidante .....	39
4.6.2. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase .....	40
4.6.3. Atividade Antitumoral.....	42
5. Resultados e Discussão .....	44
5.1. Rendimento dos extratos.....	44
5.2. Rendimentos das Partições Líquido-Líquido .....	44
5.2.1. Fase Clorofórmica .....	46
5.3. Atividades Químicas e Biológicas .....	79
5.3.1. Atividade Antioxidante .....	79
5.3.2. Ação inibitória da Acetilcolinesterase.....	82
5.3.3. Atividade Antitumoral.....	84
6. Conclusão.....	86
7. REFERÊNCIAS .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais tem sido uma prática consagrada em épocas diversas da história humana, cujo acúmulo de informações, obtido através de experiências de vários povos, representa milênios de história desde o século III a.C., quando os únicos recursos medicamentosos disponíveis eram, em grande parte, provenientes dos vegetais, até o início do século XX quando houve o advento da síntese química (MING, 1994). Existem algumas evidências de que o homem pré-histórico já fazia uso de plantas medicinais para amenizar o sofrimento de males físicos que lhe acometiam (CASTRO e CHEMALE, 1995).

No Brasil, a utilização das plantas como fonte terapêutica teve início com os primeiros habitantes a chegarem ao Brasil, por volta de 12 mil anos atrás. No entanto, pouco se conhece sobre esse período, além das pinturas rupestres (SILVA & CARVALHO, 2004).

O uso de plantas medicinais no Brasil é bastante difundido, visto que é um país em destaque por apresentar grande número de espécies vegetais nativas de cunho medicinal. Porém, há o uso em larga escala de tais plantas de modo empírico, sem um conhecimento do verdadeiro potencial terapêutico e conseqüentemente uma adequada avaliação científica. Os conhecimentos empíricos foram adquiridos e transmitidos por meio, principalmente, dos indígenas, assim como por imigrantes de diversas origens (RODRIGUES, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos" (WHO, 1998).

A Amazônia Brasileira abriga imenso recurso florestal, correspondendo a um terço das florestas tropicais do mundo, contendo milhares de espécies madeireiras, das quais cerca de 350 já foram exploradas (FREITAS, 2008). A flora amazônica é bastante típica e de elevada biodiversidade de espécies florestais tropicais (OLIVEIRA & DALY, 2001).

Conhecida como a maior floresta tropical do mundo, ameaçada por queimadas e desmatamentos, a Amazônia é, também, uma região com alto potencial de dinamização. Nela está contida metade das espécies vegetais e animais do globo e um terço das espécies de árvores do planeta – abrange a maior biodiversidade (Abrantes, 2003). Frente a toda essa riqueza o uso que as populações fazem das plantas com finalidade medicinal é expressivo, mas de longe representa um bom percentual, haja vista a totalidade da biota presente na região que merece estudos botânicos, etnobotânicos, farmacológicos, fitoquímicos, anatômicos, farmacognóstico etc. Levando-se, ainda, em consideração os outros ecossistemas brasileiros, Ming (1996) diz que menos de 1% da flora nacional tem sua composição química conhecida.

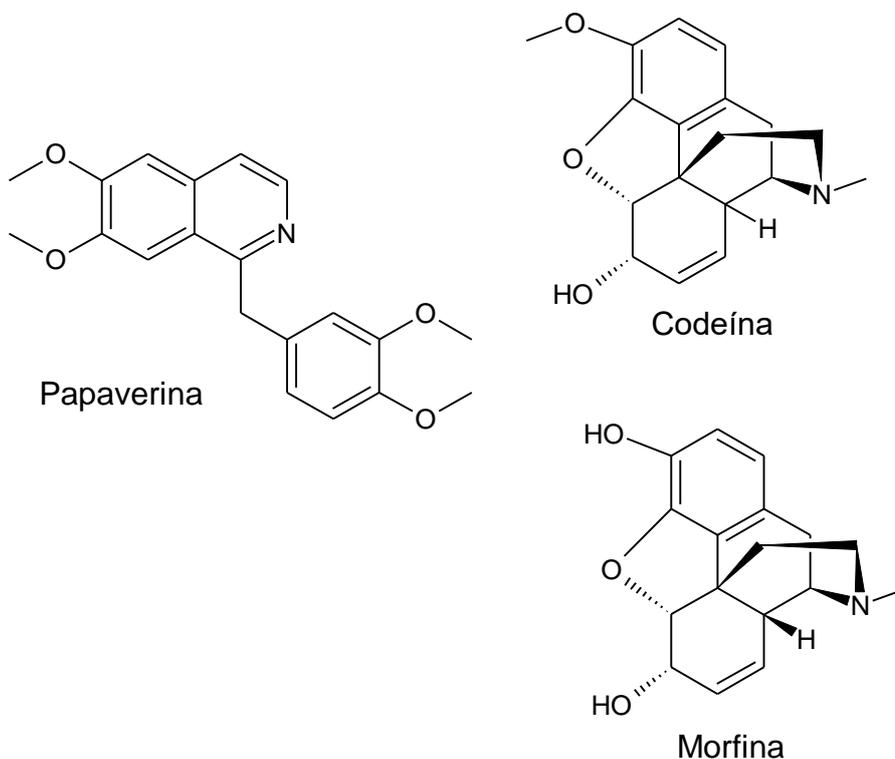
Uma das estratégias mais comuns para a investigação de plantas medicinais é a abordagem etnofarmacológica que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Esse tipo de seleção de espécies vegetais constitui um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, que não pode ser ignorado ou desprezado (KOEHN et al., 2005; BRAZ-FILHO, 2010).

As substâncias sintetizadas pelas plantas como os flavonoides, taninos, alcaloides, cumarinas, ligninas e terpenos, quando isolados da planta, parecem ser os principais responsáveis por suas ações terapêuticas, sejam elas analgésicas, anti-inflamatórias, antivirais, hipoglicemiantes, antiespasmódicas e antialérgicas (SIMÕES et al., 2004; JÚNIOR et al., 2005).

Dentre estas classes de substâncias sintetizadas pelas plantas, este estudo terá como foco a classe de alcaloides que são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas. Segundo Silva (2009), alcaloide é uma substância orgânica, de origem natural, cíclica contendo um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada dentro dos organismos vivos. Esta definição englobaria todos os compostos que foram considerados até o momento como alcaloides, mas excluiria compostos nitrogenados tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e

compostos nitro e nitroso. Alguns exemplos de alcalóides são apresentados na Figura 1.

Figura 1- Exemplos de Alcalóides.



Estima-se que esta classe abranja mais de 4000 compostos, que correspondem a cerca de 15 a 20% dos produtos naturais conhecidos (CORDELL et al, 2001; VERPOORTE, 1986) e que está dividido em diferentes grupos (tropânico, quinolínic, isoquinolínicos, indólicos, dentre outros) com destaque para o grupo dos alcaloides indólicos, devido a sua grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades farmacológicas (AQUINO,2006).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Família Apocynaceae

Apocynaceae é pertencente ao reino Plantae, Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, engloba de 250 a mais de 550 gêneros e entre 3700 e 5100 espécies (MESSIADES; 2014).

A família Apocynaceae está entre as dez maiores famílias de angiospermas. A maior dificuldade para a delimitação dos táxons está relacionada à grande diversidade e ampla distribuição da família, associada a escassez de estudos abrangentes.

As espécies da família Apocynaceae ocorrem desde o nível do mar até às altas montanhas, principalmente em solos secos. As plantas que pertencem a esta família são de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores, e trepadeiras, na maioria latescentes, que vivem tanto nos campos como nas matas e florestas. Tem folhas em geral opostas e verticiladas com estípulas rudimentares; flores pequenas e também grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas, diclamídeas; fruto seco capsular ou indeiscente, ou então dois frutículos, secos, deiscentes (GRAEBNER, 2003).

Em geral, plantas dessa família apresentam látex branco e abundante, em alguns casos, com coloração diferenciada, vermelho, sangue ou acastanhada (RIBEIRO et al, 1999.) Os seus látex frequentemente contêm constituintes prejudiciais e danosos a saúde (HENRIQUE, 2007).

No Brasil está representada por cerca de 90 gêneros e aproximadamente 850 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005), distribuídas em diversas formações vegetacionais.

A família tem vasto uso econômico, de acordo com Rapini (2000), na cultura indígena o *Apocynum cannabinum* é utilizada como fonte de fibras para cordas e fios para artesanato. Os ramos fortes e flexíveis de *Sarcostemma clausum* são usadas como vara de pescar e venenos para flechas de caça são extraídos de algumas espécies de *Matelea*.

Ainda de acordo com Rapini (2000), algumas espécies arbóreas, em particular de *Aspidosperma* (peroba) fornecem madeira para construção civil e produção de móveis e ferramentas; os caules tabulares são especialmente utilizados como cabo de machado. Borracha e goma de mascar são produzidas a partir de látex de *Apocynum spp.* e *Asclepias spp.* e a goma das sementes é utilizada no enchimento de travesseiros e almofadas.

Devido a profusão de metabolitos secundários, a família é uma importante fonte de compostos bioativos. Os mais utilizados na medicina são os alcaloides indólicos (SCHULTES, 1979). Em *Catharanthus roseus*, mais de 95 compostos foram identificados, destacando-se a vincristina (leurocristina) e vimblastina (vincaleucoblastina). Essas substâncias impedem a formação de microtúbulos durante a metáfase, interrompendo a divisão celular, e são usadas na quimioterapia contra o câncer, incluindo a doença de Hodgkin e a leucemia aguda. A vincamina, extraída da *Vinca minor*, aumenta o fluxo sanguíneo no cérebro e é utilizada no tratamento de problemas cérebro-vasculares, especialmente em idosos. Algumas plantas são bastante tóxicas e podem causar a morte quando acidentalmente consumidas por animais domésticos ou ingeridas por crianças (MOHANTA et al, 2007).

As Apocynaceae também são cultivadas como ornamentais e algumas espécies encontram-se naturalizadas em muitas regiões, e.g., *Nerium oleander*, com mais de 400 cultivares, dentre os quais 175 são comercializados; *Catharanthus roseus* de Madagascar; *Vinca major* e *V. minor*, espécies mediterrâneas; *Allamanda catártica* (alamanda), *Plumeria rubra* e *Thevetia peruviana*, espécies neotropicais cultivadas em jardins e ruas de cidades tropicais; e algumas plantas suculentas paleotropicais como *Ceropegia* e *Hoya* (RAPINI, 2000).

É interessante notar que a maioria dos compostos de uso clínico isolados das Apocynaceae são alcaloides indólicos monoterpênicos (SCHRIPSEMA et al. 2001). Esta classe de alcalóide é conhecida pela presença de derivados do triptofano, apresentando um núcleo indólico responsável pela potente habilidade de promover relevantes mudanças fisiológicas, apresentando grau variado de toxicidade (CORDELL, 1981).

## 2.2. Gênero *Aspidosperma*

Espécies do gênero *Aspidosperma*, da família Apocynaceae, são encontradas apenas nas Américas (LORENZI, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (WOODSON, 1951). No Brasil foram catalogadas cerca de 52 espécies desse gênero, praticamente distribuídas em todos os ecossistemas (CORRÊA, 1931), tais como caatinga, cerrado e florestas (AMORIM et al. 2005).

Este gênero apresenta grande relevância em relação ao seu estudo fitoquímico por apresentar-se como objeto de estudos de novas drogas, tendo como precursor seu uso popular. Segundo Gomes & Cavalcanti, estas espécies apresentam importância como fornecedoras de madeira nobre e como detentoras de alcalóides (Raffauf 1964; Gilbert 1966; INPA 1976; Robert *et al.* 1983; Lopes *et al.* 1989), grupo de substâncias com notórias aplicações antimicrobianas. Destaca-se o potencial dos alcalóides provenientes de espécies de *Aspidosperma* no tratamento de cânceres (Kansal & Potier 1986; Oliveira & Alencar-Filho 1994). Esses aspectos fundamentam um estudo aprofundado dessas plantas.

Pereira e colaboradores (2007), demonstraram a evolução da classificação das espécies de *Aspidosperma* em seu trabalho: inicialmente em 1951, Woodson classificou 52 espécies de *Aspidosperma* em 9 séries e, em 1983, outras 18 espécies foram incluídas nesse gênero, segundo Robert. Em 1987, uma nova classificação quimiotaxonômica das espécies nesse gênero foi proposta por Bolzani compreendendo 48 espécies em 7 séries (Tabela 1). Nessa Tabela foi incluída também uma outra série (Tomentosa), conforme descrito por Garcia.

O gênero *Aspidosperma* compreende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte (2 a 60 m de altura) (WOODSON, 1951; CORRÊA, 1931), com flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas alternas espiraladas não agrupadas no ápice dos ramos, que podem apresentar látex abundante, sendo que as mesmas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das Apocynaceae (GOMES, 2011).

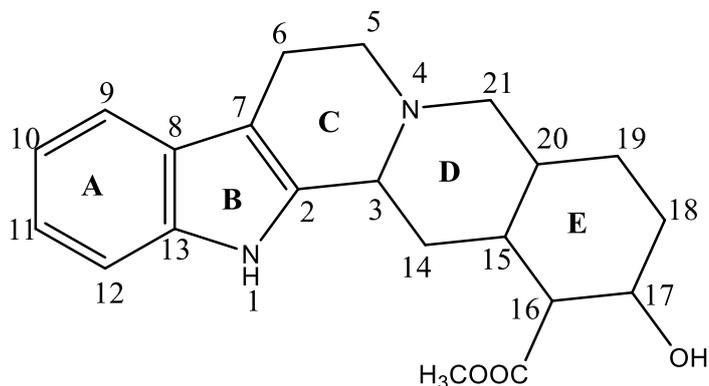
Tabela 1- Classificação das espécies do gênero *Aspidosperma*<sup>\*</sup>, segundo Bolzani (1987) e Garcia (1976).

Série	Espécies
Rígida	<i>A. rigidum</i> Rusby (= <i>A. laxiflorum</i> Kuhl.)
Nítida	<i>A. auriculatum</i> Mgf., <i>A. carapanauba</i> M. Pichon, <i>A. compactinervium</i> Kuhlmann, <i>A. discolor</i> A. DC., <i>A. eburneum</i> F. Allem, <i>A. excelsum</i> Benth, <i>A. marcgravianum</i> Woodson, <i>A. nitidum</i> Benth ex Mull. Arg., <i>A. oblongum</i> A. DC. e <i>A. spagazzinii</i> Molf. Ex Meyer
Quebrachines	<i>A. chakensis</i> Spagazzini e <i>A. quebracho-blanco</i> Schlecht
Polyneura	<i>A. cuspa</i> Blake, <i>A. cylindrocarpon</i> Muell.-Arg., <i>A. dispermum</i> , <i>A. peroba</i> , <i>A. polyneuron</i> Mull.-Arg. e <i>A. sessiliflorum</i>
Pyricolla	<i>A. australe</i> Mull.-Arg., <i>A. campus-belus</i> A. P. Duarte, <i>A. gomesianum</i> A. DC., <i>A. multiflorum</i> A. DC., <i>A. nigricans</i> Handro, <i>A. olivaceum</i> Mull.Arg., <i>A. parvifolium</i> , <i>A. populifolium</i> A. DC., <i>A. pyricollum</i> Muell.-Arg., <i>A. pyriforme</i> Mart., <i>A. rhombeosignatum</i> , <i>A. subnecanum</i> Mart., <i>A. tomentosum</i> Mart., <i>A. ulei</i> Mgf. e <i>A. vargasii</i>
Nobile	<i>A. album</i> (Vahl) R. Benth., <i>A. desmanthum</i> Benth ex Mull.-Arg., <i>A. exalatum</i> Monachino, <i>A. flendleri</i> , <i>A. limae</i> Woodson, <i>A. megalocarpon</i> Mull.-Arg., <i>A. melanocalyx</i> Mull.Arg., <i>A. neblinae</i> Monachino, <i>A. obscurinervium</i> Azembuja, <i>A. sandwithianum</i> e <i>A. spruceanum</i> Benth
Macrocarpa	<i>A. duckei</i> , <i>A. macrocarpon</i> Mart e <i>A. verbascifolium</i> Mull.-arg.
Tomentosa	<i>A. formosanum</i> e <i>A. dasycarpon</i> A. DC.

<sup>1</sup>Segundo Woodson, no gênero *Aspidosperma* são incluídas as espécies: *A. formosanum* A. P. Duarte, *A. longepetiolatum* Kuhl., *A. gilbertii* A. P. Duarte e *A. ramiflorum* Muell. Arg.

Neste gênero, há predominantemente a ocorrência de alcalóides indólicos de considerável diversidade estrutural, muitos deles contendo esqueleto  $\beta$ -carbonílico simples, com sistemas triciclos de anéis pirido-indólicos (PEREIRA et al., 2007). Com parte indólica originária biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, pela via chiquimato. LE MAN & TAYLOR, 1965 propuseram um sistema de numeração para essas substâncias baseadas na sua biogênese sendo, hoje em dia, o sistema de numeração aceito. Segundo Pereira et al., 2007 a numeração baseia-se no esqueleto da ioimbina (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura da ioimbina com numeração proposta por LE MAN & TAYLOR, 1965.



Fonte: Autora adaptado de LE MEN & TAYLOR, (1965).

Segundo Dolabela (2007), os alcalóides indólicos encontrados em espécies de *Aspidosperma* são classificados em dois grupos:

1. Alcalóides indólicos simples, com um sistema indólico derivado biogeneticamente do triptofano, alguns apresentando um esqueleto piridino-indólico. Este grupo possui poucos representantes em *Aspidosperma* (<20) e pode ser exemplificado por secundina, harmano e elipticina (Figura 3);
2. Alcalóides indolomonoterpênicos, biogeneticamente derivados do triptofano, via condensação da triptamina como a secologanina, um monoterpene. A este grupo pertence a grande maioria dos alcalóides de *Aspidosperma* (>200). Estes alcalóides podem apresentar uma grande diversidade estrutural, compreendendo dez diferentes classes (SCHRIPEMA et al., 1999). O tipo aspidoespermano é, aqui, exemplificado por uleína, epiuleína e usambarensina.

Os alcalóides indólicos possuem grande importância econômica devido as suas atividades farmacológicas. Eles podem atuar como agonistas ou agonistas parciais nos receptores alfa-adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgico e dopaminérgico. As diversas atividades biológicas exercidas estão relacionadas à forma com que cada receptor age no tecido e, como cada receptor possui diferentes subclasses, a gama de atividades dos alcalóides indólicos é enorme (SCHRIPEMA; DAGNINO; GRACE, 2007).

Em 2007, Pereira e colaboradores apresentaram uma vasta descrição estrutural dos alcalóides indólicos isolados de *Aspidosperma*, no qual foram enumerados 247 alcalóides indólicos que foram classificados de acordo com as características de seu esqueleto.

De modo geral, na Amazônia, algumas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígenas e caboclas (MILLIKEN, 1997), para vários fins medicinais, como o tratamento de inflamações do útero e ovário, diabetes, câncer, como contraceptivo e tratamento da malária. As espécies mais utilizadas são *A. nitidum*, *A. marcgravianum*, *A. carapanauba* e *A. desmantun* (BRANDÃO et al., 1992 e MILLIKEN, 1997).

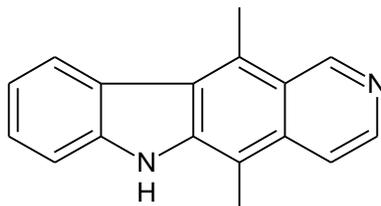
Como outros exemplos, a espécie *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose (FERREIRA et al., 2004). A espécie *A. nitidum* é utilizada como anticonceptiva (RIBEIRO et al., 1999), no tratamento de inflamação de útero e ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. Cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. polineuron* são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária. A atividade antimalárica atribuída a essas espécies foi comprovada por testes *in vitro* e *in vivo* (CARVALHO et al., 1991).

Cascas de *A. quebracho blanco* são usadas na região andina como afrodisíaca e contra febre. No Brasil essa espécie é usada também em casos de enfisema, bronquite e pneumonia, bem como no tratamento de disfunção erétil, contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispneia asmática e cardíaca (DEUTSCH et al., 1994).

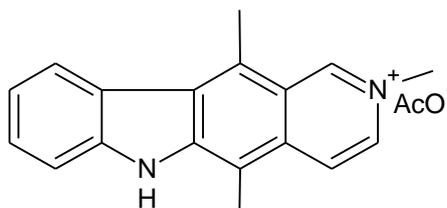
Também, foi avaliada a atividade anticâncer de substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma*, destacando-se os trabalhos com a elipticina e seus derivados sintéticos, dos quais o elipticinium (Figura 3) (acetato de 2-metil-9-hidroxielipticínio), é comercializado com o nome de Celiptium® (Elipticinium), na França, para o tratamento do câncer de mama (CRAGG e NEWMANN, 2005).

Um trabalho recente demonstrou que elipticina e aspidocarpina (Figura 3) apresentaram maior atividade antiplasmódica, *in vitro*, que a quinina, no clone K1 (*Plasmodium falciparum* multi-resistente, originário do Quênia) (ANDRADE-NETTO et al., 2007).

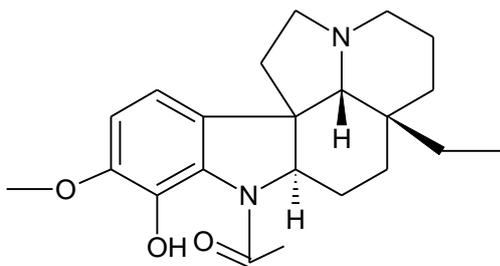
Figura 3 - Alcalóides isolados da *Aspidosperma* com atividade anticâncer e antiplasmódica.



Elipticina



Elipticinium (Celeptium)



Aspidocarpina

Fonte: Autora, adaptado de PEREIRA, 2007

### 2.2.1. *Aspidosperma nitidum*

Este trabalho contribui com o estudo fitoquímico da *Aspidosperma nitidum*, pertencente ao subgrupo Nitida, que são árvores encontradas nas Américas do Sul e Central, são comumente conhecidas no Norte do Brasil como “carapanaúba”, que significa “ninho de mosquitos” (carapanã = mosquito e ubá = árvore) (OLIVEIRA et al, 2008). Outras espécies também são conhecidas pelo mesmo nome vulgar, dentre elas *A. auriculatum*, *A. carapanauba*, *A. desmanthum*, *A. discolor*, *A. oblongum*, *A. marcgravianum* e *A. vergasii* (BARBOSA et al, 2003; CARVALHO et al, 1991; REVILLA, 2002).

*A. nitidum* também é conhecida como Pau de remo e Sapupema. Tem seu tronco dividido longitudinalmente em lamelas delgadas (COINTE, 1947), cheio de septo capazes de abrigar o carapanã, uma denominação muito comum para mosquito na região amazônica (Figura 4).

Figura 4 - Caule da *Aspidosperma nitidum*.



Fonte: Autora

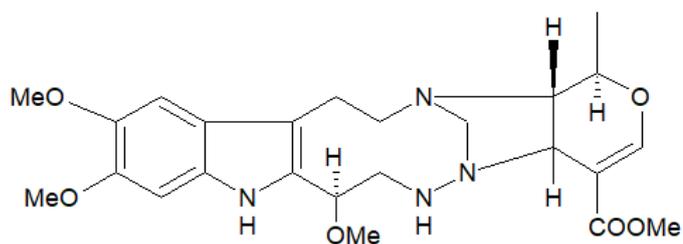
Ainda segundo Cointe, é uma árvore de grande porte, cujo habitat é nas florestas de terra firme úmidas, cuja madeira possui coloração pardo amarelado, resistente, elástica, não atacadas pelos cupins; própria para marcenaria cabos de ferramentas, remos e entre outros usos. Possui casca amargosa, febrífuga, útil nas bronquites.

De acordo com Añez (2009), as pessoas das comunidades conhecem e indicam a carapanaúba como planta medicinal, contudo apenas uma das espécies é indicada (*A. nitidum*). O uso mais comum da espécie é para tratamento de afecções do fígado e estômago. É comum ainda a indicação para profilaxia contra a malária e também para seu tratamento sintomático. A planta ainda é reconhecida como contraceptiva e poucas vezes foi indicada como abortiva. A casca do caule é a parte utilizada nas comunidades, na forma de chá com poucas citações ou diretamente na água sem fervura.

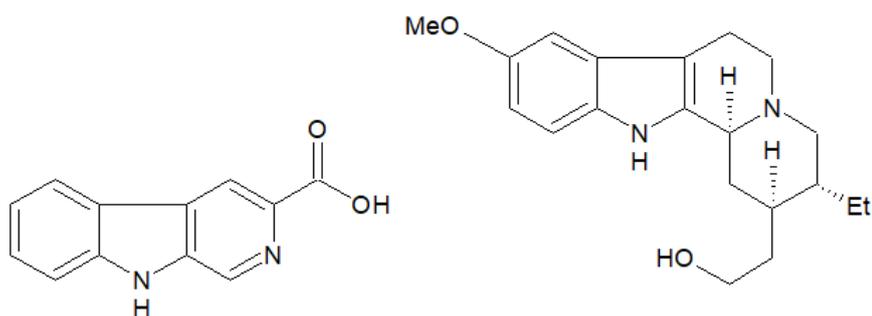
De *A. nitidum* já são conhecidas algumas estruturas de alcalóides indólicos, merecendo destaque a aspidospermina, quebrachamina, e ioimbina, muito comuns em outros representantes do gênero, que na sua maioria estão presentes nas cascas, folhas e galhos (MARQUES et al., 1996). A aspidospermina é um alcalóide indólico com atividade sobre uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (MITAINE-OFFER et al., 2002), e a ioimbina atua como bloqueador dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, como serotoninérgicos, provocando excitação central, elevação da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, e aumento da atividade motora e antidiurética (DEUTSCH et al., 1994).

Além da aspidospermina, quebrachamina, e ioimbina, outros alcalóides também foram encontrados em *A. nitidum*, outros alcalóides indólicos como: ácido harmanocarboxílico, corinanteol, braznitidumina e desidrositsirikina (Figura 5). Outras substâncias, além dos alcalóides, também estão presentes em *A. nitidum*, por exemplo os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol e os triterpenos:  $\beta$ -amirina e lupeol (Figura 6) (PEREIRA et al., 2007).

Figura 5 – Alcalóides indólicos encontrados em *Aspidosperma nitidum*.



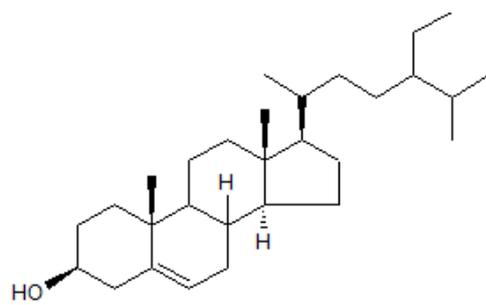
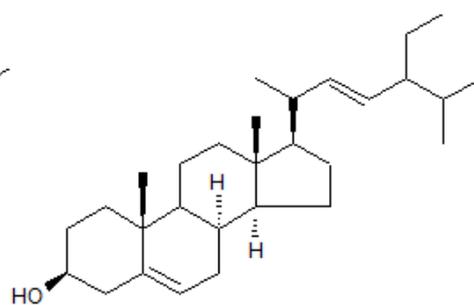
Braznitidumina



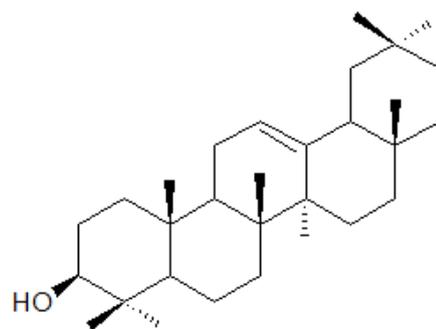
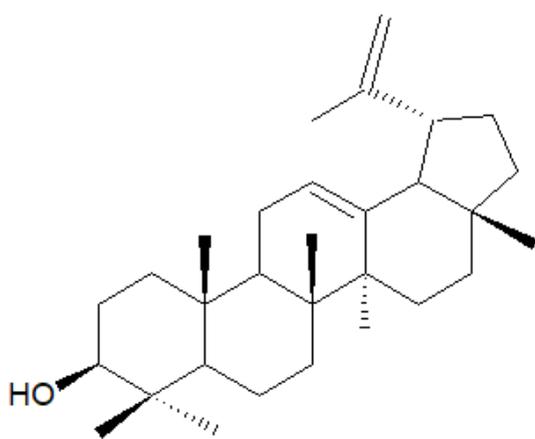
Ácido Harmanocarboxílico

3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -10-Metoxi-18,19-diidro-corinanteol

Fonte: Autora adaptado de PEREIRA, 2007.

Figura 6 - Esteroides e triterpenos encontrados em *Aspidosperma nitidum*. $\beta$ -Sitosterol

Stigmasterol



Fonte: Autora, adaptado de PEREIRA, 2007.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo o estudo químico dos extratos de galhos, folhas e cascas da espécie *Aspidosperma nitidum*, assim como analisar sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil químico dos extratos das amostras de cascas, galhos e folhas da espécie *A. nitidum* por métodos cromatográficos e espectrométricos.
- Obter perfis cromatográficos das frações e substâncias obtidas por métodos cromatográficos e espectrométricos.
- Isolar e identificar os constituintes químicos dos extratos brutos das amostras de cascas, galhos e folhas de *A. nitidum* por meio de métodos clássicos e modernos.
- Avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral dos extratos, frações e substâncias isoladas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Escolha da espécie vegetal**

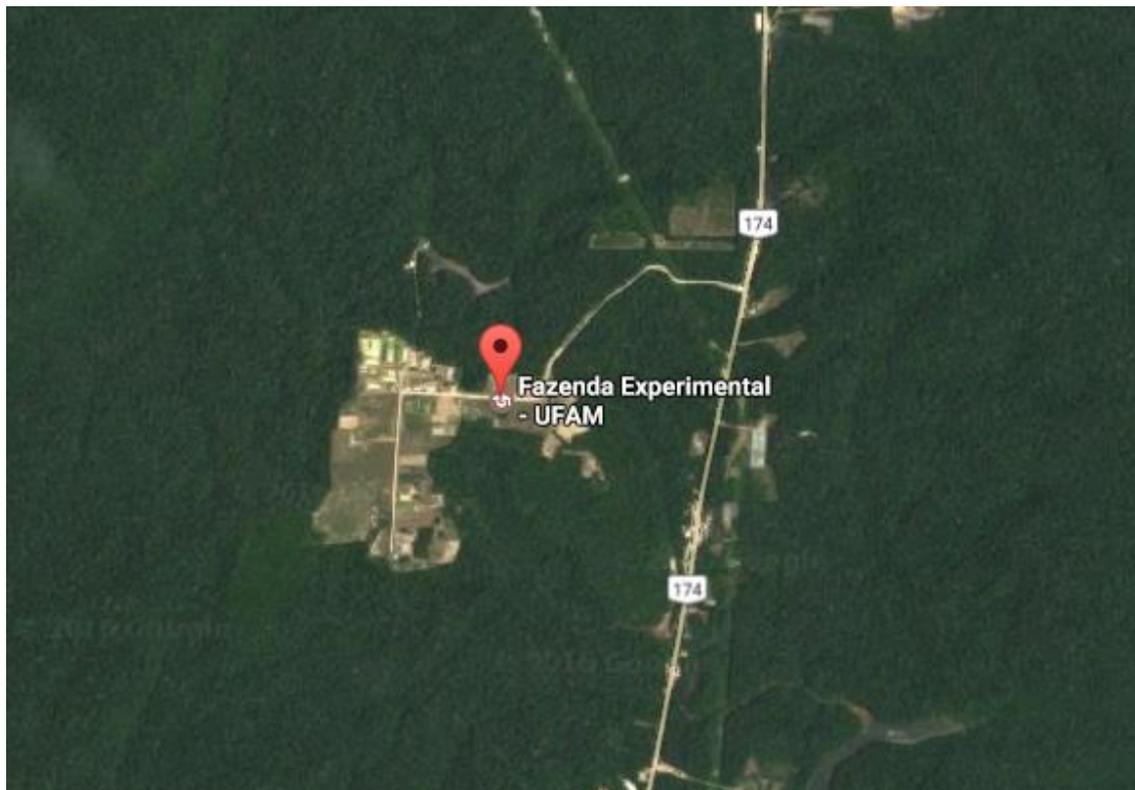
A escolha da planta foi realizada de acordo com os objetivos propostos pelo grupo de pesquisa de produtos naturais da UFAM, e ainda devido aos poucos trabalhos realizados com determinadas espécies vegetais. Dessa forma, a escolha da espécie vegetal *Aspidosperma nitidum* foi realizada segundo a informação popular sobre o uso de espécies do gênero para o tratamento de doenças uterinas e outras enfermidades como citado na revisão de literatura apresentada neste trabalho, com base ainda nesta revisão, justifica-se os ensaios anti-inflamatório, antioxidante, citotóxico e acetilcolinesterase.

### **4.2. Coleta do Material**

A espécie vegetal *Aspidosperma nitidum* foi coletada na fazenda experimental da Universidade Federal do Amazonas, localizada na AM-010, no município de Manaus, Amazonas, como mostra a Figura 7 abaixo, especificamente sob latitude e longitude 2° 38' 58" Sul e 60° 3' 12" Oeste respectivamente, sendo depositada sua exsicata no herbário HAUM/UFAM sob registro nº 10224, coleção SILVA, S.S. & SALES, M. L. F., 701. O projeto está cadastrado na plataforma do sistema nacional de gestão patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SISGEN) sob inscrição A5BEF8A.

E assim, depois de seco, o material vegetal foi selecionado e devidamente separado em: folhas, galhos e cascas. Cada parte foi moída em moinho de facas e em seguida cada fração pesada, acondicionada em sacos de papel e posteriormente guardada em freezer.

Figura 7- Vista aérea da área de coleta da espécie vegetal *A. nitidum*.



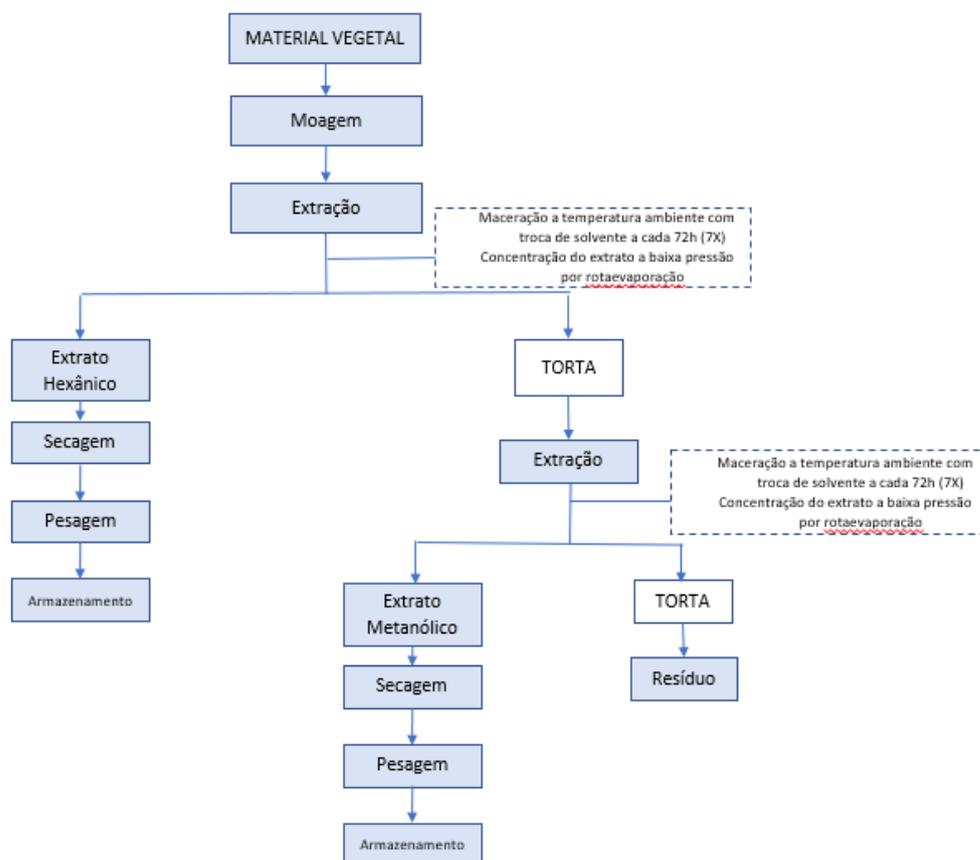
Fonte: Google maps

#### 4.3. Obtenção dos extratos

Realizou-se a maceração das cascas do caule, folhas e galhos secos triturados para realização de extrações sucessivas, no período de 3 dias, com sete repetições. Inicialmente foi usado hexano e em seguida metanol. Os extratos passaram por filtração e em seguida rotaevaporados. Após a secagem dos extratos, os mesmos foram reservados em frascos e armazenados sob refrigeração para a realização dos ensaios conforme fluxograma da Figura 8.

Ao extrato metanólico foi submetido ao monitoramento dos componentes alcaloídicos através de cromatografia de camada delgada, com o revelador Dragendorff e diversos sistemas de eluição com objetivo de separação dos componentes.

Figura 8 - Fluxograma geral operacional utilizado para obtenção dos extratos de *A. nitidum*.



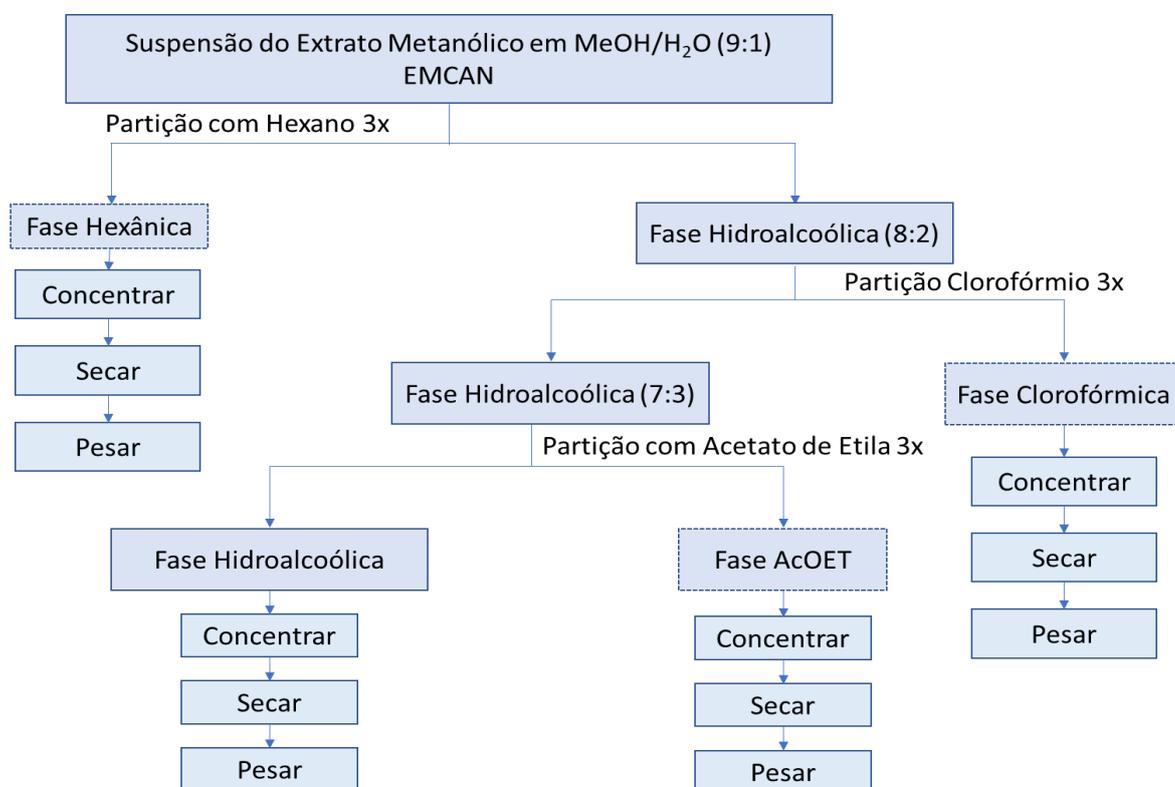
Fonte: Autora

Foram utilizados na preparação dos extratos, as quantidades de 1200 g, 700 g e 1000 g de cascas, galhos e folhas respectivamente, todos já secos e moídos.

#### 4.3.1. Fracionamento dos extratos

Foi realizada a partição de 10 gramas de extrato metanólico da casca, no qual foram empregados os solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Resultando em 4 fases, das quais, as três primeiras foram rotaevaporadas e secas em capela, enquanto a última, hidroalcoólica, depois de rotaevaporada, posteriormente congelada e liofilizada. Estas etapas ocorreram de acordo com o fluxograma demonstrado na Figura 9 abaixo. Depois de seco, as fases da partição foram pesadas e armazenadas sobre refrigeração para as análises posteriores.

Figura 9- Fluxograma da partição líquido-líquido.



Fonte: Autora

#### 4.4. Métodos espectrométricos e espectroscópicos

Foi utilizado o espectrômetro de massa do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM/CA-UFAM), modelo LQC Fleet (Thermo Scientific) para análise dos perfis dos extratos, frações assim como das substâncias. Com esta técnica foi possível conhecer as possíveis similaridades ou não das amostras norteando a sequência do trabalho.

A análise no espectrômetro de massas com analisador do tipo *ion-trap*, com injeção direta, foi realizada por fonte *eletronspray* (ESI) e sua faixa de detecção de 100-1000 Da.

O processo de preparação das amostras analisadas pelo espectrômetro de massas passou por uma sequência de diluição com o objetivo preservar o equipamento, cujo procedimento foi realizado da seguinte forma: pesou-se 1 mg da amostra e adicionou-se 1 mL de metanol (grau CLAE), desta solução são

retirados 20  $\mu$ L e novamente diluídos em 1 mL de metanol. Os dados obtidos foram processados através do programa Xcalibur 2.0.7, sendo comparados com os dados da literatura quando possível.

As análises de espectrometria de alta resolução foram realizadas, na central analítica no laboratório temático de química de produtos naturais (CA-LTQPN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no equipamento da (Brucker Daltonics, modelo Micro TOF-QII) através de fonte ESI, para determinar a massa molecular exata das substâncias.

Os espectros de RMN foram obtidos pelo aparelho da Bruker Advance III HD, operando a 500 MHz com tetrametilsilano (TMS) ou núcleo de hidrogênio residual do solvente deuterado como referencial interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) serão registradas em Hertz (Hz). Os dados obtidos das injeções foram processados através de um programa chamado TopSpin 3.5 e comparados quando possível, com os dados da literatura para elucidação estrutural das substâncias.

Os espectros de infravermelho foram obtidos pelo equipamento da marca Thermo Scientific modelo Smart Omni – transmission, localizado na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Essa análise teve a finalidade de caracterização dos grupos funcionais dos compostos isolados, a partir da formação das bandas no espectro.

#### **4.5. Isolamento dos principais constituintes químicos dos extratos**

Por intermédio da técnica de coluna cromatográfica de bancada (CC), foram obtidas as frações que foram qualificadas através de placas comparativas, cromatografia em camada delgada (CCD) assim como, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A fase clorofórmica foi submetida a coluna cromatográfica de sílica gel (70-230 mesh) onde foram utilizados como eluentes clorofórmio/metanol onde foram obtidas 55 frações e de acordo com sua similaridade em CCD foram reunidas conforme Tabela 2 abaixo totalizando 14 frações.

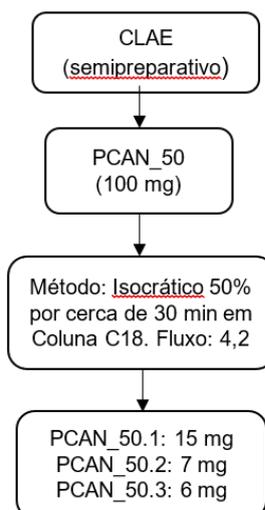
Tabela 2 - Reunião das frações da coluna da PCAN.

Grupos de Frações PCAN	Frações	Massa(mg)
1 - 7	<b>1</b>	volume morto
8 - 9	<b>8</b>	<b>985,4</b>
10	<b>10</b>	<b>128,9</b>
11 - 16	<b>11</b>	<b>248,5</b>
17	<b>17</b>	<b>40,6</b>
18 - 20	<b>20</b>	<b>105,5</b>
21 - 25	<b>21</b>	<b>187,8</b>
27 - 30	<b>27</b>	<b>74,6</b>
31 - 34	<b>31</b>	<b>56,6</b>
35 - 37	<b>35</b>	<b>41,8</b>
38 - 44	<b>38</b>	<b>17,4</b>
47 - 49	<b>47</b>	<b>38,1</b>
50-52	<b>50</b>	<b>137,6</b>
53	<b>53</b>	<b>157,9</b>
54 - 55	<b>54</b>	<b>67,3</b>

Fonte: Autora

A amostra PCAN\_50 apresentou coloração laranja quando revelada com dragendorff o que sugere positivo para alcalóides, além disso, apresentou também em CCD características bem polares o que tornou possível sua análise por cromatografia líquida de alta resolução CLAE em fase reversa. Foi, portanto, realizado um *clean-up* da amostra utilizando coluna cromatográfica aberta, fase estacionária sílica reversa C18, e fase móvel, metanol. Depois de seco, preparou-se a amostra utilizando 1 mg da amostra e solubilizou em 1mL de MeOH grau CLAE e então foi submetida ao CLAE analítico e posteriormente ao semipreparativo, onde foram utilizadas 100mg da amostra diluída em DMSO, e o que possibilitou isolar três frações cujas condições de separação estão descritas no fluxograma da Figura 13.

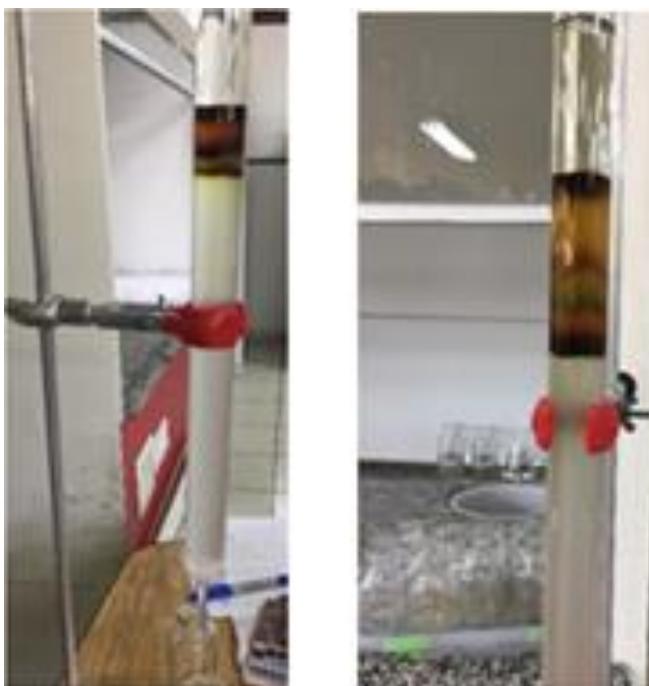
Figura 10 -- Fluxograma ilustrativo do fracionamento por CLAE da amostra PCAN\_50.



Fonte: Autora

A fração 8 foi fracionada utilizando coluna cromatográfica com fase estacionária, sílica gel (230-400 mesh), cromatografia flash e fase móvel os solventes clorofórmio/metanol (Figura 11), iniciou com 100% do solvente menos polar, no caso o clorofórmio, em seguida um gradiente 99:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH até 1:1 ou decrescendo e aumentando em uma unidade de proporção o solvente menos polar (CHCl<sub>3</sub>) e o mais polar (MeOH) respectivamente, e por último 100% MeOH, resultando em 46 frações nas quais foram feitas as CCD e de acordo com isso foram reunidas em 23 frações como mostra a Tabela 3.

Figura 11- Coluna Cromatográfica em sílica flash fase normal da amostra PCAN\_8, sistema Clorofórmio/ Metanol.



Fonte: Autora

É importante salientar que apesar de usar sílica flash (~100 mg). A cada 50 mL aproximadamente, cada fração era coletada na qual posteriormente foi submetida a rotaevaporação e secagem em capela.

Depois de seco e pesado, todas as frações foram analisadas por espectrometria de massas, injeção direta, fonte eletronspray modo positivo e negativo, foi utilizado o espectrômetro de massa do Laboratório de Espectrometria de Massas e CLAE (LABCEM/CA-UFAM), modelo LQC Fleet (Thermo Scientific).

Tabela 3-Reunião das frações da coluna cromatográfica aberta da amostra PCAN\_8.

Grupos de Frações PCAN_8	Frações	Massa(mg)
1-11	1	21,6
12-13	2	477,7
14-15	3	20
16-17	4	9,4
18	5	4,0
19-20	6	6,8
21	7	2,0
22	8	2,4
23-14	9	3,9
25	10	1,6
26-32	11	3,9
33	12	0,8
34	13	1,2
35-36	14	2,1
37-38	15	1,8
39	16	0,5
40	17	0,4
41	18	0,9
42	19	0,9
43	20	1,0
44	21	3,1
45	22	8,8
46	23	19,7

Fonte: Autora

A fração 8.2 foi submetida a mais um processo de cromatografia, em sílica fase normal, utilizou-se como sistema de eluentes também  $\text{CHCl}_3$ /metanol, iniciando com 100% clorofórmio até 1:1, seguindo para 2:8 até finalizar com 100% metanol foram obtidas 38 frações.

Estas frações também foram novamente avaliadas por CCD e espectrometria de massas, no qual a fração PCAN\_8.2.2, revelou positivo para dragendorff, sendo, portanto, submetida a análise por CLAE analítico e a partir do método de separação obtido, foi submetida a CLAE semipreparativa em modo isocrático 40% (Figura 12), por cerca de 35 minutos, utilizando como solventes

metanol/água, onde foram feitos os cálculos para as devidas proporções, conforme mostrado no fluxograma da Figura 13.

Figura 12- Espectro de CLAE analítico do composto PCAN\_8.2 em modo isocrático 40% MeOH/água.

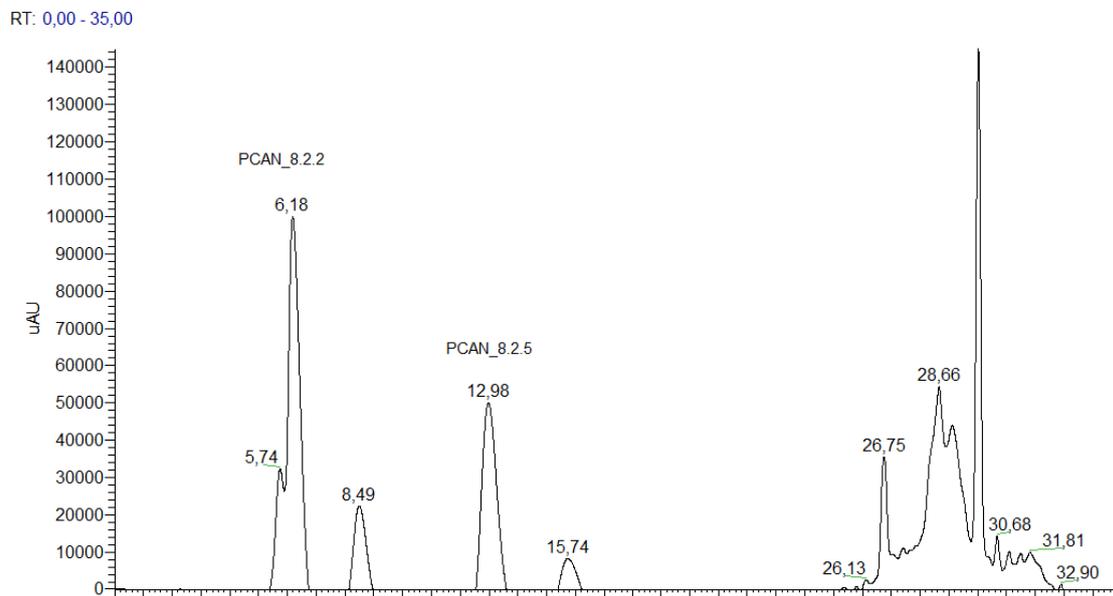
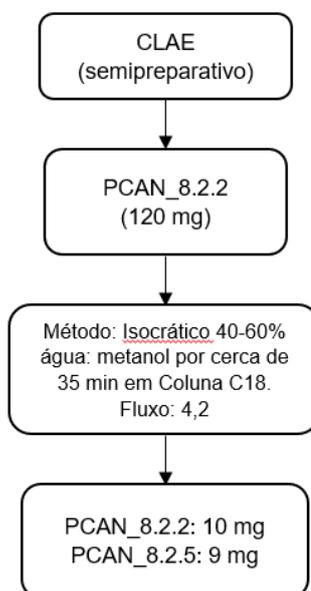


Figura 13- Fluxograma ilustrativo do isolamento das substâncias presentes na fração PCAN\_8.2 por CLAE.



Fonte: Autora

A fase hidroalcoólica obtida por partição, foi submetida a separação por cromatografia de bancada, coluna aberta, utilizou-se como adsorvente a sílica reversa C18 devido a maior polaridade dos constituintes da amostra.

Como eluentes, foram utilizados água e metanol, iniciou-se com o solvente mais polar, no caso a água, em seguida uma proporção 9:1 (H<sub>2</sub>O/ MeOH) seguindo de um em um até o gradiente 6:4, a partir daí prosseguiu-se uma eluição mais lenta de 0,5 em 0,5, ou seja, o próximo sistema de eluição foi 5,5:4,5 mantendo este acréscimo até o gradiente 3:7 (H<sub>2</sub>O/ MeOH), finalizando com a eluição de 100% MeOH.

Foram coletados 63 frações com aproximadamente 75 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas conforme Tabela 4 abaixo totalizando 18 frações.

Tabela 4- Reunião das frações da coluna cromatográfica reversa da amostra PHAAN.

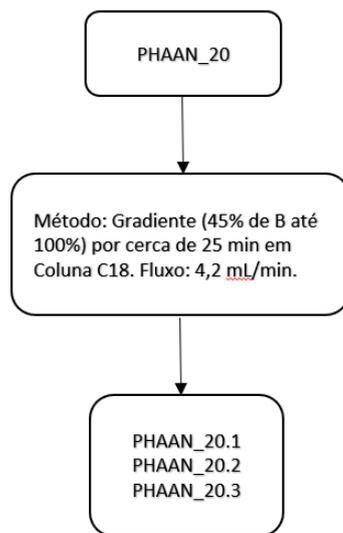
<b>Grupos de Frações reunidas</b>	<b>Fração</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>1-9</b>	Volume morto	-
<b>10-13</b>	10	477,6
<b>14</b>	14	164,9
<b>15</b>	15	106,0
<b>16</b>	16	
<b>17</b>	17	5,1
<b>18</b>	18	
<b>19</b>	19	28,6
<b>20-24</b>	20	158,3
<b>25-27</b>	25	68,9
<b>28</b>	28	37,1
<b>29-31</b>	29	136,3
<b>32-34</b>	32	36,7
<b>35-36</b>	35	19,9
<b>37-38</b>	37	15,0
<b>39-40</b>	39	14,0
<b>41-58</b>	41	
<b>59-60</b>	59	31,4
<b>61-63</b>	61	70,1

Fonte: Autora

Algumas destas frações foram liofilizadas, e depois de secas, todas foram pesadas e feita análise por varredura completa (*fullscan*) com intuito de monitorar e comparar os espectros obtidos com a literatura além de definir qual amostra seria trabalhada inicialmente.

Com base nestes dados, foram selecionadas as amostras PHAAN\_10, 14, 15, 20 e 61 para otimização de método de separação por cromatografia líquida (CLAE), no qual, as amostras mais promissoras foram, com intuito de isolamento, submetidas a separação por meio de CLAE semipreparativo devidamente escalonado como mostra o fluxograma da Figura 14 abaixo.

Figura 14- Fluxograma ilustrativo do isolamento das substâncias presentes na fração PHAAN\_20 por CLAE.



Fonte: Autora

Todas as substâncias obtidas foram submetidas a análise por espectrometria de massas e ressonância magnética uni e bidimensionais, assim como, quando possível, experimentos na região do UV-Visível e infravermelho com intuito de identificação e determinação estrutural.

## 4.6. Ensaio Biológicos

### 4.6.1. Atividade Antioxidante

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O radical DPPH possui coloração púrpura, absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 518 nm.

O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe o átomo de hidrogênio, sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH e a amostra, em solução. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela

porcentagem de DPPH restante no sistema. Então a porcentagem de DPPH restante é proporcional a concentração de antioxidante (SANCHEZ-MORENO, 2002; BONDET et al. 1997).

A absorção foi lida em um equipamento de ultravioleta (ALDARRAJI et al 2013). A amostra do controle foi preparada utilizando o mesmo método, sem amostra. O padrão de controle positivo foi a quercetina (ALDARRAJI et al HALIMOON E MAJID, 2013), as análises foram feitas em triplicata e o resultado capacidade de sequestro,  $CS_{50}$ , foi obtido plotando-se o gráfico de concentração e percentual de Atividade Antioxidante (AA) que foi obtido através da equação abaixo:

$$AA = \frac{100 - (amostra - branco) \times 100}{controle\ negativo}$$

#### 4.6.2. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) está baseada na medição da taxa de produção da tiocolina à medida que a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase, de acordo com os protocolos de ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001. Os ensaios foram realizados em microplacas, com a adição da enzima AChE (Sigma-Aldrich, Enzima acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* tipo VI-S, pó liofilizado), reagente de Ellman, solução-tampão Tris-HCl pH 8,0 e a solução avaliada em diferentes concentrações além de um grupo controle, em 405 nm.

Os neurônios colinérgicos estão relacionados com importantes funções como o alerta, o controle motor, o aprendizado e a memória, e todas essas ações exercidas pela AChE estão prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor (VINUTHA et al., 2007).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima cuja ação é crucial na propagação do impulso nervoso. A AChE inativa a ação do neurotransmissor acetilcolina hidrolisando-o em acetato e colina (MOTA et al, 2012). Evidências demonstram que doenças neurodegenerativas como o Alzheimer relacionam-se com a degeneração do sistema colinérgico, devido principalmente a diminuição

dos níveis plasmáticos de acetilcolina (VINUTHA et al., 2007) o que justifica a importância deste ensaio.

Uma substância recentemente aprovada, de origem vegetal, é a galantamina extraída de várias espécies *Gallanthus* e *Narcissus* (família Amarilidaceae), a qual tem sido utilizada no tratamento da DA, e tem mostrado grande melhoria na vida para os pacientes (HORST, 2012). Atualmente produzido sinteticamente, é considerada a mais efetiva no tratamento da doença de Alzheimer. Esses medicamentos apresentam diversos efeitos colaterais tais como hepatotoxicidade, problemas gastrintestinais e relacionados com a biodisponibilidade desse fármaco, como tacrina, com curta meia vida (MUREBWAYIREA et al., 2009).

A atividade inibidora da acetilcolinesterase foi avaliada quantitativamente usando um leitor de Elisa da BioTek, modelo Elx800, tendo como base o método de ELLMAN (1961). Inicialmente foram adicionados nas cavidades da placa de Elisa a amostra em seis diferentes concentrações juntamente com tampão fosfato 0,2 M e DTNB em seguida foram misturados com a enzima AChE.

A mistura foi incubada por cerca de 15 min a 25°C. Foi adicionado iodeto de acetilcolina (AChI) em todos os poços e em seguida, a microplaca foi levada ao espectrofotômetro em 405 nm e então mensurada cineticamente durante 30 minutos.

Ressalta-se que todas as amostras foram analisadas em triplicada. O ensaio teve como controle negativo o tampão fosfato. O padrão utilizado como controle positivo foi a neostigmina [100 µg/mL]. Foi utilizado o software Excel para determinação do percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase e o software GraphPad Prism 7.0 para determinação do  $CI_{50}$  somente para as amostras com percentual de inibição superiores a 50%.

A curva de inibição foi obtida construindo-se um gráfico com o percentual de inibição versus o logaritmo da concentração do inibidor (extrato, substância isolada ou controle positivo), os parâmetros de regressão não-linear foram determinados para a curva e os valores de  $IC_{50}$  foram obtidos utilizando-se o GraphPad Prism 7.0.

A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada com o auxílio da equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(C-A) \times 100] / C$$

Onde **C** representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco do substrato e **A** corresponde a absorbância da amostra subtraída do branco. Os resultados são então expressos como o percentual de atividade enzimática remanescente (ELLMAN, 1961).

#### 4.6.3. Atividade Antitumoral

Os ensaios antitumorais foram realizados em parceria com o prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa com a colaboração do Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra da FIOCRUZ/Bahia.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10mg/mL (para extratos-óleos essenciais). As amostras foram testadas na concentração única de 50µg/mL para extratos.

Foram utilizadas células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentaram-se negativas para micoplasma, conforme avaliado pela coloração com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos teste. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de

tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/ célula viável). A redução do alamar blue, reflete a proliferação celular. Este, foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células em suspensão e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, os compostos testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.*, 1994).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento dos extratos

Os extratos obtidos apresentaram os seguintes rendimentos conforme Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 - Massa dos extratos e seus respectivos rendimentos percentuais.

Extratos	Material vegetal	Hexânico		Metanólico	
	(g)	(g)	%	(g)	%
Casca	1200	7,8197	0,65	11,7478	0,98
Galho	700	26,4443	3,78	42,8925	6,13
Folha	1000	63,9544	6,40	89.8033	8,98

Fonte: Autora

Com estes resultados, pode se observar que os extratos obtidos das cascas de *A. nitidum* apresentaram rendimentos inferiores aos galhos e folhas tanto hexânico como metanólico. É importante ressaltar que esses últimos, folhas e galhos, apresentaram grande quantidade de látex o que pode ter influenciado no rendimento.

### 5.2. Rendimentos das Partições líquido-líquido

Apesar dos baixos rendimentos com as cascas, esta amostra foi selecionada para início dos trabalhos, por se tratar da parte da planta mais utilizada popularmente e de acordo com as CCD's mostrou resultado promissor quando revelado com Dragendorff.

Com isso, foi feita a partição do extrato metanólico das cascas, utilizando 10 g desse material, foi possível obter o rendimento mostrado na Tabela 6. Pode se perceber, que os maiores rendimentos foram na fase hidroalcoólica e clorofórmica, onde se espera que além de outras classes, nestas frações, é provável obter alcaloides de média e alta polaridade. Devido ao caráter básico de

**alguns dos alcaloides, é esperado maior afinidade com a fase clorofórmica, entretanto, devido à complexidade dos alcaloides indólicos, é possível que estes apresentem alta polaridade.**

Tabela 6 - Massas e rendimentos da partição líquido-líquido do extrato metanólico das Cascas de *A. nitidum*.

<b>Fase</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Hexânica</b>	<b>1,3324</b>	<b>13,32</b>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	<b>3,8081</b>	<b>38,8</b>
<b>Acoet</b>	<b>0,9972</b>	<b>9,97</b>
<b>Hidroalcoólica</b>	<b>4,5645</b>	<b>45,64</b>

Fonte: Autora

Foi observado que as amostras ionizaram melhor no modo positivo utilizando a fonte ESI, o que é esperado para os alcaloides, visto que, estes podem apresentar elétrons livres no nitrogênio o que confere característica básica, facilitando a protonação.

Com estes resultados pode se destacar o íon  $m/z$  427  $[m-H]^+$ , contudo, analisando a literatura, não foi possível identificá-lo, prosseguindo portanto com o trabalho no intuito de isolá-lo. Apesar dos espectros de massas demonstrarem uma matriz mais limpa, com as CCD's foi possível observar que se tratava de uma matriz complexa e portanto, inicialmente a fase da partição clorofórmica (PCAN) (Figura 15), foi submetida a coluna cromatográfica.

Figura 15- Fracionamento do extrato metanólico por partição líquido-líquido.



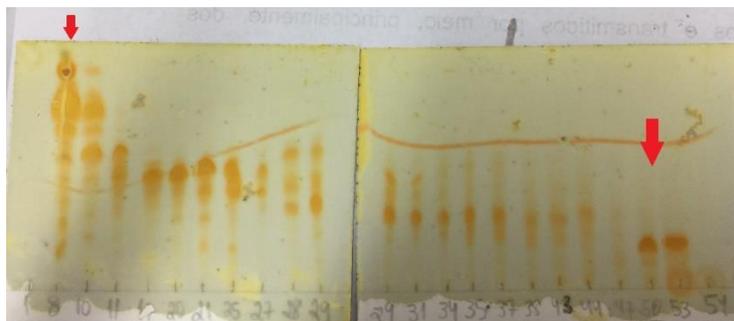
Fonte: Autora

### 5.2.1. Fase Clorofórmica

*O fracionamento em coluna cromatográfica da partição clorofórmica resultou em 14 frações, sendo que os estudos foram direcionados para as frações 8 e 50. Esta última, apresentou CCD possível para ser analisada por CLAE, e assim foram testados os métodos para então ser fracionada por CLAE semipreparativo, o que foi possível coletar três substâncias nomeados de PCAN\_50.1, PCAN\_50.2 e PCAN\_50.3, das quais, todas as CCD's apresentaram coloração laranja quando revelado com Dragendorff, o que é indicativo de alcaloides.*

*Enquanto a fração 8 foi necessário fracionar por coluna aberta e então, obtida a fração 8.2, que foi fracionada por CLAE, sendo possível coletar duas substâncias que também apresentaram positivo para alcaloide quando revelado com Dragendorff (Figura 16).*

Figura 16 - CCD's das frações da primeira coluna da fase  $\text{CHCl}_3$  revelado com Dragendorff, em destaque as frações 8 e 50.

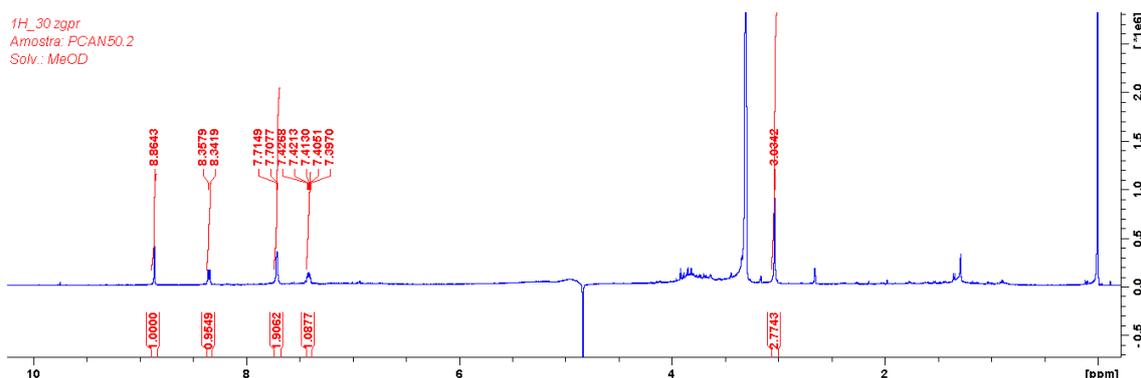


Fonte: Autora

### 5.2.1.1 Substância PCAN\_50.2

A substância PCAN\_50.2 (1,0 mg) foi obtida como sólido amorfo com coloração levemente amarelada, solúvel em metanol, e quando analisada por CCD, utilizando como revelador o Dragendorff, apresentou coloração laranja característico da natureza alcaloídica.

A partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , Figura 17, pode-se notar grupos de sinais referentes a hidrogênios aromáticos com deslocamento químico de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  8,86 ppm, simpleto, provavelmente pertencente ao anel C, visto que esse hidrogênio não apresenta hidrogênios vizinhos o que justifica o tipo de sinal (s). Ainda nesta região,  $\delta_{\text{H}}$  8,34 (d;  $J= 8,0$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,70 e 7,71 (d;  $J= 3,0$  Hz; 1H) além do hidrogênio,  $\delta_{\text{H}}$  7,40 (t;  $J= 8,0$  e 3,0 Hz, 1H), com constantes de acoplamento *orto* e *meta* correlacionando entre si referentes aos hidrogênios H-9, H-10, H-12 e H-11 respectivamente atribuídos ao anel A. Foi observado ainda, um sinal referente ao hidrogênio metílico  $\delta_{\text{H}}$  3,0 (s) no qual foi atribuído ao hidrogênio H-14.

Figura 17 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância PCAN\_50.2.

Devido a pouca massa não foi possível obter outros experimentos de RMN, contudo, a análise do espectro de massa ESI modo positivo, evidenciou a presença de um pico com maior intensidade em  $m/z$  227,27, referente ao íon  $[\text{M}-\text{H}]^+$ , em seguida, foi realizada a fragmentação do mesmo (Figura 18) apresentando uma perda de 18 u.a. característica de perda de água. Com os dados expostos e por comparação com a literatura (Tabela 7) foi possível identificar este íon como sendo o alcalóide indólico ácido 3-harmanocarboxílico cuja fórmula molecular é  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$  (Figura 19).

Figura 18 – Fragmentação da substância PCAN\_50.2.

FRAG\_227\_ESI#146 RT: 2,05 AV: 1 NL: 6,02E1  
T: FTMS + c ESI Full ms2 227,00@cid40,00 [60,00-]

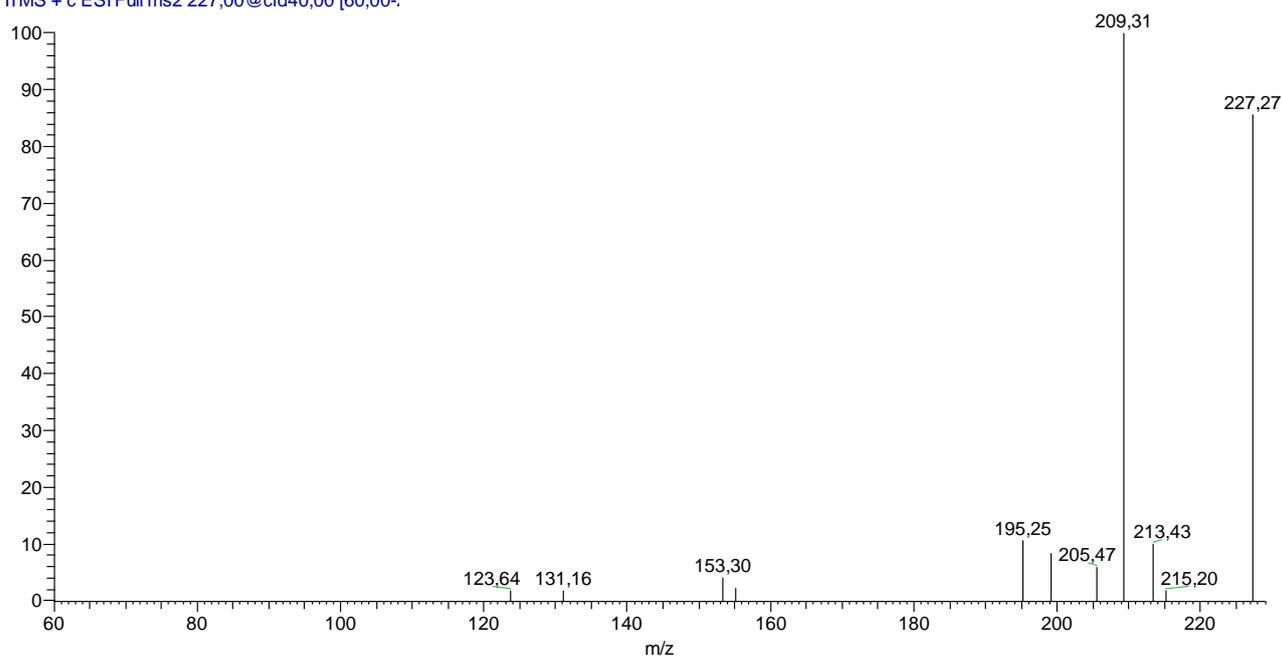
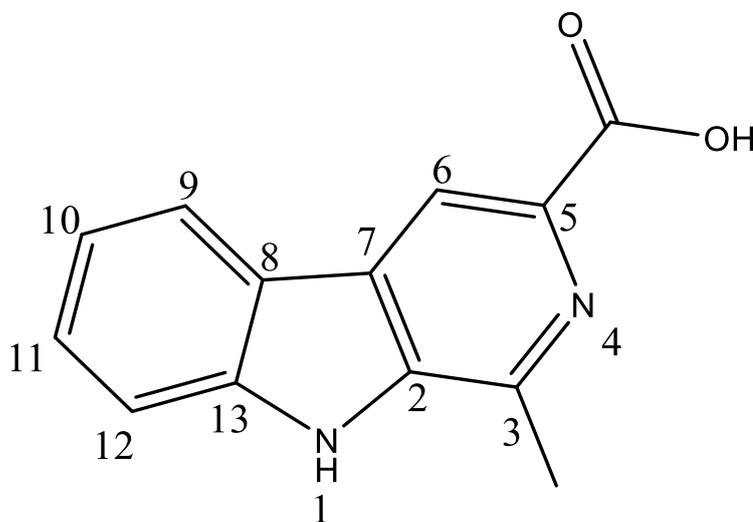


Tabela 7- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (em ppm) para o alcalóide indólico estudado em MeOD, em comparação com dados da literatura obtido em DMSO- $d_6$ .

H	PCAN_50.2 estudado em MeOD	PEREIRA et al, 2006 em DMSO
H-6	8,86 s	8,75 s <sup>a</sup>
H-9	8,34 d (J = 8,0)	8,33 d <sup>b</sup> (J = 7,85)
H-10	7,71	7,29 t <sup>c</sup> (J = 7,38)
H-11	7,41 t (J = 8,0 e 3,0)	7,58 t (J = 7,55)
H-12	7,70	7,58 t (J = 7,55)
H-14	3,00 s	2,82 s

(a) s = simpleto; (b) d = duplete; (c) t = tripleto. Fonte: Autora

Figura 19 - Estrutura da substância PCAN\_50.2 identificada como o alcaloide do tipo harmano, cuja nomenclatura é ácido 3-harmanocarboxílico.



Fonte: Autora

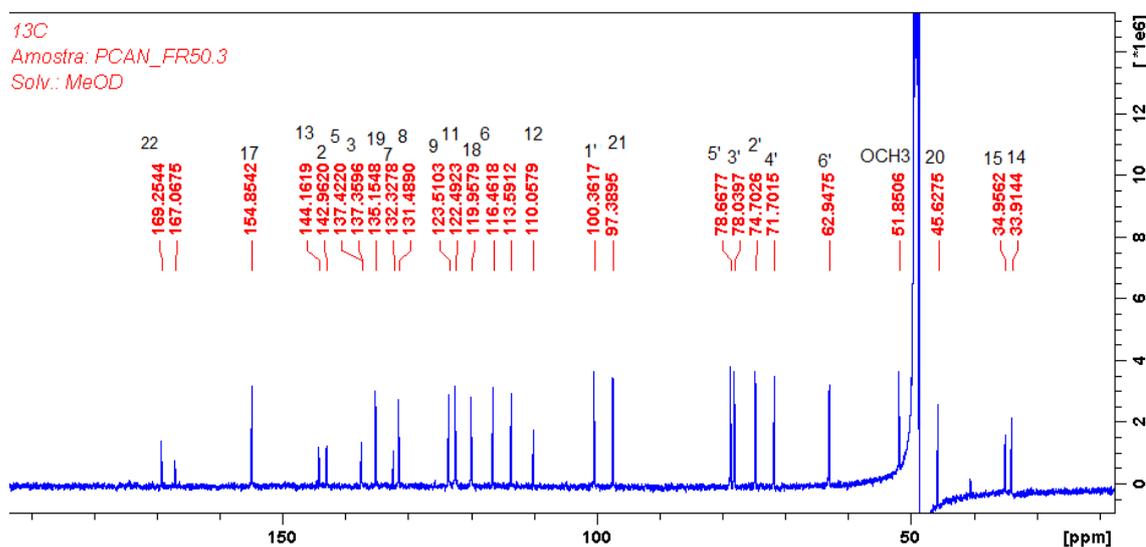
#### 5.2.1.4 Substância PCAN\_50.3

A substância apresentou-se como sólido amorfo de coloração levemente amarronzada, quando submetida a CCD, apresentou reação

positiva frente ao reagente Dragendorff o que indica presença de alcalóide.

A análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 500 Mz), HSQC e HMBC permitiu a identificação de 28 carbonos, os quais foram atribuídos a nove carbonos quaternários, incluindo dois carbonos carbonílicos de éster em  $\delta_{\text{C}}$  169,25 (C22) e 167,06, seis carbonos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  131,52 (C8); 144,22 (C13); 132,37 (C7); 142,97 (C2); 137,35 (C3); 137,43 (C5) e um carbono olefínico em  $\delta_{\text{C}}$  110,36, quinze carbonos metínicos, dentre eles, cinco aromáticos com deslocamentos em  $\delta_{\text{C}}$  116,48 (C6); 123,51 (C9); 113,59 (C10) 122,49 (C11); 122,52 (C12); 6 carbonos oximetínicos sendo cinco atribuídos a uma molécula de glicose e o outro ao C21, dois olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  154,85 (C17); 135,15 (C19), além dos carbonos alifáticos 15 e 20. Três carbonos metilênicos, sendo um olefínico terminal em  $\delta_{\text{C}}$  119,95 (C18), um saturado em  $\delta_{\text{C}}$  33,91 (C14), um oximetilênico em  $\delta_{\text{C}}$  62,94 (C19) e por fim um sinal de carbono metoxílico em  $\delta_{\text{C}}$  51,85 (Figura 20).

Figura 20- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em MeOD da substância em estudo PCAN\_50.3



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD, 500Mz) (Figura 21), foram observados sinais relativos a hidrogênio aromáticos, característicos de anel indol não substituídos em  $\delta_{\text{H}}$  8,32 (d; 1H;  $J$  8,0); 7,69 (sl); 7,696 (sl); 7,39 (m; 1H). Os hidrogênios 7,69 e 7,696 encontram-se com sinais distorcidos pela sobreposição

e com isso mais largos apresentando-se como singletto largo. Com a associação da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  associado ao espectro de HSQC, pôde-se perceber que de fato não se trata de um sinal relativo a 2H, visto que cada um correlaciona com carbonos diferentes (Figura 22).

Figura 21- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD, 500 Mz) da substância em estudo PCAN\_50.3.

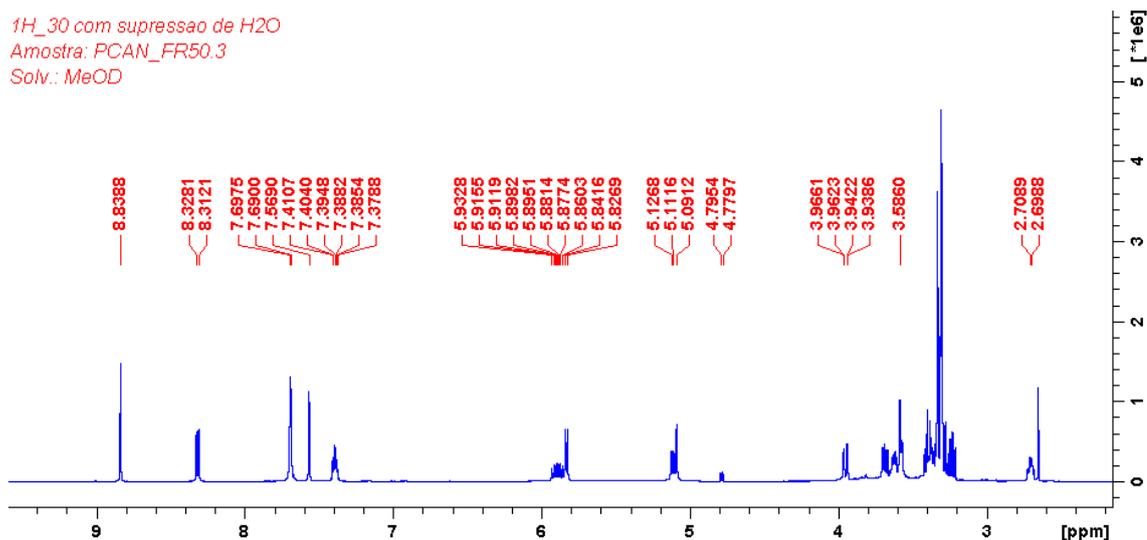
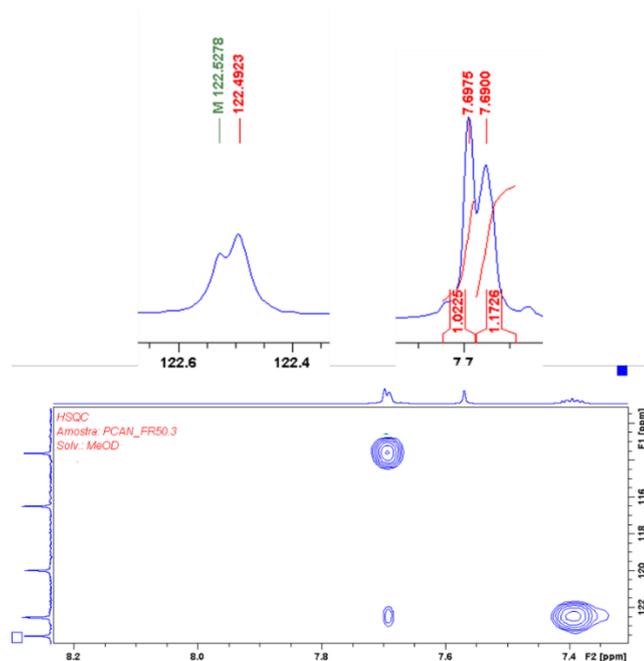


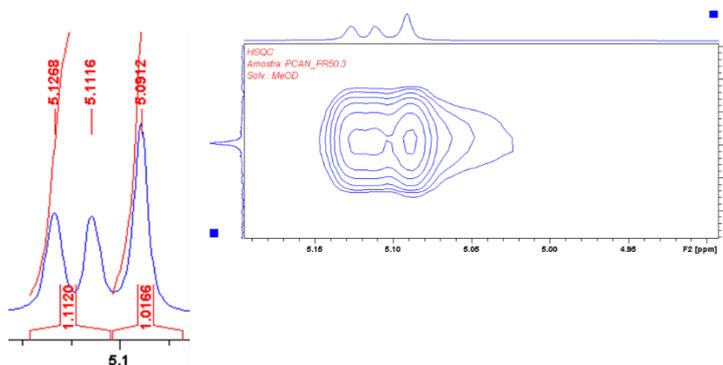
Figura 22- À direita tem-se a ampliação da região do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  referente aos hidrogênios H10 e 12, abaixo sua devida correlação em  $^1J_{CH}$  no espectro de HSQC entre os carbonos C10 e C12 respectivamente da substância PCAN\_50.3.



Fonte: Autora

Um sinal adicional observado em  $\delta_H \approx 8,83$  (s, H-6), correlacionado com um sinal de carbono em  $\delta_C \approx 167,06$  (C-24) pelo espectro de HMBC, evidenciaram a presença da unidade  $\beta$ -carbolínica substituída no carbono C-5 pelo grupo carboxila. Além de uma unidade secologanina, cujo sinal característico é um sinal de hidrogênio olefínico em  $\delta_H \approx 7,56$  (s/l, H-17) correlacionado ao carbono  $\delta_C \approx 153,1$ , no espectro de HSQC. Outros sinais indicativos da unidade secologanina, atribuídos ao grupo vinílico terminal, os sinais de hidrogênio em  $\delta_H \approx 5,11$  e  $\delta_H \approx 5,09$  ppm, correlacionados ao carbono em  $\delta_C \approx 119,95$  pelo espectro de HSQC.

Figura 23- À esquerda, apresenta a ampliação do espectro de RMN  $^1H$  da região dos hidrogênios 5,11 e 5,09 ppm e a direita o espectro de HSQC onde evidencia a correlação entre o carbono vinílico terminal C18 e os hidrogênios em questão.



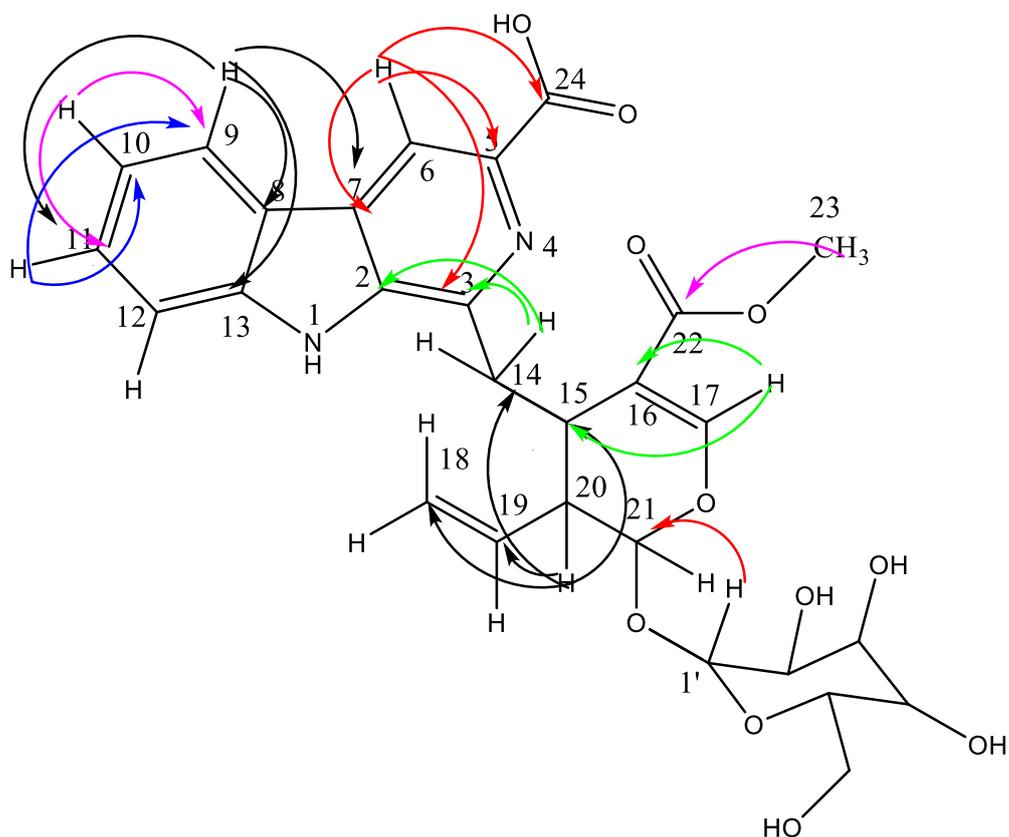
Fonte: Autora

O sinal de hidrogênio anomérico em  $\delta_H \approx 4,78$  (d,  $J = 8$  Hz, H-1') indicou a presença de uma unidade glicosídica e o valor da constante de acoplamento é indicativo da configuração  $\alpha/\beta$  para o açúcar. A posição da unidade glicosídica na molécula foi determinada pelo espectro de HMBC, que apresentou a correlação entre o hidrogênio anomérico H-1' e o carbono  $\delta_C \approx 97,46$  (C-21) (Figura 24).

A conexão da unidade secologanina à unidade  $\beta$ -carbolínica foi determinada com base na análise do espectro de HMBC, que mostrou a correlação entre os hidrogênios metilênicos H-14 em  $\delta_H \approx 3,58$  e  $3,57$  e o carbono C-3 em  $\delta_C \approx 137,43$  (Figura 24). Também, pelo espectro de HMBC foi possível

observar as correlações entre o hidrogênio  $\delta_H$  2,70 (H 20) e os carbonos C14, C15, C16, C18 e C19 o que corrobora com a estrutura proposta (Figura 24).

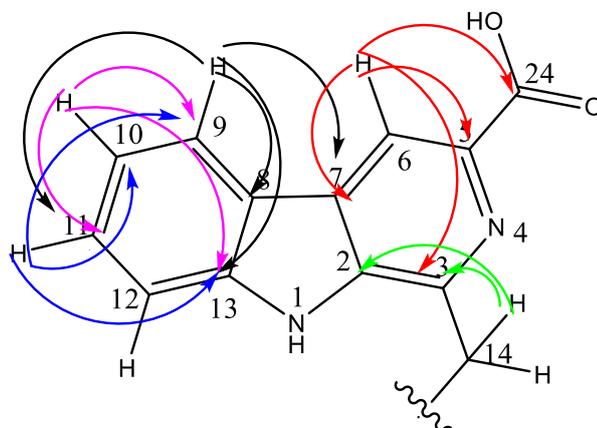
Figura 24- Fragmento proposto da substância em estudo PCAN\_50.3 e as correlações HMBC que corroboram com tal estrutura.



Fonte: Autora

Através dos dados obtidos dos espectros uni e bidimensionais, pôde-se propor a estrutura dos anéis aromáticos e o indol. Através do espectro a longa distância HMBC, observa-se as correlações entre o hidrogênio  $\delta_H$  8,32 e os carbonos  $\delta_C$  144,22 e 122,49 ppm.

Figura 25- Fragmentação proposta da região aromática-indol da substância em estudo PCAN\_50.3 e suas correlações a longa distância HMBC.



Fonte: Autora

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e HMBC estão apresentados na Tabela 8.

A análise de espectrometria de massa ESI-MS apresentou um íon molecular, no modo positivo, de  $m/z$  de 571,1947 (Figura 26), assim como uma proposta de fórmula molecular com baixo erro e que corresponde aos dados analisados nos espectros de RMN. Sua fragmentação (Figura 27) apresentou um íon mais abundante de 409, gerado a partir da perda de glicose  $[\text{M} - \text{Glu} + \text{H}]^+$ , o segundo fragmento mais abundante do processo de quebra é de  $m/z$  391, referente à quebra na ligação  $\text{C}21\text{—O}^{\text{Glu}}$ , e um outro fragmento com menor intensidade que o segundo, com  $m/z$  de 371 refere-se à quebra na região alifática da molécula em  $\text{C}3\text{—C}14$  (Figura 28).

Tabela 8- Dados dos espectros de RMN H, C e bidimensionais da substância PCAN\_50.3.

	HSQC		HMBC
	$\delta$ C (ppm)	$\delta$ H (ppm)	
<b>1</b>			
<b>2</b>	137,43		
<b>3</b>	142,97		
<b>4</b>			
<b>5</b>	137,35		
<b>6</b>	116,46	8,83	C24
<b>7</b>	132,37		
<b>8</b>	131,52		
<b>9</b>	123,51	8,32	C8, C13
<b>10</b>	122,49	7,69	C11, C13
<b>11</b>	122,53	7,39	C9, C10, C12, C13
<b>12</b>	113,59	7,696	C10, C13
<b>13</b>	144,22		H9, H10 e H11
<b>14</b>	33,91	3,58 (2H)	C16, C3 e C2
<b>15</b>	34,95	3,63	C22 e C17
<b>16</b>	110,1		
<b>17</b>	154,88	7,569	C15, C21, C16 e C22
<b>18</b>	119,95	5,09	C20 e C19
<b>19</b>	135,15	5,89	C20
<b>20</b>	45,63	2,7	C19
<b>21</b>	97,46	5,83	C15, C1', C19 e C17
<b>22</b>	169,25		
<b>23</b>	51,85	3,33	C22
<b>24</b>	167,06		
<b>1'</b>	100,36	4,78	C21, C2' e C3'
<b>2'</b>	74,7	3,23	C4'
<b>3'</b>	78,03	3,4	
<b>4'</b>	71,7	3,28	C5'e C2'
<b>5'</b>	78,66	3,36	
<b>6'</b>	62,94	3,95	C4'
		3,68	C5'

Fonte: Autora

Figura 26- Espectro de massa de alta resolução da substância em estudo PCAN\_50.3

Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma
571.1947	1	M+H	<b>C28H31N2O11</b>	571.1922	<b>-4.3</b>	1.3
	2	M+H	C25H23N12O5	571.1909	-6.7	7.5
	3	M+H	C29H27N6O7	571.1936	-2.0	11.5
	4	M+H	C26H19N16O	571.1922	-4.3	16.0
	5	M+H	C33H31O9	571.1963	2.7	23.1
	6	M+H	C30H23N10O3	571.1949	0.4	23.2
	7	M+H	C34H27N4O5	571.1976	5.1	34.7
	8	M+H	C41H23N4	571.1917	-5.2	72.6

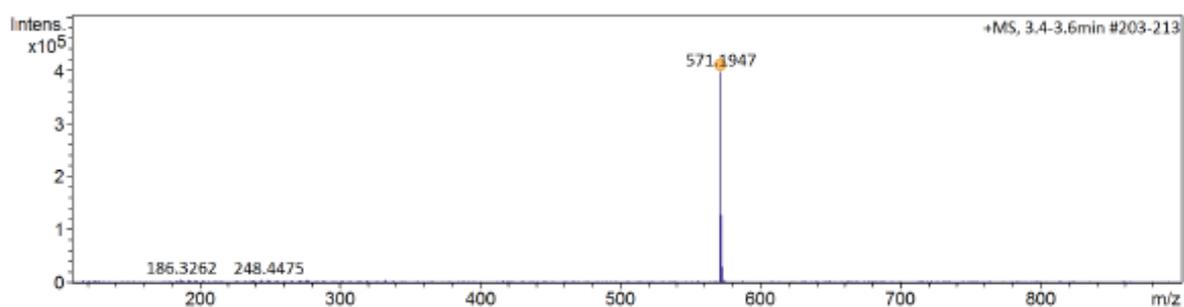
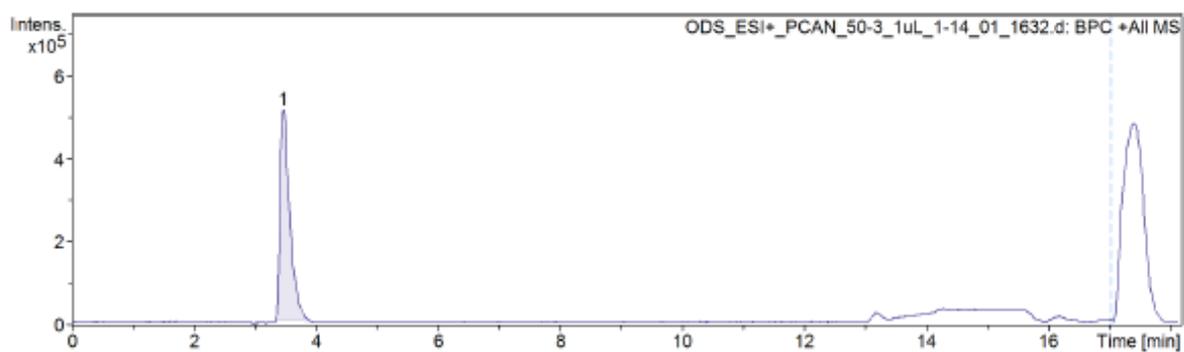


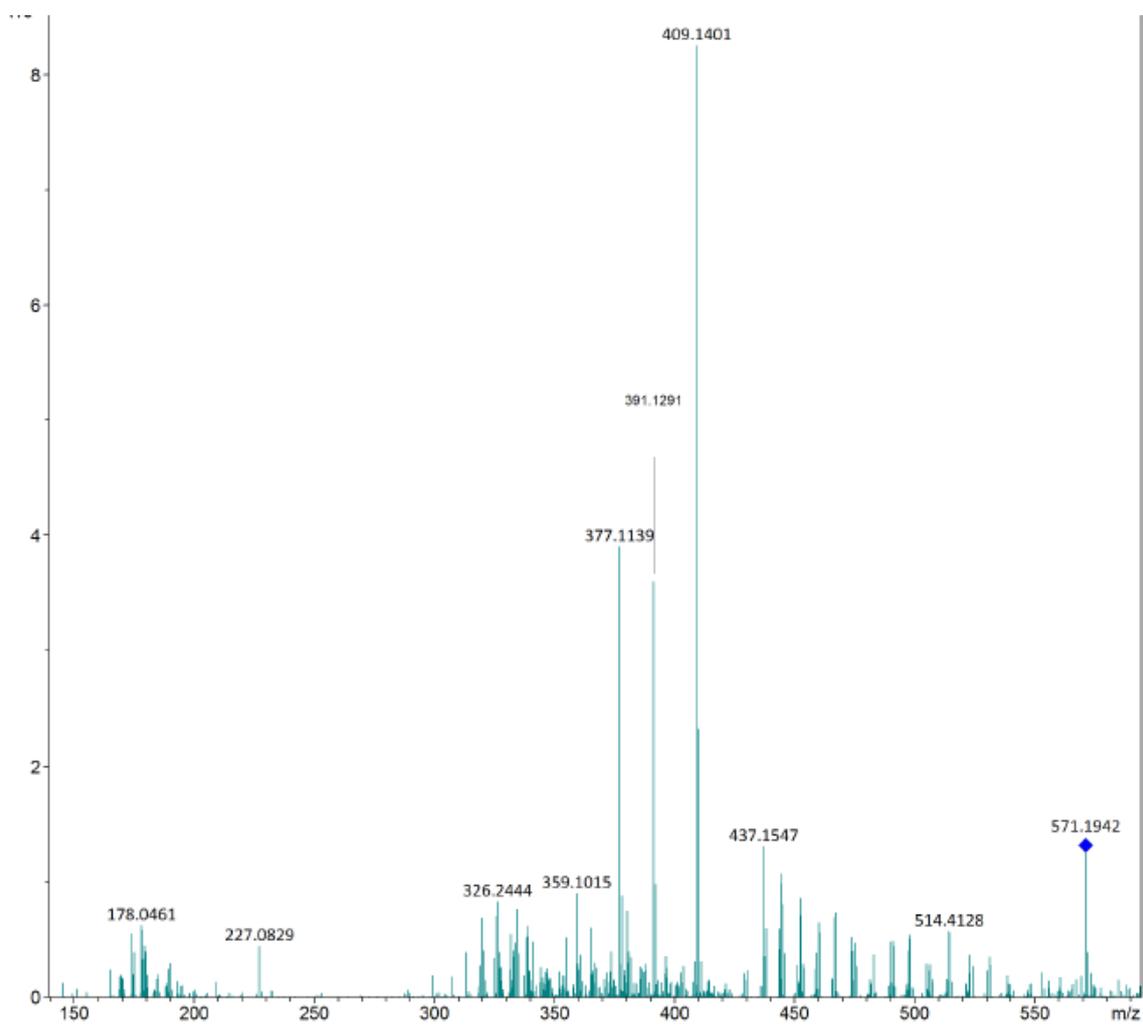
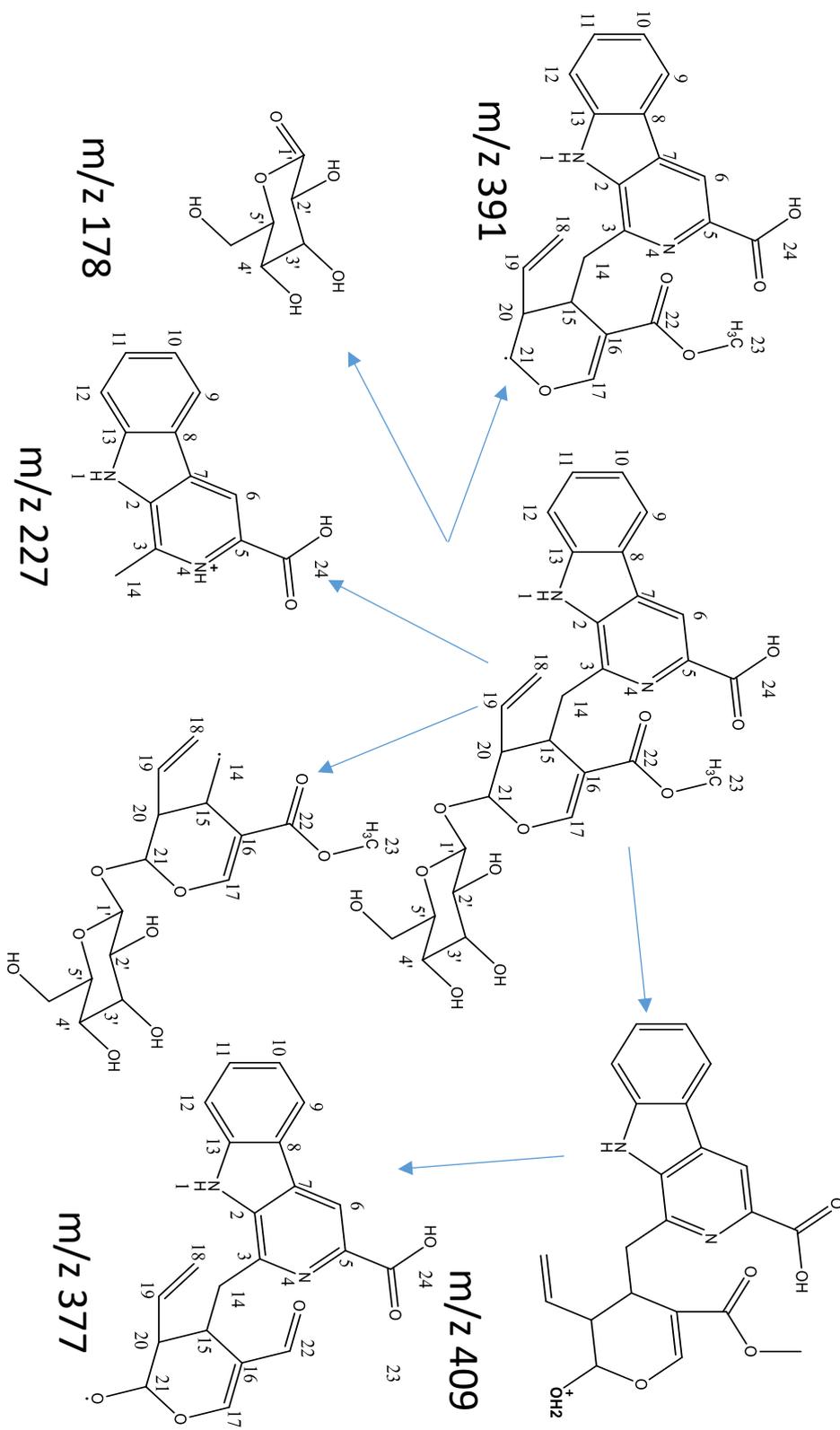
Figura 27- Fragmentação MS<sup>2</sup> da substância em estudo PCAN\_50.3.

Figura 28- Proposta de fragmentação da substância em estudo PCAN\_50.3.



Fonte: Autora

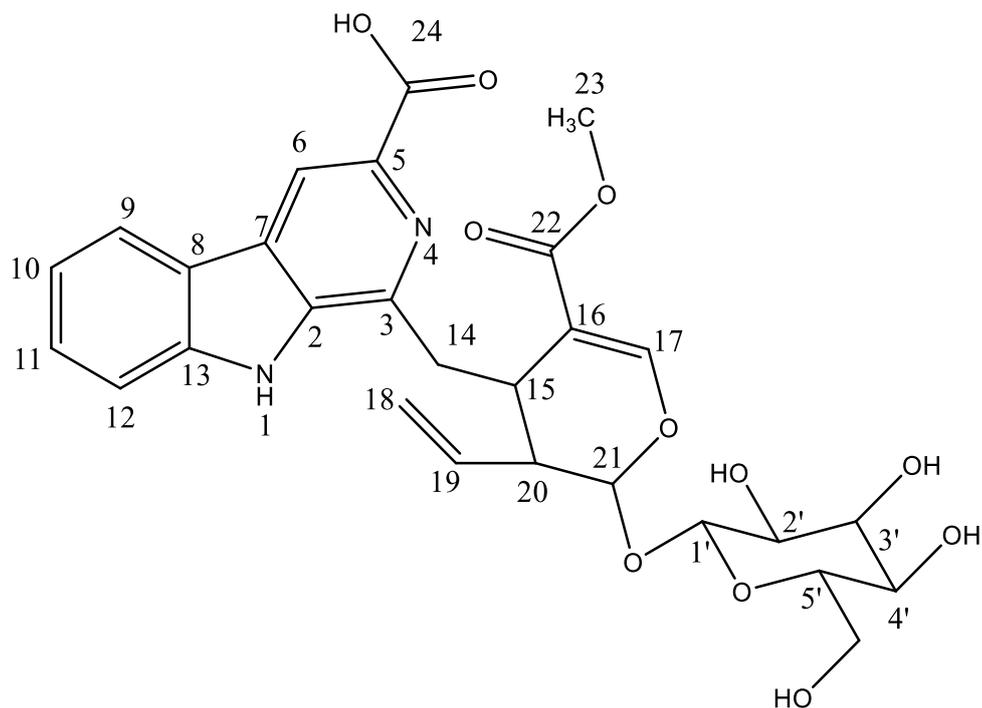
Com análise dos dados obtidos e discutido acima, e com a comparação com a literatura (Tabela 9) foi possível propor uma estrutura para a substância em estudo apresentada na Figura 29, de acordo com a literatura não foi encontrado relatos da substância no gênero estudado sendo, portanto, a primeira vez encontrada na espécie, contudo, a desoxicordifolina já foi isolada de outras espécies da família Rubiaceae, tais como *Uncaria glabrata* DC (ARBAIN *et al.*, 1993) e *Chimarrhis urbinata* (BOLZANI *et al.*, 2008) e foi isolada pela primeira vez de espécies do gênero *Adina* (BROWN e WARAMBWA, 1978) da família Naucleaceae. Em 2012, essa substância foi isolada de *Palicourea acuminata* (BERGER *et al.*, 2012).

Tabela 9- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (em ppm) para o alcalóide indólico estudado (PCAN\_50.3) em MeOD, em comparação com dados da literatura obtido em  $\text{CDCl}_3$ .

	<b>PCAN_50.3 em MeOD</b>	<b>Moraes, 2013 em <math>\text{CDCl}_3</math></b>
	$\delta$ C	$\delta$ C
	(ppm)	(ppm)
<b>2</b>	137,43	136,7
<b>3</b>	142,97	144,4
<b>5</b>	137,35	136,7
<b>6</b>	116,46	115,4
<b>7</b>	132,37	129,8
<b>8</b>	131,52	123,1
<b>9</b>	123,51	122,5
<b>10</b>	122,49	120,8
<b>11</b>	122,53	129,1
<b>12</b>	113,59	112,8
<b>13</b>	144,22	142,4
<b>14</b>	33,91	35,9
<b>15</b>	34,95	36,9
<b>16</b>	110,1	111,0
<b>17</b>	154,88	154,5
<b>18</b>	119,95	118,7
<b>19</b>	135,15	134,6
<b>20</b>	45,63	45,7
<b>21</b>	97,46	97,4
<b>22</b>	169,25	170,0
<b>23</b>	51,85	52,3
<b>24</b>	167,06	174,2
<b>1'</b>	100,36	100,2
<b>2'</b>	74,7	74,3
<b>3'</b>	78,03	77,7
<b>4'</b>	71,7	71,6
<b>5'</b>	78,66	77,7

Fonte: Autora

Figura 29- Proposta sugerida para substância em estudo PCAN\_50.3.



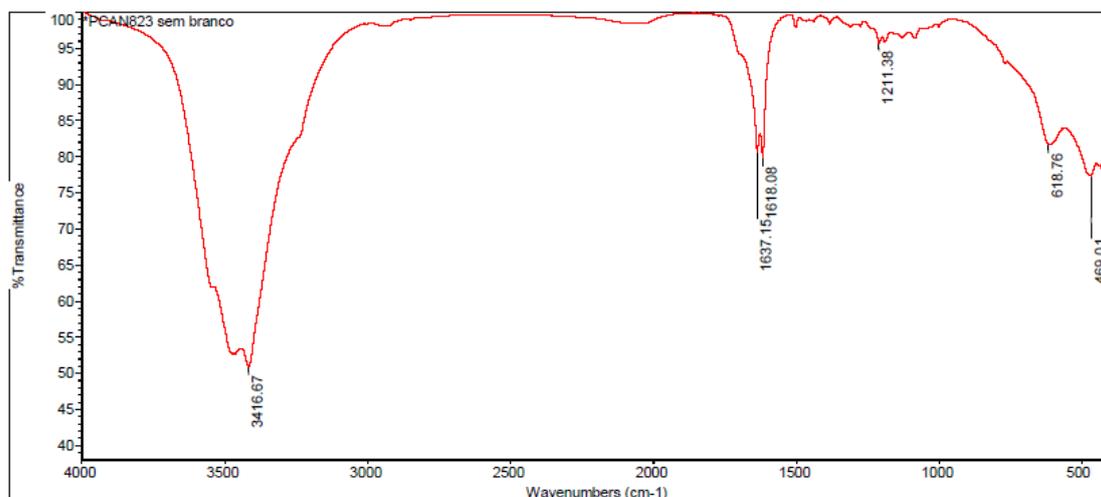
Fonte: Autora

### 5.2.1.3 Substância PCAN\_8.2.2

A substância apresentou-se como um sólido amorfo de cor amarelo clara, sugerindo a presença de um alcaloide através do teste com o reagente de Dragendorff.

No espectro de infravermelho da amostra (Figura 30), observou-se uma banda em  $3416\text{ cm}^{-1}$ , que é, provavelmente, relativo ao estiramento da ligação N-H, do indol, o que por consequência, se infere tratar de amina secundária, logo não há substituinte no anel B. Outro estiramento observado em  $1637$  e  $1638\text{ cm}^{-1}$  relativo ao anel aromático e/ou dupla ligação entre carbonos  $C = C$ .

Figura 30 -Espectro de Infravermelho da substância PCAN\_8.2.2.

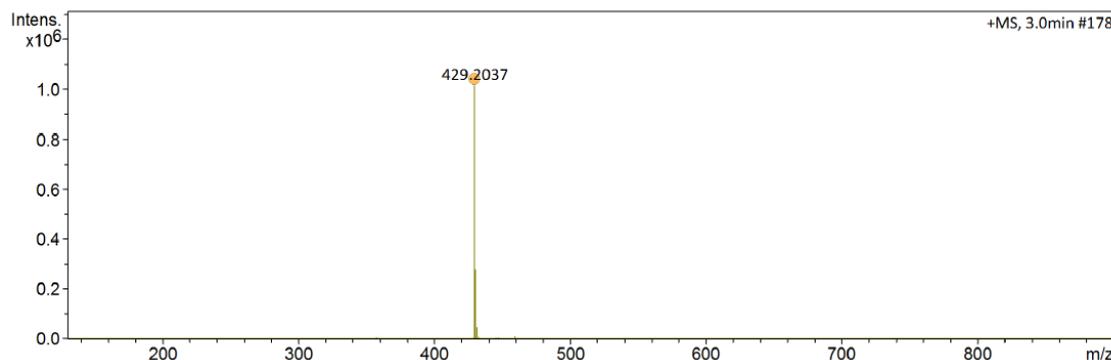


O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 34, Tabela 10) apresentou sinais ( $\delta_{\text{H}}$ ) correspondentes ao grupo metoxila de grupo carbometoxi, hidrogênios aromáticos, hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos.

A análise de massas de alta resolução no modo positivo da substância, demonstrou a presença do pico de maior intensidade em  $m/z$  429,2037, referente a um íon  $[\text{M}-\text{H}]^+$ , cuja fórmula molecular neutra mais provável é  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$  com erro dentro do limite de erro aceitável (Figura 31).

Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução da amostra PCAN\_8.2.2.

Meas. $m/z$	#	Adduct	Ion Formula	$m/z$	err [ppm]	mSigma
429.2037	1	M+H	$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$	429.2020	-4.0	6.3



Este íon  $[\text{M}-\text{H}]^+$ , 429,2037; foi submetido a fragmentação conforme demonstrado no espectro da Figura 32, onde foram observados ainda a presença dos íons  $m/z$  397, indicando a perda de um grupo  $-\text{CO}$ , de forma subsequente, uma perda de metano, apresentando a razão  $m/z$  353 e por outra

via, os íons  $m/z$  220 e 189 como demonstrado na figura. Estes fragmentos são coerentes com o alcalóide carpanaubina isolado anteriormente de espécies de *Rauwolfia* por Kumar e colaboradores em 2016.

Figura 32 - Espectro de massa MS-MS da substância PCAN\_8.2.2.

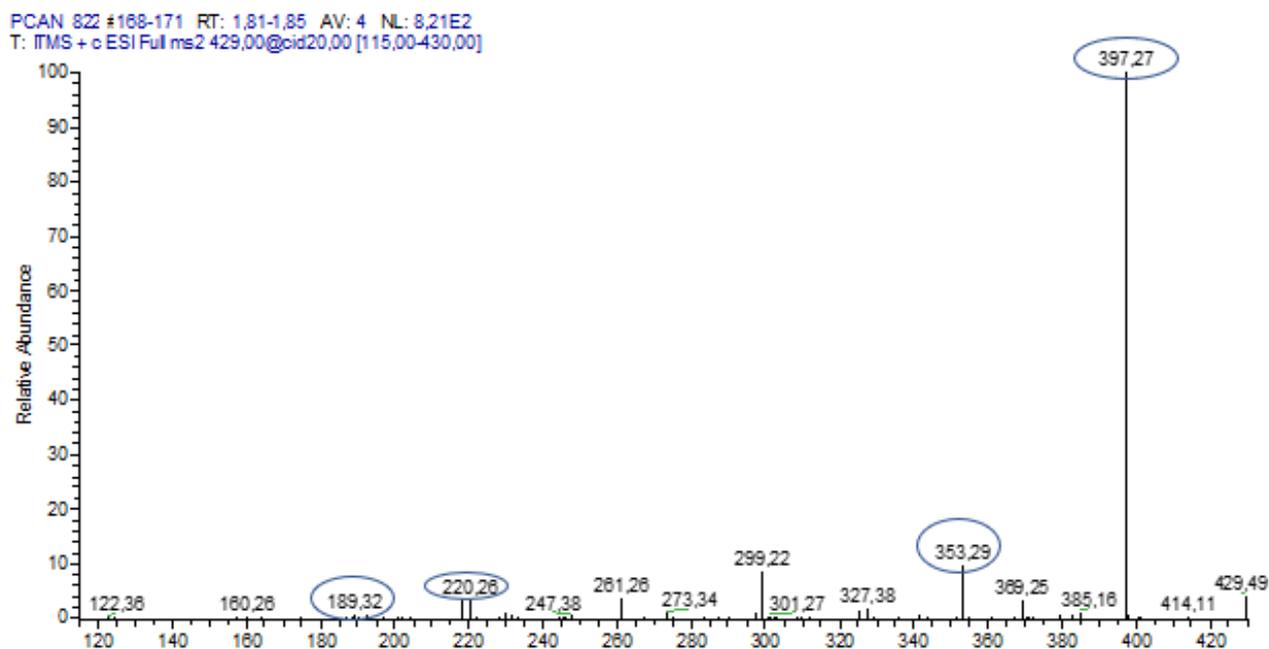
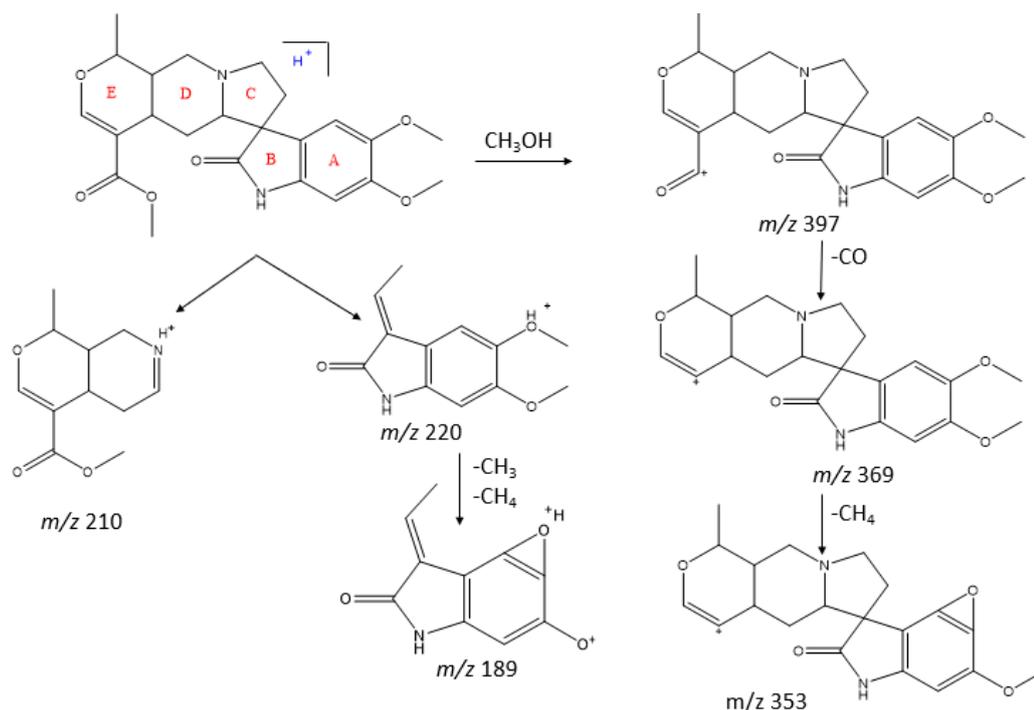


Figura 33 - Proposta de fragmentação da amostra PCAN\_8.2.2.

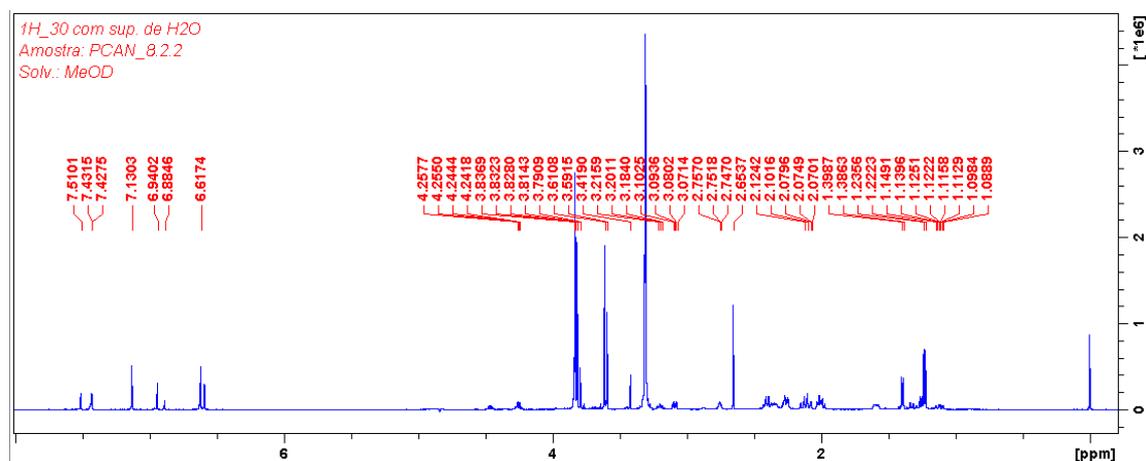


Fonte: Autora adaptado de KUMAR *et al.*,2016.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 34, Tabela 10) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de grupos metila, metoxila, hidrogênios aromáticos, grupos metínicos e metilênicos. A integração dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicou a presença de vinte e oito sinais de hidrogênio.

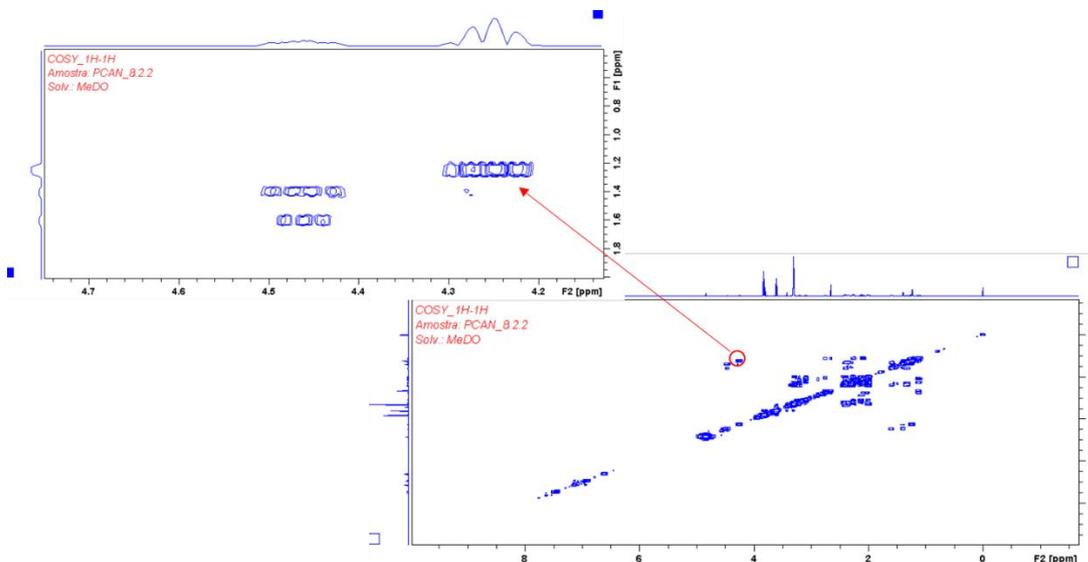
Na análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , observou-se dois sinais simples (singleto), com integral para um hidrogênio, relativos a aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  6,61 (1H, s) e 7,13 (1H, s), característicos de posição *para* visto que  $J = 0$  Hz, contudo, como só há presença destes dois hidrogênios na região aromática, isso indicar que este anel se encontre provavelmente *orto* e *meta para* substituído, sugerindo também, a presença do anel indólico, é possível confirmar tais evidências através das correlações heteronuclear (HSQC) (Figura 39) onde se observam as correlações a  $^1J_{\text{CH}}$  entre CH-9 ( $\delta_{\text{C}}$  112,1)/H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  7,13), CH-12 ( $\delta_{\text{C}}$  97,2)/H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  6,61). E através das correlações heteronuclear a longa distância (HMBC) (Figura 40) constatou-se as correlações entre os hidrogênios das metoxilas  $\delta_{\text{H}}$  3,83 e 3,81 com os carbonos do anel A C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  151,06) e C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  146,49) respectivamente.

Figura 34 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância PCAN\_8.2.2.



Ainda, a partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , foi possível observar o sinal de hidrogênio mais desblindado em  $\delta_{\text{H}}$  7,43 isto ocorre pelo fato do mesmo está ligado a um átomo de C em  $\delta_{\text{C}}$  155,6 (C17) do tipo  $\text{sp}^2$ , conseqüentemente em ressonância o que atribui um aumento da eletronegatividade e com isso facilita a perda deste próton  $\text{H}^+$ , conferindo-lhe, portanto, seu alto deslocamento. Em passo inverso, está o hidrogênio  $\delta_{\text{H}}$  1,23 (H22), com integral para 3H, o que o caracteriza como sinal de hidrogênio metílico. Este apresentou correlação em COSY com o hidrogênio metílico, em  $\delta_{\text{H}}$  4,25 (H18), que, por sua vez, apresentou como sinal característico um duplo duplete (dd,  $J$  6,50 e 1,50 Hz) (Figura 35).

Figura 35- Ampliação do espectro de COSY do acoplamento entre os hidrogênios  $\delta_H$  4,25 e 1,23 ppm.

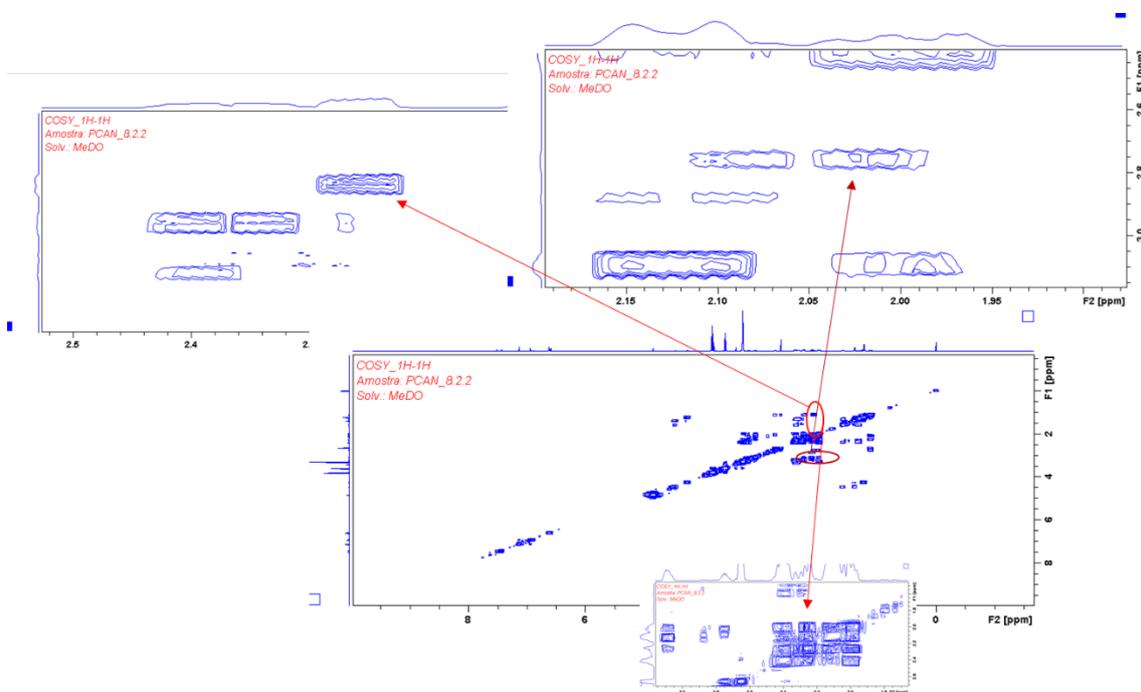


Fonte: Autora

O espectro de RMN  $^1H$  evidenciou mais três sinais metálicos, em  $\delta_H$  2,01; 2,75 (que se correlacionam em COSY) e 2,25. Apresentaram como sinal característico multipeto de forma que impossibilitou a obtenção dos  $J$ . Este último apresentou correlações por COSY um acoplamento com os hidrogênios em  $\delta_H$  1,12 ( $^2J_{HH}$ ) e acoplamento spin-spin fraco com o hidrogênio  $\delta_H$  1,99 (Figura 36).

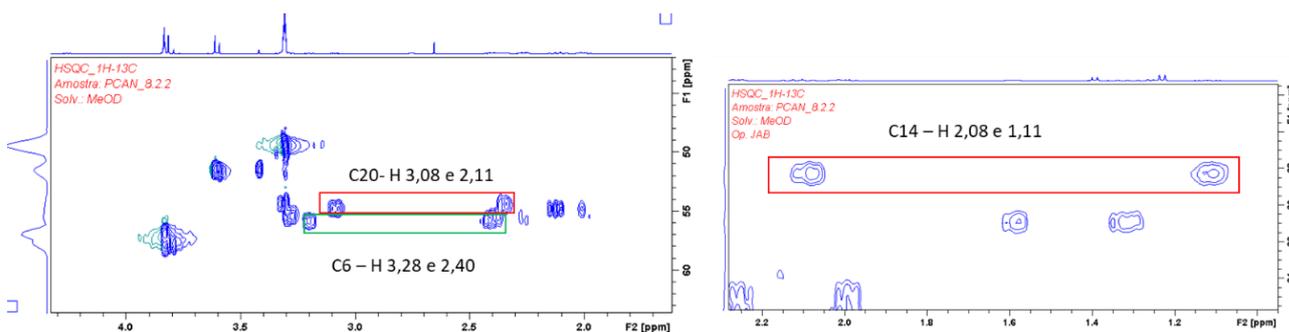
Ainda no espectro de RMN  $^1H$ , pode-se observar seis sinais de hidrogênios metilênicos, dos quais, os pares  $\delta_H$  3,08 (dd;  $J$  11,20 e 4,70 Hz) e 2,11 (d;  $J$  11,20 Hz),  $\delta_H$  2,40 e 3,28 (dd;  $J$  8,60 e 1,97 Hz) e por fim os hidrogênios  $\delta_H$  2,08 (m) e 1,11 (m) acoplam com os carbonos C20, C6 e C14 respectivamente, como pode ser comprovado pelo espectro HSQC (Figura 37).

Figura 36- Ampliação do espectro de COSY na região dos acoplamentos entre  $\delta_H$  2,01 e 2,75 ppm a direita, entre os hidrogênios  $\delta_H$  2,25 e 1,12 ppm, a esquerda e entre os hidrogênios  $\delta_H$  2,25 e 1,99 ppm a baixo.



Fonte: Autora

Figura 37- Ampliação das regiões das correlações  $^1J_{H-C}$  dos carbonos metilênicos, do espectro de HSQC.



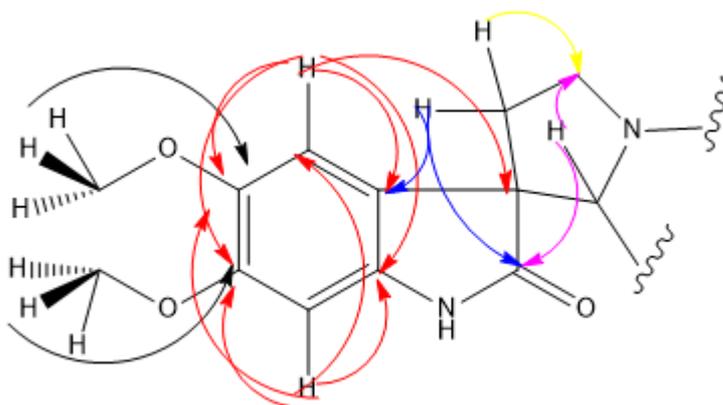
Fonte: Autora

Além disso, pode-se observar pelo espectro de HMBC uma correlação entre um hidrogênio  $\delta_H$  7,55 e o carbono em  $\delta_C$  169,1; contudo, pelo espectro de hidrogênio constata-se que este não faz parte da molécula, visto que

sua integral é de 0,40, descartando assim essa interação e continuando assim, o H-17, o mais desblindado.

A conectividade do núcleo indólico com o resto da molécula foi deduzida a partir das sequências de correlações: do hidrogênio  $\delta_H$  7,13 com o carbono spiro 58,4 ppm através de  $^3J_{CH}$ , o qual une os núcleos indóis, do hidrogênio 2,26 ppm com os carbonos  $\delta_C$  125,00 e 184,00 através de  $^3J_{CH}$  e em seguida, a correlação em  $^2J_{CH}$  do hidrogênio  $\delta_H$  1,99 com o carbono  $\delta_C$  55,30 que apesar da região alifática na qual este se encontra, apresenta-se mais desblindado pela proximidade do átomo de N. A presença do grupo cetona no núcleo indólico foi evidenciada pelas correlações a longa distância, como foi dito entre o hidrogênio  $\delta_H$  2,26 e o carbono  $\delta_C$  184,00 (C2), que apresenta um deslocamento característico deste grupamento (-C=O) reforçado pela proximidade do outro átomo de N (Figura 38).

Figura 38- Fragmento do sistema aromático-indol da substância em estudo e correlações  $^1H - ^{13}C$  HMBC.



Fonte: Autora

No espectro de HSQC foi possível destacar todas as ligações heteronucleares do tipo  $^1J$  entre H e C entre os hidrogênios que apresentaram integral relativa a amostra, ou seja, no espectro constataram-se sinais que não eram da amostra, que foram comprovados pelo espectro de RMN  $^1H$  os quais encontram-se tabelados (Tabela 10).

Tabela 10- Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, para a substância PCAN\_8.2.2.

	HSQC		HMBC	COSY
	$\delta$ C			
	(ppm)	(ppm)		
<b>1</b>				
<b>2</b>	184			
<b>3</b>	58,4			
<b>4</b>	69,19	2,25	C2; C8; C6	H 1,11; H 1,99; H 2,11
<b>5</b>				
<b>6</b>	55,3	2,4	C20	H 1,99; H 2,26; H 3,29
		3,28 (dd; $J$ 1,97; 8,60)	C4; C3; C7	H 1,99; H 2,26; H 2,40
<b>7</b>	35,97	1,99 (dt; $J$ 3,68; 4,50; 13,22)	C6; C8; C2	H 3,28; H 2,26
		2,26 (dd; $J$ 2,20; 6,50; 8,70)	C2; C8	H 3,08
<b>8</b>	125,58	-		
<b>9</b>	112,11	7,13	C3; C8 C13; C10; C11	
<b>10</b>	151,06			
<b>11</b>	146,49			
<b>12</b>	97,2	6,6	C8; C13; C10; C11	
<b>13</b>	136,41	-		
<b>14</b>	28,32	2,08 (m)		H 1,94; H 3,26
		H 1,11 (m)	C15; C4; C16	H 2,25; H 2,65; H 2,75
<b>15</b>	26,21	2,75 (m)		H 1,12; H 2,08; H 2,0188
<b>16</b>	106,08			
<b>17</b>	155,66	7,43	C15; C18; C16; C21	
<b>18</b>	76,08	H 4,25 (dd; $J$ 1,50; 6,50)	C22; C15; C19; C20; C17	H 1,23
<b>19</b>	37,97	2,01 (m)	C15; C16	H 3,08; H 2,08
<b>20</b>	54,82	3,08 (dd; $J$ 11,20; 4,70)	C15; C19	H 2,01; H 2,11; H 2,25
		2,11 (d; $J$ 11,20)	C15	H 2,01; H 2,11; H 2,25
<b>21</b>	169,13			
<b>OCH3</b>	56,84	3,83	C10	
<b>OCH3</b>	57,79	3,81	C11	
<b>OCH3</b>	51,43	3,61	C21	
<b>22</b>	18,17	1,23 (d; 6,50)	C19; C18	

Fonte: Autora

Figura 39- Espectro de RMN HSQC da substância PCAN\_8.2.2.

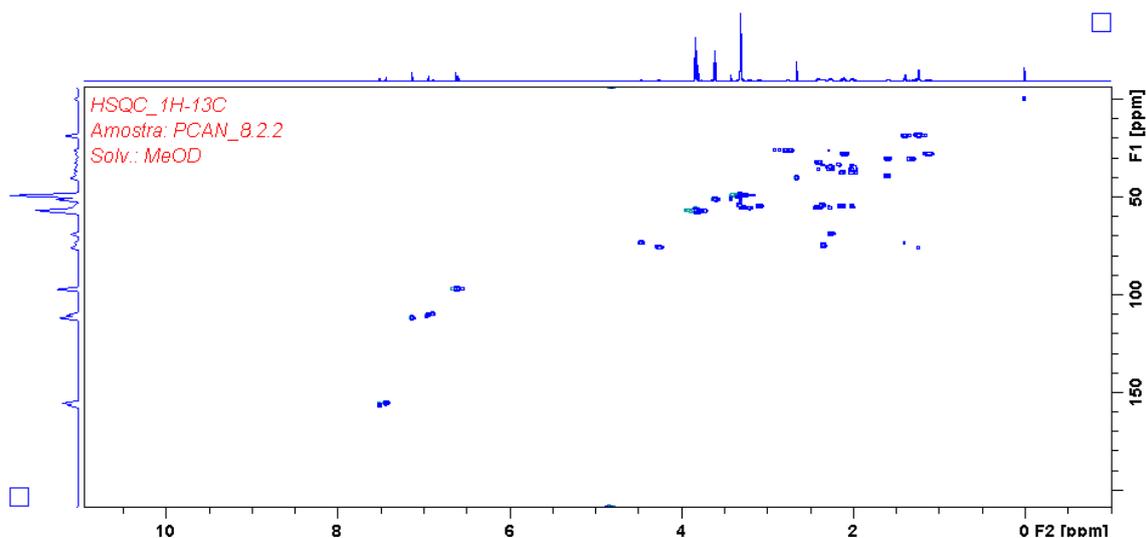
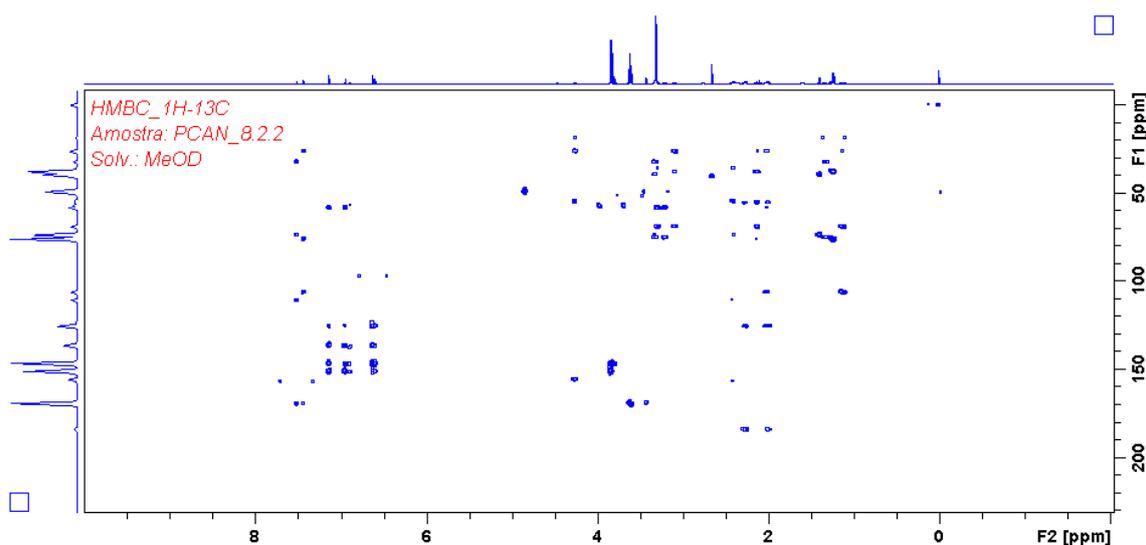


Figura 40- Espectro de RMN HMBC da substância PCAN\_8.2.2.



Devido à baixa massa obtida da substância, não foi possível obter o espectro de carbono  $^{13}\text{C}$ , contudo, a partir dos bidimensionais, HSQC e HMBC, foi possível comprovar os 23 sinais de carbono presentes na molécula. Um sinal em  $\delta_{\text{c}}$  169,1 (C21), característico de carbonila. Os sinais  $\delta_{\text{c}}$  125 (C8), 112,1 (C9), 151,06 (C10), 146,49 (C11), 97,2 (C12) e 136 (C13) característicos de carbono  $\text{sp}^2$  de anel aromático. Os sinais de deslocamentos dos grupos metílicos foram atribuídos a  $\delta_{\text{c}}$  56,84 e 57,59 aos carbonos das metoxilas ( $\text{OCH}_3$ ) ligado ao anel

benzênico com efeito mais desblindado devido a ressonância,  $\delta_c$  18,87 ao carbono metílico mais blindado.

A posição da metoxila  $\delta_c$  56,84 e 57,59 foram atribuídas ligadas aos carbonos C-10 e C-11 respectivamente, podem ser comprovadas pelas correlações apresentadas no HMBC (Figura 41). Além destas metoxilas, que se acoplam na região aromática da molécula, os espectros de H, HSQC e HMBC evidenciaram mais uma metoxila que correlaciona com o carbono carbonílico C-21 (Figura 42), na qual apresenta no espectro de RMN  $^1\text{H}$  um singlete com integral para três hidrogênios na região de 3,61 ppm, ainda característico de metoxila quando acoplado ao carbono em  $\delta_c$  51,43 (C22) .

Figura 41- Ampliação dos sinais das metoxilas substituídas no anel aromático da substância PCAN\_8.2.2.

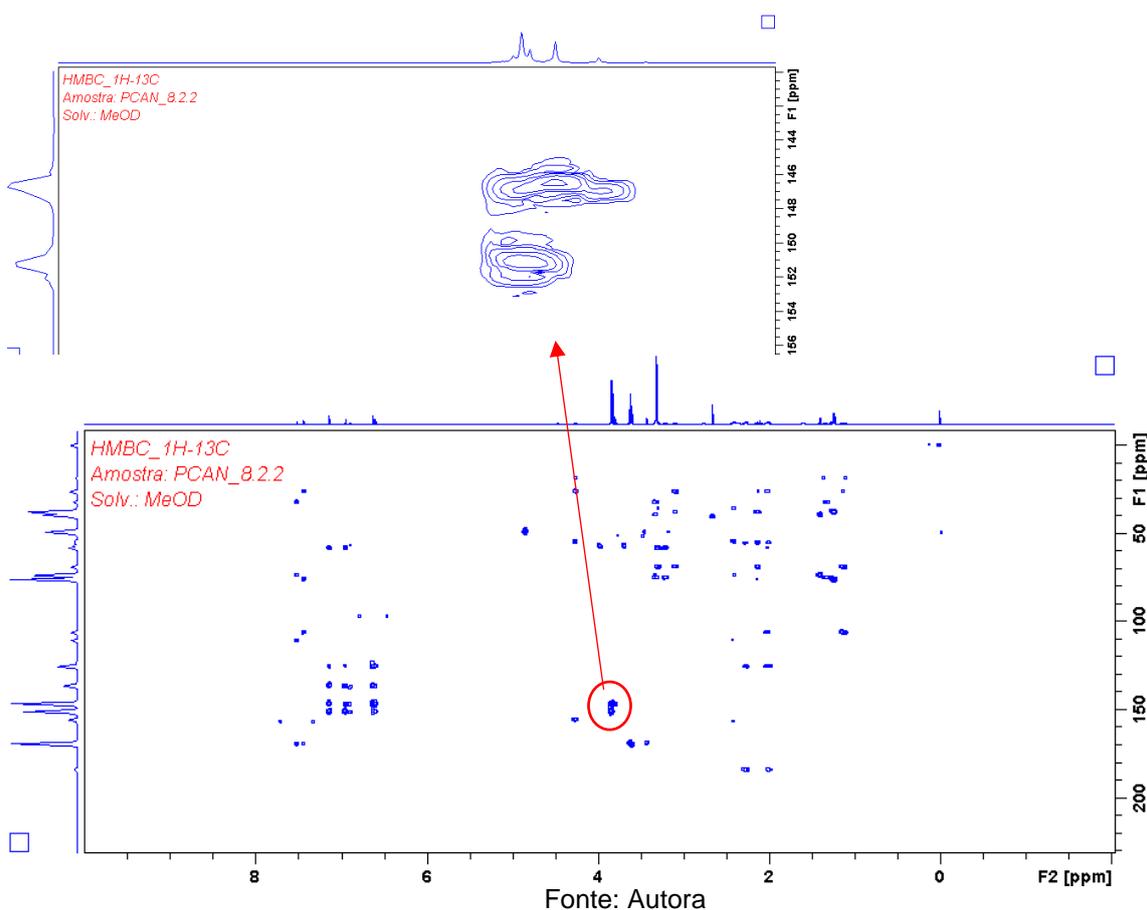
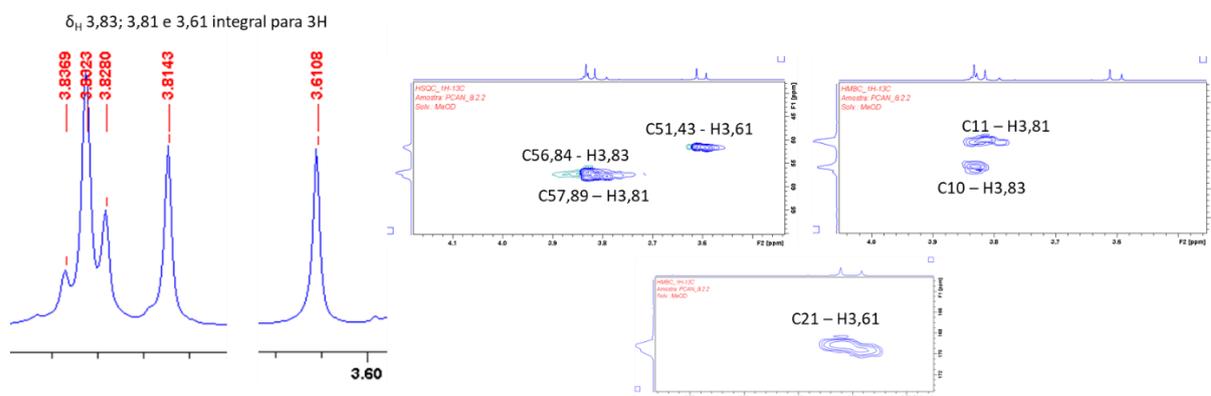


Figura 42- Ampliação dos espectros de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC das metoxilas e suas devidas correlações na substância PCAN\_8.2.2.

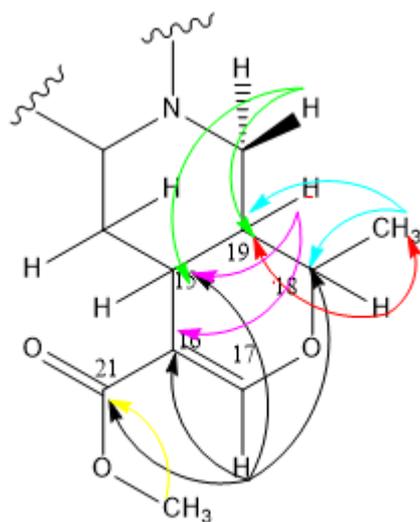


Fonte: Autora

A localização de um grupo carbometoxi foi confirmada através das correlações entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  169,1 e os hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  3,61 e 7,43 ( $^3J_{\text{CH}}$ ); a localização de um grupo metila com hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1,51 foi confirmada através das correlações à longa distância com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  76,98 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e 37,87 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), do sistema fundido de piperidina-diidropirano (Figura 43) apresentadas no espectro de HMBC. Outras correlações à longa distância dos demais átomos encontram-se sumarizadas na Tabela 10.

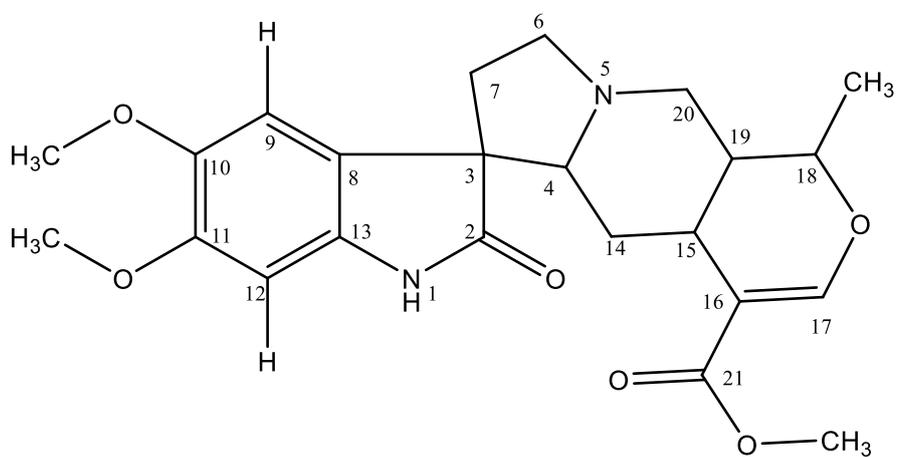
Foi possível propor uma estrutura para a substância PCAN\_8.2.2 (Figura 44) através da análise dos dados obtidos e relatados acima, contudo, não foi encontrado relato da mesma no gênero em estudo (*Aspidosperma*), este alcalóide já foi isolado em algumas espécies do gênero *Rauwolfia* (CARLOS, 2007) cujo nome é carapanaubina.

Figura 43- Fragmento do sistema piperidina-diidropirano da substância em estudo e correlações  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  HMBC.



Fonte: Autora

Figura 44- Estrutura proposta para o alcalóide PCAN\_8.2.2.

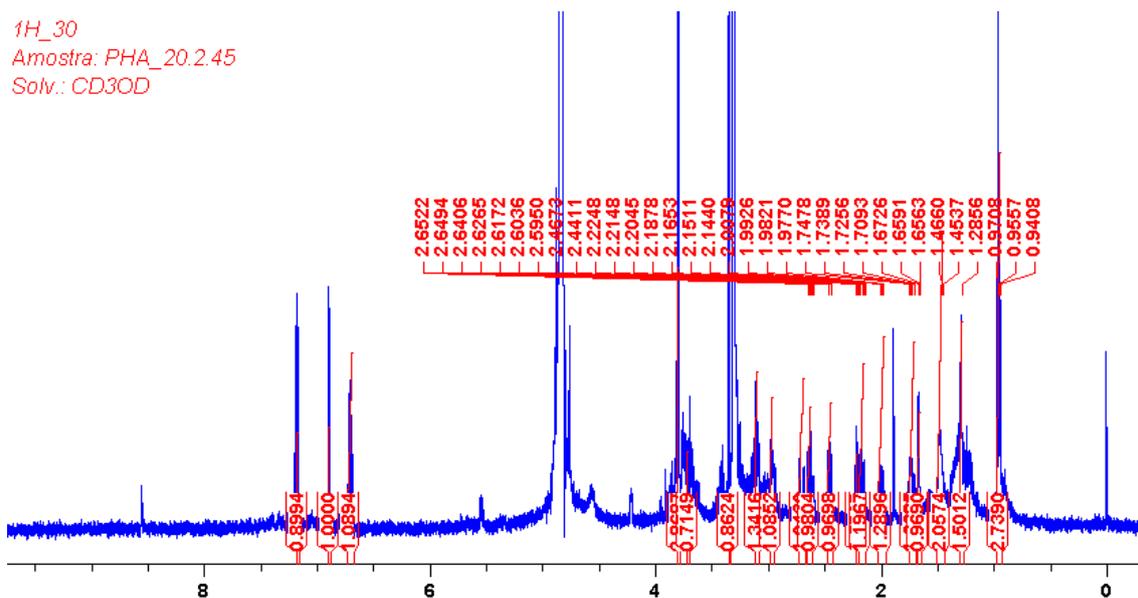


Fonte: Autora

### 5.2.1.3 Substância PHAAN\_20.2.45

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância PHAAN\_20.2.45 (Figura 45 e Tabela 11) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de metoxila, grupamento etila, hidrogênios aromáticos, hidroxila, grupos metínicos e metilênicos. Na região aromática evidenciou três sinais com deslocamentos químicos característicos, acoplados entre si. Um hidrogênio com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  7,17ppm, um duplete com  $J = 8,95$  Hz de acoplamento em *orto*. Outro hidrogênio aromático com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  6,88, também duplete com  $J = 2,49$  Hz, o que caracteriza acoplamento em *meta*. Já o ultimo sinal na região aromática, possuiu deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  6,70, um duplo duplete com  $J = 8,95$  e  $2,49$  Hz indicando, provavelmente uma substituição no anel aromático indol, visto que só há 3 sinais de hidrogênio aromático (Figura 45).

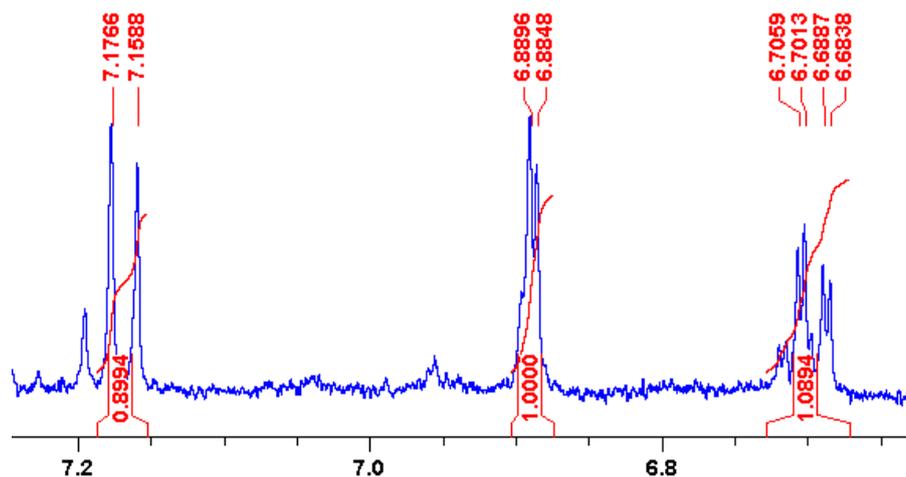
Figura 45- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância PHAAN\_20.2.45.



Neste espectro pode-se observar os multipletos com sinais  $\delta_{\text{H}}$  2,71; 2,96; 3,12 e 2,61 condizentes com hidrogênios de grupos metilênicos. Observou também, um singleto com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  3,79 com integral para 3H, referente aos hidrogênios da metoxila, e pelo espectro de HMBC percebe-se que é o substituinte do anel aromático. Um tripleto em 0,95 ppm, também com integral para 3H, característico de hidrogênios metílicos, acoplado com

hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  1,21 que apresenta como sinal um multiplete por também acoplarem com o hidrogênio metínico em  $\delta_H$  1,47 ppm.

Figura 46- Ampliação do espectro de RMN de  $^1H$ , na região aromática referente aos hidrogênios 9, 11 e 12.



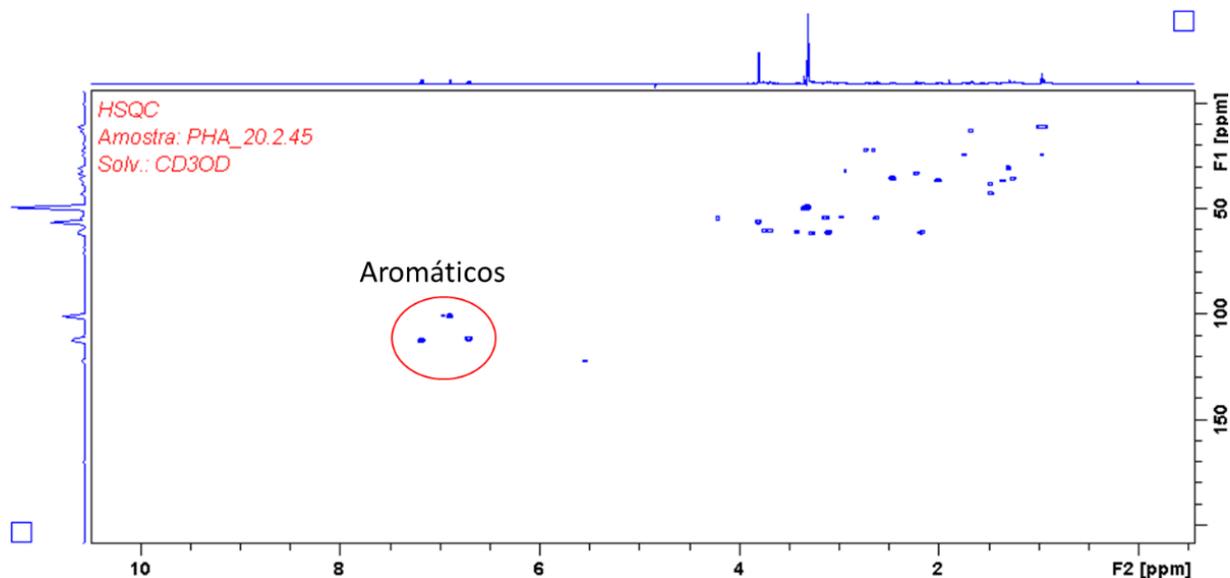
Fonte: Autora

O espectro revelou multiplete em  $\delta_H$  1,47 e 1,48 ppm, que se apresentam sobrepostos e foram atribuídos a hidrogênios metilênicos, devido ao valor da área de integração.

No espectro HSQC é possível verificar as relações do tipo  $^1J_{CH}$  e juntamente com o espectro de correlação a longa distância HMBC foi possível inferir os deslocamentos de carbonos da substância.

Observaram-se no espectro de HSQC (Figura 47) as correlações entre os átomos com os seguintes deslocamentos químicos: para grupos metínicos – o carbono em  $\delta_C$  112,6 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7,17;  $\delta_C$  111,8 e  $\delta_H$  6,70;  $\delta_C$  101 e o  $\delta_H$  6,88 (aromáticos),  $\delta_C$  60,7 e  $\delta_H$  3,70,  $\delta_C$  42,9 e  $\delta_H$  1,47;  $\delta_C$  33,6 e  $\delta_H$  2,21; para os grupos metilênicos: carbono em  $\delta_C$  22,38 e os hidrogênios  $\delta_H$  2,71 e 2,96;  $\delta_C$  54,6 e  $\delta_H$  3,12 e 2,61; o carbono em  $\delta_C$  36,9 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1,34 e 1,99; para o grupo metílico o carbono  $\delta_C$  11,3 e os hidrogênios em  $\delta_C$  0,95; para o grupo metoxila: o carbono em  $\delta_C$  56,41 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3,79.

Figura 47- Espectro Bidimensional HSQC e em destaque a região de aromáticos da substância PHAAN\_20.2.45.



Fonte: Autora

A análise do espectro de HMBC (Figura 48) permitiu estabelecer as correlações à longa distância entre o hidrogênio  $\delta_H$  6,88 e os carbonos  $\delta_C$  155; 133; 111,8, entre o hidrogênio  $\delta_H$  7,17 e os carbonos  $\delta_C$  155 e 128,8 e entre o  $\delta_H$  6,70 e os carbonos em  $\delta_C$  101; e 133, e o hidrogênio 3,79 e o carbono 155, confirmando que o anel aromático do núcleo indólico apresenta apenas um substituinte que no caso é a metoxila. Foram observadas ainda a correlação entre o hidrogênio 6,88 e o carbono 107 ppm.

A conectividade do núcleo indólico com o resto da molécula foi deduzida a partir da sequência de correlações: os hidrogênios  $\delta_H$  2,96 e  $\delta_H$  3,12 com o carbono 107 ppm, através de  $^2J_{CH}$  e  $^2J_{CH}$  respectivamente. O hidrogênio 2,21 ppm com o carbono 138 ppm em  $^4J_{CH}$ .

Correlações a longa distância foram observadas para os hidrogênios em  $\delta_H$  3,12 e  $\delta_H$  2,16 com os carbonos  $\delta_C$  61,56 e  $\delta_C$  42,9 respectivamente. A localização do grupamento etila foi confirmada através das correlações do hidrogênio  $\delta_H$  0,95 com o carbono  $\delta_C$  24,5 em  $^2J_{CH}$  e com o carbono  $\delta_C$  42,9 em  $^3J_{CH}$ . Além disso, o hidrogênio  $\delta_H$  1,21 também com o carbono  $\delta_C$  42,9 em  $^2J_{CH}$ .

A localização de um grupo etanol ligada ao carbono  $\delta_c$  33,6 ppm foi confirmada através da correlação entre o hidrogênio  $\delta_H$  2,45 ppm e o mesmo em  $^2J_{CH}$ , assim como, pela correlação do hidrogênio  $\delta_H$  1,99 ppm e o carbono  $\delta_c$  35,7 ppm em  $^3J_{CH}$ . Outras correlações encontram-se sumarizadas na Tabela 11.

Figura 48- Espectro de RMN HMBC para a substância PHAAN\_20.2.45, com ampliação das correlações entre os H 9, 11 e 12 e seus respectivos carbonos.

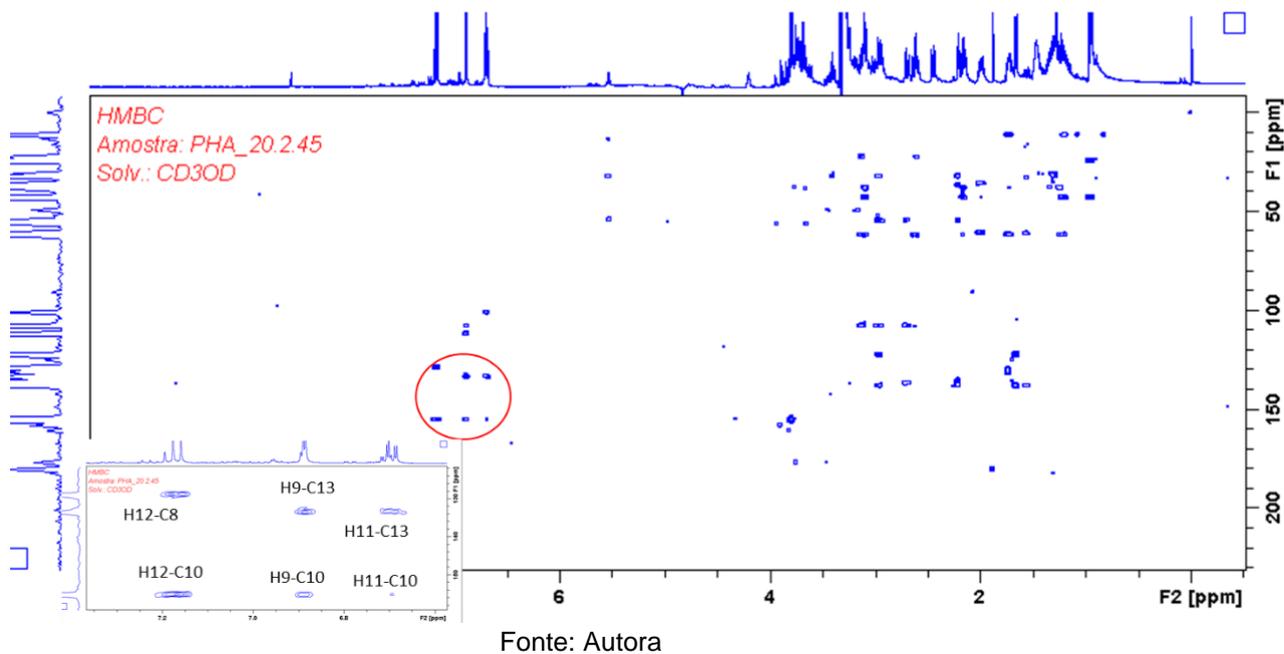
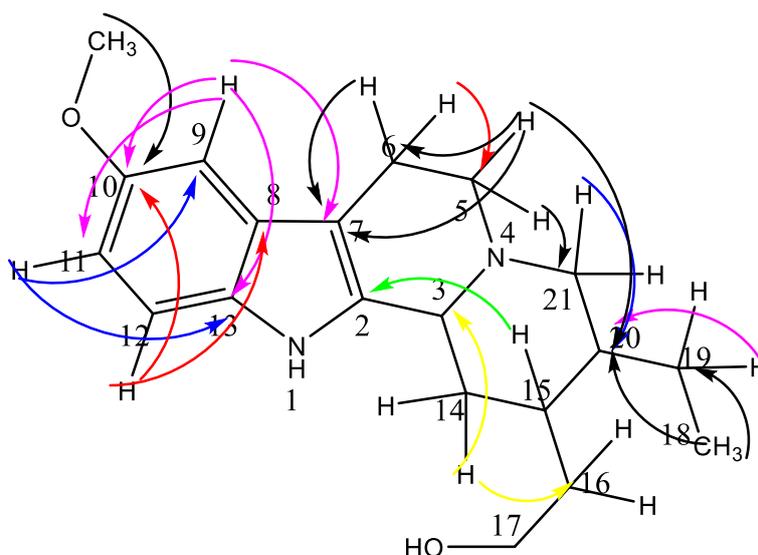


Figura 49- Estrutura proposta para a substância em estudo e principais correlações a longa distância HMBC.



Com a análise dos dados de RMN uni e bidimensionais e espectro de massa pôde-se propor uma estrutura para a substância em estudo e com comparação com os dados descritos na literatura (LEITE, 2016) para o alcalóide indólico 10-metoxi-dihidrocorinanteol, permitiram o assinalamento para a estrutura (Figura 51), cuja fórmula molecular é descrita com  $C_{20}H_{28}N_2O_2$ .

Figura 50- Espectro de massa da substância em estudo PHAAN\_20.2.45.

LC\_PHA20\_2\_19\_10\_segundacorrida #2368-2394 RT: 23,27-23,52 AV: 27 NL: 4,15E3  
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

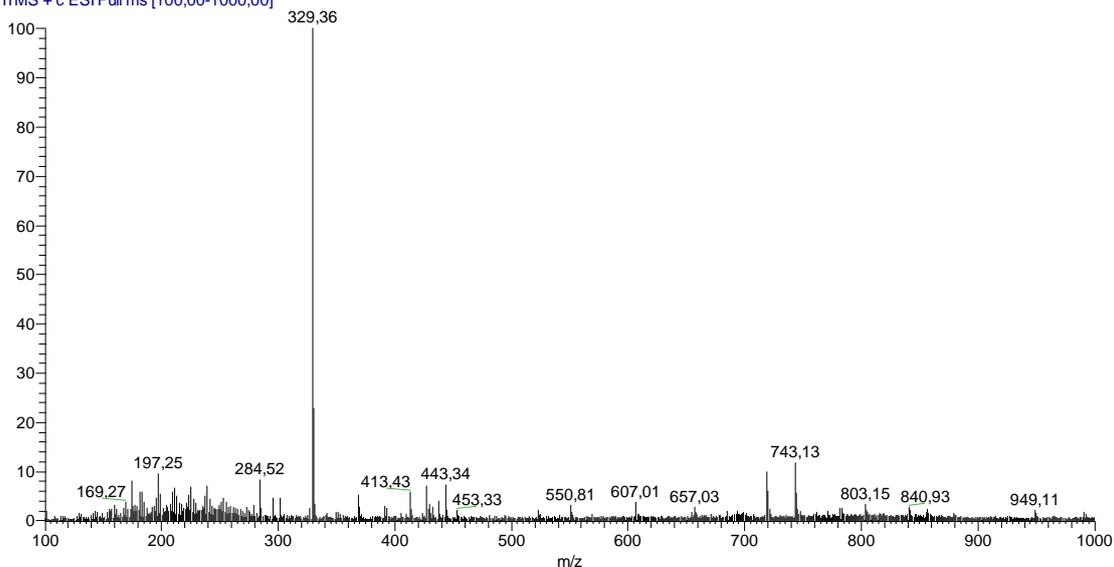
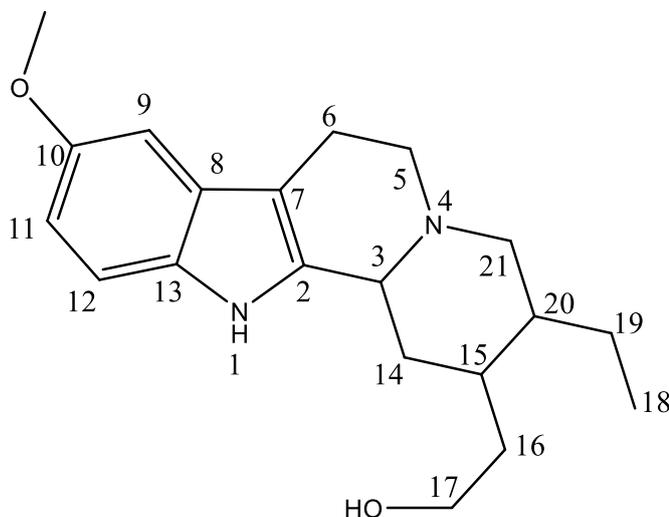


Figura 51-Proposta de estrutura para a substância PHAAN\_20.2.45.



Fonte: Autora

Tabela 11- Deslocamentos de carbono para o alcalóide estudado em comparação com a literatura (LEITE, 2016).

Átomo	Carbonos da substância em estudo	Literatura
1		
2	138	135,8
3	60,7	60,1
4		
5	54,6	52,9
6	22,38	21,6
7	107	107,7
8	128,8	127,3
9	101	100,3
10	155	153,6
11	111,8	111,4
12	112,6	110,6
13	133	131,2
14	36,9	35,4
15	33,6	37
16	35,01	35,01
17	52,6	59,8
18	11,3	11
19	24,5	29,3
20	42,9	41,5
21	61,56	59,8
22	56,41	58,8

Fonte: Autora

### 5.3. Atividades Químicas e Biológicas

#### 5.3.1. Atividade Antioxidante

A investigação fitoquímica tem demonstrado a abundante presença de alcaloides nas cascas da espécie *A. nitidum*, no entanto, a literatura não traz nenhum estudo a respeito de atividade antioxidante da espécie, o que tornou o presente trabalho interessante do ponto de vista terapêutico. Neste contexto, fizeram-se necessários testes para determinar compostos fenólicos que estejam

atuando como potencial agente promotor de proteção contra radicais livres. Sendo assim, foram efetuados testes para avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações, através dos métodos de captura de radicais DPPH e poder redutor.

A capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações da casca de *Aspidosperma nitidum*, foi avaliada através da percentagem de redução inicial do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) pelas amostras em diferentes concentrações. Na presença de um antioxidante que possa doar um elétron para o DPPH, a cor roxa típica do radical estável muda para cor amarela e a mudança de absorbância a 515 nm é monitorada por espectrofotometria. O percentual de inibição frente o radical DPPH foi calculado de acordo com a equação:

$$\% AA = 100 - \left[ \left( \frac{A_s - A_B}{A_o} \right) \times 100 \right]$$

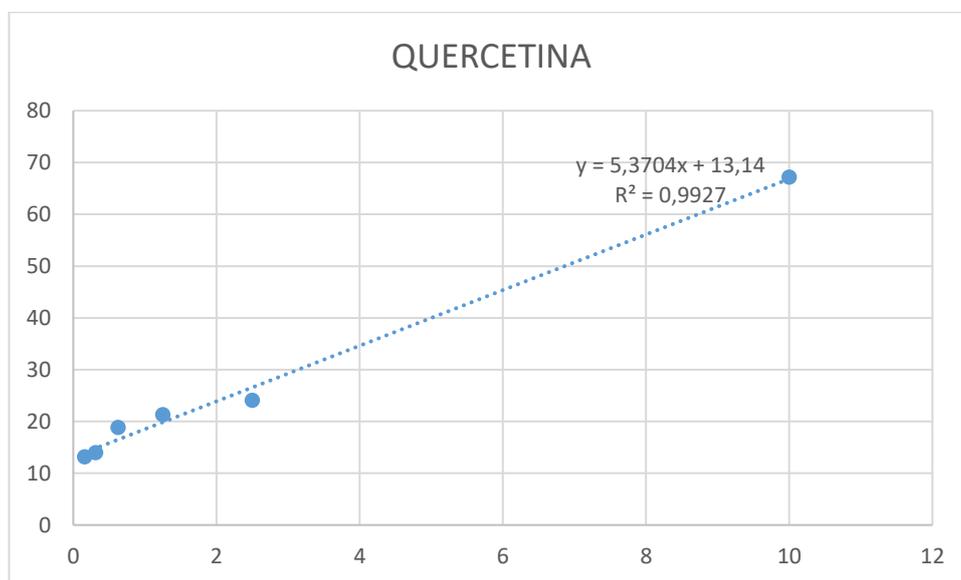
Onde  $A_s$  corresponde a absorbância da amostra,  $A_B$ , absorbância do branco e  $A_o$ , controle negativo.

Os valores de Concentração Efetiva 50% EC50 (concentração da amostra necessária para diminuir 50% de radicais livres) das amostras analisadas (Tabela 12) foram obtidos a partir da análise de regressão linear, foram feitos em triplicata e mostraram bons valores de correlação ( $R^2 > 0.99$ ). Quanto menor o valor de EC<sub>50</sub>, maior a capacidade antioxidante da amostra. Foi utilizado a quercetina como padrão, cuja curva analítica esta apresentada na Figura 52.

Tabela 12- Valores de EC<sub>50</sub> das amostras e do padrão Quercetina.

Códigos	EC <sub>50</sub> ± DP (µg/ mL)
EMC	12,28 ± 0,01
PCAN	7,51 ± 0,11
PHAAN	12,33 ± 0,05
PACAN	9,56 ± 0,08
PCAN_50.1	18,73 ± 0,01
Quercetina	6,86 ± 0,15

EMC: extrato metanólico casca; PCAN: partição do extrato metanólico das cascas fase clorofórmica; PHAAN: partição do extrato metanólico das cascas fase hidroalcoólica; PACAN: partição do extrato metanólico das cascas fase acetato de etila; PCAN\_50.1: substância isolada não identificada. Fonte: Autora

Figura 52-Curva analítica do padrão Quercetina para determinação do valor de % EC<sub>50</sub>.

Fonte: Autora

Os compostos isolados, PCAN\_8.2.2, PCAN\_50.3, PHA\_20.2.33, não foi possível obter uma curva com um bom ajuste da reta, sendo necessário, portanto, refazer o teste para estas substâncias. Já o extrato metanólico da

casca de *A. nitidum* (EMC), as frações obtidas da partição do extrato metanólico de *A. nitidum* das fases clorofórmica (PCAN), acetato de etila (PACAN) e hidroalcoólica (PHAAN) apresentaram um resultado satisfatório visto que, para um composto ser considerado ativo deve apresentar  $EC_{50}$  numa concentração menor que 50 ppm. De acordo com a literatura, os alcaloides que apresentam atividade sequestradora de radical livre DPPH apresentam hidroxilas fenólicas com capacidade de doar prótons e neutralizar os radicais.

### 5.3.2. Ação inibitória da Acetilcolinesterase

A hipótese de utilização de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) tem sido bem-sucedida e aplicada no tratamento profilático e terapêutico da doença de Alzheimer (DA), verificando-se assim uma grande melhoria de vida dos pacientes. A procura de substâncias com um grau de toxicidade baixo tem-se intensificado cada vez mais, investigando-se plantas utilizadas na medicina tradicional, como fonte de obtenção de compostos inibidores da AChE.

Esses inibidores de origem vegetal ligam-se à enzima de uma forma reversível por ligações fracas intermoleculares, permitindo, deste modo, a recuperação do centro ativo da enzima.

Neste trabalho, dentre as substâncias isoladas, pode-se destacar duas delas, a PCAN\_50.3 e PCAN\_8.2.2. A primeira, conforme estudos realizado por HORST, 2012, esperava-se obter uma moderada a potente atividade acetilcolinesterásica, entretanto, devido provavelmente a pouca massa restante para o ensaio, o resultado obtido foi abaixo do esperado, o que precisaria isolar mais a substância para repetir o teste. Já a segunda molécula, apresentou percentual de inibição muito próximo do padrão, Neostigmina, conforme pode-se observar na Tabela 13. Isso pode ser justificado pela presença de grupos carbonílicos de éster que agem fundamentalmente no sítio ativo da enzima, proporcionando uma redução na sua ação em promover a hidrólise da acetilcolina.

Tabela 13- Concentração inibitória da enzima acetilcolinesterase para o padrão neostigmina e as amostras selecionadas.

<b>Amostra</b>	<b>% de inibição</b>
Neostigmina	93,4
EMGAN	77,6
EMCAN	45,8
PHAN	33,8
EAAN	50,1
PHAAN	65,0
PCAN_8.2.2	95,7

EMGAN: extrato metanólico dos galhos de *A. nitidum*; EMCAN: extrato metanólico das cascas de *A. nitidum*; PHAN: partição do extrato metanólico das cascas fase hexânica; EAAN: Extrato aquoso das cascas de *A. nitidum*; PHAAN: partição do extrato metanólico das cascas fase hidroalcoólica; PCAN\_8.2.2: substância isolada e identificada como carapanaubina.

Fonte: Autora

Para amostras que apresentaram percentual de inibição acima de 50%, foram calculados os valores de concentração de inibição  $CI_{50}$ , nos quais, o extrato metanólico, o extrato aquoso, a partição fase clorofórmica e fase hidroalcolica além da substância PCAN\_8.2.2 (carapanaubina) mostraram resultados satisfatórios conforme tabelado abaixo (Tabela 14).

Tabela 14- Concentração inibitória da enzima acetilcolinesterase para as amostras selecionadas e o padrão Neostigmina.

<b>Amostra</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL) ± DP</b>
Neostigmina	1,06 ± 0,14
EMGAN	15,91 ± 0,11
EAAN	18,91 ± 0,04
PHAAN	14,74 ± 0,17
PCAN_8.2.2	15,78 ± 0,11

DP: desvio padrão. Fonte: Autora

### 5.3.3. Atividade Antitumoral

A Tabela 15 demonstra atividade citotóxica das amostras, na qual tem-se destaque para a PCAN que foi capaz de inibir pelo menos 90% da proliferação sendo assim, considerada ativa e com isso, apresentou baixo valor de IC<sub>50</sub> < 30 µg/mL e a substância PCAN\_8.2.2 que também apresentou percentual de inibição de cerca de 74% e conseqüentemente, para percentuais inibitórios acima de 50%, demonstra a viabilidade para verificação da citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais cujos resultados foram apresentados na Tabela 16. Entretanto, a substância PCAN\_8.2.2, quando enviada para teste citotóxico, em momento diferente da fase da qual ela foi isolada, o laboratório não realizou o teste com as células HL-60 (leucemia promielocítica humana) no qual foi obtido um ótimo resultado para a fase em questão, e por isso, a expectativa nesta análise, que por motivo desconhecido não foi realizada.

Este resultado pode ser justificado pela presença de alcalóides na amostra, visto que, nas espécies do gênero *Aspidosperma* esta classe é responsável pela sua atividade farmacológica.

Tabela 15- Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.

Amostra	Porcentagem de inibição	
	HepG2	HL20
EHAN	23,18 ± 8,95	17,71 ± 5,59
EMAN	27,68 ± 4,08	40,25 ± 2,59
PHAN	7,027 ± 4,69	24,15 ± 8,81
<b>PCAN</b>	<b>98,63 ± 5,24</b>	<b>90,70 ± 2,78</b>
PAAN	13,93 ± 8,24	28,11 ± 3,47
PHAAN	4,96 ± 1,66	17,00 ± 4,40
EAAN	19,86 ± 3,07	NR
<b>PCAN_8.2.2</b>	<b>74,09 ± 3,03</b>	<b>NR</b>
PCAN_50	17,2 ± 0,86	NR
PCAN_50.1	0,93 ± 1,76	NR
PCAN50.3	4,93 ± 0,53	NR

NR: Não realizado. Fonte: Autora.

Tabela 16- Valores de IC<sub>50</sub> para atividade citotóxica em linhagens de células tumorais versus não tumorais. Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

Células tumorais	PCAN	PCAN8.2.2	DOX
HCT116	36,58	NR	0,02
	30,02 – 44,57		0,01 – 0,44
HepG2	27,02	40,88	0,01
	23,99 – 30,42	32,30 – 51,74	0,01 – 0,06
HL-60	10,31	NR	0,03
	5,15 – 20,65		0,01 – 1,07
MRC5	40,01	38,74	1,00
	33,61 – 47,63	32,85 – 45,68	0,44 – 2,01

NR: Não realizado. Fonte: Autora

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho visou contribuir com o estudo fitoquímico da espécie *Aspidosperma nitidum* ainda pouco estudada. A investigação fitoquímica das frações do extrato metanólico das cascas de *A. nitidum*, possibilitou o isolamento e identificação de quatro alcalóides indólicos sendo 3 deles na fase clorofórmica e um proveniente da fase hidroalcoólica. Entretanto, um alcalóide no qual, pode ser um marcador para espécie, visto que o mesmo foi identificado em todas as partes da espécie em estudo, não foi possível identificação, necessitando de mais análises e ficando como sugestão de trabalhos posteriores.

O isolamento cromatográfico realizado permitiu obtenção de dois alcalóides inéditos na espécie, o PCAN\_50.3 e PCAN\_8.2.2, e outros dois alcalóides já conhecidos na espécie, o PCAN\_50.2 e PHAAN\_20.2.45. Com base nos dados obtidos e com comparação com a literatura o PCAN\_50.3 foi associado ao alcalóide indólico glicosado desoxicordifolina, não relatado anteriormente nas cascas de *A. nitidum*, conhecido em espécies do gênero Rubiaceae. O alcalóide PCAN\_8.2.2, foi associado ao oxialcalóide carapanaubina, também ainda não relatado na espécie, mas conhecido no gênero *Rauwolfia*. Já os alcalóides PCAN\_50.2 e PHAAN\_20.2.45 foram identificados como ácido harmanocarboxílico e 10-metoxi-dihidrocorinanteol, respectivamente.

Foi possível também avaliar a atividade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas pelo método de DPPH evidenciaram que tanto o extrato metanólico da casca, as frações como as substâncias isoladas PCAN\_50.1 apresentaram boa capacidade sequestrante de radicais livres, que pode ser justificada pela presença de alcalóides. O ensaio de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase apresentou potencial moderado para a substância PCAN\_8.2.2, o que necessita de mais estudos no intuito de obter ou sintetizar novos fármacos com potencial de inibição da enzima AChE para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

A avaliação citotóxica dos extratos e frações frente a linhagens de células tumorais indicou que tanto a fase clorofórmica da partição do extrato metanólico quanto a substância PCAN\_8.2.2, revelaram-se ativos para a célula tumoral

HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) com isso, deve-se especial atenção a fase clorofórmica devido a seu ótimo resultado para células HL-60 (leucemia promielocítica humana), o que justificaria mais estudo da fração com intuito de identificar os possíveis responsáveis por esta atividade testando assim tanto a substância já isolada desta fração quanto as demais que por ventura sua caracterização possa revelar.

## 7. REFERÊNCIAS

ABRANTES, J. S. 2003. Bio(Sócio)diversidade e empreendedorismo ambiental na Amazônia. Rio de Janeiro. Garamond. 148p.

ALLEN, J.R.F.; HOLMSTED, B.R. (1980) The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, 19:1573-1582.

ALWIN C. POWERS & DAVID D' ALESSIO. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. [s.l: s.n.]. p. 1237–1275.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.; CHAVES, F.C.; VIEIRA, P.P. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102(3), p.359-366, 2007.

AÑEZ, R.B.S, Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth e *Aspidosperma Marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de concentração em Botânica, Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, convênio INPA/UFAM).

ARBAIN, D.; PUTRI, M. M.; SARGENT, M. V.; SYARIF, M. The alkaloids of *Uncaria glabrata*. *Australian Journal of Chemistry*, v. 46, n.6, p. 863 – 872, 1993.

ARENAS, P.; MORENO-AZORERO, R. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility, *Econ. Bot.*, 31 (1977) 298.

AQUINO, E. M., Análise química e biológica dos alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. E *Aspidosperma tomentosum* Mart., dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C.; SOARES, D. C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.13 (supl.), p. 6-8, 2003.

BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER, H. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (= *Psychotria acuminata*, Rubiaceae). Phytochemistry Letters, v. 5, p. 558-562, 2012.

BRANDÃO, M.G.L.; GRANDE, T.S.M.; ROCHA, F.M.M.; SAWYER, D.R. and KRETTLI, A.U. J. Ethopharmacol. 1992, 36: 175-182.

BRAZ-FILHO, R (2010): Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Quim Nova 33(1): 229-239.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* 1987, 15, 187.

BOLZANI, V.S.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO-GAMBOA, I. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.1, p. 26-29, 2008.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Food Sci. Technol.-Leb. V.30, p.609-615, 1997.

BROWN R.T.; WARAMBWA, B.F.M. *Adina* alkaloids: isolation of desoxycordifoline. Phytochemistry, v. 17, p. 1686-1687, 1978.

CARLOS L. A.; Alcalóides de *Rauvolfia grandiflora* e de *Rauvolfia mattfeldiana* (APOCYNACEAE), tese de doutorado, Universidade Estadual Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro, 2007.

CARVALHO, L.H., BRANDÃO, M.G.L., SANTOS-FILHO, D., LOPES, J.L.C. and KRETTLI, A.U. Braz. J. Med. Biol. Res. 1991, 24, 1113-1123.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. 1995. Plantas Medicinais, condimentares e aromáticas. Descrição e Cultivo – Guaíba: Agropecuária. 196p.

COINTE, P. L. Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimadas), Companhia Editora Nacional, 2ª Edição ilustrada, 1947.

CORRÊA, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926.

DEUTSCH, H. F.; EVENSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from na *Aspidosperma* tree source. J Pharm. Biomed. Anal., V.12, n. 10, p. 1283-1287, Oct. 1994.

DEWICK, P.M. (1997). *Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley e Sons, 466p.

DOLABELA, M. F. Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrifuga* (A.St-Hil.) Juss. ex Mart. (RUTACEAE) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; GOBBI, L. F.; PINTO, L.H.B.; OLIVEIRA, A.J.B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.99, p. 325-327, 2004.

FERRERO-MILIANI, L., NIELSEN, O. H., ANDERSEN, P. S., GIRARDIN, S. E. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and ALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147 (2), 227–35.

FREITAS, L. D. D., ASPECTOS TECNOLÓGICOS E MORFOANATÔMICOS DE SEMENTES MADURAS, PLÂNTULAS E PLANTAS JOVENS DE *Aspidosperma spruceanum* BENTH. EX MULL. ARG. (APOCYNACEAE), dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural da Amazônia e do Museu Paraense Emílio Goeldi, 2008.

GARCIA, B. H., *Flora Medicinal de Colombia*, Vol. 2, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1975.

GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S.; *Phytochemistry* 1976, 15, 1093.

GEMMA DE LA CRUZ, M. Plantas Medicinais de Mato Grosso – A Farmacopéia Popular dos Raizeiros. 1 ed. Cuiabá, MT: Carlini & Caniato, 2008. 224 p., Bibliografia: p.98. ISBN: 978-85-99146-51-4.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 1996, 38 (supl):315-319.

GRAEBNER, I. B. Estudo dos constituintes químicos isolados de plantas medicinais da região do Vale do Purus no Acre (Amazônia). 2003. 134 f. Tese (Doutorado em Química – Área de Química Orgânica) – Setor de Ciências Naturais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

GOMES, S. M.; CAVALCANTI, T. B. Morfologia floral de *Aspidosperma Mart. & Zucc.* (Apocynaceae). Acta bot. bras., São Paulo, v. 15, n. 1, p. 73-88, Apr. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062001000100009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062001000100009&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 15 jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062001000100009>.

HENRIQUE, M.C. Estudo químico e atividade biológica das cascas de *Aspidosperma desmanthum* e *A. vargasii* (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007, 241p.

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

HORST, H.; Investigação fitoquímica e biológica da espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

INPA. 1976. The chemical composition of Amazonian plants - a catalogue. Acta amazônica 6(2): 237-239

JÚNIOR, A.A.A.; LOPES, R.C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V.W.D. 2005. Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 233pp.

KOEHN FE, CARTER GT: The evolving role of natural products in drug discovery. 2005, Nat Rev 4: 206-220.

LE COINTE, P., *A Amazônia Brasileira*, Vol. 3, Livraria Clássica, Belém do Pará 1934, pp. 35,103.

LEITE, R. F. S.; Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos extratos de *Aspidosperma nitidum* Benth Ex Mull. Arg.e *Aspidosperma pyriformium* Mart. (Apocynaceae) com atividade antimalárica. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2016.

LE MEN, L.; TAYLOR, W. I. A uniform numbering system for alkaloids. *Experientia*, v.21, n.9, p.508-510, 1965.

LOPES, J. N. C.; Lopes, J. L. C.; VICHNESWSKI, W.; NASI, A. M. T. T. & SOUZA, C. P. 1989. Preliminary screening of brasilian plant extracts for molluscicidal activity. *Planta Medica* 55(4): 388.

MESSIADES, D. M. S., Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyriformium* Mart.; dissertação de Mestrado, Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

MILLIKEN, W. Plants for malaria or fever: medicinal species in Latin America-a bibliography survey. Kew: The Royal Botanic Gardens. Monografia. The Royal Botanic Gardens, 27p., 1997.

MING, L. C. 1994. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. *Horticultura Brasileira*. 12(1):3-9.

MING, L. C. 1996. Coleta de Plantas medicinais. *In*: Di Stasi, L. C. 1996. *Plantas Medicinais: Arte e Ciência – um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista – Natura naturata. 230p.

MOHANTA, B.; SUDARSHAN, M.; BORUAH, M. CHAKRABORTY, A. Potencial of Vinca rósea Extracts in Modulating Trace Element Profile: a chemopreventive approach." Biol Trace Elem Res 117(1-3): 139-151.

MORAES, A. P.; Alcalóides indólicos das partes aéreas de *Psychotria sp.* (RUBIACEAE) e síntese de Tiohidantoínas e Tioureias derivadas de aminoácidos e do R-(+)-Limoneno, dissertação de mestrado, Universidade Federal de Góias, Goiânia, 2013.

MOTA, W.M.; BARROS, M.L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P.T.G.; FERNANDES, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. Rev. bras. plantas med., Botucatu, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722012000400008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000400008&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em: 07 Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400008>.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; HOUGHTON, P. J.; Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine, v.14, p.289-300, 2007.

NUNES, D. S., *Contribuição ao estudo químico do gênero Aspidosperma: Aspidosperma pruinosum Markgraf*, dissertação de mestrado em Química Orgânica, Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 177p, 1980.

OLIVEIRA, A. A. de & DALY, D. C. Florestas do Rio Negro. Coordenação Drauzio Varella, Projeto Gráfico Helio de Almeida. São Paulo: Companhia das letras: UNIP, 214p., 2001.

OLIVEIRA, D. R.; VIEIRA, M. N.; LEITÃO, G. G.; LEITÃO, S. G.; ARQMO. Ethnobotanic survey of carapanaua (*Aspidosperma sp.*) among “quilombolas” communities from Oriximiná – Pará State – Brazil. In: XX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL E X CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 2008, São Paulo. Programação Científica. p. 96, ref. 02.048.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 970-983, Aug. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000400037&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400037&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 13 Nov 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000400037>.

RAFFAUF, R. F. 1964. Some chemotaxonomic considerations. *Lloydia* 27(4): 286-298.

RAPINI, A. *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica*, São Paulo, v. 19, p. 55-169, junho 2001. ISSN 2316-9052. Disponível em: <->. Acesso em: 10 nov. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9052.v19i0p55-169>.

REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. Manaus: INPA / SEBRAE-AM, 2002. v.1, 444 p., 25 cm. Bibliografia: p. 69-71. ISBN: 85-87324-11-X.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia central. Manaus: INPA, 1999.

ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JOLLES, C. & JOUSSELIN, A. 1983. *Aspidosperma* de Guyane: alcaloides d'*Aspidosperma markgravianum*. *Journal of Natural Products* 46(5): 694-707.

RODRIGUES, J. V. M.; Desenvolvimento de uma solução oral com atividade farmacológica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.; dissertação de Mestrado, Universidade Estadual da Paraíba, 2015.

SANTOS, S. P. D; Alcaloides indólicos de *Aspidosperma pyrifolium*: estudo fitoquímico e dados espectroscópicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci. Technol. Int. V.8 p.121-137, 2002.

SCHRISPSEMA, J; DAGNINA, D.; GROSMAN, G. Alcalóides indólicos. Farmacognosia da planta ao medicamento. Organizadores: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Grasman, G.; Mello, J.C.P.; Ments, L.A.; Petrovick, P.R. Ed. Da UFSC e UFRCS, capítulo 31, p. 679-706, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ªed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 1102pp.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005. 703p.

WHO. Regulatory situation of herbal medicines. A Worldwide Review. Geneva: WHO, 1998. 45 p.