


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

**ROCHELly DA SILVA MESQUITA**



**ALCALOIDES DE *Abuta panurensis* (Menispermaceae):  
POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE,  
ATIVIDADE CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA**

Manaus-AM

2020

**\*ROCHELly DA SILVA MESQUITA**

**ALCALOIDES DE *Abuta panurensis* (Menispermaceae):  
POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE,  
ATIVIDADE CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Orgânica.

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

**Co-orientador:** Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

\*Bolsista FAPeAM

Manaus-AM

2020

## Ficha Catalográfica

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

M582a Mesquita, Rochelly da Silva  
Alcaloides de *Abuta panurensis* (Menispermaceae): potencial de inibição da acetilcolinesterase, atividade citotóxica e imunomoduladora / Rochelly da Silva Mesquita . 2020  
142 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. alcaloides. 2. Menispermaceae. 3. acetilcolinesterase. 4. in silico. 5. imunomodulador. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ALCALOIDES DE *Abuta panurensis*  
(MENISPERMACEAE): POTENCIAL DE INIBIÇÃO  
DA ACETILCOLINESTERASE, ATIVIDADE  
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA

**ROCHELLY DA SILVA MESQUITA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química. Aprovada em 03 de julho de 2020.



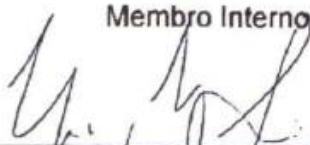
DRA. RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA (DQ/UFAM)

Presidente/Orientadora



DR. EMMANOEL VILAÇA COSTA (DQ/UFAM)

Membro Interno



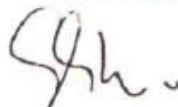
DR. VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JÚNIOR (IME)

Membro Interno



DR. TÚLIO DE ORLEANS GADELHA COSTA (DQ/UFAM)

Membro Externo



DRA. MARIA LÚCIA BELÉM PINHEIRO (DQ/UFAM)

Membro Interno

Universidade Federal do Amazonas Manaus, 03 de julho 2020.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e diversas oportunidades de aprendizado.

A todos os meus familiares em especial Reginaldo, Isabel (*in memoriam*) e Herbert pelo imenso amor, apoio e incentivo nessa jornada.

Aos orientadores Profa. Dra. Rita Nunomura e Dr. Felipe Silva pela orientação e oportunidade de crescimento profissional.

Aos colegas de laboratório da UFAM: Ingrity, Maiara, Lilian, Marcos, Leonard, André, Isabely e Natália pela oportunidade de aprendizado e por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho.

À UFAM e Central Analítica pela oportunidade de realizar este trabalho.

À FAPEAM (Fundação de Amparo e Pesquisa no Amazonas) pela bolsa concedida.

Ao Dr. Massuo Kato e Dra. Lydía Yamaguchi da USP-SP pelas análises de espectrometria de massas de alta resolução.

Ao Dr. Gemilson Soares Pontes do INPA-AM pelos ensaios de citotoxicidade e imunomodulador.

Ao Dr. Andrii Kyrylchuk do IOC-Kiev da Ucrânia pelos cálculos de *docking* molecular.

Ao projeto Horizon2020-MSCA-RISE-2016-734759 (VAHVISTUS) pelo financiamento dos testes citotóxicos, imunomoduladores e estudo *in silico*.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Espécies do gênero *Abuta* (*Menispermaceae*) são conhecidas por suas propriedades etnobotânicas, apresentando uma ampla gama de propriedades farmacológicas. Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico e investigação da atividade biológica da espécie *Abuta panurensis* (*Menispermaceae*). O perfil químico das folhas, galhos e sementes da espécie *A. panurensis* foi elaborado por meio de técnicas espectrométricas. A fração alcaloídica das folhas e galhos foi analisada por meio de CLAE-DAD-MS/MS. As estruturas dos alcaloides foram elucidadas por uma combinação de técnicas espectrométricas e espectroscópicas de RMN 1D e 2D juntamente com o estudo *in silico*. A inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade citotóxica e imunomoduladora dos alcaloides isolados foram avaliadas por meio de ensaios *in vitro*. Treze alcaloides (isoquinolínicos e amidas) foram propostos conforme a literatura, dos quais cinco alcaloides (isômero da lindoldamina, estefarina, palmatina, 5-*N*-metilmaitenina e *N-trans*-feruloitiramina) foram isolados dos galhos e reportados pela primeira vez para a espécie. A presença da poliamina 5-*N*-metilmaitenina foi reportada pela primeira vez na família *Menispermaceae*. Quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase, quatro alcaloides mostraram potencial de inibição com  $CI_{50}$  de 19,55  $\mu$ M a 61,24  $\mu$ M. O estudo *in silico* das interações dos alcaloides estefarina e 5-*N*-metilmaitenina com a enzima acetilcolinesterase e interleucinas IL-6 e IL-8, mostrou que as substâncias foram capazes de se ligar efetivamente ao sítio ativo da enzima AChE e demonstraram afinidade com as proteínas de IL-6 e IL-8. Estefarina e 5-*N*-metilmaitenina mostraram atividade citotóxica contra duas linhagens de células tumorais (K562 e U937) com  $CI_{50}$  de 11,77  $\mu$ M a 28,48  $\mu$ M e não foram citotóxicos para células normais. Quanto à atividade imunomoduladora, ambos alcaloides inibiram a produção de IL-6 em níveis semelhantes. A estefarina inibiu consideravelmente a produção de IL-8 em comparação com a 5-*N*-metilmaitenina, que mostrou uma ação dependente da dose.

**Palavras-chave:** alcaloides isoquinolínicos, poliaminas, *Menispermaceae*, acetilcolinesterase, *in silico*, imunomodulador, citotóxico.

## ABSTRACT

Species of the genus *Abuta* (*Menispermaceae*) are known for their ethnobotanical and a wide range of pharmacological properties. This work is reported the phytochemical study and biological activity investigation of the specie *Abuta panurensis* (*Menispermaceae*). A chemical profile of leaves, branches and seeds of the *A. panurensis* was elaborated by spectrometric techniques. The alkaloid fraction from leaves and branches was analyzed by HPLC-DAD-MS/MS. Structures of the alkaloids were elucidated by a combination of 1D and 2D NMR spectroscopic and spectrometric techniques together with an *in silico* study. Acetylcholinesterase enzyme inhibition, cytotoxic, and immunomodulatory activity of alkaloids were evaluated by *in vitro* assays. Thirteen alkaloids (isoquinolines and amides) were tentatively identified, of which five (lindoldhamine isomer, stepharine, palmatine, 5-*N*-methylmaitenine and *N-trans*-feruloyltiramine) were isolated and reported for the first time for the specie. The presence of 5-*N*-methylmaytenine polyamine was reported for the first time in *Menispermaceae* family. As for the acetylcholinesterase enzyme inhibition, four alkaloids showed the inhibition potential with IC<sub>50</sub> values ranging from 19.55 μM to 61.24 μM. *In silico* study of interactions of stepharine and 5-*N*-methylmaitenine alkaloids with the acetylcholinesterase enzyme, interleukins IL-6 and IL-8 showed that the compounds were able to bind effectively to the AChE enzyme active sites and to demonstrate affinity towards IL-6 and IL -8 proteins. The stepharine and 5-*N*-methylmaytenine revealed a cytotoxic activity against two tumor cell lines (K562 and U937) with the IC<sub>50</sub> values in the range of 11.77 μM to 28.48 μM, the alkaloids were not cytotoxic to normal cells. Regarding the immunomodulatory activity, both alkaloids inhibited the IL-6 production at similar levels. Steptharine inhibited considerably the IL-8 production, when compared to 5-*N*-methylmaytenine that showed, however, a dose-dependent action.

**Keywords:** isoquinolines alkaloids, polyamines, *Menispermaceae*, acetylcholinesterase, *in silico*, immunomodulator, cytotoxic.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica da família <i>Menispermaceae</i> no mundo. ....	18
<b>Figura 2:</b> Exemplos de alcaloides relatados na família <i>Menispermaceae</i> . ....	21
<b>Figura 3:</b> Exemplos de amidas reportadas nos gêneros <i>Cissampelos</i> e <i>Abuta</i> . ....	22
<b>Figura 4:</b> Distribuição geográfica do gênero <i>Abuta</i> no Brasil. ....	24
<b>Figura 5:</b> Alcaloides menos frequentes no gênero <i>Abuta</i> . ....	25
<b>Figura 6:</b> Alcaloides isolados do gênero <i>Abuta</i> . ....	26
<b>Figura 7:</b> Distribuição geográfica da espécie <i>A. panurensis</i> no Brasil. ....	28
<b>Figura 8:</b> (1) <i>A. grandifolia</i> : A. ramo frutífero; B. flor estaminada; C. detalhe do estame; D. flor pistilada; E. gineceu. (2) <i>A. panurensis</i> : A. ramo florífero; B. flor; C. detalhe do estame. D. flor pistilada; E. detalhe do gineceu. ....	28
<b>Figura 9:</b> Estrutura química dos alcaloides panurensina (29) e norpanurensina (30). ..	29
<b>Figura 10:</b> Regiões de ligação da enzima acetilcolinesterase no bolso do sítio ativo. ...	31
<b>Figura 11:</b> Secreção de citocina (TNF e IL-6) e vias de tráfego em macrófagos. ....	34
<b>Figura 12:</b> Local de coleta do material botânico situado próximo do perímetro urbano de Manaus-AM. ....	37
<b>Figura 13:</b> Espectros de massas LS-MS em fonte ESI no modo positivo para folhas (A), galhos (B) e sementes (C) de <i>A. panurensis</i> . ....	45
<b>Figura 14:</b> Proposta dos alcaloides identificados em <i>A. panurensis</i> pela técnica de LS-MS. ....	47
<b>Figura 15:</b> Cromatograma de Íons Totais (TIC) CLAE-MS da fração alcaloídica das folhas com 9 alcaloides identificados (A) e galhos com 11 alcaloides identificados (B) em escala analítica de <i>A. panurensis</i> . ....	48
<b>Figura 16:</b> Proposta de fragmentação para alcaloides protoberberínicos com dois grupos metoxilas no C-9 e C-10 (palmatina) (1) e um grupo hidroxila no C-9 ou C-10 (estefaranina) (2). ....	49
<b>Figura 17:</b> Proposta de fragmentação para alcaloides benzilisoquinolínicos. ....	51
<b>Figura 18:</b> Proposta de fragmentação para o alcaloide proaporfínico estefarina. ....	52
<b>Figura 19:</b> Proposta de fragmentação para o alcaloide aporfínico estefarina. ....	52
<b>Figura 20:</b> Proposta de fragmentação para o alcaloide protopina alocriptopina. ....	53
<b>Figura 21:</b> Proposta de fragmentação para o alcaloide morfina tebaina. ....	54
<b>Figura 22:</b> Proposta de fragmentação para alcaloides amidas ( $m/z$ 314) e poliaminas ( $m/z$ 420). ....	54
<b>Figura 23:</b> Espectro de massas de alta resolução modo <i>full scan</i> (A) e MS/MS (B) da amostra APG569. ....	58
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG569 (A) e ampliações da região de aromáticos (B) e alifáticos (C). ....	60
<b>Figura 25:</b> Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG569. ....	61
<b>Figura 26:</b> Ampliações das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG569. ....	62
<b>Figura 27:</b> Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG569. ....	63
<b>Figura 28:</b> Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG569: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ). ....	65
<b>Figura 29:</b> Estrutura do alcaloide isômero da lindoldamina. ....	66
<b>Figura 30:</b> Espectro de massas de alta resolução modo <i>full scan</i> (A) e MS/MS (B) da amostra APG298. ....	69
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG298 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C). ....	71
<b>Figura 32:</b> Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG298. ....	73



<b>Figura 33:</b> Ampliação das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG298.....	74
<b>Figura 34:</b> Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG298....	74
<b>Figura 35:</b> Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG298: azul ( $J^2$ ) e vermelho ( $J^3$ ).	76
<b>Figura 36:</b> Estrutura do alcaloide estefarina. ....	77
<b>Figura 37:</b> Espectro de massas de alta resolução modo <i>full scan</i> (A) e MS/MS (B) da amostra APG352. ....	79
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG352 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).....	81
<b>Figura 39:</b> Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG352....	82
<b>Figura 40:</b> Ampliação das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG352.....	83
<b>Figura 41:</b> Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG352....	84
<b>Figura 42:</b> Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG352: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ).	86
<b>Figura 43:</b> Estrutura do alcaloide palmatina.....	86
<b>Figura 44:</b> Espectro de massas de alta resolução modo <i>full scan</i> (A) e MS/MS (B) da amostra APG420. ....	88
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) da amostra APG420 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).....	90
<b>Figura 46:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) (A) e DEPT-135° (B) da amostra APG420. ....	92
<b>Figura 47:</b> Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) da amostra APG420..	92
<b>Figura 48:</b> Ampliação das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) da amostra APG420. ....	93
<b>Figura 49:</b> Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) da amostra APG420.	95
<b>Figura 50:</b> Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) da amostra APG420: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ).	96
<b>Figura 51:</b> Correlações homonucleares <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H observadas no experimento de COSY (500 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) (A) e ampliação da região alifática (B) da amostra APG420. ...	97
<b>Figura 52:</b> Estrutura do alcaloide 5- <i>N</i> -metilmaitenina. ....	98
<b>Figura 53:</b> Espectro de massas de alta resolução modo <i>full scan</i> (A) e MS/MS (B) da amostra APG314. ....	100
<b>Figura 54:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG314 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).....	102
<b>Figura 55:</b> Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG314...	103
<b>Figura 56:</b> Ampliação das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG314.....	104
<b>Figura 57:</b> Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG314..	106
<b>Figura 58:</b> Ampliação do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra APG314: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ). ....	108
<b>Figura 59:</b> Estrutura do alcaloide <i>N-trans</i> -feruloiltiramina.....	108
<b>Figura 60:</b> Curva dose resposta do percentual de inibição vs concentração do controle positivo neostigmina.....	110
<b>Figura 61:</b> Atividade citotóxica da estefarina contra as linhagens celulares de K562 e U937 e respectivas CI <sub>50</sub> . ....	113
<b>Figura 62:</b> Atividade citotóxica de 5- <i>N</i> -metilmaitenina contra as linhagens celulares de K562 e U937 e respectivas CI <sub>50</sub> . ....	114

<b>Figura 63:</b> Avaliação citotóxica da estefarina ( <b>A, C</b> ) e 5- <i>N</i> -metilmaitenina ( <b>B, D</b> ) para células Vero e PBMC humano. ....	114
<b>Figura 64:</b> Efeito imunomodulador da 5- <i>N</i> -metilmaitenina (12,5 µM e 25 µM) e estefarina (28,48 µM e 57,0 µM). * <i>p</i> = 0,01, *** <i>p</i> = 0,0001. ....	115
<b>Figura 65:</b> Interações da neostigmina com o bolso de ligação da enzima AChE. Interações do tipo empilhamento $\pi$ - $\pi$ (lilás) e eletrostáticas (marrom). ....	117
<b>Figura 66:</b> Poses de ligação ( <b>A, B</b> ) dos alcaloides dentro do bolso da AChE e seus modos de ligação ( <b>C, D</b> ): 5- <i>N</i> -metilmaitenina ( <b>A, C</b> ) e estefarina ( <b>B, D</b> ). ....	118
<b>Figura 67:</b> Sítios de interação da IL-6 de acordo com Somers <i>et al.</i> , (1997) ( <b>A</b> ); Poses de ligação do ácido <i>L</i> -tartárico (AT) com a IL-6 ( <b>B</b> ). O complexo receptor - IL-6 ( <b>B</b> ). As estruturas de IL-6 sobrepostas são coloridas em fitas brancas (1P9M) e azuis (1ALU). ....	120
<b>Figura 68:</b> Poses de ligação ( <b>A</b> ) da 5- <i>N</i> -metilmaitenina (azul) e estefarina (verde) na IL-6 e seus modos de ligação: 5- <i>N</i> -metilmaitenina ( <b>B</b> ) e estefarina ( <b>C</b> ). ....	121
<b>Figura 69:</b> Posições de ligação ( <b>A, B</b> ) dos alcaloides na IL-8 e seus modos de ligação ( <b>C, D</b> ): 5- <i>N</i> -metilmaitenina ( <b>A, C</b> ) e estefarina ( <b>B, D</b> ). ....	122

#### LISTA DE FIGURAS NO ANEXO

<b>Figura A1:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da coclaurina ( <i>m/z</i> 286). ....	138
<b>Figura A2:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da estefarina ( <i>m/z</i> 298). ....	138
<b>Figura A3:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da <i>N</i> -metilcoclaurina ( <i>m/z</i> 300). ....	138
<b>Figura A4:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da estefarina ( <i>m/z</i> 310). ....	139
<b>Figura A5:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da tebaina ( <i>m/z</i> 312). ....	139
<b>Figura A6:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> de feruloiltiramina ( <i>m/z</i> 314). ....	139
<b>Figura A7:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da estefaranina ( <i>m/z</i> 324). ....	140
<b>Figura A8:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da reticulina ( <i>m/z</i> 330). ....	140
<b>Figura A9:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da papaverina ( <i>m/z</i> 340). ....	140
<b>Figura A 10:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da palmatina ( <i>m/z</i> 352). ....	141
<b>Figura A11:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da alocriptopina ( <i>m/z</i> 370). ....	141
<b>Figura A12:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da metilmaitenina ( <i>m/z</i> 420). ....	141
<b>Figura A13:</b> Espectro de MS <sup>2</sup> da lindoldamina ( <i>m/z</i> 569). ....	142
<b>Figura A14:</b> Cromatograma de CLAE-DAD da fração alcaloídica dos galhos de <i>A. panurensis</i> escala semi-preparativa. A fase móvel foi composta de B (metanol) e A (ácido fórmico 1% em H <sub>2</sub> O v/v), com gradiente de eluição (1): 0-14 min 20-80 % B, 20-30 min 80 % B. Coluna C18 e detector de UV 260 nm e 280 nm. ....	142
<b>Figura A15:</b> Cromatograma de CLAE-DAD da fração alcaloídica dos galhos de <i>A. panurensis</i> escala semi-preparativa. A fase móvel foi composta de B (metanol) e A (ácido fórmico 1% em H <sub>2</sub> O v/v), com gradiente de eluição (2): 0-20 min 20-80 % B, 20-35 min 80 % B, 35-45 min 20-80 %. Coluna C18 e detector de UV 260 nm e 280 nm. ....	142

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies da família <i>Menispermaceae</i> utilizadas na medicina tradicional. ...	19
<b>Tabela 2:</b> Alguns exemplos de constituintes isolados da família <i>Menispermaceae</i> .....	20
<b>Tabela 3:</b> Caracterização MS/MS dos constituintes químicos detectados nas folhas, galhos e sementes da <i>A. panurensis</i> pela técnica de LS-MS. ....	47
<b>Tabela 4:</b> Caracterização da fração alcaloídica das folhas e galhos de <i>A. panurensis</i> por CLAE-DAD-MS/MS em escala analítica. ....	56
<b>Tabela 5:</b> Fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa da fração alcaloídica dos galhos de <i>A. panurensis</i> . ....	57
<b>Tabela 6:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da amostra APG569. ....	67
<b>Tabela 7:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da amostra APG298. ....	78
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da amostra APG352. ....	87
<b>Tabela 9:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da amostra APG420. ....	99
<b>Tabela 10:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da amostra APG314. ....	109
<b>Tabela 11:</b> Concentração inibitória ( $\mu\text{M}$ ) da enzima acetilcolinesterase para os alcaloides e o controle neostigmina. ....	110
<b>Tabela 12:</b> Atividade citotóxica da estefarina e 5- <i>N</i> -metilmaitenina contra 3 linhagens de células humanas. ....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*  
APG: *Abuta panurensis* galhos  
AChE: acetilcolinesterase  
AChI: iodeto de acetilcolina  
CCD: Cromatografia em Camada Delgada  
CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória mediana  
CD<sub>3</sub>OD: metanol deuterado  
C18: Octadecilsilano  
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
COSY: *Correlated spectroscopy*  
d: duplete  
dd: duplo duplete  
DAD: *Diode Array Detection*  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DMSO-d<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DEPT-135°: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*  
DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)  
ESI: Ionização por electropulverização  
ELISA: Ensaio imunossorvente de enzima ligada  
EMAR: Espectrometria de Massas de Alta Resolução  
FBS: soro fetal bovino  
HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*  
Hz: Hertz  
HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Correlation*  
IL: interleucina  
J: constante de acoplamento  
LS-MS: *leaf spray* por espectrometria de massas  
MS: *Mass Spectrometry*  
MS/MS<sup>n</sup>: Múltiplo estágio de *Mass Spectrometry*  
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol  
m/z: razão massa/carga

m: multipletto

PBS: Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

PFP: Pentafluorofenil

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico humano

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

s: simpleto

TIC: Cromatograma de Íons Totais

TMS: Tetrametilsilano

t: tripleto

u: unidade atômica

UV: ultravioleta

1D/2D: Uma dimensão / duas dimensões

$\mu\text{M}$ : micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1. Geral	17
2.2. Específicos	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
3.1. Família <i>Menispermaceae</i> Juss.	18
3.1.1. Aspectos Etnobotânicos da família <i>Menispermaceae</i>	18
3.2. Estudo fitoquímico da família <i>Menispermaceae</i>	19
3.2.1. Alcaloides de <i>Menispermaceae</i>	21
3.2.2. Atividade farmacológica de alcaloides de <i>Menispermaceae</i>	22
3.3. O Gênero <i>Abuta</i> Barrere ex Aubl.	24
3.3.1. Fitoquímica do gênero <i>Abuta</i>	25
3.3.2. Espécie <i>Abuta panurensis</i> Eichler	27
3.7. Inibidores da enzima acetilcolinesterase	29
3.8. Imunomoduladores	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1. Solventes e Equipamentos	36
4.2. Coleta e identificação do material botânico	36
4.3. Obtenção da marcha alcaloídica em escala analítica e preparativa da <i>A. panurensis</i>	37
4.4. Análises cromatográficas	38
4.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	38
4.4.2. <i>Leaf Spray</i> por espectrometria de massas (LS-MS)	38
4.4.3. CLAE-DAD-MS e MS/MS <sup>n</sup> em escala analítica	39
4.4.4. Fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa	39
4.4.5. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	40
4.5. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
4.6. Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)	41
4.7. Ensaio de citotoxicidade	41
4.8. Ensaio imunomodulador	423
4.9. Cálculos de <i>docking</i> molecular	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>

5.1. Análise dos espectros de LS-MS de <i>Abuta panurensis</i>	45
5.2. Perfil químico da fração alcaloídica de <i>A. panurensis</i> em escala analítica	48
5.3. Fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa	57
5.3.1. Determinação estrutural da amostra APG569	57
5.3.2. Determinação estrutural da amostra APG298	68
5.3.3. Determinação estrutural da amostra APG352	78
5.3.4. Determinação estrutural da amostra APG420	87
5.3.5. Determinação estrutural da amostra APG314	99
5.4. Avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase	109
5.5. Avaliação da atividade citotóxica	112
5.6. Atividade imunomodulatória	115
5.7. Estudo de <i>docking</i> molecular da estefarina e 5- <i>N</i> -metilmaitenina	116
5.7.1. Interação com acetilcolinesterase da <i>Tetronarce californica</i> (TcAChE)	116
5.7.2. Interação com interleucinas (IL-6 e IL-8) humanas	119
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>123</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO</b>	<b>138</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento tradicional sobre o meio em que se vive é fundamental para a construção da cultura de um povo. O uso de plantas tóxicas é uma prática muito comum entre populações indígenas, como o preparo do “curare”, um veneno de ação paralisante usado para caça na região amazônica, que pode ser preparado a partir de algumas espécies da família *Menispermaceae* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Esse conhecimento tem despertado interesse no estudo de plantas medicinais com propriedades farmacológicas, estimulando a busca por substâncias bioativas e possivelmente levando a descoberta de novos fármacos, tudo isso associado às informações botânicas e quimiotaxonômicas. A família *Menispermaceae* é conhecida na região por abrigar espécies com propriedades tóxicas, que muitas vezes estão relacionadas à presença de alcaloides, como, por exemplo, no gênero *Abuta* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

O alcaloide *d*-tubocurarina, que faz parte do princípio ativo do curare, foi isolado a partir da espécie *Chondodendron tomentosum* da família *Menispermaceae*, atuando como relaxante muscular, esta atividade está relacionada ao sistema nervoso central (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000). Estudos realizados com alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico têm mostrado potencial farmacológico de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (MUREBWAYIRE *et al.*, 2009; COMETA *et al.*, 2012), atividade citotóxica (ROJAS *et al.*, 2004; STEVIGNY *et al.*, 2005; SWAFFAR *et al.*, 2012) e imunomodulatória (VIEIRA *et al.*, 2018).

Os produtos naturais, especialmente os alcaloides, têm sido uma das principais fontes de substâncias bioativas capazes de inibir a enzima AChE, que por sua vez está relacionada ao processo de desencadeamento de doenças neurodegenerativas ou ainda, doenças inflamatórias mediada pelo sistema colinérgico de células do sistema imune (BOROVIKOVA *et al.*, 2000; COMETA *et al.*, 2012; HOUGHTON *et al.*, 2006; KONRATH *et al.*, 2013; LIMA e HAMERSKI, 2018; SUN *et al.*, 2013).

*Abuta* é o gênero que apresenta maior diversidade estrutural de alcaloides na família *Menispermaceae*, sendo caracterizado pela presença de derivados do esqueleto benzilisoquinolínico com diversas propriedades farmacológicas reportadas na literatura (BENTLEY, 1989; HOCQUEMILLER e CAVE, 1984; STEELE *et al.*, 1999; COMETA *et al.*, 2012; SWAFFAR *et al.*, 2012).



Apesar dos diversos estudos relacionados aos alcaloides da família *Menispermaceae*, a espécie *A. panurensis* ainda foi pouco explorada do ponto de vista fitoquímico, sendo possível até o momento encontrar um único registro na literatura referente a dois alcaloides do tipo bisbenzilisoquinolínicos isolados a partir dos galhos desta espécie (CAVA *et al.*, 1975b). Também vale ressaltar que muitas vezes na região, a espécie pode ser confundida com a *A. grandifolia*, embora tratem-se de espécies vegetativamente diferentes (SOUSA *et al.*, 2014).

Diante do exposto acima, o trabalho consiste no estudo fitoquímico da espécie *A. panurensis* da família *Menispermaceae* pouco explorada do ponto de vista químico, a fim de que possamos elaborar um perfil mais abrangente quanto aos metabólitos secundários encontrados, juntamente com o isolamento de substâncias e atividade inibitória da enzima AChE, citotóxica e imunomodulatória.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Contribuir para o conhecimento fitoquímico da espécie *Abuta panurensis* (*Menispermaceae*) e avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, citotóxica e imunomoduladora.

### 2.2. Específicos

- Avaliar o perfil químico das folhas, galhos e sementes de *A. panurensis* por meio da técnica de LS-MS;
- Avaliar as frações alcaloídicas das folhas e dos galhos de *A. panurensis* utilizando técnicas de CLAE-DAD-MS e MS/MS<sup>n</sup>;
- Isolar e caracterizar os principais constituintes da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis* por meio de CLAE-DAD-MS, MS/MS<sup>n</sup>, EMAR e RMN 1D/2D;
- Avaliar o potencial biológico das substâncias identificadas nos galhos de *A. panurensis* por meio de ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase, de citotoxicidade e de imunomodulação;
- Realizar o estudo teórico de *docking* molecular das substâncias promissoras.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Família *Menispermaceae* Juss.

Pertencente à ordem Ranunculales, a família *Menispermaceae* foi descrita por A. L. de Jussieu em 1789, e o nome *Menispermaceae* está relacionado ao formato de meia lua das sementes. Todas as espécies são perenes e a família é constituída de diversas formas de vida sendo predominantemente trepadeiras, mas também abrange arbustos, subarbustos, raramente ervas e árvores (WATSON e DALLWITZ, 1992; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; CARLQUIST, 1995).

As espécies da família *Menispermaceae* apresentam ampla distribuição geográfica, principalmente em países tropicais e subtropicais (Figura 1). A família está representada por 70 gêneros e 517 espécies registradas, das quais apenas 3 espécies do gênero *Abuta* ocorrem na América do Norte. Em todo Brasil foram relatados 15 gêneros e 105 espécies, das quais 16 espécies distribuídas em 8 gêneros ocorrem na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada próximo da cidade de Manaus-AM (RIBEIRO, *et al.*, 1999; FLORA, 2020).



Fonte: <http://www.mobot.org/.../orders/ranunculalesweb.htm>

**Figura 1:** Distribuição geográfica da família *Menispermaceae* no mundo.

##### 3.1.1. Aspectos Etnobotânicos da família *Menispermaceae*

Conforme podemos observar na Tabela 1, espécies de diferentes gêneros da família *Menispermaceae* são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças, apresentando um vasto valor medicinal para populações locais (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; WET e WYK, 2008). Na América do Sul o uso do curare, descrito como veneno de flechas que paralisa peixes e pássaros, é amplamente difundido entre populações indígenas principalmente para caça na região. O curare pode ser preparado a partir de espécies dos gêneros *Abuta*, *Chondodendron*, *Curarea* e *Cissampelos*, como também pode ser produzido por espécies do gênero *Strychnos* (Loganiaceae) (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1999; MANU *et al.*, 2012).

**Tabela 1:** Espécies da família *Menispermaceae* utilizadas na medicina tradicional.

Espécies	Uso tradicional
<i>Abuta grandifolia</i>	Febre, enfermidades gástricas, hepáticas, malária, curare (PÉREZ, 2002; GARAVITO <i>et al.</i> , 2006), lesões na pele e anti-inflamatório (ROJAS <i>et al.</i> , 2004).
<i>Abuta sabdwithiana</i>	Cicatrizante e anti-inflamatório (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).
<i>Abuta selloana</i>	Cólicas menstruais, anti-inflamatório e verminoses (TRIBESS <i>et al.</i> , 2015).
<i>Antizoma angustifolia</i>	Desordens no sistema digestivo e urinário (WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962; WET <i>et al.</i> , 2004).
<i>Cissampelos pareira</i>	Cólicas menstruais, hemorragia uterina e preparação curare (MANU <i>et al.</i> , 2012; SEMWAL <i>et al.</i> , 2014).
<i>Cissampelos torulosa</i>	Dor de dente, dor nos rins e vômito (WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962).
<i>Tinospora fragosa</i>	Tosse, dor de garganta, reumatismo e outras dores no corpo (WET e WYK, 2008).
<i>Chondodendron</i> spp.	Curare (RIBEIRO <i>et al.</i> , 1999; ROCHA <i>et al.</i> , 1984)

Embora tenha sido apresentado o conhecimento popular de algumas espécies da família *Menispermaceae*, a sua utilização como medicamento tradicional ou fitoterápico, especialmente considerando os dados populares de toxicidade, ainda é restrito em virtude do baixo número de informações que garantam a segurança quanto ao uso ( DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Essa restrição torna-se maior pelo fato de que os medicamentos tradicionais preparados com essas espécies da região amazônica, não se caracterizam por uso disseminado e poucas informações estão disponíveis. Entretanto, esse aspecto torna as espécies interessantes do ponto de vista científico para a realização de estudos como fonte de substâncias bioativas, além do conhecimento científico acerca de espécies bastante exploradas do ponto de vista tradicional ( DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

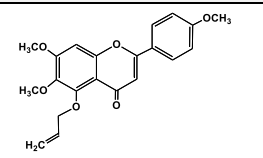
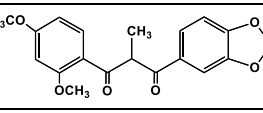
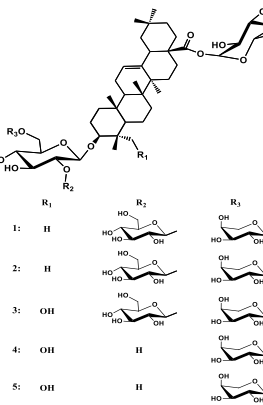
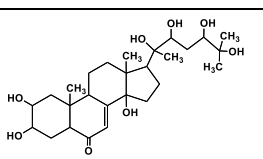
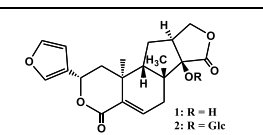
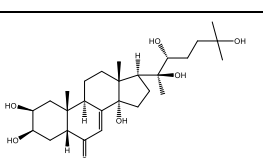
### 3.2. Estudo fitoquímico da família *Menispermaceae*

A literatura descreve que os constituintes químicos mais abundantes nas espécies da família *Menispermaceae* são os alcaloides (THORNBER, 1970; MENACHERY, 1998; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000), entretanto outras classes de metabólitos já foram relatadas na família (Tabela 2). Flavonoides e terpenoides já foram isolados da espécie *Tinospora cordifolia* (PRAKASH e ZAMAN, 1982; TUNTIWACHWUTTIKUL *et al.*, 1999), outros metabólitos como flavonas, diterpenos, triterpenos e fenólicos foram isolados da *T. crispa* (KOAY e AMIR, 2013); além de saponinas isoladas do extrato

metanólico das folhas de *Abuta grandifolia* (SAYAGH *et al.*, 2012), assim como os esteroides abutasterona e 20-hidroxiecdisona isolados de *A. velutina* (PINHEIRO *et al.*, 1983) e *Coscinium fenestratum* (DEEVANHXAY *et al.*, 2009), respectivamente.

Embora tenham sido relatados outras classes de metabólitos secundários, os alcaloides apresentam um grande interesse de estudo devido a elevada ocorrência deles nos diferentes gêneros da família. A maioria dos alcaloides em *Menispermaceae* são derivados de esqueleto isoquinolínico, apresentando como precursor o aminoácido *L*-tirosina (ROCHA *et al.*, 1984; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; SEMWAL e SEMWAL, 2015).

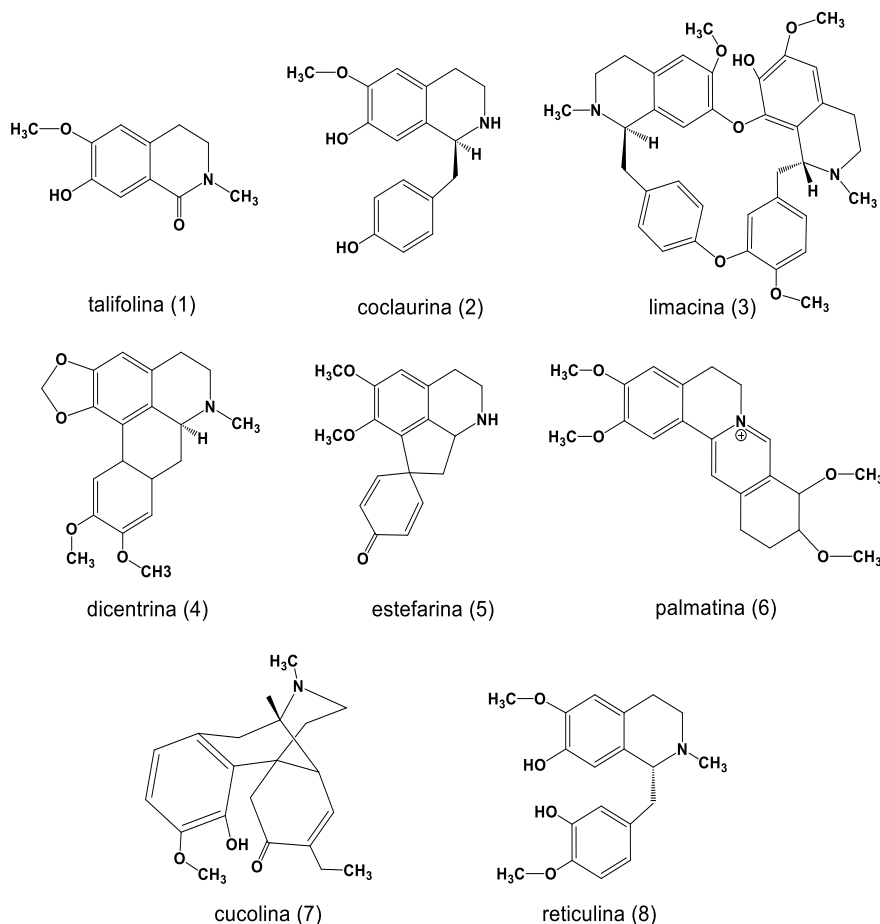
**Tabela 2:** Alguns exemplos de constituintes isolados da família *Menispermaceae*.

Estrutura Química	Classe Química	Gênero	Nome	Referência
	Flavonoides	<i>Tinospora</i>	5-aliloxi-6, 7, 4'-trimetoxiflavona	PRAKASH e ZAMAN, 1982
	Flavonoides	<i>Tinospora</i>	tinosporinona	PRAKASH e ZAMAN, 1982
	Saponinas	<i>Abuta</i>	1: lucyosideo E 2: silfiosideo E 3: (policiosideo D), 4:3-O-(β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-glucuronopiranosil)- -28-O-(β-D-glucopiranosil)- ácido oleanólico 5: polisciosideo A	SAYAGH <i>et al.</i> , 2012
	Esteroides	<i>Abuta</i>	abutasterona	PINHEIRO <i>et al.</i> , 1983
	Terpenos	<i>Tinospora</i>	1: Baenzigerida A 2: baenzigerosídeo A	TUNTIWACH WUTTIKUL <i>et al.</i> , 1999
	Esteroides	<i>Coscinium</i>	20-hidroxiecdisona	DEEVANHXAY <i>et al.</i> , 2009

### 3.2.1. Alcaloides de *Menispermaceae*

Os alcaloides são compostos nitrogenados de baixo peso molecular encontrados principalmente em plantas. Podem conter um ou mais átomos de nitrogênio com características de aminas primárias, secundárias ou terciárias, geralmente conferindo o caráter de basicidade da molécula, e facilitando o isolamento e purificação em relação às demais classes de metabólitos secundários. Contudo, esse caráter básico está relacionado com a estrutura, presença e localização de grupos funcionais nos alcaloides (DEWICK, 2009).

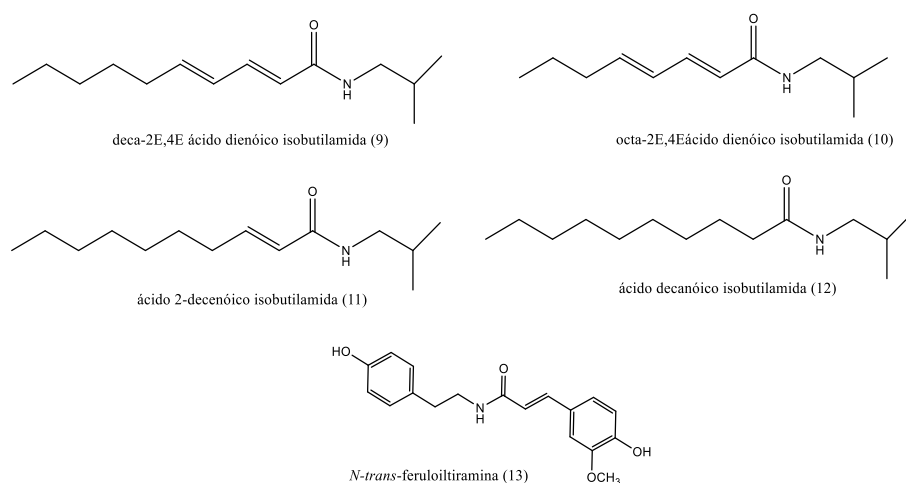
Mudanças fundamentais no esqueleto básico dos alcaloides são capazes de promover um aumento na diversidade e tipos estruturais de alcaloides. Essa característica é muito comum nos gêneros encontrados na família *Menispermaceae*, que é bastante promissora quanto à variedade de tipos de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico, das quais podemos citar: isoquinolínicos (1), benziltetrahydroisoquinolínicos (2 e 8), bisbenzylisoquinolínicos (3), aporfínicos (4), proaporfínicos (5), protoberberínicos (6), morfínicos (7) entre outros (Figura 2) (THORNER, 1970; YU *et al.*, 2014; SEMWAL e SEMWAL, 2015; KONGKIATPAIBOON *et al.*, 2017).



**Figura 2:** Exemplos de alcaloides relacionados na família *Menispermaceae*.

Alcaloides poliaminas (derivados de putrescina, espermidina, espermina e cadaverina) são metabólitos secundários que ocorrem largamente em plantas angiospermas (BIENZ *et al.*, 2005; BOKERN *et al.*, 1995; KUMAR *et al.*, 2018; PONCHET *et al.*, 1980), mas são praticamente ausentes em plantas estéreis (PONCHET *et al.*, 1980; NEGREL *et al.*, 1991; HEDBERG *et al.*, 1996; MARTIN-TANGUY, 2001; NIWA *et al.*, 2003; EFDI *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2018).

Estas substâncias também podem ser isoladas de outras fontes naturais (SCHÄFER *et al.*, 1994), particularmente de fungos (STEGLICH *et al.*, 1984; CLERICUZIO *et al.*, 2004; 2007; RUSSO *et al.*, 2007; TABASSO, 2007). Alcaloides amidas não são comuns na família *Menispermaceae*, sendo reportados apenas para *Cissampelos glaberrima*, na qual foram descritos quatro alcaloides (9-12) deste tipo (Figura 3) (ROSARIO *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2018) e *Abuta grandifolia*, na qual foi isolada *N-trans*-feruloiltiramina (13) (Figura 3) (HENRIQUE, 2012).



**Figura 3:** Exemplos de amidas reportadas nos gêneros *Cissampelos* e *Abuta*.

### 3.2.2. Atividade farmacológica de alcaloides de *Menispermaceae*

Diversas propriedades farmacológicas têm sido atribuídas aos alcaloides derivados de isoquinolínicos, um dos membros mais importantes desse grupo é a *d*-tubocurarina (bisbenzilisquinolínico) isolada da espécie *Chondodendron tomentosum* (ROCHA *et al.*, 1984; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000).

Dos diversos alcaloides isolados do curare, a *d*-tubocurarina é o que apresenta maior importância terapêutica e farmacológica. A atividade relaxante muscular promovida pelo alcaloide ocorre devido a sua ação nos receptores nicotínicos da

acetilcolina, sendo bastante utilizado na década de 60 em procedimentos cirúrgicos (ROCHA *et al.*, 1984; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000; HOUGHTON *et al.*, 2006).

Estudos realizados com alcaloides do tipo bisbenzilisoquinolínico mostraram potencial de inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilacetilcolinesterase, alvo para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (MUREBWAYIRE *et al.*, 2009; COMETA *et al.*, 2012). A atividade antimalárica dos alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, krukovina e limacina, isolados do extrato metanólico das cascas de *A. grandifolia* foram reportados na literatura (STEELE *et al.*, 1999).

Alcaloides de esqueleto do tipo aporfínico apresentaram atividade citotóxica em testes *in vivo* e *in vitro* contra linhagens de células cancerígenas (ROJAS *et al.*, 2004; STEVIGNY *et al.*, 2005). Além disso, alcaloides dos tipos tropoloisoquinolínico, azafluoranteno e oxoaporfínico isolados a partir de espécies de *Abuta* e *Cissampelos*, também mostraram atividade citotóxica contra várias linhagens de células cancerígenas (MORITA *et al.*, 1993; ITOKAWA *et al.*, 1994; SWAFFAR *et al.*, 2012).

Alcaloides proaporfínicos são conhecidos principalmente pelo seu potencial de inibir reversivelmente a enzima acetilcolinesterase (DONG *et al.*, 2015; NABAVI *et al.*, 2019). A estefarina é o alcaloide proaporfínico mais representativo do gênero *Stephania* (CAVA *et al.*, 1968). A efetividade e o potencial anti-acetilcolina do sal sulfato de estefarina (estefaglabina) foi reportado na literatura para o tratamento de traumas e injúrias pós-operatórias do sistema nervoso periférico e confirmado por estudos clínicos (KUZNETSOV *et al.*, 1995).

De acordo com a literatura, o potencial farmacêutico da estefarina é muito maior (LAGO *et al.*, 2007; MARKS, 2013), o alcaloide apresenta atividade citotóxica contra duas linhagens de células de pulmão humano (CHANG *et al.*, 2006), bem como potencial antifúngico e atividade contra danos celulares (LAGO *et al.*, 2007).

Outra propriedade farmacológica dos alcaloides encontrados na família *Menispermaceae*, está relacionada ao efeito imunomodulador. Warifteina, do tipo bisbenzilisoquinolínico, foi isolada da espécie *Cissampelos sympodialis* sendo reportado a propriedade imunomodulatória deste alcaloide contra desordens respiratórias e a utilização dele para tratamento de várias doenças inflamatórias, incluindo asma e bronquite (VIEIRA *et al.*, 2018).

De fato, a ação farmacológica dos alcaloides derivados de isoquinolínicos é relevante e se encontra bem documentada na literatura. Outras classes de metabólitos já isolados da família também apresentam importante potencial farmacológico como é o caso



da chalconoflavona, dímero isolado do extrato acetônico de *Cissampelos parreira*, que apresentou boa atividade contra *Trypanossoma cruzi* (forma intracelular) e *Trypanossoma brucei rhodesiense* (forma extracelular) (RAMÍREZ *et al.*, 2003).

### 3.3. O Gênero *Abuta* Barrere ex Aubl.

O gênero foi descrito pela primeira vez por Jean Baptiste Christophore Fouseé Aublet, sendo constituído essencialmente de lianas/trepadeiras e raramente de árvores e arbustos. As espécies de *Abuta* ocorrem nos Estados Unidos, no Hawaí, mas principalmente nas florestas tropicais, desde o sul do México até a Bolívia, passando pelo Brasil. A maior diversidade de espécies ocorre na Amazônia, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. Sendo assim, *Abuta* é um dos gêneros mais representativos em números de espécies da família *Menispermaceae* (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; SOUSA *et al.*, 2014; MOBOT, 2019).

No Brasil, o gênero está presente em todas as regiões do país, conforme mostra o mapa da Figura 4, com exceção do DF e alguns estados das regiões sul e nordeste. Ao todo são registradas 17 espécies de *Abuta* sendo duas endêmicas (*A. grisebuchii* e *A. pahni*), 14 espécies ocorrem no Estado do Amazonas (FLORA, 2020).



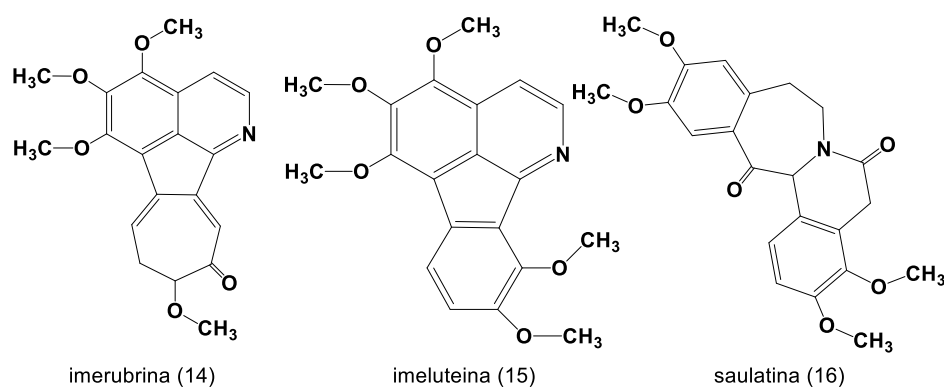
Fonte: Flora do Brasil, 2020.

**Figura 4:** Distribuição geográfica do gênero *Abuta* no Brasil.

Conhecidas popularmente por abuta-negra, abota e cipó-butá-preta, as espécies do gênero *Abuta* apresentam diversas propriedades na medicina tradicional, na maioria das vezes, em virtude da presença de alcaloides. *A. grandifolia*, a espécie mais comum na região, apresenta uma gama de usos na medicina tradicional contra: inflamação, cólicas, malária, tuberculose, febre, diarreia e vômito, contraceptivo; bem como no consumo de frutos que são comestíveis para os pássaros, primatas, roedores e para o homem (RIBEIRO *et al.*, 1999; SAYAGH *et al.*, 2012). *A. rufescens* e *A. imene*, por serem consideradas muito tóxicas, são utilizadas pelos indígenas para preparar o curare (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

### 3.3.1. Fitoquímica do gênero *Abuta*

*Abuta* é o gênero que apresenta maior diversidade estrutural de alcaloides na família *Menispermaceae*, sendo caracterizado pela presença de derivados isoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolínicos, aporfínicos, proaporfínicos, protoberberínicos e menos frequentemente: tropoloisoquinolínicos (14), azafluorantenos (15) e benzazepinas (16) (Figura 5) (BENTLEY, 1989; CAVA *et al.*, 1975a, 1975b; COMETA *et al.*, 2012; DUTÉ *et al.*, 1987; HOCQUEMILLER e CAVE, 1984; STEELE *et al.*, 1999; SWAFFAR *et al.*, 2012).



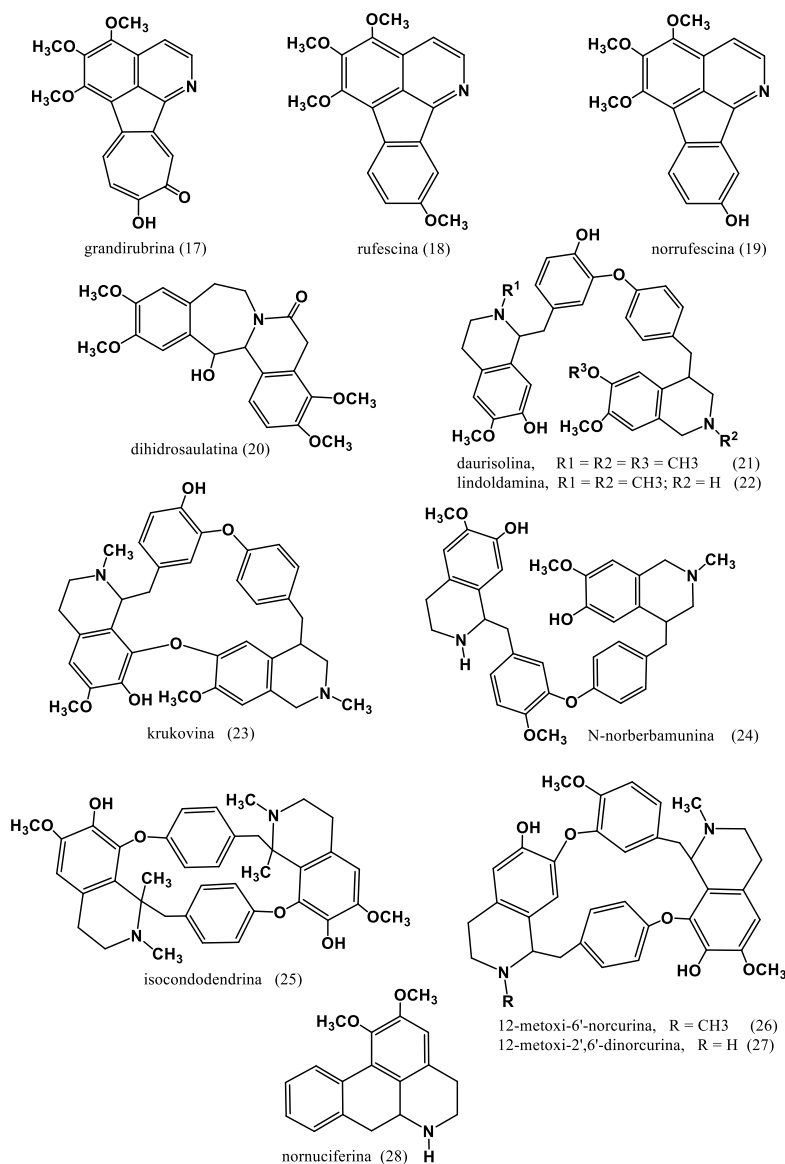
**Figura 5:** Alcaloides menos frequentes no gênero *Abuta*.

Embora na literatura haja relatos de isolamento de outros metabólitos secundários a partir de espécies do gênero *Abuta* como saponinas e esteroides (PINHEIRO *et al.*, 1983; SAYAGH *et al.*, 2012), os alcaloides se destacam por serem a classe de maior importância deste gênero, principalmente pela sua diversidade estrutural (THORNBUR, 1970; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2000).

Os dois primeiros alcaloides do tipo tropoloisoquinolínico: imerubrina (14) (Figura 5) e grandirubrina (17) (Figura 6), foram isolados de *A. imene*, *A. velutina* e *A.*

*grandifolia* (CAVA *et al.*, 1975a; MENACHERY e CAVA, 1980; PINHEIRO, 1984). Entretanto, a partir dos galhos das espécies de *A. imene*, *A. velutina* e *A. rufescens*, já foram isolados os alcaloides imeluteína (15) (Figura 5), rufescina (18) (Figura 6) e norrufescina (19) (Figura 6) do tipo de azafluorantenos (CAVA *et al.*, 1975a; PINHEIRO, 1984).

Estudos realizados com *A. bullata* relataram o isolamento de alcaloides benzazepínicos: saulatina (16) (Figura 5) e dihidrosaulatina (20) (Figura 6), que podem ser considerados também como derivados da palmatina (6) (Figura 5) do tipo protoberberínicos; levando em consideração que estes alcaloides podem ter sido gerados em decorrência da formação de um artefato durante o processo de isolamento (HOCQUEMILLER e CAVE, 1984).



**Figura 6:** Alcaloides isolados do gênero *Abuta*.

A espécie *A. pahni* é bastante promissora, dos galhos foram isolados alcaloides isoquinolínicos: talifolina (1), proaporfínicos: estefarina (5), benzilisoquinolínicos: coclaurina (2) e bisbenzilisoquinolínicos: daurisolina (21) e lindoldamina (22) (Figuras 2 e 6) (DUTÉ *et al.*, 1987).

*A. grandifolia* constitui uma das espécies mais estudadas do gênero, na qual já foram isolados a partir das cascas os alcaloides krukovina (23) e limacina (3) ambos do tipo benzilisoquinolínico (STEELE *et al.*, 1999), grandirubrina (17) do tipo tropolisoquinolínico (MENACHERY e CAVA, 1980), quatro bisbenzilisoquinolínicos nomeados: *N*-norberbamunina (24), isocondodendrina (25), 12-metoxi-6'-norcurina (26) e 12-metoxi-2'-6'-dinorcurina (27), o aporfínico nornuciferina (28) (COMETA *et al.*, 2012), bem como palmatina (6) do tipo protoberberínico (Figuras 2 e 6) e *N*-transferuloiltiramina (13, Figura 3) (ROCHA e CAVA, 1969; HENRIQUE, 2012).

### 3.3.2. Espécie *Abuta panurensis* Eichler

A espécie *A. panurensis*, descrita pela primeira vez por August Wilhelm Eichler em 1864, é constituída por lianas e trepadeiras, possui caule achatado até 35 cm de diâmetro, sulcado a liso. As folhas apresentam nervuras que frequentemente saem um pouco acima da base (plinervada) (RIBEIRO *et al.*, 1999; SOUSA *et al.*, 2014; FLORA, 2020).

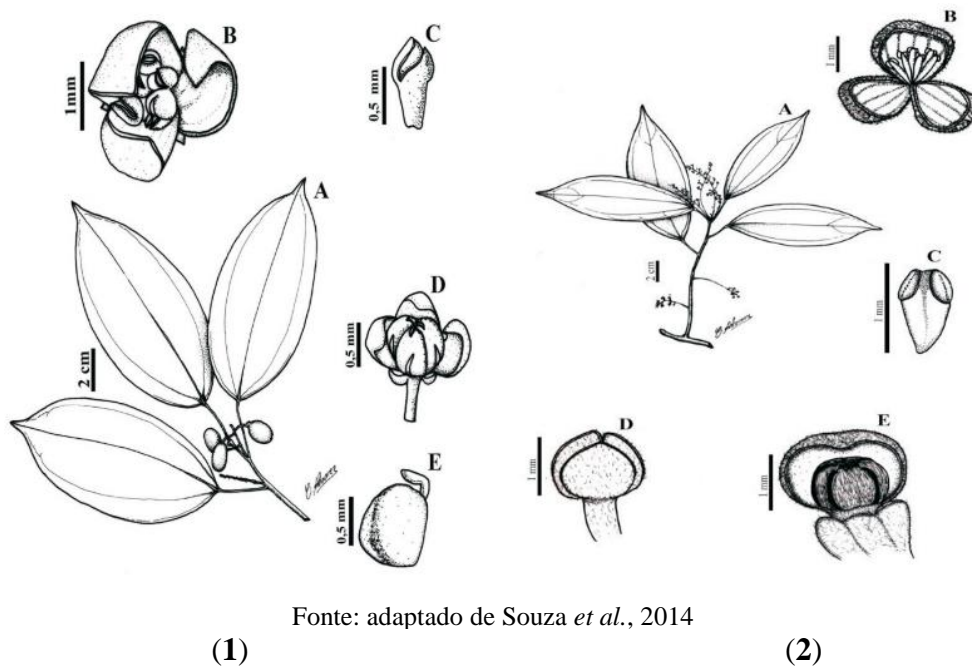
A espécie apresenta domínio fitogeográfico apenas na Amazônia brasileira, ocorrendo nos estados do Amazonas, Rondônia, Tocantins e Mato Grosso (Figura 7) e no Peru. Apesar da espécie ocorrer em campinarana e floresta de terra firme, ela é mais comum em áreas alagadas, solos argilosos, areno-argilosos e vertentes (RIBEIRO *et al.*, 1999; SOUSA *et al.*, 2014).



Fonte: Flora do Brasil, 2020.

**Figura 7:** Distribuição geográfica da espécie *A. panurensis* no Brasil.

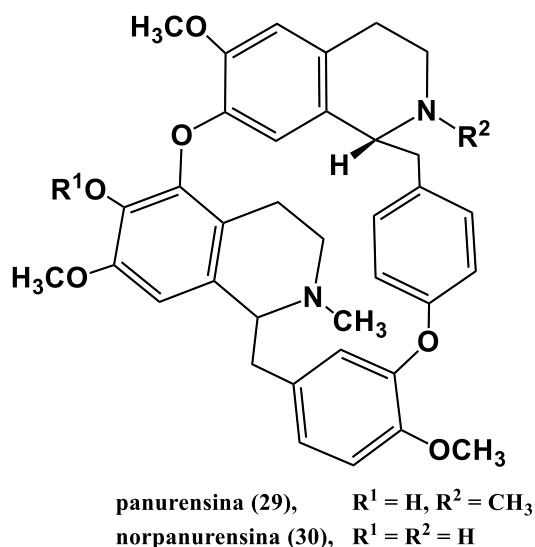
Em campo *A. panurensis* é bastante confundida com *A. grandifolia*, porém, trata-se de espécies bem distintas, pois vegetativamente *A. panurensis* encontra-se na forma de liana ao passo que *A. grandifolia* é um pequeno arbusto (Figura 8) (ALBUQUERQUE 1972; SOUSA *et al.*, 2014).



Fonte: adaptado de Souza *et al.*, 2014

**Figura 8:** (1) *A. grandifolia*: A. ramo frutífero; B. flor estaminada; C. detalhe do estame; D. flor pistilada; E. gineceu. (2) *A. panurensis*: A. ramo florífero; B. flor; C. detalhe do estame. D. flor pistilada; E. detalhe do gineceu.

A partir da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis*, Cava e colaboradores (1975b) descreveram o isolamento e a determinação estrutural de dois alcaloides bisbenzilisquinolínicos, panurensina (29) e norpanurensina (30) (Figura 9), ambos descritos como os dois principais componentes da fração alcaloídica da espécie. Contudo, esse foi o único estudo reportado na literatura relativo à composição química da espécie.



**Figura 9:** Estrutura química dos alcaloides panurensina (29) e norpanurensina (30).

### 3.7. Inibidores da enzima acetilcolinesterase

O neurotransmissor acetilcolina (ACh) é encontrado em vertebrados e artrópodes e é uma das principais substâncias do organismo pelo qual os impulsos elétricos são transmitidos no sistema nervoso. A ACh fica armazenada na cavidade dos nervos terminais (situado no sistema nervoso periférico) e o conteúdo dessa cavidade só é liberado quando ocorre uma despolarização nos nervos terminais. Ao ser liberada, a ACh entra nas sinapses nervosas ligando-se aos receptores pós-sinápticos propagando a informação. Após transmitir a mensagem, ACh se desliga dos receptores pós-sinápticos e retorna para a fenda sináptica. No entanto, a acetilcolina tem um tempo de vida muito curto devido a presença de uma grande quantidade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que tem a capacidade de hidrolisar a ligação éster na molécula, levando assim a perda de atividade estimulatória (HOUGHTON *et al.*, 2006; COLOVIC *et al.*, 2013).

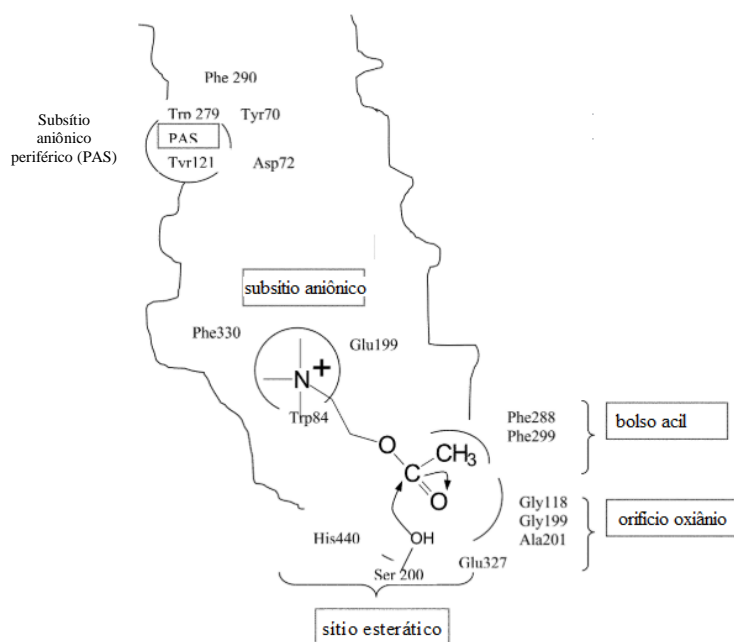
A inibição da enzima AChE resulta, no que se refere à transmissão nervosa, no prolongamento da acetilcolina no sistema, e conseqüentemente na regulação das transmissões sinápticas evitando a perda de atividade estimulatória. Este conceito tem sido empregado na medicina para o tratamento de doenças associadas aos níveis

inadequados de acetilcolina, como é o caso das doenças neurodegenerativas (HOUGHTON *et al.*, 2006; COLOVIC *et al.*, 2013).

As doenças neurodegenerativas caracterizam-se pela perda progressiva e irreversível dos neurônios de regiões específicas do cérebro, resultando em um conjunto de sintomas associado a um declínio da memória e outros processos cognitivos; o suficiente para reduzir a capacidade de realizar atividades diárias. O conjunto de sintomas que afeta as tarefas mentais cognitivas é chamado de demência e abrange uma variedade de doenças cerebrais, incluindo esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, mal de Parkinson e doença de Huntington (WILLIAMS *et al.*, 2011; KONRATH *et al.*, 2013; LIMA e HAMERSKI, 2018).

O mecanismo de hidrólise da acetilcolina é bastante complexo e o processo ocorre em um local chamado sítio periférico, e envolve quatro principais subsítios: sítio esterático, subsítio aniônico, subsítio aniônico periférico e grupos aniônicos (bolso acil e orifício oxiânion) (Figura 10). O substrato entra no bolso da enzima e o produto é liberado em conjunção com definidas mudanças conformacionais da estrutura da enzima AChE. Este conhecimento é baseado em estudos teóricos realizados com a enzima obtida a partir do peixe elétrico (*Torpedo californica*), devido a maior semelhança com a enzima AChE de mamíferos (HOUGHTON *et al.*, 2006; DVIR *et al.*, 2010).

O sítio esterático contém o maquinário catalítico da enzima, que depende quase que exclusivamente da tríade catalítica: Ser200–His440–Glu327. O subsítio aniônico contém Trp84, Phe330 e Glu199 que se ligam ao ligante amônio quaternário pelas interações catiônicas do sistema de anel aromático. O subsítio aniônico periférico contém Trp279, Tyr121, Tyr70, Phe290 e Asp72 que influenciam na conformação do sítio ativo. O orifício oxiânion consiste em Gly118, Gly119 e Ala201 que contém ligações de hidrogênio que têm a capacidade de estabilizar o intermediário da ACh, formado durante o processo catalítico. O bolso acil consiste em Phe288 e Phe290 que são capazes de limitar as dimensões do substrato que irão se ligar ao sítio ativo (Figura 10) (HOUGHTON *et al.*, 2006; DVIR *et al.*, 2010).



Fonte: adaptado de HOUGHTON *et al.*, 2006.

**Figura 10:** Regiões de ligação da enzima acetilcolinesterase no bolso do sítio ativo.

Estudos têm sido conduzidos para investigar a interação entre os inibidores e a AChE buscando novas substâncias potencialmente ativas (CAMPS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010; TAKAO *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2019). Esses inibidores podem ser divididos entre aqueles que se ligam ao sítio ativo no final do bolso onde está localizado a enzima e aqueles que se ligam ao sítio aniônico periférico, ou ainda aqueles que se ligam nos dois sítios (HOUGHTON *et al.*, 2006; CAMPS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2018).

A natureza química dos constituintes ativos tem impacto relevante em questões contemporâneas como o tratamento de doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, a utilização de produtos de origem natural com atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, que atua no sistema nervoso periférico, mostra-se como uma ferramenta benéfica na busca por substâncias ativas (HOUGHTON *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2011; KONRATH *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2018).

Os produtos naturais, especialmente os alcaloides, têm sido uma das principais fontes de substâncias utilizadas como medicamento para doenças neurodegenerativas. Muitos tipos de alcaloides, como por exemplo: derivados do esqueleto isoquinolínico,  $\beta$ -carbolina, indólico e poliaminas são capazes de inibir a AChE. O potencial inibitório da AChE dos alcaloides isoquinolínicos pode ser relacionado à presença de substituintes no anel D, ao N quaternário e à planaridade da molécula que podem influenciar a inibição da colinesterase (KOSSOROTOW *et al.*, 1974; MUREBWAYIRE *et al.*, 2008; WILLIAMS



*et al.*, 2011; KONRATH *et al.*, 2013; LIMA e HAMERSKI, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; YADAV *et al.*, 2018).

Fisostigmina, também conhecida como eserina, isolada em 1864 a partir de *Physostigma venenosum* (*Fabaceae*), foi o primeiro inibidor da AChE. Por várias décadas, análogos de fisostigmina foram desenvolvidos e utilizados para o tratamento de deficiências colinérgicas do sistema nervoso periférico, como podemos destacar a neostigmina e piridostigmina, ambas contendo o *N* quaternário (HOUGHTON *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2018; ELDUFANI e BLAISE, 2019).

Galantamina, isolada pela primeira vez de *Galanthus* spp. (*Amaryllidaceae*), também despertou interesse farmacêutico por apresentar elevada atividade inibitória da enzima (CI<sub>50</sub> 1.07 µM). Esses alcaloides foram introduzidos no tratamento de doenças neurodegenerativas, estimulando a pesquisa em novos inibidores da enzima AChE como agentes terapêuticos a partir de fontes naturais, como também os derivados usualmente disponíveis no mercado, Tacrina e Rivastigmina, em paralelo ao uso de programas de modelagem molecular para o desenvolvimento de novas drogas (HOUGHTON *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2018; ELDUFANI e BLAISE, 2019).

### **3.8 Imunomoduladores**

O sistema imunológico tem a capacidade de oferecer uma proteção contra agentes infecciosos e substâncias nocivas por meio do reconhecimento e destruição de antígenos, mas também pode atacar células de órgãos transplantados e, em casos de doenças autoimunes, são capazes de destruir células e tecidos normalmente presentes no corpo (ANASTASIOU e BUCHBAUER, 2017).

Um indivíduo saudável tem dois níveis de defesa no corpo: imunidade natural ou não-específica adquirida desde o nascimento, e a imunidade adaptativa ou adquirida que é desenvolvida com a exposição e especificamente após a defesa contra vários antígenos. O sistema imunológico está organizado em órgãos, tecidos linfoides centrais (medula óssea, timo) e periféricos (linfonodos, baço e sangue) (ANASTASIOU e BUCHBAUER, 2017).

A imunomodulação tem o objetivo de modificar a resposta do sistema imunológico via aumento de células imunes para prevenir infecções em estado de imunodeficiência, ou pela supressão do sistema imunológico em alergias, doenças autoimunes ou transplante de órgãos, onde o objetivo é de atenuar a resposta do sistema imunológico (ANASTASIOU e BUCHBAUER, 2017).

Durante a resposta da imunidade natural a um processo inflamatório, várias células do sistema imunológico (neutrófilos, macrófagos, linfócitos) liberam mediadores (citocinas, ROS etc.) que melhoram o processo inflamatório e ativam a imunidade adaptativa. As células auxiliares (linfócitos T), por sua vez ativam vários outros tipos de células (monócitos, células B entre outros) liberando várias citocinas, que afetam a progressão da inflamação (STOW *et al.*, 2009; ANASTASIOU e BUCHBAUER, 2017; PARK *et al.*, 2018).

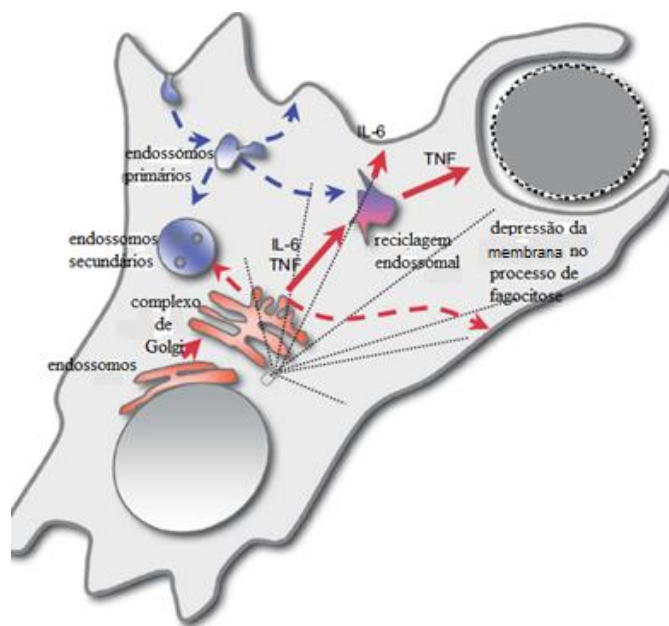
Citocinas são polipeptídeos hidrossolúveis produzidos por diversos tipos celulares capazes de modular a resposta celular, incluindo dela própria. Muitos organismos possuem substâncias que exibem um efeito imunomodulador em macrófagos, célula natural killer (NK) e linfócitos. As citocinas são classificadas em grupos: interleucinas (IL), fatores estimuladores (CSF), fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN) e fatores de crescimento. Sua classificação pode estar relacionada com sua forma estrutural ou sua função biológica. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  (Fator  $\alpha$  de Necrose Tumoral) e interleucinas (IL1, IL-6 e IL-8), atuam como mensageiros na comunicação entre as células e na regulação dentro do sistema imunológico. Citocinas determinam a resposta imune em modelos baseados em células de macrófagos, uma vez que esses macrófagos se apresentam como a primeira barreira do sistema imunológico, estimulando por sua vez, a produção de citocinas (STOW *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2013; ANASTASIOU e BUCHBAUER, 2017; PARK *et al.*, 2018).

Citocinas pró-inflamatórias são proteínas chave para o sistema imunológico e possuem múltiplas funções. A inibição mostrou-se promissora em manifestações clínicas e serológicas de atividade lúpus em pacientes acometidos por doenças autoimunes (BASCONES-MARTINEZ *et al.*, 2014), bem como desempenhou um papel importante em patógenos de artrite reumatoide caracterizada por uma inflamação crônica (KIM e MOUDGIL, 2017), em infecções causadas por flavivirus (MEHTA *et al.*, 2017) e desordens inflamatórias gastrointestinais (SUN *et al.*, 2013).

No entanto, a liberação de citocinas em um processo inflamatório constitui de um mecanismo amplo e complexo, que envolve múltiplas rotas e células mediadoras. As diversas interleucinas produzidas pelas citocinas durante o processo inflamatório, exibem diferentes habilidades de acordo com a resposta do sistema imunológico. O efeito delas depende da célula que as capta, e muitas vezes ocorre em cadeia, inibindo o sistema imune. Por exemplo, IL-4 e IL-10 foram investigadas devido às habilidades neuroprotetora e neuroregenerativa (STOW *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2018).

Porém, os macrófagos presentes no sistema imune natural são ativados quando é detectada a presença de algum organismo invasor que degrada células normais, assim esses macrófagos secretam uma matriz de citocinas, para recrutar e ativar outras células e para iniciar uma resposta do sistema imunológico adaptativo. Após a ativação, essas citocinas são liberadas em uma sequência temporal de citocinas pro-inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$  como uma resposta inicial, em seguida a interleucina 6 (IL-6) que é uma proteína complexa, secretada em um período de tempo sobreposto à TNF- $\alpha$  (Figura 11) (STOW *et al.*, 2009).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que regula uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencialização de sinais apoptóticos. Adicionalmente, IL-6 exerce efeitos na formação óssea, no metabolismo geral e funções endócrinas, tendo a habilidade de afetar diversos tecidos e órgãos. A síntese contínua e desregulada de IL-6 tem sido relacionada com diversas doenças, entre elas o câncer (WOLVEKAMP e MARQUET, 1990; ERSHLER, 1993; KAMIMURA *et al.*, 2003; TANAKA e KISHIMOTO, 2014).



Fonte: adaptado de STOW *et al.*, 2009.

**Figura 11:** Secreção de citocina (TNF e IL-6) e vias de tráfego em macrófagos.

De acordo com estudos teóricos, a IL-6 se liga à dois receptores polipeptídeos: IL-6r e gp130 por meio de três sítios de ligação (sítios I, II e III) e possui uma forma hexamérica. O receptor glicoprotéico gp130 é o principal componente de transdução de sinal na IL-6. A IL-6 é um membro de uma superfamília de citocinas agrupadas em 4

hélices que compartilham similaridades estruturais, assim como modos de interação com os receptores. Contudo, o mecanismo de ligação da interleucina aos receptores é um sistema complexo que vai além dos sítios de ativação com os receptores e numerosas interações com os resíduos aminoácidos (BOULANGER *et al.*, 2003).

Interleucina 8 (IL-8) é identificada como um fator quimiotático (substâncias químicas que atraem ou repelem células) secretado por monócitos ativos e macrófagos que promovem a migração coordenada e direcionada de células do sistema imunológico como neutrófilos, basófilos e linfócitos T. IL-8 foi atribuída como um importante fator para doenças inflamatórias e autoimunes devido às suas propriedades pró-inflamatórias. Em um ambiente tumoral, a IL-8 pode ser secretada por diversos tipos celulares presentes de forma intrínseca no tumor, tais como células de defesa (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), células da microglia, endoteliais, neurônios e neoplásicas. Além disso, IL-8 pode ativar células endoteliais e promover angiogênese (crescimento de novos vasos sanguíneos) induzindo uma infiltração quimiotática de neutrófilos no ambiente tumoral, a sinalização de IL-8 pode ter implicações importantes para interromper o progresso de uma doença cancerígena (BAGGIOLINI *et al.*, 1989; SMYTH *et al.*, 1991; KOCH *et al.*, 1992; HARADA *et al.*, 1994).

Estudos recentes têm mostrado que inibidores de AChE eventualmente podem ser considerados candidatos a drogas imunomoduladores, tendo em vista que o neurotransmissor ACh liga-se aos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos de células imunológicas. Em macrófagos, a inibição colinérgica da inflamação é conduzida especificamente pelo receptor acetilcolina nicotínico (nAChR) e subunidade  $\alpha$  ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  ou  $\alpha 7$ ). Além do mais, os receptores colinérgicos têm sido identificados em linfócitos humanos e sua atividade correlacionada com células T e macrófagos, sugerindo a participação desses receptores na liberação de várias citocinas e na produção de anticorpos sob condições inflamatórias (DAYAN *et al.*, 2004; NIZRI *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2013; YI *et al.*, 2019).

Produtos naturais têm mostrado uma variedade de propriedades farmacológicas e atividade imunomodulatória com resultados promissores, que podem ser implementados como tratamento alternativo para doenças infecciosas, imunes e carcinogênicas (ANASTASIOU e BUCHBAUER, 2017; VIEIRA *et al.*, 2018).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto está cadastrado na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o N° A9CC956.

### 4.1. Solventes e Equipamentos

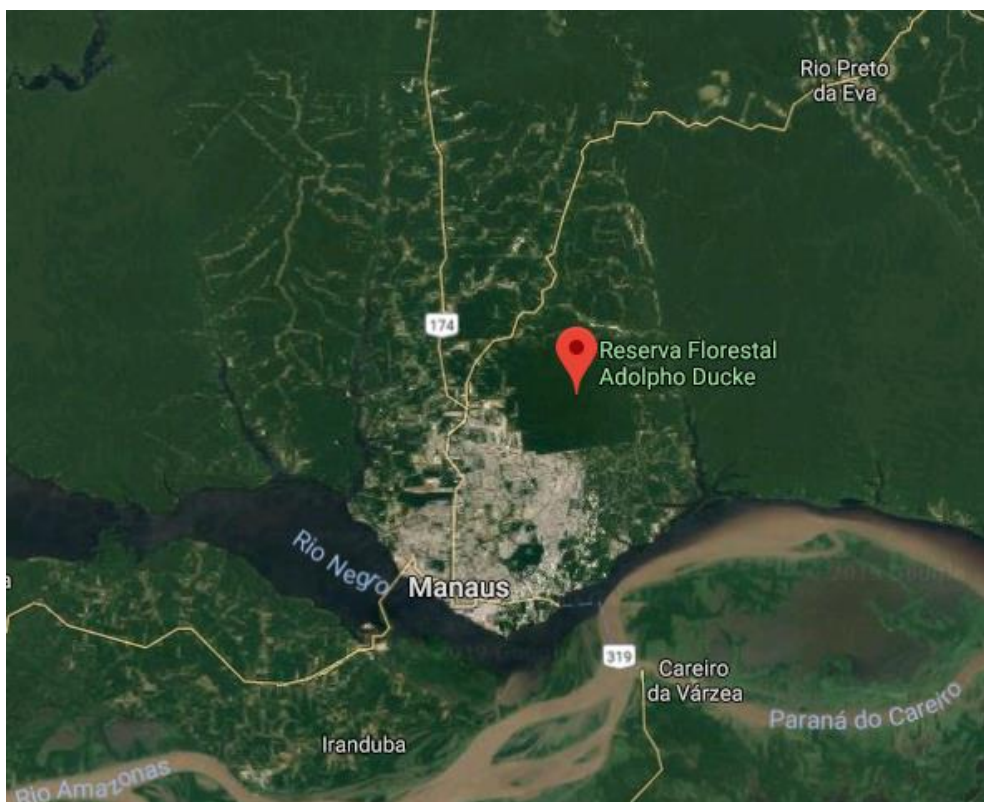
Foram utilizados solventes grau P.A. (Nuclear®) e grau HPLC (Tedia®). Os espectros de RMN foram obtidos em solventes deuterados (Tedia®). Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q (marca Merck Millipore, modelo Synergy).

- Agitador mecânico do tipo Vortex®;
- Balança analítica (Adventurer® marca Ohaus máx. 220 g – mín. 0,01g);
- Balança semi-analítica (Adventurer® marca Ohaus máx. 4100 g – mín. 0,5g);
- Espectrofotômetro leitor de microplacas de 96 poços (modelo ELX800; marca Biotek);
- Evaporador rotatório (Fisatom®);
- Estufa de circulação de ar (DeLeo®);
- Moinho de facas;
- Pipeta automática (Thermo scientific® P 1000 e P 200);
- Placas de sílica gel 60 (Merck®);

### 4.2. Coleta e identificação do material botânico

O material vegetal de *A. panurensis* (folhas – 612,3 g, galhos – 1.429,7 g e sementes 128,0 g) foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke, situado no Km 26 da rodovia AM010, Manaus-AM, -2°96'27.33"S -59°92'29.51"W (Figura 12). A espécie foi coletada em dezembro de 2017.

As exsiccatas foram identificadas e depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o número N° 279373. Após a coleta, as diferentes partes da planta foram separadas, limpas e secas a temperatura ambiente (20°C) por cerca de 10 dias. Posteriormente, o material foi triturado separadamente em moinho de facas, pesado em balança semi-analítica e armazenado em geladeira até o uso.



**Figura 12:** Local de coleta do material botânico situado próximo do perímetro urbano de Manaus-AM.

#### **4.3. Obtenção da marcha alcaloídica em escala analítica e preparativa da *A.***

##### *panurensis*

A extração foi realizada no Laboratório de Abertura de Amostras – LAEQ/UFAM. O material vegetal (folhas e galhos) seco e moído foi submetido à extração ácido-base em escala analítica e preparativa, conforme descrito por Soares *et al.*, (2015).

Para obtenção das frações alcaloídicas em escala analítica foram macerados 1 g de material vegetal, com 5 mL de uma solução a 10% de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e 5 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), o material foi agitado com um misturador do tipo vortex® a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) por 1 min. Após a extração, a fase orgânica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) foi transferida para um recipiente, acrescentando-se 5 mL de uma solução a 10% de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) e agitado manualmente. Em seguida, a fração aquosa ácida foi transferida, o pH foi ajustado para 10 utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  e extraída com 5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sob agitação vigorosa por 1 min. A fase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi separada, concentrada a temperatura ambiente e seca sob sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), resultando nas frações alcaloídicas a partir das folhas (6,6 mg) e galhos (10,7 mg).

Em escala preparativa, os galhos triturados (300 g) foram macerados com uma solução a 10% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (2 L) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 L) a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) por 72 h, o material foi agitado manualmente a cada 24 horas. Em seguida, a fase orgânica foi transferida para um funil de separação com uma solução a 10% de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) (2 L) e agitado manualmente. A fase aquosa ácida foi transferida, o pH foi ajustado para 10 utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  e em seguida extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 300$  mL). A fase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi separada, concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida e seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , resultando na fração alcaloídica dos galhos (280 mg). As frações alcaloídicas (escala analítica e preparativa) foram encaminhadas para análises cromatográficas.

#### 4.4. Análises cromatográficas

##### 4.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para as análises de cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 (Merck<sup>®</sup>), com espessura de 0,25 mm aderidas em alumínio e com indicador de fluorescência  $F_{254}$ . As manchas foram observadas com influência da luz UV (254 e 365 nm) e reveladores químicos.

##### 4.4.2. *Leaf Spray* por espectrometria de massas (LS-MS)

O método de ionização ambiente direta (*leaf spray*) foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas – LABCEM/UFAM de acordo com a metodologia descrita por Lima *et al.* (2020). Os espectros de massas foram obtidos em equipamento do tipo *ion trap* modelo LCQ Fleet (Thermo scientific<sup>®</sup>).

O material vegetal foi selecionado, cortado em camada fina no formato de triângulo medindo 1 cm de cada lado, preso por um suporte contendo uma garra metálica e posicionado a uma distância de cerca de 10 mm do orifício de entrada do espectrômetro de massas.

A técnica não requer nenhum preparo da amostra, apenas a adição de algumas gotas (10-30  $\mu\text{L}$ ) de metanol grau HPLC diretamente na amostra. Em seguida, foi aplicado uma alta tensão (+/- 4,5 kV) gerando a eletropulverização da amostra diretamente na fonte *electrospray* (ESI). Os espectros de massas foram adquiridos em modo de monitoramento contínuo *full scan* (positivo e negativo). Condições analíticas: tensão do capilar, 20 V; temperatura do capilar,  $200^\circ\text{C}$ ; lente dos tubos, 115 V; faixa de

varredura,  $m/z$  100-1000; gás de colisão, hélio e energia de colisão, 20-30 eV. Os dados espectrométricos foram processados no software Xcalibur (versão 2.2).

#### 4.4.3. CLAE-DAD-MS e MS/MS<sup>n</sup> em escala analítica

As frações alcaloídicas foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol grau HPLC e as análises foram realizadas em um cromatógrafo modelo Acella<sup>®</sup> (Thermo Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo modelo TSQ Quantum Access<sup>®</sup> (Thermo scientific), equipado com fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), modo positivo e MS/MS automático. O espectrômetro de massas foi equipado com bomba Surveyor LC Plus, autoamostrador Surveyor Plus, válvula de injeção Rheodyne (25  $\mu$ L), coluna Luna C18 (5 $\mu$ m, 150 x 4,60 mm) (Phenomenex–Torrance, CA, USA) e operado simultaneamente com detector de arranjo de diodos Surveyor PDA Plus (DAD).

A fase móvel foi composta de B (metanol) e A (ácido fórmico 1% em H<sub>2</sub>O v/v) com gradiente de eluição linear: 0-20 min 20-80% B, 20-35 min 80% B, 35-45 min 20-80% B. A taxa de fluxo da fase móvel foi 1 mL/min com volume de injeção 10 $\mu$ L. O detector DAD foi ajustado para o monitoramento entre 200-400 nm. Condições analíticas: corrente de descarga, 5  $\mu$ A; temperatura do vaporizador, 350 °C; pressão do gás de revestimento, 35 arb; pressão do gás auxiliar, 15 arb, temperatura do capilar, 250°C; lente dos tubos, 112 V; faixa de massa,  $m/z$  100-800; energia de colisão, 30 eV. Os espectros foram processados no software Xcalibur (versão 2.2).

#### 4.4.4. Fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa

Após escalonamento adequado do método utilizado em escala analítica, cerca de 150 mg da fração alcaloídica dos galhos foram solubilizados em 500  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) grau HPLC e submetido ao fracionamento em escala semi-preparativa no cromatógrafo modelo Shimadzu<sup>®</sup> equipado com módulo de comunicação CBM-20A, detector de UV SPD-20AV, degaseificador DGU-20A5, bomba com sistema binário de solventes LC-6AD, válvula de injeção Rheodyne (200  $\mu$ L), coluna Luna C18 (5 $\mu$ m, 250 x 15.00 mm) (Phenomenex–Torrance, CA, USA) e taxa de fluxo de 3 mL/min.

A fase móvel foi composta de B (metanol) e A (ácido fórmico 1% em H<sub>2</sub>O v/v), com gradiente de eluição (1): 0-14 min 20-80% B, 20-30 min 80% B. O detector de UV foi ajustado para 260 nm e 280 nm. Outro fracionamento foi preparado nas mesmas condições com diferente gradiente de eluição (2): 0-20 min 20-80% B, 20-35 min 80%



B, 35-45 min 20-80% B. O detector de UV foi ajustado para 260 nm e 280 nm. As frações coletadas foram encaminhadas para análises de espectrometria de massas de alta resolução e RMN 1D/2D.

#### 4.4.5. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

As análises de EMAR foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP. As frações foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol grau HPLC e as análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas Bruker microTOF-QII, equipado com fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), modo positivo e MS/MS automático. O espectrômetro de massas foi equipado com módulo de comunicação CBM-20A, detector de UV SPD-20AV, bomba com sistema binário de solventes LC-20AD, amostrador automático SIL-20A HT (200 $\mu$ L), forno CTO-20A, coluna Luna PFP (150 x 2mm, 100A) e operado simultaneamente com detector SPD-20A (DAD).

A fase móvel foi composta de B (ácido fórmico 0,1% em metanol v/v) e A (ácido fórmico 0,1% em H<sub>2</sub>O v/v) com gradiente de eluição linear: 0-2 min 20-80% B; 2-42 min 100% B. A taxa de fluxo da fase móvel foi 0,2 mL/min com volume de injeção 10 $\mu$ L. O detector de UV foi ajustado para monitoramento de 254 nm a 330 nm. Condições analíticas: tensão do capilar, 4500 V; pressão do nebulizador (N<sub>2</sub>), 4,0 bar; fluxo gás seco (N<sub>2</sub>), 8 L/min; temperatura do vaporizador, 200°C; faixa de massa, *m/z* 100-800; energia de colisão, 12 eV; calibrante, formiato de sódio. Os espectros foram processados no software Bruker Compass Data Analysis (versão 4.2).

#### 4.5. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear - NMR-Lab/UFAM, em espectrômetro Bruker Avance III 500 operado a uma intensidade de campo de 11,7 Teslas (<sup>1</sup>H a 500 MHz, COSY, HMBC e HSQC; 125 MHz para <sup>13</sup>C e DEPT-135°), equipado com detecção direta de 5 mm PA BBO BBF HD-05-Z SP, sonda inteligente incorporando bobina de gradiente do eixo Z capaz de fornecer amplitudes de gradiente até 50 G/cm.

As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>) com deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (*J*) foram

registradas em Hertz (Hz) e as multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), t (triplete) e m (multiplete). Os dados foram processados no software TopSpin (versão 4.0.6).

#### 4.6. Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Abertura e Ensaios Químicos-LAEQ/UFAM. Nos experimentos foram utilizados a enzima acetilcolinesterase a partir de arraia elétrica *Tetronarce californica* (Sigma-Aldrich, USA), e os testes foram realizados em microplacas de 96 poços de acordo com a metodologia proposta por Ellman *et al.*, (1961) e Senol *et al.*, (2015) com adaptações.

As substâncias foram testadas nas concentrações de 2,8; 5,6; 11,2; 22,5; 45,0 e 90,0 µg/mL. Neostigmina (Sigma-Aldrich, USA) nas concentrações de 0,28; 0,56; 1,12; 2,25; 4,5 e 9,0 µg/mL foi utilizada como controle positivo. A partir de uma solução estoque (1mg/mL), 20µL de cada amostra foram adicionados nos poços e realizado uma diluição em série. Em seguida, 150µL de tampão fosfato de sódio pH=8 (0,1 mM), 20µL de DTNB (2,5 mM) e 20µL da enzima acetilcolinesterase (1U/mL) foram adicionados subsequentemente em cada poço a temperatura de 25 °C, posteriormente, a placa foi incubada por 15 min. Após esse período a reação foi iniciada pela adição de 10µL de iodeto de acetilcolina (0.1 M). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A absorbância de cada poço foi medida em um espectrofotômetro leitor de microplacas de 96 poços a 405 nm. O ânion 5-tio-2-nitrobenzoato, de cor amarela, é formado pela hidrólise do iodeto de acetilcolina como resultado da reação de DTNB com tiocolina, catalizado pela enzima AChE. A reação foi monitorada por 30 min com intervalos de 5 min. O percentual de inibição da enzima foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(CN - B) - (A - B) \times 100}{(CN - B)}$$

Onde:

A: Absorbância da amostra.

B: Absorbância do branco de cada amostra (todos os reagentes exceto a enzima).

CN: Absorbância do controle negativo (todos os reagentes exceto a amostra).

A curva de inibição foi plotada com o percentual de inibição vs concentração, para as amostras que apresentaram percentual de inibição  $\geq 50\%$  foram determinados os

valores da Concentração inibitória mediana (CI<sub>50</sub>) por meio de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7.0, com  $p < 0,05$  e intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram expressos em micromolar ( $\mu\text{M}$ ).

#### 4.7. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. A citotoxicidade das substâncias foi avaliada através do ensaio MTT (brometo de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio). O ensaio colorimétrico foi utilizado para medir a atividade de proliferação celular e as linhagens celulares utilizadas no ensaio foram: K562 (leucemia mielogénica crônica humana), U937 (linfoma histiocítico humano), HL60 (leucemia promielocítica aguda humana) e Vero (células epiteliais de rins extraídas do macaco verde africano *Chlorocebus* sp.) juntamente com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). As linhagens celulares foram cultivadas em microplacas de 96 poços.

Uma quantidade de  $2 \times 10^4$  células foram semeadas em cada poço contendo 0,2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de FBS, penicilina-estreptomicina e fungizona, em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas. Após a formação da monocamada sub-confluenta, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias (12-100  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas novamente nas mesmas condições acima mencionadas por 24, 48 e 72 horas. PBS estéril foi utilizado como controle negativo e DMSO 100% como controle positivo. Subsequentemente, o meio foi removido de todos os poços e 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL em PBS estéril) diluído em 100  $\mu\text{L}$  de meio DMEM (sem vermelho de fenol para evitar erros de interpretação) foram adicionados aos poços e incubados durante 4 horas nas mesmas condições estabelecidas anteriormente.

Em seguida, o MTT foi removido e 50  $\mu\text{L}$  de tampão de lise de MTT foram adicionados a cada poço, seguindo-se a homogeneização para dissolver os cristais de formazan e incubados por 10 minutos a 37 °C. As densidades ópticas das amostras foram medidas utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas de 96 poços no comprimento de onda de 570 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A viabilidade relativa das células foi estimada utilizando a seguinte equação:

$$(A_{570} \text{ da amostra tratada}) / (A_{570} \text{ da amostra não tratada}) \times 100$$

Todos os dados foram representados como média aritmética e desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student e ANOVA. O valor de  $p < 0,05$  foi escolhido como critério de significância estatística. Ao longo do texto, os asteriscos (\*) correspondem aos seguintes valores de  $p$ : \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao controle negativo (células não tratadas). A concentração inibitória mediana (CI<sub>50</sub>) foi calculada por meio de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7.0. Os resultados foram expressos em micromolar (μM).

#### **4.8. Ensaio imunomodulador**

Os ensaios imunomoduladores foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do HEMOAM (número de aprovação: 3.138.343).

Para as análises do potencial imunomodulatório, células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) obtidas de candidatos a doadores de sangue saudáveis foram cultivadas no meio RPMI-1640 em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h contendo as substâncias nas seguintes concentrações: 5-*N*-metilmaitenina (12,5 μM e 25,0 μM) ou estefarina (28,48 μM e 57,0 μM).

Após a incubação os sobrenadantes foram coletados para os ensaios com citocina, utilizando o sobrenadante de células PBMC não-tratadas como controle. A concentração das citocinas IL-6 e IL-8 foi avaliada por meio de kits de ensaio imunossorvente de enzima ligada - ELISA (Boster, Pleasanton, CA, USA), disponíveis comercialmente. Todos os testes foram realizados em triplicata de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados para níveis de proteína contido em cada amostra e expressos em pg/mg de proteína total. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra individual utilizando células não-tratadas como controle negativo.

Todos os dados foram representados como média aritmética e desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student e ANOVA. O valor de  $p < 0,05$  foi escolhido como critério de significância estatística. Ao longo do texto, os asteriscos (\*) correspondem aos seguintes valores de  $p$ : \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao controle negativo (células não tratadas). A concentração inibitória mediana (CI<sub>50</sub>) foi calculada por meio de regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7.0. Os resultados foram expressos em micromolar (μM).

#### **4.9. Cálculos de *docking* molecular**

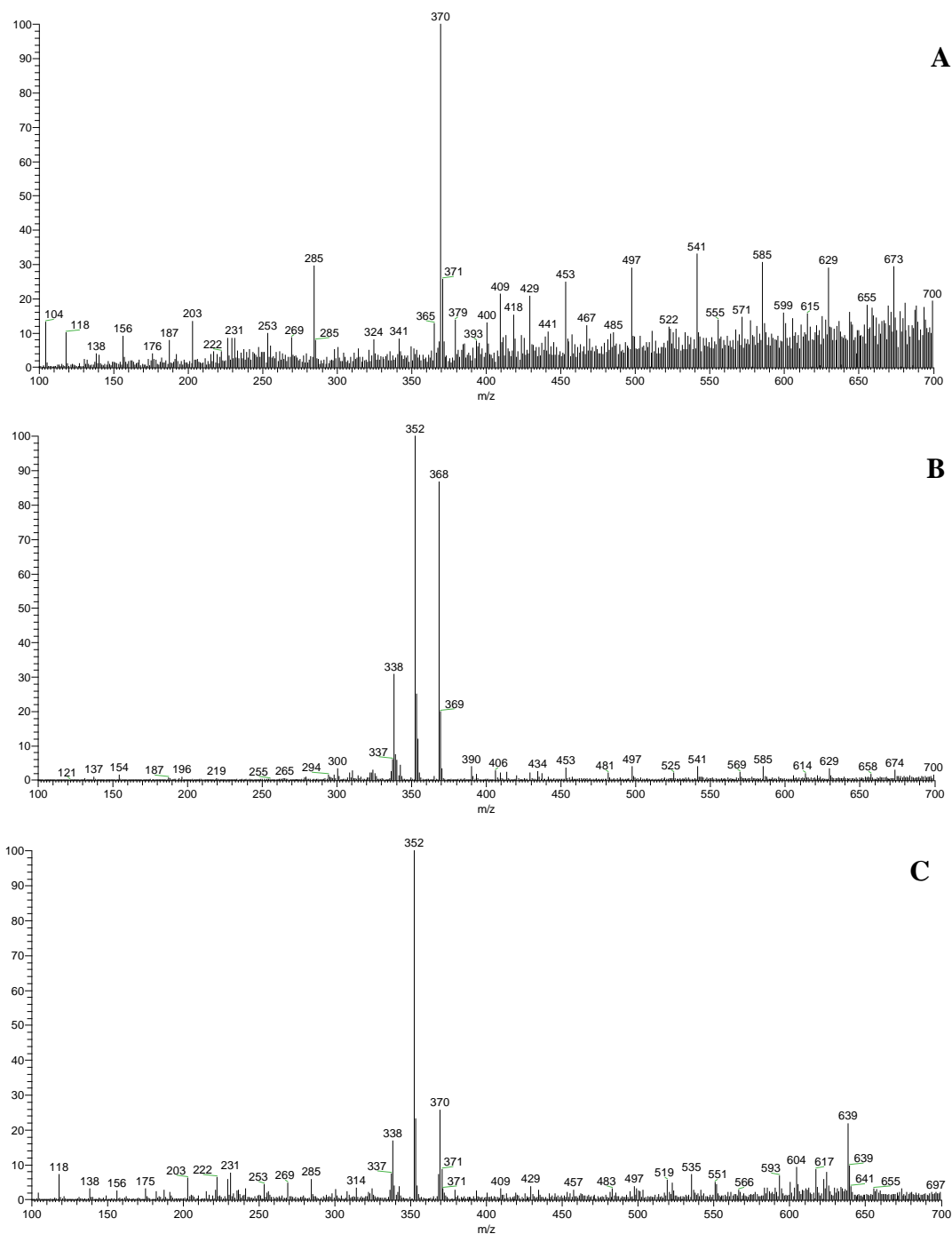
Os cálculos de *docking* molecular foram realizados no Instituto de Química Orgânica da Academia Nacional de Ciências da Ucrânia (Kiev). As estruturas de raios-X das proteínas em estudo (AChE, IL-6 e IL-8) foram obtidas a partir do banco de dados de proteínas RCSB. O estudo teórico foi realizado no software AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2010).

Para utilizar as estruturas dos ligantes em equilíbrio, a otimização geométrica foi conduzida por meio de cálculos semi-empíricos nível PM7 (STEWART, 2013) no software MOPAC (STEWART, 2016). As estruturas e parâmetros para o *docking* foram preparados utilizando o software AutoDock Tools (MORRIS *et al.*, 2009; SANNER, 1999). As imagens das estruturas das proteínas foram obtidas utilizando os softwares Discovery Studio Visualizer (DASSAULT, 2018), PyMOL (PYMOL, 2010) e UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise dos espectros de LS-MS de *Abuta panurensis*

Os espectros de LS-MS no modo positivo para folhas, galhos e sementes de *A. panurensis* apresentaram os íons protonados em  $m/z$  300; 314; 324; 338; 352; 368 e 370 todos indicativos da presença de alcaloides (Figura 13). Os espectros de MS/MS dos íons detectados foram identificados e comparados com a literatura (Tabela 3) (STÉVIGNY *et al.*, 2004; SCHMIDT *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2013).



**Figura 13:** Espectros de massas LS-MS em fonte ESI no modo positivo para folhas (A), galhos (B) e sementes (C) de *A. panurensis*.

O espectro de MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  300 apresentou perdas de massa comumente observadas em alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos ( $m/z$  178 e  $m/z$  107) (SCHMIDT *et al.*, 2005). Estes fragmentos têm sido associados ao esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico com e sem substituinte no grupo *N*, que neste caso a perda inicial de 15 u (fragmento  $m/z$  285) caracteriza a possível presença do grupo *N*-CH<sub>3</sub>, influenciando diretamente na rota de fragmentação. Além disso, outros íons observados, como por exemplo,  $m/z$  269, 255, 237 e 143, foram consistentes com o alcaloide *N*-metilcoclaurina (SCHMIDT *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2018).

Os espectros de MS<sup>2</sup> dos íons  $m/z$  324, 338, 352 e 368 apresentaram perdas equivalentes aos alcaloides do tipo protoberberínicos (ZHANG *et al.*, 2006). Os íons apresentaram perdas iniciais de 15 u correspondentes ao grupo metil [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. No entanto, a posição exata não pode ser determinada, mas os dados estão de acordo com os alcaloides estefaranina, jatrorrhizina, palmatina e hidroxipalmatina, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2006; DEEVANHXAY *et al.*, 2009; SHIM *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2018)

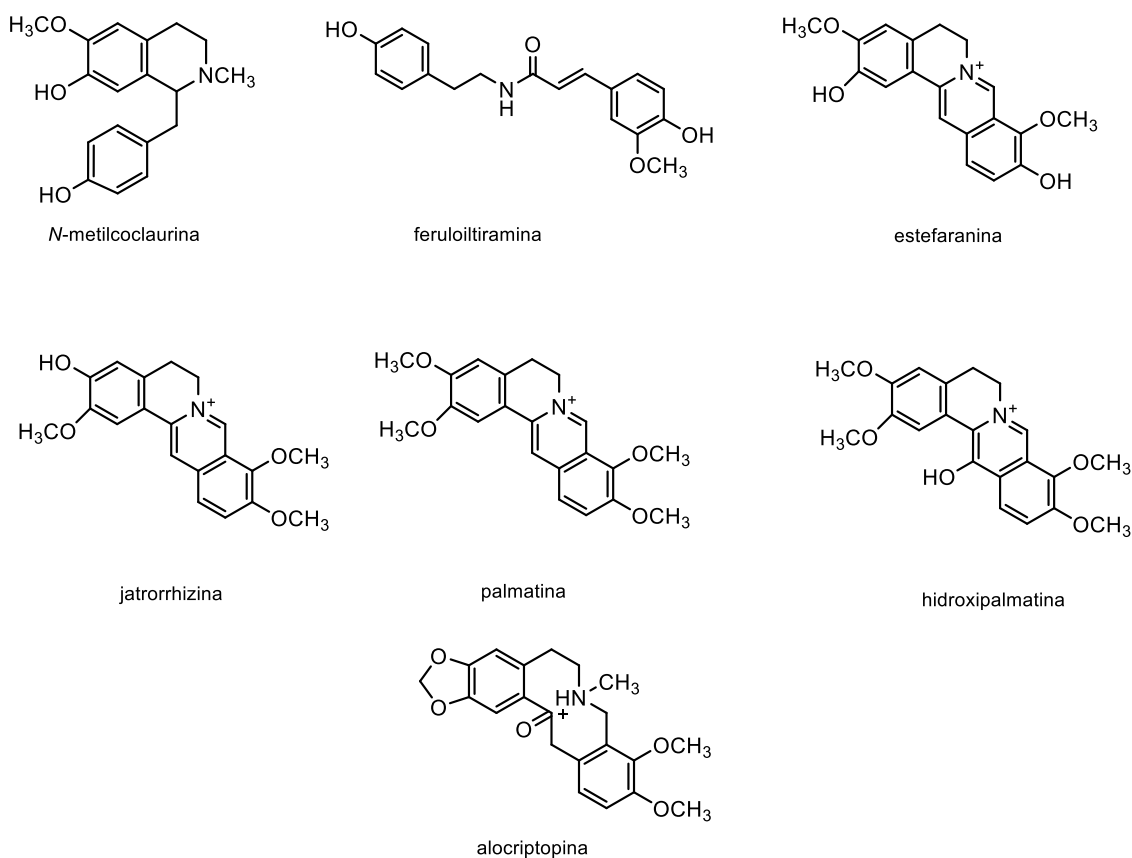
O espectro de MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  370 apresentou perdas semelhantes aos alcaloides do tipo protopina (JEONG *et al.*, 2012; SHIM *et al.*, 2013). O fragmento  $m/z$  206 é coerente com o produto formado via reação retro-Diels-Alder (RDA), seguido da perda neutra de 18 u [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, sugerindo o alcaloide alocriptopina (JEONG *et al.*, 2012; SHIM *et al.*, 2013; MANOSALVA *et al.*, 2014).

O espectro de MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  314 mostrou um pico base em  $m/z$  177 (perda de 137 u) consistente com a estrutura de amidas derivadas do ácido cinâmico. Os íons  $m/z$  145, 121 e 117 corroboram com prévios relatos da literatura para o alcaloide feruloiltiramina (GALARCE-BUSTOS *et al.*, 2019; JIAO *et al.*, 2018).

Portanto, o perfil químico das principais partes de *A. panurensis* permitiu a detecção de 7 alcaloides de diferentes tipos, como benziltetrahydroisoquinolínico, protopina, poliamina e protoberberínico, este último engloba a maioria dos alcaloides detectados pela técnica. A identificação direta dos íons detectados nos espectros de massas oferece uma alternativa rápida em relação à composição química da espécie, porém a análise pode ser comprometida pelo efeito matriz como consequência da técnica de LS-MS, sendo requerida uma investigação mais aprofundada por meio de outras técnicas mais robustas.

**Tabela 3:** Caracterização MS/MS dos constituintes químicos detectados nas folhas, galhos e sementes da *A. panurensis* pela técnica de LS-MS.

[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS <sup>n</sup>	Identificação	Parte da planta
300	MS <sup>2</sup> [300]: 285; 269; 255; 237; 178; 175; 161; 145; 107.	<i>N</i> -metilcoclaurina	Galhos
314	MS <sup>2</sup> [314]: 177; 145; 121; 117.	feruloiltiramina	Sementes
324	MS <sup>2</sup> [324]: 309; 294; 280.	estefaranina	Folhas
338	MS <sup>2</sup> [338]: 323; 307; 295; 279.	jatrorrhizina	Galhos Sementes
352	MS <sup>2</sup> [352]: 337; 322; 308; 294.	palmatina	Galhos Sementes
368	MS <sup>2</sup> [368]: 353; 350; 340; 325; 307.	hidroxipalmatina	Galhos
370	MS <sup>2</sup> [370]: 323; 206; 188.	alocriptopina	Folhas Sementes



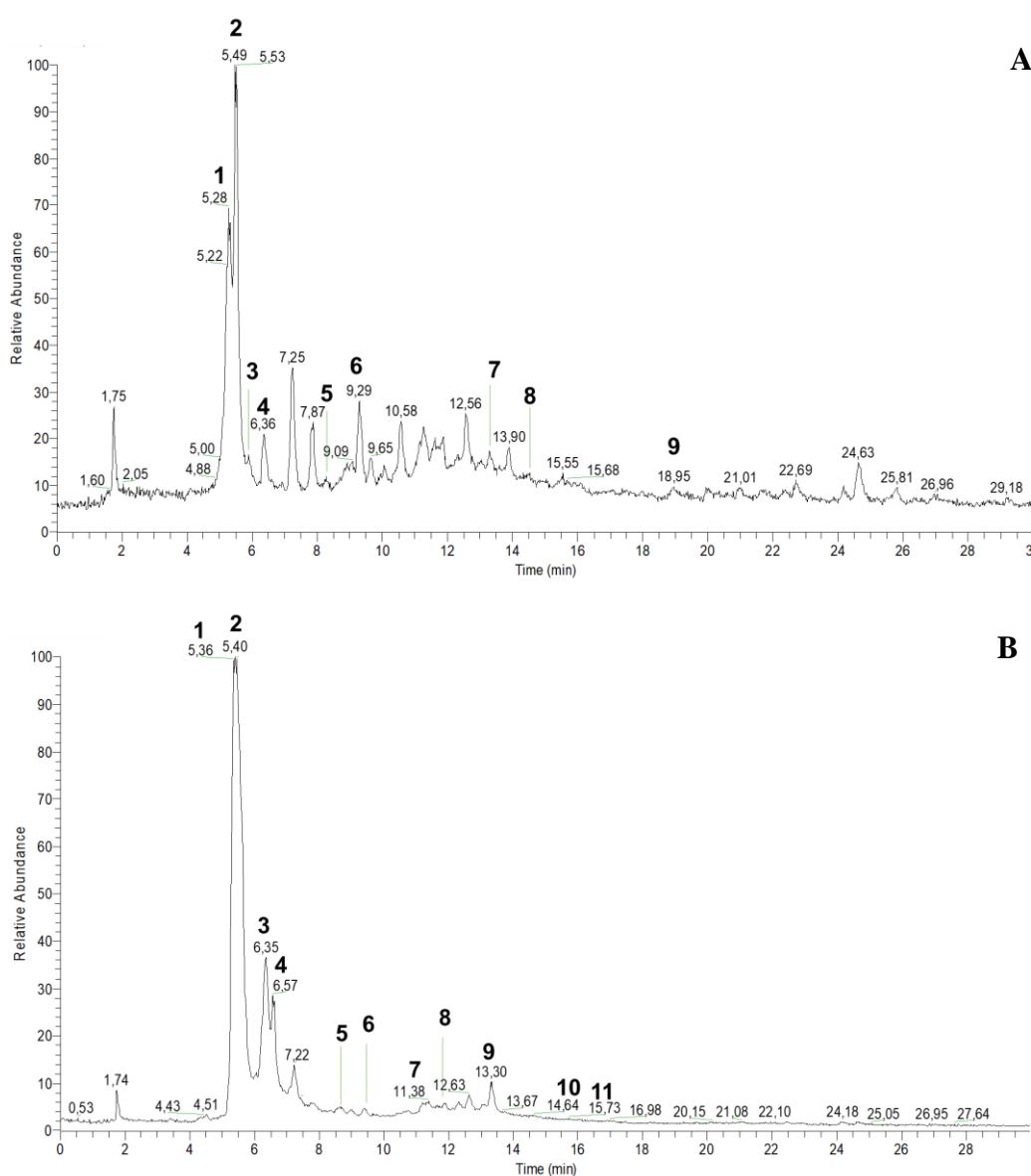
**Figura 14:** Proposta dos alcaloides identificados em *A. panurensis* pela técnica de LS-MS.



## 5.2. Perfil químico da fração alcaloídica de *A. panurensis* em escala analítica

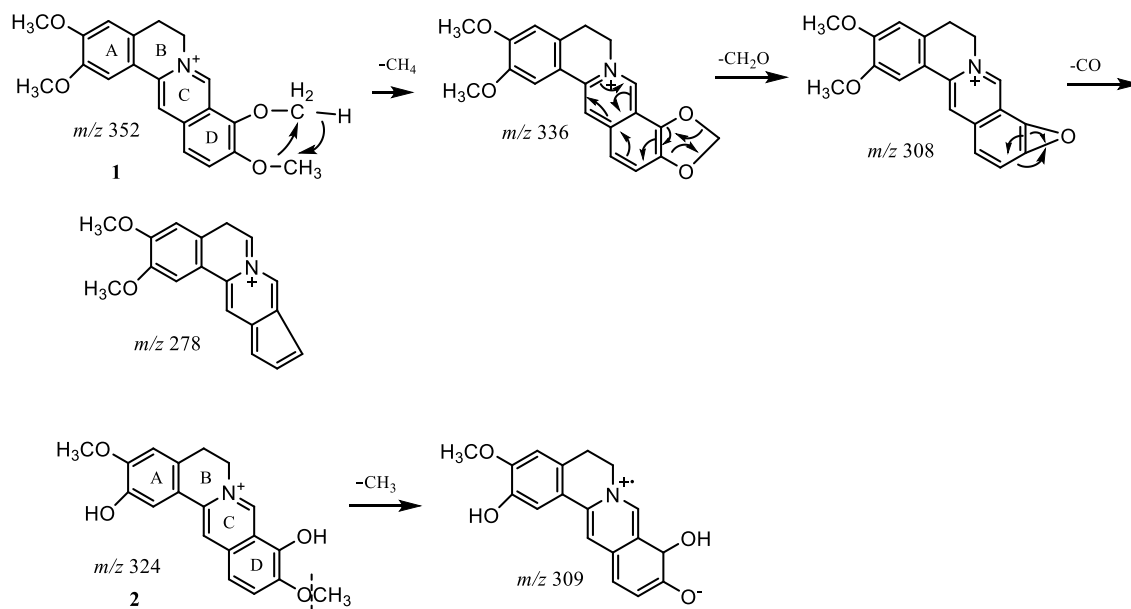
As frações alcaloídicas em escala analítica foram obtidas com rendimentos de 0,66 % para as folhas e 1,07 % para os galhos. No entanto, não foi possível obter uma fração alcaloídica a partir das sementes da espécie com rendimentos satisfatórios para realizar as análises, fato que pode ser relacionado a baixa concentração de alcaloides.

O Cromatograma de Íons Totais (TIC) CLAE-MS da fração alcaloídica das folhas e galhos de *A. panurensis* está representado na Figura 15. De acordo com os espectros de MS/MS (Figuras A1-A13, pag.: 138 - 142) para os íons detectados, foi possível propor 9 alcaloides nas folhas e 11 nos galhos (Tabela 4) dos quais 5 alcaloides foram mencionados anteriormente, reforçando os dados obtidos por LS-MS.



**Figura 15:** Cromatograma de Íons Totais (TIC) CLAE-MS da fração alcaloídica das folhas com 9 alcaloides identificados (A) e galhos com 11 alcaloides identificados (B) em escala analítica de *A. panurensis*.

Os alcaloides protoberberínicos em  $m/z$  324 e 352 identificados nos experimentos de LS-MS, foram detectados nos picos 8 (T.R. 11,85 min) e 6 (T.R. 9,40 min), respectivamente, para os galhos da espécie. O íon em  $m/z$  324 apresentou uma perda principal de 15 u  $[M-CH_3]^+$  representado pelo pico base em  $m/z$  309. Enquanto o íon em  $m/z$  352 apresentou perda inicial de 16 u (pico base  $m/z$  336) relativo ao fragmento  $[M-CH_3-H]^+$ , levando a formação de um grupo metilenodioxi na estrutura, devido a presença de metoxilas nas posições C9 e C10, caracterizado como um íon diagnóstico para alcaloides do tipo protoberberínicos. Os dados estão de acordo com os alcaloides estefaranina e palmatina, respectivamente (Figura 16) (ZHANG *et al.*, 2006; DEEVANHXAY *et al.*, 2009; SHIM *et al.*, 2013).



Fonte: Adaptado de Shim *et al.*, (2013).

**Figura 16:** Proposta de fragmentação para alcaloides protoberberínicos com dois grupos metoxilas no C-9 e C-10 (palmatina) (1) e um grupo hidroxila no C-9 ou C-10 (estefaranina) (2).

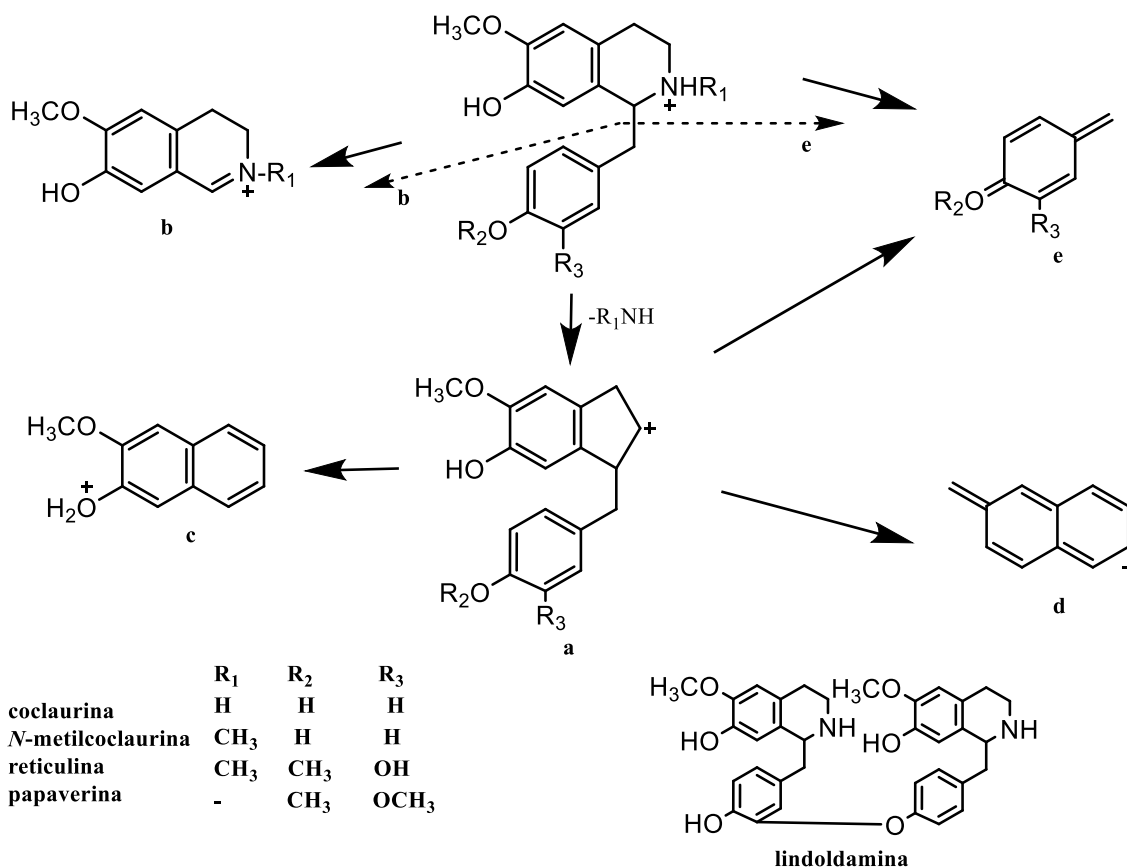
As análises de CLAE-MS/MS mostraram a presença de um alcaloide benzilisoquinolínico na espécie. O íon em  $m/z$  340 (pico 7 nas folhas; t.r. 13,29 min) apresentou duas perdas consecutivas de 15 u, os picos em  $m/z$  325  $[M-CH_3]^+$  e em  $m/z$  310  $[M-CH_3]^+$ . Este último foi denominado o pico base, levando a formação do grupo metilenodioxi no anel B; quando comparado com a literatura o alcaloide foi sugerido como sendo a papaverina (Figura 17) (PENG *et al.*, 2007).

O íon em  $m/z$  300 (pico 5; t.r. 8,65 min) detectado nos galhos, apresentou uma perda inicial de 15 u ( $m/z$  285) seguido da perda de 30 u ( $m/z$  255), para a formação de um anel estável de 5 membros, confirmando a presença do grupo  $N$ -CH<sub>3</sub>, reforçando a proposta citada anteriormente para o alcaloide  $N$ -metilcoclaurina (Figura 17, **a**) do tipo benziltetrahydroisoquinolínico (SCHMIDT *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2018).

No pico 1 das folhas (t.r. 5,28 min) e galhos (t.r. 5,36 min) foi detectado o íon em  $m/z$  286 com perda inicial de 17 u ( $m/z$  286→269), referente a saída do grupo hidroxila [M-OH]<sup>+</sup>. Além disso, observou-se a presença do pico em  $m/z$  175 representando um dos principais fragmentos de alcaloides com esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico, sendo sugerido a presença do alcaloide coclaurina (Figura 17) (DAMAS *et al.*, 1985; SCHMIDT *et al.*, 2005; SHANGGUAN *et al.*, 2018). Outro alcaloide benziltetrahydroisoquinolínico foi identificado para o íon em  $m/z$  330 (pico 4 nas folhas, t.r. 6,36 min; pico 3 nos galhos, t.r. 6,35 min) com pico base  $m/z$  192, representando o esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico atribuído ao alcaloide reticulina (Figura 17, **b**) (BALA *et al.*, 2015; SHANGGUAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2006).

Nos galhos, o pico 4 (t.r. 6,57 min) denominado para o íon  $m/z$  569 apresentou uma perda inicial de 17 u [M-OH]<sup>+</sup> ( $m/z$  552). Além do mais, a presença do pico em  $m/z$  178 indicou a presença de uma estrutura bisbenziltetrahydroisoquinolínica, sugerindo-se o alcaloide lindoldamina (Figura 17) (DUTÉ *et al.*, 1987; MUREBWAYIRE *et al.*, 2008; SHIM *et al.*, 2013).

As suposições apresentadas se baseiam no fato de que podem ser identificadas 5 rotas de fragmentação para alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos (**a-e**) (Figura 17), em fragmentos do tipo **b**, a parte tetrahydroisoquinolínica sugere a ausência/presença de grupos metila ligados no  $N$ , enquanto na parte benzílica sugere a ausência/presença de grupo metoxila ou hidroxila. Os fragmentos observados são coerentes com os alcaloides do tipo benziltetrahydroisoquinolínico (SCHMIDT *et al.*, 2005).

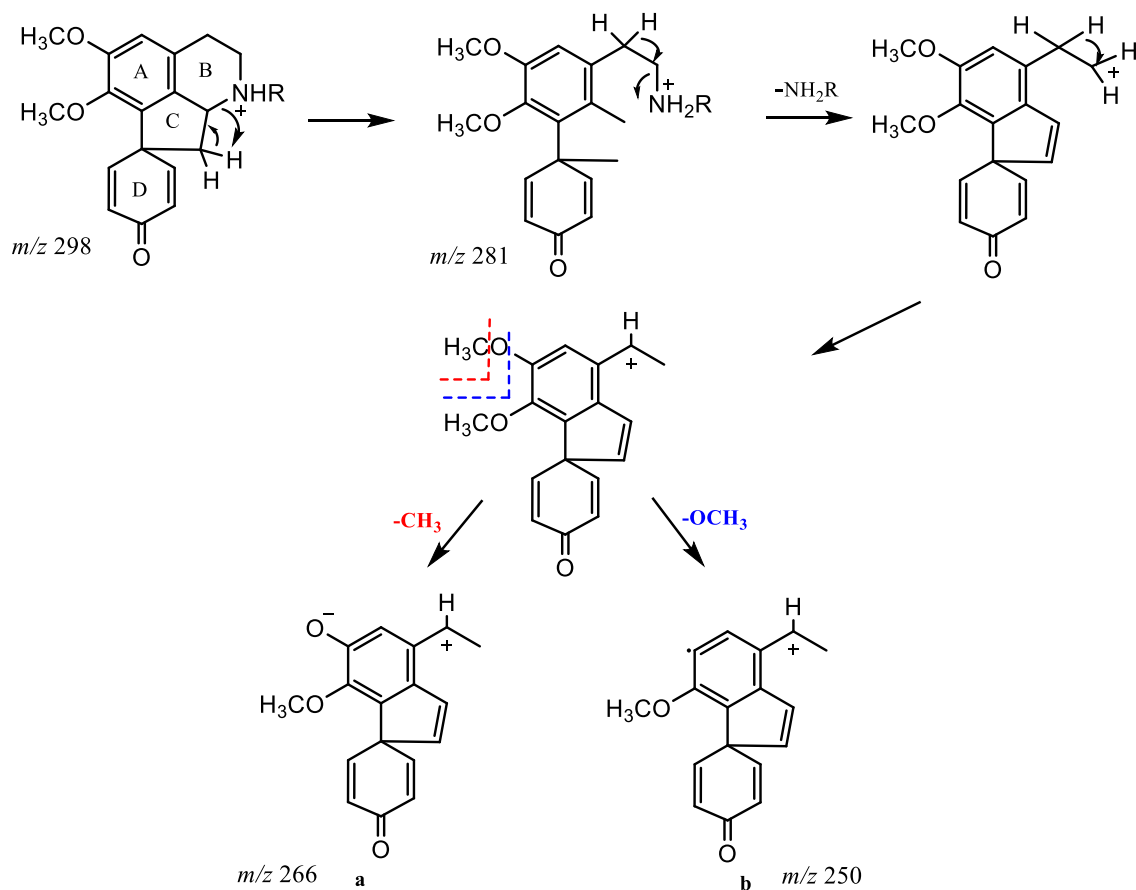


Fonte: Adaptado de Schmidt *et al.*, (2005).

**Figura 17:** Proposta de fragmentação para alcaloides benzilisoquinolínicos.

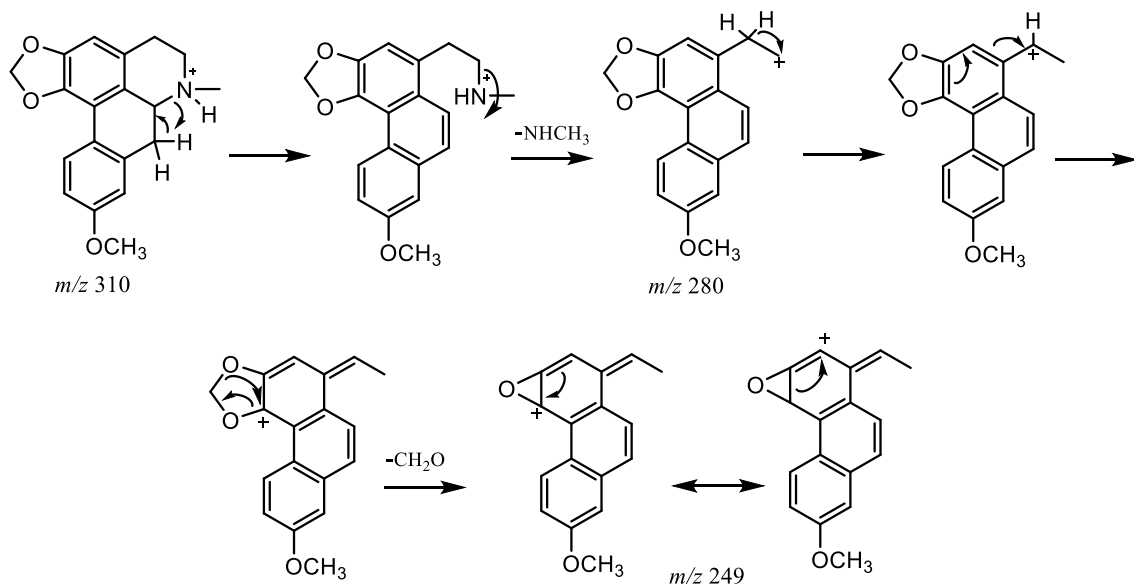
No espectro de CLAE-MS/MS o pico 2 representa o pico majoritário das folhas (t.r. 5,40 min) e galhos (t.r. 5,49 min). Sendo assim o íon em  $m/z$  298 detectado apresentou perdas sequenciais de 17 u  $[M-NH_3]^+$  ( $m/z$  298 $\rightarrow$ 281) e 15 u  $[M-CH_3]^+$  ( $m/z$  281 $\rightarrow$ 266), além de uma perda de 31 u  $[M-OCH_3]^+$  ( $m/z$  281  $\rightarrow$  250), caracterizando íon diagnóstico (Figura 18) consistente com alcaloides proaporfínicos com a presença de grupos metoxilas vicinais no anel A, sendo o alcaloide identificado como estefarina (STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Nas folhas, o pico 6 (t.r. 9,29 min) apresentou o íon  $m/z$  310 com perda inicial de 15 u ( $m/z$  310 $\rightarrow$ 295). O pico base em  $m/z$  280 está relacionado a perda de 30 u ( $m/z$  310 $\rightarrow$ 280), evidenciando a formação do fragmento  $[M-CH_2]^+$  a partir do anel A, característica importante para alcaloides de esqueleto aporfínico. Sendo assim, o alcaloide foi sugerido como sendo a estefarina (Figura 19) (STÉVIGNY *et al.*, 2004; SHANGGUAN *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2018).



Fonte: Adaptado de Stévigny *et al.*, (2004).

**Figura 18:** Proposta de fragmentação para o alcaloide proaporfínico estefarina.

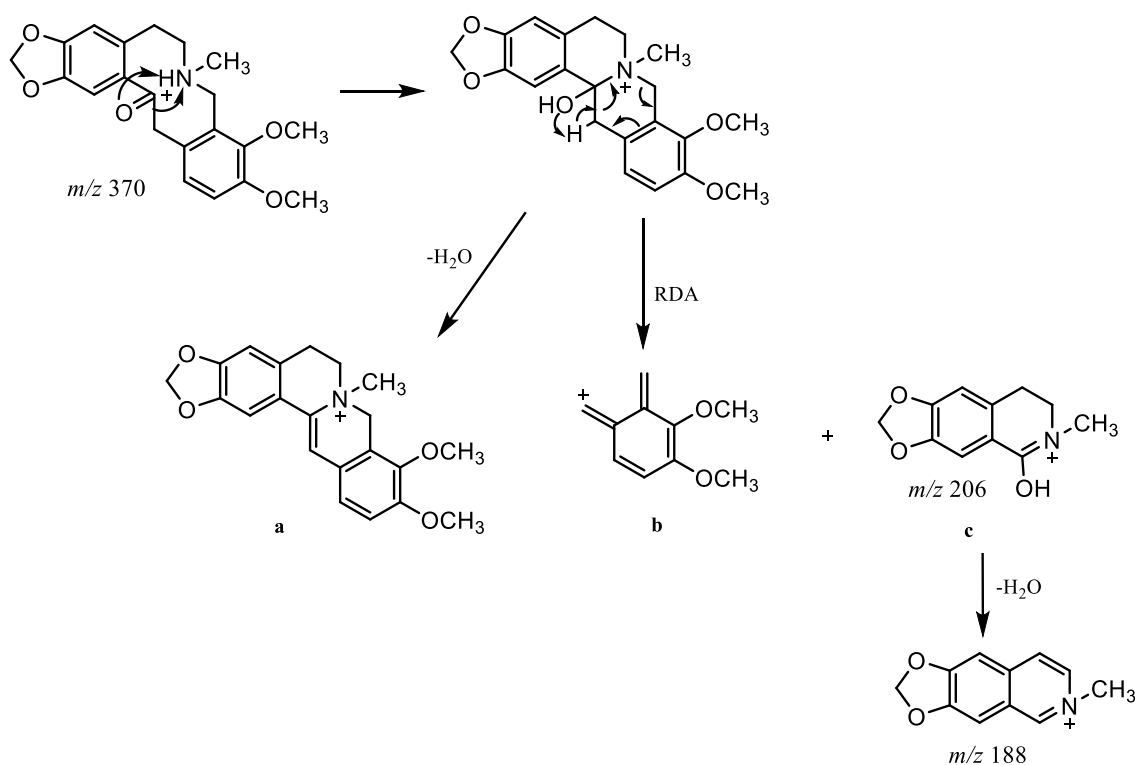


Fonte: Adaptado de Stévigny *et al.*, (2005).

**Figura 19:** Proposta de fragmentação para o alcaloide aporfínico estefanina.

Outros tipos de alcaloides menos comuns em espécies de *Menispermaceae* também foram identificados na *A. panurensis*. O íon  $m/z$  370, identificado anteriormente

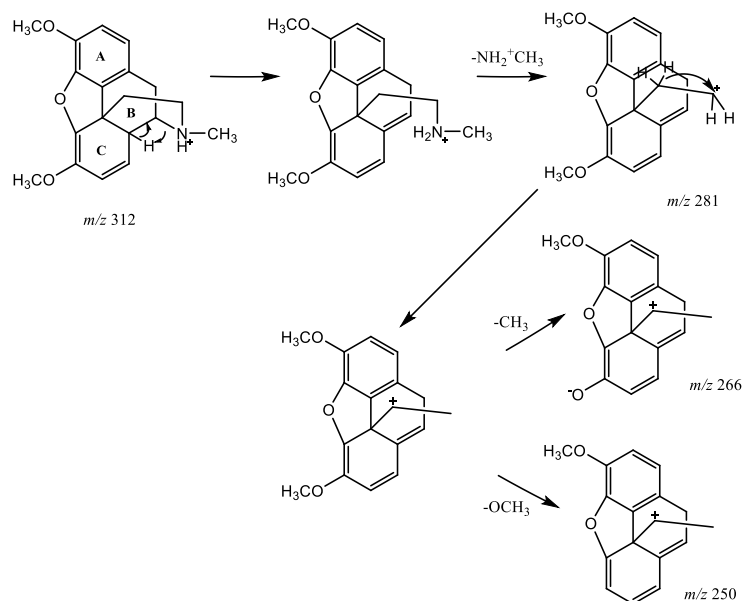
por LS-MS, também foi detectado por CLAE-MS/MS nos picos 9 (folhas t.r. 18,95 min) e 11 (galhos t.r. 15,73 min), com perda inicial de 164 u ( $m/z$  370 $\rightarrow$ 206) seguido da perda neutra de 18 u  $[M-H_2O]^+$ . Estes fragmentos evidenciam a formação do alcaloide alocriptopina via reação Retro-Diels-Alder (RDA) (Figura 20), reação muito comum em alcaloides do tipo protopina (JEONG *et al.*, 2012; SHIM *et al.*, 2013; MANOSALVA *et al.*, 2014).



Fonte: Adaptado de Shim *et al.*, (2013).

**Figura 20:** Proposta de fragmentação para o alcaloide protopina alocriptopina.

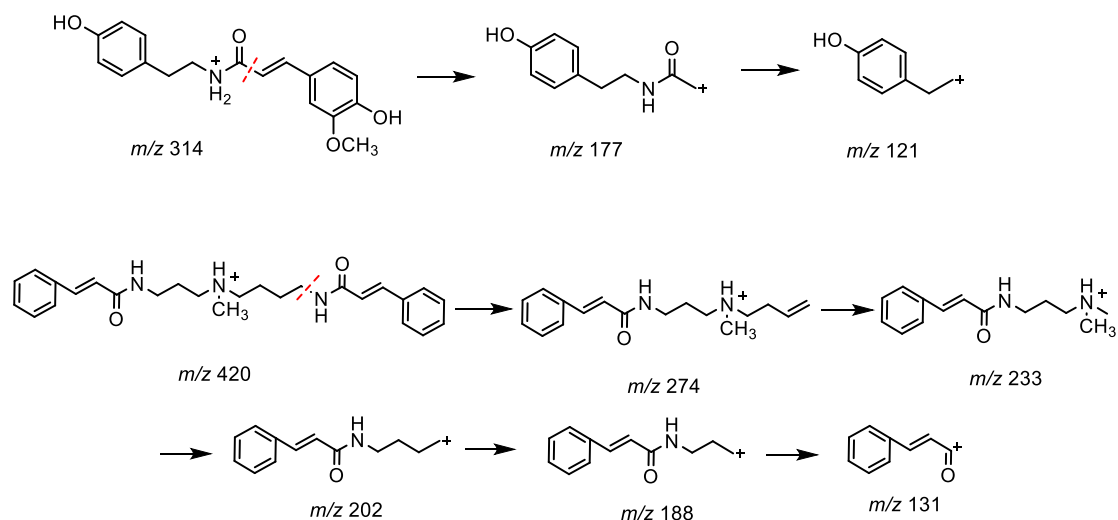
Os picos minoritários 5 (folhas, t.r. 8,66 min) e 7 (galhos, t.r. 11,38 min) foram atribuídos ao íon  $m/z$  312 que apresentou uma perda principal de 31 u ( $m/z$  312 $\rightarrow$ 281) referente ao fragmento  $[M-NH_2CH_3]^+$ . As perdas de 15 u ( $m/z$  281 $\rightarrow$ 266) e 31 u ( $m/z$  281 $\rightarrow$ 250) foram atribuídas aos substituintes do anel C  $[M-CH_3]^+$  e  $[M-OCH_3]^+$ , respectivamente. Os fragmentos comparados com a literatura corroboram com o alcaloide tebaina do tipo morfina (Figura 21) (SHIM *et al.*, 2013; RAITH *et al.*, 2003).



Fonte: Adaptado de Shim *et al.*, (2013).

**Figura 21:** Proposta de fragmentação para o alcaloide morfinano tebaina.

O íon em  $m/z$  314, atribuído aos picos 3 (folhas, t.r. 5,91 min) e 10 (galhos, t.r. 14,64 min), apresentou o pico base em  $m/z$  177 referente a perda de 137 u do fragmento etilaminobenzeno, já identificado anteriormente como o alcaloide amida derivado do ácido cinâmico feruloiltiramina (Figura 22) (GALARCE-BUSTOS *et al.*, 2019; JIAO *et al.*, 2018). O íon em  $m/z$  420, pico 8 (folhas, t.r. 14,34 min) e 9 (galhos, t.r. 13,30 min), apresentou perdas sequenciais de 218 u ( $m/z$  420 $\rightarrow$ 202), 14 u ( $m/z$  202 $\rightarrow$ 188) e 57 u ( $m/z$  188 $\rightarrow$ 131), fragmentos típicos de poliaminas derivadas de ácido cinâmico. Assim, o íon foi identificado como metilmaitenina evidenciando a presença de poliaminas na espécie (Figura 22) (CLERICUZIO *et al.*, 2007; SCHLITTLER *et al.*, 1973).



**Figura 22:** Proposta de fragmentação para alcaloides amidas ( $m/z$  314) e poliaminas ( $m/z$  420).

Na Tabela 4 também estão descritas as principais absorbâncias dos íons detectados nos espectros de CLAE-DAD-MS, alguns apresentaram co-eluição e não foi possível determinar as principais bandas. Espectros de UV de alcaloides aporfinoides são de valores consideráveis na elucidação estrutural devido aos diferentes grupos distribuídos neste tipo, que depende quase que exclusivamente da localização ao invés da natureza do substituinte. Os alcaloides proaporfínicos são caracterizados pela presença de uma banda forte na região de 230-240 nm e uma banda fraca na região de 280-290 nm, devido a ausência de ligações conjugadas no anel D e aos substituintes no anel A (SANGSTER e STUART, 1965; ZHANG *et al.*, 2006), que corrobora com as bandas identificadas para o alcaloide estefarina.

Para alcaloides benzilisoquinolínicos as absorbâncias estão relacionadas ao anel A devido as conjugações  $\pi$  do sistema aromático, que são bastante semelhantes aos alcaloides aporfínicos, com forte absorção em torno de 210-230 nm e fraca absorção em torno de 260-280 nm (SANGSTER e STUART, 1965; ZHANG *et al.*, 2006). Neste estudo, os alcaloides identificados como coclaurina e reticulina apresentaram forte absorbância em 244 e 245 nm e fraca absorbância em 265 e 282 nm, respectivamente.

Absorções de UV de poliaminas derivadas do ácido cinâmico são caracterizadas pela presença de fortes bandas na região de 220-230 nm e fracas bandas em 270-290 nm, devido as ligações conjugadas do anel aromático e na porção cinamoil (BOKERN *et al.*, 1995; ENGLERT *et al.*, 1973). As poliaminas identificadas neste estudo apresentaram bandas respectivas às regiões citadas na literatura.

Portanto, as análises de CLAE-DAD-MS/MS contribuíram adicionalmente à técnica de LS-MS/MS com a identificação de mais 8 alcaloides distribuídos entre derivados de isoquinolínicos e poliaminas, promovendo uma investigação mais ampla dos alcaloides detectados nas folhas e galhos de *A. panurensis*. No entanto, para a maioria dos alcaloides identificados, algumas diferenças foram observadas nos espectros de UV, possivelmente devido a co-eluição de muitos picos, bem como as exatas substituições padrões que permanecem desconhecidas, sendo necessário o fracionamento da fração alcaloídica e posterior análise de RMN 1D e 2D para ajuste de atribuições inequívocas das principais substâncias.



**Tabela 4:** Identificação da fração alcaloídica a partir das folhas e galhos de *A. panurensis* por CLAE-DAD-MS/MS em escala analítica.

Folhas					
Pico	Identificação	T.R.* (min)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS <sup>n</sup>	λ <sub>max</sub> (nm)
1	coclaurina	5,28	286	MS <sup>2</sup> [286]: 277; 269; 254; 237; 175; 107.	
2	estefarina	5,49	298	MS <sup>2</sup> [298]: 281; 266; 250; 235; 207; 161.	249, 284
3	feruloiltiramina	5,91	314	MS <sup>2</sup> [314]: 177; 145; 121; 117.	243, 284
4	reticulina	6,36	330	MS <sup>2</sup> [330]: 267; 207; 192; 175; 137.	
5	tebaina	8,66	312	MS <sup>2</sup> [312]: 281; 266; 251; 235; 223.	254
6	estefanina	9,29	310	MS <sup>2</sup> [310]: 295; 280; 266; 252; 249; 234; 224.	
7	papaverina	13,29	340	MS <sup>2</sup> [340]: 325; 310; 295; 279; 264.	253
8	metil-maitenina	14,34	420	MS <sup>2</sup> [420]: 274; 233; 202; 188; 131.	
9	alocriptopina	18,95	370	MS <sup>2</sup> [370]: 323; 206; 188.	
Galhos					
Pico	Identificação	T.R.* (min)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS <sup>n</sup>	λ <sub>max</sub> (nm)
1	coclaurina	5,36	286	MS <sup>2</sup> [286]: 277; 269; 254; 237; 175; 107.	244, 265
2	estefarina	5,40	298	MS <sup>2</sup> [298]: 281; 266; 250; 235; 207; 161.	248, 285
3	reticulina	6,35	330	MS <sup>2</sup> [330]: 267; 207; 192; 175; 137.	245, 282
4	lindoldamina	6,57	569	MS <sup>2</sup> [569]: 552; 178.	
5	<i>N</i> -metilcoclaurina	8,65	300	MS <sup>2</sup> [300]: 285; 269; 255; 237; 178; 161; 145; 107.	235, 277
6	palmatina	9,40	352	MS <sup>2</sup> [352]: 336; 322; 308; 294.	
7	tebaina	11,38	312	MS <sup>2</sup> [312]: 281; 266; 251; 235; 223.	244
8	estefaranina	11,85	324	MS <sup>2</sup> [324]: 309; 294; 280.	
9	metil-maitenina	13,30	420	MS <sup>2</sup> [420]: 274; 233; 202; 188; 131	243, 270
10	feruloiltiramina	14,64	314	MS <sup>2</sup> [314]: 177; 145; 121; 117.	244, 285, 316
11	alocriptopina	15,73	370	MS <sup>2</sup> [370]: 323; 206; 188.	242, 254

T.R.\*: Tempo de Retenção

### 5.3. Fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa

A fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis* foi submetida ao fracionamento em escala semi-preparativa, e na Tabela 5 estão descritas as cinco frações coletadas de acordo com os tempos de retenção obtidos a partir dos cromatogramas de CLAE-DAD (Figuras A14 e A15, pag.: 142). Para obter maiores rendimentos e melhor resolução dos picos, o fracionamento foi realizado com dois métodos diferentes de gradiente de eluição (1 e 2). Sendo assim, no gradiente 1 foi possível coletar as amostras APG569 e APG298 separadamente, enquanto no gradiente 2 essas duas amostras co-eluíram. Por outro lado, no gradiente 2 foi possível coletar a amostra APG314.

**Tabela 5:** Fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis*.

Pico	Código das amostras	[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	T.R. * (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	T.R. ** (min)	λ <sub>max</sub> (nm)
1	APG569	569	3,43	238, 279	1,75	279 <sup>a</sup>
2	APG298	298	4,05	239, 276	2,28	279 <sup>a</sup>
3	APG352	352	8,00	236, 271, 345	6,12	265, 340
4	APG420	420	11,15	237, 276	10,16	271
5	APG314	314	-	-	13,51	286, 315

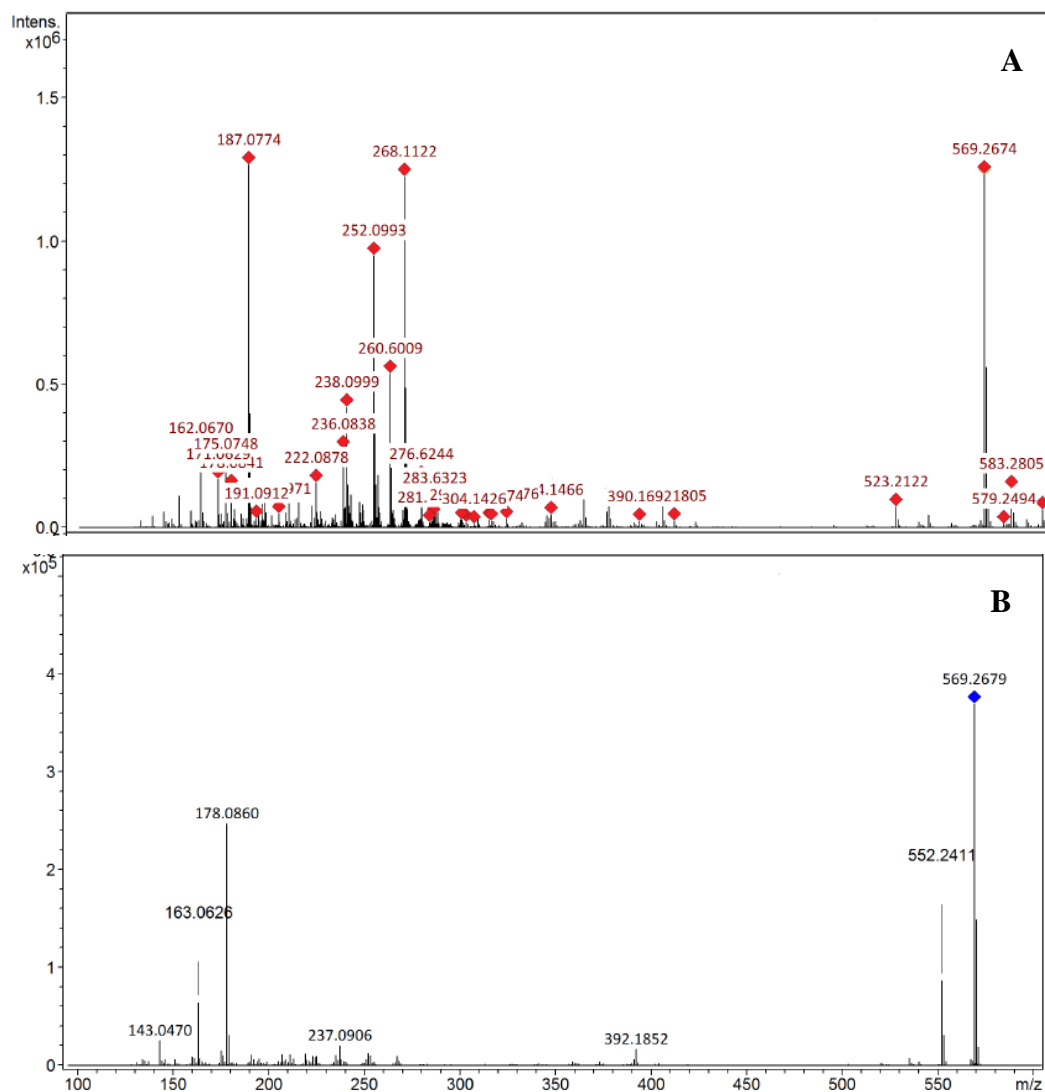
\*: Tempos de retenção conforme gradiente de eluição 1.

\*\* : Tempos de retenção conforme gradiente de eluição 2.

a: Co-eluição.

#### 5.3.1. Determinação estrutural da amostra APG569

A amostra APG569 (3,6 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo claro. No espectro de massas modo *full scan* (Figura 23a) foi observado o pico principal em *m/z* 569. No espectro de MS/MS (Figura 23b) o íon *m/z* 569 apresentou uma perda inicial de 17 u (*m/z* 552), atribuído a perda de hidroxila [M-OH]<sup>+</sup> no anel C do esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico. O pico em *m/z* 178 pode ser considerado um íon diagnóstico no esqueleto de alcaloides benzilisoquinolínicos (DUTÉ *et al.*, 1987; MUREBWAYIRE *et al.*, 2008; SHIM *et al.*, 2013). Dados de espectrometria de massas de alta resolução [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* 569,2674; fórmula molecular: C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; calculado: *m/z* 569,2646; Δ<sub>*m/z*</sub> teórico = - 4,8 ppm.

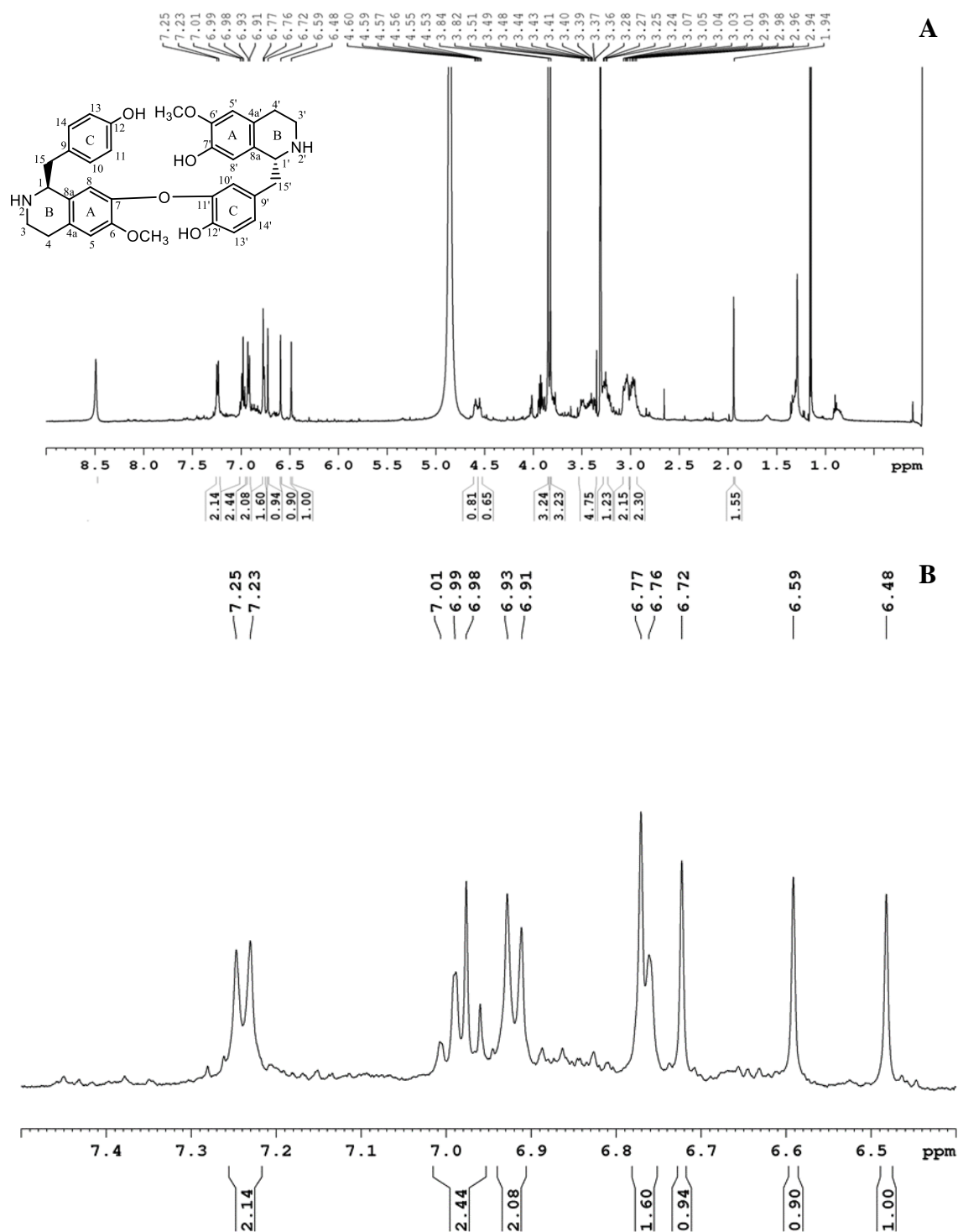


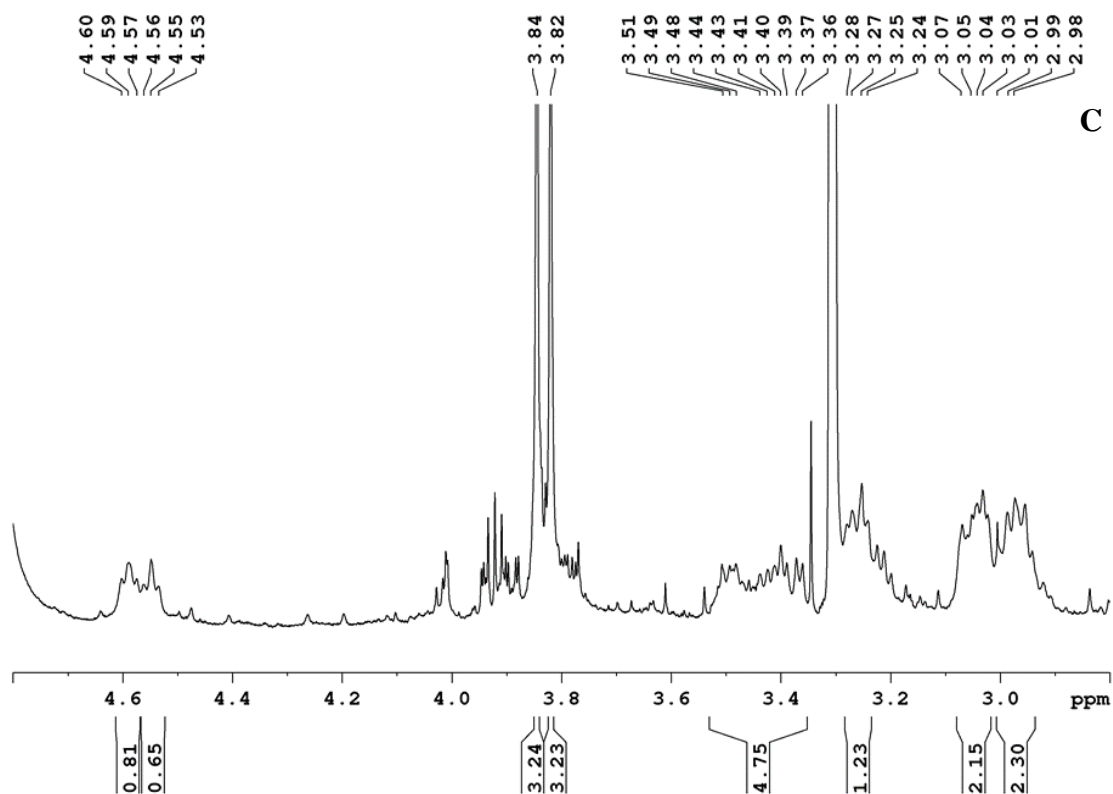
**Figura 23:** Espectro de massas de alta resolução modo *full scan* (A) e MS/MS (B) da amostra APG569.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 24 e Tabela 6) da amostra APG569 apresentou 11 sinais de hidrogênio na região de aromáticos (7,3 - 6,5 ppm), sendo que dois deles foram observados com a mesma constante de acoplamento e integração para dois hidrogênios cada:  $\delta_{\text{H}}$  7,25 (d; 2H;  $J$ : 8,5 Hz; H-10; H-14) e  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (d; 2H;  $J$ : 8,5 Hz; H-11; H-13), além de sete simpletos com um hidrogênio cada.

Os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,59 (s; 1H; H-8'),  $\delta_{\text{H}}$  6,48 (s; 1H; H-8),  $\delta_{\text{H}}$  6,72 (s; 1H; H-5') e  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (s; 1H; H-5) estão localizados em posição *para* no anel aromático B tetrassubstituído, além de três sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,99 (dd; 1H;  $J$ : 8,5 e 2,0 Hz; H-14'),  $\delta_{\text{H}}$  6,98 (d; 1H;  $J$ : 8,5 Hz; H-13') e  $\delta_{\text{H}}$  6,76 (s; 1H; H-10') que apresentaram constante de acoplamento *orto* no anel C.

Na região de alifáticos, são observados dois sinais de metoxilas em  $\delta_H$  3,84 (s; 3H; H-6'-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_H$  3,82 (s; 3H; H-6-OCH<sub>3</sub>), dois sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  4,59 (t; 1H; *J*: 7,1 Hz; H-1) e  $\delta_H$  4,55 (t; 1H; *J*: 7,1 Hz; H-1') e 12 hidrogênios metilênicos dos anéis B, H-15 e H15' sobrepostos na região de 3,5 – 2,0 ppm, totalizando 31 hidrogênios no espectro de RMN de <sup>1</sup>H.



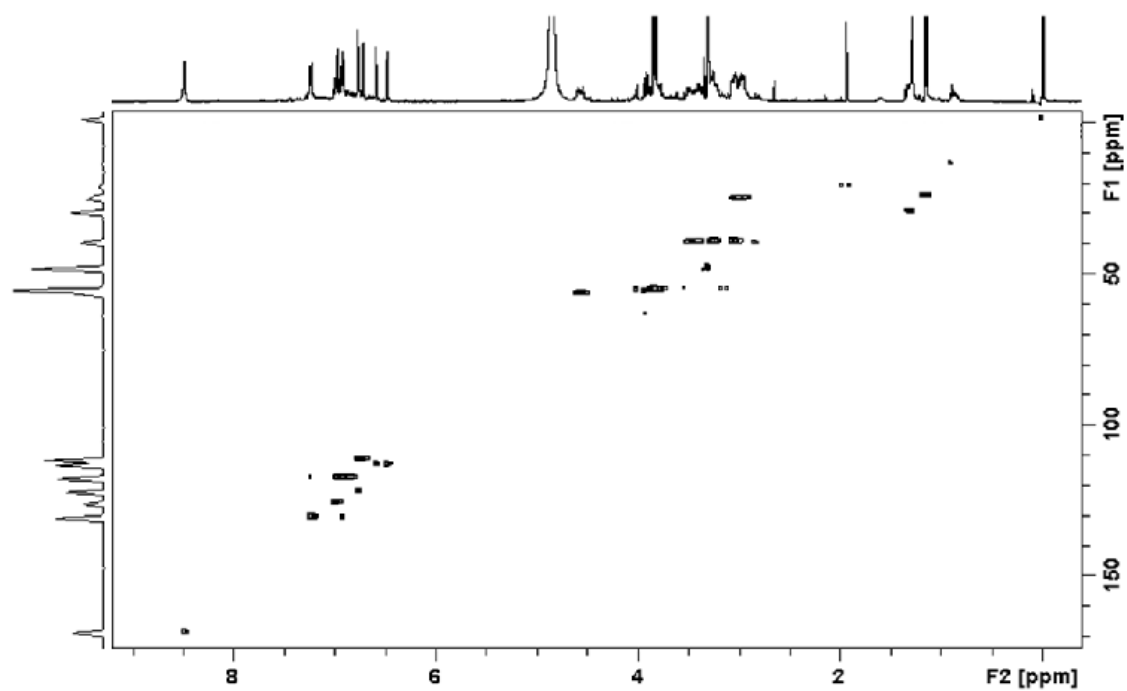


**Figura 24:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG569 (A) e ampliações da região de aromáticos (B) e alifáticos (C).

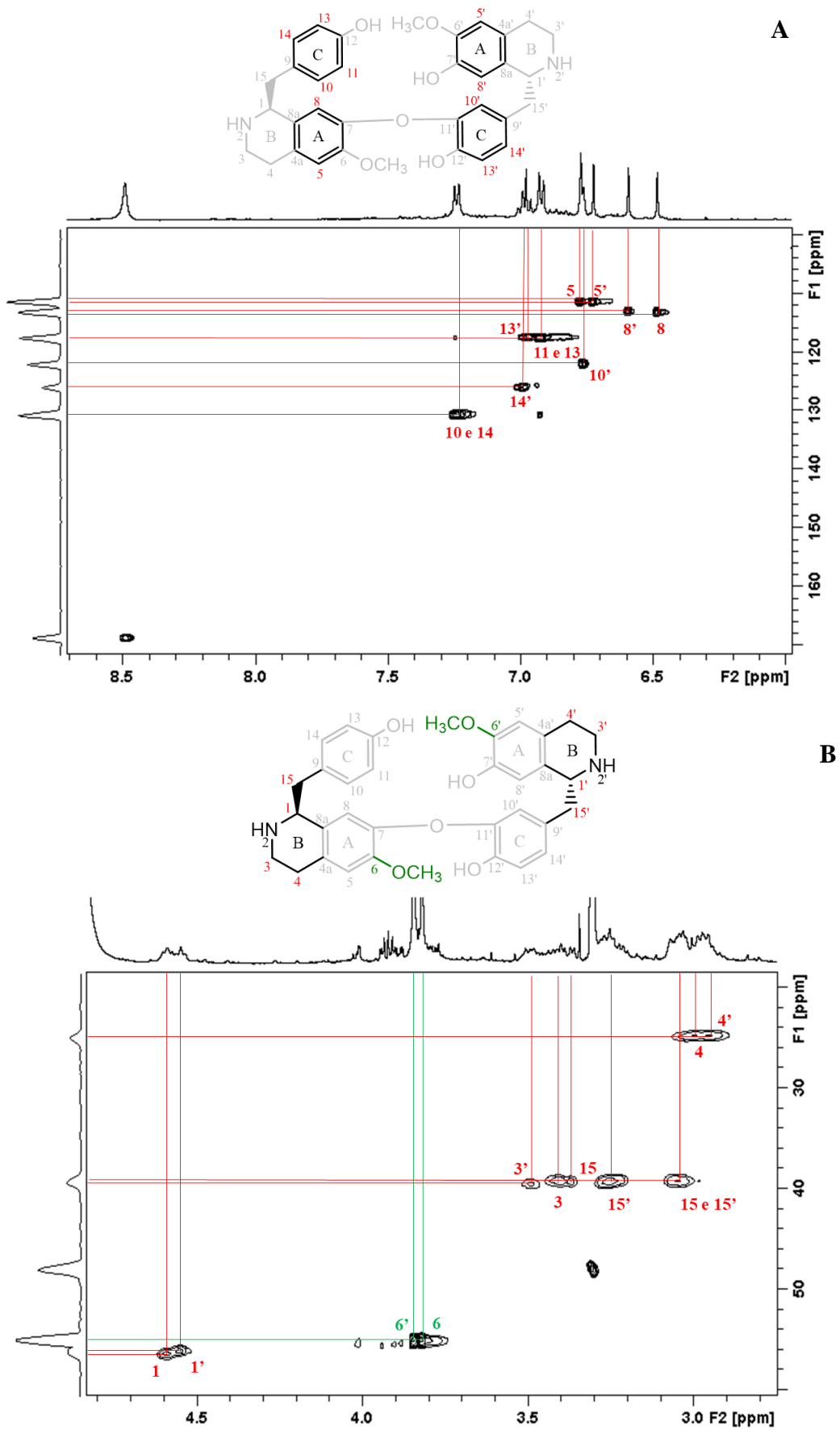
No mapa de contorno de HSQC (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) foi possível localizar 10 sinais de carbono na região de aromáticos (111 – 160 ppm) e 11 na região de alifáticos (24 – 57 ppm) (Figuras 25 e 26; Tabela 6). Observou-se a correlação de dois dupletos na região de aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,25 (H-10; H-14) e  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (H-11; H-13) com dois sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  130,6 (C-10 e C-14) e  $\delta_{\text{C}}$  117,5 (C-11 e C-13), que conseqüentemente formam um anel aromático simétrico. A presença do outro anel aromático foi evidenciada pela correlação de três sinais de hidrogênio:  $\delta_{\text{H}}$  6,99 (H-14');  $\delta_{\text{H}}$  6,98 (H-13') e  $\delta_{\text{H}}$  6,76 (H-10') com três sinais de carbono  $\delta_{\text{C}}$  126,0 (C-14'),  $\delta_{\text{C}}$  117,6 (C13') e  $\delta_{\text{C}}$  121,9 (C10'), respectivamente; confirmando a posição *orto* no anel. As correlações de H-C em posição *para* no anel A tetrassubstituído foram confirmadas com  $\delta_{\text{H}}$  6,48 (H-8),  $\delta_{\text{H}}$  6,59 (H-8'),  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  6,72 (H-5') com os sinais de carbono sobrepostos em  $\delta_{\text{C}}$  113,1 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  112,9 (C-8'),  $\delta_{\text{C}}$  111,4 (C-5) e  $\delta_{\text{C}}$  111,3 (C-5').

Os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,84 (s; H-6'-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (s; H-6-OCH<sub>3</sub>) correlacionam com  $\delta_{\text{C}}$  55,8 (C-6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$  55,2 (C-6-OCH<sub>3</sub>). Ainda próximo dessa região, os tripletos  $\delta_{\text{H}}$  4,55 (t; H-1') e 4,59 (t; H-1) correlacionam com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  56,4 (C-1') e  $\delta_{\text{C}}$  56,1 (C-1). Os sinais de hidrogênio metilênico em  $\delta_{\text{H}}$  3,49 (m; H-3');  $\delta_{\text{H}}$  3,40 (m; H-3);  $\delta_{\text{H}}$  3,25 e  $\delta_{\text{H}}$  3,05 (m; H-15') e  $\delta_{\text{H}}$  3,36 e  $\delta_{\text{H}}$  3,05 (m; H-15) foram

localizados em deslocamentos muito próximos e correlacionando com os sinais de carbono das posições C-3' ( $\delta_C$  39,4); C-3 ( $\delta_C$  39,3); C-15' ( $\delta_C$  39,3) e C-15 ( $\delta_C$  39,3). Dois hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2,99 e  $\delta_H$  2,98 (m; 2H; H-4');  $\delta_H$  3,07 e  $\delta_H$  3,03 (m; 2H; H-4) foram atribuídos aos sinais de carbono em  $\delta_C$  24,8 (C-4') e  $\delta_C$  24,9 (C-4) totalizando 6 sinais de carbono de grupos metilênicos.



**Figura 25:** Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG569.

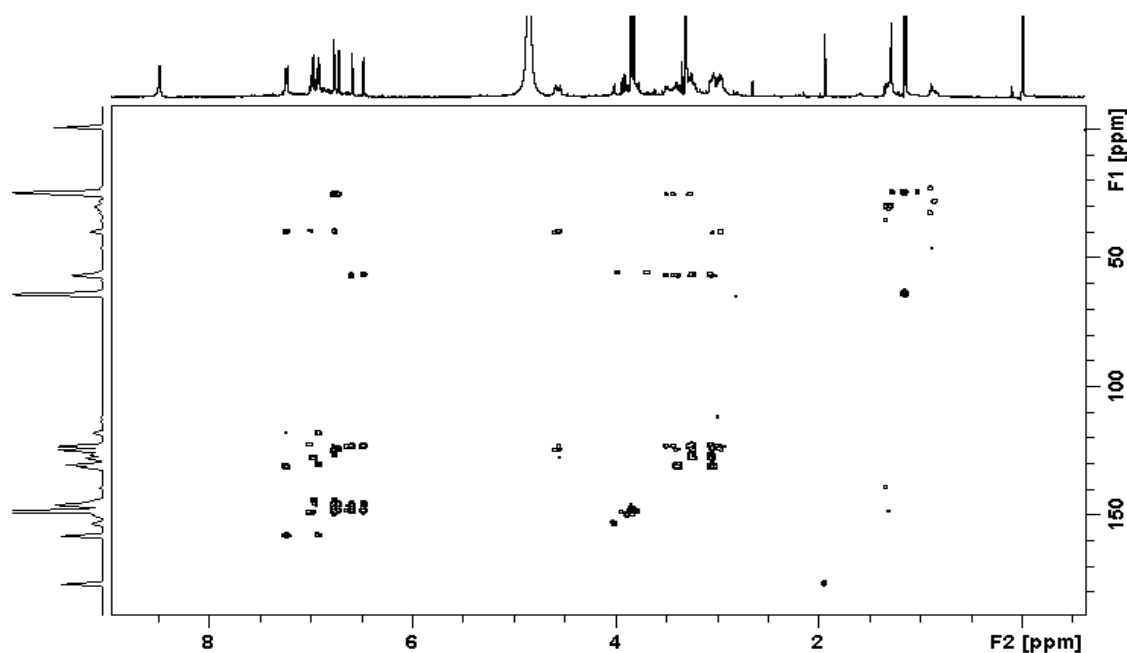


**Figura 26:** Ampliações das regiões de aromáticos (**A**) e alifáticos (**B**) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG569.

O mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 27 e 28; Tabela 6) mostrou as principais correlações à longa distância dos H-C ( $J^2$ ,  $J^3$  e  $J^4$ ) destacando a identificação de 12 sinais de carbono quaternários. As principais correlações em  $J^3$  dos anéis aromáticos foram atribuídas para os hidrogênios simétricos  $\delta_H$  7,25 (H-10 e H-14) com  $\delta_C$  39,3 (C-15). Além disso,  $\delta_H$  6,93 (H-11) e  $\delta_H$  7,25 (H-14) apresentaram correlação com o  $\delta_C$  157,8 (C-12) em  $J^2$  e  $J^3$ , respectivamente. A correlação de  $\delta_H$  7,25 (H-14) com o  $\delta_C$  131,1 (C-9) ( $J^2$ ) indica a presença do sinal de carbono quaternário no anel C. As correlações  $\delta_H$  6,98 (H-13') e  $\delta_C$  127,7 (C-9');  $\delta_H$  3,05 (H-15') e  $\delta_C$  127,7 (C-9');  $\delta_H$  6,98 (H-13') e  $\delta_H$  148,8 (C-12') comprovam a presença do outro sinal de carbono quaternário no anel C com hidrogênios em posição *orto*.

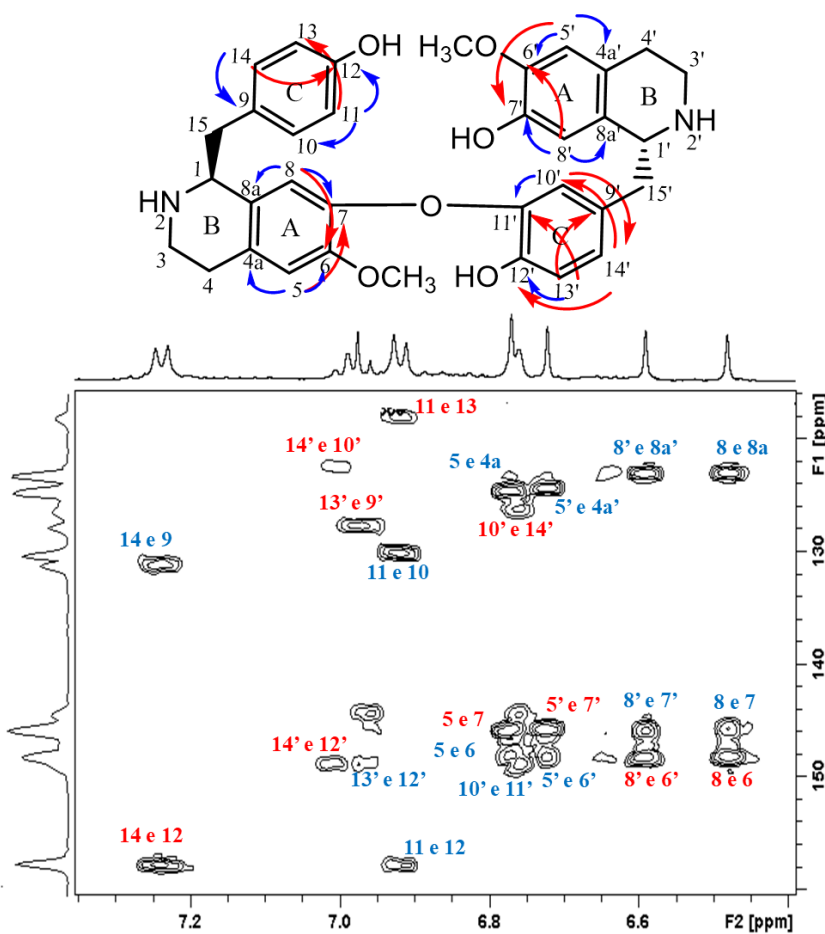
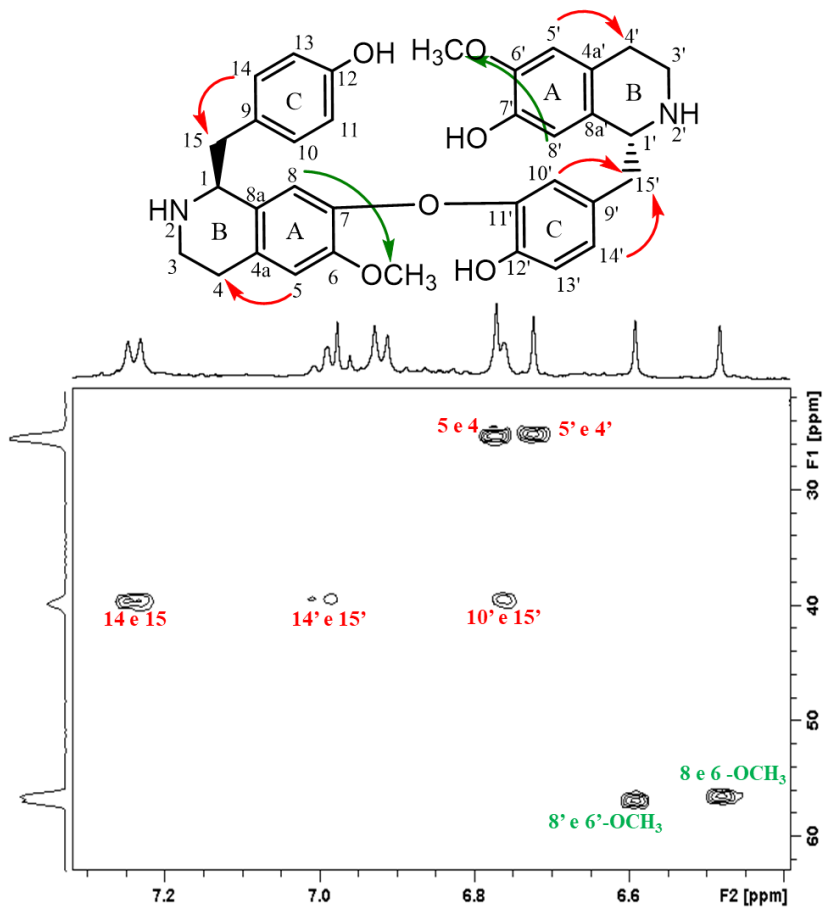
Na porção da estrutura que caracteriza o grupo benziltetraisoquinolínico as correlações para os sinais de carbono quaternário foram atribuídas conforme os deslocamentos em  $\delta_H$  4,55 (H-1') e  $\delta_H$  6,72 (H-5') com  $\delta_C$  124,3 (C-4a');  $\delta_H$  4,59 (H-1) e  $\delta_H$  6,77 (H-5) com  $\delta_C$  124,5 (C-4a). Os metilênicos em  $\delta_H$  3,49 (H-3') e  $\delta_H$  3,40 (H-3) com  $\delta_C$  123,0 (C-8a') e  $\delta_C$  123,1 (C-8a), respectivamente.

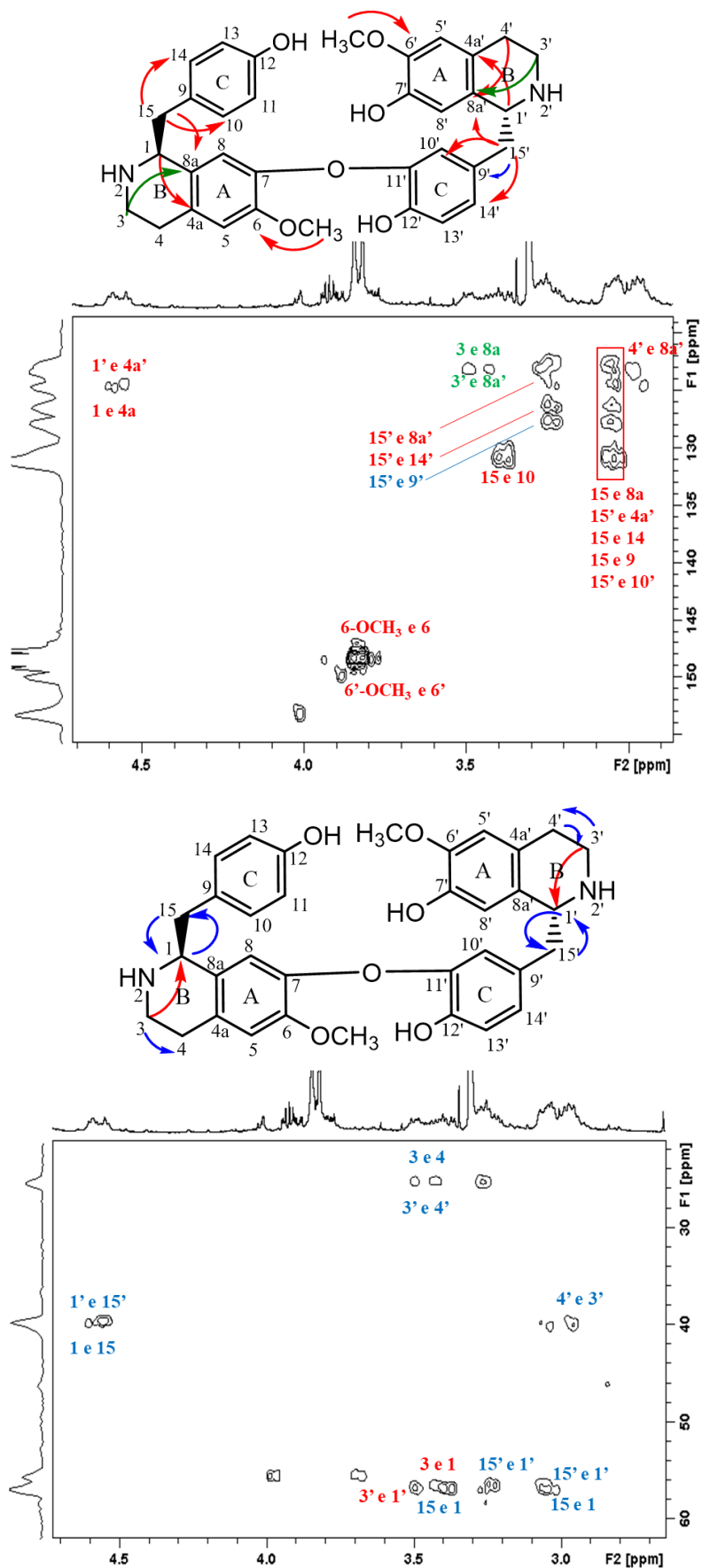
Por fim, temos as metoxilas  $\delta_H$  3,84 (6'-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_H$  3,82 (6-OCH<sub>3</sub>) correlacionadas em  $J^2$  com os sinais de carbono em  $\delta_C$  148,2 (C-6') e  $\delta_C$  148,2 (C-6), bem como os sinais de hidrogênio  $\delta_H$  6,59 (H-8') e  $\delta_H$  6,72 (H-5') correlacionando à longa distância com o sinais de carbono em  $\delta_C$  145,7 (C-7'), deslocamento característico de carbono ligado à hidroxila. Além disso, os sinais de hidrogênio  $\delta_H$  6,48 (H-8) e  $\delta_H$  6,77 (H-5) correlacionando à longa distância com o sinal de carbono em  $\delta_C$  145,6 (C-7).



**Figura 27:** Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG569.



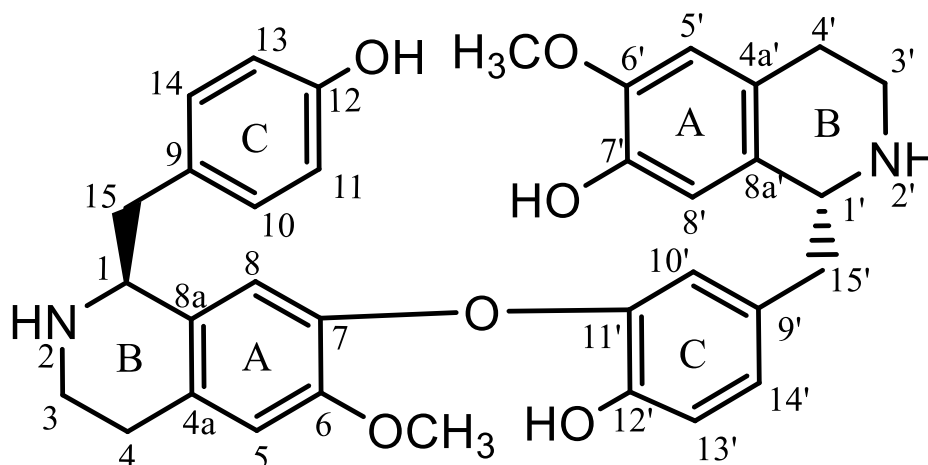




**Figura 28:** Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG569: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ).

As análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC juntamente com os dados de espectrometria de massas sugeriram que a molécula consiste em dois fragmentos similares com uma ligação de conexão aos dois fragmentos. As estruturas são coerentes com duas coclaurinas conectadas via ligação de éter. A ligação C-7 e C-11' foi suportada pelo espectro de HMBC de acordo com as características observadas no ambiente químico destes carbonos mencionados.

Portanto os experimentos levaram a determinação da estrutura do alcaloide isômero da lindoldamina (Figura 29) do tipo bisbenzilisoquinolínico, previamente identificado no curare (GARCIA *et al.*, 2015). Lindoldamina já foi reportado nos gêneros *Triclisia*, *Albertisia* e *Abuta* (DUTÉ *et al.*, 1987; LAVAULT *et al.*, 1987; MUREBWAYIRE *et al.*, 2008).



**Figura 29:** Estrutura do alcaloide isômero da lindoldamina.

**Tabela 6:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra APG569.

Amostra APG569 (isômero da lindoldamina)				
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J Hz) <sup>b</sup>	$\delta_{\text{C}}$ HSQC <sup>a,c</sup>	HMBC <sup>a</sup>
1	4,59 (1H; t; 7,1 Hz)	4,65 (1H; t; 7,1 Hz)	56,1	39,3; 124,5
3	3,40 (2H; m)	3,32 e 3,55 (2H; m)	39,3	24,9; 56,1; 123,1
4	3,03 e 3,07 (2H; m)	3,05 e 3,09 (2H; m)	24,9	39,3; 56,1
4a	-	-	124,5	-
5	6,77 (1H; s)	6,79 (1H; s)	111,4	24,9; 113,1; 123,1; 124,5; 145,6; 148,2
6	-	-	148,2	-
6-OCH <sub>3</sub>	3,82 (3H; s)	3,85 (3H; s)	55,2	145,6; 148,2
7	-	-	145,6	-
8	6,48 (1H; s)	6,61 (1H; s)	113,1	55,2; 123,1; 145,6; 148,2
8a	-	-	123,1	-
9	-	-	131,1	-
10	7,25 (1H; d; 8,5 Hz)	7,28 (1H; d; 8,3 Hz)	130,6	39,3; 117,5; 130,6; 131,1; 157,8
11	6,93 (1H; d; 8,5 Hz)	6,94 (1H; d; 8,3 Hz)	117,5	117,5; 131,1; 157,8
12	-	-	157,8	-
13	6,93 (1H; d; 8,5 Hz)	6,94 (1H; d; 8,3 Hz)	117,5	117,5; 131,1; 157,8
14	7,25 (1H; d; 8,5 Hz)	7,28 (1H; d; 8,3 Hz)	126,0	39,3; 117,5; 130,6; 131,1; 157,8
15	3,05 (1H; m) 3,36 (1H; m)	3,44 (1H; m) 3,08 (1H; m)	39,3	56,1; 123,1; 126,0; 130,6; 131,1
1'	4,55 (1H; t; 7,1 Hz)	4,60 (1H; t; 7,2 Hz)	56,4	39,3; 124,3
3'	3,49 (2H; m)	3,32 e 3,48 (2H; m)	39,4	24,8; 56,4; 123,0
4'	2,98 e 2,99 (2H; m)	3,03 e 3,08 (2H; m)	24,8	39,4; 56,4; 123,0; 124,3
4a'	-	-	124,3	-
5'	6,72 (1H; s)	6,74 (1H; s)	111,3	24,8; 112,9; 124,3; 145,7; 148,2
6'	-	-	148,2	-
6'-OCH <sub>3</sub>	3,84 (3H; s)	3,82 (3H; s)	55,1	145,7; 148,2
7'	-	-	145,7	-
8'	6,59 (1H; s)	6,50 (1H; s)	112,9	123,0; 56,4; 145,7; 148,2
8a'	-	-	123,0	-

9 <sup>a</sup>	-	-	127,7	-
10 <sup>a</sup>	6,76 (1H; s)	6,80 (1H; s)	121,9	39,3; 126,0; 148,8
11 <sup>a</sup>	-	-	144,5	-
12 <sup>a</sup>	-	-	148,8	-
13 <sup>a</sup>	6,98 (1H; d; 8,5 Hz)	6,98 (1H; d; 8,2 Hz)	117,6	39,3; 127,7; 144,5; 148,8
14 <sup>a</sup>	6,99 (1H; dd; 8,5 e 2,0 Hz)	7,02 (1H; dd; 8,2 e 1,5 Hz)	126,0	39,3; 121,9; 148,8
15 <sup>a</sup>	3,05 (1H; m) 3,25 (1H; m)	3,10 (1H; m) 3,27 (1H; m)	39,3	56,4; 121,9; 123,0; 126,0; 127,7

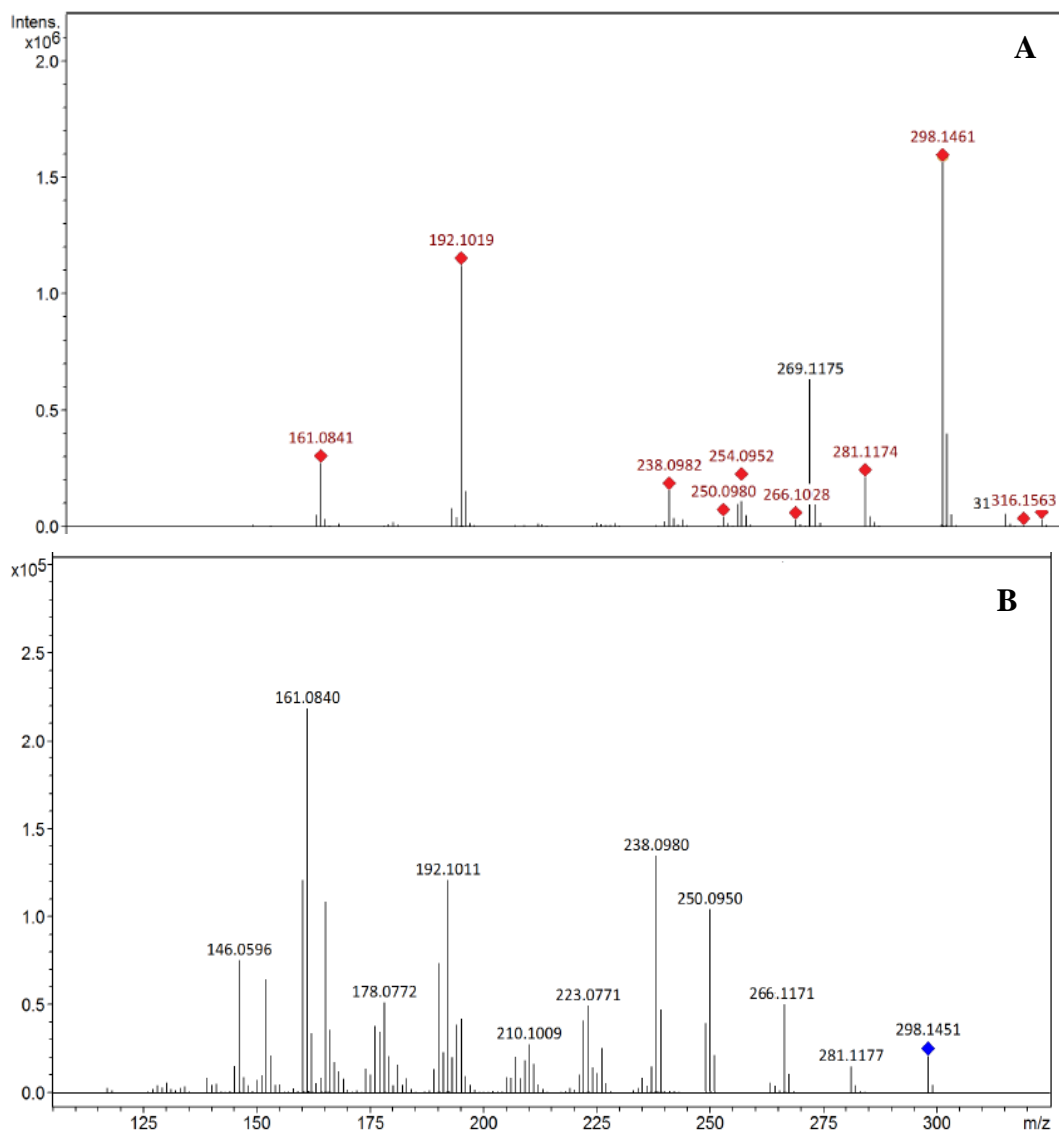
<sup>a</sup> O experimento foi realizado em CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz para <sup>1</sup>H.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Garcia *et al.*, (2015) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

<sup>c</sup> Carbonos foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

### 5.3.2. Determinação estrutural da amostra APG298

A amostra APG298 (22,1 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom claro. No espectro de massas modo *full scan* (Figura 30a) foi observado um pico base [M+H]<sup>+</sup> em *m/z* 298, e seu espectro MS/MS (Figura 30b) mostrou perdas sequenciais de 17 u (*m/z* 298→281) e 15 u (*m/z* 281→266) seguidas pela perda de 31 u (*m/z* 281→250), que são consistentes com o esqueleto proaporfínico (STÉVIGNY *et al.*, 2004). Dados de espectrometria de massas de alta resolução [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* 298,1461; fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>; calculado: *m/z* 298,1438;  $\Delta_{m/z}$  teórico = - 7,9 ppm.

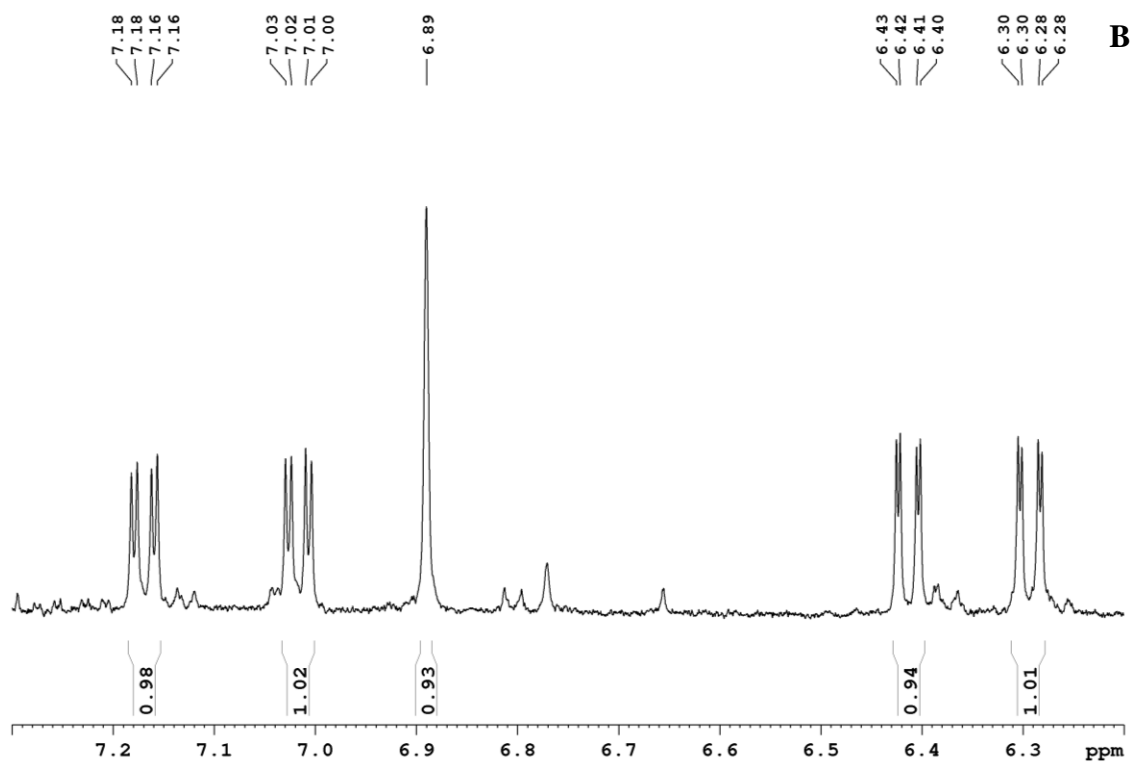
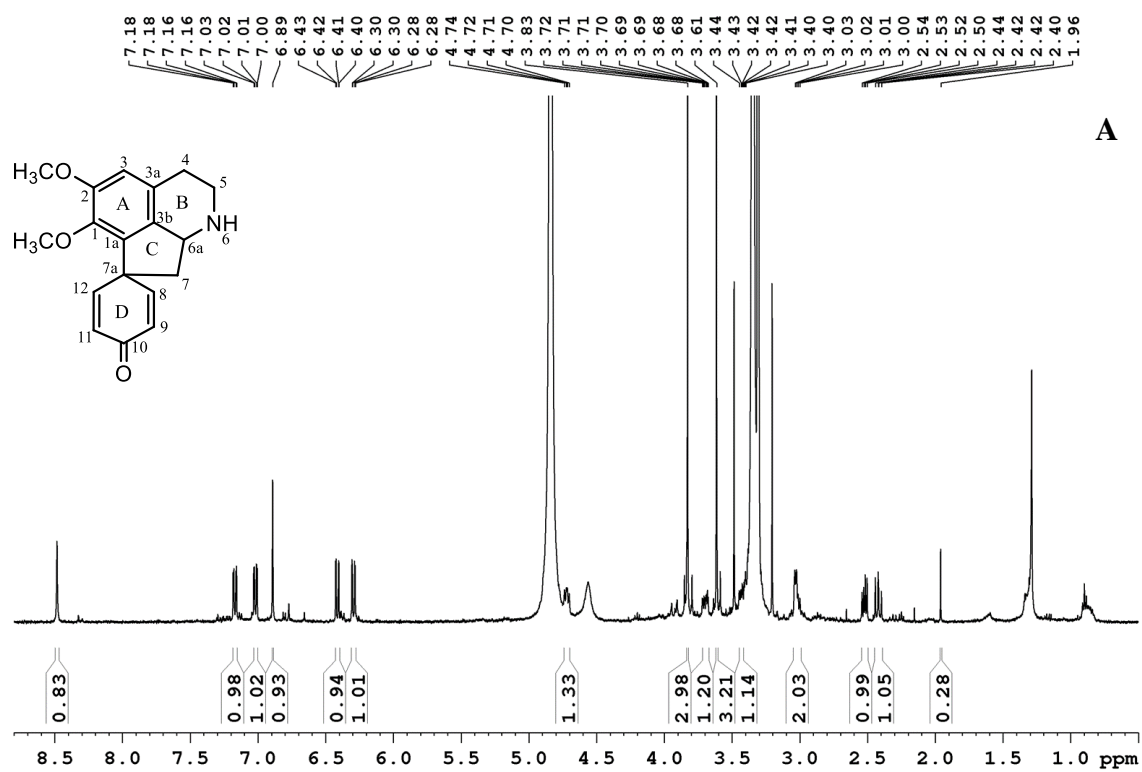


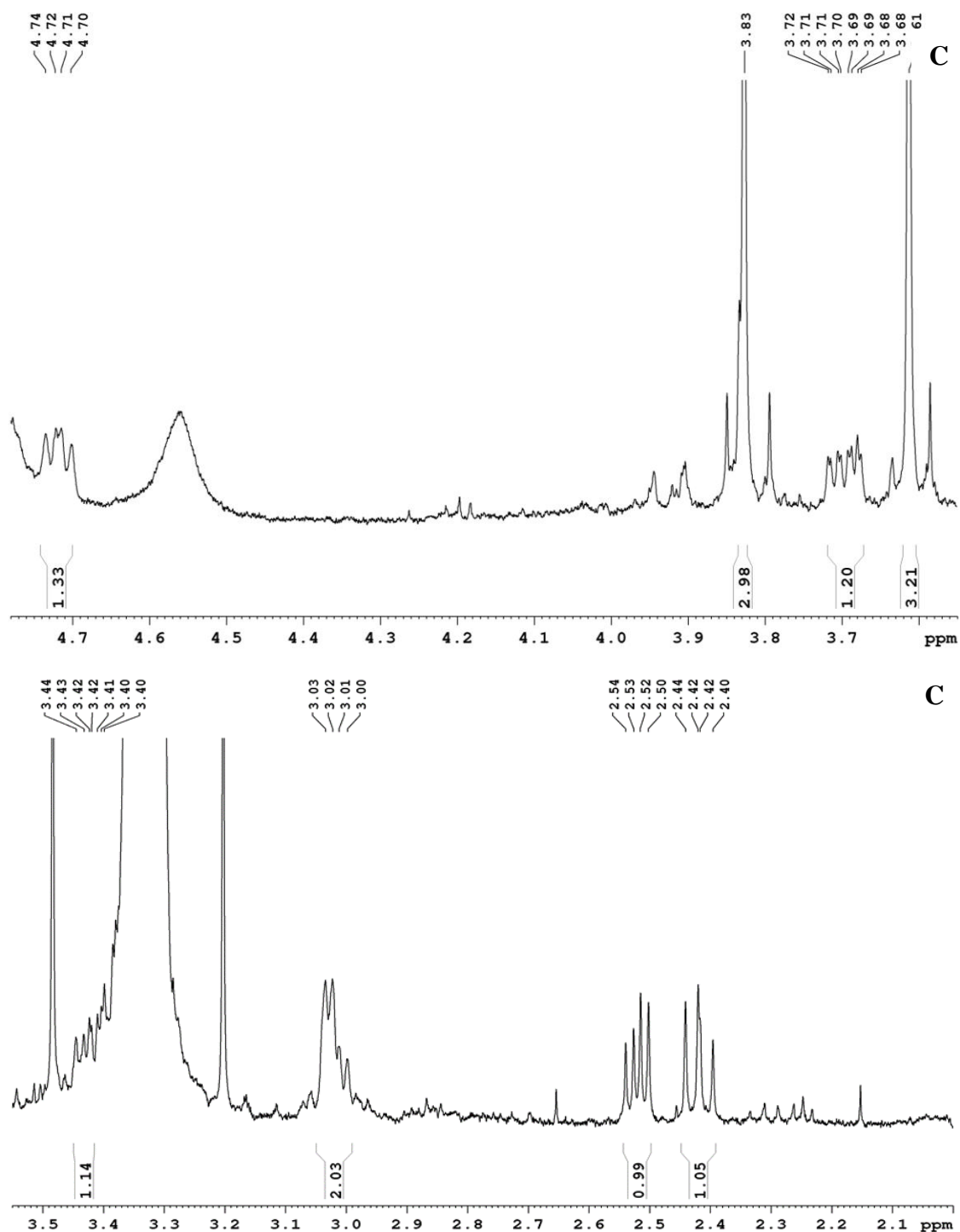
**Figura 30:** Espectro de massas de alta resolução modo *full scan* (A) e MS/MS (B) da amostra APG298.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 31 e Tabela 7) da amostra APG298 apresentou 5 sinais de hidrogênio na região de aromáticos (7,3 – 6,0 ppm). O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,89 (s, 1H; H-3) foi atribuído ao anel A, com características de esqueleto proaporfínico com substituições. Os demais sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,16 (dd; 1H;  $J$ : 10 e 3 Hz; H-8);  $\delta_{\text{H}}$  6,29 (dd; 1H;  $J$ : 10 e 1,9 Hz; H-9);  $\delta_{\text{H}}$  6,41 (dd; 1H;  $J$ : 10 e 1,9 Hz; H-11) e  $\delta_{\text{H}}$  7,02 (dd; 1H;  $J$ : 10 e 3 Hz; H-12) foram atribuídos ao anel D não substituído.

Na região de alifáticos são observados seis sinais de hidrogênio na região de 4,75 – 2,00 ppm: um próton metínico  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (m; 1H; H-6a) e os grupos metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,69 (ddd; 1H;  $J$ : 13; 5,9 e 2,3 Hz; H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  3,44 (m; 1H; H-5),  $\delta_{\text{H}}$  3,00 (m; 2H; H-4),  $\delta_{\text{H}}$  2,52 (dd; 1H;  $J$ : 12 e 6,5 Hz; H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  2,42 (dd; 1H; 12 e 10,5 Hz; H-7) corroborando

com a natureza proaporfínica da substância. Em adição aos dados mencionados, são observados dois simpletos em  $\delta_H$  3,82 (s, 3H; 2-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_H$  3,61 (s, 3H; 1-OCH<sub>3</sub>), caracterizando as metoxilas substituídas no anel A; totalizando 18 sinais de hidrogênio no espectro de <sup>1</sup>H.





**Figura 31:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG298 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).

No mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) foi possível localizar 5 sinais de carbono na região de aromáticos (111 – 154 ppm) e 6 na região de alifáticos (22 – 60 ppm) (Figura 32 e 33; Tabela 7). Os duplo dupletos da região de aromáticos  $\delta_H$  7,16 (H-8),  $\delta_H$  6,29 (H-9),  $\delta_H$  6,41 (H-11) e  $\delta_H$  7,02 (H-12) correlacionaram com os sinais de carbono  $\delta_C$  150,3 (C-8),  $\delta_C$  126,7 (C-9),  $\delta_C$  127,8 (C-11) e  $\delta_C$  153,6 (C-12) evidenciando



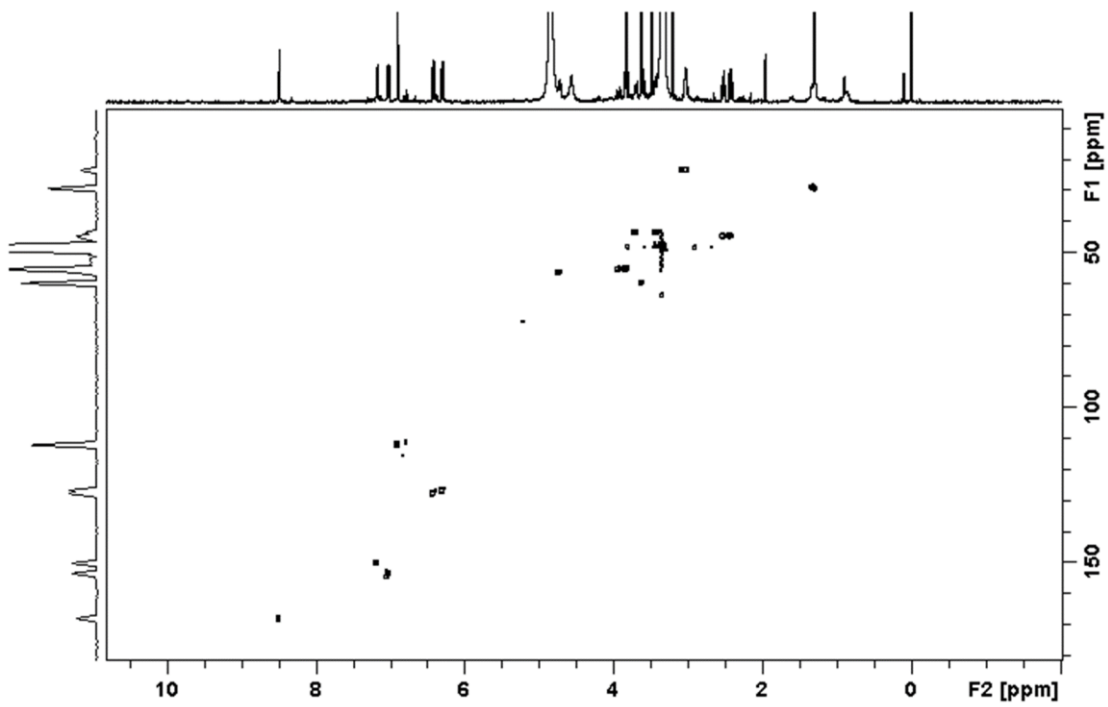
o anel D da estrutura. O simpleto  $\delta_{\text{H}}$  6,89 (H-3) correlacionou com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  112,1 (C-3) atribuído ao anel A.

Na região de alifáticos, as metoxilas  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (s, 3H; 2-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_{\text{H}}$  3,61 (s, 3H; 1-OCH<sub>3</sub>) foram atribuídas aos deslocamentos  $\delta_{\text{C}}$  59,9 (C-1-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_{\text{C}}$  55,4 (C-2-OCH<sub>3</sub>), substituintes do anel A. Além do mais, o multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,00 (H-4) foi atribuído ao deslocamento  $\delta_{\text{C}}$  23,5 (C-4), enquanto  $\delta_{\text{H}}$  3,69 (H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  3,44 (H-5) foram atribuídos para  $\delta_{\text{C}}$  43,7 (C-5), ambos no anel B. O multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (H-6a) foi atribuído ao sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  56,5 (C-6a), e os duplo dupletos  $\delta_{\text{H}}$  2,42 (H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  2,52 (H-7) foram atribuídos ao deslocamento  $\delta_{\text{C}}$  44,9 (C-7), o que estaria de acordo com a presença do anel C do esqueleto proaporfínico.

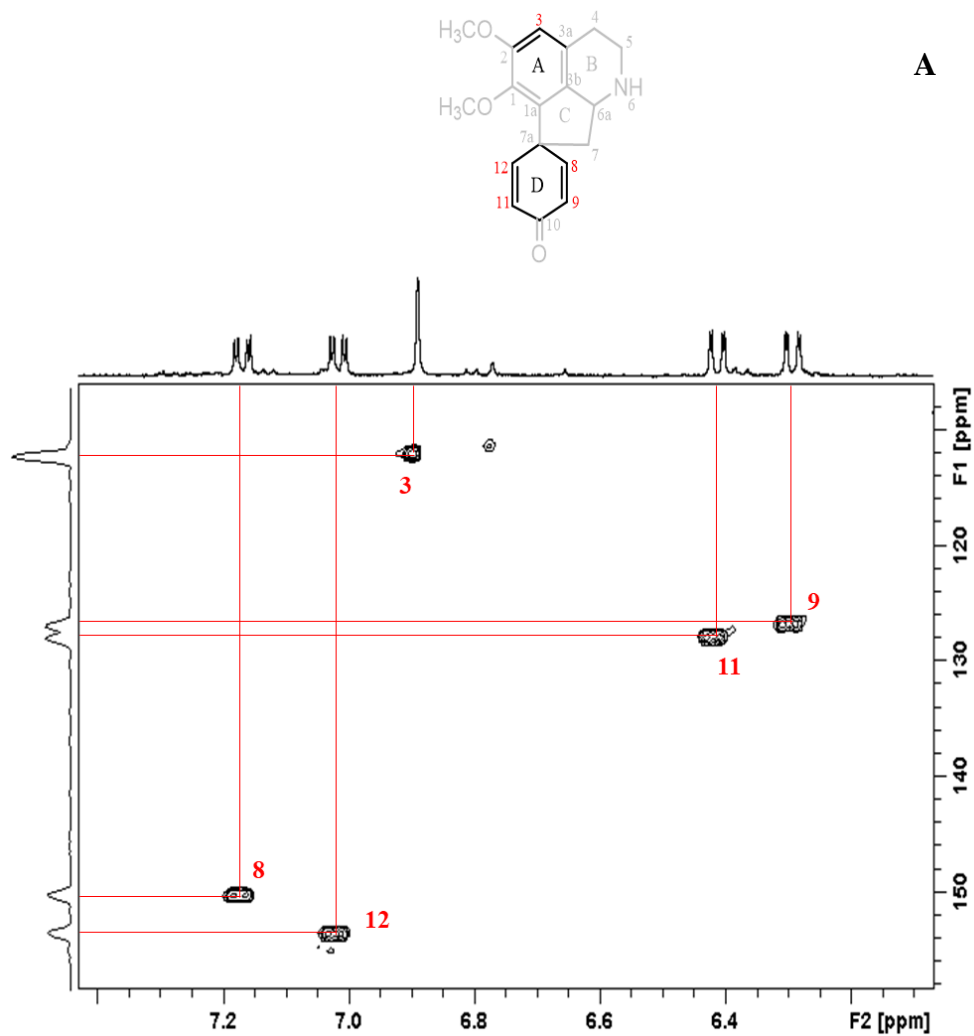
O mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 34 e 35; Tabela 7) mostrou as principais correlações à longa distância dos H-C ( $J^2$  e  $J^3$ ) destacando a identificação de 5 sinais de carbono quaternário na estrutura. As principais correlações em  $J^3$  dos anéis aromáticos foram atribuídas para os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,16 (H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  7,02 (H-12) com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  186,5 (C-10) no anel D. Além disso,  $\delta_{\text{H}}$  6,29 (H-9) e  $\delta_{\text{H}}$  6,41 (H-11) correlacionam com  $\delta_{\text{C}}$  50,7 (C-7a), confirmando a presença de outro carbono quaternário no anel D. Ainda em  $J^3$ , o próton  $\delta_{\text{H}}$  6,89 (H-3) correlaciona com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  144,6 (C-1),  $\delta_{\text{C}}$  129,3 (C-3b) e  $\delta_{\text{C}}$  23,5 (C-4).

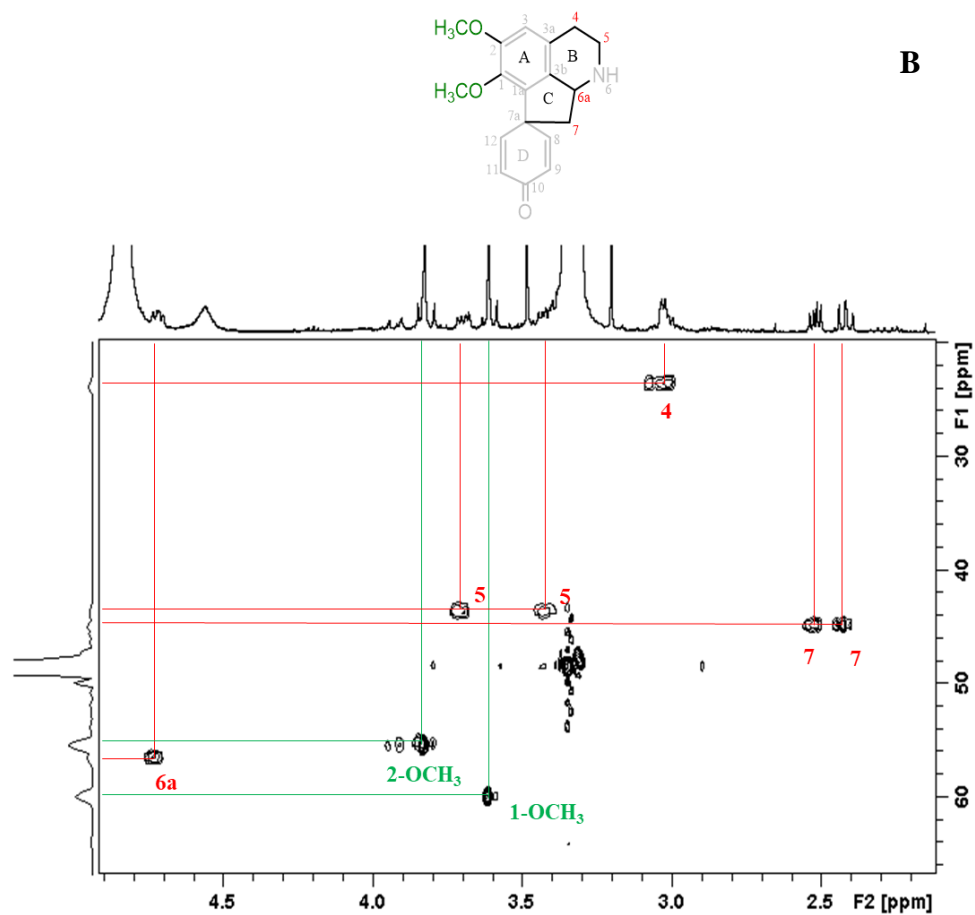
Confirmando a estrutura do anel C, foram localizadas as correlações  $\delta_{\text{H}}$  2,42 (H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  2,52 (H-7) com  $\delta_{\text{C}}$  133,8 (C-1a) e  $\delta_{\text{C}}$  129,3 (C-3b), ambos carbonos quaternários presentes na estrutura. Em adição, estes sinais de hidrogênio citados também correlacionaram com  $\delta_{\text{C}}$  150,3 (C-8) e  $\delta_{\text{C}}$  153,6 (C-12) do anel D.

As metoxilas  $\delta_{\text{H}}$  3,61 (1-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (2-OCH<sub>3</sub>) correlacionam em  $J^2$  com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  144,6 (C-1) e  $\delta_{\text{C}}$  154,7 (C-2), respectivamente, confirmando a substituição no anel A.

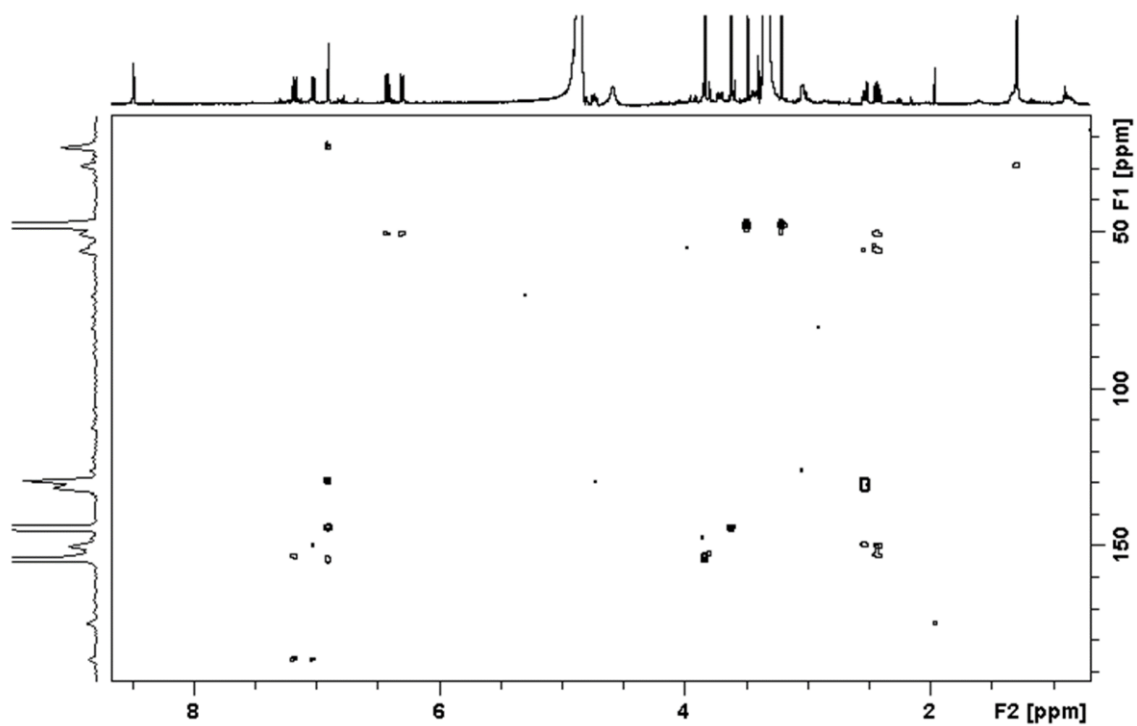


**Figura 32:** Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG298.

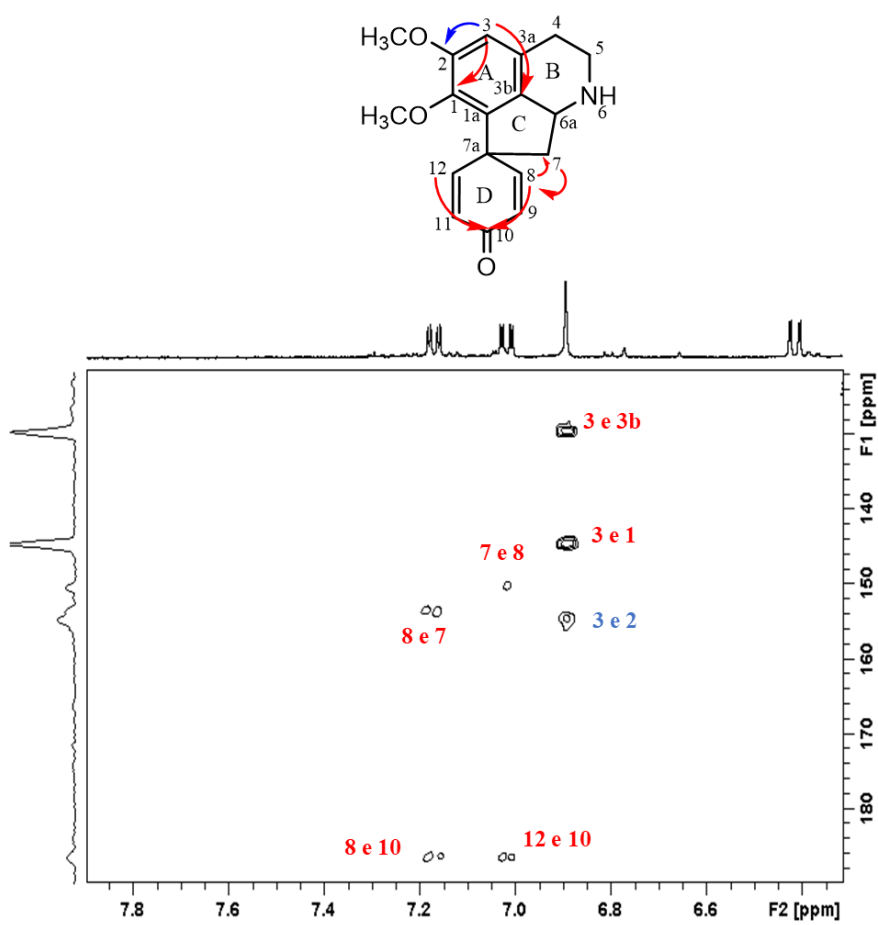
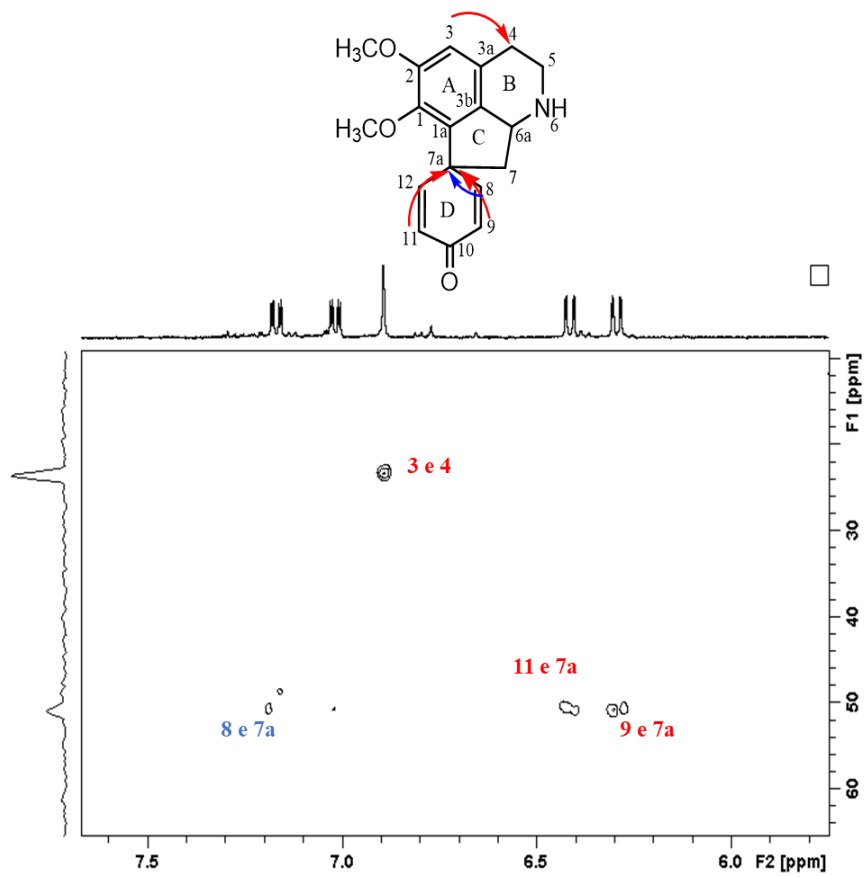


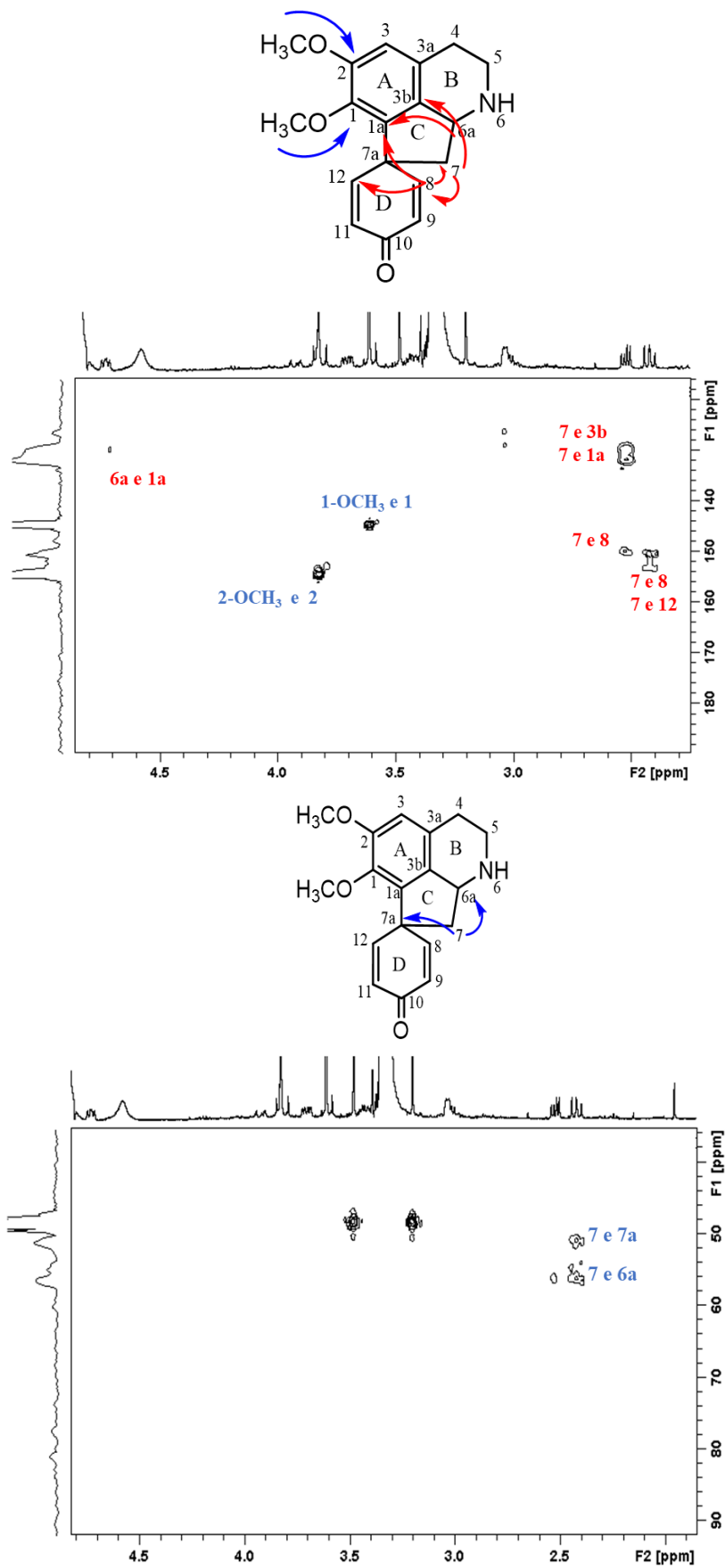


**Figura 33:** Ampliação das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG298.



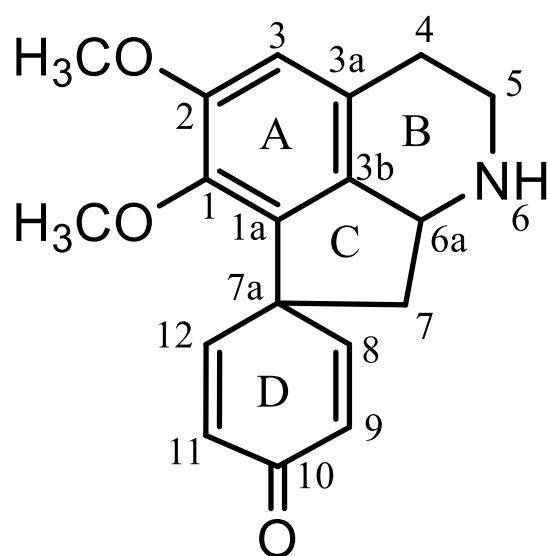
**Figura 34:** Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG298.





**Figura 35:** Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG298: azul ( $J^2$ ) e vermelho ( $J^3$ ).

De acordo com os espectros de 1D e 2D, juntamente com as análises de espectrometria de massas foi possível confirmar a estrutura da estefarina (Figura 36). O alcaloide identificado é um dos mais representativos do tipo proaporfínico dentro da família *Menispermaceae*, previamente reportado nos gêneros: *Stephania*, *Sciadotenia* e *Abuta* (CAVA *et al.*, 1968; DAMAS *et al.*, 1985; DUTÉ *et al.*, 1987; GORPENCHENKO *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2018).



**Figura 36:** Estrutura do alcaloide estefarina.

**Tabela 7:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra APG298.

Amostra APG298 (estefarina)				
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; J Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; J Hz) <sup>b</sup>	$\delta_{\text{C}}$ HSQC <sup>a,c</sup>	HMBC <sup>a</sup>
1	-	-	144,6	-
1-OCH <sub>3</sub>	3,61 (3H; s)	3,60 (3H; s)	59,9	144,6
1a	-	-	133,8	-
2	-	-	154,7	-
2-OCH <sub>3</sub>	3,82 (3H; s)	3,81 (3H; s)	55,4	154,7
3	6,89 (1H; s)	6,66 (1H; s)	112,1	23,5; 129,3; 144,6; 154,7
3a	-	-	131,5	-
3b	-	-	129,3	-
4	3,00 (2H; m)	2,79 (2H; m)	23,5	-
5	3,44 (1H; m) 3,69 (1H; ddd; 13; 5,9 e 2,3 Hz)	3,14 (1H; ddd; 12,7; 10,3 e 6,6 Hz) 3,44 (1H; ddd; 12,7; 6,6 e 2,3 Hz)	43,7	-
6-NH	1,95 (s)	-	-	-
6a	4,72 (1H; m)	4,30 (1H; dd; 10,8 e 6,3 Hz)	56,5	133,8
7	2,42 (1H; dd; 12 e 10,5 Hz) 2,52 (1H; dd; 12 e 6,5 Hz)	2,21 (1H; dd; 12,1 e 10,8 Hz) 2,41 (1H; m; 12,1 e 6,3 Hz)	44,9	50,7; 56,5; 129,3; 133,8; 150,3; 153,6
7a	-	-	50,7	-
8	7,16 (1H; dd; 10 e 3 Hz)	7,06 (1H; dd; 10 e 2,9 Hz)	150,3	44,9; 50,7; 186,5
9	6,29 (1H; dd; 10 e 1,9 Hz)	6,30 (1H; dd; 10 e 1,9 Hz)	126,7	50,7
10	-	-	186,5	-
11	6,41 (1H; dd; 10 e 1,9 Hz)	6,42 (1H; dd; 10 e 1,9 Hz)	127,8	50,7
12	7,02 (1H; dd; 10 e 3 Hz)	6,93 (1H; dd; 10 e 2,9 Hz)	153,6	186,5

<sup>a</sup> O experimento foi realizado em CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz para  $^1\text{H}$ .

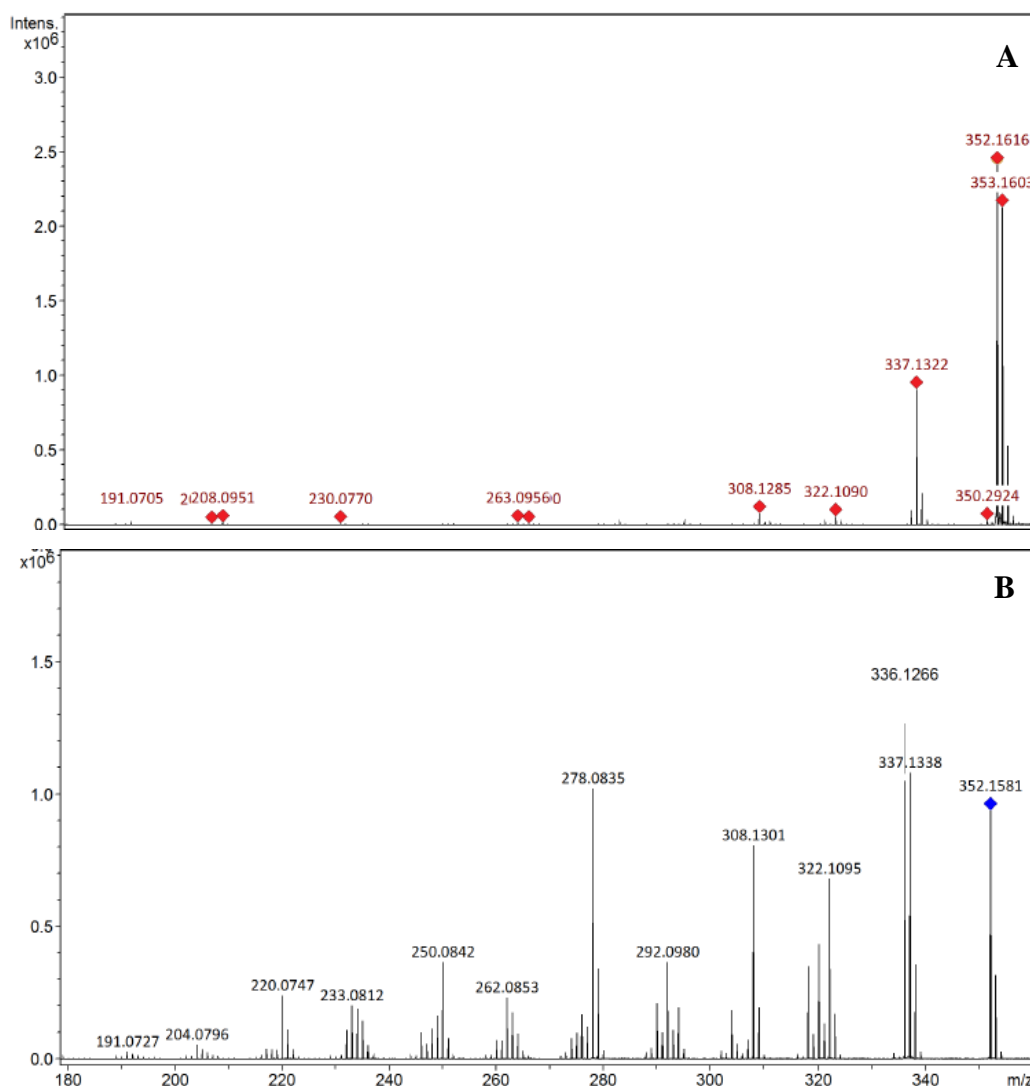
<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Costa *et al.*, (2015) (CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

<sup>c</sup> Carbonos foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

### 5.3.3. Determinação estrutural da amostra APG352

A amostra APG352 (8,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo. No espectro de massas modo *full scan* (Figura 37a) foi observado um pico base em  $m/z$  352  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , e o espectro de fragmentação MS/MS (Figura 37b) apresentou uma perda principal de 16 u ( $m/z$  352  $\rightarrow$  336)  $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}]^+$  característico do esqueleto de alcaloides protoberberínicos (SHIM *et al.*, 2013; DEEVANHXAY *et al.*, 2009). Dados

de espectrometria de massas de alta resolução  $[M+H]^+$ :  $m/z$  352,1616; fórmula molecular:  $C_{14}H_{26}NO_9$ ; calculado:  $m/z$  352,1602;  $\Delta_{m/z}$  teórico = - 3,9 ppm.

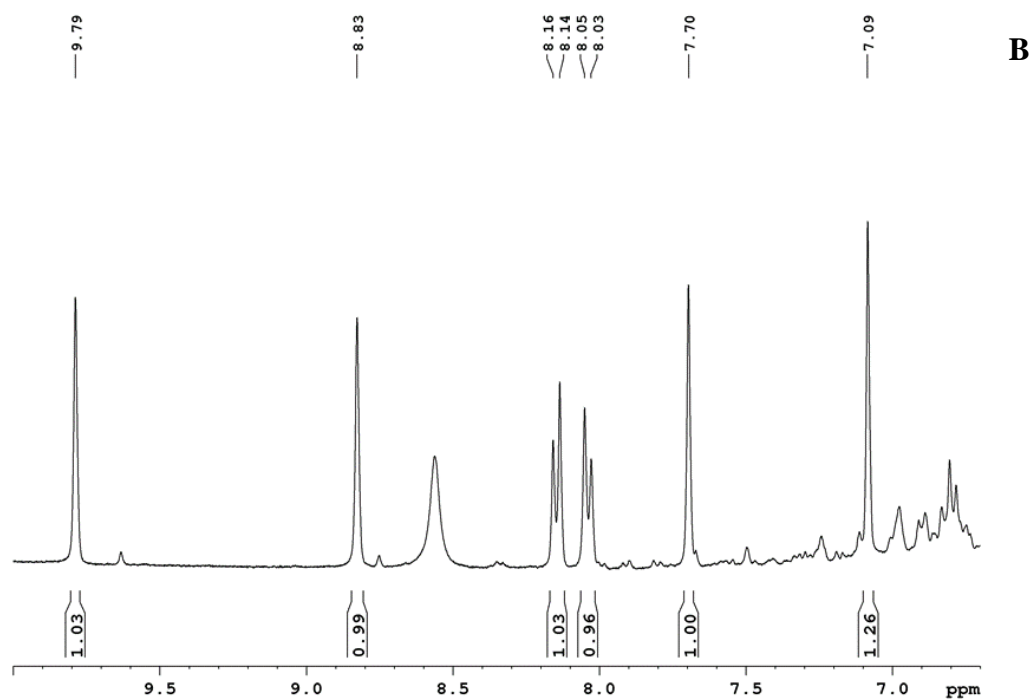
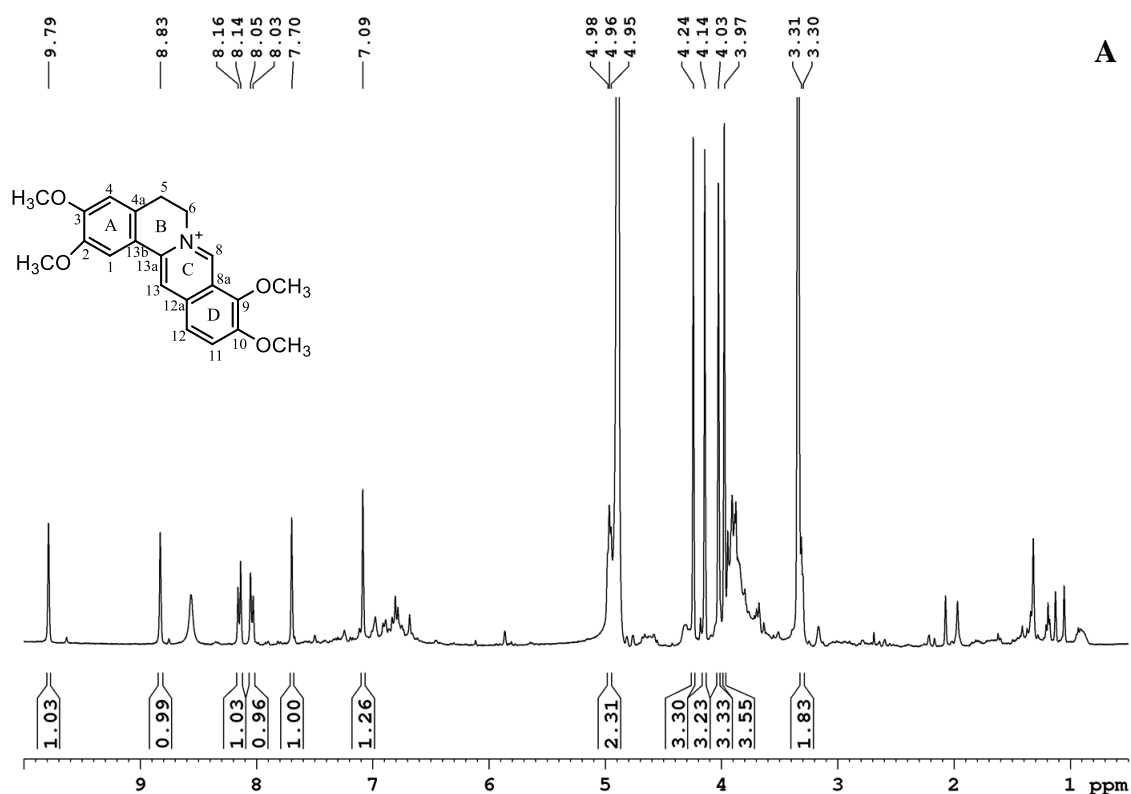


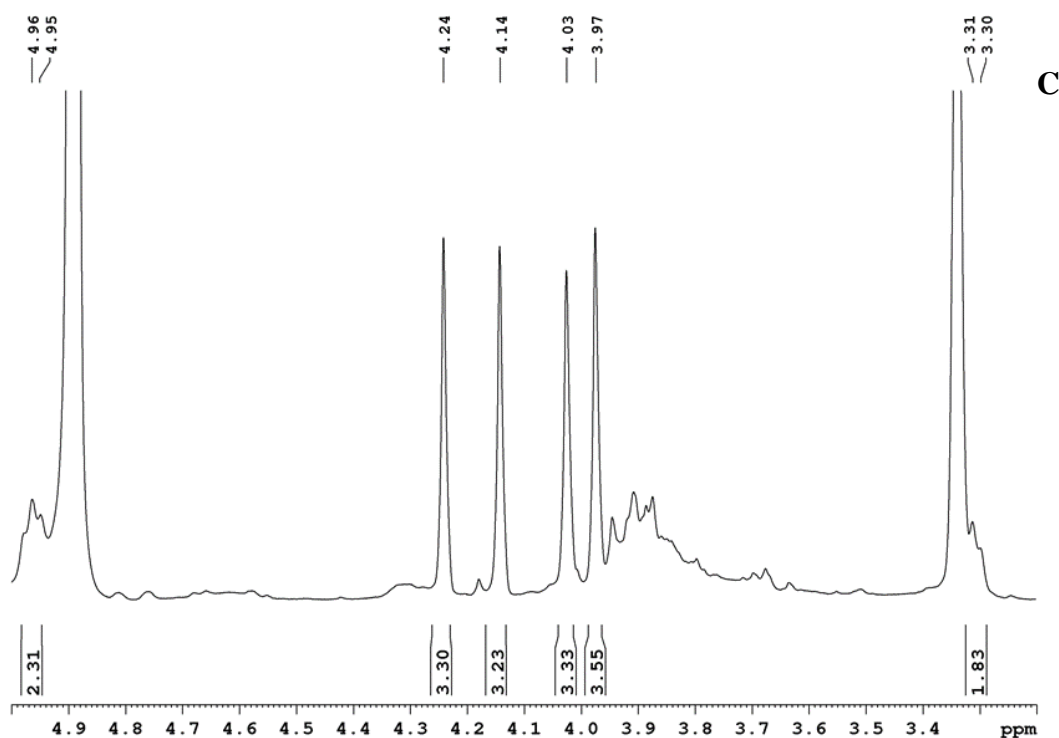
**Figura 37:** Espectro de massas de alta resolução modo *full scan* (A) e MS/MS (B) da amostra APG352.

O espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figura 38 e Tabela 8) da amostra APG352 apresentou 6 sinais de hidrogênio na região de aromáticos (10,00 – 7,00 ppm). Os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  7,69 (s; 1H; H-4) e  $\delta_H$  7,08 (s; 1H; H-1) foram atribuídos ao anel A em posição *para*, característico do anel aromático tetrassubstituído. Outros sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  9,79 (s; 1H; H-8) e  $\delta_H$  8,82 (s; 1H; H-13) também em posição *para* foram atribuídos no anel C. Enquanto no anel D foram atribuídos sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  8,14 (d; 1H;  $J$ : 9,3 Hz; H-11) e  $\delta_H$  8,04 (d; 1H;  $J$ : 8,8 Hz; H-12) em posição *orto* característico do esqueleto protoberberínico.



Na região de alifáticos são observados 6 sinais de hidrogênio na região de 5,00 – 3,00 ppm. Dois grupos metilênicos foram identificados no espectro em  $\delta_H$  3,30 (m; 2H; H-5) e  $\delta_H$  4,96 (m; 2H; H-6), sendo este último deslocamento característico de metilênico próximo de amina quaternária. Os demais sinais de hidrogênio foram identificados como metoxilas:  $\delta_H$  4,24 (s; 3H; 9-OCH<sub>3</sub>),  $\delta_H$  4,14 (s; 3H; 10-OCH<sub>3</sub>),  $\delta_H$  4,02 (s; 3H; 2-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_H$  3,97 (s; 3H; 3-OCH<sub>3</sub>) totalizando 22 sinais de hidrogênio no espectro de <sup>1</sup>H.





**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG352 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).

No mapa de contorno de HSQC (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) foi possível localizar 6 sinais de carbono na região de aromáticos (111 – 147 ppm) e 6 na região de alifáticos (28 – 64 ppm) (Figura 39 e 40; Tabela 8). Os simpletos da região de aromáticos  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (H-1),  $\delta_{\text{H}}$  7,69 (H-4),  $\delta_{\text{H}}$  9,79 (H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  8,82 (H-13) correlacionaram com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  110,6 (C-1),  $\delta_{\text{C}}$  112,8 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  146,9 (C-8) e  $\delta_{\text{C}}$  121,8 (C-13), respectivamente, todos em posição *para* nos anéis A e C da estrutura. Os dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  8,14 (H-11) e  $\delta_{\text{H}}$  8,04 (H-12) correlacionaram com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  128,7 (C-11) e  $\delta_{\text{C}}$  125,1 (C-12) em posição *orto*, atribuídos ao anel D.

Na região de alifáticos o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,30 (H-5) correlacionou com o deslocamento  $\delta_{\text{C}}$  29,1 (C-5) e o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,96 (H-6) com  $\delta_{\text{C}}$  58,5 (C-6), ambos no anel B, evidenciando o esqueleto berberínico. Os deslocamentos  $\delta_{\text{C}}$  63,2 (C-9-OCH<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$  58,5 (C-10-OCH<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$  57,7 (C-2-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_{\text{C}}$  57,2 (C-3-OCH<sub>3</sub>) foram atribuídos as quatro metoxilas identificadas anteriormente.

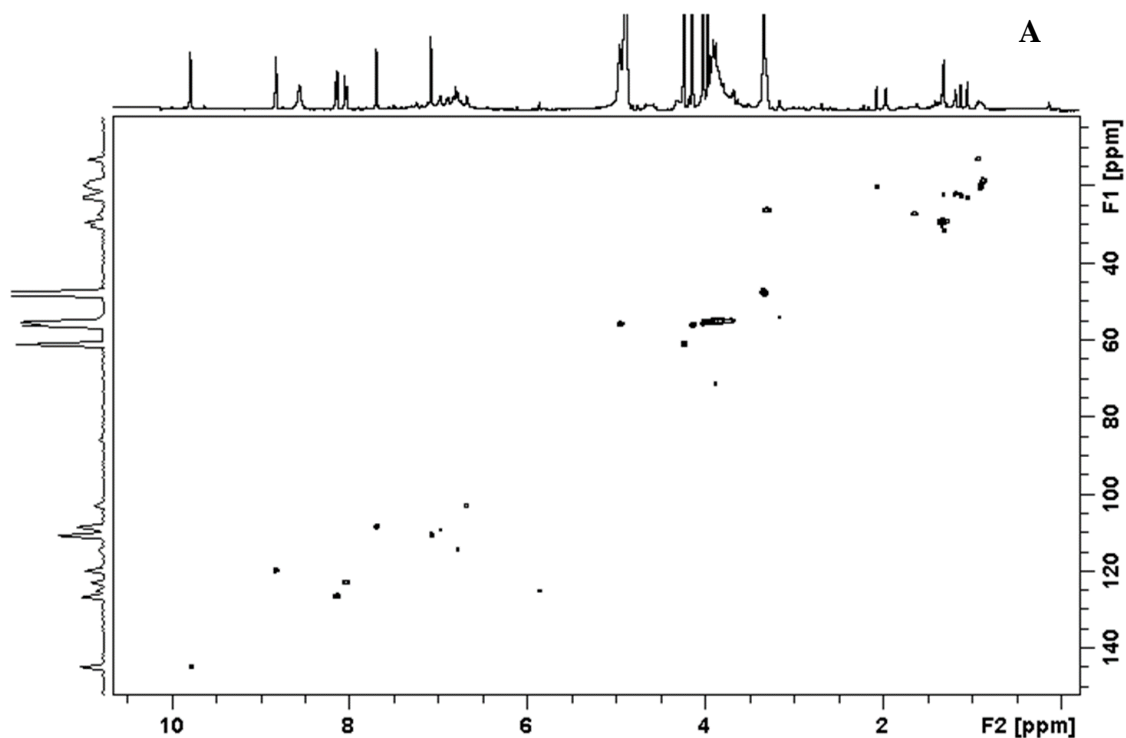
O mapa de contorno de HMBC (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figuras 41 e 42; Tabela 8) mostrou as principais correlações à longa distância dos H-C ( $J^2$ ,  $J^3$  e  $J^4$ ) destacando a identificação de 9 sinais de carbono quaternário na estrutura. As principais correlações em  $J^3$  dos anéis A e B foram atribuídas para os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (H-1)

correlacionado com  $\delta_C$  121,9 (C-4a), bem como  $\delta_H$  7,69 (H-4) e  $\delta_H$  3,30 (H-5) com  $\delta_C$  131,5 (C-13b), determinando a posição dos carbonos quaternários dessa porção da estrutura.

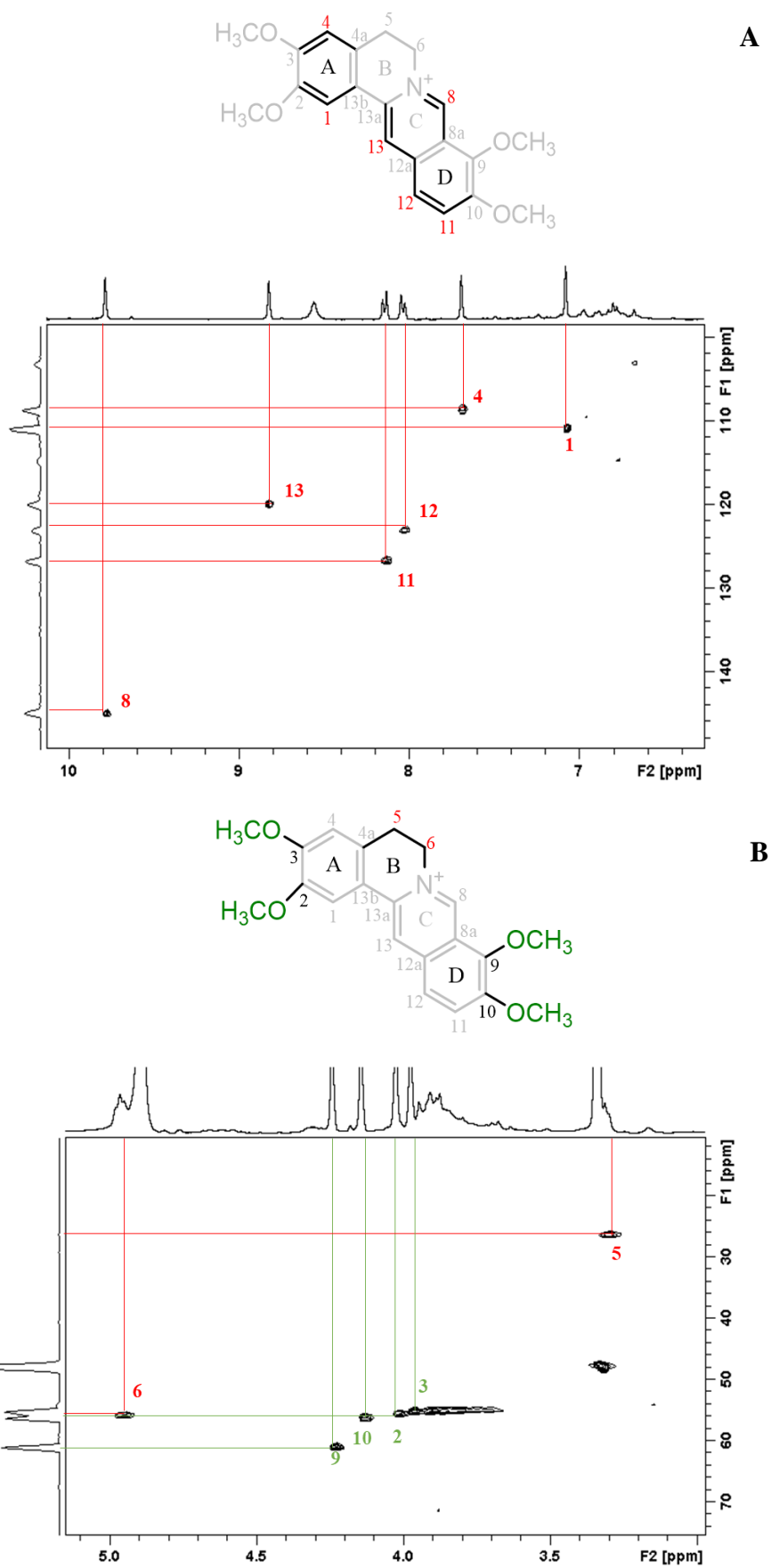
Uma evidência forte do anel C está relacionada aos deslocamentos  $\delta_H$  9,79 (H-8) e  $\delta_H$  8,82 (H-13) correlacionados à longa distância com o  $\delta_C$  141,2 (C-13a), como também foi observado a correlação de  $\delta_H$  4,96 (H-6) com o  $\delta_C$  141,2 (C-13a). As principais correlações à longa distância no anel D ocorreram para  $\delta_H$  8,14 (H-11) com  $\delta_C$  136,6 (C-8a), como também foi observado para  $\delta_H$  8,04 (H-12) com  $\delta_C$  122,7 (C-12a).

As principais correlações para os metilênicos foram identificadas no espectro em  $\delta_H$  3,30 (H-5) com o  $\delta_C$  58,5 (C-6), assim como foram mostradas as correlações de  $\delta_H$  9,79 (H-8) com o  $\delta_C$  58,5 (C-6) e  $\delta_H$  7,69 (H-4) com o  $\delta_C$  29,1 (C-5).

As posições exatas das metoxilas ficaram por conta das correlações em  $J^2$  de  $\delta_H$  4,02 (2-OCH<sub>3</sub>) com  $\delta_C$  152,2 (C-2) e  $\delta_H$  3,97 (3-OCH<sub>3</sub>) com  $\delta_C$  155,1 (C-3), ambos no anel A, assim como as metoxilas  $\delta_H$  4,24 (9-OCH<sub>3</sub>) com  $\delta_C$  147,1 (C-9) e  $\delta_H$  4,14 (10-OCH<sub>3</sub>) com  $\delta_C$  153,3 (C-10) localizadas no anel D. As demais correlações à longa distância são destacadas na Figura 39.



**Figura 39:** Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG352.



**Figura 40:** Ampliação das regiões de aromáticos (**A**) e alifáticos (**B**) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG352.

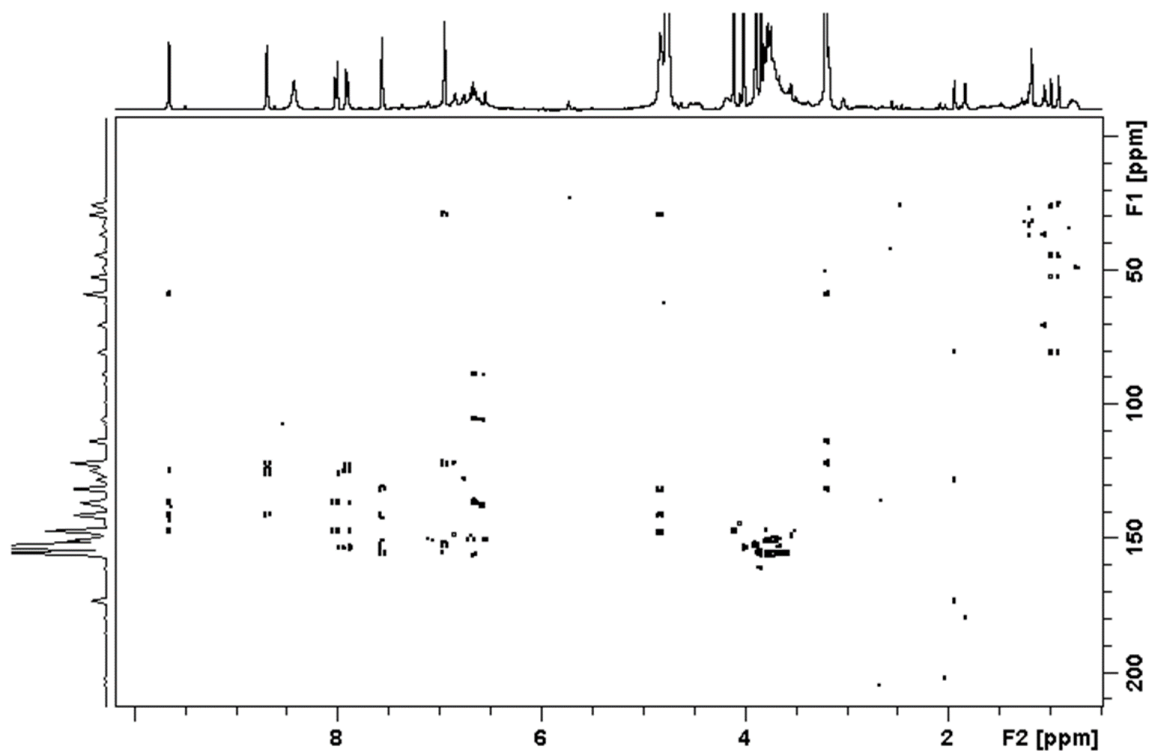
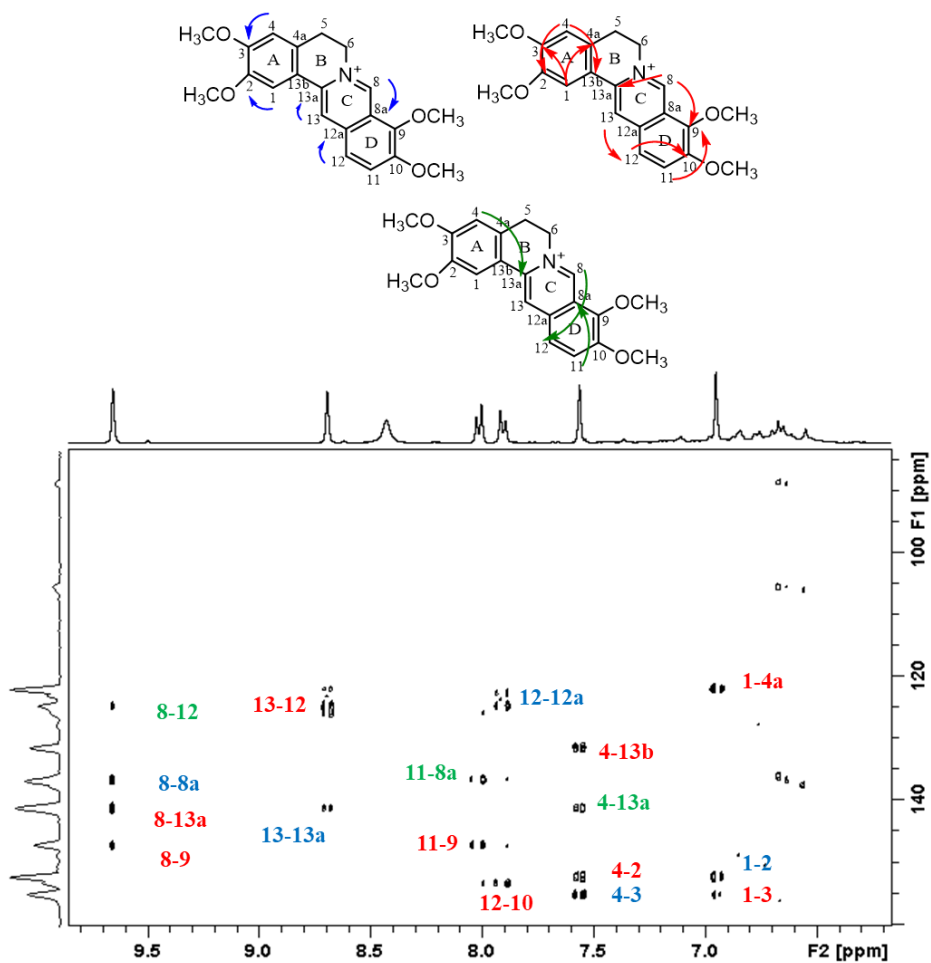
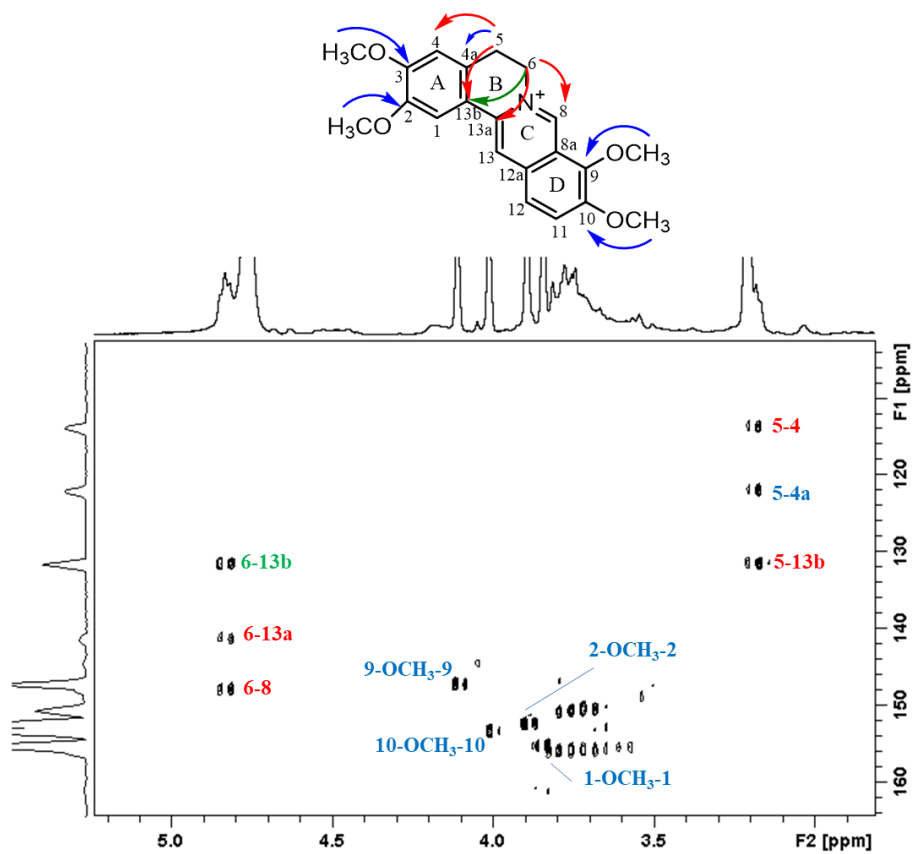
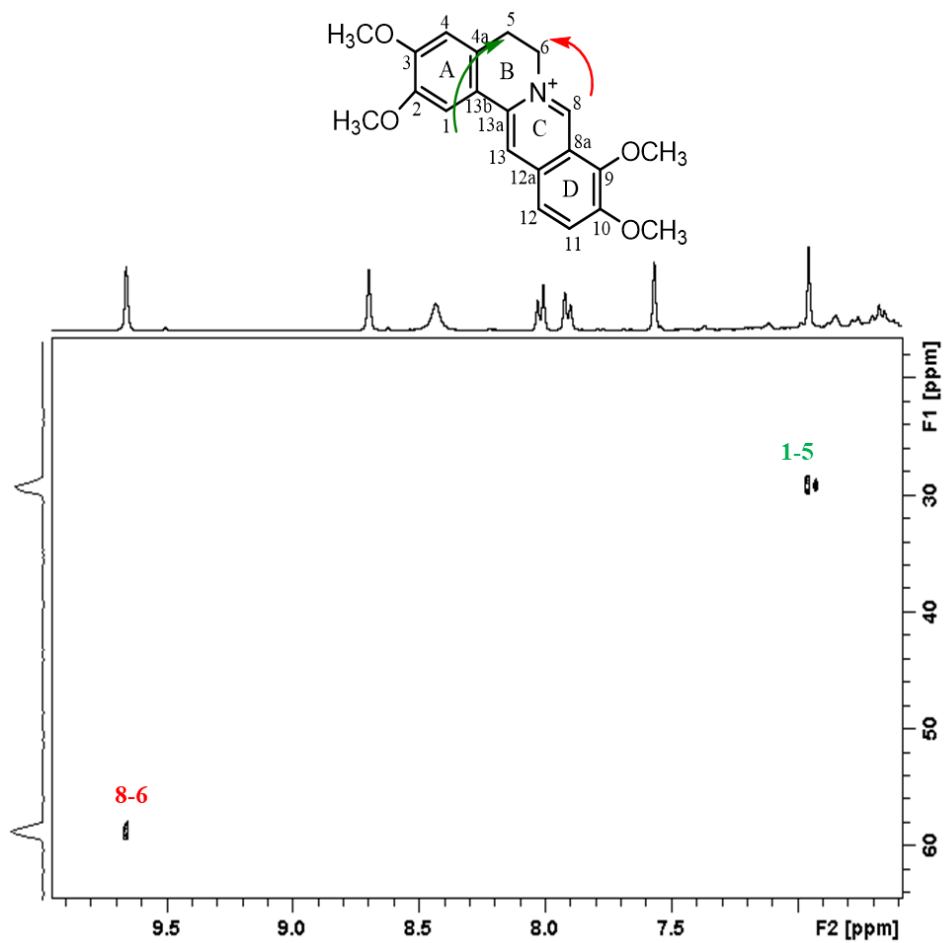
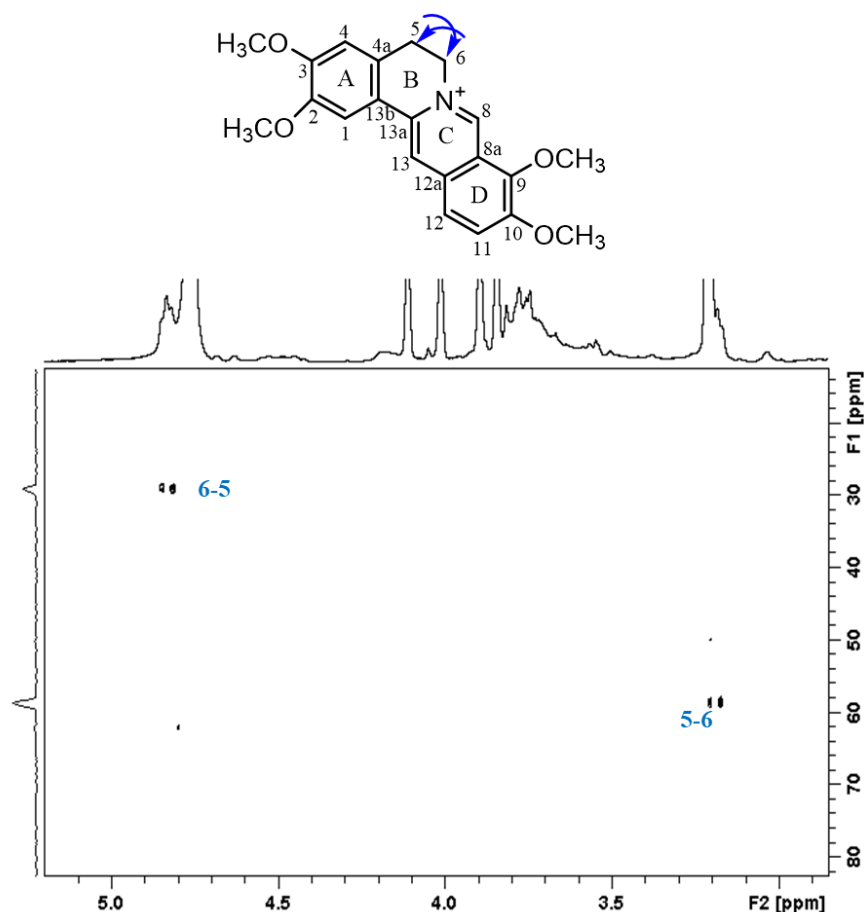


Figura 41: Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG352.

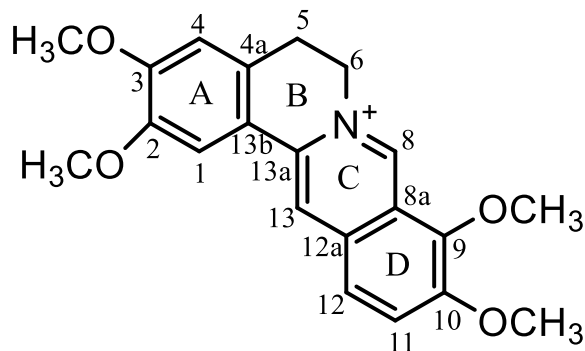






**Figura 42:** Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG352: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ).

De acordo com a análise dos espectros de correlação juntamente com as análises de espectrometria de massas foi possível determinar a estrutura da palmatina (Figura 43), pertencente aos protoberberínicos. O alcaloide identificado é bastante recorrente na família *Menispermaceae* principalmente nos gêneros *Stephania*, *Tinospora*, *Coscinium*, *Arcangelisia* e *Abuta* (CHANG *et al.*, 1984; HOCQUEMILLER e CAVE, 1984; THUY *et al.*, 2005; DEEVANHXAY *et al.*, 2009; HENRIQUE, 2012; YU *et al.*, 2014; SEMWAL e SEMWAL, 2015; BAJPAI *et al.*, 2016; SHANGGUAN *et al.*, 2018).



**Figura 43:** Estrutura do alcaloide palmatina.

**Tabela 8:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra APG352.

Amostra APG352 (palmatina)				
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ Hz) <sup>b</sup>	$\delta_{\text{C}}$ HSQC <sup>a,c</sup>	HMBC <sup>a</sup>
1	7,08 (1H; s)	7,64 (1H; s)	110,6	29,1; 121,9; 152,2; 155,1
2	-	-	152,2	-
2-OCH <sub>3</sub>	4,02 (3H; s)	3,98 (3H; s)	57,7	152,2
3	-	-	155,1	-
3-OCH <sub>3</sub>	3,97 (3H; s)	3,93 (3H; s)	57,2	155,1
4	7,69 (1H; s)	7,03 (1H; s)	112,8	131,5; 141,2; 152,2; 155,1
4a	-	-	121,9	-
5	3,30 (2H; m)	3,28 (2H; t; 6,3 Hz)	29,1	58,5; 110,6; 112,8; 121,9; 131,5
6	4,96 (2H; m)	4,93 (2H; t; 6,3 Hz)	58,5	29,1; 131,5; 141,2; 146,9
7	-	-	-	-
8	9,79 (1H; s)	9,75 (1H; s)	146,9	58,5; 141,2; 125,1; 136,6; 147,1
8a	-	-	136,6	-
9	-	-	147,1	-
9-OCH <sub>3</sub>	4,24 (3H; s)	4,20 (3H; s)	63,2	147,1
10	-	-	153,3	-
10-OCH <sub>3</sub>	4,14 (3H; s)	4,09 (3H; s)	58,5	153,3
11	8,14 (1H; d; 9,3 Hz)	8,09 (1H; d; 9,1 Hz)	128,7	125,1; 136,6; 147,1; 153,3
12	8,04 (1H; d; 8,8 Hz)	8,01 (1H; d; 9,1 Hz)	125,1	122,7; 136,6; 147,1; 153,3
12a	-	-	122,7	-
13	8,82 (1H; s)	8,79 (1H; s)	121,8	125,1; 141,2
13a	-	-	141,2	-
13b	-	-	131,5	-

<sup>a</sup> O experimento foi realizado em CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz para  $^1\text{H}$ .

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Costa *et. al.*, (2009) (CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

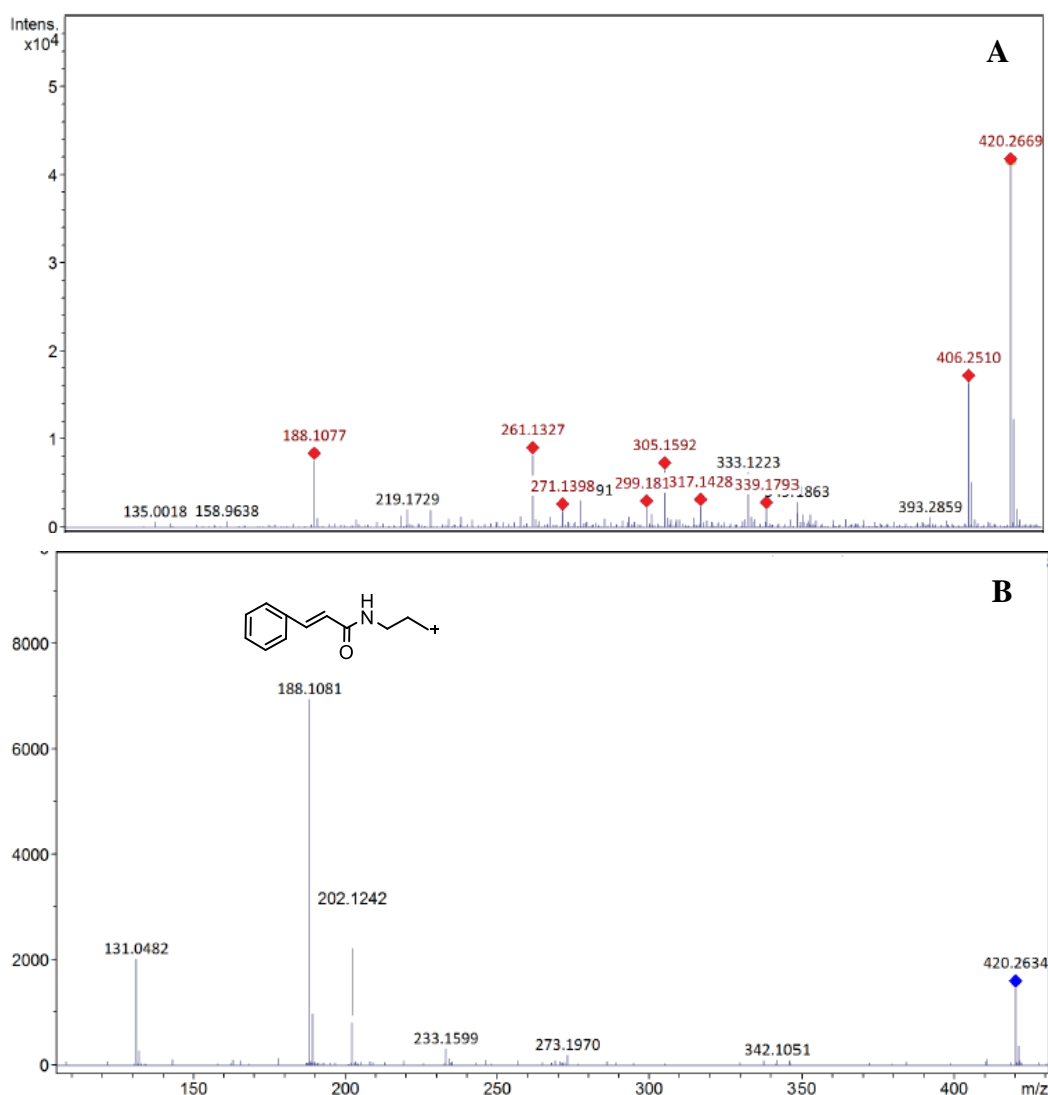
<sup>c</sup> Carbonos foram assinalados de acordo com os dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

#### 5.3.4. Determinação estrutural da amostra APG420

A amostra APG420 (11,2 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo claro. No espectro de massas modo *full scan* (Figura 44a) foi observado um pico base em  $m/z$  420  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e o espectro de fragmentação MS/MS (Figura 44b) mostrou perdas principais de 232 u ( $m/z$  420 $\rightarrow$ 188) e 57 u ( $m/z$  181 $\rightarrow$ 131), fragmentos típicos de

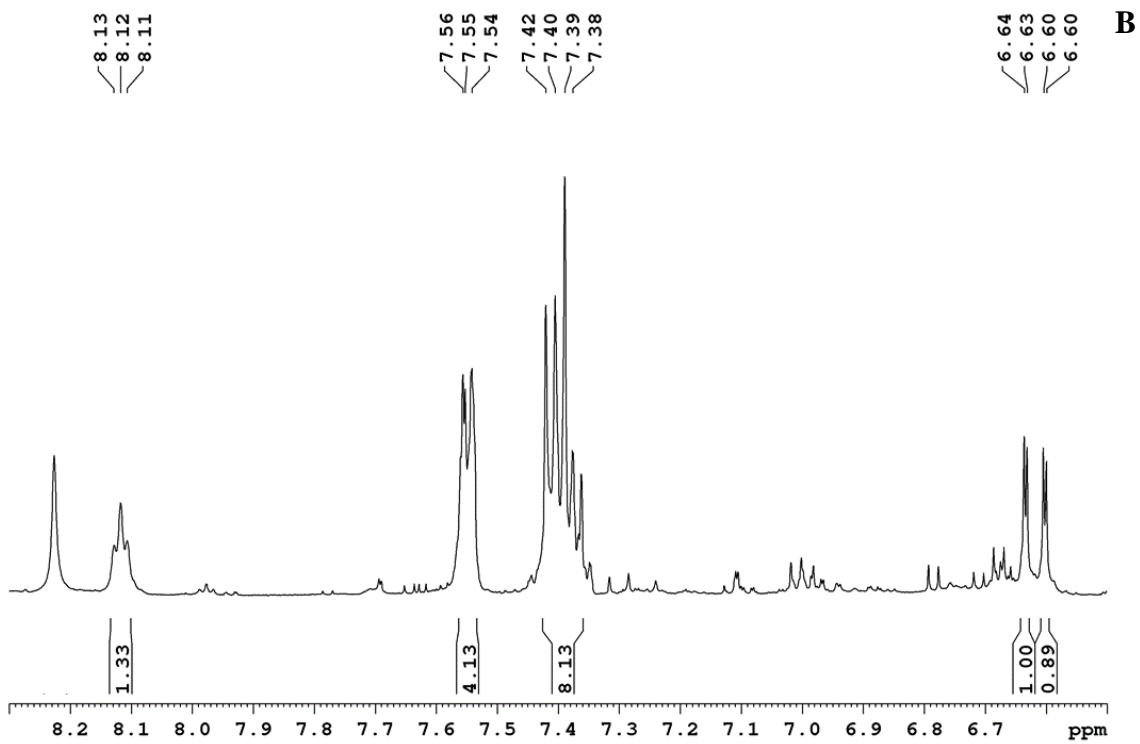
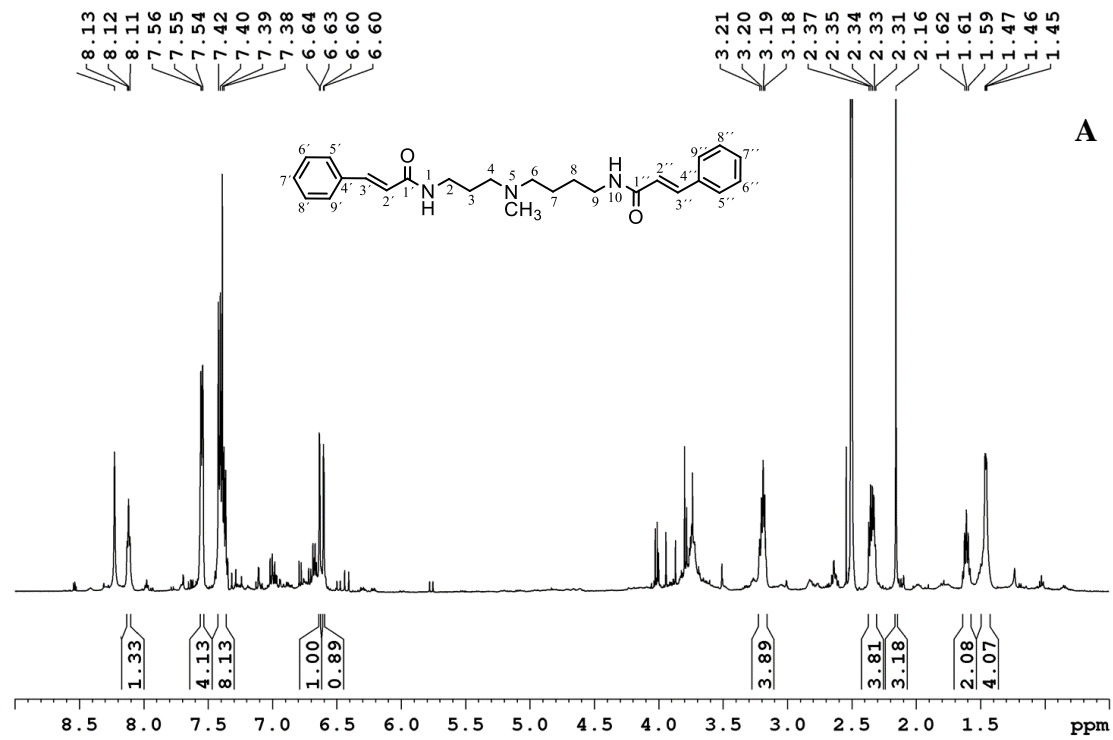


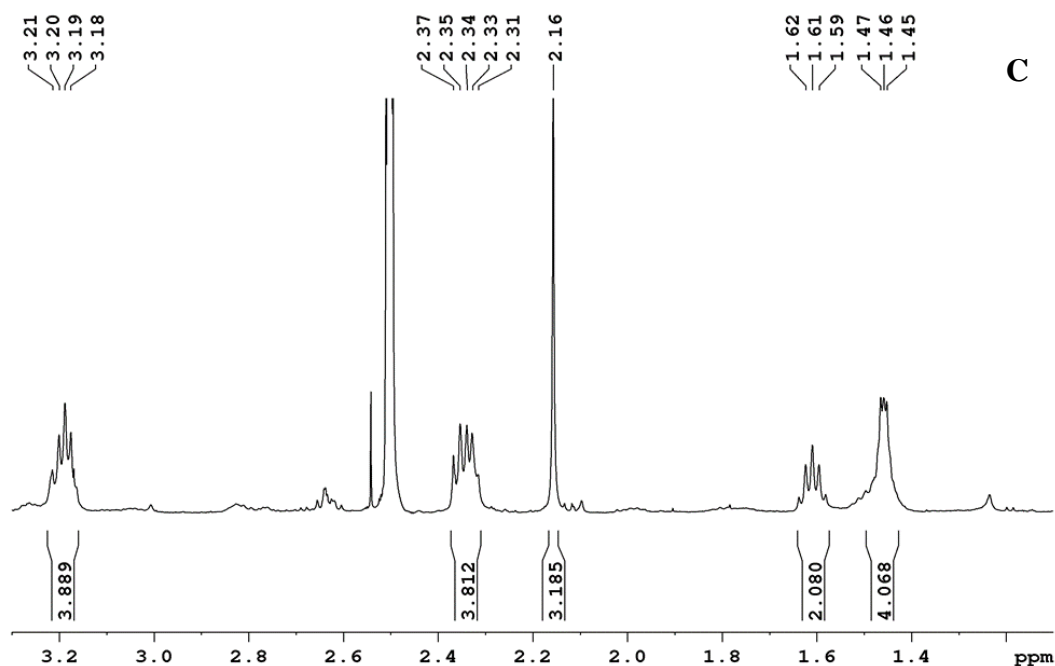
amidas derivadas de ácido cinâmico (CLERICUZIO *et al.*, 2007; SCHLITTLER *et al.*, 1973). Dados de espectrometria de massas de alta resolução  $[M+H]^+$ :  $m/z$  420,2669; fórmula molecular:  $C_{26}H_{34}N_3O_2$ ; calculado:  $m/z$  420,2646;  $\Delta_{m/z}$  teórico = - 5,6 ppm.



**Figura 44:** Espectro de massas de alta resolução modo *full scan* (A) e MS/MS (B) da amostra APG420.

O espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 45 e Tabela 9) da amostra APG420 apresentou dois multipletos sobrepostos na região de aromáticos (7,6 – 7,0 ppm) caracterizados por sinais de anel aromático não substituído em  $\delta_H$  7,42 – 7,38 (m; 8H; H-3''; H-3'; H-7' e H-7'') e  $\delta_H$  7,56-7,54 (m; 4H; H-5'; H-5''; H-6'; H-6''; H-8'; H-8''; H-9'; H-9''), bem como hidrogênios metínicos em  $\delta_H$  6,60 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-2' ou H-2'') e  $\delta_H$  6,63 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-2'' ou H-2') em posição *trans* devido aos valores de  $J$ . A presença do grupo amida foi confirmada pelo sinal  $\delta_H$  8,12 (-NH). Na região de alifáticos (3,20 – 1,45 ppm) foram detectados 5 sinais de hidrogênio.





**Figura 45:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) da amostra APG420 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).

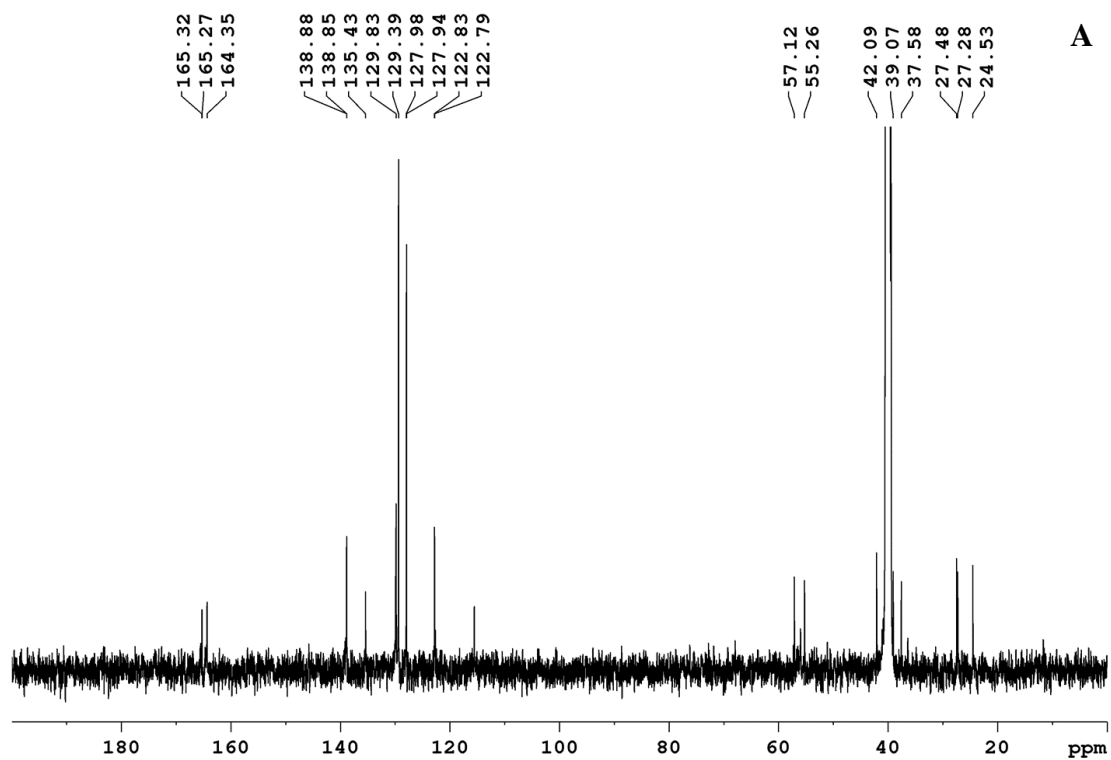
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 46a e Tabela 9) da amostra APG420 apresentou 12 sinais de carbono na região de aromáticos (166 – 120 ppm) incluindo carbonos quaternários, enquanto na região de alifáticos foram identificados 8 sinais de carbono. Ainda na região de alifáticos, foram confirmados por meio de DEPT-135° (Figura 46b) a presença de uma metila ( $\delta_{\text{C}}$  42,09) e sete sinais de carbono metilênico ( $\delta_{\text{C}}$  24 - 55) bem definidos. Além disso, observa-se apenas a presença de 9 sinais de carbono na região acima de 120 ppm, isto implica dizer que os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  165,32;  $\delta_{\text{C}}$  165,27 e  $\delta_{\text{C}}$  135,43 observados no espectro de  $^{13}\text{C}$  são quaternários.

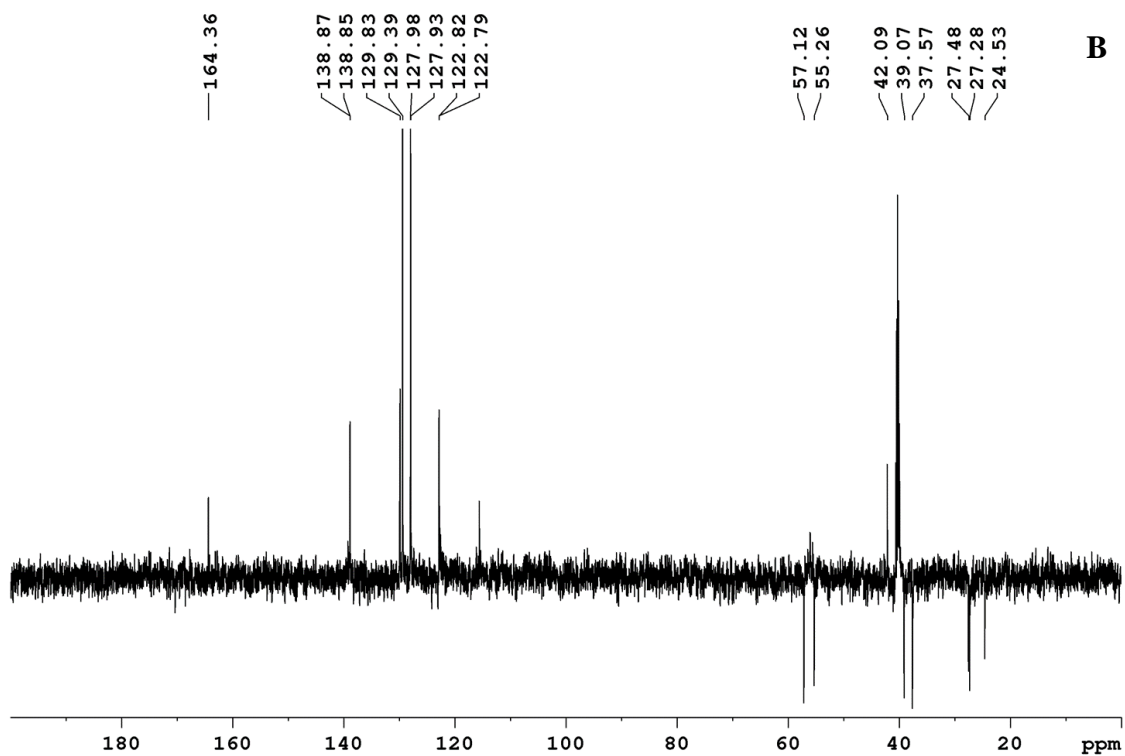
A correspondente correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  foi confirmada mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 47 e 48; Tabela 9). Na região de aromáticos é possível observar a presença de dois anéis simétricos em  $\delta_{\text{H}}$  7,56-7,54 (m; 4H; H-5'; H-5''; H-6'; H-6''; H-8'; H-8''; H-9'; H-9'') correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  127,94 (C-9' e C-9''),  $\delta_{\text{C}}$  127,98 (C-5' e C-5''),  $\delta_{\text{C}}$  129,39 (C-6'; C-6''; C-8'; C-8''), como também o próton  $\delta_{\text{H}}$  7,40 (m; 2H; H-7' e H-7'') correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  129,83 (C-7' e C-7'').

Conforme sugere o espectro, os hidrogênios metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,60 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-2' ou H-2'') e  $\delta_{\text{H}}$  6,63 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-2'' ou H-2') correlacionaram com  $\delta_{\text{C}}$

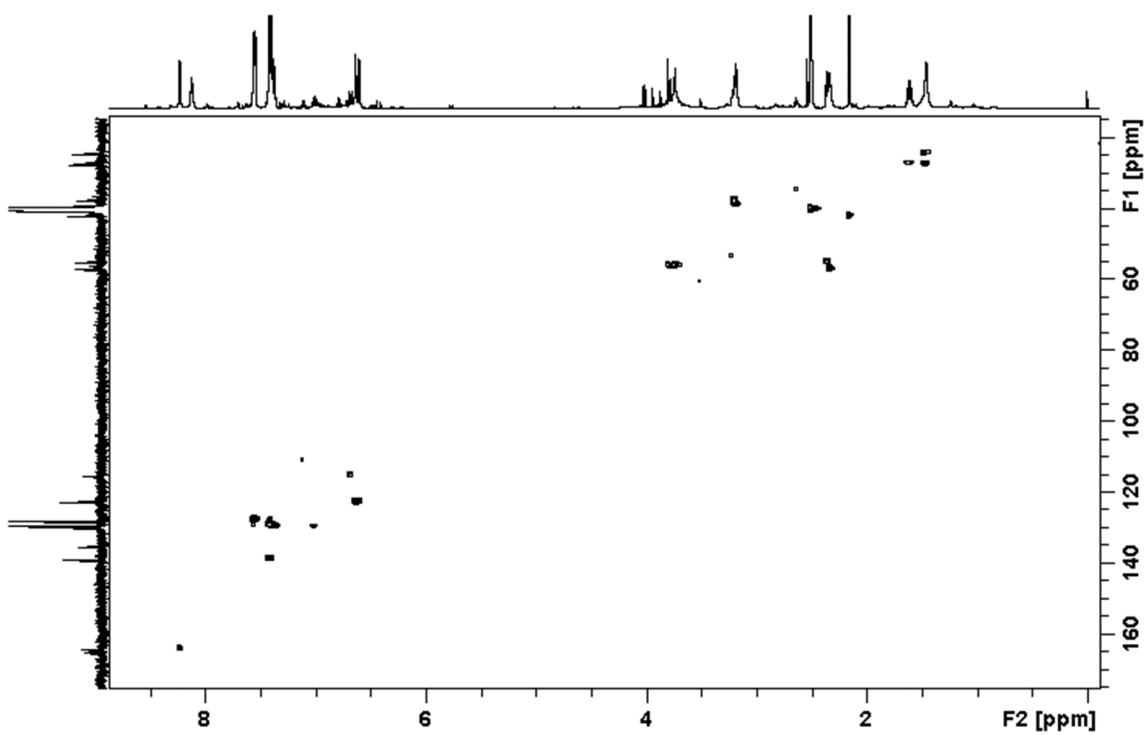
122,83 (C-2') e  $\delta_C$  122,79 (C-2''). Entretanto, os outros dois hidrogênios metínicos não foram facilmente identificados por meio da multiplicidade, sendo sugerido os deslocamentos  $\delta_H$  7,42 (m; 1H; H-3') correlacionando com  $\delta_C$  138,85 (C-3') e  $\delta_H$  7,38 (m; 1H; H-3'') com  $\delta_C$  138,88 (C-3'').

Na porção alifática, o grupo metila foi confirmado pelo deslocamento  $\delta_H$  2,16 (H-5) correlacionando com  $\delta_C$  42,09 (C-5) e os metilênicos  $\delta_H$  3,20 (H-2),  $\delta_H$  3,18 (H-9),  $\delta_H$  2,35 (H-4),  $\delta_H$  2,32 (H-6) e  $\delta_H$  1,61 (H-3) apresentaram correlação com os sinais de carbono em  $\delta_C$  37,58 (C-2),  $\delta_C$  39,07 (C-9),  $\delta_C$  55,26 (C-4),  $\delta_C$  57,12 (C-6) e  $\delta_C$  42,09 (C-3), respectivamente. O deslocamento em  $\delta_H$  1,45 (H-7 e H-8) identificado como metilênico, apresentou correlação com dois sinais de carbono em  $\delta_C$  27,48 (C-7 ou C-8) e  $\delta_C$  24,53 (C-8 ou C-7).

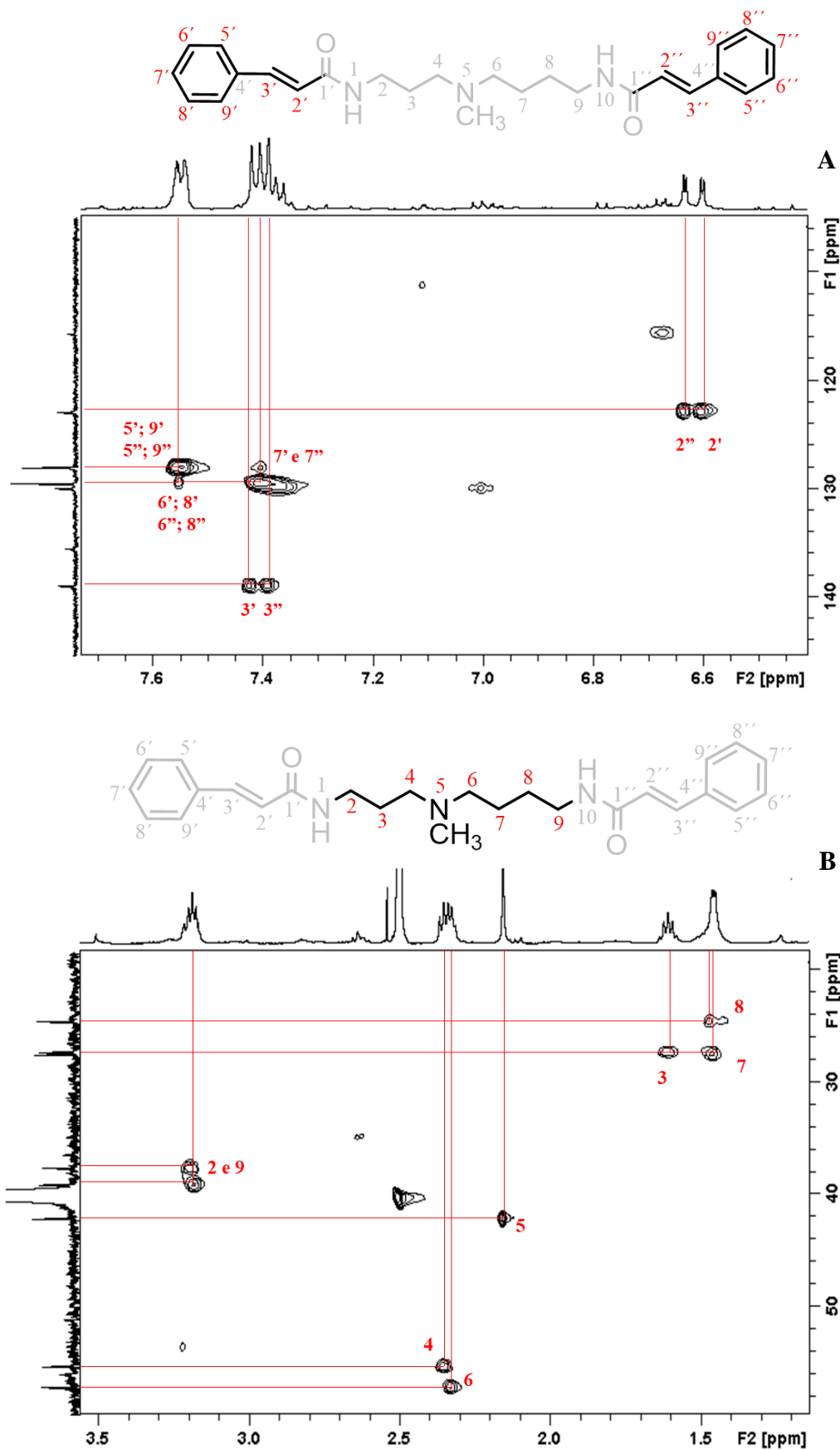




**Figura 46:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) (A) e DEPT-135 $^\circ$  (B) da amostra APG420.



**Figura 47:** Mapa de contorno de HSQC (500 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) da amostra APG420.



**Figura 48:**Ampliação das regiões de aromáticos (**A**) e alifáticos (**B**) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) da amostra APG420.

O mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 49 e 50; Tabela 9) apresenta as correlações à longa distância da estrutura identificada na amostra APG420. As principais correlações na porção aromática da estrutura foram observadas em  $J^3$  para os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  7,56 (H-5') e  $\delta_H$  7,55 (H-6') com o sinal de carbono em  $\delta_C$  127,94 (C-9'), além da correlação de  $\delta_H$  7,56 (H-5') com  $\delta_C$  129,83 (C-7'), confirmando que o anel aromático não é substituído. A confirmação dos carbonos quaternários ficou por conta da correlação de  $\delta_H$  6,60 (H-2') com  $\delta_C$  135,43 (C-4') e  $\delta_H$  7,42 (H-3') com  $\delta_C$  165,27 (C-1'). Os hidrogênios metínicos foram confirmados a partir das correlações de  $\delta_H$  7,42 (H-3') com os sinais de carbono em  $\delta_C$  127,98 (C-5') e  $\delta_C$  127,94 (C-9'). Importante ressaltar, que todas as correlações até então observadas, ocorreram simultaneamente para ambas as partes de amida derivada do ácido cinâmico, confirmando que a estrutura possui dois fragmentos estruturais simétricos.

O grupo metila  $\delta_C$  42,09 diretamente ligado ao nitrogênio na cadeia alifática pode ser confirmado a partir da interação à longa distância entre  $\delta_H$  2,16 (s, NCH<sub>3</sub>) e os sinais de carbono metilênico em  $\delta_C$  55,26 (C-4) e  $\delta_C$  57,12 (C-6). Também foram confirmadas as correlações em  $J^3$  para  $\delta_H$  3,20 (H-2) com  $\delta_C$  57,26 (C-4);  $\delta_H$  2,35 (H-4) com  $\delta_C$  57,12 (C-6) e  $\delta_H$  2,32 (H-6) com  $\delta_C$  24,53 (C-8). Em adição, foi possível confirmar as posições exatas dos metilênicos em  $\delta_H$  1,45 (H-7) e  $\delta_H$  1,47 (H-8) a partir das correlações de  $\delta_H$  2,32 (H-6) com  $\delta_C$  27,48 (C-7) e  $\delta_H$  3,18 (H-9) com  $\delta_C$  24,53 (C-8).

Isto implica dizer, que os dois sinais de hidrogênio que ocorreram em  $\delta_H$  1,45-1,47 apresentaram efeito isocronia, ou seja, dois sinais de hidrogênio na mesma frequência correlacionando com dois sinais de carbono em frequências diferentes. Além do mais, esse efeito pode ser confirmado nas correlações homonucleares  $^1H$ - $^1H$  observadas no experimento de COSY (Figura 51) em  $\delta_H$  2,32 (H-6) com  $\delta_H$  1,45 (H-7) e  $\delta_H$  3,18 (H-9) com  $\delta_H$  1,47 (H-8).

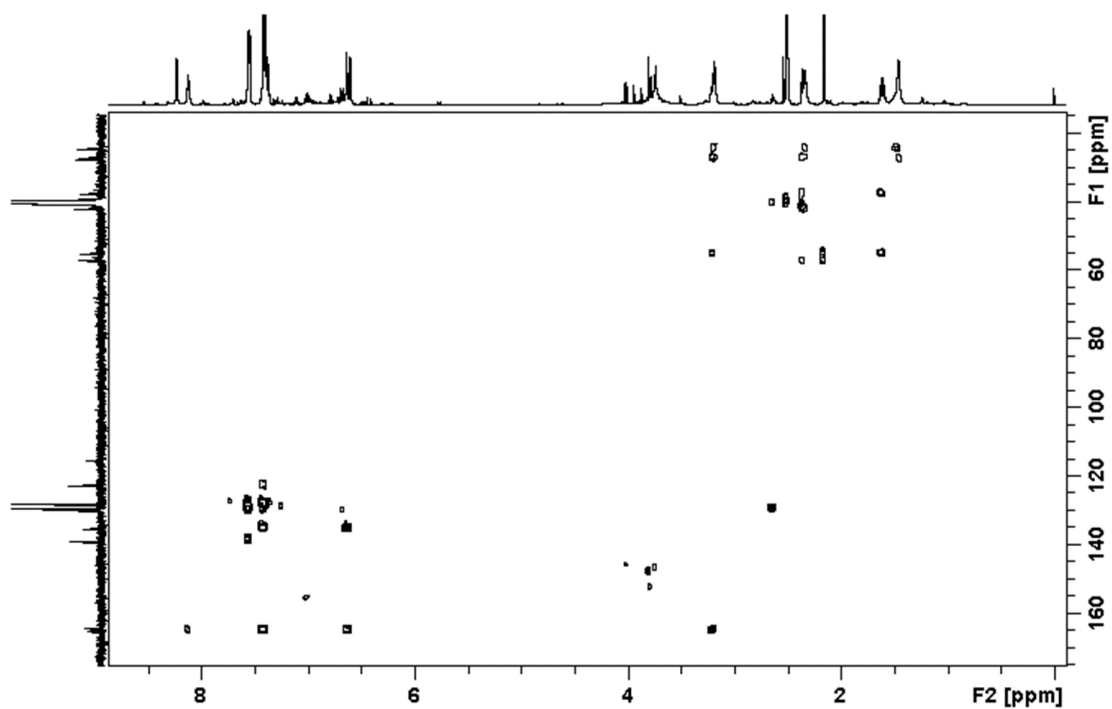
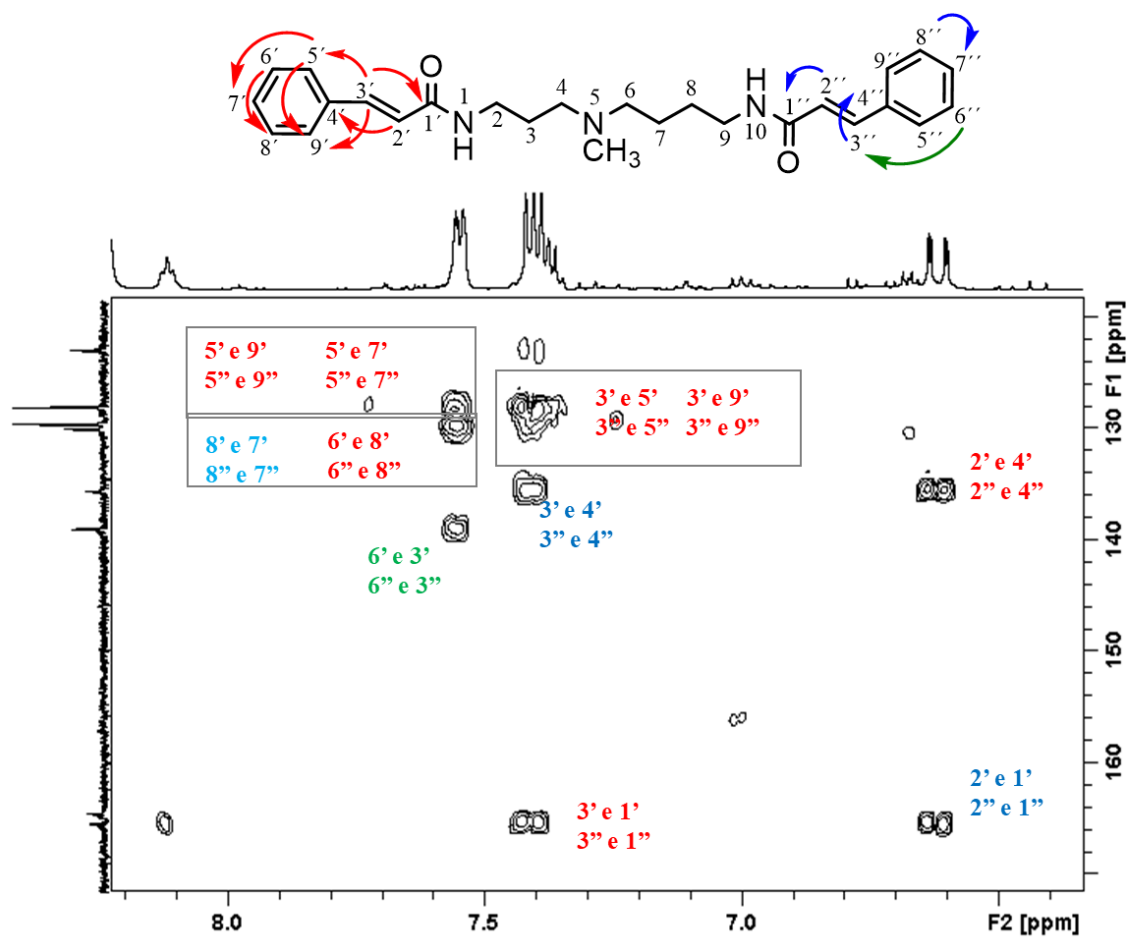
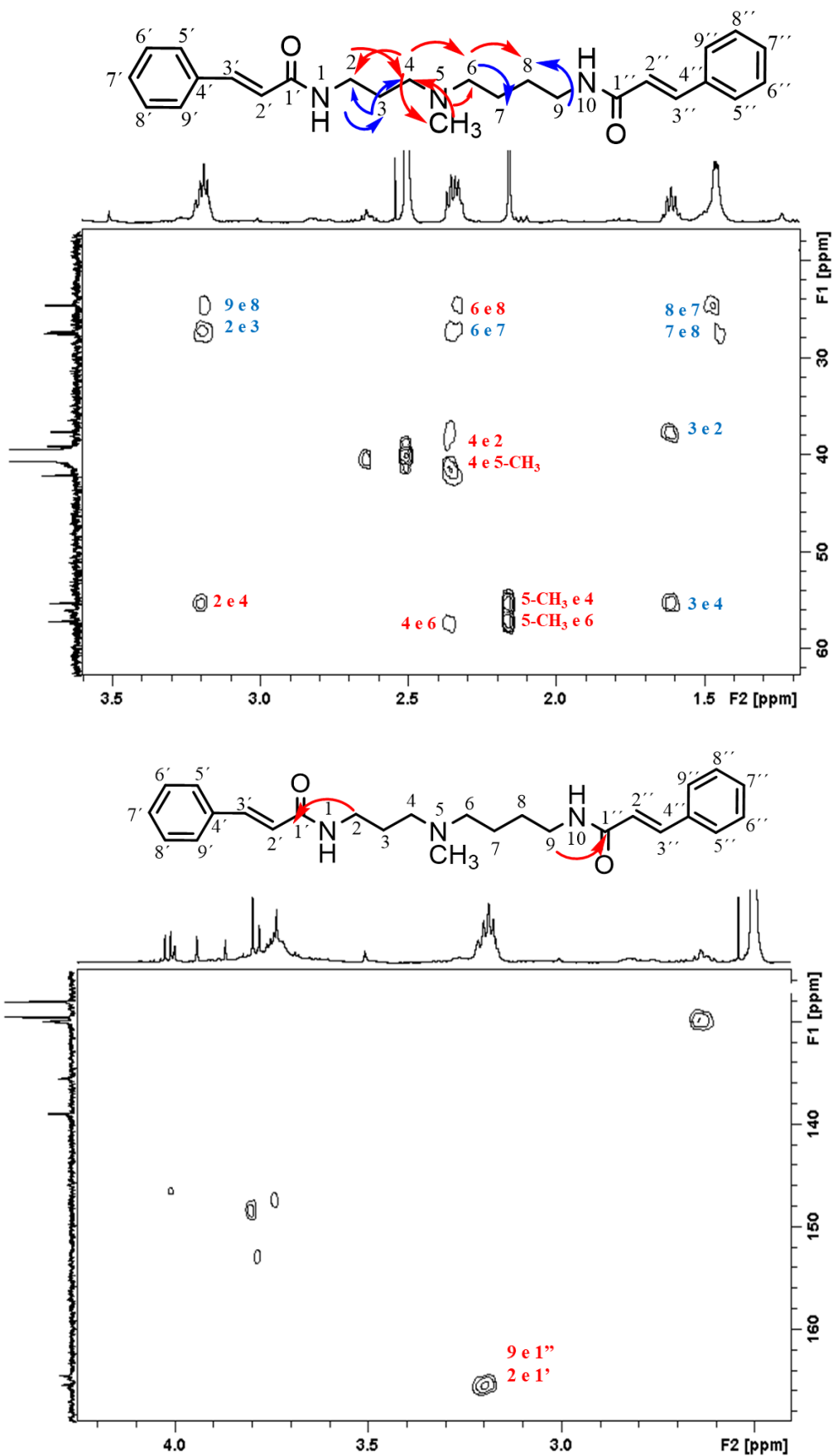


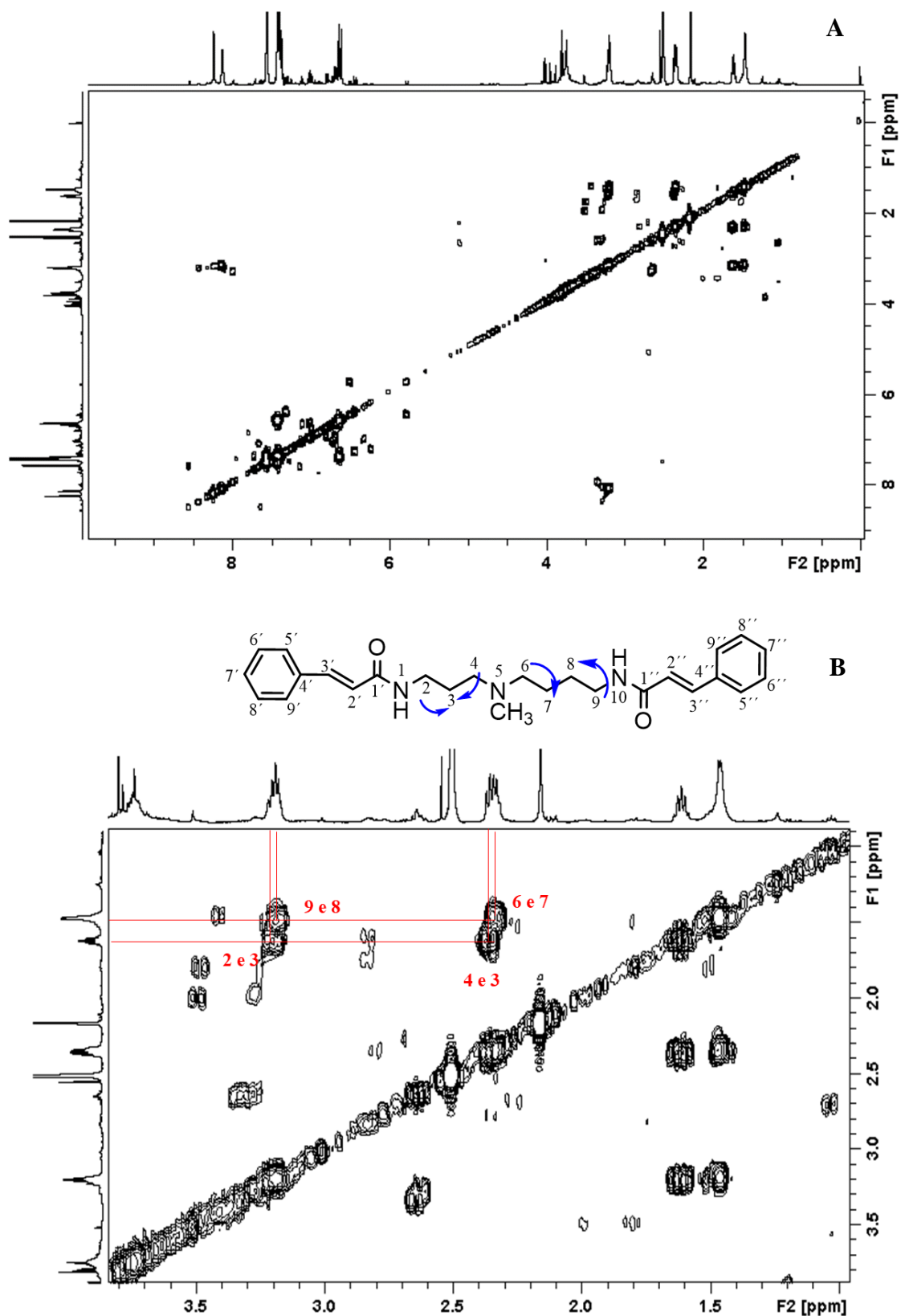
Figura 49: Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) da amostra APG420.







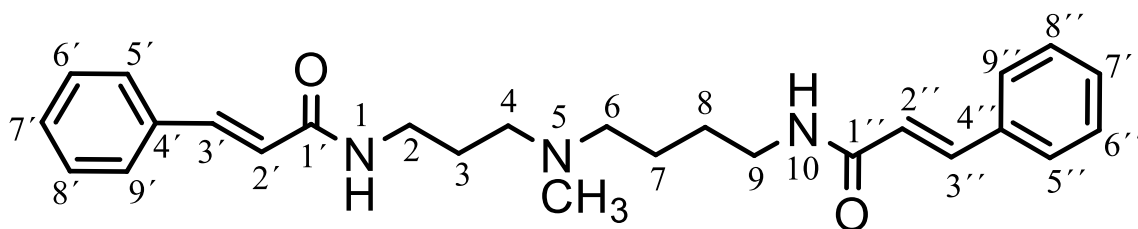
**Figura 50:** Ampliações do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) da amostra APG420: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ).



**Figura 51:** Correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  observadas no experimento de COSY (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) (A) e ampliação da região alifática (B) da amostra APG420.

De acordo com as análises dos espectros de RMN e espectrometria de massas foi possível identificar o alcaloide como 1,10-di-*E*-cinamamida de 5-*N*-metilespermidina ou apenas 5-*N*-metilmaitenina (Figura 52). Na literatura foi reportada a síntese desta poliamina (SCHLITTLER *et al.*, 1973). Porém, este é o primeiro relato de isolamento deste alcaloide a partir de produtos naturais, bem como a primeira ocorrência do alcaloide na família *Menispermaceae*.

Na região amazônica, o alcaloide poliamina *N,N*-di-*E*-cinamoileespermidina ou maitenina foi isolado de árvores de *Maytenus krukovii* (*Maytenus chuchuhuasha*) da família *Celastraceae* (CLERICUZIO *et al.*, 2007), e por ser um produto de origem natural foi utilizado para comparação dos dados espectrais.



**Figura 52:** Estrutura do alcaloide 5-*N*-metilmaitenina.

**Tabela 9:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra APG420.

Amostra APG420 (5-N-metilmainenina)					
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; J Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; J Hz) <sup>b</sup>	$\delta_{\text{C}}$ $^{13}\text{C}$ <sup>a</sup>	HMBC <sup>a</sup>	COSY
1 e 10 N-H	8,12 (t; 2H; 5,5 Hz)	8,21 (2H)	-	165,27; 165,32	3,18; 3,20
5' e 5'' ou 9' e 9'' 9' e 9'' ou 5' e 5''	7,56 - 7,54 (m; 2H)	7,34 - 7,27 (m; 4H)	127,98	138,85; 138,88; 127,94; 129,83	7,40; 7,38; 7,42
6'; 6''; 8'; 8''	7,56 - 7,54 (m; 4H)	7,59 - 7,48 (m; 6H)	129,39	138,85; 138,85; 129,39	7,38; 7,40; 7,42
7' e 7''	7,40 (m; 2H)	7,59 - 7,48 (m; 6H)	129,83	127,94; 127,98; 122,79; 122,83; 127,94; 127,98;	6,60; 6,63
3' ou 3''	7,42 (m; 1H)	7,46 (m; 2H; 16 Hz)	138,85	135,43; 165,27; 165,32 122,79; 122,83;	6,60; 6,63
3'' ou 3'	7,38 (m; 1H)	7,46 (m; 2H; 16 Hz)	138,88	127,94; 127,98; 135,43; 165,27; 165,32	6,60; 6,63
2' ou 2''	6,63 (d; 1H; 16 Hz)	6,58 (d; 2H; 16 Hz)	122,79	135,43; 165,27; 165,32	-
2'' ou 2'	6,60 (d; 1H; 16 Hz)	6,58 (d; 2H; 16 Hz)	122,83	135,43; 165,27; 165,32	-
2	3,20 (m; 2H)	3,41 (m; 2H)	37,58	27,28; 55,26; 165,27	1,61
9	3,18 (m; 2H)	3,30 (m; 2H)	39,07	24,53; 165,32	1,47
4	2,35 (m; 2H)	3,02 (m; 2H)	55,26	27,28; 37,58; 42,09; 57,12	1,61
6	2,32 (m; 2H)	3,02 (m; 2H)	57,12	24,53; 55,26	1,45
5	2,16 (s; 3H)	-	42,09	55,26; 57,12	-
3	1,61 (m; 2H)	1,94 (m; 2H)	27,28	37,58; 55,26	3,20; 2,35
8	1,47 (m; 2H)	1,48 (m; 2H)	24,53	27,48	3,18
7	1,45 (m; 2H)	1,71 (m; 2H)	27,48	24,53	2,32
4' e 4''	-	-	135,43	-	-
1' ou 1''	-	-	165,27	-	-
1'' ou 1'	-	-	165,32	-	-

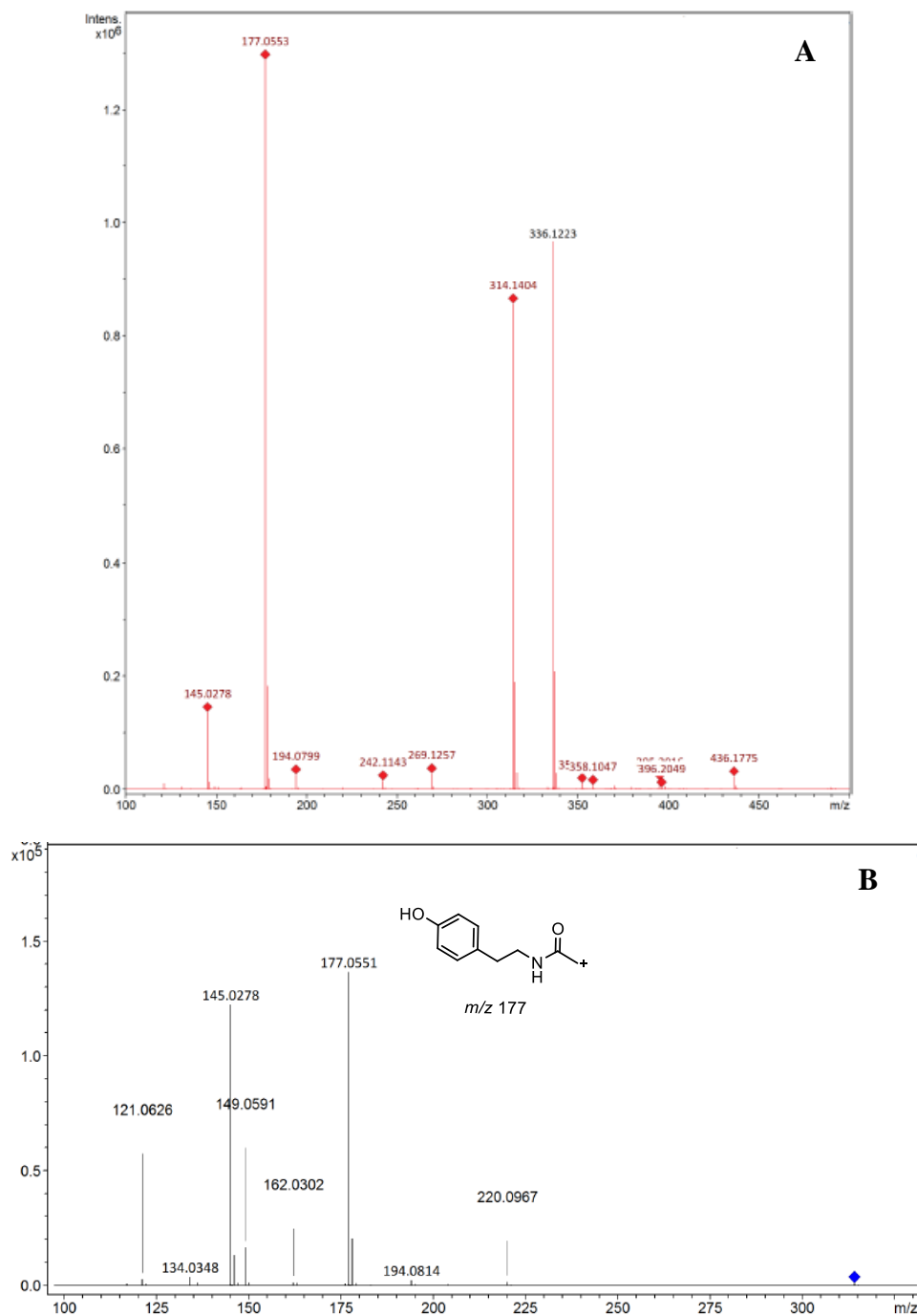
<sup>a</sup> O experimento foi realizado em DMSO  $d_6$  a 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

<sup>b</sup> Dados da literatura para a estrutura da mainenina de acordo com Clericuzio *et al.*, (2007) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

### 5.3.5. Determinação estrutural da amostra APG314

A amostra APG314 (3,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo claro. No espectro de massas modo *full scan* (Figura 53a) foi observado o pico base  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  314, e o espectro de fragmentação MS/MS (Figura 53b) mostrou perdas principais de 137 u ( $m/z$  314 $\rightarrow$ 177), 32 u ( $m/z$  177 $\rightarrow$ 145) e 56 u ( $m/z$  145 $\rightarrow$ 121),

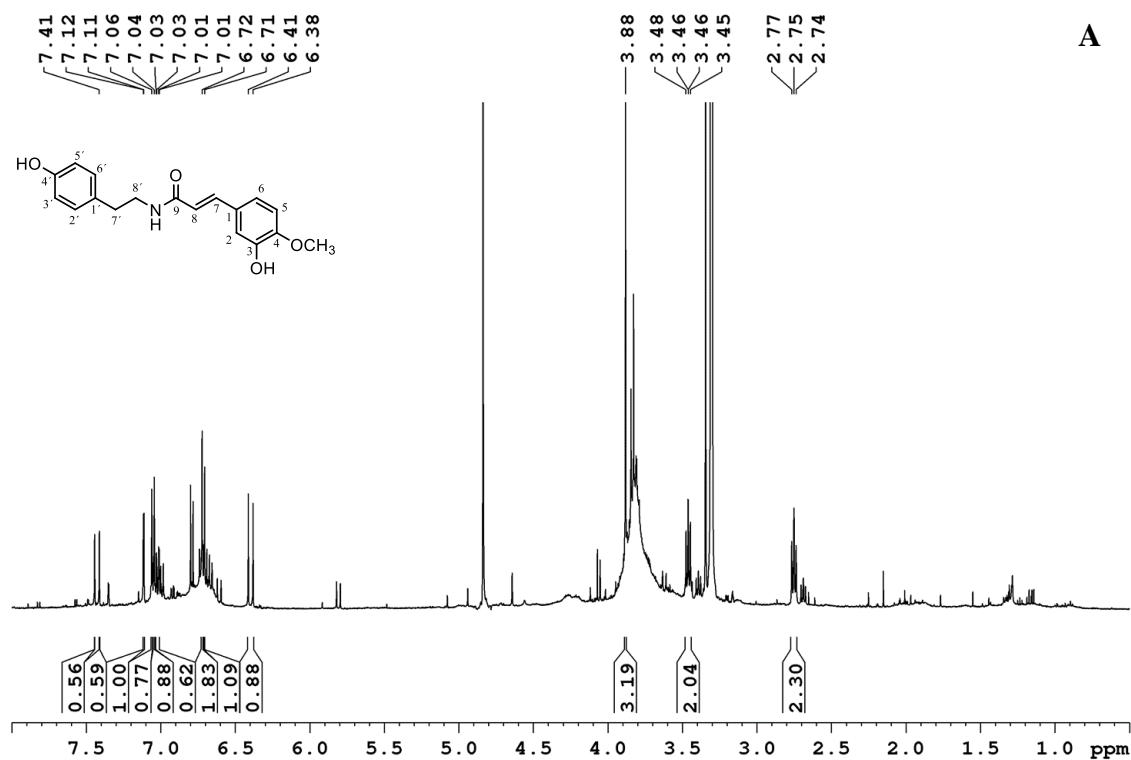
fragmentos típicos de amidas derivadas de ácido cinâmico (GALARCE-BUSTOS *et al.*, 2019; JIAO *et al.*, 2018). Dados de espectrometria de massas de alta resolução  $[M+H]^+$ :  $m/z$  314,1404; fórmula molecular:  $C_{18}H_{20}NO_4$ ; calculado:  $m/z$  314,1387;  $\Delta_{m/z}$  teórico = - 6,3 ppm.

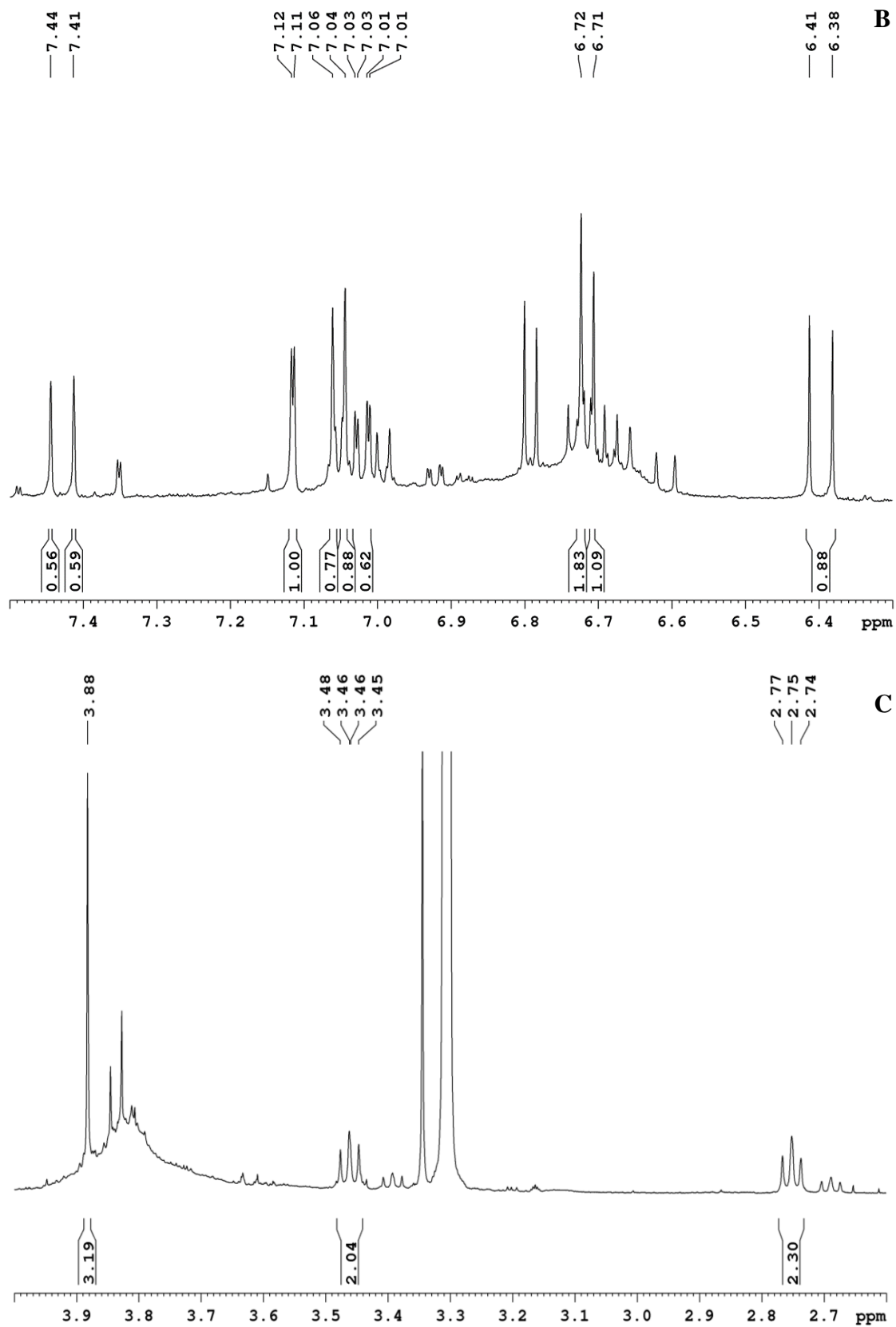


**Figura 53:** Espectro de massas de alta resolução modo *full scan* (A) e MS/MS (B) da amostra APG314.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 54 e Tabela 10) da amostra APG314 apresentou 8 sinais de hidrogênio na região de aromáticos (7,5 – 6,0 ppm). Os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,11 (d; 1H;  $J$ : 1,8 Hz; H-2),  $\delta_{\text{H}}$  7,06 (m; 2H; H-2' e H-6'),  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (dd; 1H;  $J$ : 1,8 e 8,5 Hz; H-6),  $\delta_{\text{H}}$  6,72 (m; 2H; H-3' e H-5') e  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (m; 1H; H-5) foram atribuídos aos dois sistemas de anel aromático. Os deslocamentos  $\delta_{\text{H}}$  7,44 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  6,40 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-8) foram atribuídos aos hidrogênios de uma ligação dupla em posição *trans*.

Na região de alifáticos foram observados 3 sinais de hidrogênio na região de 4,00 – 2,00 ppm, sendo dois grupos metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,75 (m; 2H; H-7') e  $\delta_{\text{H}}$  3,46 (m; 2H; H-8'). O outro sinal foi atribuído à metoxila  $\delta_{\text{H}}$  3,88 (s; 3H; 4-OCH<sub>3</sub>).

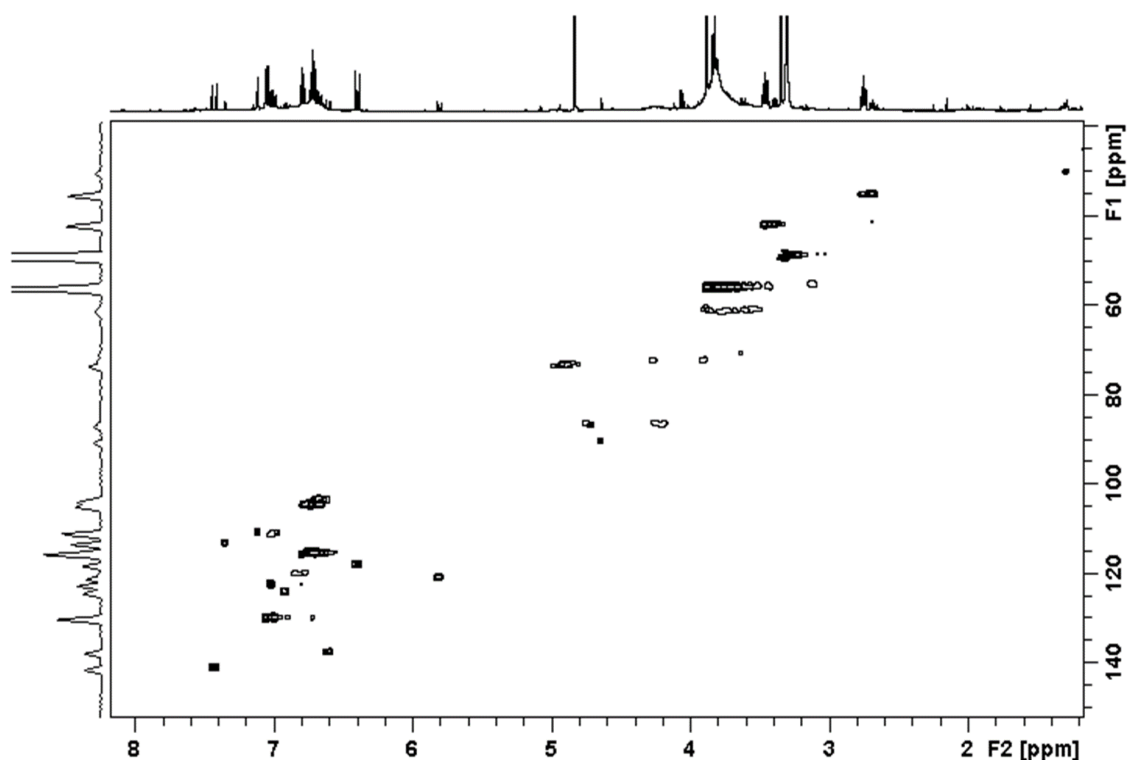




**Figura 54:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG314 (A) e ampliações das regiões de aromáticos (B) e alifáticos (C).

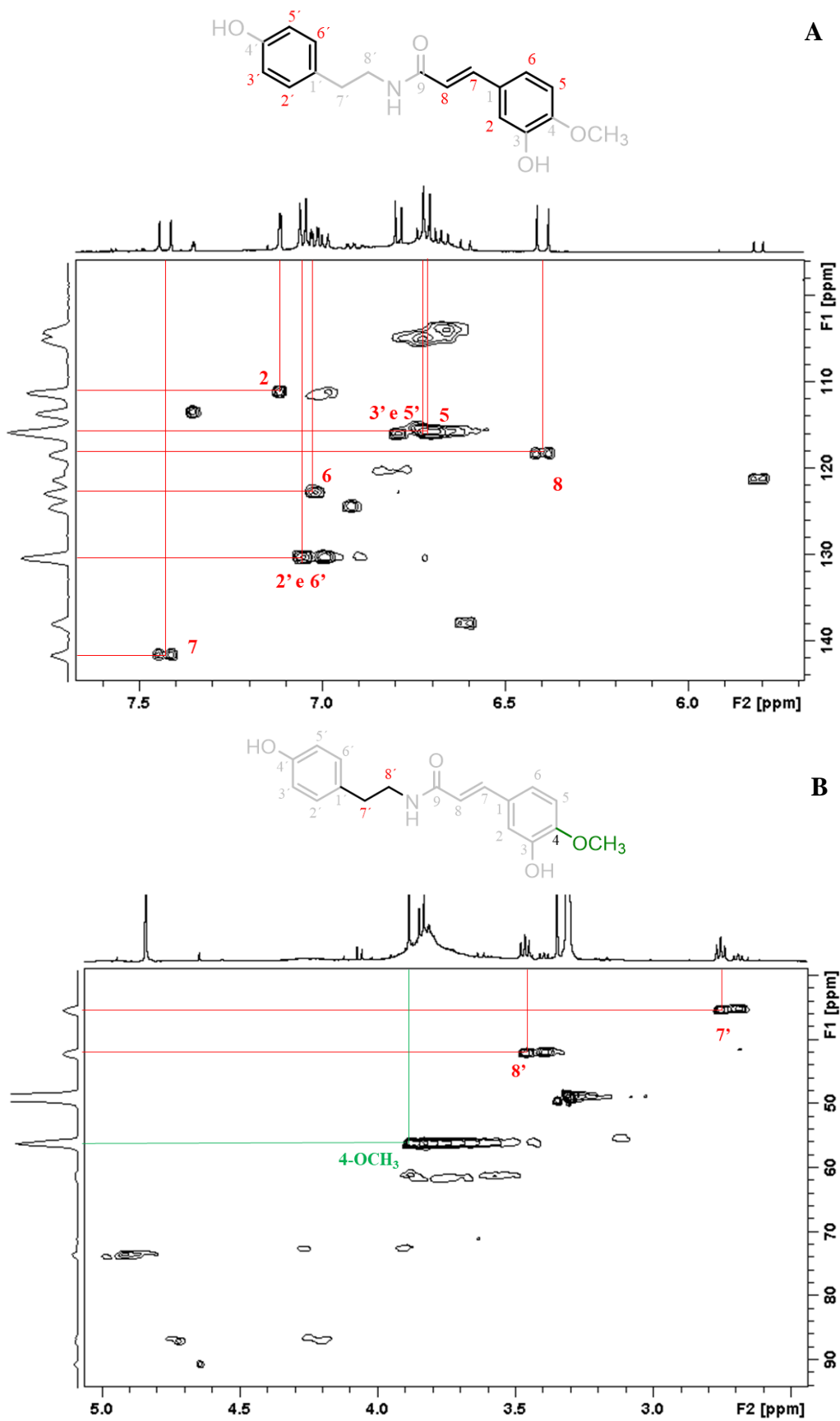
No mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figura 55 e 56; Tabela 10) da amostra APG314 foi possível identificar as correlações dos dois anéis aromáticos:  $\delta_H$  7,11 (d; 1H;  $J$ : 1,8 Hz; H-2) correlacionando com  $\delta_C$  111,1 (C-2); 6,70 (m; 1H; H-5) com  $\delta_C$  115,7 (C-5) e  $\delta_H$  7,03 (dd; 1H;  $J$ : 1,8 e 8,5 Hz; H-6) com  $\delta_C$  122,7 (C-6) em posição *orto*. O outro anel aromático mostrou um sistema simétrico de  $\delta_H$  7,06 (m; 2H; H-2' e H-6') correlacionando com o  $\delta_C$  130,2 (C-2' e C-6'), além de  $\delta_H$  6,72 (m; 2H; H-3' e H-5') correlacionando com o  $\delta_C$  115,7 (C-3' e C-5').

O sistema de ligação *trans* foi observado pelas correlações  $\delta_H$  7,44 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-7) com  $\delta_C$  141,5 (C-7) e  $\delta_H$  6,40 (d; 1H;  $J$ : 16 Hz; H-8) com  $\delta_C$  118,4 (C-8). A metoxila  $\delta_H$  3,88 (s; 3H; 4-OCH<sub>3</sub>) apresentou a correlação com  $\delta_C$  56,0 (C-4). Os sinais em  $\delta_H$  2,75 (m; 2H; H-7') e  $\delta_H$  3,46 (m; 2H; H-8') correlacionaram com  $\delta_C$  35,4 (C-7') e  $\delta_C$  42,1 (C-8'), respectivamente.



**Figura 55:** Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG314.





**Figura 56:** Ampliação das regiões de aromáticos (A) e alifáticos (B) do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG314.

De acordo com o mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figura 57 e 58; Tabela 10), o deslocamento  $\delta_H$  7,44 (H-7) correlacionou com os sinais de carbono do anel aromático em  $\delta_C$  111,1 (C-2),  $\delta_C$  123,4 (C-1) e  $\delta_C$  169,3 (C-9); estes dois últimos correspondem aos sinais de carbono quaternário, indicando a presença do grupo *trans*-feruloil. Por outro lado, o sinal  $\delta_H$  2,75 (H-7') correlacionou em  $J^2$  com dois sinais de carbono em  $\delta_C$  130,9 (C-1') e  $\delta_C$  42,1 (C-8'), indicando a presença do fragmento etilbenzeno. Adicionalmente, o sinal em  $\delta_H$  3,46 (H-8') correlacionou em  $J^2$  com dois sinais de carbono em  $\delta_C$  130,9 (C-1') e  $\delta_C$  169,3 (C-9), sendo essa parte da estrutura ligada ao grupo contendo o deslocamento característico da carbonila e um átomo de nitrogênio, conforme o ambiente químico. Isto permite a determinação da presença de um grupo amino terminal, formando a estrutura de tiramina; sendo então formado o esqueleto *N-trans*-feruloil conforme esses acoplamentos.

O anel aromático situado próximo da ligação *trans* foi determinado por meio das correlações de  $\delta_H$  7,11 (H-2) com os sinais de carbono em  $\delta_C$  123,4 (C-1),  $\delta_C$  141,5 (C-7) e  $\delta_C$  150,2 (C-4) e também do próton em  $\delta_H$  7,02 (H-6) com os sinais de carbono em  $\delta_C$  111,1 (C-2),  $\delta_C$  141,5 (C-7) e  $\delta_C$  150,2 (C-4). A metoxila ( $\delta_H$  3,88) aparece correlacionado em  $J^2$  com o sinal de carbono em  $\delta_C$  150,2 (C-4).

O outro anel aromático foi atribuído próximo da ligação etil mostrando correlações de  $\delta_H$  7,06 (H-2' e H-6'') em  $J^{2,3}$  com os sinais de carbono em  $\delta_C$  35,4 (C-7'),  $\delta_C$  130,9 (C-1') e  $\delta_C$  157,1 (C-4') e também dos sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  6,72 (H-3' e H-5'') com os sinais de carbono em  $\delta_C$  130,9 (C-1') e  $\delta_C$  157,1 (C-4'). O deslocamento  $\delta_C$  157,1 (C-4') foi atribuído ao carbono do anel aromático ligado a uma hidroxila.

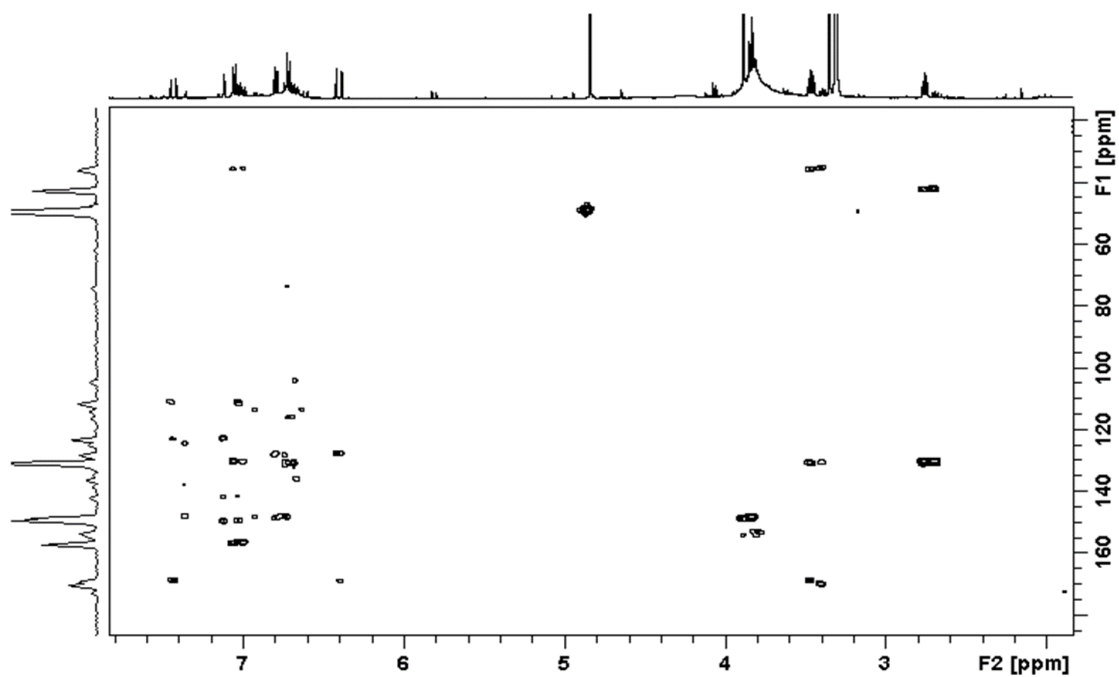
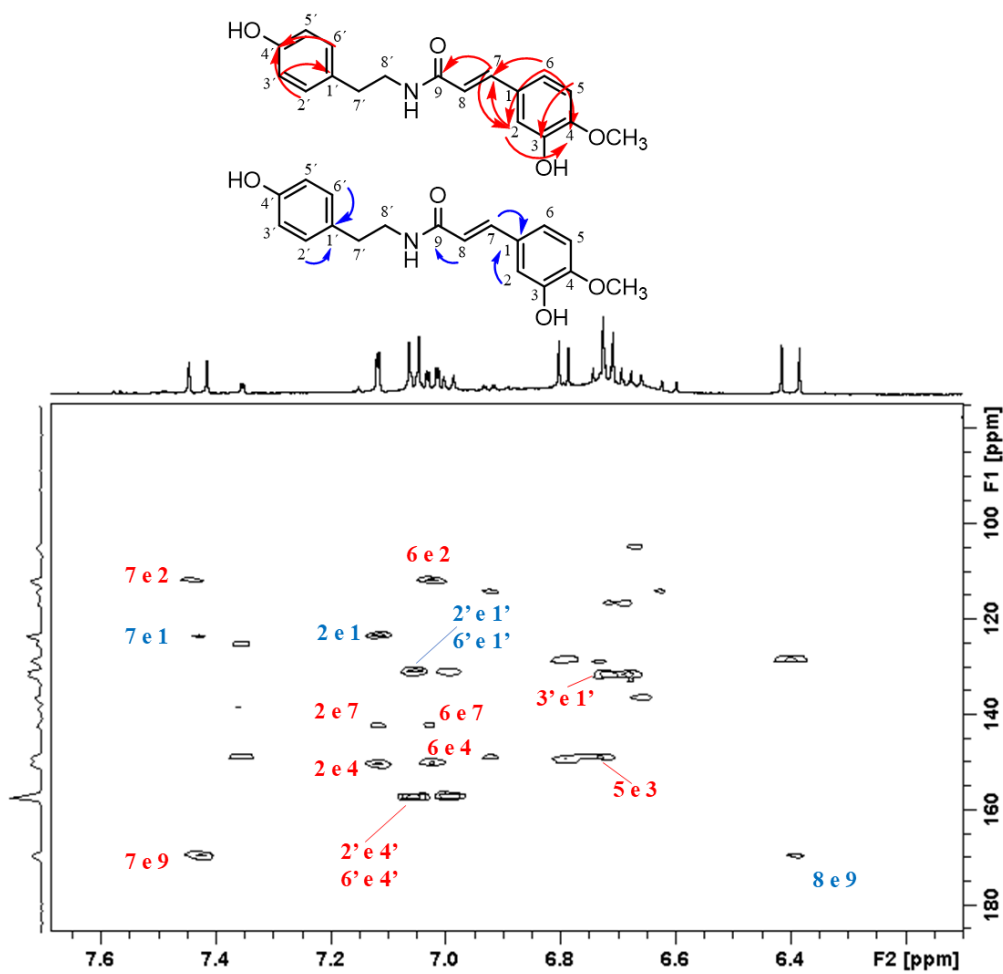
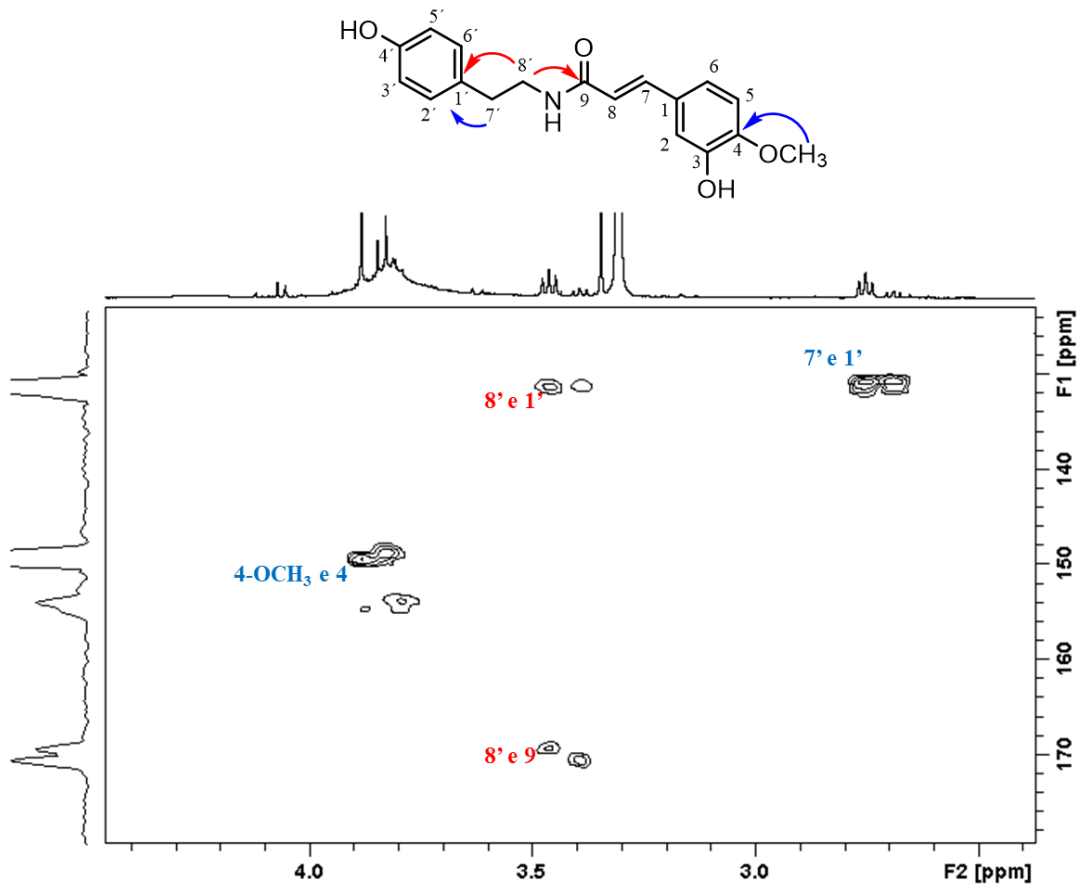
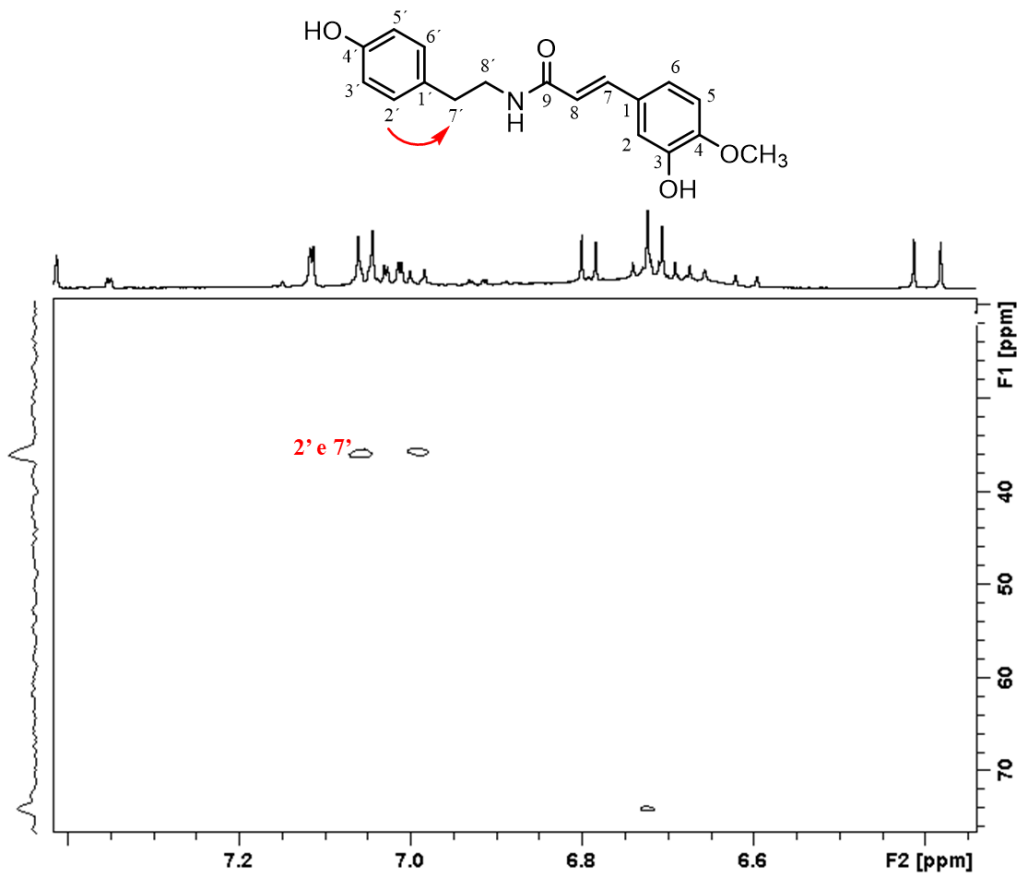
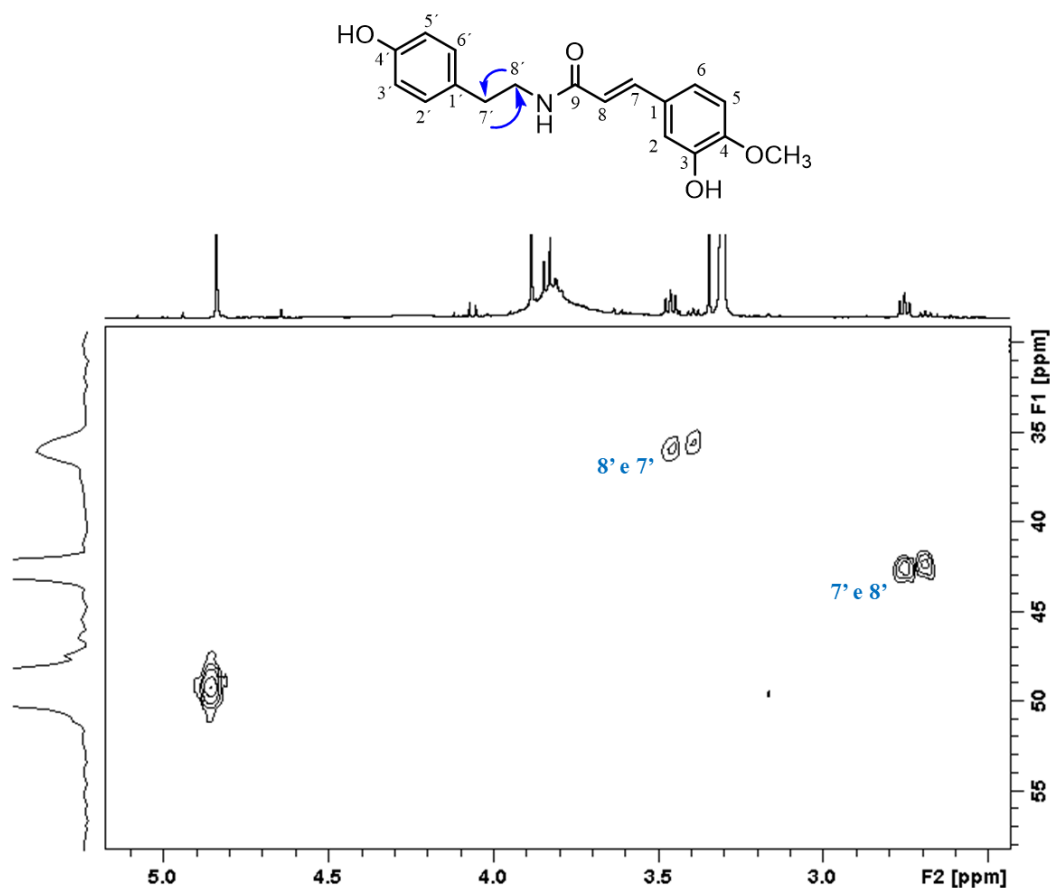


Figura 57: Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra APG314.

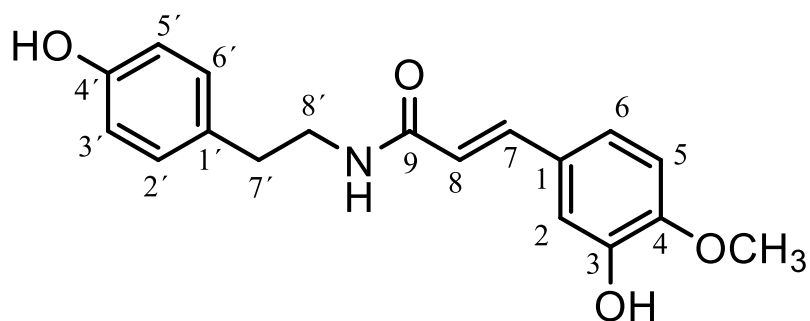






**Figura 58:** Ampliação do mapa de contorno de HMBC (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra APG314: azul ( $J^2$ ), vermelho ( $J^3$ ) e verde ( $J^4$ ).

Em conformidade com as análises de RMN, espectrometria de massas e comparação com dados da literatura, a estrutura química foi estabelecida como *N-trans*-feruloiltiramina (Figura 59). Sendo que esta amida já foi previamente reportada nos gêneros *Abuta*, *Tinospora* e *Cocculus* (BAJPAI *et al.*, 2016; CAVIN *et al.*, 1998; FUKUDA *et al.*, 1983; HENRIQUE, 2012; JIAO *et al.*, 2018; KIM e KINGSTON, 1995).



**Figura 59:** Estrutura do alcaloide *N-trans*-feruloiltiramina.

**Tabela 10:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra APG314.

Amostra APG314 ( <i>N-trans-feruloiltiramina</i> )				
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; <i>J</i> Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; <i>J</i> Hz) <sup>b</sup>	$\delta_{\text{C}}$ HSQC <sup>a,c</sup>	HMBC <sup>a</sup>
1	-	-	123,4	-
2	7,11 (d; 1H; 1,8 Hz)	7,10 (d; 1H; 2 Hz)	111,1	123,4; 141,5; 150,2
3	-	-	148,8	-
4	-	-	150,2	-
4-OCH <sub>3</sub>	3,88 (s; 3H)	3,87 (s; 3H)	56,0	150,2
5	6,70 (m; 1H)	6,79 (d; 1H; 8,2 Hz)	115,7	148,8
6	7,03 (dd; 1H; 1,8 e 8,5 Hz)	7,00 (dd; 1H; 2 e 8,2 Hz)	122,7	111,1; 141,5; 150,2
7	7,44 (d; 1H; 16 Hz)	7,43 (d; 1H; 15,6 Hz)	141,5	111,1; 123,4; 169,3
8	6,40 (d; 1H; 16 Hz)	6,40 (d; 1H; 15,6 Hz)	118,4	169,3
9	-	-	169,3	-
1'	-	-	130,9	-
2'	7,06 (m; 1H)	7,05 (d; 2H; 6,8 Hz)	130,2	35,4; 130,9; 157,1
3'	6,72 (m; 2H)	6,72 (d; 2H; 7,2 Hz)	115,7	130,9; 157,7
4'	-	-	157,1	-
5'	6,72 (m; 2H)	6,72 (d; 2H; 7,2 Hz)	115,7	130,9; 157,7
6'	7,06 (m; 1H)	7,05 (d; 2H; 6,8 Hz)	130,2	35,4; 130,9; 157,1
7'	2,75 (m; 2H)	-	35,4	42,1; 130,9
8'	3,46 (m; 2H)	-	42,1	35,4; 130,9; 169,3

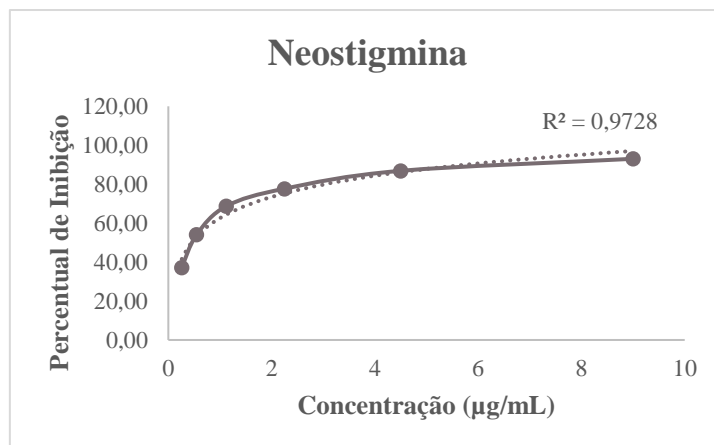
<sup>a</sup> O experimento foi realizado em CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz para  $^1\text{H}$ .

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Amaro *et al.*, (2014) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

<sup>c</sup> Carbonos foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

#### 5.4. Avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

Os testes de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, foram realizados para os cinco alcaloides isolados a partir da espécie *A. panurensis* e controle positivo neostigmina. A curva de dose-resposta para neostigmina foi construída nas concentrações entre 0,2 a 9,0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 60).



**Figura 60:** Curva dose resposta do percentual de inibição vs concentração do controle positivo neostigmina.

A atividade inibitória de 5-*N*-metilmaitenina, palmatina, isômero da lindoldamina, estefarina e *N-trans*-feruloitiramina contra enzima AChE foi avaliada na concentração máxima de 90 µg/mL. Os alcaloides apresentaram percentual de inibição de  $78,01 \pm 0,09$  %;  $116,92 \pm 0,04$  %;  $74,48 \pm 0,08$  %;  $74,58 \pm 0,03$  % e  $19,88 \pm 0,09$  %, respectivamente. A neostigmina, um eficiente inibidor reversível a curto prazo da enzima AChE, foi utilizado como controle positivo e mostrou o percentual de inibição de  $93,04 \pm 0,03$  % na concentração máxima de 9,0 µg/mL.

Conforme os resultados observados, todos os alcaloides, exceto *N-trans*-feruloitiramina, revelaram a atividade inibitória contra a enzima AChE e na Tabela 11 estão apresentadas as concentrações inibitórias para os alcaloides e o controle positivo neostigmina.

As substâncias isoladas da *A. panurensis* foram promissoras com valores de  $CI_{50}$  de 19,55 µM para 5-*N*-metilmaitenina, 32,25 µM para palmatina, 39,38 µM para isômero da lindoldamina e 61,24 µM para estefarina. A  $CI_{50}$  de 3,72 µM foi observado para neostigmina.

**Tabela 11:** Concentração inibitória (µM) da enzima acetilcolinesterase para os alcaloides e o controle neostigmina.

Substâncias	$CI_{50}$ (µM)
neostigmina	3,72
5- <i>N</i> -metilmaitenina	19,55
palmatina	35,25
isômero da lindoldamina	39,38
estefarina	61,24

Atualmente os produtos naturais constituem uma das principais fontes de inibidores da enzima AChE, utilizados como substâncias ativas para tratar danos no sistema nervoso central e periférico, bem como aliviar sintomas de doenças neurodegenerativas (NABAVI *et al.*, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2018).

Alcaloides bisbenzilisoquinolínicos exibiram um moderado potencial de inibição da enzima AChE com valores de  $CI_{50}$  de 34,66  $\mu$ M a 78,22  $\mu$ M (COMETA *et al.*, 2012). O alcaloide lindoldamina apresentou 88% de inibição da enzima AChE e  $CI_{50}$  de 3,52  $\mu$ M (MUREBWAYIRE *et al.*, 2008).

Estudos realizados com alcaloides do tipo protoberberínicos mostraram que a palmatina apresenta atividade inibitória da enzima AChE com  $CI_{50}$  36,6  $\mu$ M (ZHAO *et al.*, 2016).

Alcaloides do tipo proaporfínico são principalmente conhecidos pelo seu potencial para inibir reversivelmente a enzima acetilcolinesterase (DONG *et al.*, 2015; NABAVI *et al.*, 2019). Alcaloides aporfínicos e proaporfínicos demonstraram melhor atividade inibitória da AChE com valores de  $CI_{50}$  variando de 2,98  $\mu$ M para 20,4  $\mu$ M e este efeito está frequentemente relacionado aos diferentes substituintes na estrutura (DONG *et al.*, 2015). A efetividade e o potencial anti-AChE do sal de sulfato de estefarina (estefaglabina) foi reportado para estudos clínicos para o tratamento de lesões traumáticas e pós-operatórias no sistema nervoso periférico (KUZNETSOV *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Paula e colaboradores (2013) mostraram que o alcaloide *N-trans*-feruloiltiramina foi inativo quando avaliado para a inibição da enzima AChE, o mesmo foi mostrado nesse estudo em que o alcaloide não atingiu 20 % de inibição da enzima.

Alcaloides poliaminas como putrecina, espermidina, espermina, cadaverina e seus derivados estão presentes em células vivas; eles têm uma variedade de funções dentro das células incluindo o crescimento e regeneração celular (MILLER-FLEMING *et al.*, 2015). Para o sistema nervoso central em particular, estudos mostram que poliaminas agem como receptores relacionados ao processo neurodegenerativo (GILAD e GILAD, 1988; MORRISON e KISH, 1995), por exemplo, a espermidina diminui significativamente a atividade de AChE, estresse oxidativo e neuroinflamações no hipocampo cerebral (YADAV *et al.*, 2018).

Dentre os alcaloides estudados (exceto *N-trans*-feruloiltiramina), todos se mostraram promissores como inibidores da enzima AChE. Contudo, tanto para estefarina



quanto 5-*N*-metilmaitenina este é o primeiro relato de estudo *in vitro* referente a enzima AChE.

### 5.5. Avaliação da atividade citotóxica

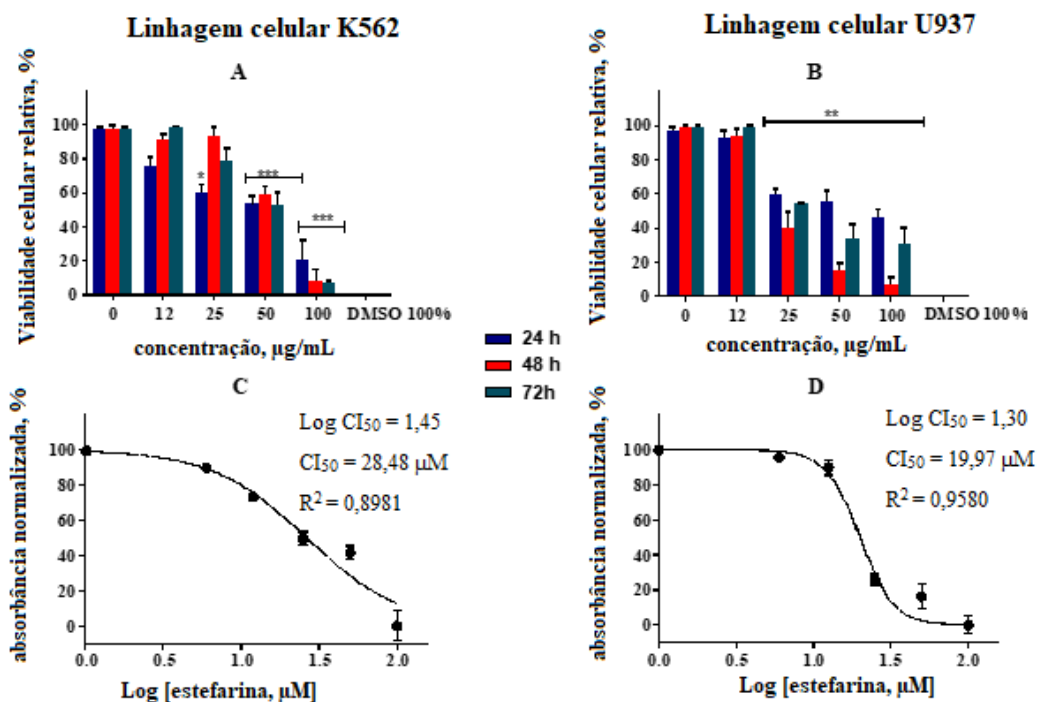
Os alcaloides estefarina e 5-*N*-metilmaitenina foram avaliados quanto a atividade citotóxica contra três linhagens de células: U937 (linfoma histiocítico humano), HL60 (leucemia promielocítica aguda humana) e K562 (leucemia mielogênica crônica humana). As substâncias demonstraram boa atividade antiproliferativa contra duas das linhagens testadas. Nenhum dos alcaloides apresentou atividade citotóxica contra células normais da linhagem Vero e PBMC humano. Os resultados estão relatados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Atividade citotóxica da estefarina e 5-*N*-metilmaitenina contra 3 linhagens de células humanas.

Substâncias	CI <sub>50</sub> (µM)		
	leucemia mielogênica crônica humana ( <i>linhagem K562</i> )	linfoma histiocítico humano ( <i>linhagem U937</i> )	leucemia promielocítica aguda humana ( <i>linhagem HL60</i> )
<b>estefarina</b>	28,48	19,97	>100
<b>5-<i>N</i>-metilmaitenina</b>	12,50	11,77	>100

A 5-*N*-metilmaitenina foi mais ativa quando comparada com a estefarina, exibindo valores de CI<sub>50</sub> 12,50 µM e 11,77 µM para as linhagens K562 e U937, respectivamente. Embora 5-*N*-metilmaitenina tenha sido mais ativa apenas nas primeiras 24 h do teste, a estefarina também exibiu boa atividade antiproliferativa com valores CI<sub>50</sub> de 28,48 µM e 19,97 µM para as linhagens K562 e U937, respectivamente. As duas substâncias não foram efetivas contra a linhagem HL60 (CI<sub>50</sub> >100 µM).

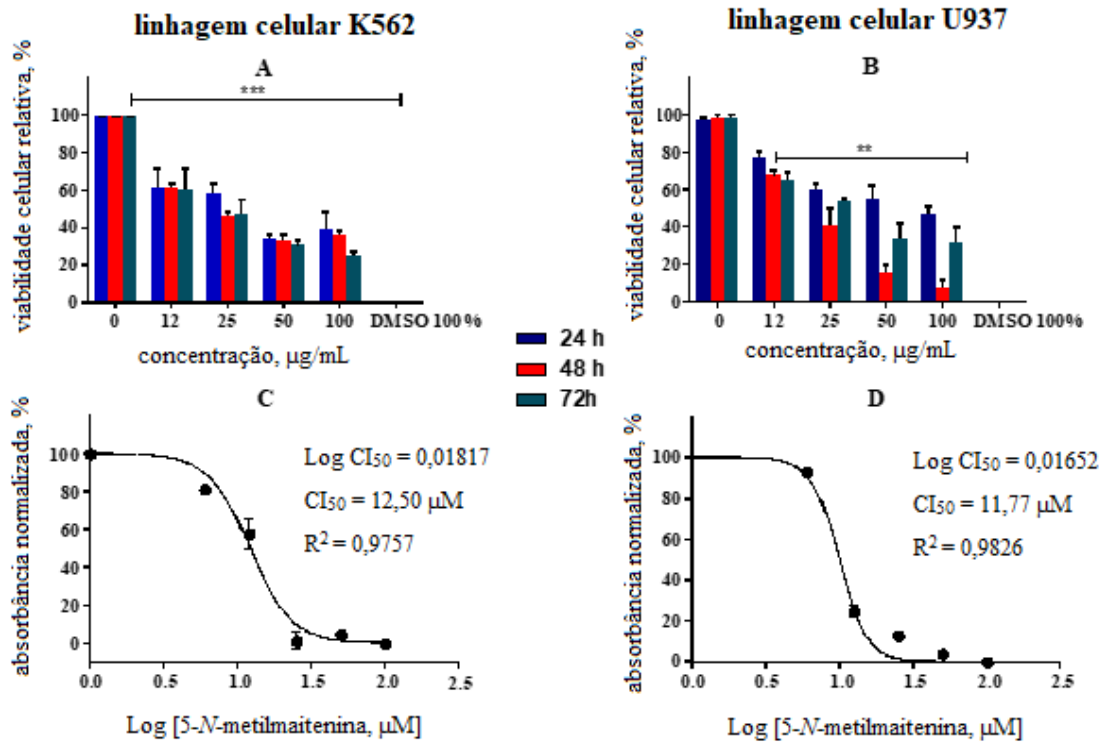
A efetividade da estefarina (Figura 61) e 5-*N*-metilmaitenina (Figura 62) em diferentes concentrações foram avaliadas contra as linhagens de células tumorais U937 and K562. As células U937 foram mais susceptíveis para a ação citotóxica da estefarina. Curiosamente, a estefarina demonstrou maior atividade citotóxica contra a cepa K562 apenas nas primeiras 24 horas de tratamento. Este resultado sugere que a linhagem celular K562 é mais resistente ao tratamento com estefarina quando comparado com a cepa U937. Ambos alcaloides apresentaram praticamente nenhuma toxicidade para as células normais (Vero e PBMC humano, Figura 63).



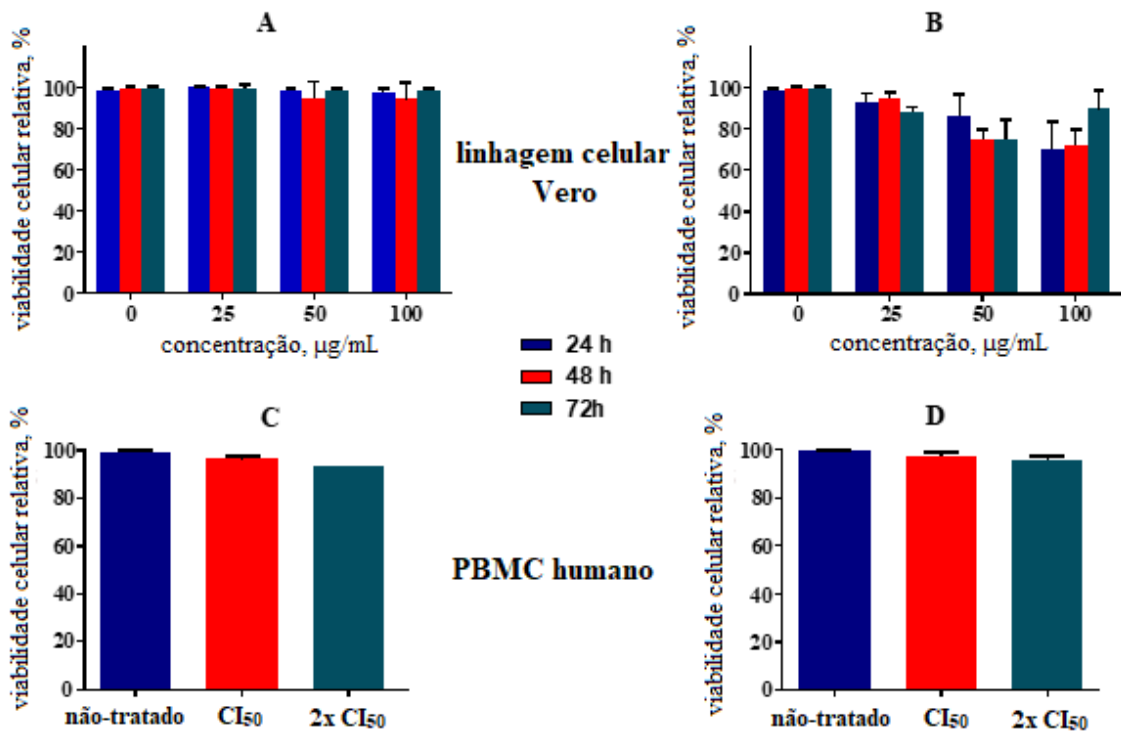
**Figura 61:** Atividade citotóxica da estefarina contra as linhagens celulares de K562 e U937 e respectivas CI<sub>50</sub>.

Embora a estefarina tenha apresentado melhor estabilidade de ação no curso do ensaio, a 5-*N*-metilmaitenina demonstrou maior eficiência contra as linhagens de células tumorais, de acordo com os valores de CI<sub>50</sub> apresentados anteriormente.

Os resultados obtidos corroboram com relatos da literatura em que alcaloides isoquinolínicos de diferentes esqueletos, como berberina e aporfínico contendo substituintes oxo- em sua estrutura, particularmente oxoisoaporfínico, demonstraram um potencial moderado a forte de atividade citotóxica contra várias linhagens de células tumorais, incluindo aquelas no presente estudo (LETAŠIOVÁ *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2004; QING *et al.*, 2018; UADKLA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2018).



**Figura 62:** Atividade citotóxica de 5-N-metilmaitenina contra as linhagens celulares de K562 e U937 e respectivas CI<sub>50</sub>.

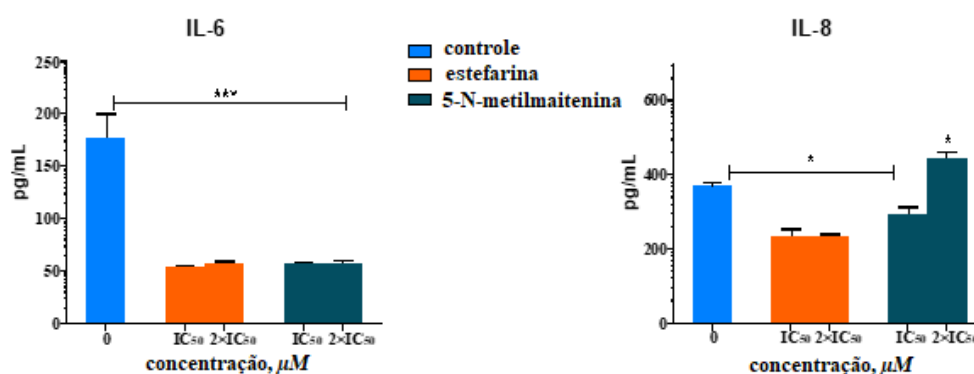


**Figura 63:** Avaliação citotóxica da estafarina (A, C) e 5-N-metilmaitenina (B, D) para células Vero e PBMC humano.

## 5.6. Atividade imunomodulatória

Os níveis de citocinas IL-6 e IL-8 foram avaliados por ELISA em sobrenadante de células de PBMC humano tratadas com 5-*N*-metilmaitenina (15 ou 30 µg/mL) ou estefarina (29 ou 58 µg/mL). Os resultados demonstraram que os dois alcaloides inibiram a produção de IL-6 em PBMC humano após 24 horas de tratamento em níveis estatisticamente significantivos ( $p = 0,0001$ ) em comparação com o PBMC não-tratado (Figura 64).

Contudo, apenas a estefarina induziu significantivamente ( $p = 0,01$ ) a redução nos níveis de IL-8, quando comparado ao controle. É interessante a notar, que os níveis de IL-8 aumentaram em comparação ao controle ( $p = 0,01$ ), quando a concentração da 5-*N*-metilmaitenina foi dobrada até 57 µM. Os resultados sugerem que ambos os alcaloides, 5-*N*-metilmaitenina e estefarina, induziram a modulação anti-inflamatória, mas o efeito na expressão da IL-8 foi dose-dependente para 5-*N*-metilmaitenina (Figura 64).



**Figura 64:** Efeito imunomodulador da 5-*N*-metilmaitenina (12,5 µM e 25 µM) e estefarina (28,48 µM e 57,0 µM). \* $p = 0,01$ , \*\*\* $p = 0,0001$ .

As propriedades anti-inflamatórias dos inibidores acetilcolinesterase são mediadas pelo sistema colinérgico presente em células imunitárias (BOROVIKOVA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2013). Por exemplo, macrófagos e células T expressam um receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)  $\alpha 7$  homopentamérico, que sendo estimulado, pode promover uma diminuição tanto da produção de citocinas inflamatórias (TNF  $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) como da transcrição dependente do fator NF- $\kappa$ B (SUN *et al.*, 2013). O último mecanismo da regulação pode ser envolvido na patogênese de várias doenças crônicas, como asma, artrite reumatoide, aterosclerose e até mesmo a doença de Alzheimer (KALTSCHMIDT *et al.*, 1999; PAPANICOLAOU *et al.*, 1998; ROSS, 1993; TAK *et al.*, 2001).

Neste estudo, não avaliamos o potencial da estefarina e da 5-*N*-metilmaitenina na modulação da resposta imunitária pelo NF- $\kappa$ B. No entanto, nossos estudos demonstraram que a regulação anti-inflamatória colinérgica através dos inibidores da AChE poderia reduzir a produção de IL-6 e IL-8, que abre caminho para proteção contra os danos provocados pelas inflamações em diferentes tipos de doenças inflamatórias.

## 5.7. Estudo de *docking* molecular da estefarina e 5-*N*-metilmaitenina

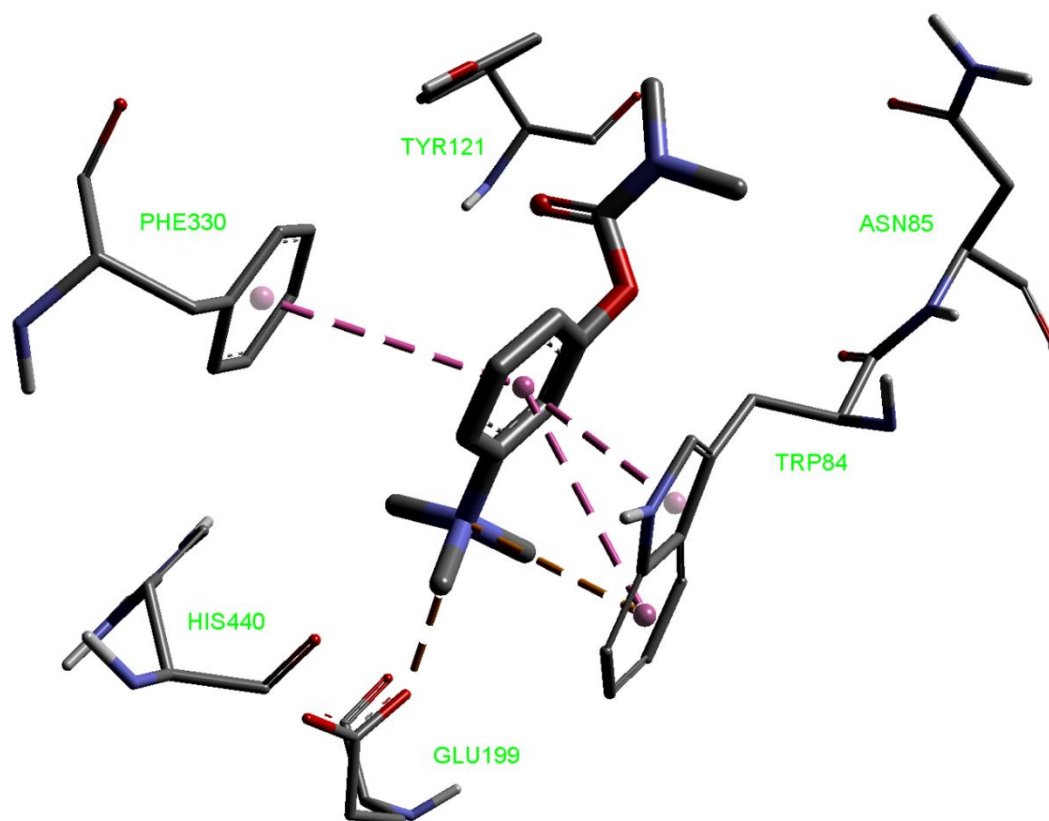
### 5.7.1. Interação com acetilcolinesterase da *Tetronarce californica* (TcAChE)

A estrutura de raios-X da AChE da raia elétrica *T. californica* foi obtida a partir do Banco de Dados de Proteínas RCSB PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*) sob o código 6H12 (OUKOLOFF *et al.*, 2019). A estrutura cristalina recuperada do banco de dados é um aduto da AChE com um ligante de ureia funcionalizada. Para verificar a confiabilidade da metodologia, estudos preliminares de *docking* foram realizados com a estrutura do ligante obtida nos experimentos da difração de raios-X. Os cálculos foram de acordo com a estrutura experimental do aduto. O *docking* molecular foi primeiramente realizado para a neostigmina, conhecida como um eficiente inibidor da AChE utilizado como controle positivo neste estudo. De acordo com os resultados *in silico*, o valor da afinidade de ligação foi -7,2 kcal/mol.

A 5-*N*-metilmaitenina se liga ao sítio ativo da AChE com a afinidade de -9,9 kcal/mol. Estefarina se encaixa bem dentro do sítio ativo da AChE com uma afinidade de ligação prevista de -10,2 kcal/mol.

O estudo de *docking* forneceu uma ferramenta muito útil na interpretação dos resultados da atividade inibitória da AChE, indicando que as moléculas investigadas foram capazes de se ligar efetivamente ao sítio ativo da enzima TcAChE.

Os cálculos mostraram, que a neostigmina forma um empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com os anéis aromáticos de aminoácidos do então chamado subsítio aniônico da enzima, correspondente ao bolso de ligação da colina (Trp84 e Phe330). Esta interação é reforçada também pelas duas interações eletrostáticas atrativas: a primeira está entre o nitrogênio do amônio quaternário carregado positivamente e um grupo carboxílico do Glu199, a segunda interação é formada entre o mesmo átomo de nitrogênio e um anel aromático do Trp84, embora a uma distância bastante alta de aproximadamente 4,4 Å (Figura 65).

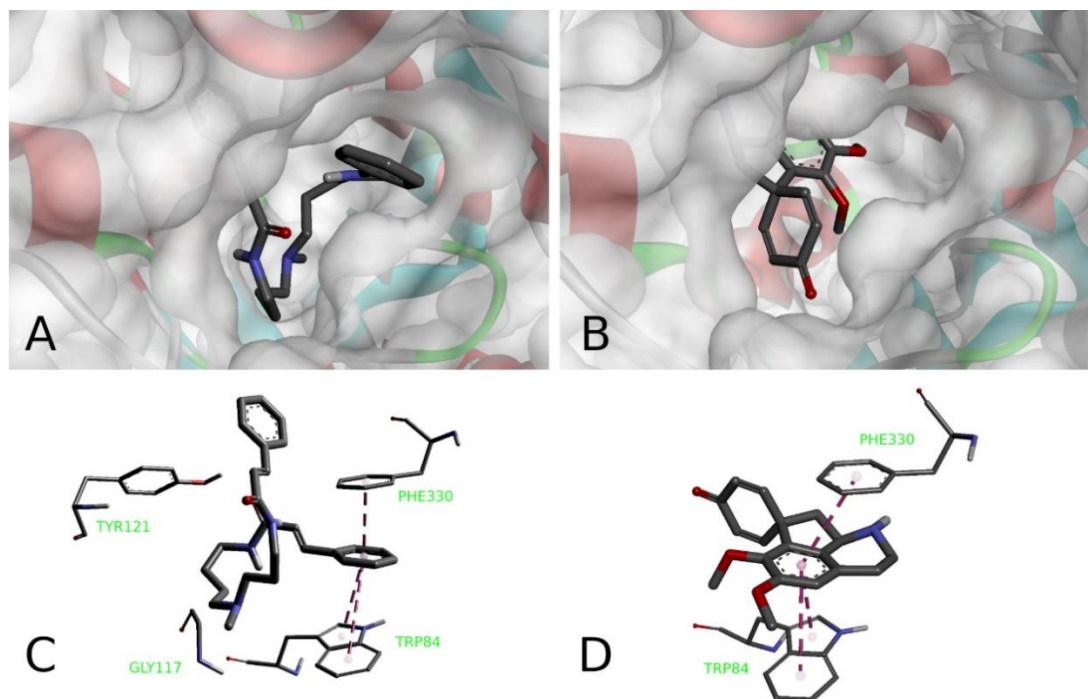


**Figura 65:** Interações da neostigmina com o bolso de ligação da enzima AChE. Interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  (lilás) e eletrostáticas (marrom).

Como o bolso do sítio ativo da AChE forma uma cavidade profunda e estreita, formada por 40 % de resíduos aromáticos (DVIR *et al.*, 2010), as interações hidrofóbicas desempenham um papel importante na ligação dos alcaloides estudados à enzima AChE (Figura 66).

Os dados de *docking* indicam que 5-*N*-metilmaitenina é um ligante plausível para a enzima, que pode adotar uma ampla variedade de poses de ligação devido à sua flexibilidade conformacional. Um dos anéis da parte do ácido cinâmico posiciona-se entre os dois resíduos aromáticos da AChE, o Trp84 e o Phe330 à distância de 3,6 Å a 3,9 Å, respectivamente, um valor típico para uma ligação  $\pi$ - $\pi$  do empilhamento paralelo deslocado. Também foram observadas interações com os subsítios periféricos Tyr121 e Gly117 (Figura 66).

A estefarina se encaixou muito bem dentro do bolso da AChE com uma afinidade de ligação prevista de -10,2 kcal/mol. Essa energia corresponde à interação significativa entre o ligante e o receptor (Figura 66). De novo, a ligação  $\pi$ - $\pi$  é a principal interação do receptor-ligante.



**Figura 66:** Poses de ligação (A, B) dos alcaloides dentro do bolso da AChE e seus modos de ligação (C, D): 5-*N*-metilmaitenina (A, C) e estefarina (B, D).

Ambos os alcaloides têm suas poses de ligação no subsítio aniônico lipofílico (Trp84 e Phe330) do receptor TcAChE (Figura 67), onde são capazes de interagir com o bolso enzimático.

Todas as três substâncias estudadas (neostigmina, 5-*N*-metilmaitenina, e estefarina) possuem anel aromático como a característica estrutural mais importante, que leva a interações semelhantes, responsáveis pela afinidade delas com a AChE. A interação preferencial do nitrogênio quaternário da neostigmina com os elétrons  $\pi$  dos anéis aromáticos no sítio de ligação da enzima, indica a maior afinidade desse subsítio aos ligantes de amônio facilmente polarizáveis (SUSSMAN *et al.*, 1991). Como os alcaloides em estudo não possuem esses fragmentos, os valores de  $CI_{50}$  deles são mais altos em comparação à neostigmina.

O sítio de ligação aniônico periférico da enzima também está associado a uma agregação anormal de proteínas  $\beta$ -amiloides mediada por AChE em pacientes com doença de Alzheimer (MELCHIORRE *et al.*, 1998; INESTROSA *et al.*, 1996). É interessante notar que, devido a uma flexibilidade conformacional da molécula, a 5-*N*-metilmaitenina interage simultaneamente com os subsítios aniônico e periférico da AChE. Portanto, 5-*N*-metilmaitenina pode ter um maior potencial farmacológico

(MELCHIORRE *et al.*, 1998) em comparação com a estefarina que interagiu apenas com o subsítio ativo aniônico.

O estudo teórico dos alcaloides 5-*N*-metilmaitenina e estefarina foi reportado pela primeira vez e revelou que ambas as substâncias são inibidores da AChE. A capacidade da 5-*N*-metilmaitenina de interagir simultaneamente com vários subsítios na estrutura da enzima pode fornecer uma orientação importante na busca de novas substâncias ativas para o tratamento de distúrbios neurológicos (COLOVIC *et al.*, 2013).

### 5.7.2. Interação com interleucinas (IL-6 e IL-8) humanas

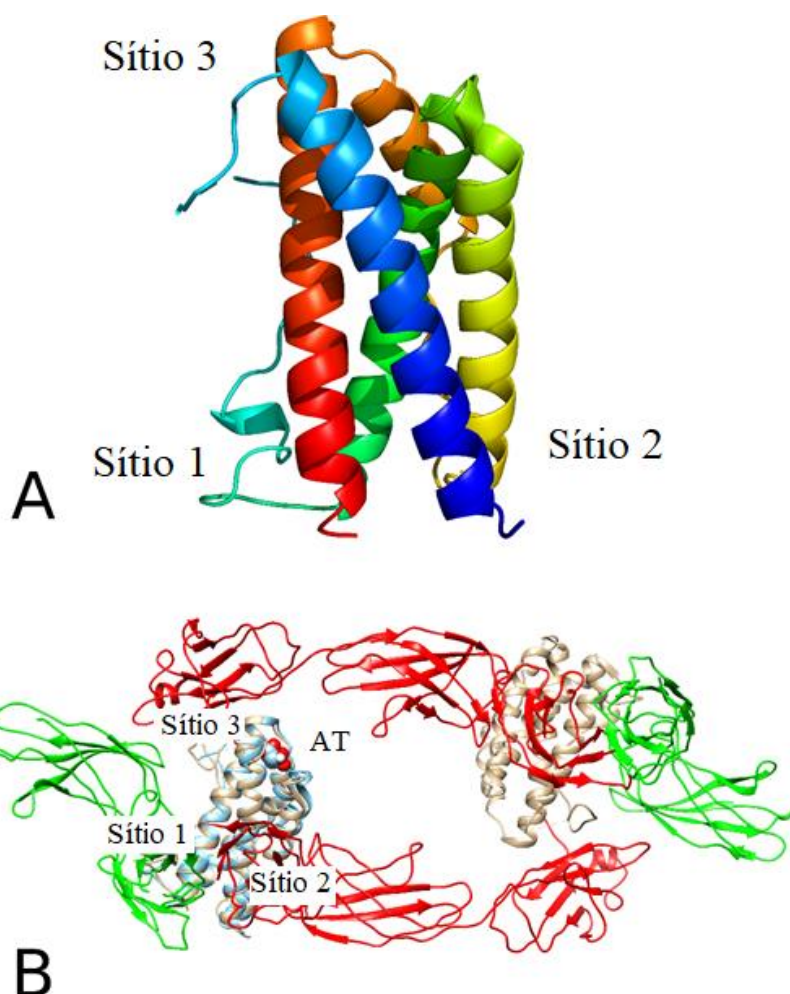
Para os estudos *in silico* foi utilizada a estrutura de raios-X da interleucina-6 humana (RCSB PDB, código ID: 1ALU) (SOMERS *et al.*, 1997). A estrutura contém uma molécula de ácido *L*(+)-tartárico co-cristalizada com duas proteínas IL-6 (Figura 67). Durante o evento de sinalização celular a IL-6 se associa ao receptor de IL-6 (IL-6r), formando um complexo. Em seguida, a segunda proteína do receptor, a glicoproteína gp130, liga-se ao complexo, formando um dímero e iniciando a sinalização (BOULANGER, 2003; CHOY e ROSE-JOHN, 2017; SOMERS *et al.*, 1997). A estrutura de raios-X do complexo receptor-interleucina foi encontrada no banco de dados de proteínas RCSB PDB sob o código ID: 1P9M (BOULANGER, 2003).

De acordo com a literatura (SOMERS *et al.*, 1997), a molécula IL-6 possui três sítios de ligação, onde ocorrem as interações com a proteína do receptor e com a segunda molécula da IL-6 (Figura 67). A interação IL-6 - IL-6r ocorre no sítio 1, enquanto nos sítios 2 e 3 a IL-6 interage com a gp130. Como a molécula de IL-6 não possui um bolso de ligação aparente, foi realizado um estudo de *docking* preliminar cobrindo toda a superfície da proteína.

Os resultados mostraram várias conformações de ligação do *L*-ácido tartárico em uma região superior da proteína, próxima do sítio 3, onde o ligante interage simultaneamente com três hélices da IL 6 (Figura 67B). As afinidades de ligação estão na faixa de -4,2 a -4,4 kcal/mol. Porém na estrutura experimental determinada por raios-X, o *L*-tartarato é ligado ao sítio 1, porque a molécula do ligante interage com duas moléculas de IL-6 ao mesmo tempo.

A 5-*N*-metilmaitenina se liga à alça posterior da estrutura da IL-6 em uma conformação dobrada (Figura 68) com a afinidade máxima de ligação de -5,1 kcal/mol. Dois átomos de oxigênio dos resíduos de ácido cinâmico da 5-*N*-metilmaitenina estão envolvidos como

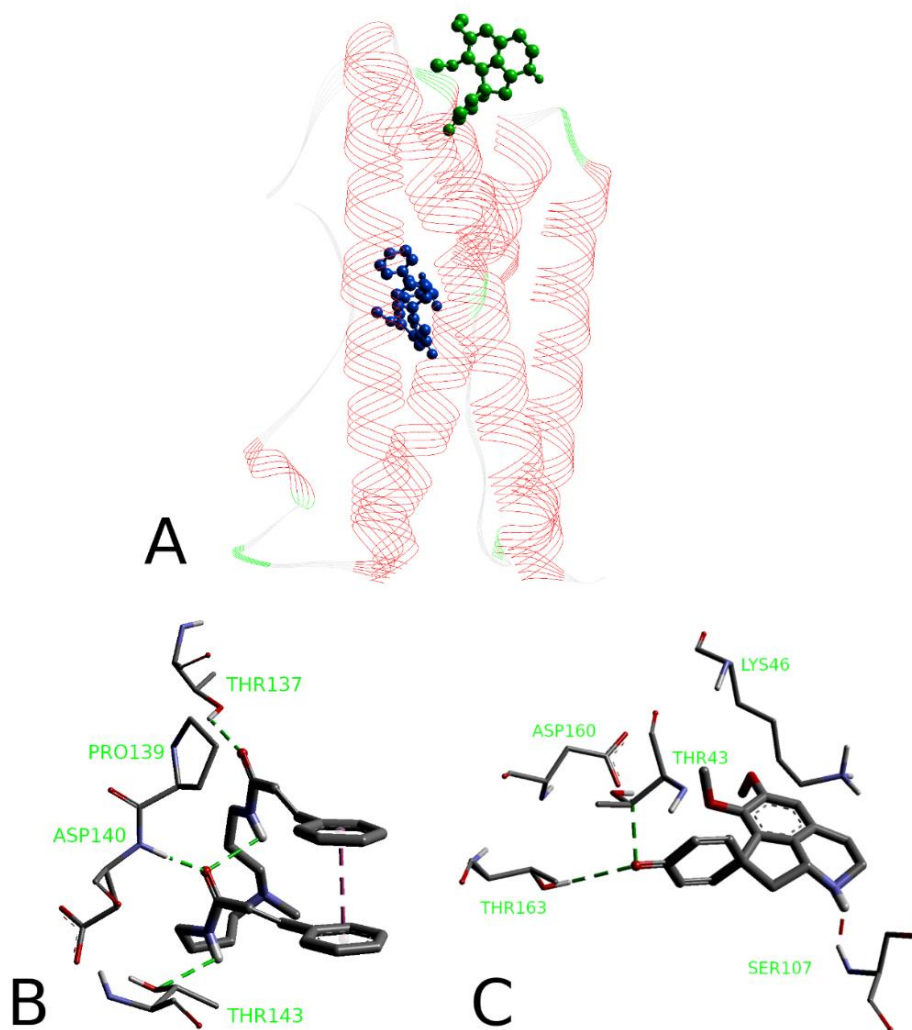




**Figura 67:** Sítios de interação da IL-6 de acordo com Somers *et al.*, (1997) (A); Poses de ligação do ácido *L*-tartárico (AT) com a IL-6 (B). O complexo receptor - IL-6 (B). As estruturas de IL-6 sobrepostas são coloridas em fitas brancas (1P9M) e azuis (1ALU).

acceptores na formação de duas ligações de hidrogênio com a hidroxila do resíduo Thr137 e com o grupo amino de Asp140 como doadores. Outra ligação de hidrogênio é formada entre o átomo de oxigênio da Thr143 e o próton -NH da 5-*N*-metilmaitenina. A conformação dobrada da 5-*N*-metilmaitenina é estabilizada pelas ligações intramoleculares de hidrogênio e  $\pi$ - $\pi$  (Figura 68B).

De maneira semelhante ao ácido *L*-tartárico (Figura 67B), a estefarina liga-se à região superior da IL-6, interagindo com as três hélices  $\alpha$  com a afinidade de -6,5 kcal/mol (Figura 68). A 5-*N*-metilmaitenina pode interagir também com o sítio 1, mas com uma menor afinidade de -5,1 kcal/mol. As ligações de hidrogênio entre a carbonila do anel D da estefarina e duas hidroxilas dos resíduos Thr163 e Thr43 da interleucina são as interações mais importantes para o alcaloide (Figura 68C). Há também uma interação repulsiva



**Figura 68:** Poses de ligação (A) da 5-*N*-metilmaitenina (azul) e estefarina (verde) na IL-6 e seus modos de ligação: 5-*N*-metilmaitenina (B) e estefarina (C).

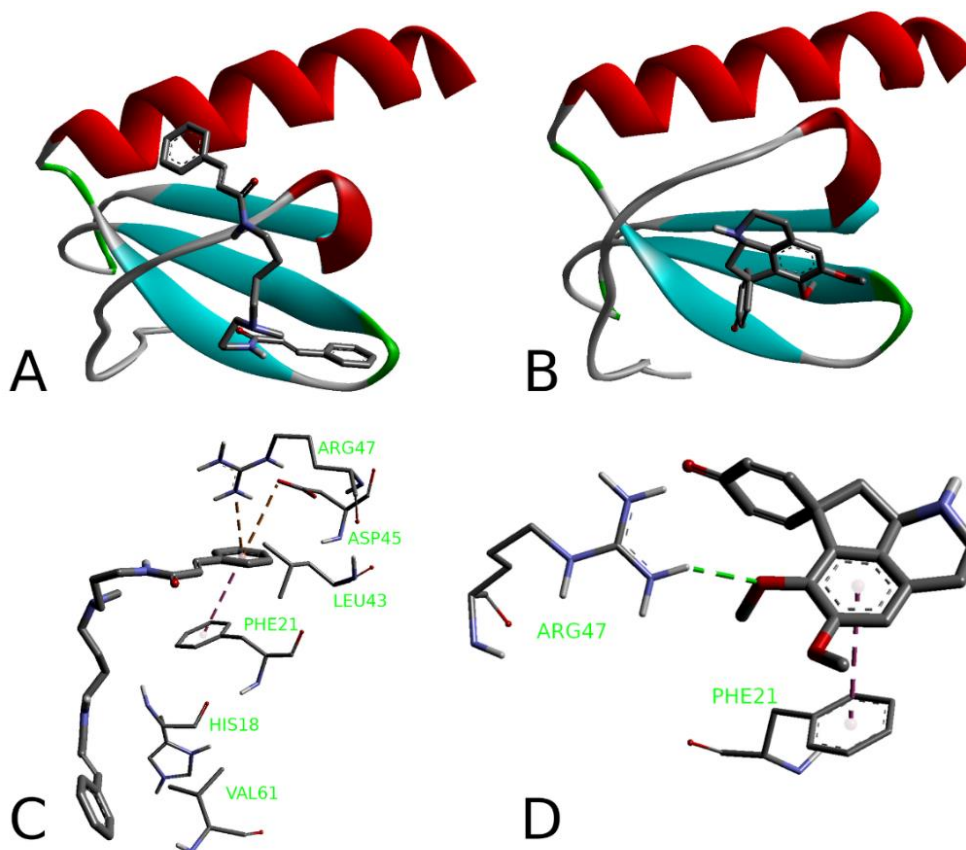
presente entre o grupo -NH da estefarina e o próton do grupo amino do resíduo Ser107, ambos com a carga positiva.

Conforme mencionado na parte 5.6 (pág. 115), ambos os alcaloides regulam a indução de IL-6 de uma maneira semelhante.

A estrutura molecular da interleucina-8 foi encontrada no banco de dados de proteínas RCSB PDB sob o código ID: 3IL8 (BALDWIN *et al.*, 1991).

5-*N*-metilmaitenina e estefarina interagem com IL-8 com afinidades de ligação de -6,9 kcal/mol e -5,9 kcal/mol, respectivamente. Ambos os alcaloides se ligam ao bolso raso entre os resíduos Thr12-Pro19 e uma região da folha- $\beta$  Ile40-Cys50 (Figura 69 A,B).

A 5-*N*-metilmaitenina forma uma interação aromática com o grupo fenil da Phe21 e duas interações eletrostáticas do tipo carga- $\pi$  com a parte guanidina da Arg47 e com a carboxila de Asp45 (Figura 69C).



**Figura 69:** Posições de ligação (A, B) dos alcaloides na IL-8 e seus modos de ligação (C, D): 5-*N*-metilmaitenina (A, C) e estefarina (B,D).

No caso da 5-*N*-metilmaitenina, a produção da IL-8 parece ocorrer de uma maneira regulada em função da dose (Figura 64).

A estefarina liga-se ao bolso da interleucina-8 de maneira semelhante, pela interação  $\pi$ - $\pi$  com a Phe21, mas atua como um aceptor de ligação de hidrogênio com o próton -NH do resíduo Arg47 (Figura 69D). Esse fato poderia sugerir uma inibição ligeiramente mais forte da produção de IL-8 pela estefarina.

Principalmente as interleucinas IL-6 e IL-8 desempenham um papel crucial na quimiotaxia seletiva, degranulação e ativação de neutrófilos, e altos níveis delas estão associados à imunopatogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas como lesão celular na inflamação renal, maus resultados em diferentes manifestações neurológicas e infiltração excessiva de neutrófilos nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística (BONFIELD *et al.*, 1995; MEHTA *et al.*, 2017; PAPANICOLAOU *et al.*, 1998). Assim, terapias direcionadas às citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8 têm implicações clínicas importantes.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em contribuição ao estudo dos principais constituintes químicos de *A. panurensis*, as análises por LS-MS/MS e CLAE-DAD-MS/MS permitiram detectar treze alcaloides (isoquinolínicos e amidas) na espécie. *A. panurensis* apresentou predominância de alcaloides isoquinolínicos, sendo possível o isolamento e identificação de cinco alcaloides inéditos: isômero da lindoldamina (bisbenzilisoquinolínico), palmatina (protoberberínico), estefarina (proaporfínico), 5-*N*-metilmaitenina (poliamina) e *N-trans*-feruloiltiramina (amida). O estudo abordou pela primeira vez o isolamento de 5-*N*-metilmaitenina a partir da fonte natural e o primeiro relato na família *Menispermaceae*.

Os alcaloides isolados mostraram potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase nos ensaios *in vitro*, exceto *N-trans*-feruloiltiramina que foi inativa. Estefarina e 5-*N*-metilmaitenina foram os alcaloides mais promissores e o estudo teórico *in silico* mostrou que as substâncias em questão, se ligam efetivamente ao sítio ativo da enzima AChE demonstrando potencial de inibição promissor. Devido à maior flexibilidade conformacional da 5-*N*-metilmaitenina, a substância mostrou-se capaz de interagir com os subsítios aniônico e periférico, demonstrando maior potencial de inibição da AChE quando comparada à estefarina.

Os dois alcaloides foram eficazes contra as linhagens de células tumorais K562 e U937, mostrando praticamente nenhuma citotoxicidade para as linhagens de células normais Vero e PBMC humano.

Estefarina e 5-*N*-metilmaitenina demonstraram atividade imunomodulatória em relação às interleucinas IL-6 e IL-8. No primeiro caso, ambos alcaloides inibiram a produção de IL-6 em níveis muito semelhantes, o que provavelmente pode estar relacionado à formação de ligações de hidrogênio com os sítios de ligação das proteínas. Neste último caso, a estefarina inibiu consideravelmente a produção de IL-8 em comparação com a 5-*N*-metilmaitenina, que mostrou uma ação dependente da dose (inibidora na dose de  $CI_{50}$  e estimulante na dose dupla de  $CI_{50}$ ). Tal comportamento possivelmente pode ser explicado por diferentes modos de ligação dos alcaloides aos fragmentos estruturais da IL-8.

Nossos resultados sugerem que a estefarina e 5-*N*-metilmaitenina apresentam potencial como inibidores reversíveis da AChE no tratamento de manifestações de distúrbios neurológicos, bem como candidatos a agentes imunomoduladores no contexto de doenças inflamatórias. No entanto, são necessários mais estudos para uma completa investigação do potencial farmacológico e o perfil toxicológico dessas substâncias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, B. W. P. Contribuição ao estudo da nervação foliar de plantas da flora amazônica. III — Cinco espécies do gênero *Abuta* (*Menispermaceae*). **Acta Amazonica**, v. 2 (1), p. 21-22, 1972.

AMARO, C. A. B.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; HERRERA-RUIZ, M.; ROMÁN-RAMOS, R.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER, E. Hypoglycemic and hypotensive activity of a root extract of *Smilax aristolochiifolia*, standardized on *N-trans*-feruloyl-tyramine. **Molecules**, v. 19 (8), p. 11366–11384, 2014.

ANASTASIOU, C.; BUCHBAUER, G. Essential Oils as Immunomodulators: Some Examples. **Open Chemistry**, v. 15 (1), 2017.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, p. 1045–1049, 1989.

BAJPAI, V.; SINGH, A.; CHANDRA, P.; NEGI, M. P. S.; KUMAR, N.; KUMAR, B.. Analysis of phytochemical variations in dioecious *Tinospora cordifolia* stems using HPLC/QTOF MS/MS and UPLC/QqQLIT-MS/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 27 (2), p. 92–99, 2016.

BALA, M.; VERMA, P. K.; AWASTHI, S.; KUMAR, N.; LAL, B.; SINGH, B. Chemical prospection of important ayurvedic plant *Tinospora cordifolia* by UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS and NMR. **Natural Product Communications**, v. 10 (1), p. 43–48, 2015.

BALDWIN, E. T. Crystal structure of interleukin 8: Symbiosis of NMR and crystallography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88 (2), p. 502–506, 1991.

BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E. V.; LEITÃO, G. A. I. Alkaloids of the *Menispermaceae*. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 54, p. 1-190, 2000.

BASCONES-MARTINEZ, A.; MATTILA, R.; GOMEZ-FONT, R.; MEURMAN, J. H. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.19 (1), p. e24-e25, 2014.

BENTLEY, K. W.  $\beta$ -Phenylethylamines and the Isoquinoline Alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 5, p. 405–432, 1989.

BIENZ, S.; BISEGGER, P.; GUGGISBERG, A.; HESSE, M.; HESSE, M. Polyamine alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 647–658, 2005.

BOKERN, M.; WITTE, L.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; MEURER-GRIMES, B. Trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines from *Quercus dentata* pollen. **Phytochemistry**, v. 39 (6), p. 1371–1375, 1995.

BONFIELD, T. L.; PANUSKA, J. R.; KONSTAN, M. W.; HILLIARD, K. A.; HILLIARD, J. B.; GHNAIM, H.; BERGER, M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis

lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.152, p. 2111–2118, 1995.

BOROVIKOVA, L. V. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, 2000.

BOULANGER, M. J.; CHOW, D.; BREVNOVA, E. E.; GARCIA, K. C. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6  $\alpha$ -receptor/gp130 complex. **Science**, v. 300 (5628), p. 2101–2104, 2003.

CAMPS, P. Pyrano[3,2-c]quinoline - 6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and  $\beta$ -amyloid directed anti-Alzheimer compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52 (17), p. 5365–5379, 2009.

CARLQUIST, S. Wood and Stem Anatomy of *Menispermaceae*. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 14 (3), p. 155–170, 1995.

CAVA, M.P.; BUCK, K.T.; NOGUCHI, I.; SRINIVASAN, M.; RAO, M.G.; ROCHA, A.I. The alkaloids of *Abuta imene* and *Abuta Rufescens*. **Tetrahedron**, v. 31, p. 1667–1669, 1975a.

CAVA, M. P. SAA, J. M. LAKSHMIKANTHAM, M.V. MITCHELL, M J. panurensine and Norpanurensine, new bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta panurensis*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 40 (18), p. 2647–2649, 1975b.

CAVA, M. P. Alkaloids of *Stephania glabra*. Direct chemical correlation of the absolute configuration of some benzyltetrahydroisoquinoline, proaporphine, and aporphine alkaloids. A protoberberine alkaloid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 33 (7), p. 2785–2789, 1968.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Medica**, v. 64 (5), p. 393–396, 1998.

COMETA, M. F.; FORTUNA, S.; PALAZZINO, G.; VOLPE, M. T.; RENGIFO, S.; ELSA, NICOLETTI, M.; TOMASSINI, L. New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. **Fitoterapia**, v. 83 (3), p. 476–480, 2012.

COSTA, E.V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatterioopsis blepharophylla*, *Guatterioopsis friesiana* e *Guatterioopsis hispida* (*Annonaceae*), 2009. 380f. Tese de doutorado (doutorado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

COSTA, E. V.; SAMPAIO, M. F. C.; SALVADOR, M. J.; NEPEL, A.; BARISON, A. Chemical constituents from the stem bark of *Annona pickelii* (*Annonaceae*). **Quimica Nova**, v. 38 (6), p. 769–776, 2015.

CHANG, F.; HWANG, T.; YANG, Y.; LI, C. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Diterpenes from Formosan *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. **Planta Medica**, v. 72, p.

1344–1347, 2006.

CHANG, H.M.; EL-FISHAWY, A.M.; SLATIKIN, D.J.; SCHIFF, JR, P.L. Quaternary alkaloids of *Tinospora capillipes*. **Planta Medica**, p. 88-90, 1984.

CHOY, E.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 as a Multifunctional Regulator: Inflammation, Immune Response, and Fibrosis. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, v. 2(2), p. S1–S5, 2017.

CLERICUZIO, M.; PIOVANO, M.; CHAMY, M. C.; GARBARINO, J. A.; MILANESIO, M.; VITERBO, D.; VIDARI, G.; VITA, P.. Structural Characterisation of Metabolites from *Pholiota spumosa* ( Basidiomycetes ). **Croatica Chemica Acta**, v. 77(4), p. 605–611, 2004.

CLERICUZIO, M.; TABASSO, S.; GARBARINO, J. A.; PIOVANO, M.; CARDILE, V.; RUSSO, A.; VIDARI, G. Non-phenolic dicinnamamides from *Pholiota spumosa*: Isolation, synthesis and antitumour activity. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 33, p. 5551–5559, 2007.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11 (3), p. 315–335, 2013.

DAMAS, P.; BRUNETON, J.; FOURNET, A.; GUINAUDEAU, H. 2-Norlimacusine, nouvelle bisbenzylisoquinoleine isolee de *Sciadotenia eichleriana*. **Journal of Natural Products**, v. 48(1), p. 69–71, 1985.

DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment Release. San Diego Dassault Systèmes, 2018. Disponível em: <<https://www.3ds.com/>>. Acesso em: 10 de julho de 2020.

DAYAN, M.; STHOEGER, Z.; NEIMAN, A.I.; ABARBANEL, J.; SELA, M.; MOZES, E. Immunomodulation by a dual altered peptide ligand of autoreactive responses to the acetylcholine receptor of peripheral blood lymphocytes of patients with myasthenia gravis. **Human Immunology**, v.65 (6), p. 571–577, 2004.

DEEVANHXAY, P.; SUZUKI, M.; MAESHIBU, N.; LI, H.; TANAKA, K.; HIROSE, S. Simultaneous characterization of quaternary alkaloids, 8-oxoprotoberberine alkaloids, and a steroid compound in *Cosciniium fenestratum* by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.50(3), p. 413–425, 2009.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester, United Kingdom. 2009.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na mata Atlântica. UNESP. São Paulo, 2002. 64p.

DONG, J. W.; CAI, L.; FANG, Y. S.; XIAO, H.; LI, Z. J.; DING, Z. T. Proaporphine and aporphine alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Stephania epigaea*.

**Fitoterapia**, v.104, p. 102–107, 2015.

DUTÉ, P.; WEBER, J. F.; FOURNET, A.; CAVÉ, A.; BRUNETON, J. Bis-benzylisoquinoline alkaloids from *Abuta pahnii*. **Phytochemistry**, v. 26(7), p. 2136–2137, 1987.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187(1–3), p. 10–22, 2010.

EFDI, M.; ITOH, T.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. The isolation of secondary metabolites and *in vitro* potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3667–3671, 2007.

ELDUFANI, J.; BLAISE, G. The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 5, p. 175–183, 2019.

ENGLERT, V. G.; KLINGA, K.; RAYMOND H.; SCHLITTLER, E.; VETTERL, W. Die Struktur von Maytenin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 56(39), p. 474–478, 1973.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

ERSHLER, WB. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 41, p. 176–181, 1993.

FLORA 2020, *Menispermaceae* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB163>>. Acesso em: 10 de julho 2020.

FUKUDA, Y.; YONEMITSU, M.; KIMURA, T. Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumée. I. *N-trans*- and *N-cis*-feruloyl tiramine, and a new phenolic glucoside, Tinotuberide. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 31(1), p. 156–161, 1983.

GALARCE-BUSTOS, O.; PAVÓN-PÉREZ, J.; HENRÍQUEZ-AEDO, K.; ARANDA, M. An improved method for a fast screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in cherimoya fruit (*Annona cherimola* Mill.) applying effect-directed analysis via high-performance thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 1–17, 2019.

GARAVITO, G.; RINCÓN, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G.; GIMENEZ, A.; PINZÓN, R.; DEHARO, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107(3), p. 460–462, 2006.



GARCIA, G.R.M.; HENNIG, L.; SHELUKHINA, I.V.; KUDRYAVTSEV, D. S.; BUSSMANN, R.W.; TSETLIN, V. I.; GIANNIS, A. Curare Alkaloids: Constituents of a Matis Dart Poison. **Journal of Natural Products**, v. 78(11), p. 2537-2544, 2015.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H. Early polyamine treatment enhances survival of sympathetic neurons after postnatal axonal injury or immunosympathectomy. **Developmental Brain Research**, v. 38(2), p. 175–181, 1988.

GORPENCHENKO, T. Y.; GRIGORCHUK, V. P.; FEDOREYEV, S. A.; TARBEEVA, D. V.; TCHERNODED, G. K.; BULGAKOV, V. P. Stepharine production in morphogenic cell cultures of *Stephania glabra* (ROXB.) Miers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 128(1), p. 67–76, 2017.

HARADA, A.; SEKIDO, N.; AKAHOSHI, T.; WADA, T.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, p. 559–564, 1994.

HENRIQUE, M. C. Estudo químico e atividade biológica de *Abuta grandifolia* e *Parahancornia amapa*, 2012. 164p. Tese de doutorado (Doutorado em Química) Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus.

HEDBERG, C.; HESSE, M.; WERNER, C. Spermine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases in *Aphelandra tetragona*. **Plant Science**, v. 113(2), p. 149–156, 1996.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, v. 23 (2), p. 181–199, 2006.

HOCQUEMILLER, R; CAVE, A. LA, S. Alcaloide Isoquinoleique Original Isole De *Abuta bullata*. **Journal of Natural Products**, v. 27(2), p. 563-568, 1984.

HUANG, L.; SHI, A.; HE, F.; LI, X. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18(3), p. 1244–1251, 2010.

INESTROSA, N. C.; ALVAREZ, A.; PÉREZ, C. A.; MORENO, R. D.; VICENTE, M.; LINKER, C.; CASANUEVA, O. I.; SOTO, C.; GARRIDO, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- $\beta$ -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. **Neuron**, v.16(4), p. 881–891, 1996.

ITOKAWA, H.; MATSUMOTO, K.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Preparation and antileukemic activity of congeners of tropoloisoquinoline alkaloids from *Abuta concolor*. **Heterocycles**, v. 37, p. 1025–1031, 1994.

JEONG, E. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 1661–1674, 2012.

JIAO, Q.; XU, L.L.; ZHANG, J.Y.; WANG, Z.J.; JIANG, Y.Y. LIU, B.; JIAO, Q.S.; XU, L.L.; ZHANG, J.Y.; WANG, Z.J.; JIANG, Y.Y.; LIU, B. Rapid Characterization and

Identification of Non-Diterpenoid Constituents in *Tinospora sinensis* by CLAE-LTQ-Orbitrap MS<sup>n</sup>. **Molecules**, v. 23(2), p. 274–293, 2018.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 149, p. 1–38, 2003.

KALTSCHMIDT, B.; UHEREK, M.; WELLMANN, H.; VOLK, B.; KALTSCHMIDT, C. Inhibition of NF- $\kappa$ B potentiates amyloid  $\beta$ -mediated neuronal apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96(16), p. 9409–14, 1999.

KIM, E. Y.; MOUDGIL D. M. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. **Cytokine**, v. 98, p. 139–148, 2017.

KIM, Y. C.; KINGSTON, D. G. I. Two phenolic amides from *Cocculus diversifolius*. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 26(3), p. 273–275, 1995.

KONGKIATPAIBOON, S.; DUANGDEE, N.; PRATEEPTONGKUM, S.; TAYANA, N.; INTHAKUSOL, W. Simultaneous HPLC analysis of crebanine, dicentrine, stephanine and tetrahydropalmatine in *Stephania venosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27(6), p. 691–697, 2017.

KONRATH, E. L.; PASSOS, C. D. S.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65(12), p. 1701–1725, 2013.

KOSSOROTOW, A.; WOLF, H. U.; SEILER, N. Regulatory effects of polyamines on membrane bound acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 144(1), p. 21–27, 1974.

KUMAR, V.; BHATT, V.; KUMAR, N. Amides From Plants: Structures and Biological Importance. **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 287–333, 2018.

KUZNETSOV Y.B.; E.V., ARZAMASCEV; M.I., MIRONOVA; A.T., ELISEEV; L.N., BOGONATOVA. Treatment of traumatic and postoperative injuries of the peripheral nervous system. Patent URSS 1713151. 1995.

KOAY, Y. C.; AMIR, F. A review of the secondary metabolites and biological activities of *Tinospora crispa* (*Menispermaceae*). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12(4), p. 641–649, 2013.

KOCH, A.E.; POLVERINI, P.J.; KUNKEL, S.L.; HARLOW, L.A.; DIPIETRO, L.A.; ELNER, V.M.; ELNER, S.G.; STRIETER, R.M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, p. 1798–1801, 1992.

LAVAUULT, M.; BRUNETON, J.; CAVÉ, A.; CHAN, K. C.; DEVERRE, J. R.; SEVENET, T.; GUINAUDEAU, H. Alcaloides bisbenzylisoquinoleiques de *Albortisia* cf. *A. papuana*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 343–347, 1987.

LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H.; AYRES, M. C. C.; AGRIPINO, D. G.; YOUNG, M. C. M. Evaluation of Antifungal and DNA- Damaging Activities of Alkaloids from Branches of *Porcelia macrocarpa*. **Planta Medica**, v. 73, p. 292–295, 2007.

LETAŠIOVÁ, S.; JANTOVÁ, S.; ČIPÁK, L.; MÚČKOVÁ, M. Berberine-antiproliferative activity *in vitro* and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. **Cancer Letters**, v. 239(2), p. 254–262, 2006.

LIMA, J. A.; HAMERSKI, L. Alkaloids as Potential Multi-Target Drugs to Treat Alzheimer's Disease. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 61, p. 301–334, 2018.

LIMA, B. R. Synthesis and Inhibition Evaluation of New Benzyltetrahydroprotoberberine Alkaloids Designed as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 7(629), p. 1-12, 2019.

LIMA, B. R. Integrative approach based on leaf spray mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for comprehensive characterization of isoquinoline-derived alkaloids in leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31(1), p. 79–89, 2020.

LIN, C. C.; NG, L. T.; HSU, F. F.; SHIEH, D. E.; CHIANG, L. C. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31(1–2), p.65–69, 2004.

MANU, A.; TANVI, S.; ANU, D.; NEERAJ, B.; AHMAD, S.A. An Inside Review of *Cissampelos Pareira* Linn: A Potential Medicinal Plant of India. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3(12), p. 38–41, 2012.

MARKS, K. D. The Total Synthesis of (±) Stepharine, 2013. 59p. Thesis of doctoral. University of Texas, USA.

MANOSALVA, L.; MUTIS, A.; QUIROZ, A.; DÍAZ, J.; URZÚA, A.; FAJARDO, V. Identification of isoquinoline alkaloids from berberis microphylla by HPLC ESI-MS/MS. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 13, p. 324–335, 2014.

MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: Recent development (new approaches). **Plant Growth Regulation**, v. 34(1), p. 135–148, 2001.

MEHTA, V. K.; VERMA, R.; GARG, R. K.; MALHOTRA, H. S.; SHARMA, P. K.; JAIN, A. Study of interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with neurological manifestations of dengue. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.63(1), p. 11–15, 2017.

MELCHIORRE, C.; ANDRISANO, V.; BOLOGNESI, M.L.; BUDRIESI, R.; CAVALLI, A.; CAVRINI, V.; ROSINI, M.; TUMIATTI, V.; RECANATINI, M. Acetylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone for potential use against Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41(22), p. 4186–4189, 1998.

MENACHERY, M. D. The Alkaloids of South American *Menispermaceae* - chapter 3. Pennsylvania-USA, 1998. p. 269-302.

MENACHERY, M. D.; CAVA, M. P. Grandirubrine, a new tropolisoquinoline alkaloid. **Heterocycles**, v. 14(7), p. 943–945, 1980.

MILLER-FLEMING, L.; OLIN-SANDOVAL, V.; CAMPBELL, K.; RALSER, M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. **Journal of Molecular Biology**, v. 427(21), p. 3389–3406, 2015.

MORRIS, G.M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30(16), p. 2785–2791, 2009.

MORRISON, L. D.; KISH, S. J. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 197(1), p. 5–8, 1995.

MOBOT – Missouri Botanical Garden. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <<http://www.tropicos.org/Name/40024553>> Acesso em: 10 de julho 2020.

MORITA, H.; MATSUMOTO, K.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Azafluoranthene alkaloids from *Cissampelos pareira*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.41, p. 1307–1308, 1993.

MUREBWAYIRE S, INGGANINAN K, CHANGWIJIT K, FREDERICH M, DUEZ P. *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels (*Menispermaceae*), a potential source of acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61(1), p. 103–107, 2009.

NABAVI, S. M.E. U.; RASTRELLI, L.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E. Aporphines and Alzheimer's Disease: Towards a Medical Approach Facing the Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 3253–3259, 2019.

NEGREL, J.; JAVELLE, F.; PAYNOT, M. Separation of putrescine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases extracted from tobacco callus. **Phytochemistry**, v. 30(4), p. 1089–1092, 1991.

NIWA, T.; DOI, U.; OSAWA, T. Inhibitory activity of corn-derived bisamide compounds against  $\alpha$ -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51(1), p. 90–94, 2003.

NIZRI, E.; IRONY-TUR-SINAI, M.; FARANESH, N.; LAVON, I.; LAVI, E.; WEINSTOCK, M.; BRENNER, T. Suppression of neuroinflammation and immunomodulation by the acetylcholinesterase inhibitor rivastigmine. **Journal of Neuroimmunology**, v. 203(1), p. 12–22, 2008.

OUKOLOFF, K. Design, biological evaluation and X-ray crystallography of nanomolar multifunctional ligands targeting simultaneously acetylcholinesterase and glycogen synthase kinase-3. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 58–77, 2019.

PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R.L.; MANOLAGAS, S. C.; CHROUSOS, G. P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Annals of Internal Medicine**, p. 127–37. 1998.

PARK, J.; DECKER, J. T.; MARGUL, D. J.; SMITH, D.R.; CUMMINGS, B. J.; ANDERSON, A. J.; SHEA, L. D. Local Immunomodulation with Anti-inflammatory Cytokine-Encoding Lentivirus Enhances Functional Recovery after Spinal Cord Injury. **Molecular Therapy**, v. 26(7), p. 1756–1770, 2018.

PAULA, A.; BELÉN, M.; JULIA, M.; PAOLA, N.; CAVALLARO, V. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer 's Disease Therapy. **Current Neuropharmacological**, v. 11(4), p. 388–413, 2013.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25(13), p. 1605–1612, 2004.

PONCHET, M.; MARTIN-TANGUY, J.; MARAIS, A.; MARTIN, C. Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some *Araceae* species. **Phytochemistry**, v. 21(12), p. 2865–2869, 1980.

PENG, Z.; SONG, W.; HAN, F.; CHEN, H.; ZHU, M.; CHEN, Y. Chromatographic tandem mass spectrometric detection of papaverine and its major metabolites in rat urine. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 266(1–3), p. 114–121, 2007.

PÉREZ D. Etnobotánica Medicinal y Biocidas para Malaria en la Región Ucayali. **Folia Amazónica**, v. 13, p. 1-2, 2002.

PINHEIRO, M. L. B.; FILHO, W. W.; ROCHA, I. D. A.; PORTER, B.; WENKER, E. Abutasterone, an ecdysone from *Abuta velutina*. **Phytochemistry**, v. 22(10), p. 2320–2321, 1983.

PINHEIRO, M. L. B.; ROCHA, I. D. A.; FILHO, W. W. Estudo fitoquímico de *Abuta velutina* Gleason. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo-SP. 4 a 11 de julho de 1984.

PyMOL Molecular Graphics System. LLC August Schrödinger, 2010.

PRAKASH, S.; ZAMAN, A. Flavonoids of *Tinospora malabarica*. **Phytochemistry**, v. 21(12), p. 2992–2993, 1982.

QING, Z.; HUANG, J.; YANG, X.; LIU, J.; CAO, H.; XIANG, F.; CHENG, P.; ZENG, J. Anticancer and Reversing Multidrug Resistance Activities of Natural Isoquinoline Alkaloids and their Structure-activity Relationship. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25(38), p. 5088–5114, 2018.

RAMÍREZ, I.; CARABOT, A.; MELÉNDEZ, P.; CARMONA, J.; JIMENEZ, M.; PATEL, A. V.; CRABB, T. A.; BLUNDEN, G.; CARY, P. D.; CROFT, S. L.; COSTA,

- M. Cissampeloflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 645–647, 2003.
- RAITH, K.; NEUBERT, R.; POEAKNAPO, C.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. H.; SCHMIDT, J. Electrospray tandem mass spectrometric investigations of morphinans. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, p. 1262–1269, 2003.
- ROCHA, A. I. D.; LUZ, A. I. R.; SILVA, M. F. D. A presença de alcaloides em espécies botânicas da Amazônia - *Menispermaceae*. **Acta Amazonica**, v. 14(1–2), p. 244–254, 1984.
- ROCHA, I.; CAVA, M. A presença de palmatina da *Abuta grandifolia*, **Publicação INPA**, n. 11, 1969.
- ROSARIO, S. L.; SIIVA, A. J. R. D.; PARENTE, J. P. Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. **Planta Medica**, v. 62, p. 376–377, 1996.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. **Nature**, 1993.
- RUSSO, A. Putrescine-1,4-dicinnamide from *Pholiota spumosa* (Basidiomycetes) inhibits cell growth of human prostate cancer cells. **Phytomedicine**, v. 14(2–3), p. 185–191, 2007.
- RIBEIRO, J. E. L. DA 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, E. L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus-AM: INPA, 1999.
- ROJAS, Y.; SOTO, R.; AMAYA, E.; RETUERTO, F.; FUERTES, C. M. Efecto antitumoral de los alcaloides hidrosolubles de *Abuta grandifolia* (MART) Satidwith, en Línea Celular HEP-2. **Ciencia e Investigación**, v. 7(1), p. 22–26, 2004.
- SANTOS, T. C.; GOMES, T. M.; PINTO, B. A. S.; CAMARA, A. L. ANDRADE, A. M.P. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. **Frontiers in Pharmacology Frontiers Media S.A.**, v. 18, p. 1-14, 2018.
- SAYAGH, C.; LONG, C.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Saponins and alkaloids from *Abuta grandifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 5(1), p. 188–193, 2012.
- SANGSTER, A. W.; STUART, K. L. Ultraviolet Spectra of Alkaloids. **Chemical Reviews**, v. 65(1), p. 69–130, 1965.
- SANNER, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **J. Mol. Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17(1), p. 57–61, 1999.

SCHÄFER, A.; BENZ, H.; FIEDLER, W.; GUGGISBERG, A.; BIENZ, S.; HESSE, M. Polyamine Toxins from Spiders and Wasps. **Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**, v. 45, p. 1–125, 1994.

SCHLITTLER, V.E.; SPITALER, U.; WEBER N. Über die Synthesen von Maytenin, *N*-Methylspermidin und *N*-Methylmaytenin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 56(3), p. 1097–1099, 1973.

SEMWAL, D. K.; SEMWAL, R. B. Efficacy and safety of *Stephania glabra*: An alkaloid-rich traditional medicinal plant. **Natural Product Research**, v. 29(5), p. 396–410, 2015.

SEMWAL, D. K.; SEMWAL, R. B.; VERMAAK, I.; VILJOEN A. From arrow poison to herbal medicine – The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (*Menispermaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1011–1028, 2014.

SHANGGUAN, Y.; HE, J.; KANG, Y.; WANG, Y.; YANG, P.; GUO, J.; HUANG, J. Structural Characterisation of Alkaloids in Leaves and Roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 29(1), p. 101–111, 2018.

SOMERS, W.; STAHL, M.; SEEHRA, J. S. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: Implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. **EMBO Journal**, v. 16(5), p. 989–997, 1997.

STEGLICH, W.; STEFFAN, B.; STROECH, K.; WOLF, M. Pistillarin , ein charakteristischer Inhaltsstoff und einiger Ramaria -Arten (Basidiomycetes). **Z. Naturforsch**, v. 39, p. 10–12, 1984.

STEWART, J. J. P. Stewart Computational Chemistry Colorado Springs. CO. USA. 2016.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19(1), p. 1–32, 2013.

STOW, J. L.; CHING LOW, P.; OFFENHÄUSER, C.; SANGERMANI, D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. **Immunobiology**, v. 214(7), p. 601–612, 2009.

SUSSMAN, J.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253(5022), p. 872–879, 1991.

SWAFFAR, D. S.; HOLLEY, C. J.; FITCH, R. W.; ELKIN, K. R.; ZHANG, C.; STURGILL, J. P.; MENACHERY, M. D. Phytochemical investigation and in vitro cytotoxic evaluation of alkaloids from *Abuta rufescens*. **Planta Medica**, v. 78(3), p. 230–232, 2012.

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and

atmospheric pressure photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11(1), p. 325-327, 2005.

SENOL, F.S.; ORHAN, I. E.; USTUN, O. *In vitro* cholinesterase inhibitory and antioxidant effect of selected coniferous tree species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8(4), p. 269–275, 2015.

SHIM, H.J.; LEE, J. Y.; KIM, B.; HONG, J. General fragmentations of alkaloids in electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry Letters**, v. 4(4), p. 79–82, 2013.

SMYTH, M.J.; ZACHARIAE, C.O.; NORIHISA, Y.; ORTALDO, J.R.; HISHINUMA, A.; MATSUSHIMA, K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 3815–3823, 1991.

SOARES, E.R.; SILVA, F.M.A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B.R.; SILVA, F.A.; BARISON, A.; KOOLEN, H.H.F.; PINHEIRO, M.L. B. SOUZA, A. D.L. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* maas (*Annonaceae*). **Phytochemical Analysis**, v. 26(5), p. 339–345, 2015.

SOUSA, J. S.; BASTOS, M. N. C. GURGEL, E. S. C.; CRUZ, A.P. O. Taxonomia do gênero *Abuta* Aubl. (*Menispermaceae*) no Estado de Rondônia, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 4(3), p. 62–72, 2014.

STEELE, J.C.P.; SIMMONDS, M. S. J.; VEITCH, N. C.; WARHURST, D. C. Evaluation of the Anti-Plasmodial Activity of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Abuta grandifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 413–416, 1999.

STEVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5(2), p. 173–182, 2005.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18(5), p. 523–528, 2004.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679–693, 2007.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. **Cancer Immunol Res**, v. 2, p. 288-294, 2014.

TABASSO, S. Fungal metabolites: Isolation, structural characterization, bioactivity and synthesis, 2007. Thesis of doctoral. Università Degli Studi di Torino. Torino- Italy.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- $\kappa$ B: A key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, p. 1-2, 2001.



TAKAO, K.; TODA, K.; SAITO, T.; SUGITA, Y. Synthesis of amide and ester derivatives of cinnamic acid and its analogs: Evaluation of their free radical scavenging and monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 65(11), p. 1020–1027, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31(2), p. 455–461, 2010.

THORNER, C. W. Alkaloids of the *Menispermaceae*. **Phytochemistry**, v. 9(1), p. 157–187, 1970.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; LARISSA A. B.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; GASPER, A. L. de; ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 136–146, 2015.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; BOONRASRI, N.; BREMNER, J.; TAYLOR, W. Rearranged clerodane diterpenes from *Tinospora baenzigeri*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1335-1340, 1999.

THUY, T. T.; PORZEL, A.; FRANKE, K.; WESSJOHANN, L.; SUNG, T. V.; Isoquinolone and protoberberine alkaloids from *Stephania rotunda*. **Pharmazie**, v. 60 (9), p. 701-704, 2005.

UADKLA, O.; YODKEEREE, S.; BUAYAIRAKSA, M.; MEEPOWPAN, P.; NUNTASAEN, N.; LIMTRAKUL, P.; POMPIMON, W. Antiproliferative effect of alkaloids *via* cell cycle arrest from *Pseuduvaria rugosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 51(3), p. 400–404, 2013.

VIEIRA, G. C.; GADELHA, F.A.A.F.; PEREIRA, R. F.; FERREIRA, L.K.D.P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BOZZA, P. T.; PIUVEZAM, M. R. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 50-56, 2018.

XIAO, J.; SONG, N.; LU, T.; PAN, Y.; SONG, J.; CHEN, G.; SUN, L.; LI, N. Rapid characterization of TCM Qianjinteng by UPLC-QTOF-MS and its application in the evaluation of three species of *Stephania*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 156, p. 284–296, 2018.

WANG, X.; FANG, H.; HUANG, Z.; SHANG, W.; HOU, T.; CHENG, A.; CHENG, H. Imaging ROS signaling in cells and animals. **Journal of Molecular Medicine**, p. 2-4, 2013.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 48–77, 2011.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification and Information Retrieval. Version: 14<sup>th</sup>, 1992. Disponível em:

<<http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/delta/angio/www/menisper.htm>>. Acesso em: 10 de julho 2020.

WATT, J.M., BREYER-BRANDWIJK, M.G. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, 2<sup>nd</sup> ed. Livingstone. London. 1962, p. 756–758.

WET, H.; WYK, B.E.V. An ethnobotanical survey of southern African *Menispermaceae*. **South African Journal of Botany**, v. 74(1), p. 2–9, 2008.

WET, H.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN WYK, B. E. Alkaloids of *Antizoma angustifolia* (*Menispermaceae*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32(12), p. 1145–1152, 2004.

WOLVEKAMP, M.C.; MARQUET, R.L. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. **Immunology Letters**, v. 24, p. 1–9, 1990.

YADAV, M.; PARLE, M.; JINDAL, D. K.; SHARMA, N. Potential effect of spermidine on GABA, dopamine, acetylcholinesterase, oxidative stress and proinflammatory cytokines to diminish ketamine-induced psychotic symptoms in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, p. 207–213, 2018.

YI, T. G.; CHO, Y. K.; LEE, H. J.; KIM, J.; JEON, M. S.; HAM, D.S.; KIM, W. C.; SONG, S.U. A novel immunomodulatory mechanism dependent on acetylcholine secreted by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **International Journal of Stem Cells**, v. 12(2), p. 315–330, 2019.

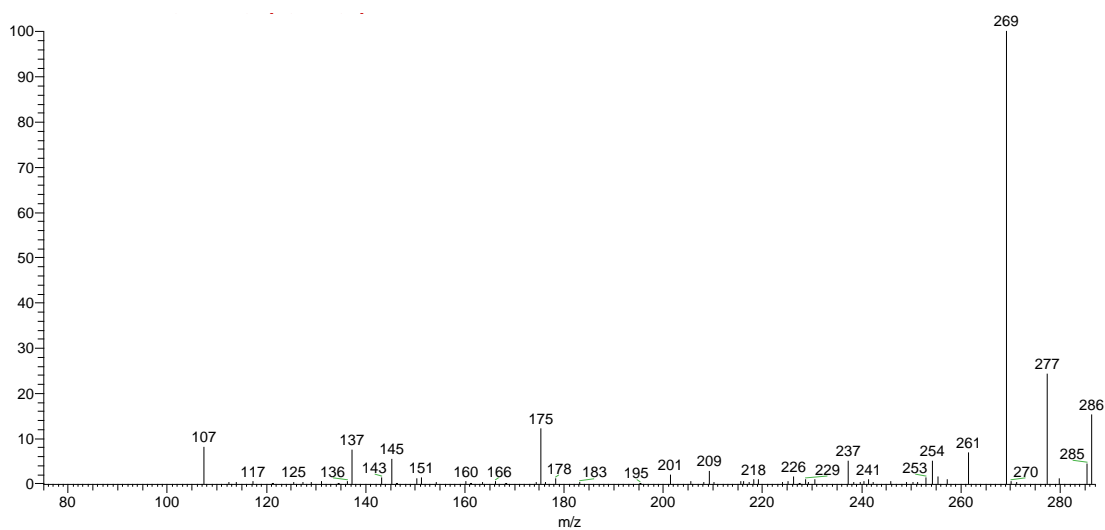
YU, L. L.; LI, R. T.; AI, Y. B.; LIU, W.; DENG, Z.S.; ZOU, Z. M. Protoberberine isoquinoline alkaloids from *Arcangelisia gusanlung*. **Molecules**, v. 19(9), p. 13332–13341, 2014.

ZHANG, J.; CHEN, L.; SUN, J. Oxoisoaporphine Alkaloids: Prospective Anti-Alzheimer's Disease, Anticancer, and Antidepressant Agents. **Chemistry Medical**, v. 13(13), p. 1262–1274, 2018.

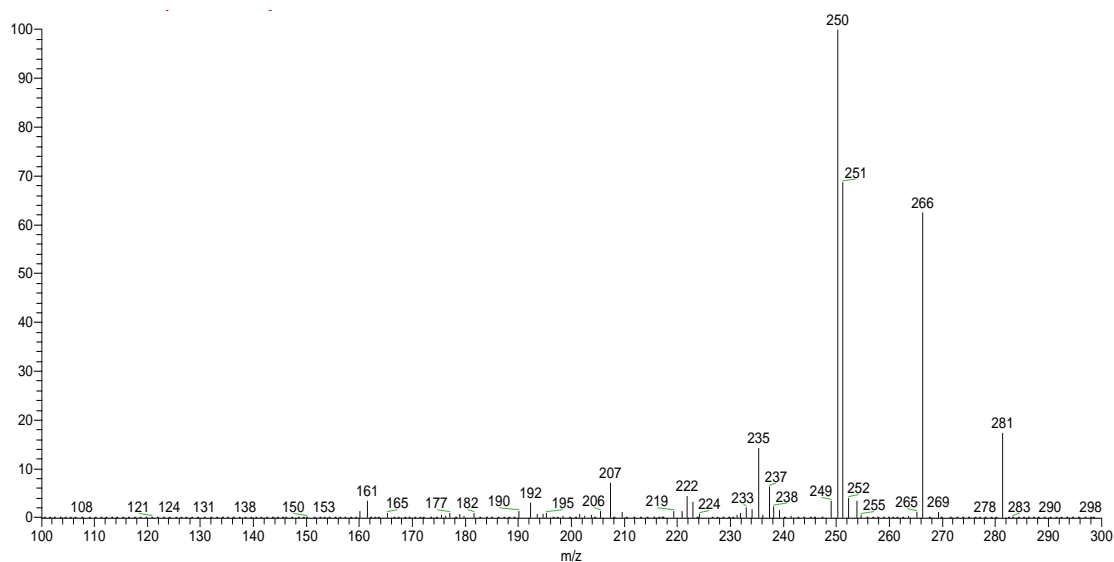
ZHANG, Y.; SHI, Q.; SHI, P.; ZHANG, W.; CHENG, Y. Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 20, p. 2328–2342, 2006.

ZHAO, H.; ZHOU, S.; ZHANG, M.; FENG, J.; WANG, S.; WANG, D.; GENG, Y.; WANG, X. An in vitro AChE inhibition assay combined with UF-HPLC-ESI-Q-TOF/MS approach for screening and characterizing of AChE inhibitors from roots of *Coptis chinensis* Franch. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 120, p. 235–240, 2016.

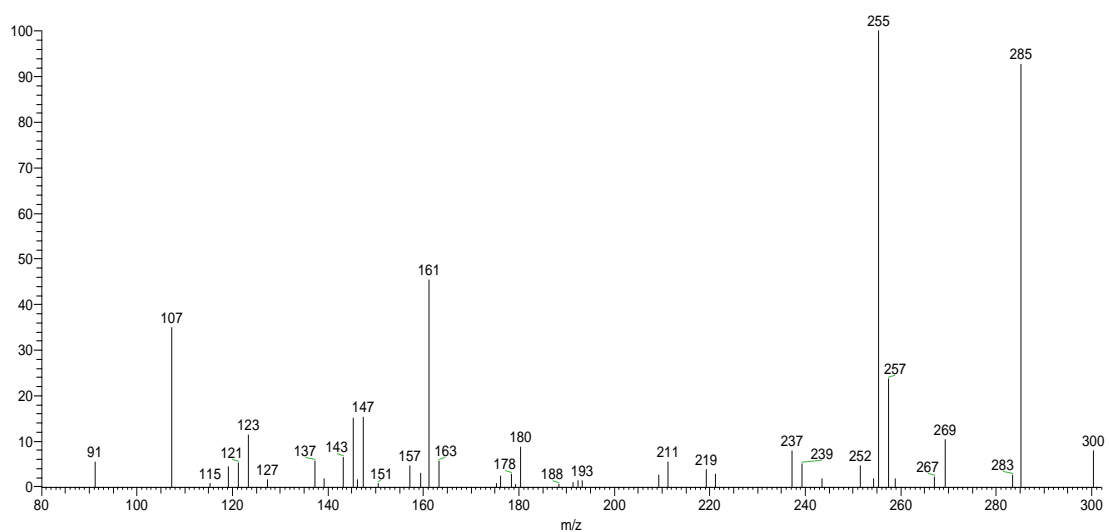
## ANEXO



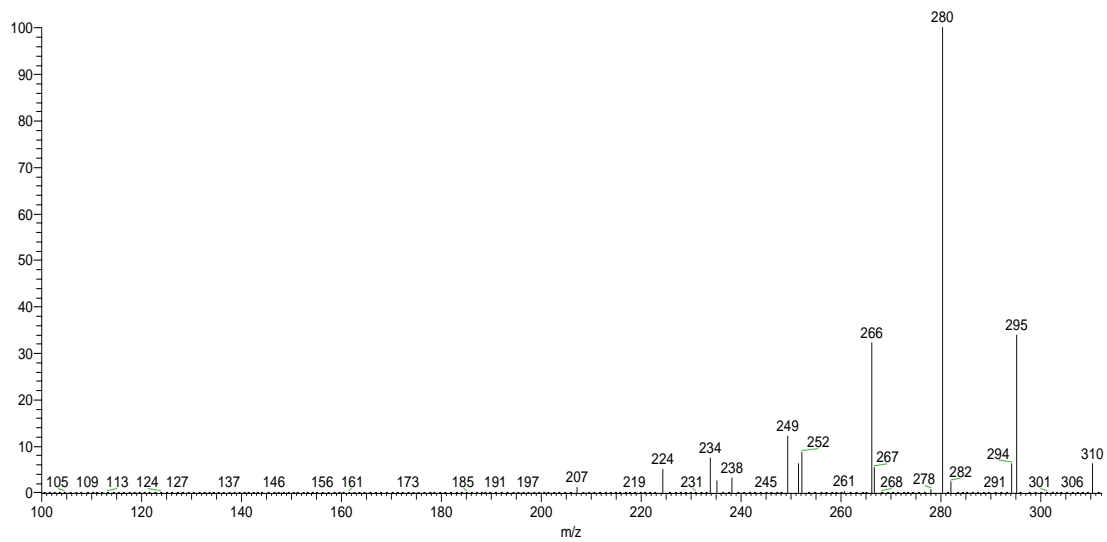
**Figura A1:** Espectro de  $MS^2$  da coclaurina ( $m/z$  286).



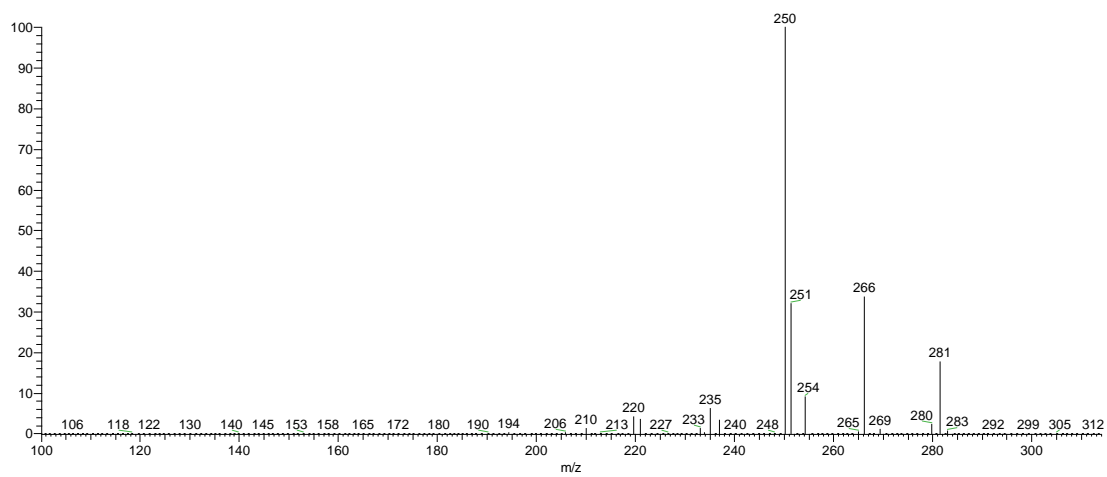
**Figura A2:** Espectro de  $MS^2$  da estefarina ( $m/z$  298).



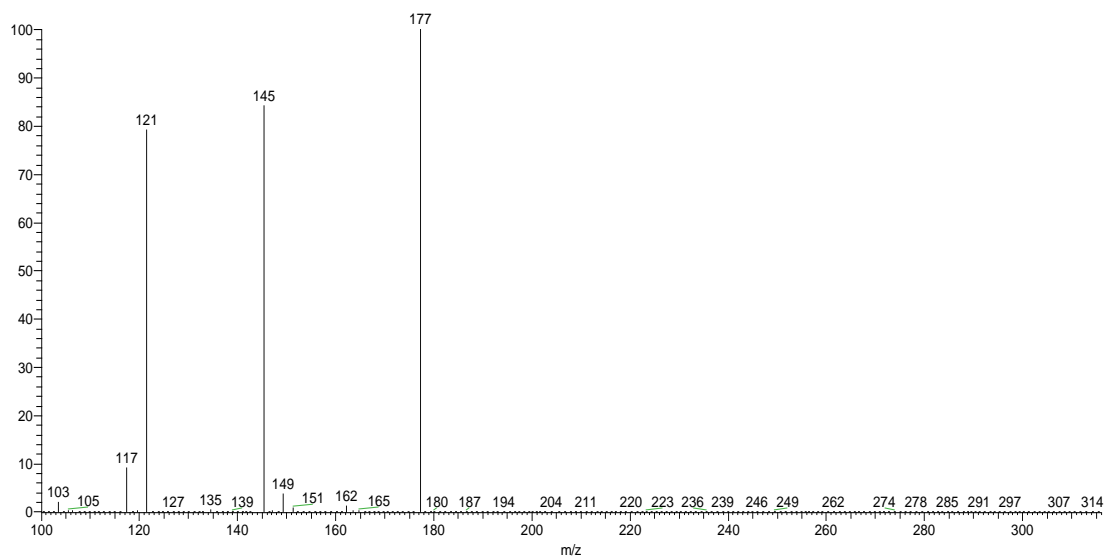
**Figura A3:** Espectro de  $MS^2$  da *N*-metilcoclaurina ( $m/z$  300).



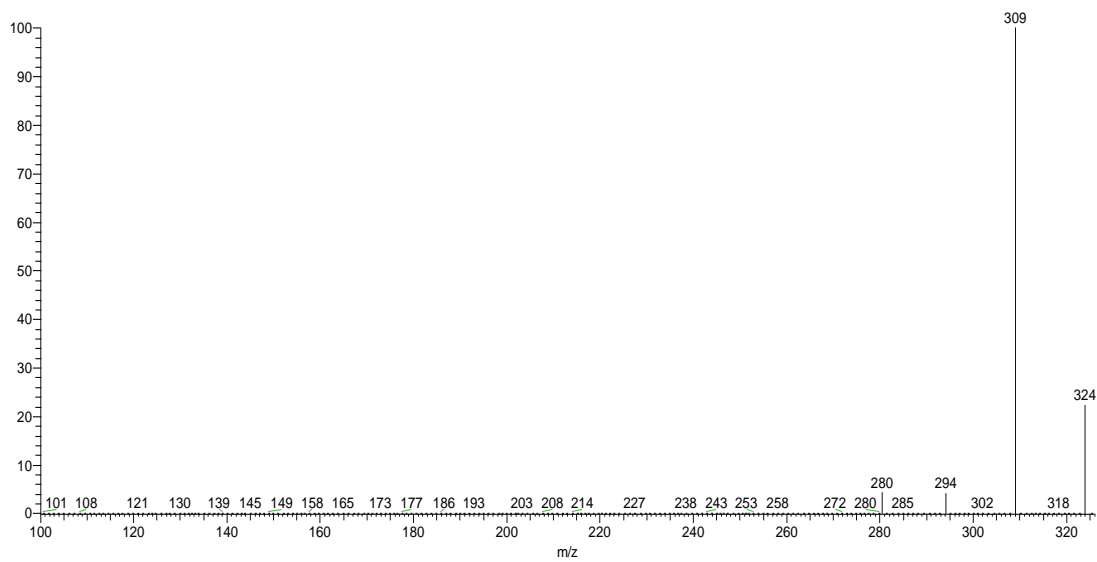
**Figura A4:** Espectro de  $MS^2$  da estefanina ( $m/z$  310).



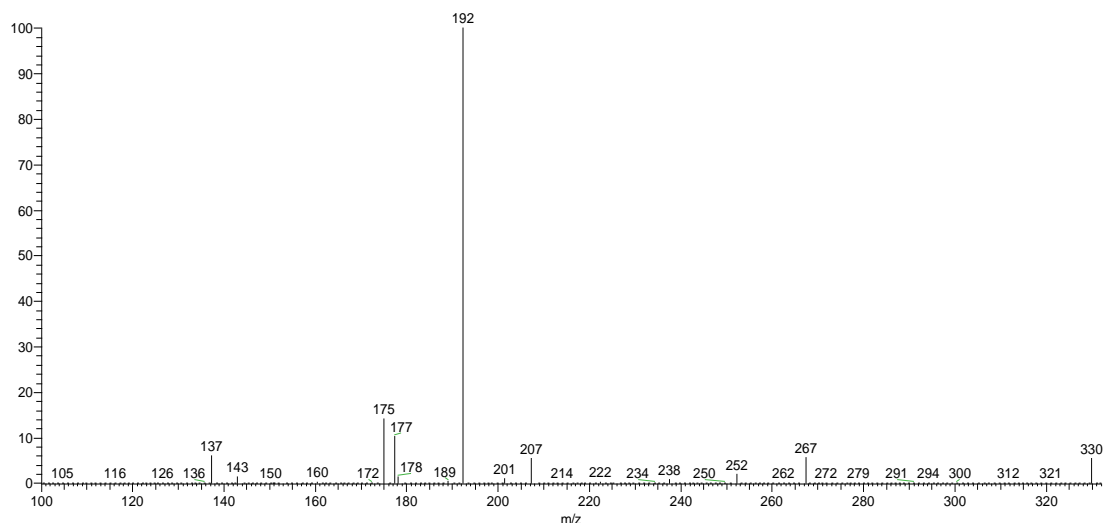
**Figura A5:** Espectro de  $MS^2$  da tebaina ( $m/z$  312).



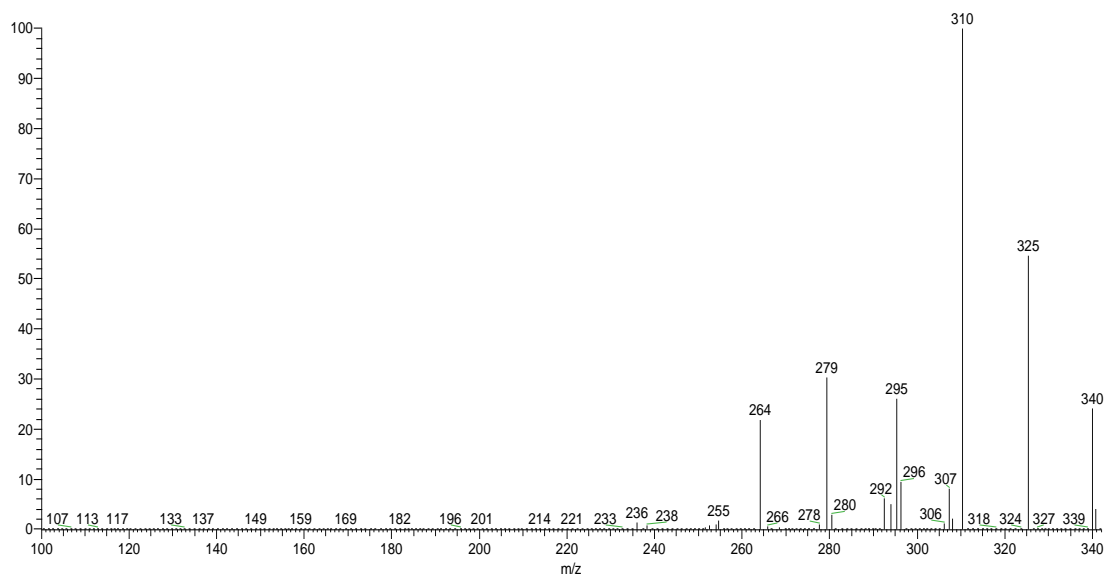
**Figura A6:** Espectro de  $MS^2$  de feruloiltiramina ( $m/z$  314).



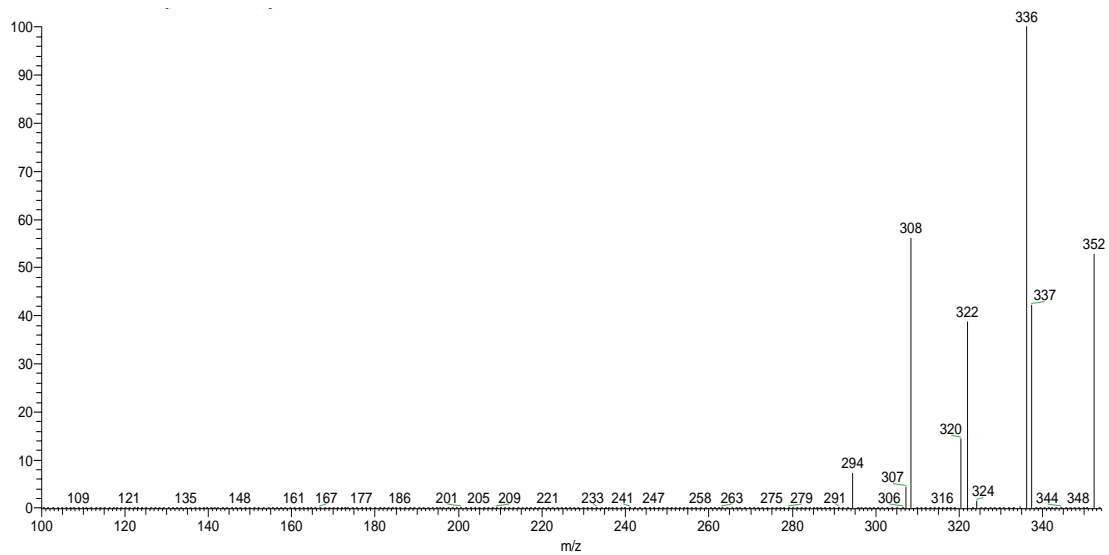
**Figura A7:** Espectro de  $MS^2$  da estefaranina ( $m/z$  324).



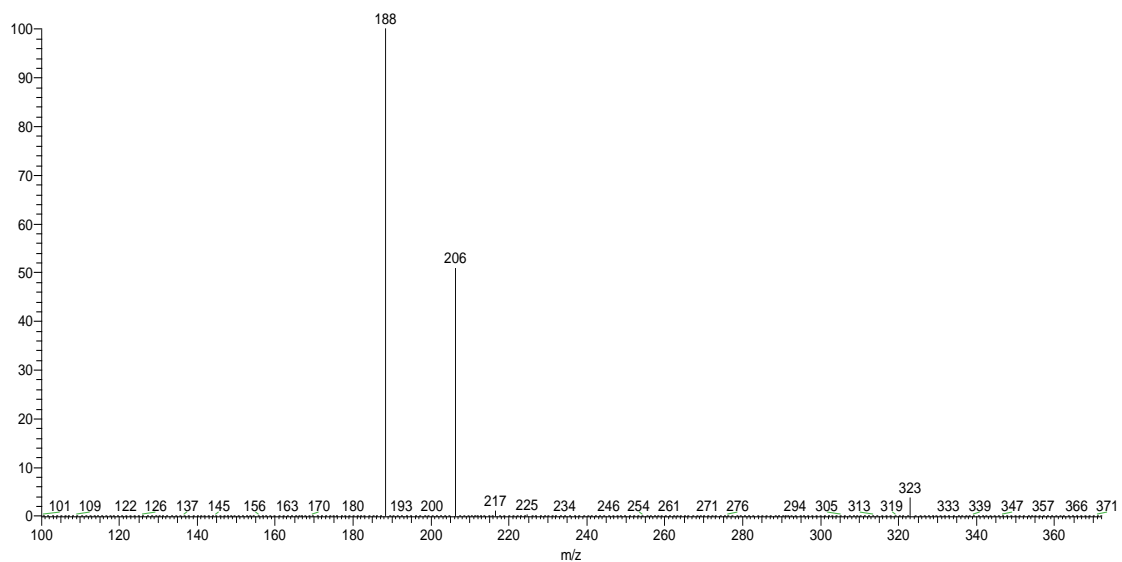
**Figura A8:** Espectro de  $MS^2$  da reticulina ( $m/z$  330).



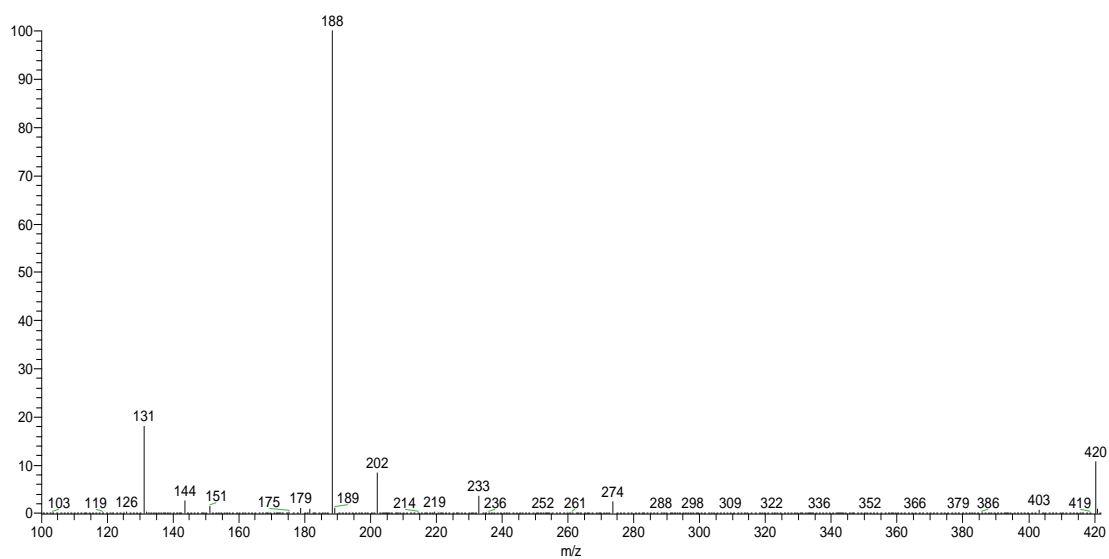
**Figura A9:** Espectro de  $MS^2$  da papaverina ( $m/z$  340).



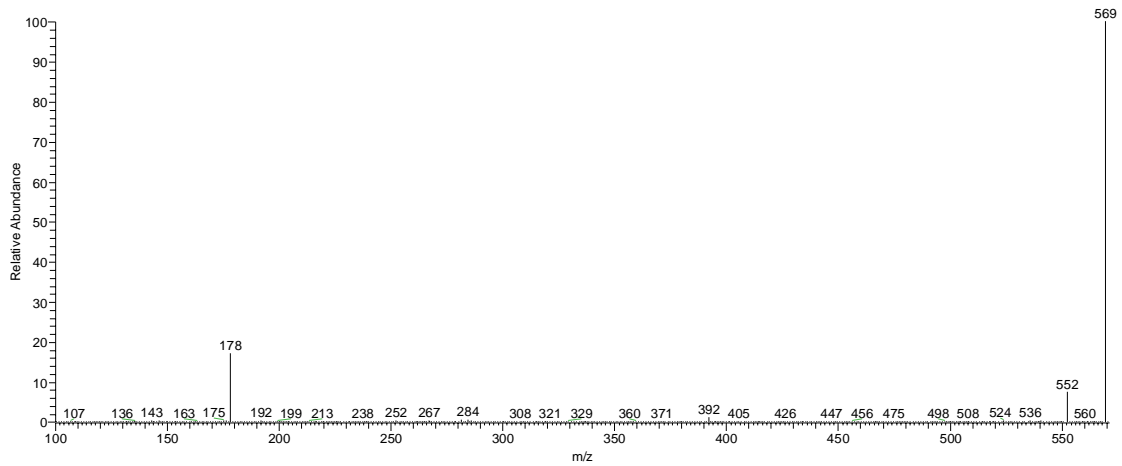
**Figura A 10:** Espectro de  $MS^2$  da palmatina ( $m/z$  352).



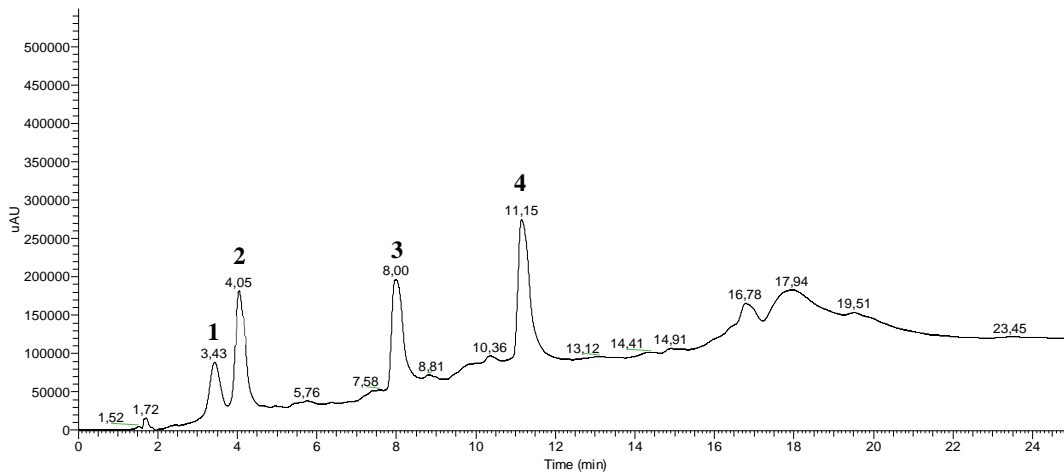
**Figura A11:** Espectro de  $MS^2$  da alocriptopina ( $m/z$  370).



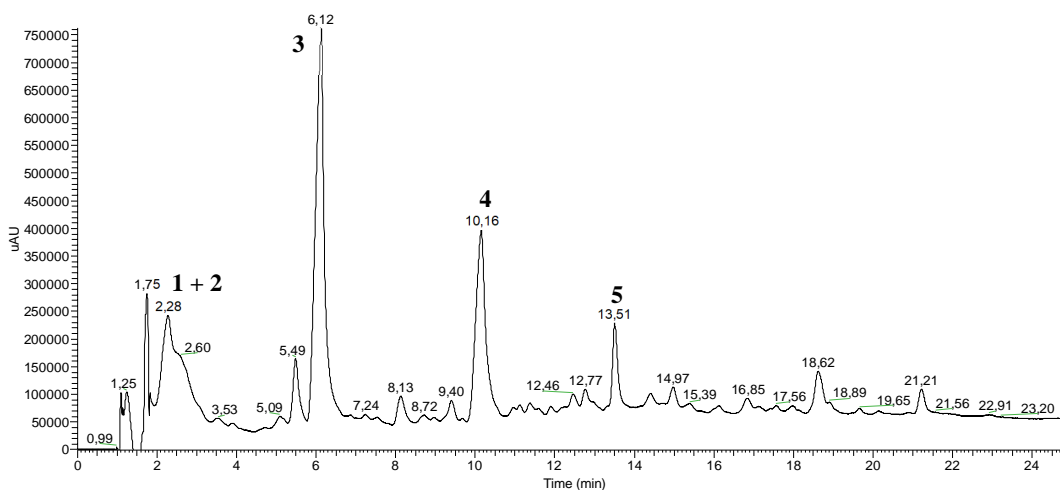
**Figura A12:** Espectro de  $MS^2$  da metilmaitenina ( $m/z$  420).



**Figura A13:** Espectro de MS<sup>2</sup> da lindoldamina ( $m/z$  569).



**Figura A14:** Cromatograma de CLAE-DAD da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis* escala semi-preparativa. A fase móvel foi composta de B (metanol) e A (ácido fórmico 1% em H<sub>2</sub>O v/v), com gradiente de eluição (1): 0-14 min 20-80 % B, 20-30 min 80 % B. Coluna C18 e detector de UV 260 nm e 280 nm.



**Figura A15:** Cromatograma de CLAE-DAD da fração alcaloídica dos galhos de *A. panurensis* escala semi-preparativa. A fase móvel foi composta de B (metanol) e A (ácido fórmico 1% em H<sub>2</sub>O v/v), com gradiente de eluição (2): 0-20 min 20-80 % B, 20-35 min 80 % B, 35-45 min 20-80 %. Coluna C18 e detector de UV 260 nm e 280 nm.