



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTITUMORAL DE UM ESPÉCIME DE *Aspidosperma verbascifolium*
MÜLL. ARG. (APOCYNACEAE) OCORRENTE NO CERRADO DE
MATO GROSSO DO SUL”**

Geanderson Bannwart

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez

Campo Grande - 2017



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTITUMORAL DE UM ESPÉCIME DE *Aspidosperma verbascifolium*
MÜLL. ARG. (APOCYNACEAE) OCORRENTE NO CERRADO DE
MATO GROSSO DO SUL”**

Geanderson Bannwart

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química -
Nível de Doutorado - da
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul para obtenção do
título de Doutor em Química (área
de concentração: Química).

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez

Campo Grande - 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jair Bannwart e Sandra Maria Mantovani Bannwart que me fizeram sempre acreditar que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos, permitindo que nessa vida eu fosse capaz de adquirir conhecimento.

Aos meus amados pais, Jair Bannwart e Sandra Maria Mantovani Bannwart, por toda a dedicação, companheirismo e amor com que me apoiaram durante a realização deste trabalho. “Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar”.

Aos meus irmãos Jefferson Bannwart e Enderson Sergio Bannwart. Irmão é nome sagrado, é ligação para a vida e é dádiva de Deus!

A minha amiga e aluna de iniciação científica Juliana de Souza Peçanha pela inestimável contribuição ao trabalho.

Aos professores Walmir Silva Garcez e Patrícia de Oliveira Figueiredo, aos técnicos do PRONABIO. Principalmente à professora Prof. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez pela orientação.

Ao Professor Arnildo Pott, do instituto de Biociências da UFMS, pela identificação do material botânico.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Aos amigos do PRONABIO, Alex, Danilo, Hino, Pamela, Talita, Patrick e Rodrigo.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que eu alcançasse com êxito essa etapa de vida.

“Se é para criticar, cale-se. Se é para reclamar, dê sugestão. Se é para buscar culpados, busque solução. Se é para se fazer de vítima, faça-se vencedor. Se é para justificar seus erros, aprenda com eles. Se é para julgar as pessoas, julgue suas atitudes”.

RESUMO

Representando cerca de 20% de todos os Produtos Naturais, os alcaloides são considerados substâncias com notórias propriedades biológicas e notável diversidade estrutural, sendo muitas vezes considerados marcadores quimiotaxonômicos para muitas espécies de plantas, incluindo a espécie alvo de nosso estudo, *Aspidosperma verbascifolium* pertencente à família Apocynaceae. O presente trabalho teve por objetivo realizar a identificação dos constituintes químicos de um espécime de *Aspidosperma verbascifolium* ocorrente no Cerrado de Mato Grosso do Sul por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM), bem como o isolamento, purificação e caracterização dos principais metabólitos secundários presentes nas cascas e folhas desta espécie, visando à avaliação de suas propriedades antiproliferativas. O isolamento, purificação e caracterização dos alcaloides copsanol-*N*-óxido, copsanona-*N*-óxido, copsinina-*N*-óxido e 5,22-dioxocopsano, além de β -sitosterol, estigmasterol, quercetina, kaempferol, cafeato de metila, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, etil- β -D-glucopiranosídeo, ácido protocatecuico e 3,4-di-hidroxibenzoato de etila, estão sendo descritos pela primeira vez nesta espécie. Os alcaloides copsanol, 5-oxocopsanol e copsanona, descritos anteriormente nessa espécie, também foram isolados e identificados no presente trabalho. Suas estruturas foram caracterizadas com base na análise CLAE-DAD-EM/EM e nos respectivos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais e por comparação com dados descritos na literatura. Por meio da análise por CLAE-DAD-EM/EM das fases alcaloídicas clorofórmicas provenientes dos extratos etanólicos das folhas e cascas, foram identificadas 13 substâncias das folhas e 9 substâncias das cascas. Para a avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa, sete diferentes linhagens de células neoplásicas foram testadas. Os ensaios revelaram potente atividade citotóxica frente às linhagens testadas, de modo que se mostraram promissores inibidores de tumores. Dentre os extratos brutos, o das cascas foi o que apresentou melhor atividade. Para as fases alcaloídicas, a da casca foi a que apresentou melhor atividade inibitória, principalmente frente a células de ovário e leucêmicas, nesta última com uma alta seletividade. Frente às células leucêmicas, todas as amostras apresentaram valores de GI_{50} menores que 30 $\mu\text{g/mL}$, destacando-se a fase acetato de etila das folhas proveniente da extração ácido base da mesma, que também se mostrou fortemente ativa frente às linhagens de rim e ovário e com

alta seletividade. A viabilidade dos alcaloides isolados como futuro quimioterápico esta sendo testada, porém pode-se ressaltar que compostos alcaloidicos são uma importante classe de agentes bioativos, sendo esta atividade associada ao alto teor de alcaloides encontrados nessas frações.

Palavras-chave: *Aspidosperma verbascifolium*, alcaloides, atividade citotóxica, CLAE-DAD-ESI-Q-TOF-EM/EM

ABSTRACT

Representing about 20% of all Natural Products, alkaloids are considered compounds with notorious biological properties and considerable structural diversity, being often considered chemotaxonomic markers for so many species, including the aim specie of our study, *Aspidosperma verbascifolium* wich belongs to Apocynaceae family. The actual work had as objective performing the identification of chemical constituents from an *Aspidosperma verbascifolium* specimen occurring in vegetation of Brazilian interior in Mato Grosso do Sul by high performance liquid chromatography coupled to diode arrangement detector and sequential mass spectrometer (HPLC-DAD-MS/MS), as well as the isolation, refinement and characterization of the major secondary metabolits presents in bark and leaves of that specie, aiming the valuation of their antiproliferative properties. The isolation, purification and characterization of the alkaloids kopsanol-*N*-oxide, kopsanone-*N*-oxide, kopsinine-*N*-oxide and 5,22-dioxokopsane, besides β -sitosterol, stigmasterol, quercetin, kaempferol, methyl caffeate, 5-O-caffeoylquinic acid, ethyl- β -D-glucopyranoside, protocatechuic acid and ethyl 3,4-dihydroxybenzoate, are being described for the first time in this specie, the alkaloids, kopsanol, 5-oxokopsanol and kopsanone, previously described in this specie, were also isolated and identified in the present work. Their structures had being characterized on the basis of their HPLC-DAD-MS/MS analysis and the respective ^1H -NMR and ^{13}C uni- and bidimensional spectra and by comparison with data described in literature. Through analysis of alkaloids cloroformic phases by HPLC-DAD-MS/MS coming from ethanolic extracts of bark and leaves, 13 substances had been identified from leaves and 9 from bark. For *in vitro* evaluation of antiproliferative activity, seven differents neoplastic cells lineage had been tested. The assays revealed potent cytotoxic activity against the tested lines so that a promising tumor inhibitor is shown. Among the crude extracts, one from bark had presented the best activity. For the alkaloid phases, the bark showed the best inhibitory activity, mainly against ovary and leukemic cells, in the latter with a high selectivity. In contrast to the leukemic cells, all samples presented GI50 values lower than 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$, highlighting the fact that the ethyl acetate phase of the leaves from the base acid extraction of the leaves was also strongly active against the kidney and ovary lines and with high selectivity. The viability of isolated alkaloids as a future chemotherapeutic agent is being tested. However, it is possible to emphasize that alkaloid

compounds are an important class of bioactive agents, being this activity associated to the high alkaloid content found in these fractions.

Keywords: *Aspidosperma verbascifolium*, alkaloids, cytotoxic activity, HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos esteróides A-1 (stigmasterol) e A-2 (β -sitosterol).....	79
Figura 2. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-1+A-2.....	81
Figura 3. Cromatograma de AVFACL-10CD	82
Figura 4. Estrutura química do flavonoide A-3 (quercetina).....	83
Figura 5. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-3	85
Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-3	86
Figura 7 . Cromatograma de AVFACL-10CD	87
Figura 8. Estrutura química do flavonoide A-4 (kaempferol)	88
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-4	90
Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CD_3OD) de A-4	91
Figura 11. Cromatograma de AVFACL-12-8 (8,433 minutos)	92
Figura 12. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AVFACL-12-8p4 das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	93
Figura 13. Espectro A: UV de A-5. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente a A-5. Espectro C: Experimento EM/EM.....	94
Figura 14. Estruturas químicas do alcaloide copsanol- <i>N</i> -óxido e do alcaloide A-5 (copsanol).....	96
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5	98
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5	99
Figura 17. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5	100
Figura 18. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5	101
Figura 19. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5	102
Figura 20. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AVFACL-15-18 das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	103
Figura 21. Espectro A: UV de A-5 (copsanol). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol. Espectro C: Experimento EM/EM.....	104
Figura 22. Espectro A: UV de A-6 (copsanol- <i>N</i> -óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol- <i>N</i> -óxido. Espectro C: Experimento EM/EM	105
Figura 23. Estrutura química do alcaloide A-6 (copsanol- <i>N</i> -óxido)	105

Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6	109
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6	110
Figura 26. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6	111
Figura 27. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6	112
Figura 28. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6	113
Figura 28a. Expansão do mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6.....	109
Figura 28b. Expansão do mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6.....	110
Figura 29. Estrutura química do alcaloide A-7 (5-oxocopsanol).....	116
Figura 30. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AVFACI-13-68 das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	117
Figura 31. Espectro A: UV de A-6 (copsanol- <i>N</i> -óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol- <i>N</i> -óxido. Espectro C: Experimento EM/EM	118
Figura 32. Espectro A: UV de A-7 (5-oxocopsanol). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto 5-oxocopsanol. Espectro C: Experimento EM/EM	119
Figura 33. Estrutura química dos alcaloides copsorinina e copsanol (A-5)	120
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6+A-7	122
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6+A-7..	123
Figura 36. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AFCJ-32-14 das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	124
Figura 37. Espectro A: UV de A-8. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto A-8. Espectro C: Experimento EM/EM	125
Figura 38. Estrutura química de A-8 (Cafeato de metila).....	127
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-8	129
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-8	130
Figura 41. Espectro de RMN de DEPT (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-8.....	131
Figura 42. Mapa de contornos HSQC de A-8.....	132
Figura 43. Mapa de contornos HMBC de A-8.....	133
Figura 44. Cromatograma de AFCJ-15-13	134
Figura 45. Estrutura química do alcaloide A-9 (copsanona)	135

Figura 46. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AVFACI-15-13-p4 das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	136
Figura 47. Espectro A: UV de A-9 (copsanona). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanona. Espectro C: Experimento EM/EM ...	136
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) de A-9	138
Figura 49. Estrutura química do alcaloide A-10 (Copsanona- <i>N</i> -óxido)	139
Figura 50. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AFCJ-32-9/10-9 das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	140
Figura 51. Espectro A: UV de A-10 (copsanona- <i>N</i> -óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanona- <i>N</i> -óxido. Espectro C: Experimento EM/EM.....	140
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-10	143
Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-10	144
Figura 54. Espectro de RMN de DEPT (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-10....	145
Figura 55. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AFCJ-28-31-9 das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	146
Figura 56. Estrutura química do alcaloide A-11 (copsinina- <i>N</i> -óxido)	147
Figura 57. Espectro A: UV de A-11 (copsinina- <i>N</i> -óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsinina- <i>N</i> -óxido. Espectro C: Experimento EM/EM	147
Figura 58. Estrutura química do alcaloide copsinina (Bannwart, 2012)	148
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-11	150
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-11	151
Figura 61. Estrutura química do alcaloide A-12 (5,22-dioxocopsano).....	152
Figura 62. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica AFCJ-32-9/10-7 das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	153
Figura 63. Espectro A: UV de A-12 (5,22-dioxocopsano). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto A-12 (5,22-dioxocopsano). Espectro C: Experimento EM/EM.....	154
Figura 64. Estrutura química dos alcaloides copsorinina e copsanona.....	155
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-12	157

Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-12	158
Figura 67. Mapa de contornos HMBC de A-12.....	159
Figura 68. Cromatograma de pico Base (BPC) da fase alcaloídica AVFACl das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	161
Figura 69. Compostos identificados da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Picos 2 e 3.	163
Figura 70. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol (Pico 2). Espectro C: Experimento EM/EM	163
Figura 71. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto 22-epicopsanol (Pico 3). Espectro C: Experimento EM/EM	164
Figura 72. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Pico 5.....	166
Figura 73. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Pico 7.....	168
Figura 74. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto 5-oxocopsanol (Pico 7). Espectro C: Experimento EM/EM.....	169
Figura 75. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Pico 1.....	170
Figura 76. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanona (Pico 1). Espectro C: Experimento EM/EM.....	171
Figura 77. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina	172
Figura 78. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto aspidofractina (Pico 4). Espectro C: Experimento EM/EM	173

Figura 79. Flavonoides identificados na fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI– EM/EM. Grupo 6 – Flavonoides, Esqueleto do tipo flavonol	175
Figura 80. A: Espectro UV da substância eluída em 24,8 minutos (Pico 6 - Quercetina). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução obtido via ionização por electrospray no modo positivo correspondente ao composto quercetina. Espectro C: Experimento EM/EM	176
Figura 81. A: Espectro UV da substância eluída em 28,9 minutos (Pico 8 - Kaempferol). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução obtido via ionização por electrospray no modo positivo correspondente ao composto kaempferol. Espectro C: Experimento EM/EM	177
Figura 82. Proposta de mecanismos de fragmentação da isoramnetina $[M+H]^+$, m/z 317) a partir de EM/EM, em modo positivo (Rijke <i>et al.</i> , 2006).....	180
Figura 83. A: Espectro UV da substância eluída em 29,9 minutos (Pico 9 – isoramnetina). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução obtido via ionização por electrospray no modo positivo correspondente ao composto isoramnetina. Espectro C: Experimento EM/EM	182
Figura 84. Cromatograma de pico Base (BPC) da fase alcaloídica AFCJ das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	183
Figura 85. Compostos identificados da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Picos 1,2,4 e 5.	184
Figura 86. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Pico 3.....	185
Figura 87. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Pico 13.....	186
Figura 88. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 – Esqueleto do tipo copsano – Pico 6.....	187

Figura 89. Espectro A: UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto N α -formilcopsanol. Espectro C: Experimento EM/EM.....	188
Figura 90. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina – Pico 7.	189
Figura 91. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina – Pico 10.	190
Figura 92. Compostos identificados da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina – Picos 8 e 9.	192
Figura 93. Espectro A: UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto Copsinina (Isômero A). Espectro C: Experimento EM/EM – Pico 8.	192
Figura 94. Espectro A: UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsinina (Isômero B). Espectro C: Experimento EM/EM- Pico 9.	193
Figura 95. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina – Pico 14.	195
Figura 96. Espectro A: Experimento UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto ácido-5-oxocopsinico. Espectro C: Experimento EM/EM..	195
Figura 97. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM.....	197
Figura 98. Estrutura química de A-13 (Etil- β -D-Glucopiranosideo).....	198
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD $_3$ OD) de A-13	200
Figura 100. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CD $_3$ OD) de A-13	201
Figura 101. Espectro de RMN de DEPT 135 (75,45 MHz; CD $_3$ OD) de A-13.....	202
Figura 102. Estrutura química do A-14 (Ácido protocatecuico)	203
Figura 103. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD $_3$ OD) de A-14	205
Figura 104. Estrutura química de A-15 (3,4-diidroxibenzoato de etilo)	208

Figura 105. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-14+A-15	209
Figura 106. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CD_3OD) de A-14+A-15.....	210
Figura 107. Estrutura química do ácido quínico A-16 (5-O-cafeoilquínico)	211
Figura 108. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-16	213

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta da via mecanística do fragmento m/z 161 do cafeato de metila (m/z 193) a partir de EM/EM, em modo negativo	125
Esquema 2. Proposta da via mecanística de fragmentação do copsanol (m/z 309) a partir de EM/EM, em modo positivo.....	165
Esquema 3. Proposta da via mecanística de fragmentação do copsanol- <i>N</i> -óxido (m/z 325) a partir de EM/EM, em modo positivo.	167
Esquema 4. Proposta da via mecanística de fragmentação do 5-oxocopsanol (m/z 323) a partir de EM/EM, em modo positivo.	170
Esquema 5. Proposta da via mecanística de fragmentação da aspidofractina (m/z 367) a partir de EM/EM, em modo positivo.	173
Esquema 7. Proposta de mecanismos de fragmentação do kaempferol $[M+H]^+$, m/z 287) a partir de EM/EM, em modo positivo (March & Miao, 2004; Rijke <i>et al.</i> , 2006).....	179
Esquema 8. Proposta de fragmentação da isoramnetina (m/z 317) a partir de EM/EM, em modo positivo (Ma <i>et al.</i> , 1997; Rijke <i>et al.</i> , 2006).....	181
Esquema 9. Proposta da via mecanística de fragmentação do 5,22-dioxocopsano (m/z 321) a partir de EM/EM, em modo positivo.	186
Esquema 10. Proposta da via mecanística de fragmentação do $N\alpha$ -formilcopsanol (m/z 337) a partir de EM/EM, em modo positivo.	188
Esquema 11. Proposta da via mecanística de fragmentação da copsinina- <i>N</i> -óxido (m/z 355) a partir de EM/EM, em modo positivo.	191
Esquema 12. Proposta da via mecanística de fragmentação da copsinina (m/z 339) a partir de EM/EM, em modo positivo.....	194
Esquema 13. Proposta da via mecanística de fragmentação do ácido-5-oxocopsinico (m/z 339) a partir de EM/EM, em modo positivo.	196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frações obtidas da cromatografia em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh) da fração AVFACI.....	51
Tabela 2. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-14B.....	53
Tabela 3. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-7B.....	54
Tabela 4. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AVFACI-10CD	55
Tabela 5. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-12.....	56
Tabela 6. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AVFACI-12-8.....	57
Tabela 7. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AVFACI-12-10.....	57
Tabela 8. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-13.....	58
Tabela 9. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-15.....	59
Tabela 10. Dados obtidos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração AFCJ	60
Tabela 11. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFCJ-15.....	62
Tabela 12. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AFCJ-15-13	63
Tabela 13. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) da fração AFCJ-28.....	64
Tabela 14. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) da subfração AFCJ-28-31	65
Tabela 15. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) da subfração AFCJ-28-46	66

Tabela 16. Dados obtidos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração AFCJ-32.....	67
Tabela 17. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) da subfração AFCJ-32-9-10.....	68
Tabela 18. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFCJ-35.....	69
Tabela 19. Dados obtidos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração AFAAc.....	70
Tabela 20. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-1.....	72
Tabela 21. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-6.....	73
Tabela 22. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-8.....	74
Tabela 23. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-9.....	75
Tabela 24. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-16.....	76
Tabela 25. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-23.....	77
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H para as substâncias A-1 e A-2 e comparação com dados de ^1H para o estigmasterol e β -sitosterol	80
Tabela 27. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância A-3 e comparação com dados de ^{13}C da quercetina.....	84
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H para a substância A-4 e comparação com dados de ^1H para o kaempferol	89
Tabela 29. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância A-5 (copsanol) e comparação com dados de ^1H e de ^{13}C para o alcaloide copsanol- <i>N</i> -óxido	97
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância A-6 e comparação com dados de ^{13}C para o copsanol (A-5) e o copsanol- <i>N</i> -óxido descrito na literatura	108

Tabela 31. Dados de RMN de ^{13}C para a substância A-7 e comparação com dados de ^{13}C para o copsanol (A-5) e copsorinina descritos na literatura.....	121
Tabela 32. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI– EM/EM para A-8 (cafeato de metila)	126
Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância A-8 e comparação com $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ do cafeato de metila.....	127
Tabela 34. Principais correlações ^2J e ^3J ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) observadas no mapa de contorno HMBC para a substância A-8	128
Tabela 35. Dados de RMN de ^1H para a substância A-9 e comparação com dados de ^1H para a copsanona descrita na literatura	137
Tabela 36. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância A-10 e comparação com dados de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a copsanona- <i>N</i> -óxido descrita na literatura	142
Tabela 37. Dados de RMN de ^{13}C para a substância A-11 e comparação com dados de ^{13}C para o copsanol- <i>N</i> -óxido (A-6) e o copsanona- <i>N</i> -óxido (A-10).....	148
Tabela 38. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância A-11 e comparação com dados de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a copsinina descrita na literatura	149
Tabela 39. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância A-12 e comparação com dados de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o alcaloide copsanona e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o alcaloide copsorinina descritos na literatura	156
Tabela 40. Alcaloides identificados da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Picos 2 e 3.....	166
Tabela 41. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 5.....	168
Tabela 42. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 7.....	170
Tabela 43. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI–EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 1.....	172

Tabela 44. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloide com esqueleto do tipo aspidofractina.....	174
Tabela 45. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI-EM/EM para quercetina – pico 6)	177
Tabela 46. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI-EM/EM para kaempferol – pico 8.....	178
Tabela 47. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI-EM/EM para isoramnetina – pico 9.....	183
Tabela 48. Alcaloides identificados da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Picos 1,2,4 e 5.....	185
Tabela 49. Alcaloide identificado na fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> com esqueleto copsano por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloide com esqueleto do tipo copsano – pico 5.....	186
Tabela 50. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 13.....	187
Tabela 51. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano	189
Tabela 52. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina.....	190
Tabela 53. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina.....	191
Tabela 54. Alcaloides identificados da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina.....	194

Tabela 55. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina.....	196
Tabela 56. Fenilpropanoide identificado na fase alcaloídica das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM.....	197
Tabela 57. Dados de RMN de ^1H para a substância A-13 e comparação com dados de ^{13}C para o Etil- α -D-Glucopiranosideo e Etil- β -D-Glucopiranosideo descritos na literatura ...	199
Tabela 58. Dados de RMN de ^1H para a substância A-14 e comparação com dados de ^1H para o ácido protocatecuico descrito na literatura.....	204
Tabela 59. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C /DEPT para A-14 e comparação com dados de ^1H e ^{13}C /DEPT para o ácido protocatecuico descrito na literatura	207
Tabela 60. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C /DEPT para A-15 e comparação com dados de ^1H e de ^{13}C /DEPT para o ácido protocatecuico descrito na literatura	208
Tabela 61. Dados de RMN de ^1H para A-16 e comparação com dados de ^1H para o 5-O-cafeoilquínico descrito na literatura.....	212
Tabela 62. Valores de GI_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólico e fases da espécie <i>Aspidosperma verbascifolium</i> em linhagens celulares	215

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Esquema: Procedimento empregado para a extração ácido/base do extrato etanólico das folhas de <i>A. verbascifolium</i>	47
Fluxograma 2. Estudo da fase clorofórmica alcaloídica das cascas (AVFACl)	52
Fluxograma 3. Estudo da fase clorofórmica alcaloídica das folhas (AVFJ)	61
Fluxograma 4. Estudo da fase acetato de etila das cascas (AFAAc)	71

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AVFACI: Fase alcaloídica clorofórmica das cascas

AFCJ: Fase alcaloídica clorofórmica das folhas

AFAAc: Fase acetato de etila das cascas

CC: Coluna cromatográfica

CCDA: Cromatografia em camada delgada analítica

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD-EM/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas sequencial

COSY: Correlation Spectroscopy

δ : Deslocamento químico

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DOX: Doxorubicina

GI₅₀: Concentração necessária para que ocorra 50% de inibição de crescimento

HT-29: Linhagem celular de câncer de cólon

HL-60: Linhagem celular de leucemia

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

IES- ionização por eletrospray

***J*:** Constante de acoplamento

LAPNEM: Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas

MCF7: Linhagem celular de câncer de mama

NCI-USA: National Cancer Institute

NCI-ADR/RES: Linhagem celular de câncer de ovário resistente a múltiplas drogas

NIH/3T3: Linhagem celular não tumoral (fibroblasto murino)

OVCAR-3: Linhagem celular de câncer de ovário

PC-03: Linhagem celular de câncer de próstata

Q-TOF: Analisador de massas quadrupolo e por tempo de voo

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SMART: *Somatic Mutation And Recombination Test*

SRB: Sulforrodamina B

786-0: Linhagem celular de câncer de rim

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ESQUEMAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xxi
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xxii
1. INTRODUÇÃO	25
1.1 A família Apocynaceae	31
1.2 O gênero <i>Aspidosperma</i>	37
1.3 A espécie <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	43
1.4 Avaliação de atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais.....	44
2. OBJETIVOS	45
3. METODOLOGIA.....	45
3.1 Materiais e equipamentos	45
3.2 Estudo químico de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	46
3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	46
3.2.2 Obtenção e extração ácido-base dos extratos brutos das cascas e folhas de <i>A. verbascifolium</i>	46
3.3 Análise por CLAE-DAD-ESI-Q-TOF-EM/EM de AVFACI e AFCJ.....	48
3.4 Separação de componentes de frações por CLAE no modo semipreparativo (CLAE-UV/Vis)	49
3.5 Identificação dos compostos presentes em AVFACI e AFCJ por espectrometria de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM).....	49
3.6 Isolamento dos constituintes químicos	50
3.6.1 Estudo da fração clorofórmica alcaloídica das cascas (AVFACI)	50
3.6.1.1 Estudo da fração AVFACI-14B.....	53
3.6.1.2 Estudo da subfração AVFACI-7	53
3.6.1.3 Estudo da subfração AVFACI-10CD	54

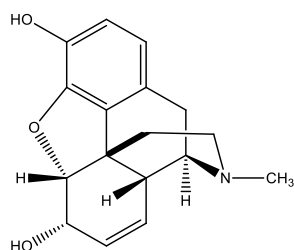
3.6.1.4 Estudo da fração AVFACl-12	55
3.6.1.4.1 Estudo da subfração AVFACl-12-8 e AVFACl-12-10 por CLAE-UV/Vis	56
3.6.1.5 Estudo da subfração AVFACl-13.....	58
3.6.1.6 Estudo da fração AVFACl-15	58
3.6.2 Estudo da fração clorofórmica alcaloídica das folhas (AFCJ)	59
3.6.2.1 Estudo da fração AFCJ-15.....	62
3.6.2.2 Estudo da fração AFCJ-28.....	63
3.6.2.3 Estudo da fração AFCJ-32.....	66
3.6.2.4 Estudo da subfração AFCJ-34/35	68
3.6.3 Estudo da fração acetato de etila das cascas (AFAAc)	69
3.6.3.1 Estudo da subfração AFAAc-1.....	72
3.6.3.2 Estudo da subfração AFAAc-6.....	72
3.6.3.3 Estudo da subfração AFAAc-8.....	73
3.6.3.4 Estudo da subfração AFAAc-9.....	74
3.6.3.5 Estudo da subfração AFAAc-16.....	75
3.6.3.6 Estudo da subfração AFAAc-23.....	76
3.7 Ensaios de atividade antiproliferativa frente a linhagens de células neoplásicas humanas e murina.....	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fase clorofórmica (AVFACl) das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	78
4.1.1 Substâncias A-1 + A-2.....	78
4.1.2 Substância A-3.....	82
4.1.3 Substância A-4.....	87
4.1.4 Substância A-5.....	92
4.1.5 Substâncias A-5+A-6.....	103
4.1.6 Substâncias A-6+A-7.....	116
4.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fase clorofórmica (AFCJ) das folhas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	124
4.2.1 Substância A-8.....	124
4.2.2 Substância A-9.....	134
4.2.3 Substância A-10.....	139
4.2.4 Substância A-11.....	146

4.2.5 Substância A-12.....	152
4.3 Identificação dos compostos presentes na fase alcaloídica clorofórmica das cascas (AVFACl) por CLAE-DAD-EM/EM.....	160
4.4 Identificação dos compostos presentes na fase alcaloídica clorofórmica (AFCJ) das folhas por CLAE-DAD-EM/EM.....	183
4.5 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fase acetato de etila (AFAAc) das cascas de <i>Aspidosperma verbascifolium</i>	197
4.5.1 Substância A-13.....	197
4.5.2 Substância A-14.....	203
4.5.3 Substâncias A-14+A-15.....	206
4.5.4 Substância A-16.....	211
4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	214
4.6.1 Atividade antiproliferativa.....	214
5. CONCLUSÕES.....	218
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	220

1. INTRODUÇÃO

A utilização de Produtos Naturais pela humanidade data desde tempos remotos, seja na busca por alívio e cura de doenças, ou mesmo no uso de venenos naturais como o veneno de Hemlock, extraído da espécie vegetal *Conium maculatum* para a execução de prisioneiros durante o império grego, em técnicas utilizadas pelos egípcios para a conservação de múmias, na medicina tradicional chinesa com seus preparados vegetais ou mesmo na comercialização de especiarias durante o século XVI, como o pau-brasil (*Cesalpinia echinata*), do qual era obtido um corante de cor vermelha utilizado para tingir roupas (Viegas Jr e Bolzani, 2006).

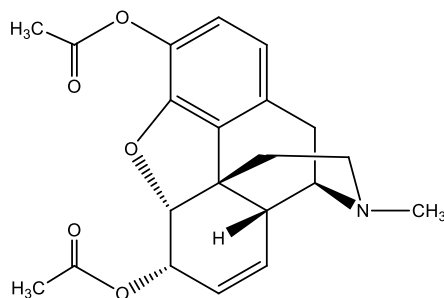
O profundo aprendizado vindo destas diferentes civilizações influenciou de forma significativa a pesquisa em Produtos Naturais, incentivando a busca por substâncias com propriedades tóxicas e/ou medicamentosas presentes nas plantas. A primeira droga a ser investigada quimicamente foi o ópio, obtida dos bulbos da papoula, *Papaver somniferum* (Papaveraceae) (Duarte, 2005), utilizada há séculos devido às suas propriedades soporíferas (Viegas Jr e Bolzani, 2006), analgésicas (Barreiro e Bolzani, 2009) e narcóticas (Smith, 2007). A morfina (**1**) foi o primeiro alcaloide a ser isolado do ópio em 1806, por Sertürner, farmacêutico alemão que trabalhou no isolamento de seus princípios ativos (Roberts e Wink, 1998).



(1)

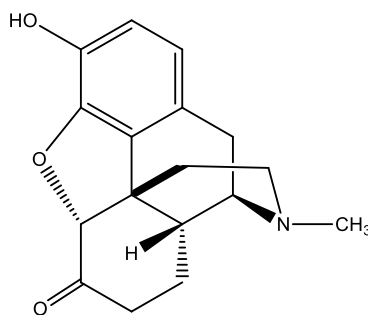
Aproximadamente 15 anos após sua descoberta, a mesma passou a ser comercializada em países Europeus e na América do Norte (Booth, 1998) e posteriormente, serviu como modelo para inúmeras modificações estruturais importantes, que culminaram no desenvolvimento de vários derivados semi-sintéticos. Pode-se citar, por exemplo, a heroína (**2**) (diacetilmorfina) (Corbett, 1966), utilizada como medicação por volta de 1898 para substituir a morfina (**1**) em pacientes com problemas pulmonares (Pais, 2011) e considerada um analgésico poderoso, tendo sido

retirada de circulação como fármaco 12 anos após, devido à sua capacidade de causar dependência (Cohen, 1969).



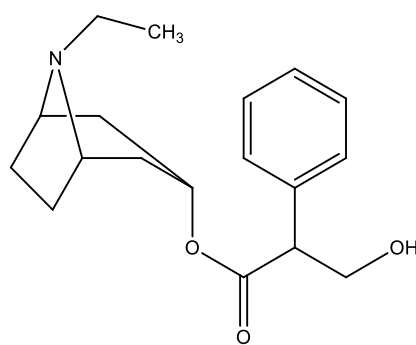
(2)

Outro agonista opioide semi-sintético importante é a hidromorfona (3), sintetizado na Alemanha em 1921 (Garcia *et al.*, 2010) e empregado como opção ao uso da morfina em casos de dor crônica (Rizzo *et al.*, 2010).



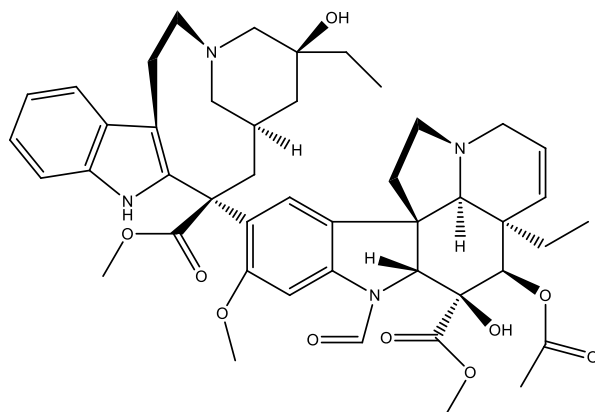
(3)

Conhecida e utilizada há milênios por médicos Babilônios, devido às suas características terapêuticas contra espasmos, tosse e asma, a beladona (*Atropa belladonna*) (Barraca, 1999), conhecida também como bela-dama e erva-envenenada (Silveira, 1992), apenas em 1831 seu componente principal, conhecido como atropina (4), foi isolado por Mein, químico alemão (Corrêa, 1926.; Martinez *et al.*, 2009). Este alcaloide psicoativo alucinógeno e tóxico (Martinez *et al.*, 2009) funciona como agente anticolinérgico, atuando diretamente no sistema nervoso central (Correia, 2005).

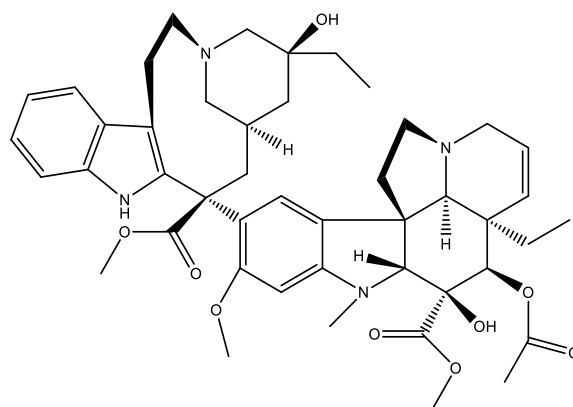


(4)

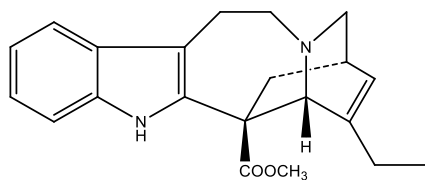
Amplamente estudada, devido à produção de alcalóides bisindólicos encontrados em suas folhas, utilizados no tratamento de vários tipos de cânceres e diabetes (Sing *et al.*, 2001.; Noble, 1990) e também por possuírem propriedades tranquilizantes e anti-hipertensivos (Verpoorte *et al.*, 1997), a espécie *Catharanthus roseus* foi fundamental para a retomada do interesse das indústrias farmacêuticas na área dos Produtos Naturais (Pinto, 2002), que durante o final da primeira metade do século XX, centralizou-se apenas no estudo dos metabólitos secundários e suas possíveis atuações nas plantas. Somente após o isolamento da vimblastina (5) em 1934 pelo Doutor Robert Laing Noble e da vincristina (6), identificada em 1954 pelo Doutor Beer e a equipe do Doutor Noble, substâncias ativas principalmente no tratamento de câncer (Viegas Jr *et al.*, 2006), o interesse em Produtos Naturais foi recuperado. Até hoje a vimblastina (5) é usada para o combate da leucemia, podendo ser utilizada no tratamento de outros tipos de cânceres (Simões, 2007). Posteriormente, estudos constataram a presença nas partes aéreas de *C. roseus* de mais de 100 alcaloides indólicos monoterpênicos, sendo a catarantina (7) e a vindolina (8) os mais abundantes (Moreno *et al.*, 1996). Os alcaloides monoméricos serpentina (9) (tranquilizante) (Verpoorte *et al.*, 1997) e ajmalicina (10) (anti-hipertensivo e perturbações circulatórias) (Moreno *et al.*, 1996) também foram identificados.



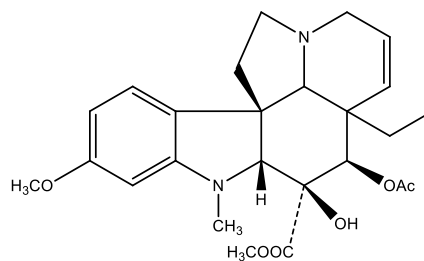
(5)



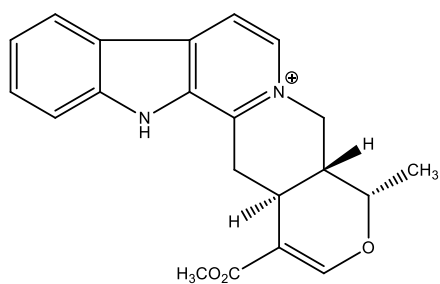
(6)



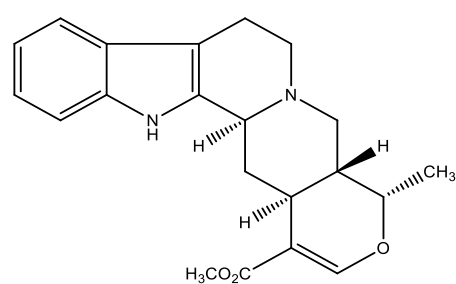
(7)



(8)

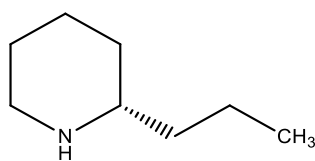


(9)

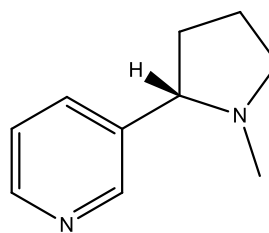


(10)

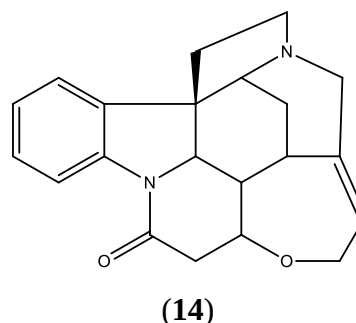
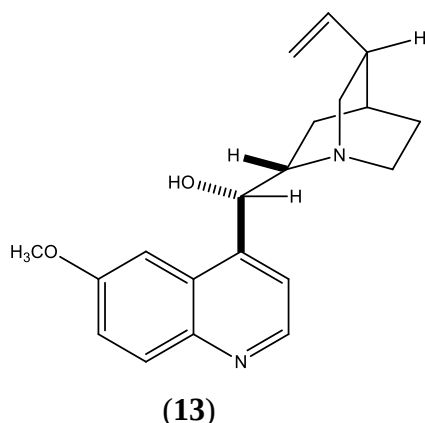
Apesar do uso pelo homem de plantas contendo alcaloides para a produção de muitos medicamentos, poções, chás e venenos datar de mais de 4 mil anos antes da era cristã (Almeida, 2007), e praticamente confundir-se com a própria história do homem, apenas no início do século XIX se conseguiu isolar algumas destas substâncias. Na época se determinar a estrutura química dos alcaloides era uma tarefa difícil. Fato de grande importância histórica e que veio a contribuir na investigação desses compostos seria a síntese, pois os métodos utilizados até então levavam, apenas, à determinação parcial de suas estruturas. A coniina (**11**), principal componente da cicuta (*Conium maculatum*) isolado em 1827, tornou-se o primeiro alcaloide a ser sintetizado (Mann, 1987). Este acontecimento deu-se em 1886 e o cientista responsável foi Albert Ladenburg. Muitos anos se passaram até a estrutura deste alcaloide ser determinada, o mesmo ocorreu a outros. Por exemplo: a nicotina (**12**), isolada das folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) em 1828 por Posselt e Reiman (Goodman & Gilman, 2005) só foi sintetizada em 1904 (Oliveira *et al.*, 2011); a quinina (**13**), alcaloide com extrema atividade contra a malária, isolada em 1820 por Pelletier e Caventou e sintetizada em 1944 (Oliveira e Szczerbowski, 2009); a morfina (**1**), isolada em 1806 por Serturmer, foi sintetizada em 1952 por Gates & Tschude (Barreiro, 1990; Calixto & Siqueira Jr, 2008) e a estriquinina (**14**), isolada em 1818 por Pelletier e Caventou das sementes da *Strychnos nux-vomica* L. (noz-vômica) (Costa, 2010), foi sintetizada em 1954 por R. B. Woodward (Correia, 2002).



(11)

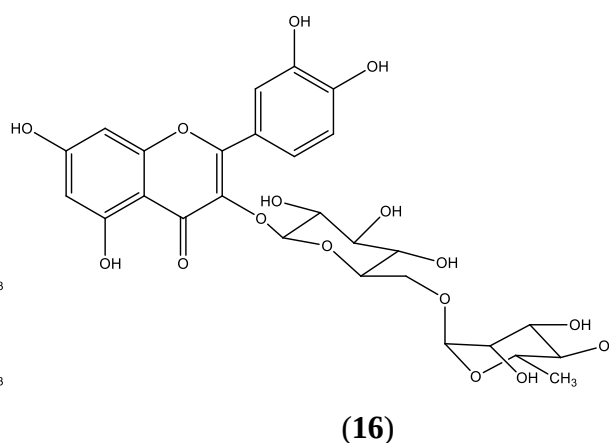
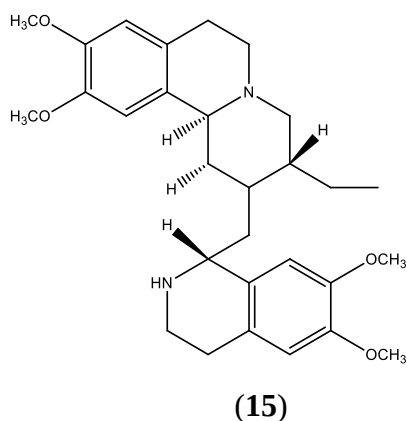


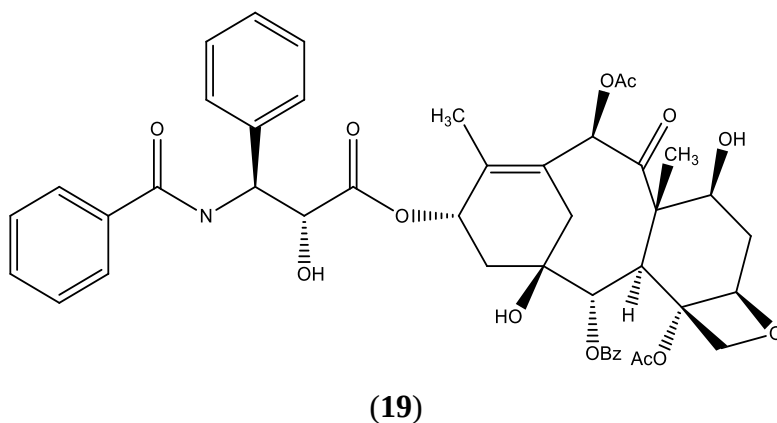
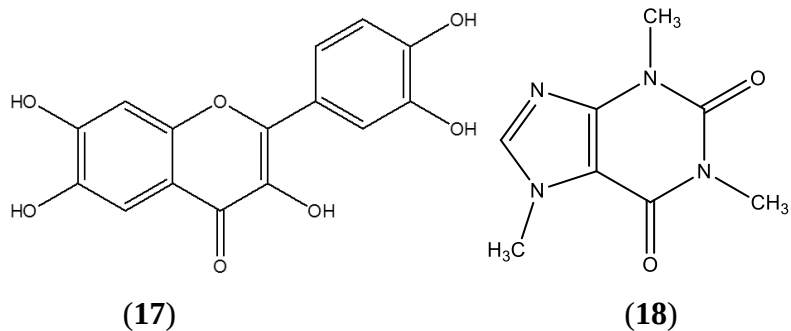
(12)



Consideradas fontes nobres de moléculas para o tratamento de várias doenças, as plantas além de seu uso popular com finalidade terapêutica têm contribuído de forma eficaz para a obtenção de vários fármacos ao longo dos tempos e representam cerca de 25% de todos os medicamentos disponibilizados no mercado, sejam eles isolados, produzidos por semi-síntese (Foglio, 2006) ou servindo de modelos estruturais para síntese (Pinto *et al.*, 2002). Muitos são utilizados até hoje clinicamente, podendo-se citar a vincristina (**6**) já mencionada. Também destaca-se a emetina (**15**), isolada de *Psychotria ipecacuanha*, conhecida por suas propriedades eméticas (Teixeira *et al.*, 2012).

Flavonoides de relevante ação analgésica (Filho & Yunes, 1998), rutina (**16**) e quercetina (**17**), e a cafeína (**18**), isolada, por exemplo, de *Coffea arabica* (café) e utilizada como estimulante. De importância atualmente, podemos mencionar o paclitaxel (taxol) (**19**), anticancerígeno (Filho e Yunes, 1998) isolado da espécie vegetal *Taxus brevifolia* (Souza, 2004).





Representando em torno de 20% de todos os Produtos Naturais conhecidos (Farnsworth, 1990) e presentes em boa parte dos fármacos utilizados clinicamente e na medicina tradicional, os alcaloides representam ainda um papel de suma importância nos vegetais, principalmente funcionando como defesa contra predadores, em especial mamíferos herbívoros, devido à sua toxicidade geral (Yamada, 2004.; Larcher, 2000). Estes dados tornam fundamental na realização de estudos mais aprofundados sobre essa rica classe de metabólitos secundários.

1.1 A família Apocynaceae

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das maiores e mais importantes fontes vegetais com utilidade terapêutica na medicina moderna. Descrita inicialmente por Antoine Laurent de Jussieu em 1789, teve um aumento de seu número de gêneros reconhecidos, porém, logo foi desmembrada em duas por Brown em 1810, Apocynaceae e Rubiaceae (Rapini, 2000).

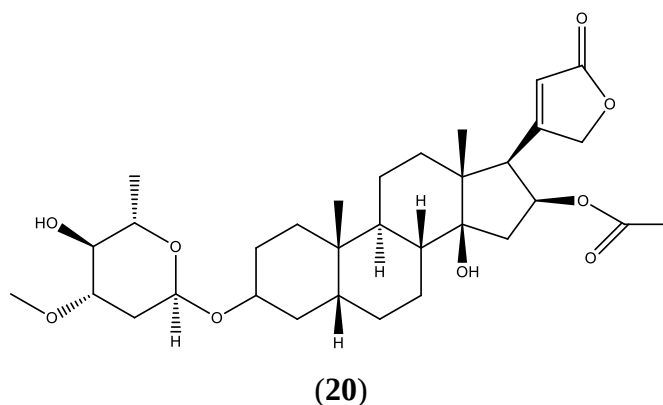
Contendo plantas de hábitos variados, incluindo lianas, árvores, arbustos e herbáceas, possui aproximadamente 400 gêneros distribuídos entre 2000 e 5000

espécies (Tropicos, 2016.; Endress, 2004.; Endress *et al.*, 2007.; Judd *et al.*, 2009), encontradas em regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes, havendo poucos representantes em regiões temperadas (Leeuwenberg, 1994). No Brasil, ocorrem cerca de 95 gêneros e 850 espécies, presentes em diversas formações vegetais (Souza & Lorenzi 2008).

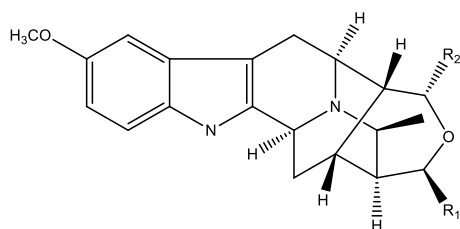
As plantas desta família podem ser reconhecidas facilmente devido à presença de látex e por apresentarem grau variado de toxicidade (Barth & Luz, 2008.; Rapini, 2000). Quanto à importância econômica dessa família, destacam-se as espécies do gênero *Aspidosperma* (*A. polyneuron* e *A. pyriformium*), devido à qualidade de suas madeiras (Carvalho, 2004.; Tavares & Santana, 2013). Outras se destacam por seu potencial paisagístico, como a espécie *Nerium oleander* (espirradeira) (Pedroza *et al.*, 2014). No que se refere ao número de espécies, encontra-se entre as dez mais ricas dentre as angiospermas, sendo fitogeneticamente incluída na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae e ordem Gentianales (Nicholas e Baijnath, 1994).

Seus constituintes químicos incluem glicosídeos cardioativos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitóis, triterpenoides e uma enorme variedade de alcaloides (Evans, 2002), especialmente dos grupos indólicos derivados do triptofano e triptamina, e com menor frequência, alcaloides pirrolizidínicos, esteroidais e piridínicos (Henriques *et al.*, 2001).

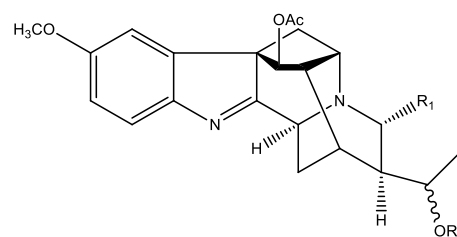
Estudos realizados com *Nerium oleander* (Armién *et al.*, 1994) levaram ao isolamento da oleandrina (**20**) (Galey, 2004), glicosídeo cardiotoxico (Pedroza *et al.*, 2014) apontado como responsável por intoxicação em animais, especialmente gado (Pedroso *et al.*, 2009).



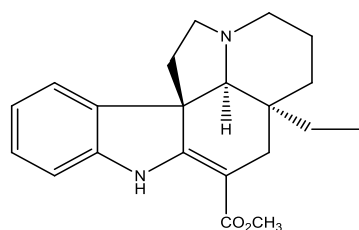
Algumas espécies do gênero *Vinca* apresentam atividades anticarcinogênica (*Vinca rosea*) (Baratto, 2010.; Brandão *et al.*, 2010) e forte atividade antimicrobiana foi detectada para *Vinca minor* contra bactérias Gram positivas, especialmente do gênero *Bacillus* (Grujić *et al.*, 2015). Estudos químicos de um espécime de *V. major* (Pervinca-maior) (Twyford & Baxter, 1999) realizados por Zhang e colaboradores em 2016 evidenciaram a presença de substâncias alcaloídicas indólicas monoterpênicas, tais como vinmajorinas C-E (**21**, **22**, **23**) (Zhang *et al.*, 2016a) e 19-hidróxi-10-metóxi-19,20-di-hidrovinorina (**24**), 19-O-acetil-10-metóxi-19,20-di-hidrovinorina (**25**) e 19,21 α -di-hidróxi-10-metóxi-19, 20-di-hidrovinorina (**26**) (Zhang *et al.*, 2016b). Estudos realizados com *V. difformis* resultaram no isolamento dos alcaloides vincadiformina (**27**), vincamajina (**28**), vincamedina (**29**), acuammidina (**30**), vellosimina (**31**) e vincadifina (**32**) em 1985 e da diforina (**33**) e normacusina B (**34**), em 1986 (Garnier e Mahuteau, 1985.; Garnier & Mahuteau, 1986).



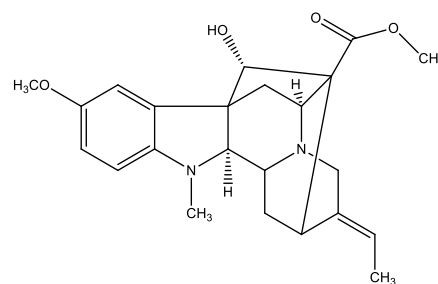
21 - R₁ = OH, R₂ = OCH₃
22 - R₁ = H, R₂ = OH
23 - R₁ = H, R₂ = OOCCH₃



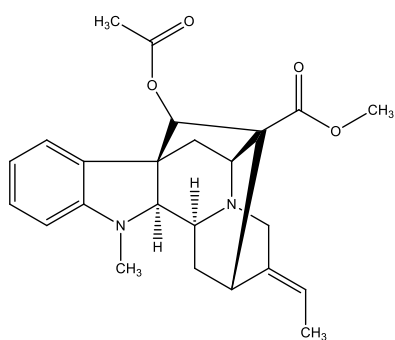
24 - R₁ = H, R₂ = H
25 - R₁ = H, R₂ = Ac
26 - R₁ = OH, R₂ = H



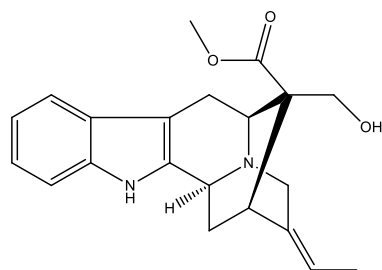
(27)



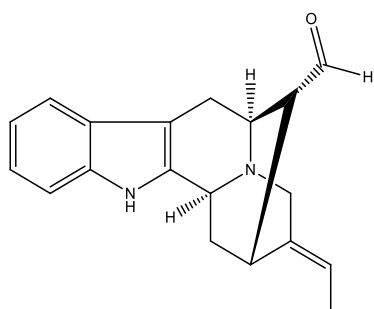
(28)



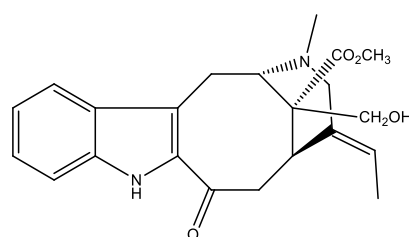
(29)



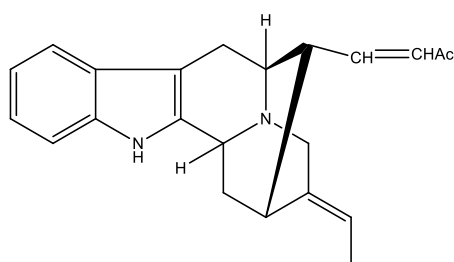
(30)



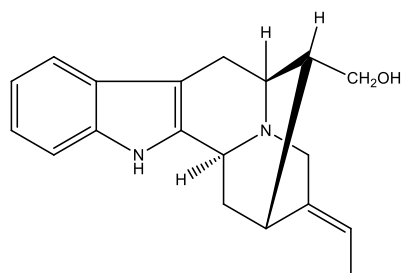
(31)



(32)

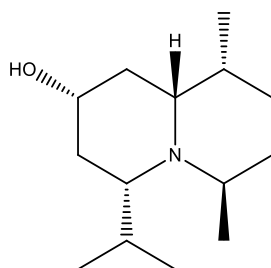


(33)



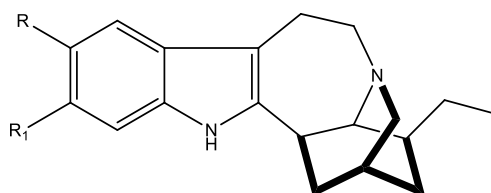
(34)

O alcaloide de esqueleto quinilidinico denominado plumerinina (35) foi obtido de *Plumeria rubra* (Kazmi *et al.*, 1989), espécie popularmente conhecida como Jasmim-manga (Medeiros & Pereira, 2008), e reconhecida no Brasil por ser muito utilizada como planta ornamental (Pilli *et al.*, 2005). Esta espécie é famosa por uma variedade de atividades biológicas a ela atribuídas, tais como purgante, diurética, abortiva, antituberculose (Pilli *et al.*, 2005) e também no tratamento de reumatismo, diarreia, lepra e doenças venéreas (Comins *et al.*, 2002).



(35)

Do gênero *Tabernanthe*, pode-se destacar *Tabernanthe iboga*, de onde foram obtidos os alcaloides ibogalina (36) (Neuss, 1959.; Andrade *et al.*, 2005), ibogamina (37) (Jenks, 2002), noribogaína (38) (Kontrimaviciutė *et al.*, 2006) e ibogaína (39). Este último foi isolado das raízes (Koenig & Hilber, 2015) e considerado psicoativo (Barreiro & Bolzani, 2009), com suposta atividade “antiaditiva”, aliviando o desejo e impedindo a recaída do uso de drogas (Koenig & Hilber, 2015), e assim, sendo eficaz no tratamento de dependência de opióides e cocaína (40) (Lotsof, 1995). A estrutura da ibogaína (39), que foi definitivamente elucidada em 1957, sendo sua síntese total relatada em 1965 (Alper, 2001), mostrou-se similar ao importante neuroregulador serotonina (41), o que explicaria sua ação nos receptores serotoninérgicos centrais (Barreiro & Bolzani, 2009).

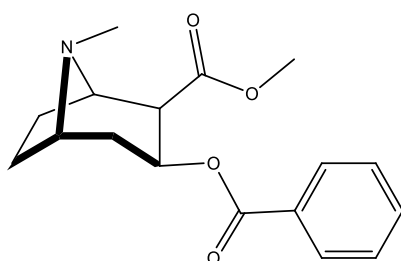


36 R = R₁ = OCH₃

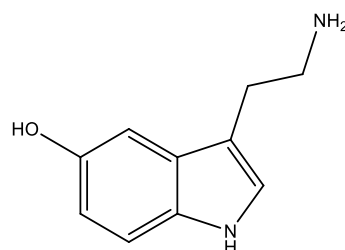
37 R = R₁ = H

38 R = OH; R₁ = H

39 R = OCH₃, R₁ = H

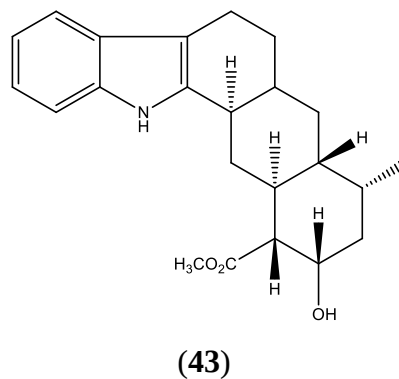
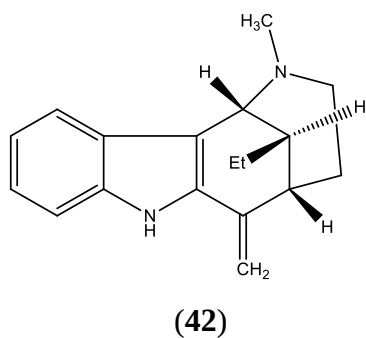


(40)

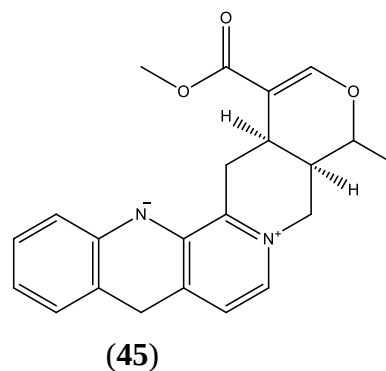
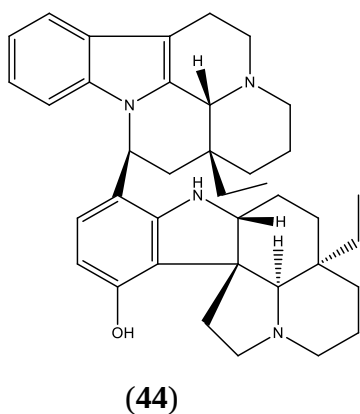


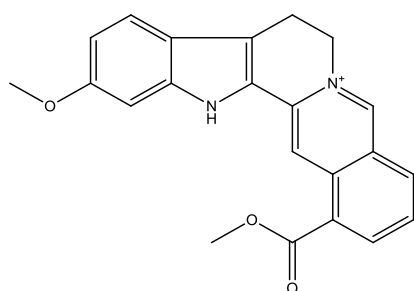
(41)

A investigação fitoquímica do gênero *Himatanthus* revelou a presença dos alcaloides uleína (42) e ioimbina (43) em um espécime de *H. lancifolius* (Lopes, 2008), sendo este último responsável por aumentar a atividade colinérgica e diminuir a adrenérgica, pois atua sobre o sistema nervoso autônomo periférico (Goloni *et al* 2005).

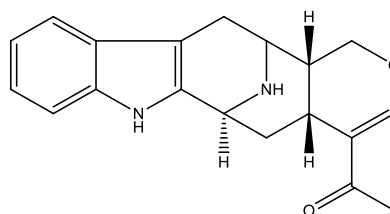


A bisleuconotina A (44), isolada a partir das cascas de *Leuconotis griffithii*, apresentou atividade inibidora do crescimento celular frente a quatro linhagens de células neoplásicas humanas, mama, leucêmica, colorretal e pulmão (Liu *et al.*, 2013). Alcaloides bioativos foram também isolados de espécies do gênero *Alstonia*, tais como *A. scholaris*, *A. constricta* e *A. macrophylla*, onde se pode destacar a alstonina (45), alstonilina (46), alstonerina (47) e a reserpina (48) (Moragas, 2006), sendo que este último é utilizado no tratamento de hipertensão e arritmias cardíacas (Budman *et al.*, 1997).

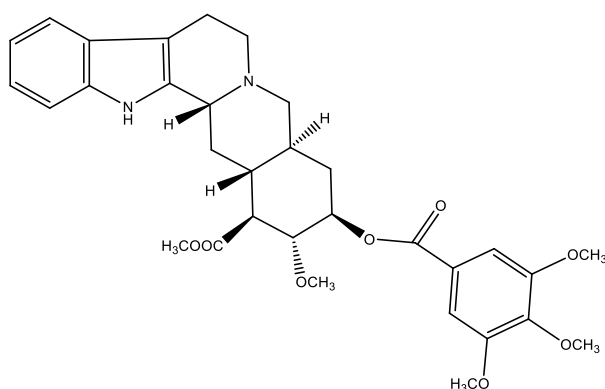




(46)



(47)



(48)

1.2 O gênero *Aspidosperma*

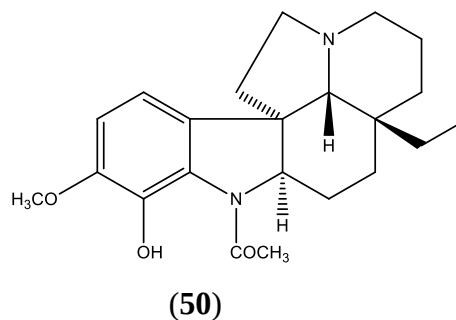
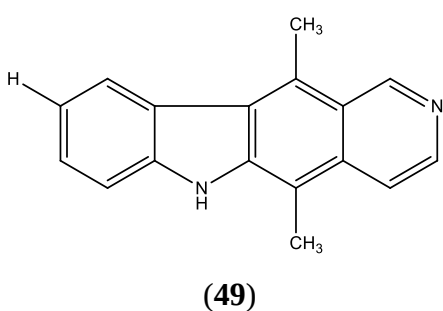
Levando em consideração características morfológicas das *Aspidospermas*, Woodson em 1951 classificou as 52 espécies catalogadas para gênero até então em nove séries (Woodson, 1951): *Macrocarpa* (2 espécies); *Ramiflora* (1 espécie); *Pyricola* (11 espécies); *Polyneura* (4 espécies); *Rigida* (1 espécie); *Nitida* (1 espécie); *Stegomeria* (3 espécies); *Quebrachines* (2 espécies) e *Nobiles* (14 espécies). Porém, não havia consenso sobre o número de espécies pertencentes ao gênero (Allorge & Poupat, 1991). Posteriormente, estudos relacionados ao agrupamento de espécies do gênero *Aspidosperma* levando em consideração aspectos quimiotaxonômicos e evolutivos foram realizados por Bolzani e colaboradores, que incluíram 48 espécies em 7 séries, *Rigida*, *Nitida*, *Quebrachines*, *Polyneura*, *Pyricola*, *Nobile*, e *Macrocarpa* (Bolzani *et al.*, 1987). No entanto, algumas espécies não foram incluídas nas séries mencionadas neste trabalho (Garcia, 1976; Pereira *et al.*, 2007) A série *Macrocarpa* inclui as espécies *A. verbascifolium*, *A. macrocarpon* e *A. duckei*, sendo a primeira, motivo do presente estudo.

Espécies do gênero *Aspidosperma* são encontradas apenas nas Américas (Lorenzi, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (Woodson, 1951). No Brasil são conhecidas popularmente como peroba, guatambu ou pequiá no Sul e como aracanga e carapanaúba no Norte do Brasil (Gonzaga, 2006), estando distribuídas em todos os ecossistemas (Corrêa, 1931), tais como, caatinga, cerrados e florestas (Amorim *et al.*, 2005).

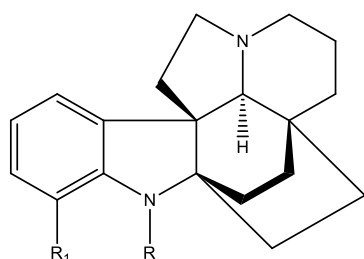
Além de fornecedoras de madeiras nobres, com larga aplicação na carpintaria (Lorenzi, 1998.; Joly, 1991) as espécies deste gênero têm se mostrado muito importantes do ponto de vista científico, sendo que muitas têm sido alvo de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividade farmacológica (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002).

Segundo Cordell e colaboradores, cerca de 30% dos alcaloides isolados de plantas são do tipo indólico, sendo que mais de 12% destes foram isolados de Apocynaceae, da qual se destaca o gênero *Aspidosperma* (Cordell *et al.*, 2001). Assim, distinguido quimicamente pela frequente ocorrência de alcaloides do tipo indólico, o gênero *Aspidosperma* tem nestes alcaloides bons marcadores quimiotaxonômicos para classificação botânica das espécies do gênero (Mitaine *et al.*, 1996), sendo essa característica compartilhada por cerca de 46 das 57 espécies atribuídas ao gênero (Bolzani *et al.*, 1987).

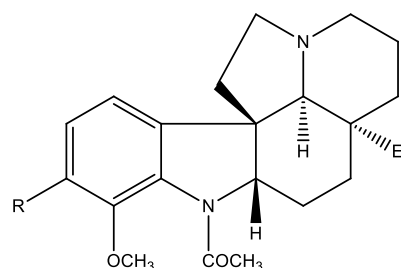
Neste contexto de plantas produtoras de alcaloides, se inserem *A. gilbertii* e *A. olivaceum* das quais foram isolados os alcaloides elipticina (49) e aspidocarpina (50), respectivamente (Mukhopadhyay & Cordell, 1983.; Gilbert *et al.*, 1965). Posteriormente foi demonstrado que a elipticina (49) e a aspidocarpina (50) apresentaram maior atividade antiplasmódica *in vitro* que a quinina (13) contra *Plasmodium falciparum* multi-resistente, originário do Quênia (Andrade-Netto, 2007).



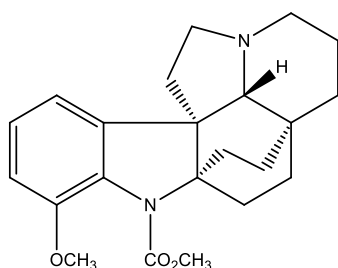
Alguns alcaloides pertencentes a esta classe foram isolados do pó da casca do caule de *A. pyrifolium*, dentre os quais se pode destacar aspidofractinina (**51**), *N*-formilaspidofractinin (**52**) e 6-desmetóxi-pirifolina (**53**) (Araújo Júnior *et al.*, 2007), enquanto outros foram relatados para as folhas, cascas das raízes e galhos, como vincadiformina (**30**), (+) - pirifolidinmina (**54**), (+) - aspidospermina (**55**) (Tavares & Santana, 2013). Testes realizados com o extrato bruto etanólico da casca do caule demonstraram sua letalidade para larvas de *Plutella xylostella*, sendo sua atividade inseticida associada à presença dos alcaloides indólicos monoterpênicos **51**, **52** e 15-desmetoxipirifolina (**56**) (Trindade *et al.*, 2008). Ainda com relação à atividade biológica dos alcaloides de *A. pyrifolium*, podemos destacar a capacidade bloqueadora adrenérgica sobre vários tecidos urogenitais da aspidospermina (**55**) e quebrachamina (**57**), justificando o emprego na medicina popular de extratos desta espécie para alívio da hiperplasia prostática benigna e impotência erétil (Deutsch *et al.*, 1994).



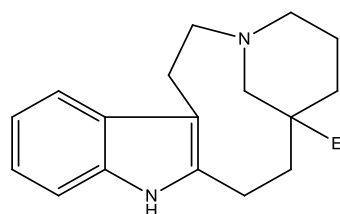
51 R = R₁ = H
52 R = CHO; R₁ = H
53 R = COCH₃; R₁ = OCH₃



54 R = OCH₃
55 R = H

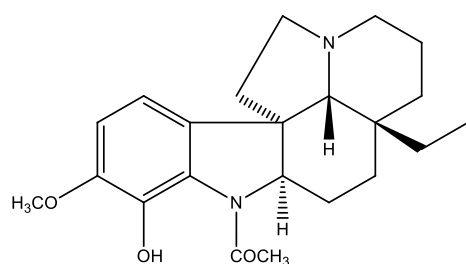


(56)

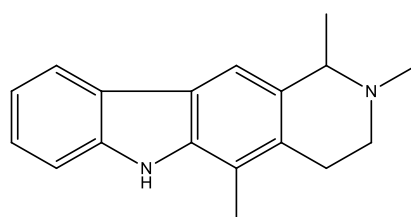


(57)

Usando uma abordagem bio-monitorada, Chierrito e colaboradores atribuíram a atividade de *A. olivaceum* contra *Plasmodium falciparum* para o alcaloide aspidoscarpina (**58**) e em menor grau, para o alcaloide *N*-metil-tetra-hidroolivacina (**59**) (Chierrito *et al.*, 2014).

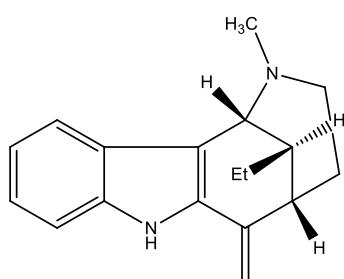


(58)

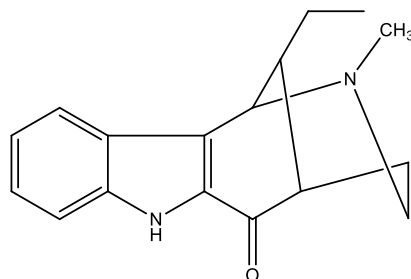


(59)

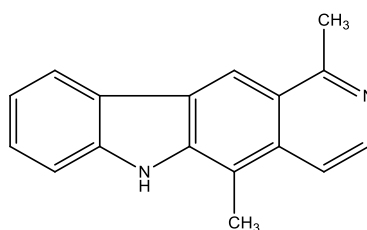
Um estudo dos extratos etanólicos de diferentes partes de *A. ulei* levou ao isolamento dos alcaloides indólicos, uleína (60), 20-*epi*-dasycarpidona (61) e olivacina (62), sendo que 61 apresentou atividade inibidora de crescimento de fibroblastos de murino (Torres *et al.*, 2013).



(60)

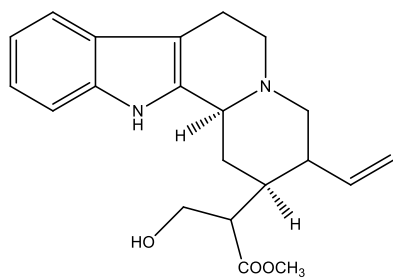


(61)

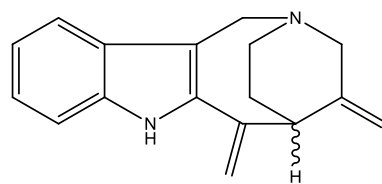


(62)

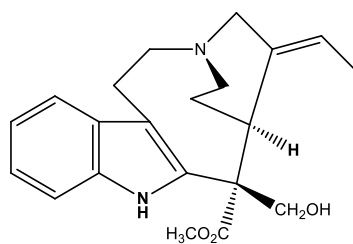
Em um estudo químico realizado com o extrato de metanólico da casca do caule e sementes de *A. pyricollum* foi relatado o isolamento dos alcaloides sitsirikina (63), aparicina (64), uleína (60) e estemadenina (65) (Carmo *et al.*, 2015).



(63)

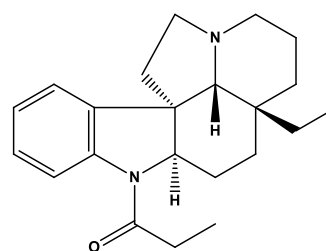
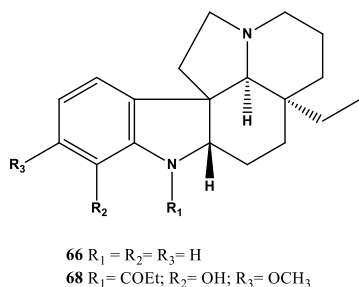


(64)

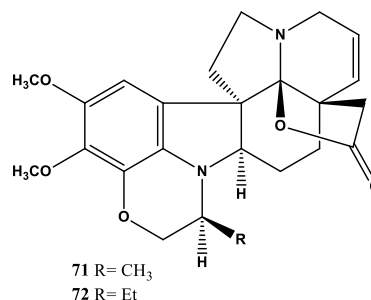
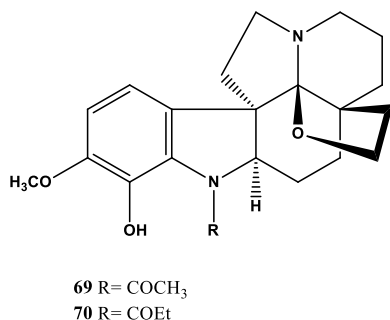


(65)

Da espécie *A. spruceanum*, conhecida popularmente como pau-amarelo (Silva *et al.*, 2004), vários alcaloides indólicos foram obtidos do extrato metanólico das cascas do caule e sementes, dentre os quais estão a aspidospermidina (66), desmetoxipalosina (67), aspidocarpina (50), aspidolimina (68), fendlerina (69) e aspidolimidina (70) (Oliveira *et al.*, 2009.; Pereira *et al.*, 2007). Pode-se destacar ainda o isolamento de dois novos alcalóides indólicos do extrato metanólico das cascas do caule e sementes, com esqueleto plumerano, spruceanuminas A e B (71 e 72), ressaltando o perfil quimiotaxonômico do gênero (Oliveira *et al.*, 2009).

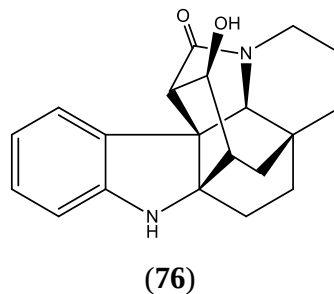
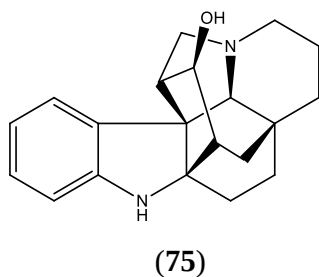
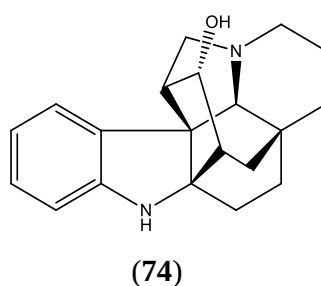
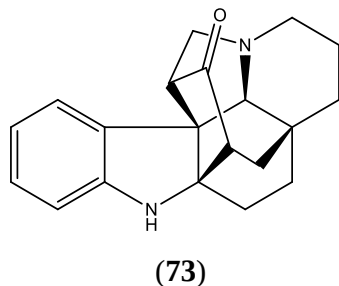


(67)



Estudos químicos realizados com *A. duckei* Hub e *A. macrocarpon* Mart., espécies inseridas junto com *A. verbascifolium* Müll. Arg. na série “Macrocarpa”, (Pereira *et al.*, 2007.; Bolzani *et al.*, 1987) mostraram que as mesmas estão intimamente relacionadas, parecendo ter sido encontrada uma relação química e taxonômica definitiva das espécies estudadas, visto que os principais alcaloides de *A. macrocarpon* e *A. duckei* são idênticos (Ferreira Filho, 1966).

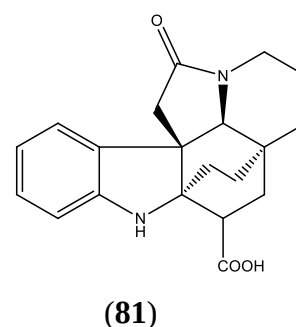
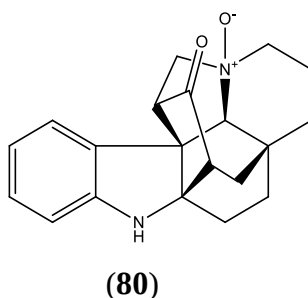
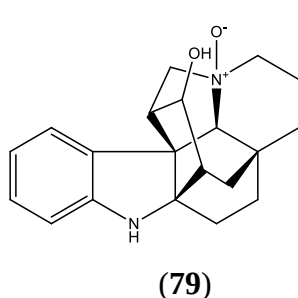
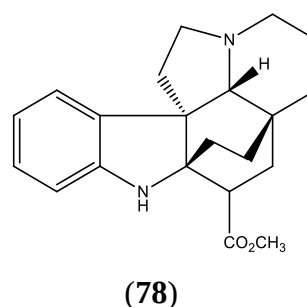
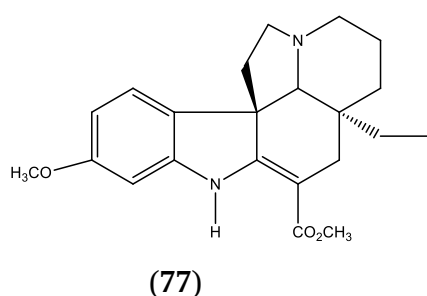
Da fase clorofórmica das cascas de *A. duckei*, popularmente conhecida como “Araracanga” (Mazzei & Ruschel, 2014), foram obtidos os alcaloides indólicos copsanona (73), copsanol (74), 22-epicopsanol (75) e 5-oxoepicopsanol (76) (Ferreira Filho *et al.*, 1966; Pereira *et al.*, 2007).



A atividade cardiovascular do extrato etanólico das folhas de *A. macrocarpon* foi avaliada em ratos, e os resultados deste estudo indicam que a redução na pressão arterial *in vivo* ocorreu sem alterações significativas na frequência cardíaca, possivelmente sugerindo que o efeito de relaxação de vasos *in vitro* do extrato contribuiu significativamente para os efeitos hipotensores (Oliveira *et al.*, 2012). Um outro espécime de *A. macrocarpon* coletado em Brasília-DF teve seu extrato etanólico das cascas testado, apresentando forte atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (Mesquita *et al.*, 2007).

Com relação à composição química de *A. macrocarpon*, conhecida popularmente como “Peroba do campo” (Oliveira Filho *et al.*, 2008), vários alcaloides indólicos foram obtidos, dentre os quais estão: a copsanona (73), copsanol (74), vincadiformina (27), ervinceina (77) e copsinina (78) isolados das sementes, e os alcaloides 73, 74, 22-epicopsanol (75) e (78) das cascas de um espécime coletado na floresta Amazônica da Bolívia (Mitaine *et al.*, 1996.; Pereira *et al.*, 2007). Recentemente, estudos realizados por Bannwart e colaboradores com as folhas de um

espécime coletado em maio de 2010 em Goiânia-GO, resultaram no isolamento e identificação dos alcaloides **73** e **78**, além de copsanol-*N*-óxido (**79**), copsanona-*N*-óxido (**80**) e um derivado ácido do copsinilam (**81**) (Bannwart, 2012.; Bannwart *et al.*, 2013). Testada frente a 11 linhagens de células carcinogênicas, a copsanona (**73**) mostrou-se ativa frente às linhagens de célula glioma e leucemia (Bannwart *et al.*, 2013). Os alcaloides **73** e **80** isolados por Bannwart e colaboradores tiveram seu potencial inibitório avaliado por Klein Júnior e colaboradores em 2015 para monoamino oxidase (MAO), os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando se cinuramina como substrato não seletivo de supersomas MAO-A e MAO-B humanos e mostraram que a atividade de MAO-A para a substância **74** exibiu uma potência dez vezes maior quando comparada à da substância **80**. Estes resultados corroboram o fato de que os alcaloides indólicos podem ser utilizados visando à inibição de enzimas relacionadas com doenças neurodegenerativas (Klein-Júnior *et al.*, 2015).

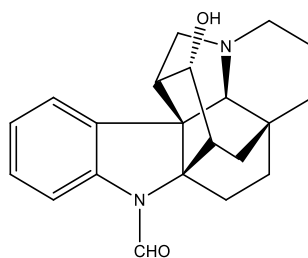


1.3 A espécie *Aspidosperma verbascifolium*

Conforme já mencionado, o gênero *Aspidosperma* se distingue quimicamente pela ocorrência frequente de alcaloides do tipo indólico e tem esta característica compartilhada por cerca de 46 das 57 espécies atribuídas ao gênero (Bolzani *et al.*, 1987). A espécie *A. verbascifolium*, motivo do presente trabalho, é uma destas. Inserida na série “macrocarpa”

(Bolzani *et al.*, 1987), pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida (Barroso, 1991) e incluída filogeneticamente na ordem Gentianales (Sennblad & Bremer 2002), subclasse Asteridae que abrange cerca de 5,5% das angiospermas (Nicholas & Baijnath, 1994). Esta espécie é encontrada apenas nas Américas, principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (Corrêa, 1926.; Woodson, 1951), sendo conhecida popularmente como peroba, guatambu, carapanaúba, pau-pereiro, amargoso e quina (Corrêa, 1931).

Estudo químico anteriormente realizado com um espécime de *A. verbascifolium* coletado em Goiânia relatou o isolamento dos alcaloides di-hidroindólicos copsanona (73), copsanol (74), 22-*epi*-copsanol (75), 5-oxoepicopsanol (76) e N α -formilcopsanol (82) (Braekman *et al.*, 1969).



(82)

Estudo taxonômico realizado recentemente por Machate e colaboradores em 2016 catalogou 14 espécies de *Aspidosperma* no Mato Grosso do Sul, sendo *A. verbascifolium* descrita pela primeira vez no estado (Machate *et al.*, 2016).

Visto à ausência de relatos sobre a composição química de *A. verbascifolium* e levando em consideração as diversas atividades farmacológicas e usos etnomedicinais de espécies deste gênero, torna-se relevante a ampliação do conhecimento químico e propriedades biológicas de espécimes de *A. verbascifolium* que ocorrem em regiões do país. Os resultados além de integrar diversas áreas da pesquisa em plantas, poderão conduzir a um caminho promissor e eficaz para a descoberta de princípios ativos como candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos.

1.4 Avaliação de atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais

O modelo biológico de avaliação de atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas e murina, aliado ao ensaio preliminar de toxicidade para *Artemia salina*, tem sido uma estratégia adotada para a busca de novos agentes

antitumorais. A avaliação da atividade antiproliferativa também é empregada em indústria e em instituições de pesquisa como o National Cancer Institute (NCI-USA). O protocolo atualmente utilizado nos ensaios de citotoxicidade para avaliação da atividade antiproliferativa em *screenings* de drogas anticâncer, é o da sulforrodamina B (Monks, 1991.; Houghton, 2007).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- a) Realizar a identificação dos constituintes químicos das cascas e folhas de um espécime de *Aspidosperma verbascifolium* ocorrente no Cerrado de Mato Grosso do Sul por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM),
- b) Realizar o isolamento, purificação e caracterização dos principais metabólitos secundários presentes nas cascas e folhas desta espécie,
- c) Avaliar o potencial antitumoral dos respectivos extratos brutos, frações e substâncias isoladas, através da avaliação de suas atividades antiproliferativas frente a linhagens de células tumorais.

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais e equipamentos

As análises por CLAE-DAD-EM/EM foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, bombas LC- 20AD, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) M20A, injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A e desgaseificador DGU-20A3r e em espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics® (modelo micrOTOF-QII) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massas quadrupolo e por tempo de voo (Q-TOF), no modo de ionização positivo ou negativo (m/z 120-1300), do Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas da UFMS (LAPNEM).

Nas separações por CLAE semipreparativa foi utilizado equipamento Waters 2489 Autosampler, bomba modelo WatersTM 600, com detector ultravioleta/visível. Em

todos os procedimentos de CLAE utilizou-se solventes grau HPLC. A água utilizada foi purificada no sistema Puritech/Permutation PT0020, filtro 0,2 µm. O software Empower (Waters) foi utilizado para processamento dos dados. A coluna utilizada foi do modelo Luna (Phenomenex®) 100 C-18 de dimensões 250x21x20 mm. As amostras foram injetadas utilizando-se *loop* de 200 µL e vazão previamente determinada para cada amostra. Antes de serem injetadas no equipamento de CLAE, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com poros de abertura 0,45 µm da Milipore® (INQUI/UFMS).

Para as técnicas de cromatografia em coluna foram utilizadas Sephadex LH-20 e sílica gel (70-230 *mesh*). Nas análises por cromatografia em camada delgada foram utilizadas sílica gel 60 GF254 e cromatofolhas de alumínio 60 F254 da Merck, utilizando como reveladores iodo e reagente de Dragendorff (revelador para alcaloides).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX300 (300 e 75 MHz para RMN de ¹H e de ¹³C, respectivamente), utilizando como solvente CDCl₃ e CD₃OD da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.).

3.2 Estudo químico de *Aspidosperma verbascifolium*

3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As amostras vegetais, cascas e folhas de *Aspidosperma verbascifolium*, foram coletadas no município de Campo Grande e identificadas pelo Dr. Arnildo Pott (CCBS/UFMS), sendo o número de coleta WG288. As exsiccatas foram depositadas no herbário CGMS da UFMS.

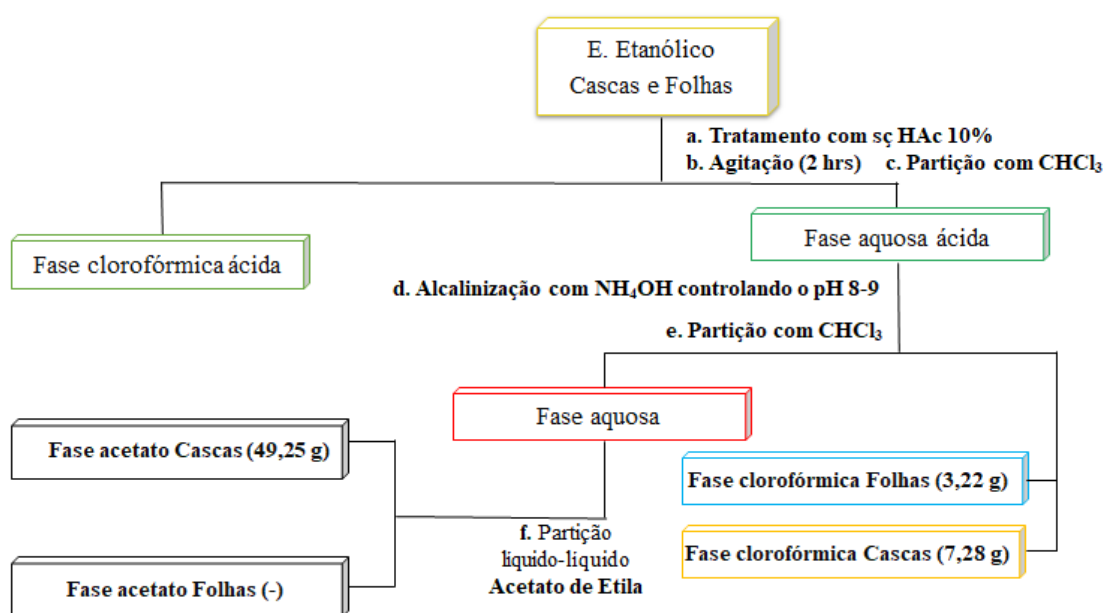
3.2.2 Obtenção e extração ácido-base dos extratos brutos das cascas e folhas de *A. verbascifolium*

As cascas (2.018,2 g) e folhas (1.220,0 g) foram secas, trituradas em moinho de facas e submetidas separadamente à extração exaustiva com etanol 95% a frio. Após a concentração em rotaevaporador, foram obtidos 100,50 g de extrato etanólico das cascas e 283,70 g de extrato etanólico das folhas. Os extratos brutos foram testados quanto à presença de alcaloides, utilizando-se o reagente de Dragendorff. Em seguida, o extrato

das cascas (100,00 g) e o das folhas (202,00 g) foram submetidos ao método clássico de extração de alcaloides, através de extração ácido-base em funil de separação. Inicialmente, foram adicionados a cada extrato 200 mL de solução aquosa de ácido acético 10% e 50 mL de clorofórmio. Os sistemas foram mantidos sob agitação por duas horas e em seguida, as soluções foram transferidas para funis de separação com auxílio de 300 mL de clorofórmio e 50 mL de água. Os funis foram agitados várias vezes por cerca de 30 minutos e deixados em repouso até completa separação das fases.

As respectivas fases clorofórmicas foram separadas e as fases aquosas alcalinizadas até pH 8 com hidróxido de amônio concentrado e, em seguida, submetidas à extração com clorofórmio (200 mL, 3 vezes). As fases clorofórmicas obtidas foram lavadas com 100 mL de água e o solvente orgânico evaporado sob pressão reduzida, resultando em 7,3 g de fase alcaloídica clorofórmica das cascas (**AVFACI**) e 3,2 g de fase alcaloídica clorofórmica das folhas (**AFCJ**) (**Fluxograma 1**).

O extrato aquoso remanescente de **AVFACI** foi particionado com solvente orgânico acetato de etila (250 mL, por 5 vezes) resultando em 49,2 g da fase acetato de etila das cascas, codificada como **AFAAc** (**Fluxograma 1**).



Fluxograma 1. Esquema: Procedimento empregado para a extração ácido/base do extrato etanólico das folhas de *A. verbascifolium*

3.3 Análise por CLAE-DAD-ESI-Q-TOF-EM/EM de AVFACI e AFCJ

Para a obtenção dos perfis químicos dos extratos alcaloidicos das cascas e folhas de *A. verbascifolium* foi utilizada a separação dos constituintes em sistema CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) (Shimadzu LC-20AD, Kyoto, Japan), coluna C18, injetor automático Shimadzu Prominence (SIL-20A) e bombas Shimadzu LC-20AT. Sistema acoplado a um detector de arranjo de diodos SPD-M20A DAD e a um espectrômetro de massas de alta resolução (EM/EM), com analisadores quadrupolo e por tempo de voo (TOF) micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Germany) e com uma fonte de ionização por eletrospray (IES). Os componentes do extrato foram detectados *on line* por detector de arranjo de diodos (DAD) (λ 240-800nm) e então direcionados para o espectrômetro de massas. Os espectros de massas foram obtidos no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 120-1300, sendo essa razão calibrada com adutos de ácido trifluoroacético (TFA) no modo positivo.

Preparo da amostra: Uma alíquota dos extratos alcaloidicos (1,0 mg) foi solubilizada em 0,5mL de MeOH/H₂O (85:15 v/v), aplicada em um cartucho de extração em fase sólida (SPE- Waters, Sep-Pak Classic, C-18, partícula 55-105 μ m, poro 125 Å) e eluída com 0,5 mL de de MeOH/H₂O (70:30 v/v). O cartucho SPE foi previamente condicionado (Eluição de 5 mL de MeOH e depois 5 mL de MeOH/H₂O (70:30 v/v)). Após eluição, a solução foi submetida a secagem e solubilizada em MeOH/H₂O (70:30 v/v) em uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ e filtrada em membrana de PVDF de 0,22 μ m.

Condições cromatográficas – O volume de injeção foi de 5 μ L de solução a 1,0 mg/mL em metanol/água 7:3, coluna Kinetex C-18 (150 x 2.2 mm – 2.6 μ m) e como eluente foi empregado um gradiente de água acidificada (ácido fórmico 0,1%) (A) e acetonitrila acidificada (ácido fórmico 0,1%) (B), nas seguintes condições: 0-2 min: A (97%) e B (3%), 2-25 min A (97-75%) e B (3-25%), 25-40 min: A (75-20%) e B (25-80%), 40-43 min: A (20%) e B (80%), 43-44 min: A (20-97%) e B (80-3%) e 44-48 min: A (97%) e B (3%). A temperatura do forno da coluna e a vazão da fase móvel foram de 50°C e 0,3 mL/min, respectivamente.

3.4 Separação de componentes de frações por CLAE no modo semipreparativo (CLAE-UV/Vis)

As amostras foram pesadas em frasco de vidro, sendo solubilizadas em acetonitrila (ACN) ou metanol (CH₃OH), grau HPLC, em concentrações diferentes para cada amostra e em seguida filtradas. As amostras foram solubilizadas com auxílio de sonicação durante 15 min. Foram injetadas alíquotas de 200 µL, de modo automático. Para a separação utilizou-se coluna modelo Luna (Phenomenex®) 100 C-18 (250 x 21x20 mm, 5 micron) e vazão previamente determinado para cada amostra. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, com detecção nos comprimentos de onda de 210 e 254 nm e/ou 254 e 325 nm. Espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico.

3.5 Identificação dos compostos presentes em AVFACI e AFCJ por espectrometria de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM)

Para tornar mais seletivo o leque de possibilidades de identificações preliminares dos constituintes presentes nas fases alcalóidicas, uma base de dados foi construída a partir de um levantamento bibliográfico cujo escopo se limitou as substâncias previamente isoladas de espécies de *Aspidosperma* até 2015. As bases de dados da SciELO, Chemical Abstracts (SciFinder), ScienceDirect, PudMed foram consultadas, capítulos de livros, dissertações de Mestrado e teses de Doutorado também foram consultados, além destes, anais de congressos disponibilizados na internet e obtidos através das buscas no Google Acadêmico. Os documentos encontrados foram inicialmente triados analisando-se as palavras chave: *Aspidosperma*, *Aspidosperma verbascifolium*, alcaloides, alcaloides indólicos. Para a construção da base teórica aproximadamente 100 documentos foram selecionados.

Constatou se que, em sua maioria, os compostos já descritos na literatura pertencem à classe dos alcaloides indólicos monoterpênicos, tendo poucos relatos de outras classes de compostos (Kam, 2004; Lim *et al.*, 2007; Pereira, *et al.*, 2007; Ahmad, 2009; Bannwart, 2012; Bannwart *et al.*, 2013; Kitajima *et al.*, 2014; Balachandran *et al.*, 2015).

Dados de fórmula molecular e de seus íons protonados e desprotonados foram inseridos na base de dados para cada substância. Desta forma, analisando os resultados

experimentais obtidos por CLAE-DAD-EM/EM e por comparação com a base de dados, foi possível detectar a presença dos componentes previamente descritos e assim identificá-los nas fases alcaloídicas **AVFACI** e **AFCJ** de *Aspidosperma verbascifolium*.

3.6 Isolamento dos constituintes químicos

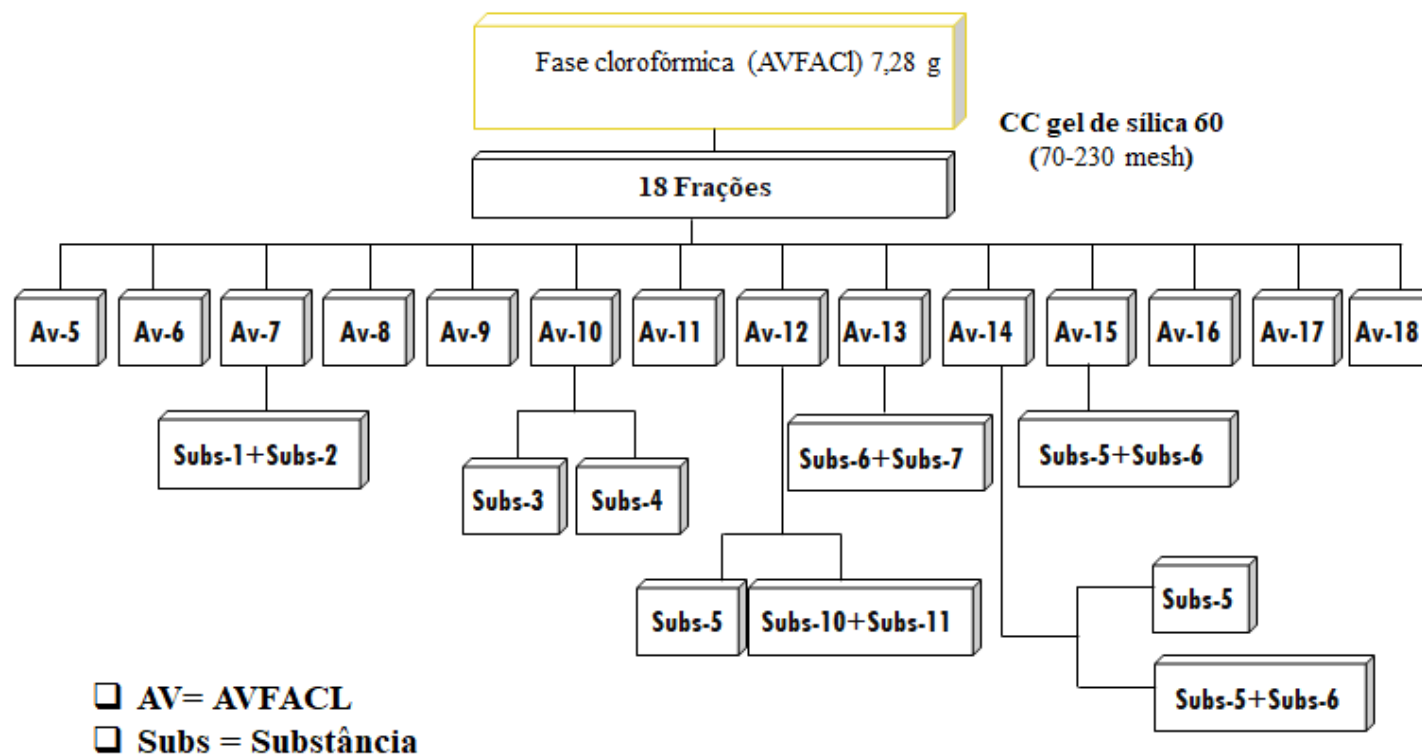
3.6.1 Estudo da fração clorofórmica alcaloídica das cascas (AVFACI)

Inicialmente, a fase alcaloídica clorofórmica das cascas (AVFACI) foi analisada por CCDA, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) e como reveladores vapores de iodo e reagente de Dragendorff. Esta fase (7,3 g) foi submetida à separação cromatográfica em coluna de gel de sílica 60 (70-230 *mesh*) ($\varnothing = 5$ cm; h = 23 cm), empacotada com hexano (100%). Os eluentes utilizados foram hexano, clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade. Foram recolhidas 18 frações, de aproximadamente 100 mL cada, que foram agrupadas de acordo com suas semelhanças em CCDA (AVFACI-1 a AVFACI-18) (**Tabela 1**) (**Fluxograma 2**).

Tabela 1. Frações obtidas da cromatografia em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh) da fração AVFACl

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Identificadas
Hexano (100%)		AVFACl-1	7,8	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 95:5		AVFACl-2	5,0	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 90:10		AVFACl-3	50,7	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 70:30		AVFACl-4	190,0	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 50:50		AVFACl-5	947,1	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 30:70		AVFACl-6	43,6	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 10:90		AVFACl-7A	156,8	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 10:90		AVFACl-7B	545,9	A-1, A-2
CHCl ₃		AVFACl-8	276,9	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 90:10		AVFACl-9	59,1	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 80:20		AVFACl-10AB	821,3	
		AVFACl-10CD	520,3	A-3, A-4
CHCl ₃ :CH ₃ OH 70:30		AVFACl-11	149,7	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 60:40		AVFACl-12	88,6	A-5, A-10, A-11
CHCl ₃ :CH ₃ OH 50:50		AVFACl-13	167,6	A-6, A-7
CHCl ₃ :CH ₃ OH 40:60		AVFACl-14A	47,7	A-5, A-6
CHCl ₃ :CH ₃ OH 40:60		AVFACl-14B	35,9	A-5
CHCl ₃ :CH ₃ OH 30:70		AVFACl-15	53,8	A-5; A-6
CHCl ₃ :CH ₃ OH 20:80	16-17	AVFACl-16/17	55,4	
CH ₃ OH		AVFACl-18	507,4	

Durante a remoção do solvente da fração AVFACl-14 sob vácuo em evaporador rotativo, foi observada a formação de duas fases, que foram separadas e renomeadas como AVFACl-14A (47,7 mg) e AVFACl-14B (35,9 mg). Na fração AVFACl-14A foram obtidas as substâncias **A-5+A-6** e na fração AVFACl-14B a substância **A-5**.



Fluxograma 2. Estudo da fase clorofôrmica alcaloídica das cascas (AVFACL)

3.6.1.1 Estudo da fração AVFACI-14B

A fração codificada como AVFACI-14B (35,9 mg), se apresentou como uma mistura que foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing$ = 4 cm; h = 24 cm), utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 6:4, resultando em 27 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada. As subfrações foram reunidas em seis, de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA (**Tabela 2**). Na subfração AVFACI-14B-5 foi obtida a substância **A-5** (1,0 mg).

Tabela 2. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-14B

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CHCl_3 : CH_3OH 60:40	1-10	AVFACI-14B-1	1,0	A-5
	11-15	AVFACI-14B-2	1,3	
	16-18	AVFACI-14B-3	1,5	
	19-22	AVFACI-14B-4	9,1	
	23-26	AVFACI-14B-5	1,0	
	27	AVFACI-14B-6	1,0	

3.6.1.2 Estudo da subfração AVFACI-7

Durante a remoção do solvente da fração AVFACI-7 sob vácuo em evaporador rotativo, foi observada a formação de duas fases, que foram separadas e renomeadas como AVFACI-7A (156,8 mg) e AVFACI-7B (545,9 mg). A subfração **AVFACI-7B** (545,9 mg) se apresentou como mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing$ = 4 cm; h = 24 cm), utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 6:4, resultando em 105 frações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 26 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. Deste processo resultou no isolamento das substâncias **A-1+A-2** (2,3 mg) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-7B

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substâncias Identificadas
CHCl ₃ : CH ₃ OH 60:40	1-2	AVFACI-7B-1	0,5	
	3-11	AVFACI-7B-2	3,2	
	12-13	AVFACI-7B-3	4,8	
	14-22	AVFACI-7B-4	5,6	
	23	AVFACI-7B-5	1,0	
	24	AVFACI-7B-6	1,0	
	25-29	AVFACI-7B-7	3,7	
	30-32	AVFACI-7B-8	3,2	
	33	AVFACI-7B-9	2,5	
	34-43	AVFACI-7B-10	30,6	
	44	AVFACI-7B-11	6,1	
	45-54	AVFACI-7B-12	24,8	
	55	AVFACI-7B-13	2,1	
	56-66	AVFACI-7B-14	36,7	
	67-72	AVFACI-7B-15	25,9	
	73-76	AVFACI-7B-16	18,0	
	77	AVFACI-7B-17	5,0	
	78-81	AVFACI-7B-18	27,1	
	82-85	AVFACI-7B-19	23,5	
	86-87	AVFACI-7B-20	20,0	
	88	AVFACI-7B-21	6,1	
	89-99	AVFACI-7B-22	2,3	
	100-101	AVFACI-7B-23	1,5	
	102	AVFACI-7B-24	2,1	
	103-104	AVFACI-7B-25	8,5	
	105	AVFACI-7B-26	1,9	

3.6.1.3 Estudo da subfração AVFACI-10CD

A subfração AVFACI-10CD (520,3 mg) se apresentou como uma mistura de substâncias, assim parte de sua massa (18,0 mg) foi submetida a um fracionamento cromatográfico em CLAE. Para a análise utilizou-se coluna Luna® 100 RP-18

(250x21x20 mm d.i., Phenomenex) e vazão de 6 mL/min. As análises foram realizadas a temperatura ambiente, com detecção no comprimento de onda de 254 e 325 nm. Espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizada a eluição isocrática descrita na **Tabela 4**. Deste processo resultou o isolamento das substâncias **A-3** (5,7 mg) e **A-4** (4,0 mg).

Tabela 4. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AVFACI-10CD

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Massa- subfração (mg)	Substância Isolada	Pico
0-6	95	5			
6-9	95	5	3,5		1
9-10	95	5	5,7	A-3	2
10-11	95	5	4,0	A-4	3

A: Metanol, B: H₂O.

3.6.1.4 Estudo da fração AVFACI-12

A fração **AVFACI-12** (88,6 mg) se apresentou como uma mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing$ = 4 cm; h = 24 cm), utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH 6:4, resultando em 58 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada. Estas foram posteriormente reunidas em 12 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA (**Tabela 5**).

Tabela 5. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-12

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)
CHCl ₃ :CH ₃ OH 60:40	1-5	AVFACI-12-1	4,8
	6	AVFACI-12-2	1,0
	7	AVFACI-12-3	1,5
	8	AVFACI-12-4	1,0
	9	AVFACI-12-5	2,1
	10-14	AVFACI-12-6	6,3
	15-16	AVFACI-12-7	5,0
	17-20	AVFACI-12-8	13,0
	21-24	AVFACI-12-9	13,5
	25-32	AVFACI-12-10	21,4
	33-40	AVFACI-12-11	4,7
	41-58	AVFACI-12-12	7,8

3.6.1.4.1 Estudo da subfração AVFACI-12-8 e AVFACI-12-10 por CLAE-UV/Vis

A subfração AVFACI-12-8 (13,0 mg) se apresentou como uma mistura de substâncias e foi submetida a um fracionamento cromatográfico por CLAE no modo semipreparativo. Para a separação dos componentes de AVFACI-12-8 utilizou-se coluna Luna® 100 C-18 (250x21x20 mm d.i., Phenomenex) e vazão de 9 mL/min. A separação foi realizada à temperatura ambiente, com detecção nos comprimentos de onda de 210 e 254 nm. Os espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizado como eluente o sistema isocrático descrito na **Tabela 6**. Deste processo resultou o isolamento da substância **A-5** (1,6 mg).

Tabela 6. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AVFACI-12-8

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Massa-subfração (mg)	Substância Isolada	Pico
0	90	10			
3,0-4,8	90	10	1,5		1
4,8-5,6	90	10	3,4		2
5,6- 8,0	90	10	3,8		3
8,0-12,0	90	10	1,6	A-5	4
12,0-21,6	90	10	0,8		5

A: Acetonitrila (ACN), B: H₂O.

Para a separação dos componentes de AVFACI-12-10 (15,4 mg) utilizou-se coluna Luna® 100 RP-18 (250x21x20 mm d.i., Phenomenex) e vazão de 6 mL/min. A separação foi realizada à temperatura ambiente, com detecção no comprimento de onda de 210 e 254 nm. Os espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizado o sistema isocrático descrito na **Tabela 7**. Deste processo resultou o isolamento das substâncias **A-10+A-11** (8,9 mg) e **A-5** (3,5 mg).

Tabela 7. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AVFACI-12-10

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Massa-subfração (mg)	Substância Isolada	Pico
0,0-8,0	100	0			
8,0-9,8	100	0	8,9	A-10+A-11	1
9,8-12,5	100	0	0,3		2
12,5-19,0	100	0	3,5	A-5	3

A: Acetonitrila (ACN), B: H₂O.

3.6.1.5 Estudo da subfração AVFACI-13

Inicialmente, a fração AVFACI-13 (167,6 mg) foi analisada em CCDA com revelador Dragendorff (eluente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 8:2) e revelou a presença de alcaloides em mistura. Foi então submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 6:4 ($\varnothing = 4$ cm; $h = 30$ cm), resultando em 81 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 12 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. Deste processo resultou o isolamento das substâncias **A-6+A-7** (2,7 mg) (**Tabela 8**).

Tabela 8. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-13

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 60:40	1-20	AVFACI-13-1	2,7	A-6+A-7
	21-28	AVFACI-13-2	2,0	
	29-36	AVFACI-13-3	2,4	
	37-44	AVFACI-13-4	2,8	
	45-50	AVFACI-13-5	3,9	
	51-52	AVFACI-13-6	6,6	
	53-54	AVFACI-13-7	5,4	
	55-61	AVFACI-13-8	20,0	
	62-67	AVFACI-13-9	50,7	
	68	AVFACI-13-10	2,7	
	69-75	AVFACI-13-11	4,2	
	76-81	AVFACI-13-12	4,0	

3.6.1.6 Estudo da fração AVFACI-15

Inicialmente, a subfração AVFACI-15 (53,8 mg) foi analisada em CCDA com revelador Dragendorff (eluente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 8:2) e revelou a presença de alcaloides em mistura. Foi então submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 6:4 ($\varnothing = 4$ cm; $h = 24$ cm), resultando em 32 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 8

subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. Deste processo resultou o isolamento da substância **A-6** (2,1 mg) (**Tabela 9**).

Tabela 9. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AVFACI-15

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CHCl ₃ :CH ₃ OH 60:40	1-8	AVFACI-15-1	1,0	A-6
	9-13	AVFACI-15-2	1,2	
	14-15	AVFACI-15-3	1,9	
	16	AVFACI-15-4	1,2	
	17	AVFACI-15-5	2,2	
	18-20	AVFACI-15-6	2,1	
	21-24	AVFACI-15-7	7,8	
	25-32	AVFACI-15-8	19,8	

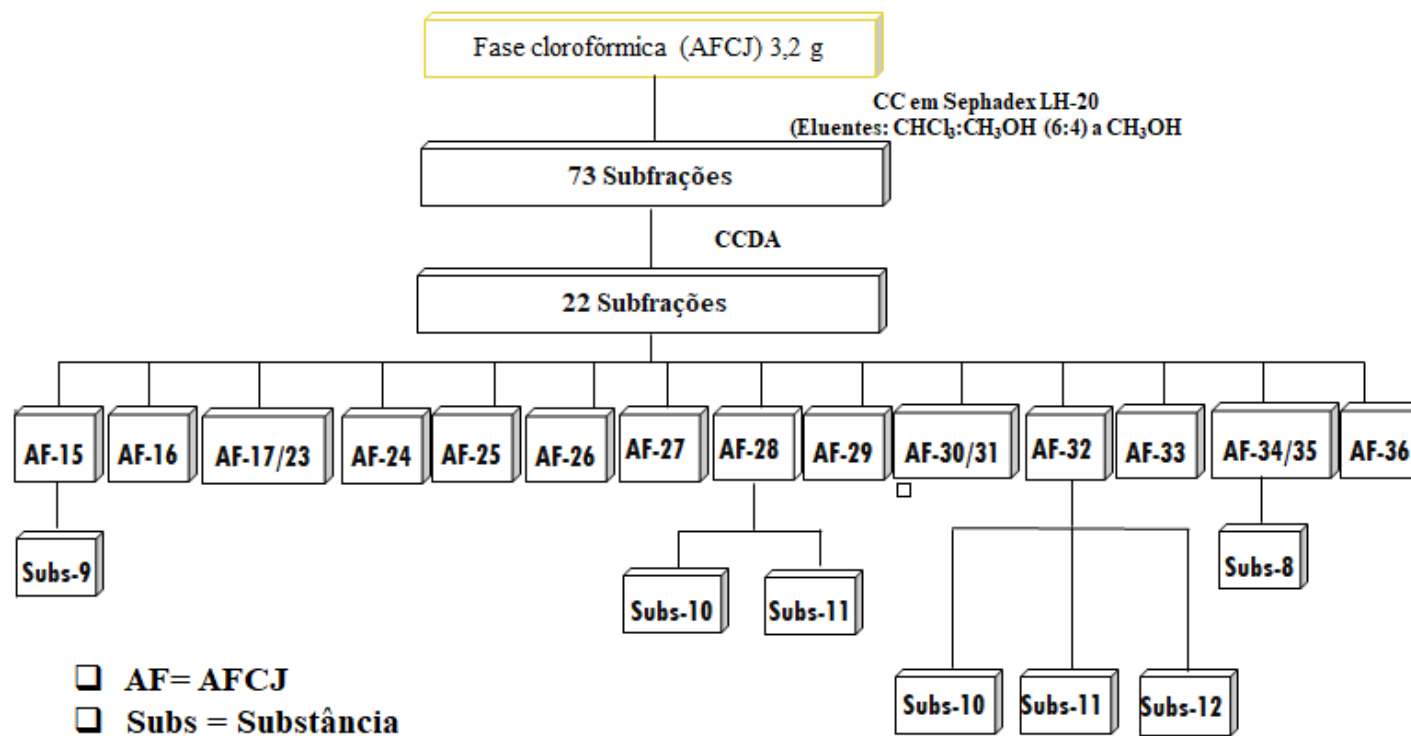
3.6.2 Estudo da fração clorofórmica alcaloídica das folhas (AFCJ)

Inicialmente, a fase alcaloídica clorofórmica (AFCJ) foi analisada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1) e como reveladores vapores de iodo e reagente de Dragendorff.

A fração AFCJ (3,2 g) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (Ø = 6 cm; h = 35 cm), utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (6:4) e CH₃OH 100%. Foram obtidas 73 frações, de aproximadamente 1 mL cada, as quais foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, resultando em 22 subfrações (AFCJ-1 a AFCJ-36) (**Tabela 10**) (**Fluxograma 3**).

Tabela 10. Dados obtidos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração AFCJ

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CHCl ₃ : CH ₃ OH 60:40 e CH ₃ OH	1-50	AFCJ-1/7	50,0	A-9
	51-53	AFCJ-8	166,0	
	54	AFCJ-9	1,7	
	55-57	AFCJ-10	141,0	
	58-62	AFCJ-11	37,5	
	63	AFCJ-12	21,4	
	64-65	AFCJ-13	3,1	
	66-69	AFCJ-14	74,9	
	70-72	AFCJ-15	111,8	
	73	AFCJ-16	14,3	
	74-86	AFCJ-17/23	227,9	
	87-88	AFCJ-24	161,0	
	89-91	AFCJ-25	69,9	
	92	AFCJ-26	48,9	
	93-100	AFCJ-27	97,5	
	101-108	AFCJ-28	409,0	A-10, A-11
	109-114	AFCJ-29	148,6	
	115-126	AFCJ-30/31	173,9	A-8, A-10, A-11, A-13
	127-136	AFCJ-32	282,9	
	137-142	AFCJ-33	184,8	
	143-144	AFCJ-34/35	52,2	A-8
	145	AFCJ-36	85,9	



Fluxograma 3. Estudo da fase cloroformica alcaloídica das folhas (AFVJ)

3.6.2.1 Estudo da fração AFCJ-15

A fração AFCJ-15 (111,8 mg) se apresentou como uma mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 6:4 ($\varnothing = 4$ cm; $h = 30$ cm), resultando em 67 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram reunidas em 15 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA (**Tabela 11**).

Tabela 11. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFCJ-15

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)
$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 60:40	1-14	AFCJ-15-1	2,7
	15	AFCJ-15-2	0,1
	16	AFCJ-15-3	0,5
	17-18	AFCJ-15-4	0,8
	19-20	AFCJ-15-5	0,3
	21-25	AFCJ-15-6	1,8
	26-28	AFCJ-15-7	1,0
	29-33	AFCJ-15-8	4,0
	34	AFCJ-15-9	2,0
	35-39	AFCJ-15-10	8,5
	40-43	AFCJ-15-11	8,3
	44-46	AFCJ-15-12	6,0
	47-62	AFCJ-15-13	27,0
	63-66	AFCJ-15-14	11,5
	67	AFCJ-15-15	2,5

A subfração AFCJ-15-13 (27,0 mg) se apresentou como uma mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico por CLAE semipreparativa. Para a análise utilizou-se coluna Luna® 100 RP-18 (250x21x20 mm d.i., Phenomenex) e vazão de 5,0 mL/min. A separação foi realizada à temperatura ambiente, com detecção nos comprimentos de onda de 210 e 254 nm. Os espectros no UV, na faixa de 210 a 400

nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizada a eluição isocrática descrita na **Tabela 12**. Deste processo resultou o isolamento da substância **A-9** (2,3 mg).

Tabela 12. Processo de separação dos componentes da fração por CLAE semipreparativa da subfração AFCJ-15-13

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Massa- subfração (mg)	Substância Isolada	Pico
0	90	10			
	90	10	2,1		1
	90	10	3,1		2
	90	10	4,2		3
12,0	90	10	2,3	A-9	4

A: Acetonitrila (ACN), B: H₂O.

3.6.2.2 Estudo da fração AFCJ-28

A fração AFCJ-28 (409,0 mg) se apresentou como uma mistura e foi escolhida para um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (70-230 *mesh*), empacotada com C₆H₁₄/CHCl₃ (8:2) (Ø = 3 cm; h = 25 cm) e eluída com misturas de C₆H₁₄/CHCl₃ e de CHCl₃/CH₃OH em gradiente crescente de polaridade, resultando em 103 subfrações de aproximadamente 1 mL cada. Estas foram posteriormente reunidas em 46 subfrações (AFCJ-28-1 a AFCJ-28-46), de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA (**Tabela 13**). Deste processo foram obtidas as substâncias **A-11** (3,8 mg), **A-11** (15,5 mg) e **A-10** (3,8 mg) das subfrações AFCJ-28-32, AFCJ-28-34 e AFCJ-28-35, respectivamente.

Tabela 13. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) da fração AFCJ-28

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 50:50	1-6	AFCJ-28-1/3	21,0	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 40:60	7-10	AFCJ-28-4	1,0	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 40:60	11-14	AFCJ-28-5	1,5	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 30:70	15	AFCJ-28-6	1,0	
	16	AFCJ-28-7	8,8	
	17	AFCJ-28-8	10,9	
	18	AFCJ-28-9	2,1	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 20:80	19-27	AFCJ-28-10/14	2,3	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 10:90	28	AFCJ-28-15	1,0	
	29-32	AFCJ-28-16	2,6	
	33-36	AFCJ-28-17	5,0	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 5:95	37-44	AFCJ-28-18	13,1	
	45-46	AFCJ-28-19	6,5	
CHCl ₃	47-50	AFCJ-28-20	10,4	
	51-58	AFCJ-28-21/24	17,5	
CHCl ₃ : CH ₃ OH 5:95	59-60	AFCJ-28-25	28,8	
	61-62	AFCJ-28-26/27	19,0	
	63	AFCJ-28-28	10,5	
CHCl ₃ : CH ₃ OH 5:95	64-72	AFCJ-28-31	33,0	
	73-74	AFCJ-28-32	3,8	A-11
	75-78	AFCJ-28-33/34	15,5	A-11
	79-80	AFCJ-28-35	3,8	A-10
CHCl ₃ : CH ₃ OH 90:10	81	AFCJ-28-36	8,1	
	82	AFCJ-28-37	9,3	
	83-84	AFCJ-28-38	8,7	
CHCl ₃ : CH ₃ OH 80:20	85-87	AFCJ-28-39	22,3	
	88-91	AFCJ-28-40/42	12,1	
CHCl ₃ : CH ₃ OH 70:30	92-94	AFCJ-28-43	12,7	
	95-99	AFCJ-28-44	23,1	
CHCl ₃ : CH ₃ OH 60:40 a CHCl ₃ : CH ₃ OH 50:50	100-104	AFCJ-28-45/46	16,7	

A subfração AFCJ-28-31 (33,3 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel (230-400 mesh) ($\varnothing = 3$ cm; h = 15 cm), utilizando como eluente misturas de $C_6H_{14}/CHCl_3$ e de $CHCl_3/CH_3OH$ em gradiente crescente de polaridade, resultando em 16 frações de aproximadamente 8 mL cada (AFCJ-28-31-1 a AFCJ-28-31-16). Estas foram reunidas em 10 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. Este processo resultou no isolamento da substância **A-10** (3,6 mg) (**Tabela 14**).

Tabela 14. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) da subfração AFCJ-28-31

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
$C_6H_{14}:CHCl_3$ 20:80	1-2	AFCJ-28-31-1	0,3	A-10
$C_6H_{14}:CHCl_3$ 10:90	3	AFCJ-28-31-2	2,3	
	4	AFCJ-28-31-3	0,9	
$C_6H_{14}:CHCl_3$ 5:95	5	AFCJ-28-31-4	0,2	
	6	AFCJ-28-31-5	0,8	
$CHCl_3$	7	AFCJ-28-31-6	7,0	
	8	AFCJ-28-31-7	2,7	
$CHCl_3:CH_3OH$ 90:10	9	AFCJ-28-31-8	1,9	
	10-12	AFCJ-28-31-9	3,6	
$CHCl_3:CH_3OH$ 80:20 a $CHCl_3:CH_3OH$ 50:50	13-16	AFCJ-28-31-10	8,5	

A subfração AFCJ-28-46 (16,7 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel (230-400 mesh), ($\varnothing = 3$ cm; h = 10 cm) utilizando como eluente misturas de $C_6H_{14}/CHCl_3$ e de $CHCl_3/CH_3OH$ em gradiente crescente de polaridade, resultando em 10 frações de aproximadamente 8 mL cada (AFCJ-28-46-1 a AFCJ-28-46-10). Estas foram reunidas em 10 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. Este processo resultou no isolamento da substância **A-10** (3,6 mg) (**Tabela 15**).

Tabela 15. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) da subfração AFCJ-28-46

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (66G)	Substância Isolada
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 20:80	1-4	AFCJ-28-46-1	1,5	A-10
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 10:90	5	AFCJ-28-46-2	2,0	
	6-9	AFCJ-28-46-3	1,0	
	10	AFCJ-28-46-4	0,6	
CHCl ₃	11-14	AFCJ-28-46-5	1,0	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 95:5	15-16	AFCJ-28-46-6	2,0	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 90:10	17-18	AFCJ-28-46-7	2,5	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 80:20	19-20	AFCJ-28-46-8	3,5	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 7:3	21-22	AFCJ-28-46-9	1,0	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 50:50	23	AFCJ-28-46-10	0,5	

3.6.2.3 Estudo da fração AFCJ-32

A fração AFCJ-32 (282,9 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing$ = 4 cm; h = 24 cm), utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH 6:4, resultando em 72 subfrações de aproximadamente 1,0 mL cada, as quais foram reunidas em 18 subfrações (AFCJ-32-1 a AFCJ-32-18) de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA (**Tabela 16**). Este processo resultou no isolamento da substância **A-8** (3,6 mg) da subfração AFCJ-32-14 (**Tabela 16**).

Tabela 16. Dados obtidos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração AFCJ-32

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CHCl ₃ :CH ₃ OH 60:40	1-5	AFCJ-32-1	0,8	A-8
	6-7	AFCJ-32-2	0,7	
	8-9	AFCJ-32-3	0,1	
	10-15	AFCJ-32-4	2,5	
	16-24	AFCJ-32-5	14,6	
	25-27	AFCJ-32-6	6,6	
	28	AFCJ-32-7	2,5	
	29-32	AFCJ-32-8	16,1	
	33-61	AFCJ-32-9/10	171,1	
	62-63	AFCJ-32-11	9,6	
	64	AFCJ-32-12	1,0	
	65-67	AFCJ-32-13	7,0	
	68	AFCJ-32-14	3,3	
	69	AFCJ-32-15	2,0	
	70	AFCJ-32-16	0,9	
	71	AFCJ-32-17	2,0	
	72	AFCJ-32-18	4,3	

A subfração AFCJ-32-9/10 (171,1 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel (230-400 mesh) ($\varnothing = 4$ cm; h = 20 cm) utilizando como eluente misturas de C₆H₁₄/CHCl₃ e de CHCl₃/CH₃OH em gradiente crescente de polaridade, resultando em 30 subfrações. Estas foram posteriormente reunidas em 11 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA (AFCJ-32-9/10-1 a AFCJ-32-9/10-11). Deste processo resultou o isolamento das substâncias AFCJ-32-9/10-7 (**A-12**), AFCJ-32-9/10-8 (**A-11**) (19,5 mg) e AFCJ-32-9/10-9 (**A-10**) (12,5 mg) e AFCJ-32-9/10-10 (**A-10**) (4,3 mg) (**Tabela 17**).

Tabela 17. Dados obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) da subfração AFCJ-32-9-10

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 20:80	1-3	AFCJ-32-9/10-1	0,5	
	4	AFCJ-32-9/10-2	2,5	
C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 10:90	5	AFCJ-32-9/10-3	1,1	
	6-9	AFCJ-32-9/10-4	2,5	
CHCl ₃	10-12	AFCJ-32-9/10-5	2,1	
	13	AFCJ-32-9/10-6	3,6	
CHCl ₃ :CH ₃ OH 10:90	14	AFCJ-32-9/10-7	3,7	A-12
	15-16	AFCJ-32-9/10-8	19,5	A-11
CHCl ₃ :CH ₃ OH 20:80	17	AFCJ-32-9/10-9	12,5	A-10
	18	AFCJ-32-9/10-10	4,3	A-10
CHCl ₃ :CH ₃ OH 30:70	19-21	AFCJ-32-9/10-11	5,5	

3.6.2.4 Estudo da subfração AFCJ-34/35

A subfração AFCJ-34/35 (52,2 mg) se apresentou como uma mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing = 4$ cm; h = 24 cm), utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH 6:4, resultando em 36 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram reunidas em 10 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. As análises das subfrações levaram ao isolamento da substância **A-8** (**Tabela 18**).

Tabela 18. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFCJ-35

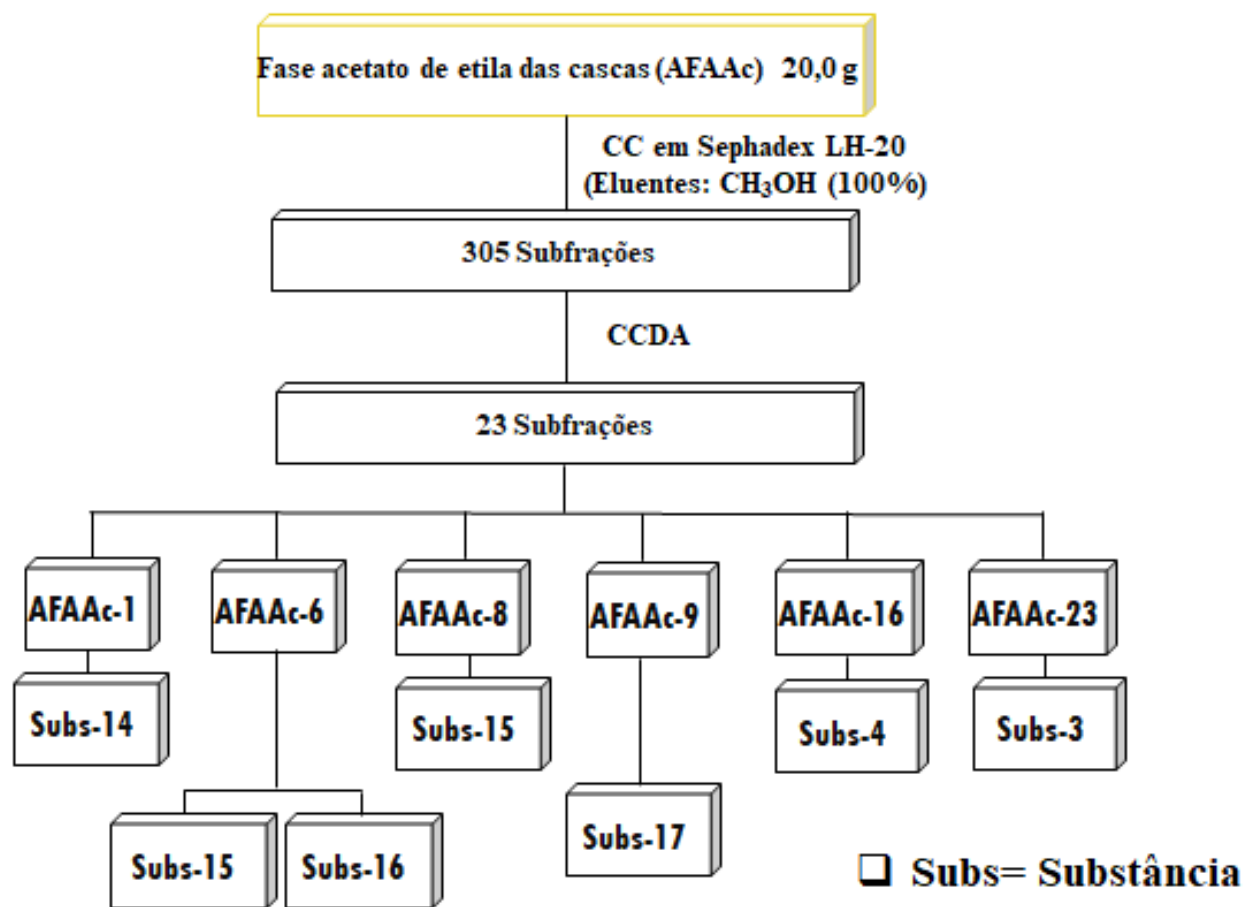
Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CHCl ₃ :CH ₃ OH 60:40	1-2	AFCJ-35-1	0,9	A-8
	3-5	AFCJ-35-2	1,0	
	6-8	AFCJ-35-3	1,5	
	9-12	AFCJ-35-4	4,0	
	13-20	AFCJ-35-5	11,5	
	21-23	AFCJ-35-6	2,0	
	24-30	AFCJ-35-7	5,0	
	31	AFCJ-35-8	0,5	
	32-34	AFCJ-35-9	11,5	
	35-36	AFCJ-35-10	10,0	

3.6.3 Estudo da fração acetato de etila das cascas (AFAAc)

Inicialmente, a fase acetato de etila das cascas (**AFAAc**) (49,2 g) foi analisada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando como eluente CHCl₃/ CH₃OH (9:1) e como reveladores vapores de iodo. Parte desta fração (3,0 g) foi submetida à separação cromatográfica em coluna Sephadex LH-20 (Ø = 6 cm; h = 35 cm). O eluente utilizado foi metanol 100% (MeOH). Foram recolhidas 305 subfrações, de aproximadamente 10 mL cada, que foram agrupadas de acordo com suas semelhanças em CCD, gerando 25 novas subfrações (AFAAc-1 a AFAAc -25) (**Tabela 19**) (**Fluxograma 4**).

Tabela 19. Dados obtidos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 da fração AFAAc

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CH ₃ OH	1-22	AFAAc-1	101,0	A-14
	23-32	AFAAc-2	338,1	
	33-44	AFAAc-3	223,3	
	45-69	AFAAc-4	99,5	
	70	AFAAc-5	5,0	
	71-80	AFAAc-6	32,2	A-15, A-16
	81-91	AFAAc-7	40,2	
	92-111	AFAAc-8	61,4	A-15
	112-123	AFAAc-9	40,6	A-17
	124-137	AFAAc-10	42,7	
	138	AFAAc-11	5,1	
	139-159	AFAAc-12	67,8	
	160	AFAAc-13	3,4	
	161-169	AFAAc-14	34,0	
	170-171	AFAAc-15	6,0	
	172-204	AFAAc-16	87,9	A-4
	205-212	AFAAc-17	47,7	
	213-220	AFAAc-18	17,2	
	221-228	AFAAc-19	66,9	
	229-230	AFAAc-20	13,1	
	231-236	AFAAc-21	67,6	
	237-262	AFAAc-22	366,6	
	263-303	AFAAc-23	316,8	A-3
	304	AFAAc-24	2,0	
	305	AFAAc-25	3,3	



Fluxograma 4. Estudo da fase acetato de etila das cascas (AFAAc)

3.6.3.1 Estudo da subfração AFAAc-1

A fração AFAAc-1 (101,0 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ($\varnothing = 4$ cm; h = 24 cm), utilizando como eluente CH_3OH . Foram obtidas 20 frações de aproximadamente 0,5 mL cada. As frações coletadas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCDA, gerando 6 novas subfrações (AFAAc-1-1 a AFAAc-1-6) (**Tabela 20**).

Tabela 20. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-1

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CH_3OH	5-9	AFAAc-1-1	13,2	A-13
	10-12	AFAAc-1-2	10,2	
	13	AFAAc-1-3	13,1	
	14	AFAAc-1-4	15,2	
	15-18	AFAAc-1-5	10,2	
	19-20	AFAAc-1-6	11,1	

A subfração AFAAc-1-1 (13,2 mg) solúvel em metanol, apresentou uma mancha em CCDA quando revelado com iodo, fornecendo a substância **A-13**.

3.6.3.2 Estudo da subfração AFAAc-6

A subfração AFAAc-6 (32,2 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing = 4$ cm; h = 24 cm), utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 6:4, resultando em 63 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram reunidas em 10 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. As análises das subfrações levaram ao isolamento de 2 substâncias (**Tabela 21**).

Tabela 21. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-6

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CHCl ₃ :CH ₃ OH 60:40	1-18	AFAAc-6-1	2,0	A-14+A-15
	19-21	AFAAc-6-2	2,0	
	22-24	AFAAc-6-3	2,3	
	25-26	AFAAc-6-4	2,4	
	27-28	AFAAc-6-5	2,7	
	29	AFAAc-6-6	1,0	
	30-33	AFAAc-6-7	1,7	
	34-36	AFAAc-6-8	4,0	
	37-40	AFAAc-6-9	3,8	
	41	AFAAc-6-10	4,5	

3.6.3.3 Estudo da subfração AFAAc-8

A subfração AFAAc-8 (61,4 mg) se apresentou como em mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 ($\varnothing = 4$ cm; h = 24 cm), utilizando como eluente CH₃OH, resultando em 45 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram reunidas em 11 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. As análises das subfrações levaram ao isolamento da substância **A-14** (Tabela 22).

Tabela 22. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-8

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CH ₃ OH	1-3	AFAAc-8-1	1,0	A-14
	4	AFAAc-8-2	0,5	
	5-7	AFAAc-8-3	2,0	
	8	AFAAc-8-4	0,5	
	9-12	AFAAc-8-5	2,5	
	13-16	AFAAc-8-6	1,0	
	17	AFAAc-8-7	0,5	
	18-23	AFAAc-8-8	5,0	
	24-39	AFAAc-8-9	1,3	
	40	AFAAc-8-10	0,5	
	41-45	AFAAc-8-11	1,0	

3.6.3.4 Estudo da subfração AFAAc-9

A subfração AFAAc-9 (40,6 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20, utilizando como eluente CH₃OH 100%, resultando em 50 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada, que foram reunidas em 13 subfrações de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. As análises das subfrações levaram ao isolamento da substância **A-16** (Tabela 23).

Tabela 23. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-9

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CH ₃ OH	1-13	AFAAc-9-1	0,6	A-16
	14-15	AFAAc-9-2	0,5	
	16-17	AFAAc-9-3	2,1	
	18-19	AFAAc-9-4	1,0	
	20-21	AFAAc-9-5	1,0	
	22-24	AFAAc-9-6	2,0	
	25-29	AFAAc-9-7	3,0	
	30	AFAAc-9-8	0,5	
	31-32	AFAAc-9-9	4,6	
	33-34	AFAAc-9-10	5,7	
	35	AFAAc-9-11	0,5	
	36-39	AFAAc-9-12	7,3	
	40-50	AFAAc-9-13	7,5	

3.6.3.5 Estudo da subfração AFAAc-16

A subfração AFAAc-16 (87,9 mg) se apresentou em mistura e foi submetida a um fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20, utilizando como eluente CH₃OH, resultando em 26 subfrações de aproximadamente 0,5 mL cada. As análises das subfrações levaram ao isolamento da substância **A-4** (Tabela 24).

Tabela 24. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-16

Eluente	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
CH ₃ OH	AFAAc-16-1	1,0	A-4
	AFAAc-16-2	5,2	
	AFAAc-16-3	3,4	
	AFAAc-16-4	2,3	
	AFAAc-16-5	4,2	
	AFAAc-16-6	3,1	
	AFAAc-16-7	1,2	
	AFAAc-16-8	0,8	
	AFAAc-16-9	1,2	
	AFAAc-16-10	1,3	
	AFAAc-16-11	1,1	
	AFAAc-16-12	0,5	
	AFAAc-16-13	1,2	
	AFAAc-16-14	3,4	
	AFAAc-16-15	5,4	
	AFAAc-16-16	1,2	
	AFAAc-16-17	3,2	
	AFAAc-16-18	3,3	
	AFAAc-16-19	3,2	
	AFAAc-16-20	4,2	
	AFAAc-16-21	2,3	
	AFAAc-16-22	3,1	
	AFAAc-16-23	3,4	
	AFAAc-16-24	0,5	
	AFAAc-16-25	1,0	
	AFAAc-16-26	6,2	

3.6.3.6 Estudo da subfração AFAAc-23

Parte da subfração AFAAc-23 (123,4 mg) se apresentou como uma mistura e foi submetida a uma partição por solventes, utilizando como eluentes CH₃OH (2 mL),

CHCl₃ (2mL) e H₂O (1mL), resultando em duas fases distintas. As análises das subfrações levaram ao isolamento da substância **A-3** (Tabela 25).

Tabela 25. Dados obtidos por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da fração AFAAc-23

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa-Fração (mg)	Substância Isolada
	-	AFAAc-23-i	120,0	
	-	AFAAc-23-s	3,4	A-3

3.7 Ensaios de atividade antiproliferativa frente a linhagens de células neoplásicas humanas e murina

Os extratos etanólicos das cascas e folhas da espécie, assim como as substâncias isoladas, foram encaminhadas para a Prof^a Dr^a Maria de Fatima Cepa Matos e Prof^a Dr^a Renata Trentin Perdomo do FACFAN da UFMS para avaliação da atividade citotóxica frente às seguintes linhagens de células tumorais: MCF7 (mama), HT-29 (côlon), 786-0 (rim), PC-03 (próstata), HL-60 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas), OVCAR-3 (ovário). Também foi incluída a linhagem não tumoral NIH/3T3 (ATCC–CRL 1658, fibroblasto murino) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro para a avaliação da citotoxicidade (Ojeda, 2015). O teste de citotoxicidade foi realizado de acordo com o protocolo que emprega o corante sulforrodamina B (Monks, 1991). Nos experimentos foram incluídos um controle positivo (doxorubicina). A inibição de crescimento - GI (%) de cada amostra-teste foram calculadas em programa Excel 2007, utilizando-se as fórmulas segundo Monks. (1991):

$T > CN$ a droga estimulou o crescimento, não é possível o cálculo da GI.

Se $T \geq T_0$ e $< CN$, (efeito citostático): $IC = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

Se $T < T_0$ (efeito citocida): $IC = 100 \times [(T-T_0)/(C)]$

A dose que inibe 50% do crescimento celular (GI₅₀) foi determinada em programa de análises de dados (Origin Versão 6.0). As amostras-teste com GI₅₀ ≤ 30µg/mL foram consideradas ativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fase clorofórmica (AVFACl) das cascas de *Aspidosperma verbascifolium*

As substâncias isoladas a partir do fracionamento da fase alcaloídica clorofórmica das cascas do espécime *Aspidosperma verbascifolium* (AVFACl) tiveram suas estruturas estabelecidas com base nas análises espectroscópicas, principalmente RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais e também na espectrometria de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM), e posterior comparação com dados existentes na literatura. A identificação destas substâncias é descrita a seguir.

4.1.1 Substâncias A-1 + A-2

As substâncias **A-1** e **A-2** presentes na fração AVFACl-7B-89/99 se apresentaram como um sólido de cor branca solúvel em clorofórmio, tendo fornecido resultado negativo frente ao reagente de Dragendorff. A fração apresentou, no entanto, uma única mancha quando revelada em placa cromatográfica com Iodo.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração (**Figura 2**) sugeriu tratar-se de uma mistura de duas substâncias, ambas pertencentes à classe dos esteroides. Esta proposta foi corroborada pela presença de sinais relativos a hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,32 (d, $J = 4,6$ Hz, H-5), além de um tripleto em δ_{H} 3,50 ($J = 5,2$ Hz, H-3) indicativo da presença de hidrogênio carbinólico relativo à β -hidroxilação do sistema, pertencentes a ambos os esteroides. Foram observados também sinais de hidrogênios olefínicos *trans*, em δ_{H} 4,98 (dd, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz) e 5,12 (dd, $J = 8,3$ e $15,1$ Hz), sugestivos dos H-22 e H-23, respectivamente, do esteroide estigmasterol. A presença de sinais em δ_{H} 0,65-1,05 de vários grupos metínicos e entre 1,0-2,0 de grupos metilênicos, reforça o indicio de que a fração tratava-se da mistura dos esteroides β -sitosterol (**A-1**) e estigmasterol (**A-2**) (**Figura 1, Tabela 26**).

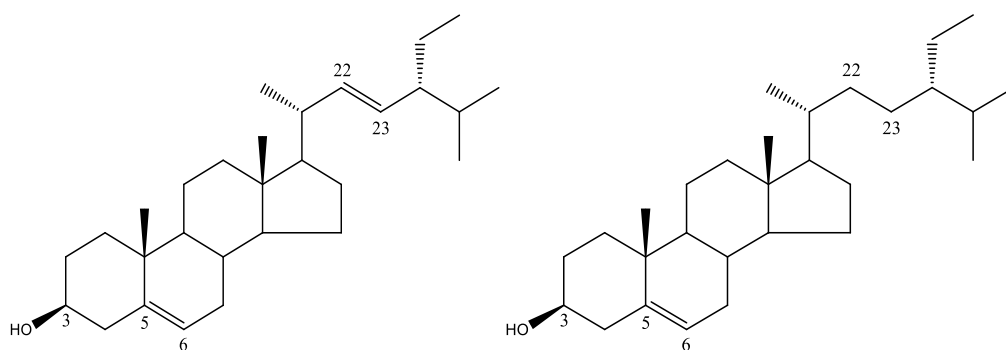


Figura 1. Estrutura química dos esteróides **A-1** (estigmasterol) e **A-2** (β -sitosterol)

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos esteroides foram comparados com os encontrados na literatura (Baratto, 2010.; Dalmarco, 2009) para os esteróides estigmasterol e β -sitosterol, conforme listado na **Tabela 26**. Embora de ocorrência ampla no reino vegetal, estes compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Aspidosperma*.

As confirmações das estruturas de **A-1** e **A-2** foram feitas com base na comparação por CCDA e pelos dados de RMN comparados com a literatura com amostras autênticas.

Tabela 26. Dados de RMN de ^1H para as substâncias **A-1** e **A-2** e comparação com dados de ^1H para o estigmasterol e β -sitosterol

	δ_{H} (mult., J) ^a A-1	δ_{H} (mult., J) ^a A-2	δ_{H} (mult., J) ^b estigmasterol (Chaturvedula, 2012)	δ_{H} (mult., J) ^b β -sitosterol (Chaturvedula, 2012)
3	3,50 (t, J = 5,2 Hz)	3,50 (t, J = 5,2 Hz)	3,51 (tdd, J = 4,5; 4,2; 3,8 Hz)	3,53 (tdd, J = 4,5; 4,2; 3,8 Hz)
5	5,32 (d, J = 4,6 Hz)	5,32 (d, J = 4,6 Hz)	5,31 (t, J = 6,1 Hz)	5,36 (t, J = 6,4 Hz)
18	0,98 (s)	0,98 (s)	1,03 (s, 3H)	1,01 (s, 3H)
19	0,6-0,8 (m)	0,67 (s)	0,71 (s, 3H)	0,68 (s, 3H)
21	0,89 (d, J = 6,3 Hz)	0,89 (d, J = 6,3 Hz)	0,91 (d, 3H, J = 6,2 Hz)	0,93 (d, 3H, J = 6,5 Hz)
22	4,98 (dd, J = 8,6; 15,1 Hz)		4,98 (m, 1H)	
23	5,12 (dd, J = 8,3; 15,1 Hz)		5,14 (m, 1H)	
26	0,78 (d, J = 6,4 Hz)	0,78 (d, J = 6,4 Hz)	0,80 (d, 3H, J = 6,6 Hz)	0,81 (d, 3H, J = 6,4 Hz)
27	0,81 (d, J = 6,4 Hz)	0,81 (d, J = 6,4 Hz)	0,82 (d, 3H, J = 6,6 Hz)	0,83 (d, 3H, J = 6,4 Hz)
29	0,83 (m)	0,83 (m)	0,83 (t, 3H, J = 7,1 Hz)	0,84 (t, 3H, J = 7,2 Hz)
(CDCl ₃ ; 300,06 MHz para ^1H); [^b (CDCl ₃ ; 600,0 MHz para ^1H)]				

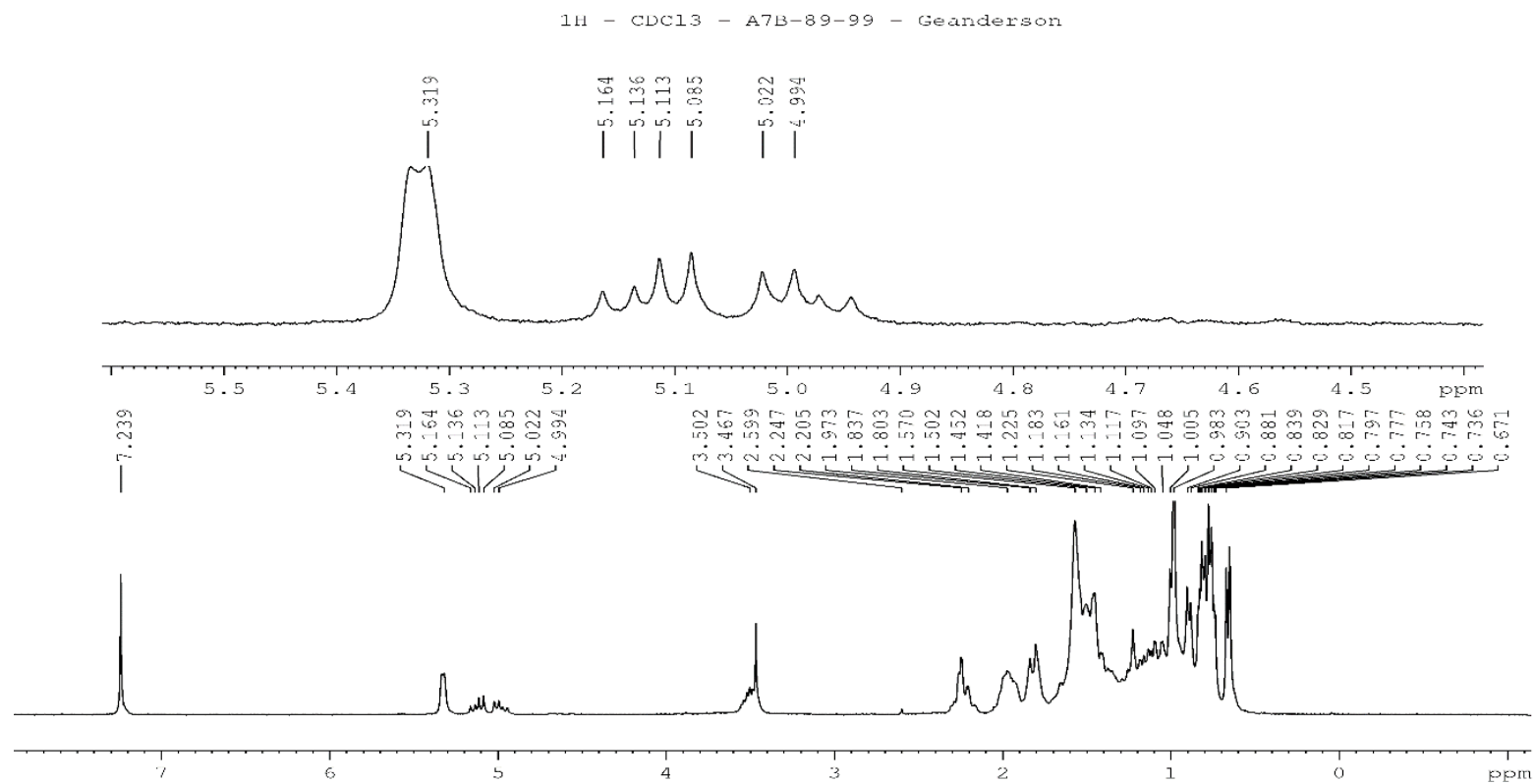


Figura 2. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-1+A-2

4.1.2 Substância A-3

Isolada como um pó de cor amarela através de um fracionamento cromatográfico em CLAE da subfração AVFACL-10CD, a substância **A-3** (AVFACL-10CD-p2) (**Figura 3**) solúvel em metanol, apresentou fluorescência em placa cromatográfica ao ser revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

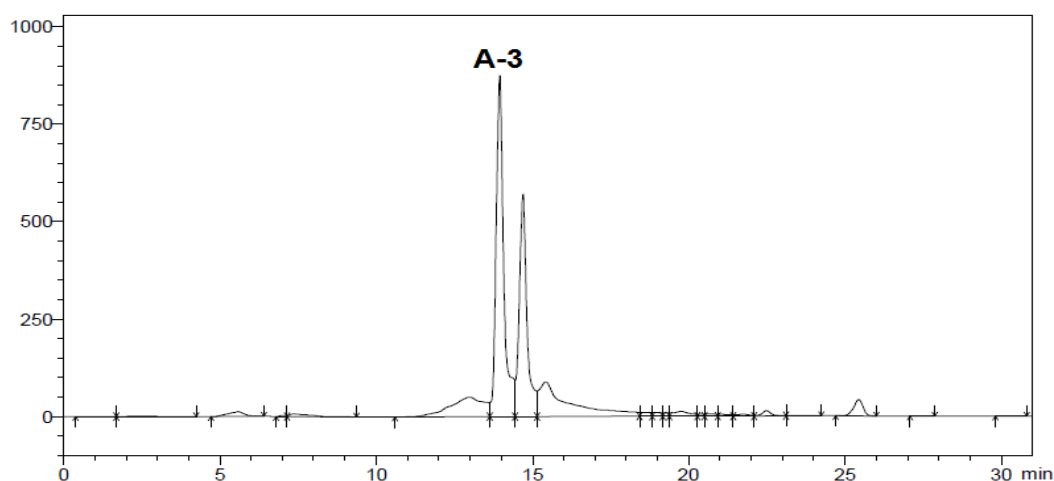


Figura 3. Cromatograma de AVFACL-10CD

Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H sugeriram que esta substância trata-se de um flavonol 3, 5, 7, 3', 4'- hidroxilado (quercetina), com base nos sinais em 7,69 (s, 1H) e em 6,85 (dd; $J= 2,0; 8,5$ Hz, 1H) e 7,61 (d, $J= 8,5$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B, respectivamente, característicos de hidroxilação em C-3' e C-4'. (**Figuras 4 e 5 e Tabela 27**).

Os sinais referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A hidroxilado nas posições 5 e 7 foram observados como dupletos em 6,3 ppm ($J= 1,5$ Hz) e 6,1 ppm ($J= 1,5$ Hz), respectivamente (**Figura 4, Tabela 27**).

Sinais característicos de um flavonol foram observados também nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135, em δ_{C} 157,0, referente ao carbono não hidrogenado C-2 do anel C, em 135,7, referente ao carbono C-3 e em δ_{C} 176,2, referente ao carbono carbonílico C-4. Os sinais dos carbonos oxigenados C-3' e C-4' do anel B foram observados em δ_{C} 144,9 e 147,5, respectivamente (**Figura 6, Tabela 27**).

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de **A-3** foram ainda comparados com os encontrados na literatura para o flavonoide quercetina, conforme listado na **Tabela 27** e apresentaram uma boa correlação.

Da mesma forma, na análise por CLAE-DAD-EM/EM da fase alcaloídica das cascas (item 4.2), o **PICO 6** presente no cromatograma de pico base (BPC) foi identificado como sendo relativo ao flavonoide quercetina, cujo espectro de massas obtido via ionização por electrospray no modo positivo apresentou um íon protonado a $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 303,0505, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_7^+$ (erro de 3,0 ppm).

Este flavonoide está sendo descrito pela primeira vez nesta espécie, enquanto que a literatura relata a existência do flavonoide rutina em *Aspidosperma macrocarpon* (Bannwart, 2012).

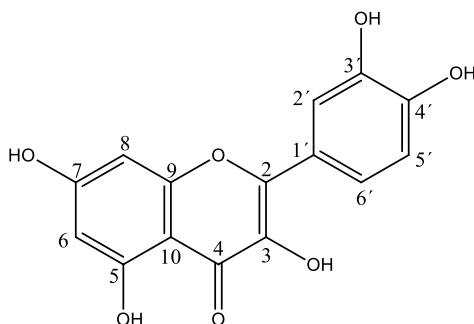


Figura 4. Estrutura química do flavonoide **A-3** (quercetina)

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **A-3** e comparação com dados de ^{13}C da quercetina

C/H	δH (mult., J)	δc (C)	$^b\delta\text{c}$ (C)
	$^a\text{A-3}$	$^a\text{A-3}$	$^b\text{Quercetina}$ (Martins, 2006)
2	-	157,0	156,3
3- OH	-	135,7	135,9
4	-	176,2	176,0
5- OH	-	161,2	160,9
6	6,3 (d, $J= 1,53$ Hz)	97,8	98,3
7- OH	-	164,1	164,1
8	6,1 (d, $J= 1,53$ Hz)	93,0	93,5
9	-	157,0	156,3
10	-	103,9	103,1
1'	-	122,7	122,1
2'	7,69 (s)	114,6	115,2
3'- OH	-	144,9	145,2
4'- OH	-	147,5	147,9
5'	7,61 (d, $J= 8,3$ Hz)	120,3	120,2
6'	6,85 (dd, $J= 1,6; 8,1$ Hz)	114,8	115,8

[$^a(\text{CD}_3\text{OD}; 300,06 \text{ MHz para } ^1\text{H}); (\delta\text{-ppm}, 75,45 \text{ MHz}, \text{CD}_3\text{OD})$]; [$^b(\delta\text{-ppm}, 75,45 \text{ MHz}, \text{DMSO-}d_6)$]

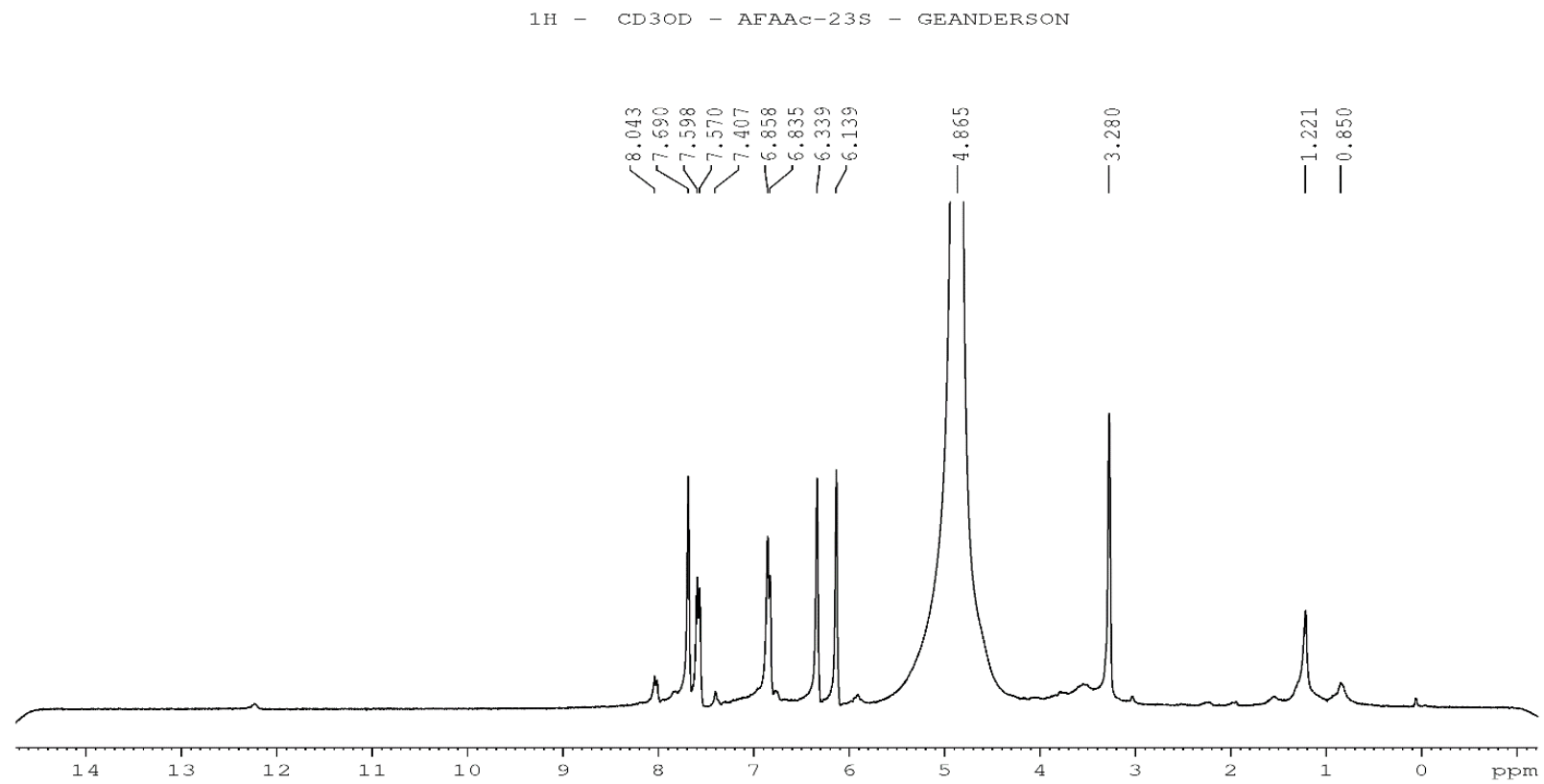


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-3

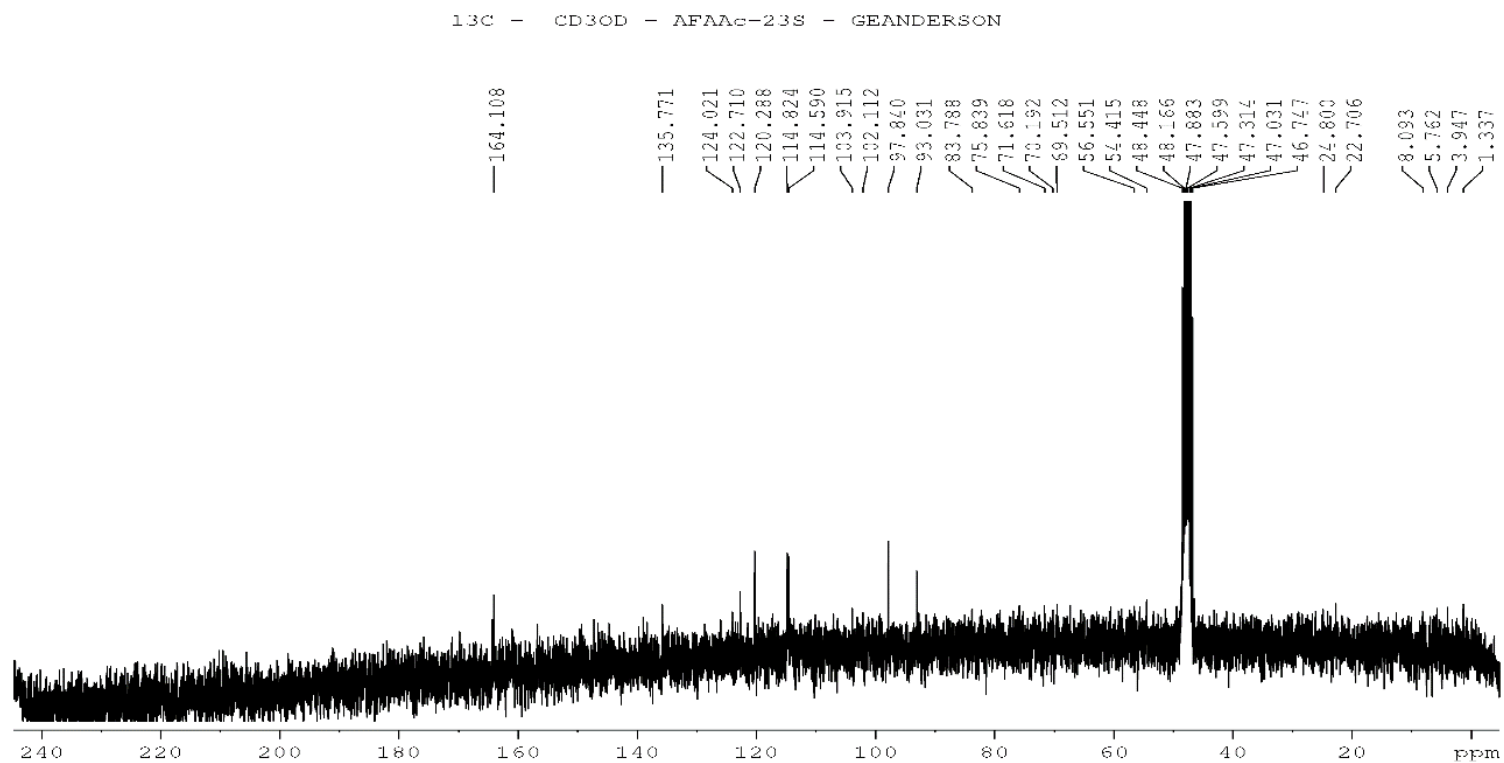


Figura 6. Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz; CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-3

4.1.3 Substância A-4

A subfração AVFACL-10CD, através de um fracionamento cromatográfico em CLAE, mostrou ser constituída por duas substâncias (**Figura 7**). Após purificação por CLAE semipreparativa, foi coletada a subfração **AVFACL-10CD-p4** correspondente ao pico eluído em 15,0 minutos, resultando a substância **A-4**. Esta substância apresentou-se como um sólido de cor amarela, solúvel em metanol, com absorbância sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

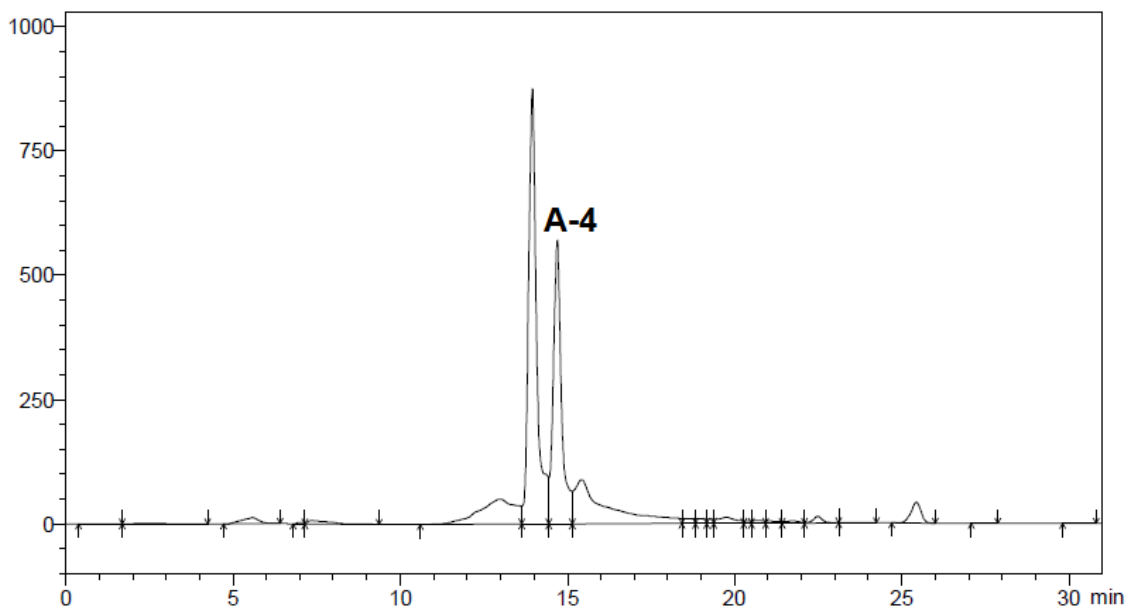


Figura 7 . Cromatograma de AVFACL-10CD

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 9**) de A-4 mostrou-se semelhante ao de A-3, sugerindo que se tratava também de um flavonol. As principais diferenças observadas foram com relação aos sinais dos hidrogênios do anel B. O espectro de A-4 apresentou sinais em δ_{H} 6,9 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H) e 8,0 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), sendo os valores de deslocamento químico e constante de acoplamento indicativos de um anel aromático *para*-substituído. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-3',5' e H-2',6', respectivamente, sendo característicos do anel aromático B substituído na posição 4'. Isso ocorre devido à simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições 2' e 3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições 6' e 5', respectivamente. Sinais referentes ao anel A foram observados em δ 6,1 (d, H-6, $J = 2,1$ Hz) e 6,3 (d, H-8, $J = 2,1$ Hz). A constante de acoplamento observada confirma um acoplamento meta entre esses hidrogênios (**Tabela**

28). Estes dados são condizentes com os relatados na literatura para o kaempferol (3,5,7,4'-tetraidroxiflavonol) (Singh, 2008), descrito pela primeira vez nesta espécie.

As informações fornecidas pelos espectros de RMN ^{13}C 135, evidenciaram sinais em δ 147,5 e 137,1ppm referentes aos carbonos C-2 e C-3 não hidrogenados do anel C, o sinal do carbono carbonílico C-4 em δ 177,4, além dos sinais relativos à C-2'/6' e C-3'/5' em δ 130,7 e 116,3, respectivamente. Os demais dados de RMN de ^{13}C de **A-4** são apresentados na **Figura 10 e Tabela 28**.

Da mesma forma que o relatado para a substância **A-3**, na análise por CLAE-DAD-EM/EM da fase alcaloídica das cascas (item 4.2), o **PICO 8** presente no cromatograma de pico base (BPC) foi identificado como sendo relativo ao flavonoide kaempferol, cujo espectro de massas obtido via ionização por electrospray no modo positivo apresentou um íon protonado a $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 287,055, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ (erro de 0,5 ppm).

Não foram encontrados na literatura relatos a respeito da existência do flavonoide kaempferol (**Figura 9**) em *Aspidosperma verbascifolium*.

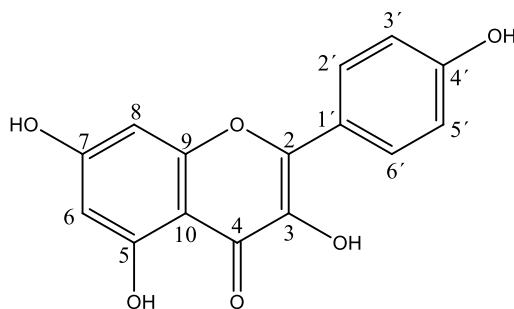


Figura 8. Estrutura química do flavonoide **A-4** (kaempferol)

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H para a substância **A-4** e comparação com dados de ^1H para o kaempferol

C/H	δ_{H} (mult., J)	δ_{C} (C)	$^b\delta_{\text{C}}$ (C)
	^a A-4	^a A-4	^b Kaempferol (Singh, 2008)
2	-	147,5	146,8
3- OH	-	137,1	135,6
4	-	177,4	175,9
5- OH	-	161,9	160,7
6	6,1 (d, J= 2,1 Hz)	99,3	98,2
7- OH	-	165,6	163,9
8	6,3 (d, J= 2,1 Hz)	94,5	93,5
9	-	158,3	156,2
10	-	104,5	103,1
1'	-	123,7	121,7
2'	8,0 (d, J= 8,7 Hz)	130,7	129,5
3'- OH	6,9 (d, J= 8,7 Hz)	116,3	115,4
4'- OH	-	160,5	159,2
5'	6,9 (d, J= 8,7 Hz)	116,3	115,4
6'	8,0 (d, J= 8,7 Hz)	130,7	129,5

[^a(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]; [^b(δ -ppm, 75,45 MHz, DMSO-d₆)]

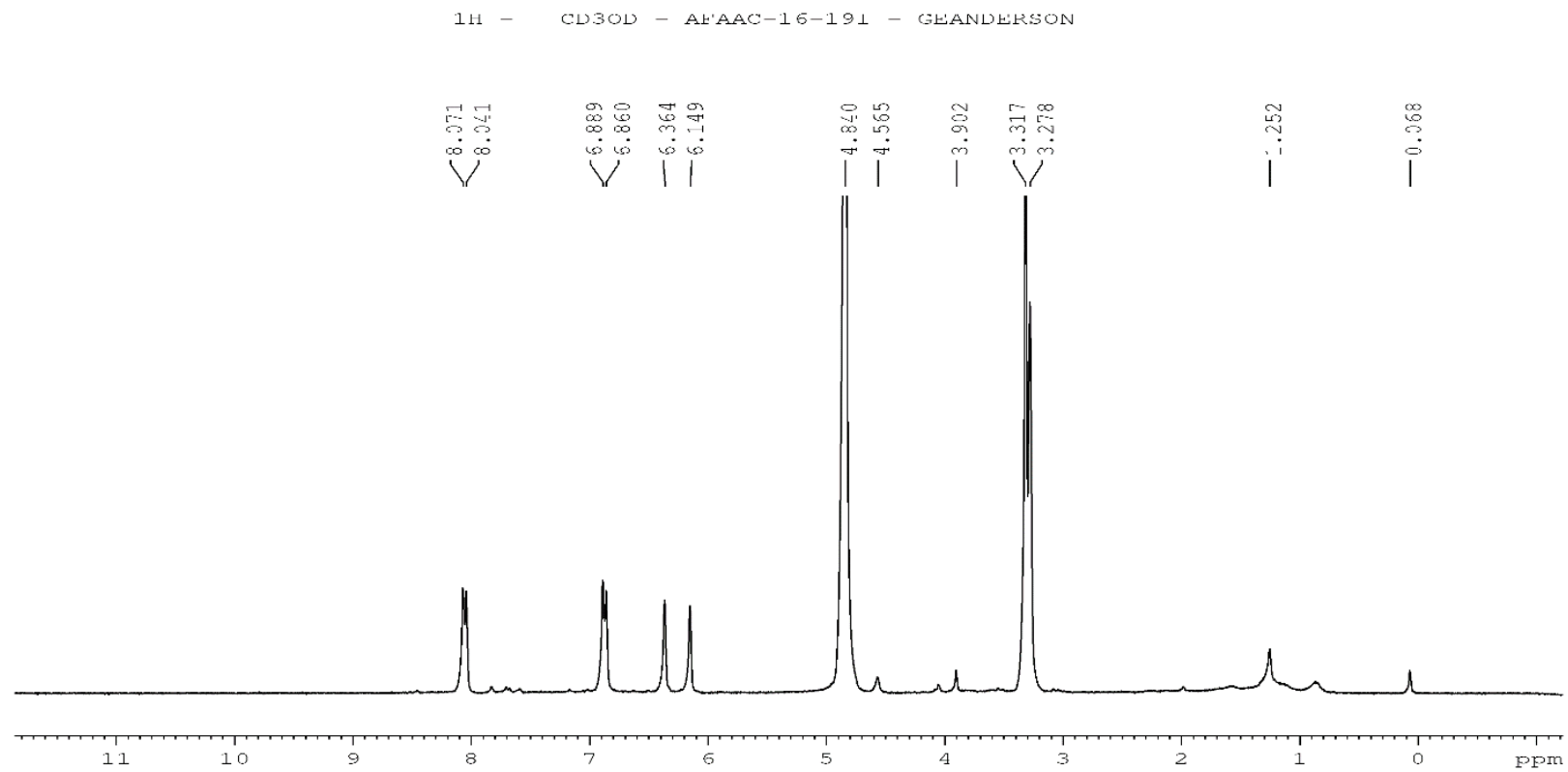


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-4

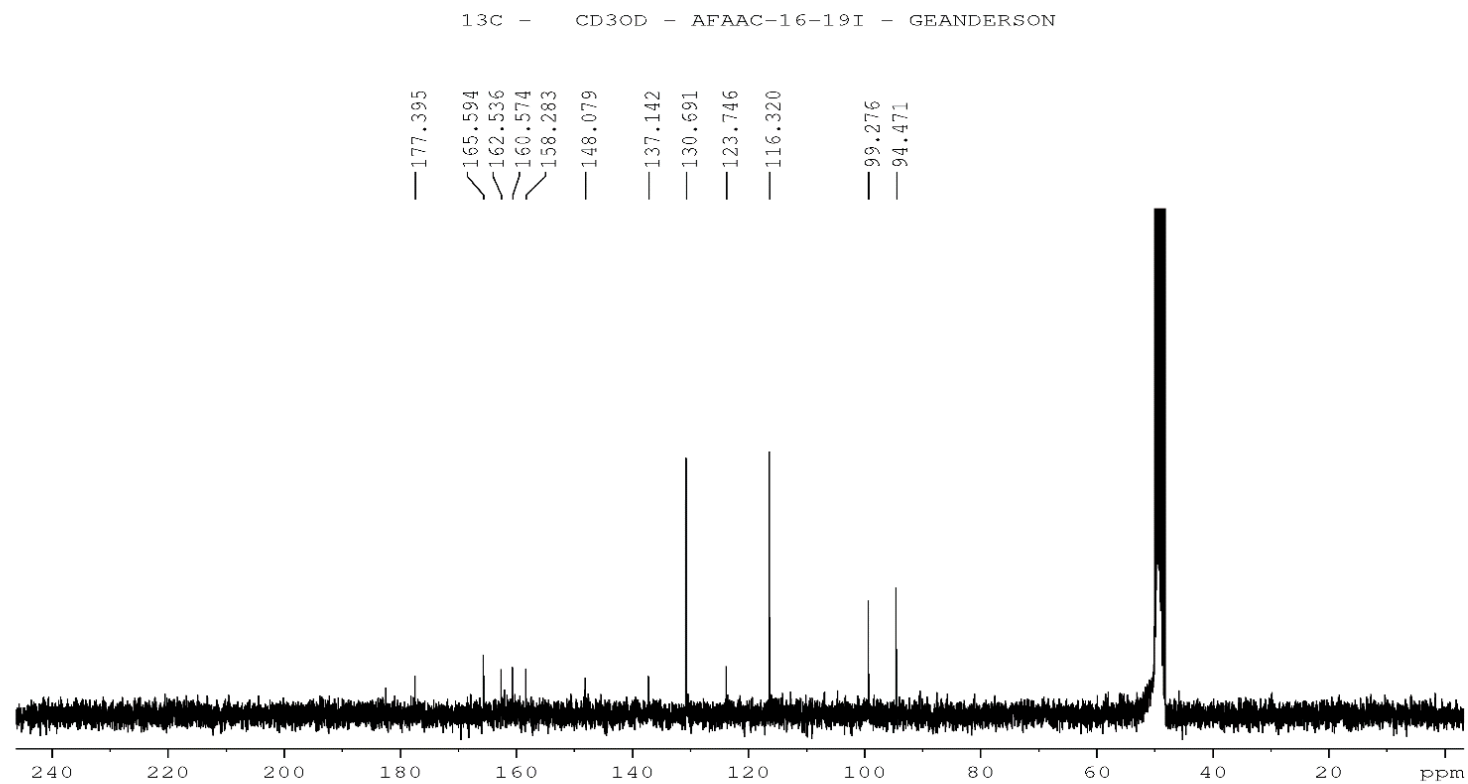


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CD_3OD) de A-4

4.1.4 Substância A-5

Após submetida a um fracionamento cromatográfico em CLAE, a subfração **AVFACI-12-8** (13,0 mg) mostrou ser constituída por quatro substâncias (**Figura 11**). Após purificação por CLAE semipreparativa, foi coletada a subfração **AVFACI-12-8p4**, correspondente ao pico eluído em 8,5 minutos, originando a substância **A-5**. Esta substância apresentou-se como um sólido de cor amarela, solúvel em clorofórmio com gotas de metanol e revelou se como um alcaloide através do teste positivo com o reagente de Dragendorff, sendo encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C /DEPT 135 e CLAE-DAD-EM/EM.

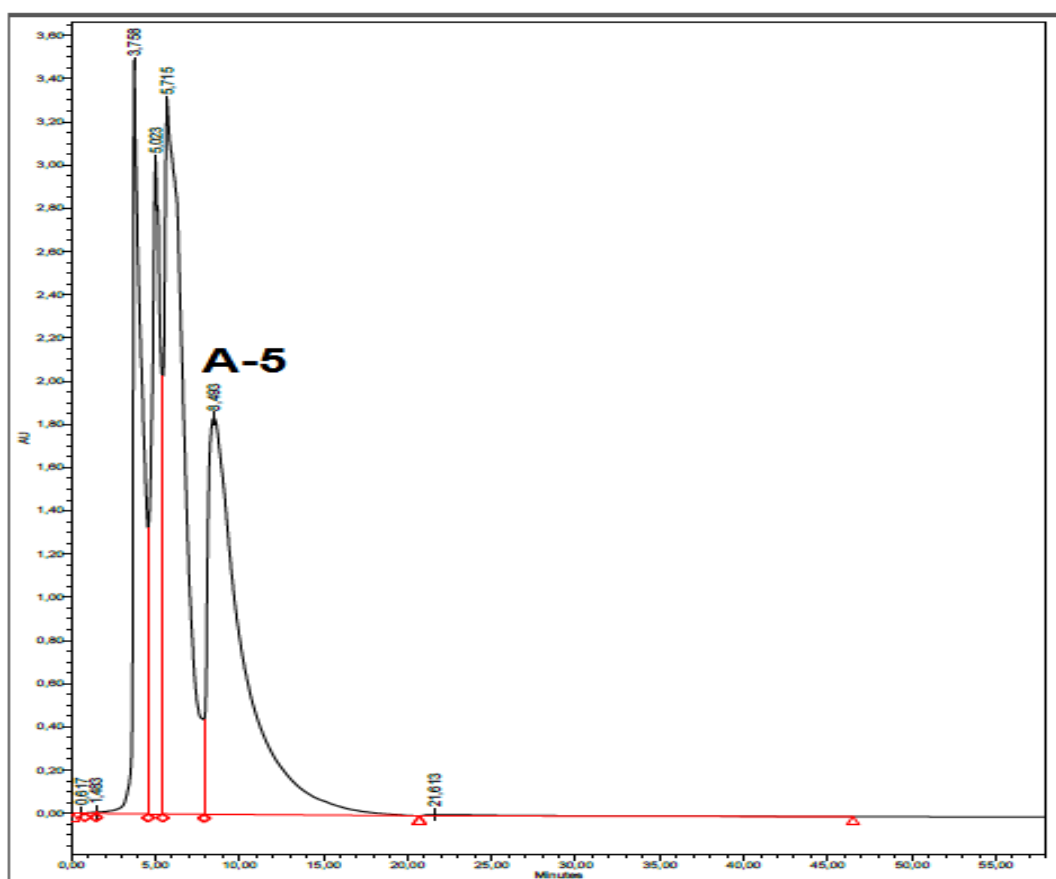


Figura 11. Cromatograma de AVFACI-12-8 (8,433 minutos)

A análise da fração alcaloídica **AVFACI-12-8p4** por CLAE-DAD-EM/EM (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas sequencial) (**Figura 12**) revelou a presença de um pico cujo

espectro de massas de alta resolução (EM) (**Figura 13**) mostrou um pico a m/z 309,1965 $[M+H]^+$ em 13,9 min, compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{24}N_2O$ (Δ -1,1 ppm).

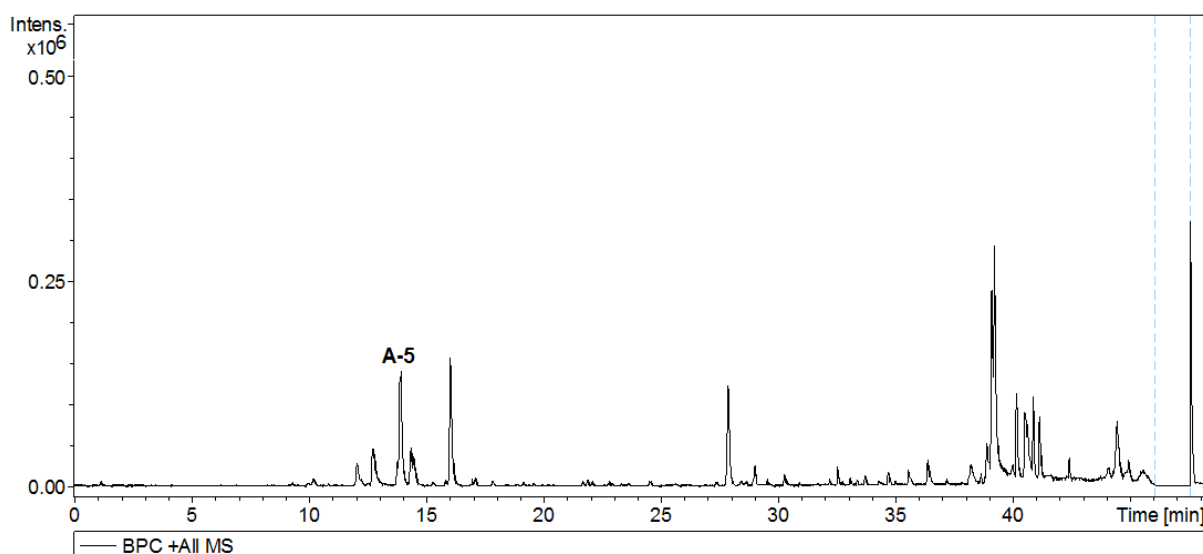


Figura 12. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AVFACI-12-8p4** das cascas de *Aspidosperma verbascifolium*

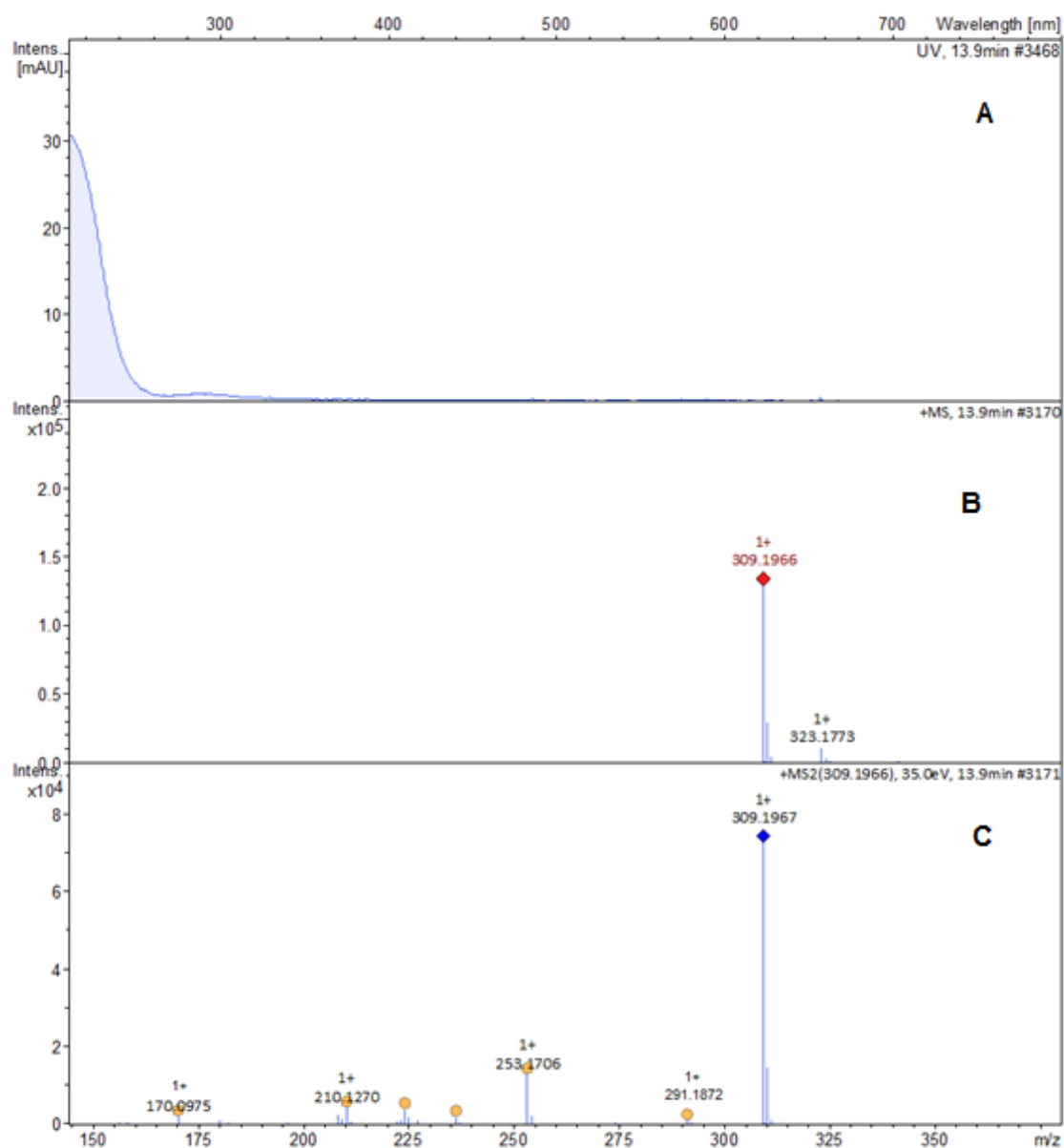


Figura 13. Espectro A: UV de A-5. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente a A-5. Espectro C: Experimento EM/EM

O mecanismo de fragmentação de **A-5** e as estruturas de alguns dos íons-produto observados no experimento EM/EM são observados no item 4.3 (Identificação dos compostos presentes na fase alcaloídica clorofórmica das cascas (AVFACI) por CLAE-DAD-EM/EM).

As análises de RMN de ^1H (**Figura 15**) da subfração **AVFACI-12-8p4** evidenciaram a presença de uma substância da classe dos alcaloides indólicos do tipo copsano (Pereira *et al.*, 2007). Assim, o espectro de RMN de ^1H apresentou dois

dupletos em δ_H 6,60 (1H, $J = 7,6$ Hz) e 7,32 (1H, $J = 7,6$ Hz) e tripletos largos em δ_H 6,72 (1H, $J = 7,4$ Hz) e 6,99 (1H, $J = 7,4$ Hz) sugestivos dos hidrogênios H-12 e H-9, e, H-10 e H-11, respectivamente, de um núcleo indólico, onde o anel A encontra-se sem substituintes (Bannwart, 2012). Estas atribuições foram confirmadas através das correlações heteronucleares a longa distância apresentadas no espectro de HMBC (**Figura 19**) entre C-9 (δ_C 123,1)/H-11 (δ_H 6,99), C-10 (δ_C 119,3)/H-12 (δ_H 6,72), CH-11 (δ_C 127,2)/H-9 (δ_H 7,32), CH-12 (δ_C 110,5)/H-10 (δ_H 6,60), e C-13 (δ_C 151,3)/H-9 (δ_H 7,32)/H-11 (δ_H 6,99). Sinais de hidrogênios metilênicos próximos a nitrogênio foram observados em δ_H 3,50 (s, H-5) e δ_H 3,03 (m, H-3). Além destes, foi observado um duplo tripleto em δ_H 2,59 ($J = 9,6$ e $2,4$ Hz, H-6), um duplo duplete em δ_H 2,31 ($J = 10,0$ e $4,6$ Hz, H-16) e um simpleto em δ_H 3,20 (H-21) referentes a um hidrogênio metínico cada (**Tabela 29**). Ainda foi observado um duplo duplete em δ_H 4,75 ($J = 9,0$ e $4,4$ Hz, H-22) referente a hidrogênio carbinólico. Demais correlações e atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos da cadeia alifática estão descritos na **Tabela 29**.

A presença de sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ_C 123,1 (C-9), 119,3 (C-10), 127,2 (C-11) e 110,5 (C-12) evidenciaram sinais correspondentes a carbonos de anel aromático. Sinais correspondentes a carbonos de anel aromático desprovidos de hidrogênio foram observados em δ_C 134,1 (C-8) e 151,1 (C-13). O sinal em δ_C 71,4 indicou a presença de um carbono carbinólico não conjugado na estrutura do alcaloide. Sinais referentes a carbonos metilênicos em δ_C 46,9 e 48,9 e de um carbono metínico em δ_C 70,6 (**Figura 16**) atribuídos a C-3, C-5 e C-21 ligados ao nitrogênio N4 também foram observados (**Tabela 29**). O mapa de correlação de HSQC (**Figura 18**) forneceu as correlações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, observando-se três carbonos metínicos (CH) do tipo sp_3 em: δ_C 54,4 (C-6), δ_C 45,6 (C-16) e δ_C 72,2 (C-22).

Pelo mapa de contornos HMBC (**Figura 19**) pode-se observar as correlações entre δ_C 45,6 (C-16) com δ_H 2,49 (H-6), do δ_C 48,9 (C-5) com δ_H 3,20 (H-21) e 4,75 (H-22), do δ_C 70,8 (C-21) com δ_H 3,50 (H-5), do δ_C 71,2 (C-2) com δ_H 2,31 (H-16) e 1,6-1,7 (H-18). Foram evidenciados também acoplamentos entre o carbono em δ_C 72,2 (C-22) e os hidrogênios em δ_H 3,50 (H-5) e 2,49 (H-6), confirmando o posicionamento do grupo carbinólico em C-22.

As correlações entre os hidrogênios observadas no mapa de contornos COSY (**Figura 17**) confirmaram os acoplamentos entre os hidrogênios H-9 (δ_H 7,32) e H-10 (δ_H 6,72) e entre os hidrogênios H-11 (δ_H 6,99) e H-12 (δ_H 6,60) do sistema aromático. Também foram observadas correlações entre H-6 (δ_H 2,49) e H-22 (δ_H 4,75) e entre H-16 (δ_H 2,31) e H-22 (δ_H 4,75) corroborando o posicionamento do grupo hidroxila em C-22.

O conjunto de dados espectrais de RMN uni- e bidimensionais descritos acima para o alcaloide **A-5** mostrou-se muito semelhante ao dos dados apresentados na literatura para o alcaloide indólico copsanol-*N*-óxido descrito anteriormente por Bannwart e colaboradores (**Figura 14**) (Bannwart, 2012) (**Tabela 29**). No entanto, apresentaram diferenças referentes aos sinais dos carbonos metilênicos C-3, C-5 e do carbono metínico (C-21). A proteção dos sinais desses carbonos, em relação aos dos mesmos presentes no copsanol-*N*-óxido nos levou a inferir que um grupo retirador de elétron ligado ao nitrogênio da posição 4 não se faz presente em **A-5**. Esses dados sugeriram que **A-5** se trata do alcaloide indólico monoterpênico copsanol, anteriormente isolado de um espécime de *Aspidosperma macrocarpon* por Mitaine e cols. em 1996 e também por Braekman e cols. em 1969 de um espécime de *A. verbascifolium* (**Figura 14**).

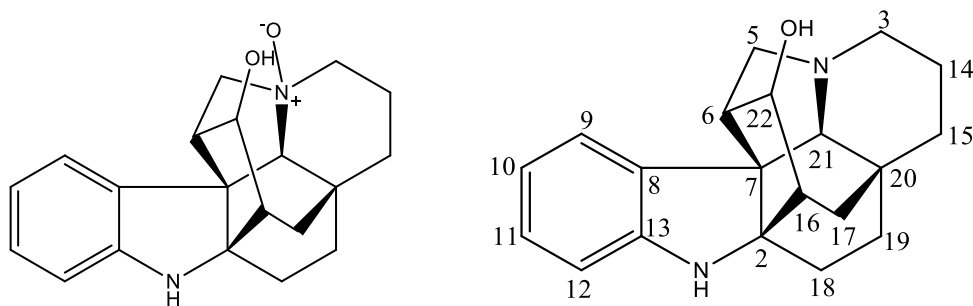


Figura 14. Estruturas químicas do alcaloide copsanol-*N*-óxido e do alcaloide **A-5** (copsanol)

Embora descrito anteriormente por Mitaine e cols e por Braekman e cols, os dados espectrométricos de RMN uni- e bidimensionais deste alcaloide estão sendo descritos pela primeira vez no presente trabalho.

Tabela 29. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância A-5 (copsanol) e comparação com dados de ^1H e de ^{13}C para o alcaloide copsanol-*N*-óxido

C/H	δ_{H} (mult., <i>J</i>) ^a A-5	δ_{C} (C) ^a A-5	δ_{H} (mult., <i>J</i>) ^b copsanol- <i>N</i> -óxido (Bannwart, 2012)	δ_{C} (C) ^b copsanol- <i>N</i> -óxido (Bannwart, 2012)
2	-	71,2	-	66,3
3	3,03 (m)	47,0	3,08 (m)	47,9
5	3,50 (s)	48,9	3,16 (dd, <i>J</i> =6,0; 10,8 Hz) 3,59 (t, <i>J</i> =10,8 Hz)	55,7
6	2,59 (m)	54,5	2,56 (ddd, <i>J</i> =1,5; 6,0;	63,4
7	-	65,2	-	77,1
8	-	134,0	-	141,8
9	7,32 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz)	123,1	7,42 (dd, <i>J</i> =0,6; 7,5 Hz)	124,0
10	6,72 (t, <i>J</i> = 7,4Hz)	119,3	6,81 (m)	121,8
11	6,99 (t, <i>J</i> = 7,4 Hz)	127,2	7,05(m)	128,8
12	6,60 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz)	110,5	6,75 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz)	113,9
13	-	151,1	-	150,9
14	1,10-1,20 (m)	15,2	1,35 (m)	15,8
	1,90-2,00 (m)		1,98 (m)	
15	1,50-1,60 (m)	34,3	1,32 (m)	34,3
			1,48	
16	2,31 (dd, <i>J</i> = 9,6 e 4,4 Hz)	45,6	2,46 (d, <i>J</i> =10,8 Hz)	48,0
17	1,20 (m)	29,5	1,58 (m)	35,2
			1,80 (m)	
18	1,60-1,70 (m)	25,6	1,58 (m)	24,8
			1,89 (m)	
19	1,20-1,30 (m)	36,9	1,30 (m)	37,2
20	-	31,3	-	31,6
21	3,20 (s)	70,8	3,84 (s)	85,5
22	4,75 (dd, <i>J</i> = 9,6 e 4,4 Hz)	72,2	2,97 (m)	71,3

[^a(CDCl₃, gota CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CDCl₃, gota de CD₃OD)] [^b(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]

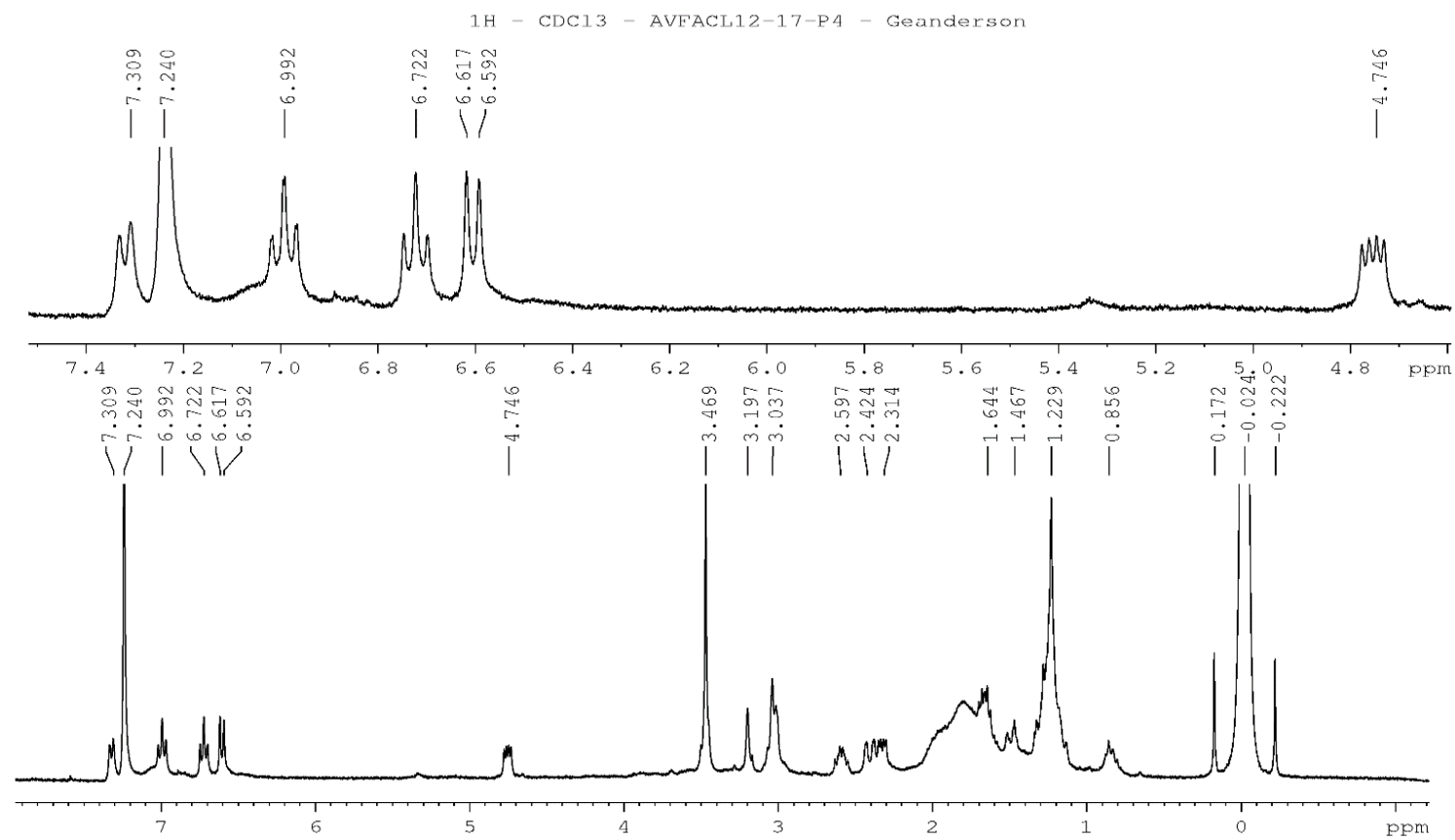


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5

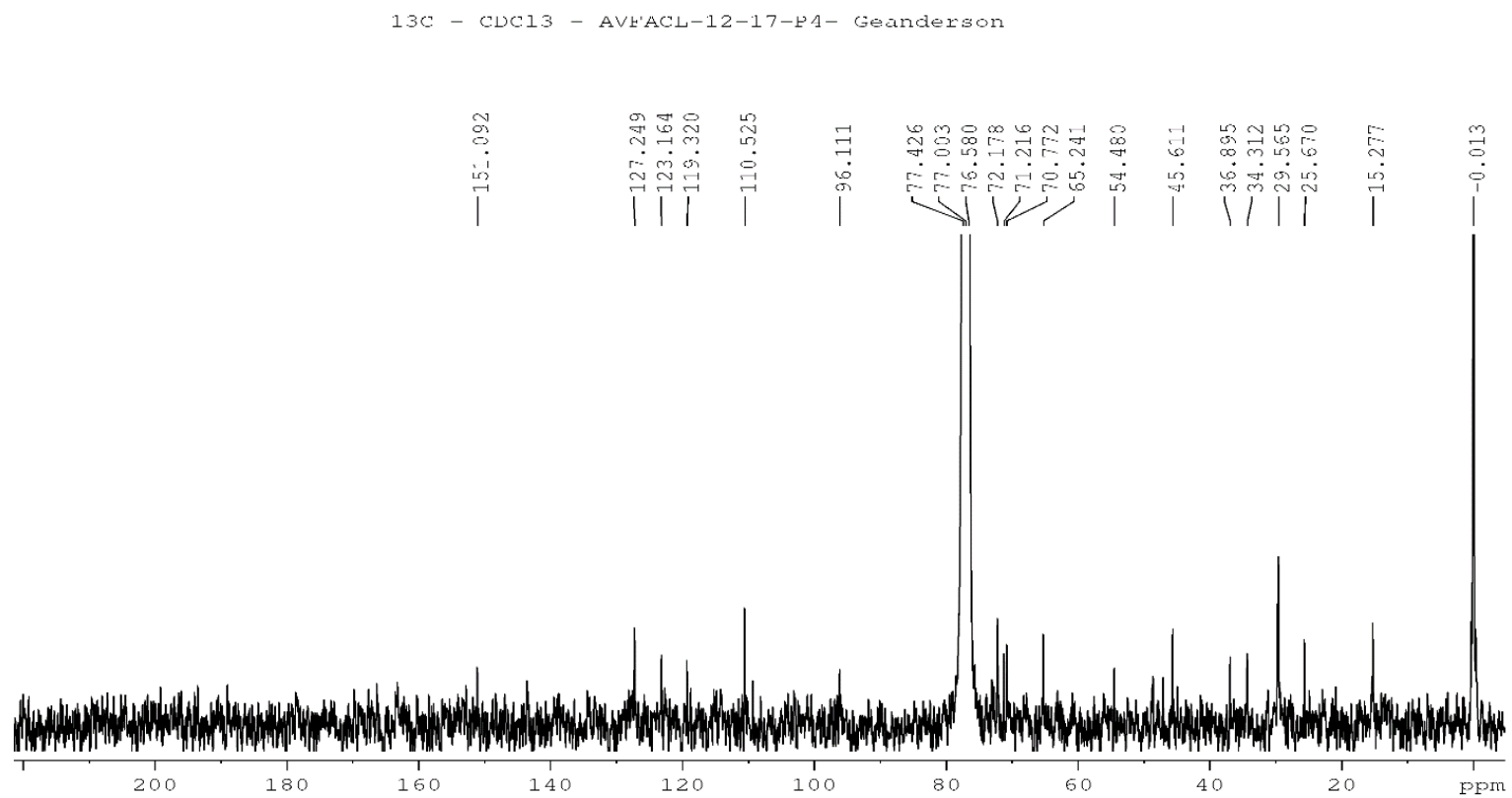


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5

COSY - CDCl₃ - AVFACL-12-17-P4 - Geanderson

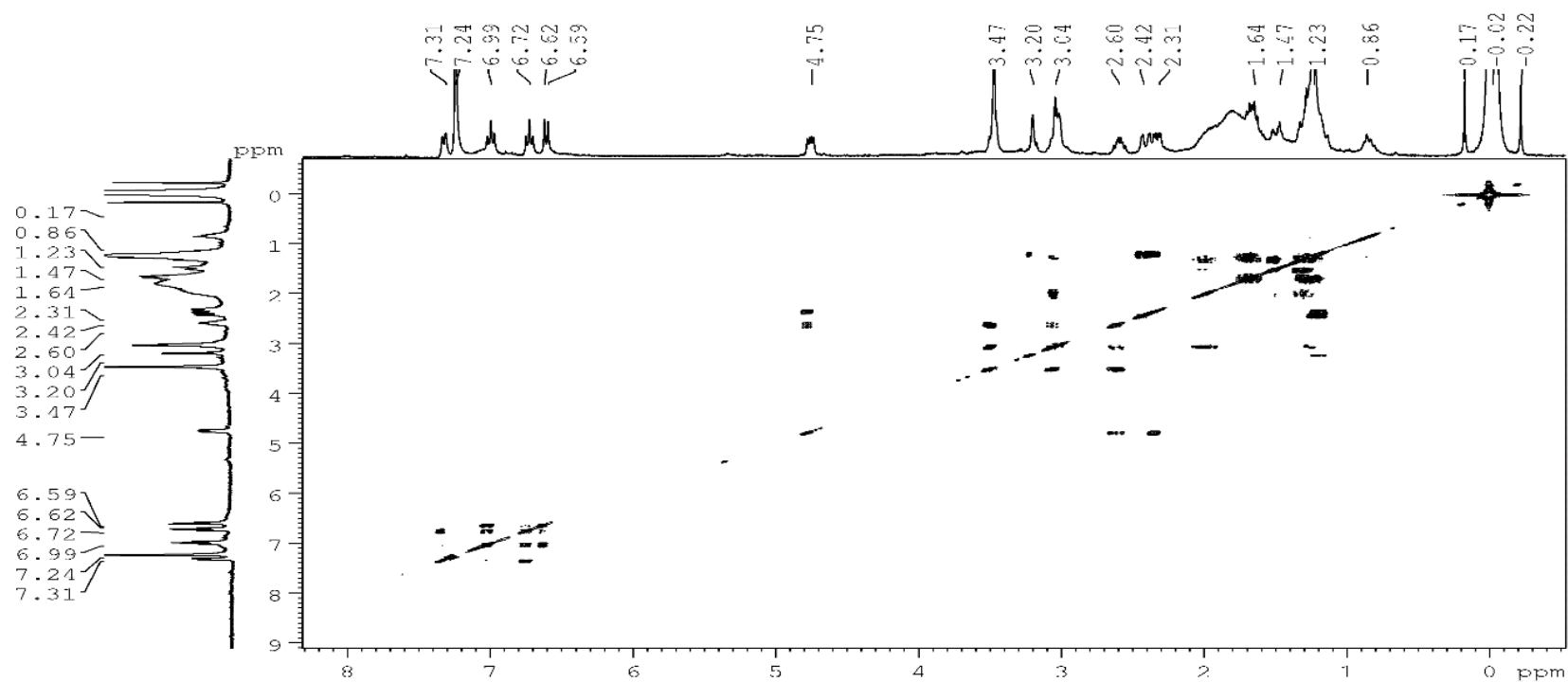


Figura 17. Mapa de contornos COSY (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-5

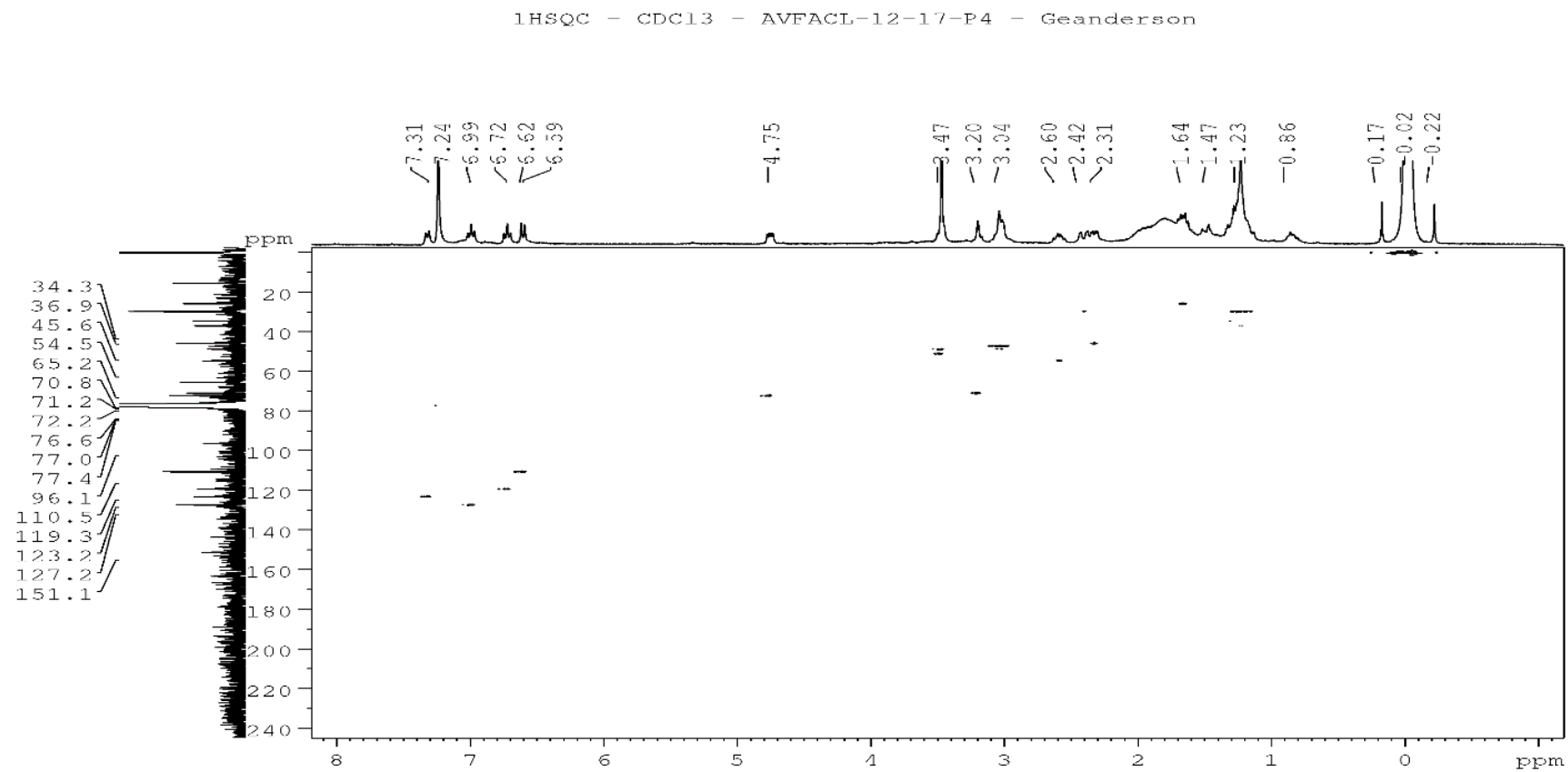


Figura 18. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-5

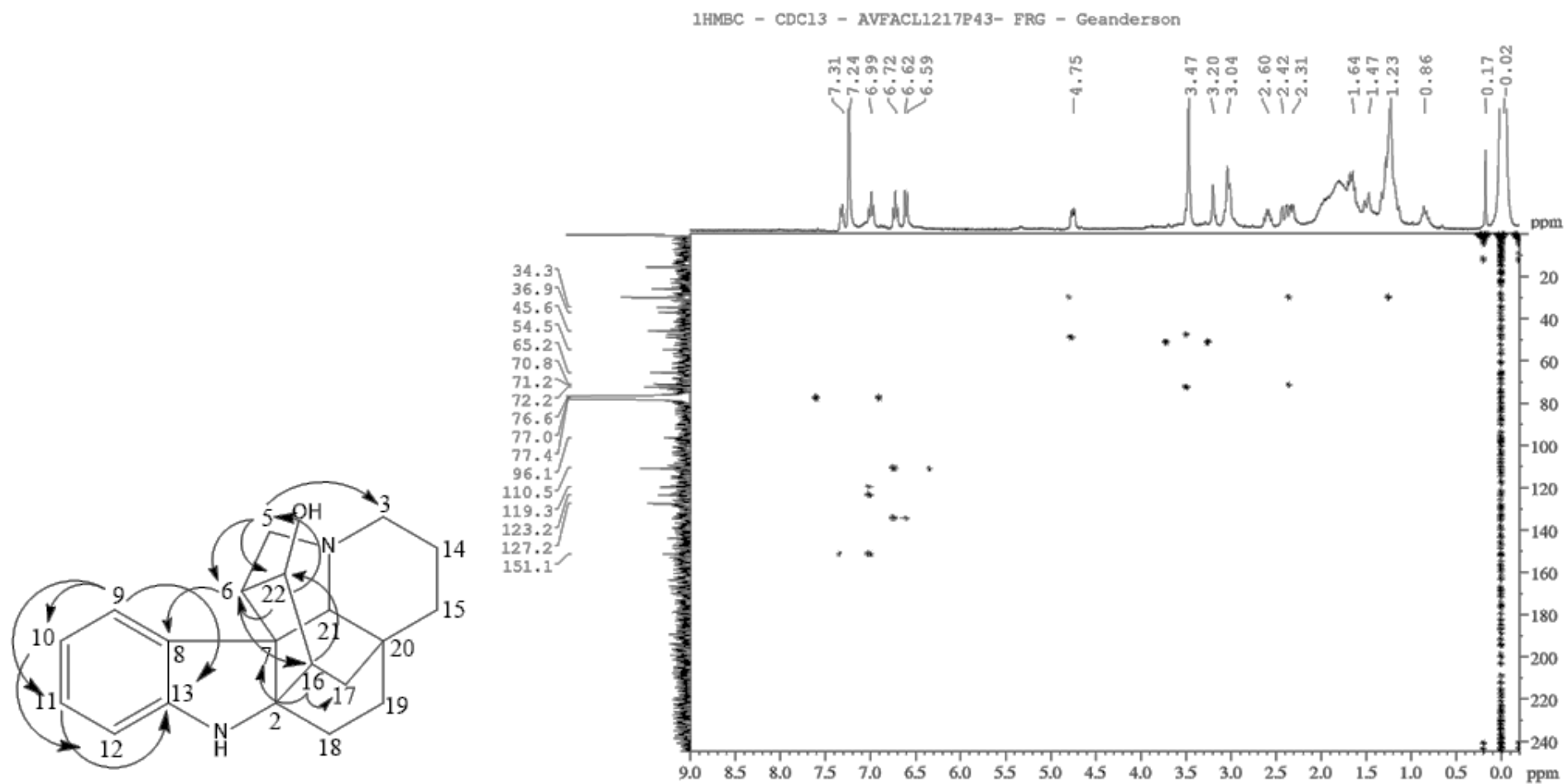


Figura 19. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-5

4.1.5 Substâncias A-5+A-6

As substâncias **A-5** e **A-6** foram isoladas em mistura como um sólido de cor amarela solúvel em clorofórmio com gotas de metanol da fração **AVFACL-15-18**. Quando revelada após CCDA com solução do reagente de Dragendorff, apresentou uma única mancha alaranjada, sendo encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C /DEPT 135 e e CLAE-DAD-EM/EM.

A análise da fração alcaloídica **AVFACI-15-18** por CLAE-DAD-EM/EM (**Figura 20**) revelou a presença de um pico cujo espectro de massas (EM) (**Figura 21**) mostrou um íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 309,1972 em 12,0 minutos, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (Δ -3,5 ppm) e atribuído à substância **A-5** (copsanol, item 4.1.4). Revelou também um pico em 15,8 minutos (**A-6**), fornecendo um íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 325,1925 (**Figura 22**), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (erro de -4,3 ppm). A proposta de fragmentação de **A-6** e as estruturas de alguns dos íons-produto observados no experimento EM/EM são apresentadas no item 4.3.

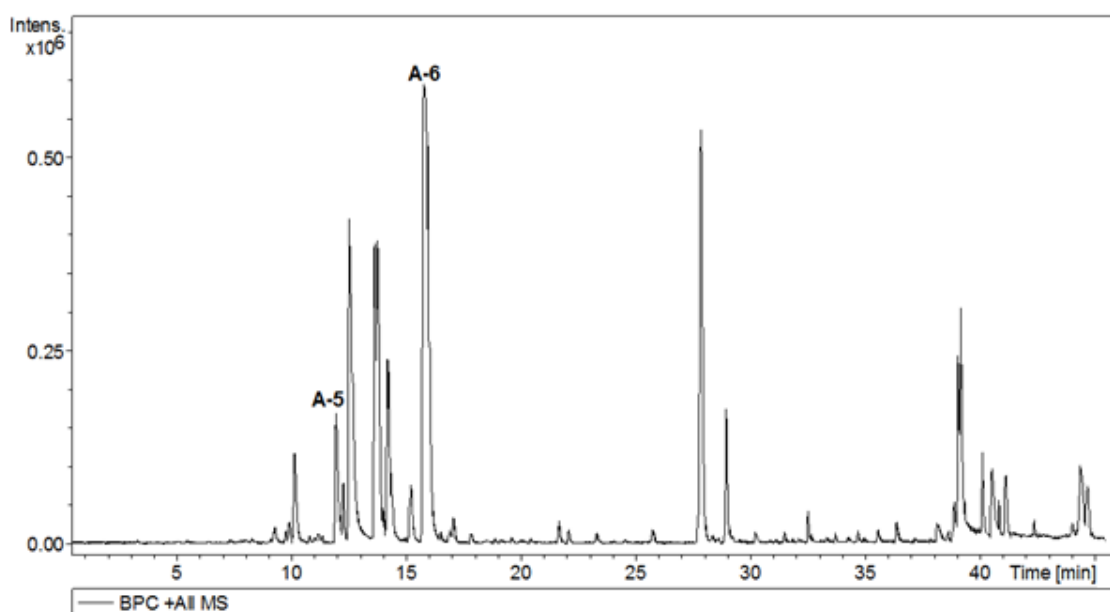


Figura 20. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AVFACI-15-18** das cascas de *Aspidosperma verbascifolium*

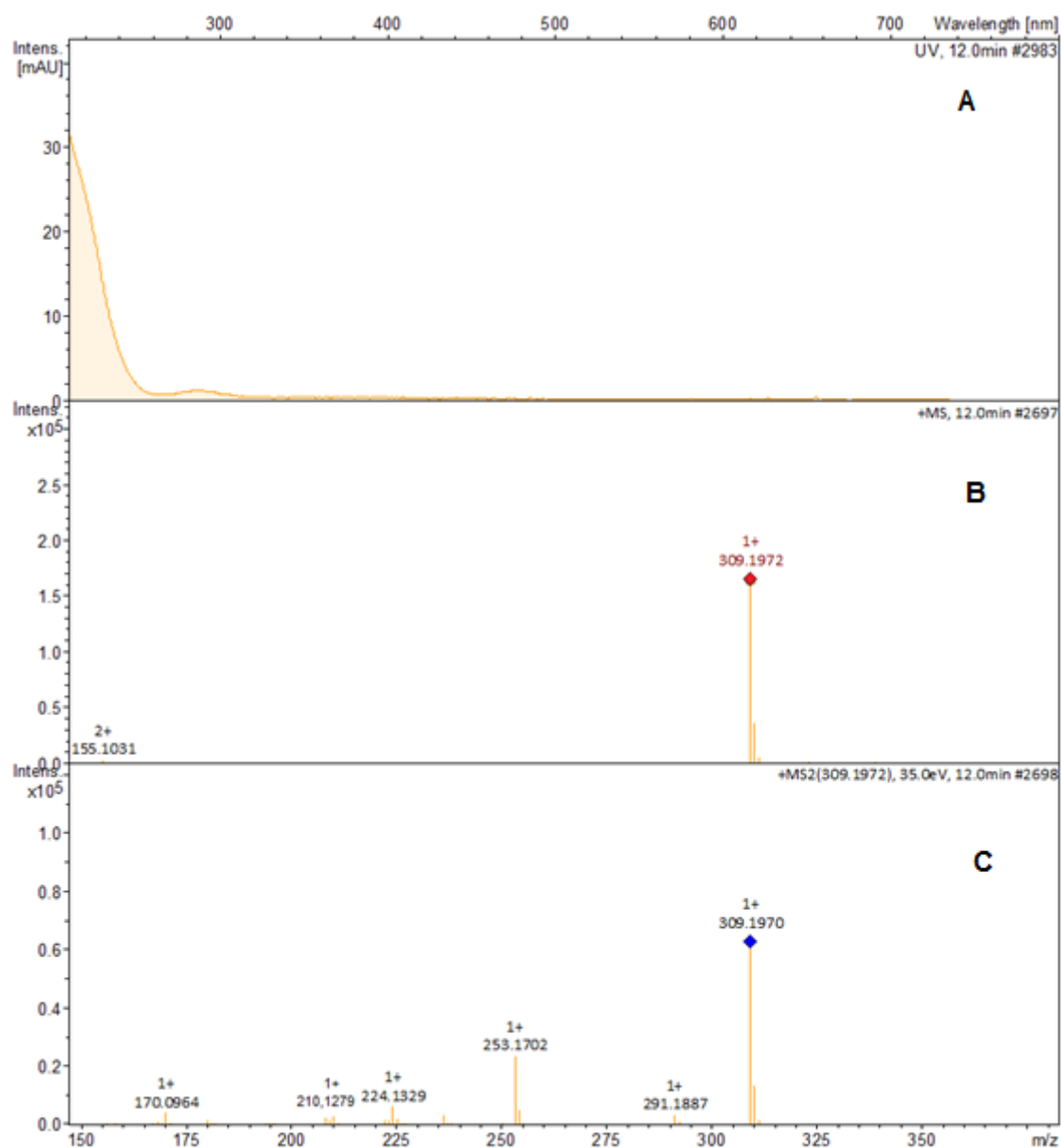


Figura 21. Espectro A: UV de A-5 (copsanol). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol. Espectro C: Experimento EM/EM

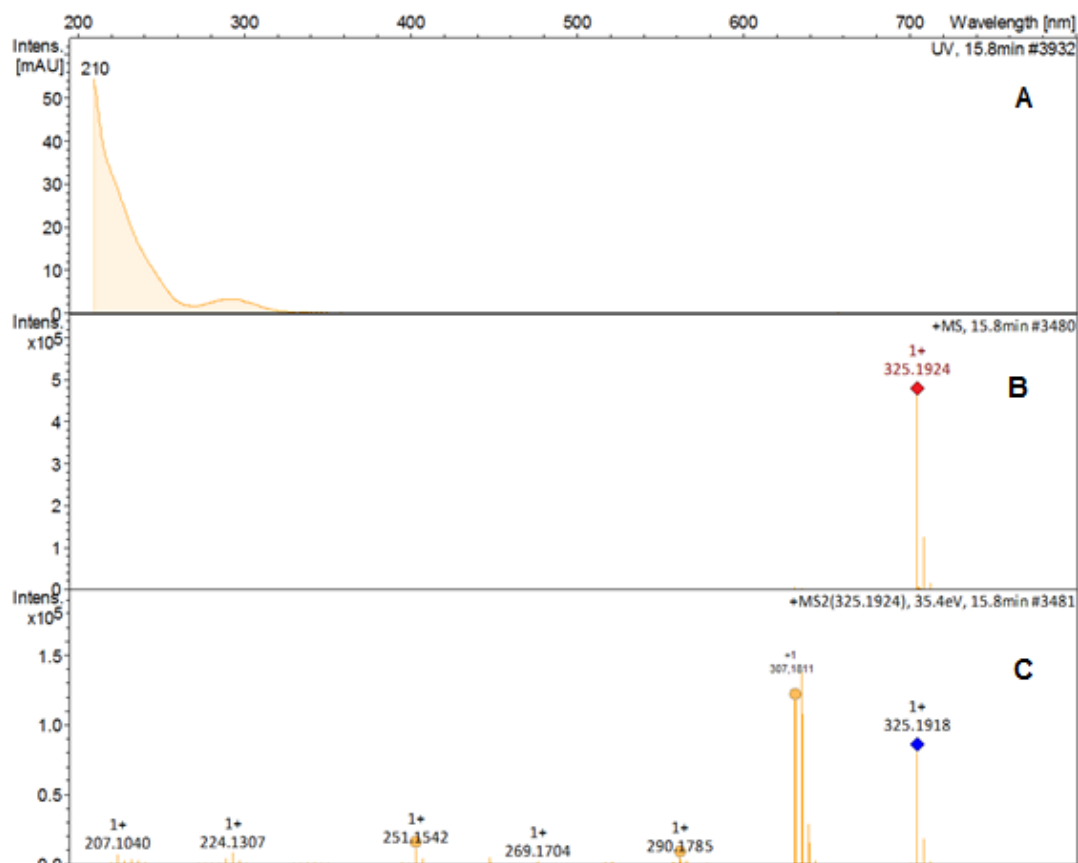


Figura 22. Espectro A: UV de A-6 (copsanol-*N*-óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol-*N*-óxido. Espectro C: Experimento EM/EM

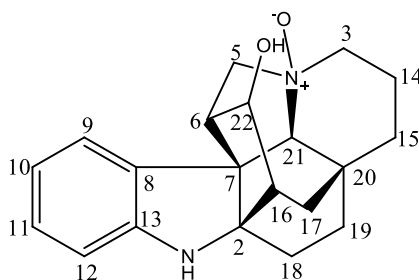


Figura 23. Estrutura química do alcaloide **A-6** (copsanol-*N*-óxido)

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C /DEPT (**Figura 24**; **Figura 25**) da fração **AVFACI-15-18** indicaram que era composta por uma mistura contendo dois componentes majoritários. Através da comparação destes dados com os obtidos para o alcaloide **A-5** descrito anteriormente (copsanol, **Figura 14**), foram verificadas similaridades, indicando assim que um dos componentes da mistura se tratava deste

alcaloide. A análise dos demais dados presentes nos espectros da mistura, aliada à fórmula molecular $C_{20}H_{24}N_2O_2$ obtida para um dos componentes da mistura (**A-6**) sugeriu que o outro componente majoritário da subfração **AVFACI-15-18** seria o alcaloide copsanol-*N*-óxido (**Tabela 30**). Os sinais nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C atribuídos a **A-6**, que apresentaram valores de deslocamento químico muito próximos aos de **A-5** (copsanol), reforçaram esta proposta (**Tabela 30**).

As diferenças mais significativas entre os dados de RMN de ^{13}C de **A-5** e **A-6** foram observadas nos valores de deslocamento químico dos carbonos metilênicos em δ_C 64,2 e 63,6 e do carbono metínico em δ_C 86,9 de **A-6**, atribuíveis, respectivamente a C-3, C-5 e C-21. A desproteção de C-3, C-5 e C-21, vizinhos a N-4, indica a presença de um grupo retirador de elétrons, indicando que **A-6** se trata, portanto de um derivado *N*-óxido de **A-5** (**Figura 25; Tabela 30**).

O espectro de RMN de 1H também apresentou importantes informações para a definição da estrutura de **A-6**, tais como a desproteção dos hidrogênios metilênicos H-3 (δ_H 3,3 e 3,8) e H-5 (δ_H 3,2 e 4,15) e do hidrogênio metínico H-21 (δ_H 3,40), reforçando a presença do grupo *N*-óxido em **A-6**. As atribuições dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios metilênicos e metínicos da cadeia alifática estão descritos na **Tabela 30**.

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância apresentadas no espectro de HMBC entre C-9/H-11, C-10/H-12, C-11/H-9, C-12/H-10, e C-13/H-9/H-11 (δ_H) (**Figura 28, Figura 28a**).

Pelo mapa de contornos HMBC (**Figura 28, Figura 28b**) pode-se observar picos cruzados entre os sinais de C-16 (δ 44,7) e H-6 (δ 2,85); C-21 (δ 86,9) e H-5 (δ 4,15); C-2 (δ 71,0) e H-16 (δ 2,25) e de C-5 (δ 63,5) e H-21 (δ 3,46) e H-22 (δ 4,67). As correlações entre o sinal do carbono em δ_C 70,1 (C-22) e os dos hidrogênios em δ_H 4,15 (H-5) e 2,85 (H-6) confirmaram o posicionamento do grupo carbinólico neste carbono. As correlações no mapa de contornos COSY entre os hidrogênios a δ_H 3,30 (H-3) e 1,89 (H-14); δ_H 2,25 (H-16) e 1,24 (H-17); δ_H 2,25 (H-16) e 4,67 (H-22); δ_H 2,85 (H-6) e 4,67 (H-22) e δ_H 4,15 (H-5) e 2,85 (H-6) corroboraram as atribuições dos valores de deslocamento químico destes hidrogênios (**Figura 26**). Esta figura mostra também as demais correlações observadas no espectro COSY.

O conjunto de dados espectrais de RMN uni- e bidimensionais descritos anteriormente para o alcaloide **A-6** mostrou-se muito semelhante aos dados apresentados na literatura para o alcaloide indolico copsanol-*N*-óxido isolado de *A. macrocarpon* (**Figura 23**) (Bannwart, 2012) (**Tabela 30**).

Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância **A-6** e comparação com dados de ^{13}C para o copsanol (**A-5**) e o copsanol-*N*-óxido descrito na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J)	δ_{C} (C)	δ_{C} (C)	δ_{C} (C)
	^a A-6	^a A-6	^b copsanol (A-5)	^c copsanol- <i>N</i> -óxido (Bannwart, 2012)
2	-	71,0	71,2	66,3
3	3,30 (m)	64,2	47,0	47,9
	3,80 (m)			
5	3,20 (m)	63,6	48,9	63,4
	4,15 (dd, $J= 7,3$ e $12,4$ Hz)			
6	2,85 (m)	53,7	54,4	55,7
7	-	66,1	65,2	77,1
8	-	131,7	134,0	141,8
9	7,30 (d, $J= 7,2$ Hz)	126,7	123,1	124,0
10	6,68 (t, $J= 7,4$ Hz)	119,1	119,3	121,8
11	6,93 (t, $J= 7,4$ Hz)	128,0	127,2	128,8
12	6,55 (d, $J= 7,5$ Hz)	110,3	110,5	113,9
13	-	151,4	151,1	150,9
14	1,90 (m)	19,8	15,2	15,8
15	1,30 (m)	31,9	34,3	34,3
	1,35 (d, $J= 3,9$ Hz)			
16	2,25 (dd, $J= 4,4$ e $9,8$ Hz)	44,7	45,6	48,0
17	1,20 (m)	29,3	29,6	35,2
18	1,89 (m)	19,8	25,6	24,8
19	1,20 (m)	36,9	36,9	37,2
20	-	32,7	31,3	31,6
21	3,40 (s)	86,9	70,8	85,5
22	4,67 (dd, $J= 4,4$ e $9,2$ Hz)	70,1	72,2	71,3

[^a(CDCl₃, gota CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CDCl₃, gota de CD₃OD)]

[^b(CDCl₃, gota CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CDCl₃, gota de CD₃OD)]

[^c(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]

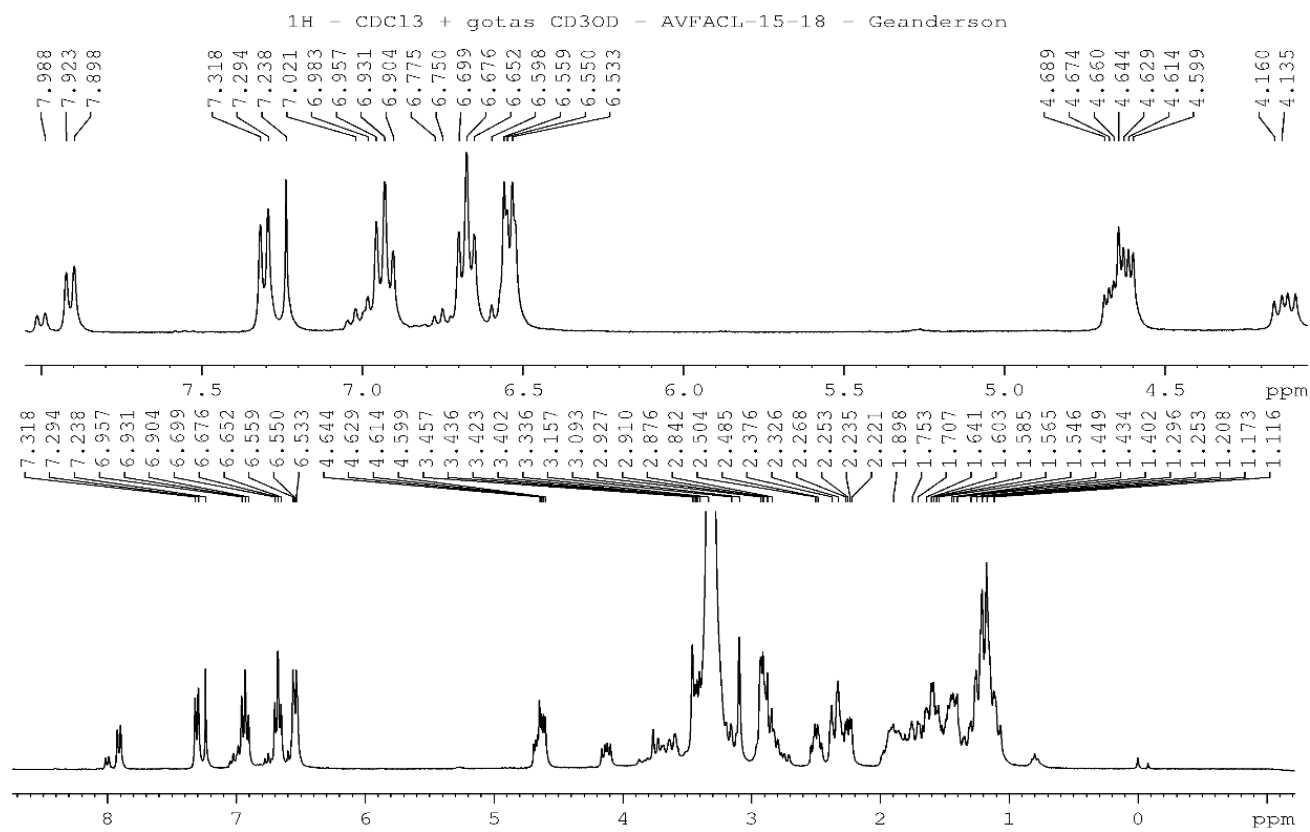


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6

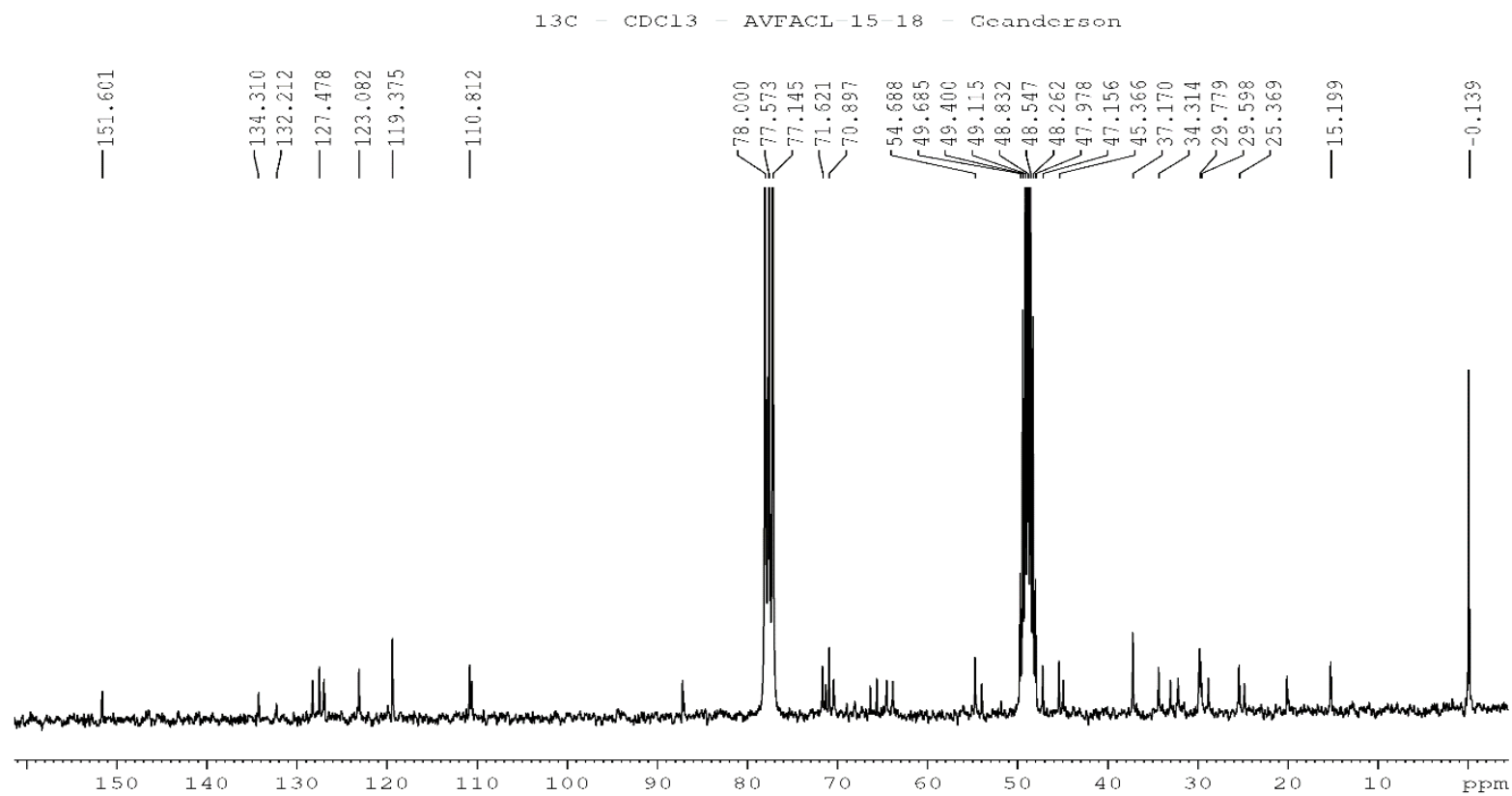


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6

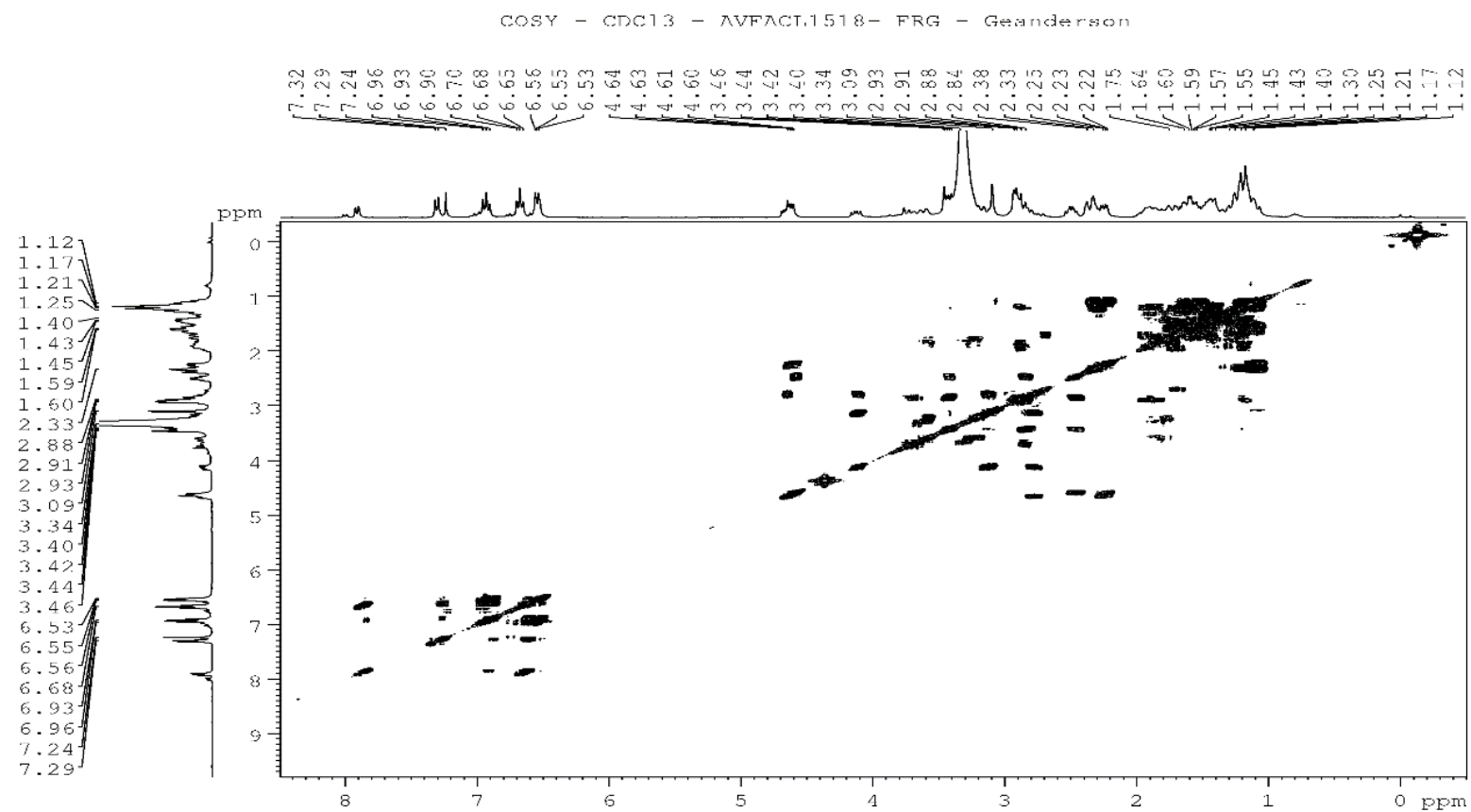


Figura 26. Mapa de contornos COSY (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-6

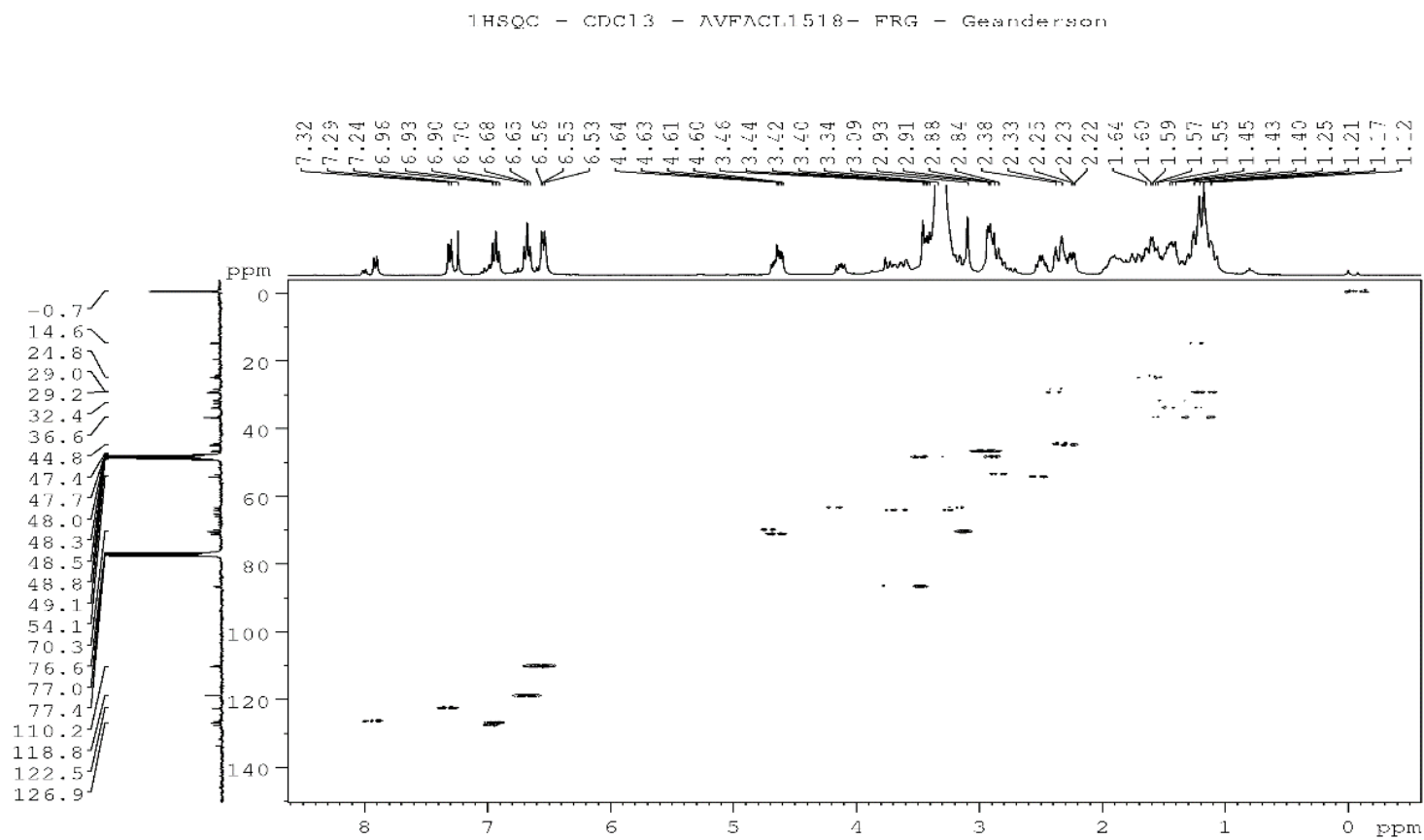


Figura 27. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-6

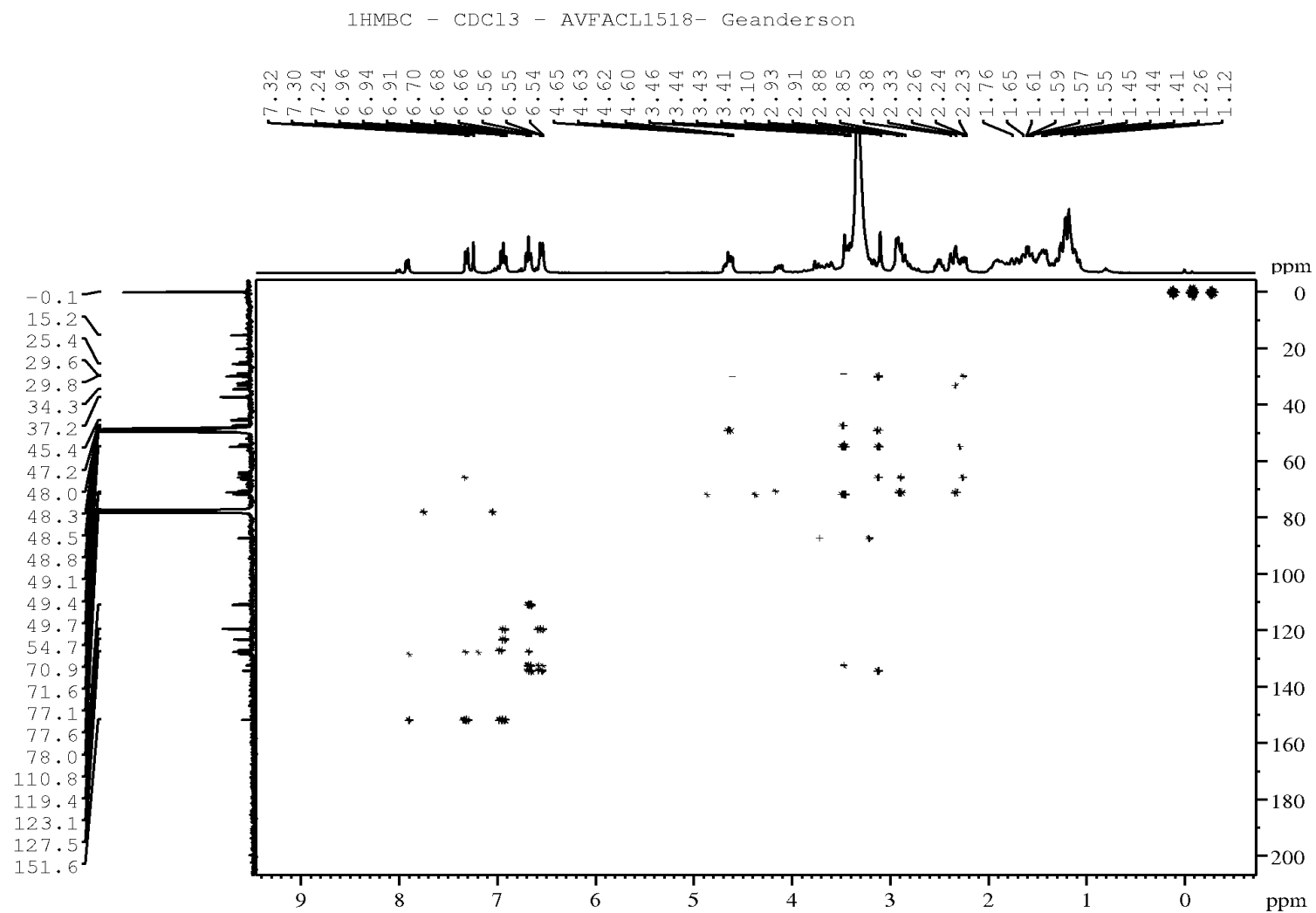


Figura 28. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-6

1HMBC - CDCl₃ - AVFACL1518- Geanderson

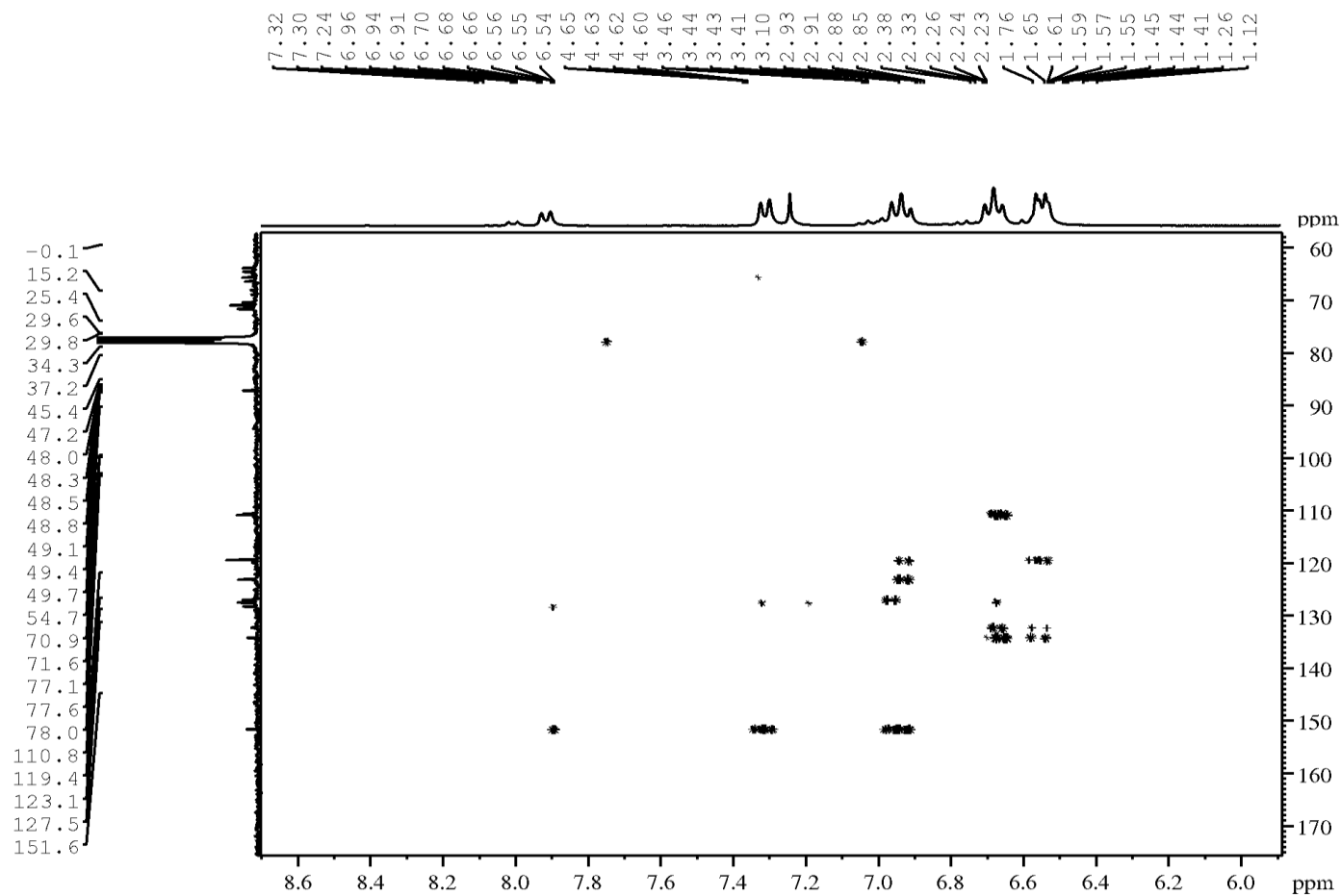


Figura 28a. Expansão do mapa de contornos HMBC (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-6

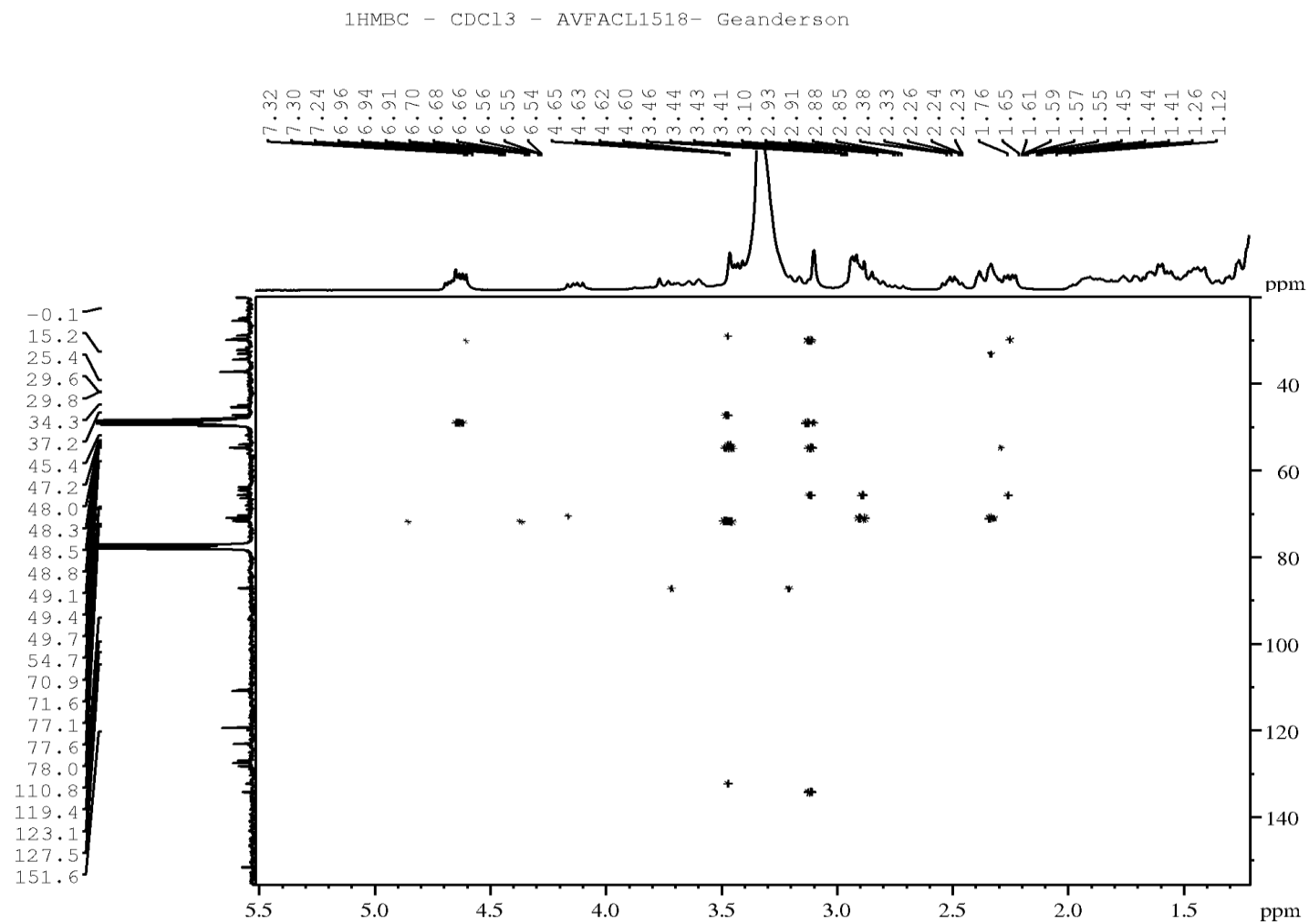


Figura 28b. Expansão do mapa de contornos HMBC (CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-6

4.1.6 Substâncias A-6+A-7

As substâncias **A-6+A-7** foram isoladas como um sólido de cor amarela solúvel em clorofórmio com gotas de metanol da subfração **AVFACI-13-68**. Revelada com solução do reagente de Dragendorff, apresentou-se em uma única mancha alaranjada, sendo encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C e CLAE-DAD-EM/EM.

A análise da fração alcaloídica **AVFACI-13-68** por CLAE-DAD-EM/EM (**Figura 30**) revelou a presença de um pico cujo espectro de massas (EM) (**Figura 31**) mostrou um íon a m/z 325,1913 em 16,0 minutos, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (Δ -0,9 ppm) e atribuído a copsanol-*N*-óxido (**A-6**, item 4.1.5). Apresentou também um pico em 27,8 minutos (**A-7**), que originou no espectro de massas um íon a m/z 323,1759, com erro (Δ) de -1,4 ppm para a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (**Figura 32**). A proposta de fragmentação de **A-7** e as estruturas de alguns dos íons-produto observados no experimento EM/EM são apresentadas no item 4.3.

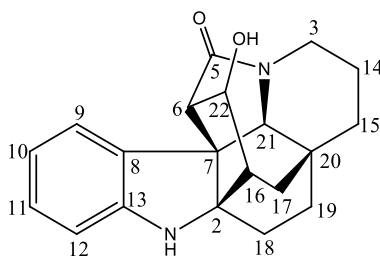


Figura 29. Estrutura química do alcaloide **A-7** (5-oxocopsanol)

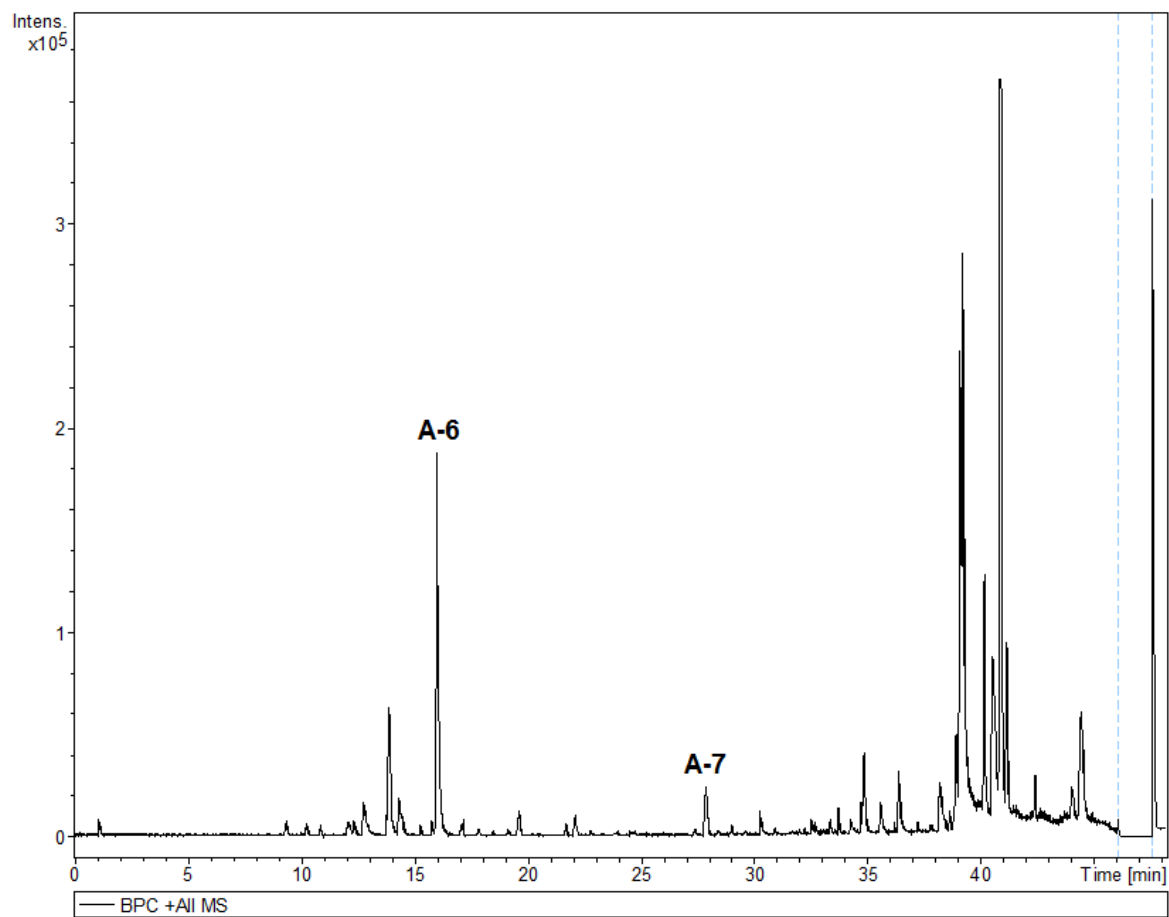


Figura 30. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AVFACI-13-68** das cascas de *Aspidosperma verbascifolium*

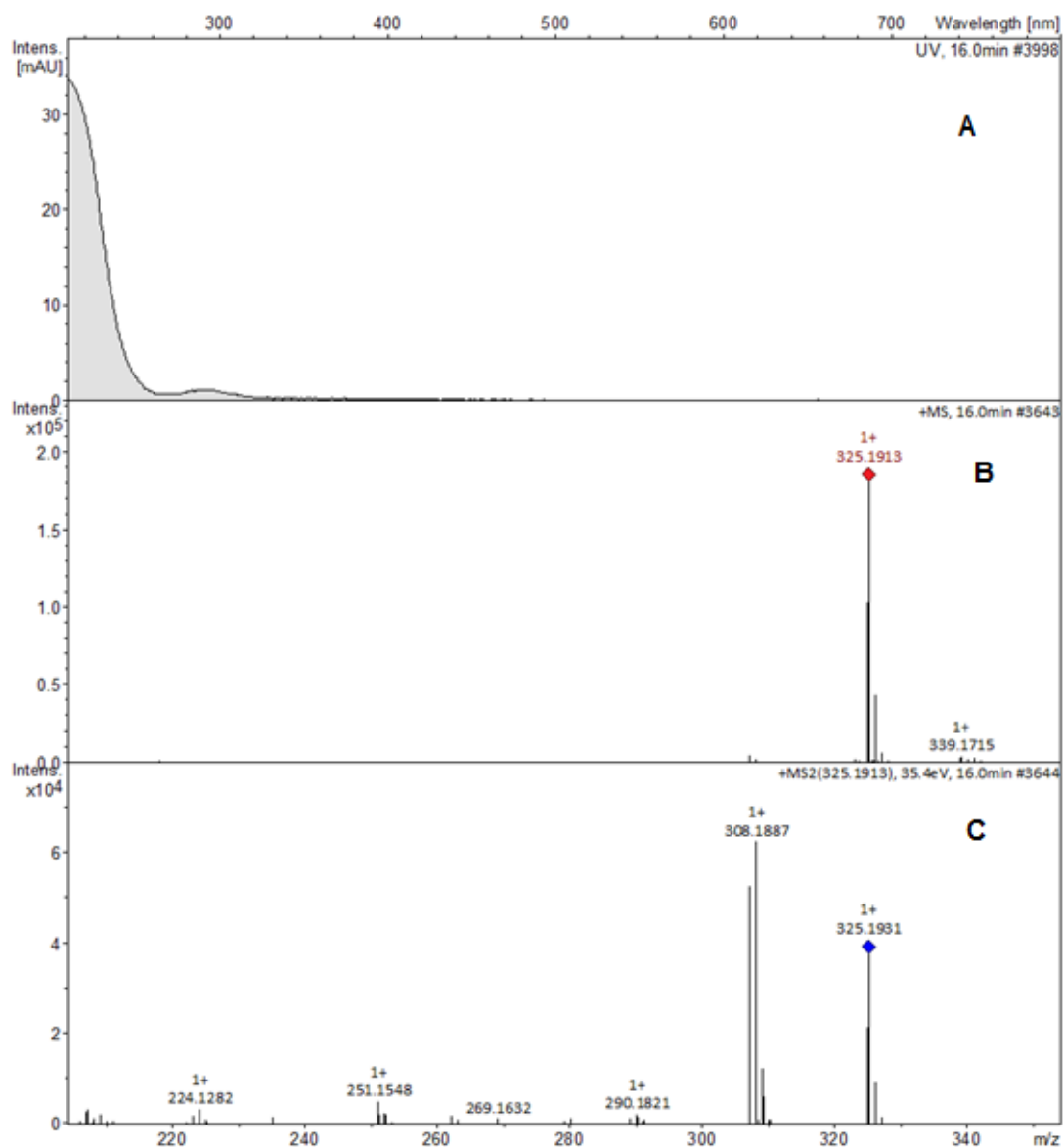


Figura 31. Espectro A: UV de A-6 (copsanol-*N*-óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol-*N*-óxido. Espectro C: Experimento EM/EM

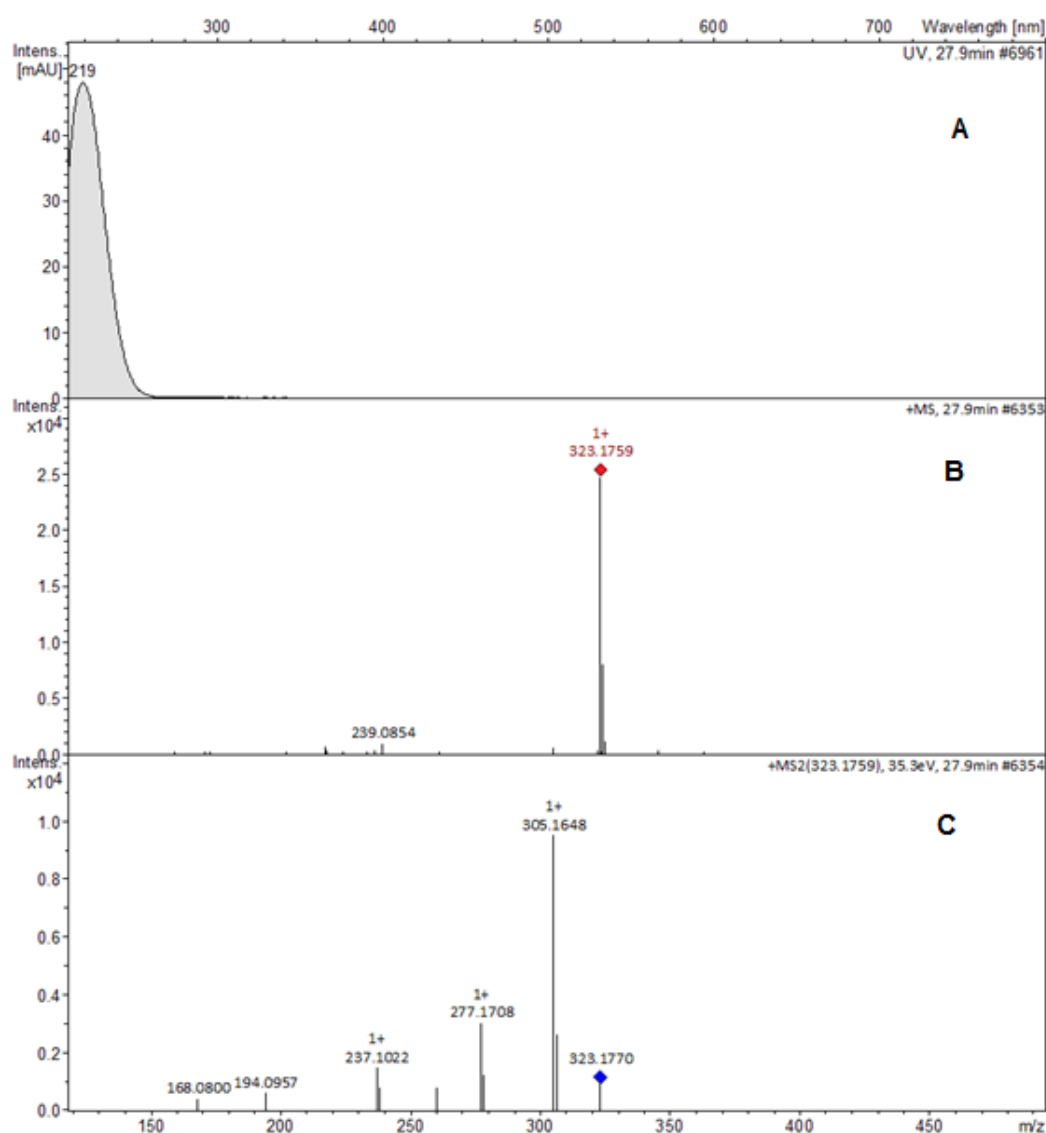


Figura 32. Espectro A: UV de A-7 (5-oxocopsanol). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto 5-oxocopsanol. Espectro C: Experimento EM/EM

Os dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C indicaram que esta subfração era composta por uma mistura de duas substâncias principais. Através da comparação destes dados com os obtidos para **A-6**, verificou-se que o componente majoritário da mistura se tratava deste alcaloide. A análise dos demais dados presentes nos espectros da mistura sugeriu que o outro componente da subfração **AVFACI-13-68**, denominado **A-7**, seria o alcaloide 5-oxocopsanol (**Figura 29**). O padrão típico de hidrogênios de anel aromático de derivados indólicos foi observado em δ_{H} 7,36 (d, $J = 7,3$ Hz, H-9),

6,69 (t, $J = 7,3$ Hz, H-10), 6,99 (t, $J = 7,3$ Hz, H-11) e 6,63 (d, $J = 7,3$ Hz, H-12), indicando a presença do núcleo indólico livre de substituintes. Sinais de três hidrogênios metínicos em δ_H 2,49 (dd, $J = 3,6$ e $11,8$ Hz, H-6), δ_H 2,37 (dd, $J = 4,3$ e $5,7$ Hz, H-16) e δ_H 3,32 (s, H-21) também foram observados (**Figura 34; Tabela 31**).

Um sinal no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 35**) em δ_C 163,4 sugeriu a presença de carbonila de uma lactama e um segundo sinal em δ_C 72,3 foi atribuído ao carbono carbinólico C-22. No espectro de RMN de 1H (**Figura 34**), um duplo duplete em δ_H 3,70 ($J = 4,9$ e $6,0$ Hz, H-22) confirmou a presença deste grupo.

O conjunto de dados espectrais de ^{13}C descritos acima para o alcaloide **A-7** se mostrou muito semelhante aos dados apresentados pelos alcaloides indólicos copsorinina (Kam, 2004) e copsanol (**A-5**) (**Figura 33, Tabela 31**). Estas informações, aliadas à fórmula molecular $C_{20}H_{22}N_2O_2$ obtida para o componente relativo ao pico **A-7**, permitiram propor para este alcaloide a estrutura correspondente ao 5-oxocopsanol (**Figura 29**). Este composto foi anteriormente isolado de um espécime de *Aspidosperma verbascifolium* por Braekman e cols. em 1969. Embora descrito anteriormente por Braekman e cols, os dados espectrométricos de RMN deste alcaloide esta sendo descritos pela primeira vez no presente trabalho.

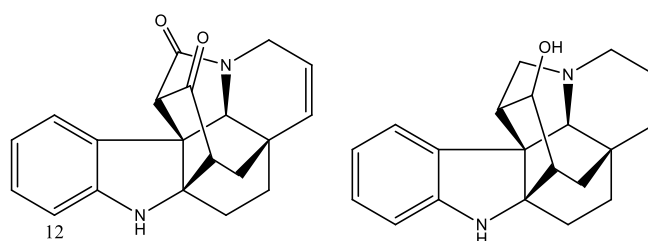


Figura 33. Estrutura química dos alcaloides copsorinina e copsanol (**A-5**)

Tabela 31. Dados de RMN de ^{13}C para a substância **A-7** e comparação com dados de ^{13}C para o copsanol (**A-5**) e copsorinina descritos na literatura.

C/H	δc (C) ^a A-7	δc (C) ^b copsanol (A-5)	δc (C) ^c copsorinina (Kam & Choo, 2004)
2	71,7	71,2	69,2
3	46,0	47,0	41,8
5	163,4	48,9	167,4
6	55,1	54,4	62,1
7	67,3	65,2	56,1
8	133,4	134,0	130,6
9	127,5	123,1	122,6
10	119,6	119,3	120,1
11	128,0	127,2	128,8
12	111,3	110,5	11,7
13	158,8	151,1	150,7
14	14,4	15,2	124,3
15	33,1	34,3	131,9
16	46,0	45,6	53,6
17	29,5	29,6	33,4
18	20,8	25,6	23,4
19	37,9	36,9	30,6
20	32,9	31,1	34,1
21	71,4	70,8	63,2
22-	72,3	72,2	204,7

[^a(CDCl₃, gota CD₃OD; 75,45 MHz); [^b(CDCl₃, gota CD₃OD; 75,45 MHz); [^c(CDCl₃; 100,0 MHz)]

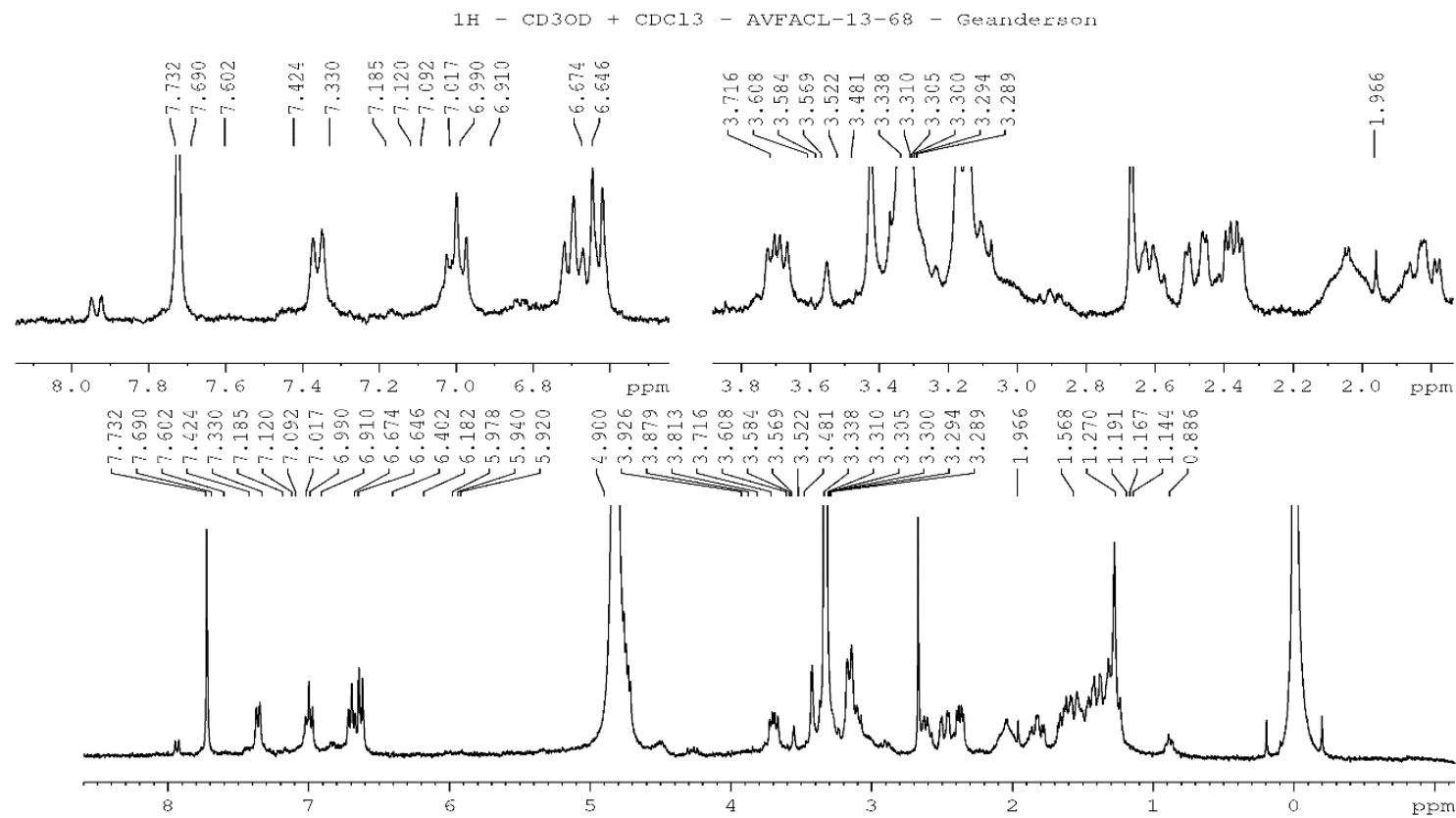


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6+A-7

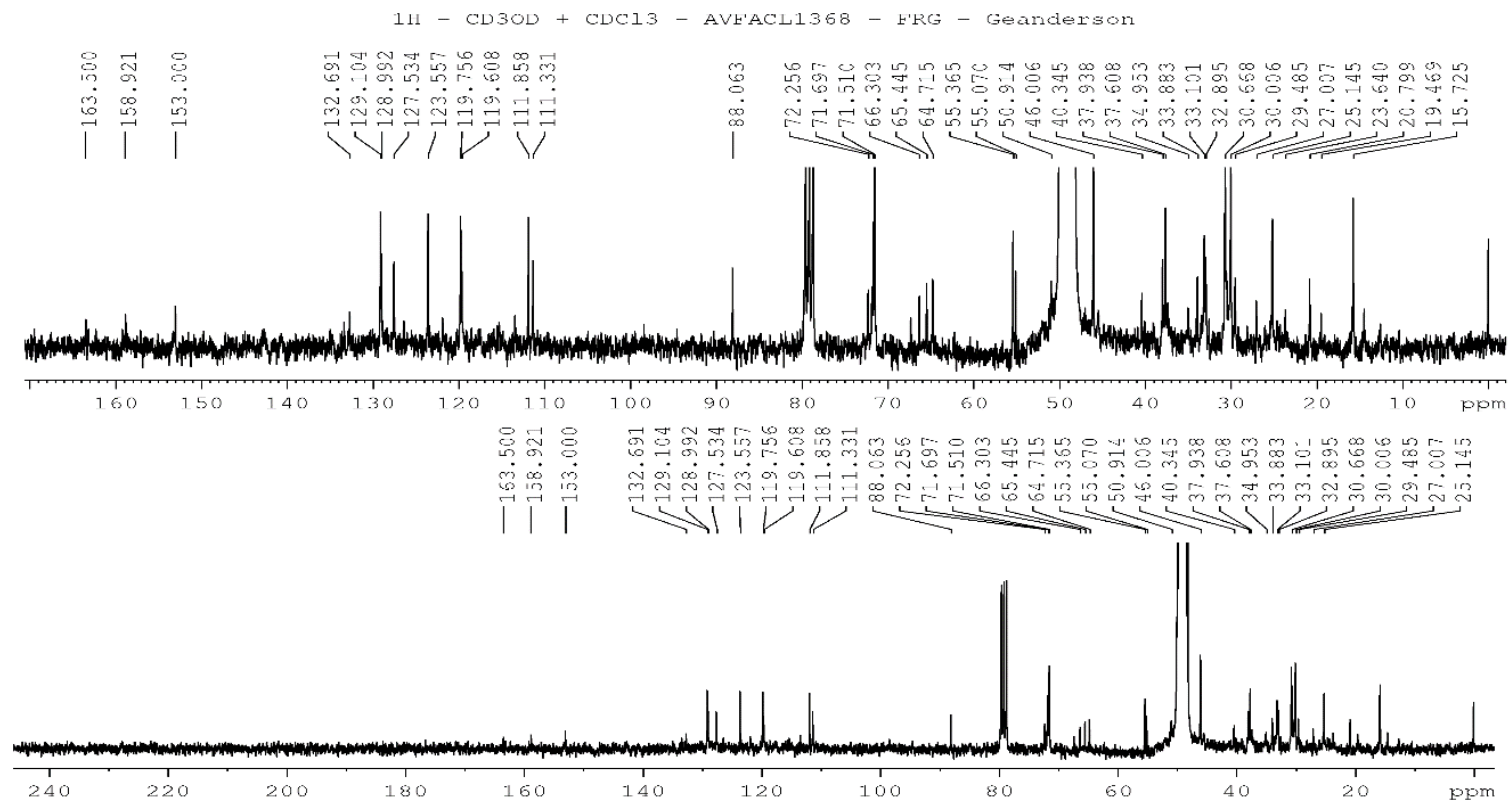


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-6+A-7

4.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fase clorofórmica (AFCJ) das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

As substâncias isoladas a partir do fracionamento da fase alcaloídica clorofórmica das folhas do espécime *Aspidosperma verbascifolium* (AFCJ) tiveram suas estruturas estabelecidas com base nas análises espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas sequencial (CLAE-DAD-EM/EM) e por comparação com dados existentes na literatura. A identificação destas substâncias é descrita a seguir.

4.2.1 Substância A-8

O fracionamento cromatográfico de **AFCJ-32-14** culminou no isolamento de **A-8**, esse se apresentou como sólido amorfo de cor branca. Suas estruturas foram confirmadas a partir dos espectros RMN de ^1H , de ^{13}C e CLAE-DAD-EM/EM.

A espectrometria de massas sequencial (EM/EM) (**Figura 36**) forneceu grandes informações estruturais e facilitou a identificação do metabólito através da análise da fragmentação característica de sua molécula. Registrando íon desprotonado m/z 193,0512 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (**Figura 37**), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4^-$. A identidade do composto foi confirmada por comparação dos seus dados espectrométricos de RMN de ^1H , de ^{13}C e EM, com os relatados em literatura (Balachandran, 2015).

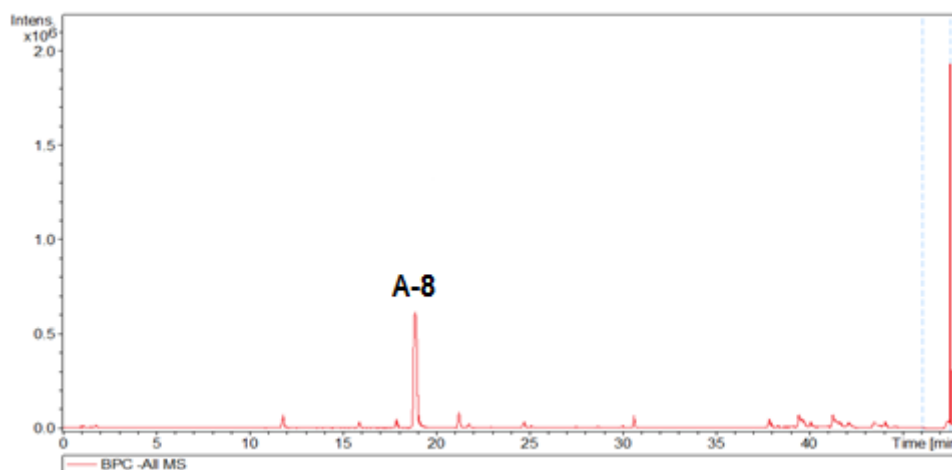


Figura 36. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AFCJ-32-14** das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

O espectro de massas do composto é apresentado na **Figura 37** bem como o resultado da análise EM/EM para m/z 193 que origina principalmente o íon m/z 161 (**Tabela 32**).

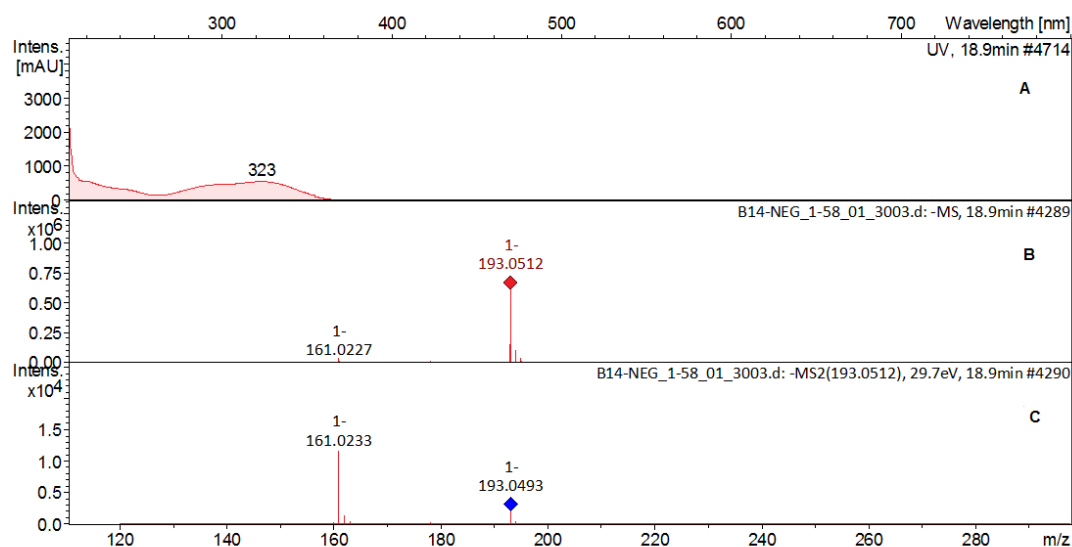
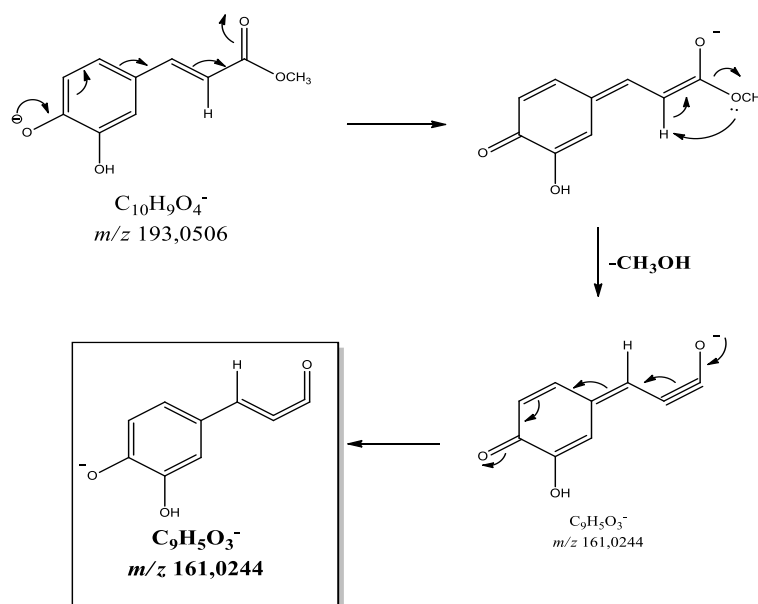


Figura 37. Espectro A: UV de A-8. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto A-8. Espectro C: Experimento EM/EM

O fragmento m/z 193 corresponde ao íon $[M-H]^-$ do cafeato de metila, o qual por perda de uma molécula de CH_3OH (32 Da) $[M-H-CH_3OH]$ pode originar o fragmento m/z 161 de acordo com o apresentado no **Esquema 1**.



Esquema 1. Proposta da via mecanística do fragmento m/z 161 do cafeato de metila (m/z 193) a partir de EM/EM, em modo negativo

Tabela 32. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI– EM/EM para A-8 (cafeato de metila)

Composto	Fórmula	[M-H] ⁻	Erro	ESI-EM/EM
	molecular	m/z	Δ (ppm)	Fragmentos (m/z)
		calculado		observado
Cafeato de metila	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ ⁻	193	-3,4	193
	C ₉ H ₅ O ₃ ⁻			161

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiu caracterizar a substância como um derivado do ácido cinâmico. Do conjunto de dados obtidos mediante os espectros de RMN de ¹H (**Figura 39**) deste, devem ser destacados em face da importância para a caracterização estrutural do mesmo, os sinais em δ_H 7,06 - δ 6,82 ppm, característicos de anel aromático 1,3,4-trissubstituído e os sinais em δ_H 7,56 e δ 6,24 ppm referentes aos dois prótons olefínicos H-7 e H-8, respectivamente, cuja configuração trans conjugada à carbonila é confirmada pela constante de acoplamento (J= 15,9 Hz), sinais estes que são característicos de um éster trans-cinâmico de derivados aromáticos C₆-C₃. Além destes, um singlete em δ_H 3,80, integrado para 3 hidrogênios referente a um grupo metoxila foi atribuído a estrutura (**Tabela 33**).

O espectro de RMN de ¹³C/DEPT (**Figura 40**, **Figura 41**), evidenciou dez linhas espectrais, a quais destacam-se os sinais em δc 145,4 e 113,5 referentes aos carbonos olefínicos C-7 e C-8, respectivamente. Além destes, destacam-se os sinais dos carbonos carbinólicos do sistema aromático em δc 144,8 (C-3), 147,5 (C-4), o carbono quaternário δc 126,1 (C-1), e sinais em δc 168,3 e 51,0 compatíveis com a presença de um grupo carboximetila (**Figura 40**). A posição da metoxila foi confirmada através das correlações heteronucleares a longa distância apresentadas no espectro de HMBC (**Figura 43**) através das correlações entre o C-9 (δc 168,3) com os hidrogênios em δ_H 3,8 (O-CH₃). Pelo mapa de contornos HMBC foi possível observar ainda as correlações entre δc 145,4 (C-7) com δ_H 6,81 (H-2), do δc 126,1 (C-1) com δ_H 7,57 (H-7), 6,24 (H-8) e 6,81 (H-2). Demais correlações podem ser observadas na **Tabela 34**. Esses dados estão em acordo com a literatura (Balachandran *et al.*, 2015) para compostos da mesma família química e permitiram caracterizar o produto como cafeato de metila (**Figura 43**).

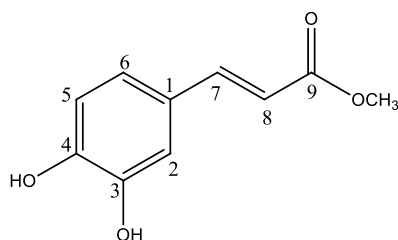


Figura 38. Estrutura química de **A-8** (cafeato de metila)

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância **A-8** e comparação com $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ do cafeato de metila

C/H	δH (mult., J) ^a A-8	δc (C) RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ ^a A-8	δc (C) RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ ^b Cafeato de Metila (Balachandran <i>et al.</i> , 2015)
1	-	126,1	126,3
2	7,06 (1H, d, $J=1,2$ Hz)	113,6	113,4
3	-	144,8	145,6
4	-	147,5	148,2
5	6,81 (1H, d, $J= 8,1$ Hz)	114,9	115,1
6	6,96 (1H, dd, $J= 8,1; 1,7$ Hz)	121,5	121,6
7	7,57 (1H, d, $J= 15,9$ Hz)	145,4	145,4
8	6,24 (1H, d, $J= 15,9$ Hz)	113,5	113,7
9	-	168,3	168,4
COOCH ₃	3,80 (s)	51,0	50,6

[^a(δ -ppm, 300 MHz, CD₃OD)] [^a(δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]; [^b(δ -ppm, 100MHz, DMSO-d₆)]

Tabela 34. Principais correlações 2J e 3J ($^1H \times ^{13}C$) observadas no mapa de contorno HMBC para a substância **A-8**

δ_H (H)	δ_C (C)
7,57 (H-7), 6,24 (H-8), 3,80 (COOCH ₃)	168,3 (C-9)
7,06 (H-2), 6,94 (H-6), 6,81 (H-5)	147,5 (C-4)
6,81 (H-5)	145,4 (C-7)
6,81 (H-5)	144,8 (C-3)
7,57 (H-7), 6,81 (H-5), 6,24 (H-8)	126,1 (C-1)
7,57 (H-7), 7,06 (H-2)	121,5 (C-6)
6,94 (H-6)	114,9 (C-2)
6,94 (H-6)	113,6 (C-5)
7, 57 (H-7)	113,5 (C-8)
-	51,0 (COOCH ₃)

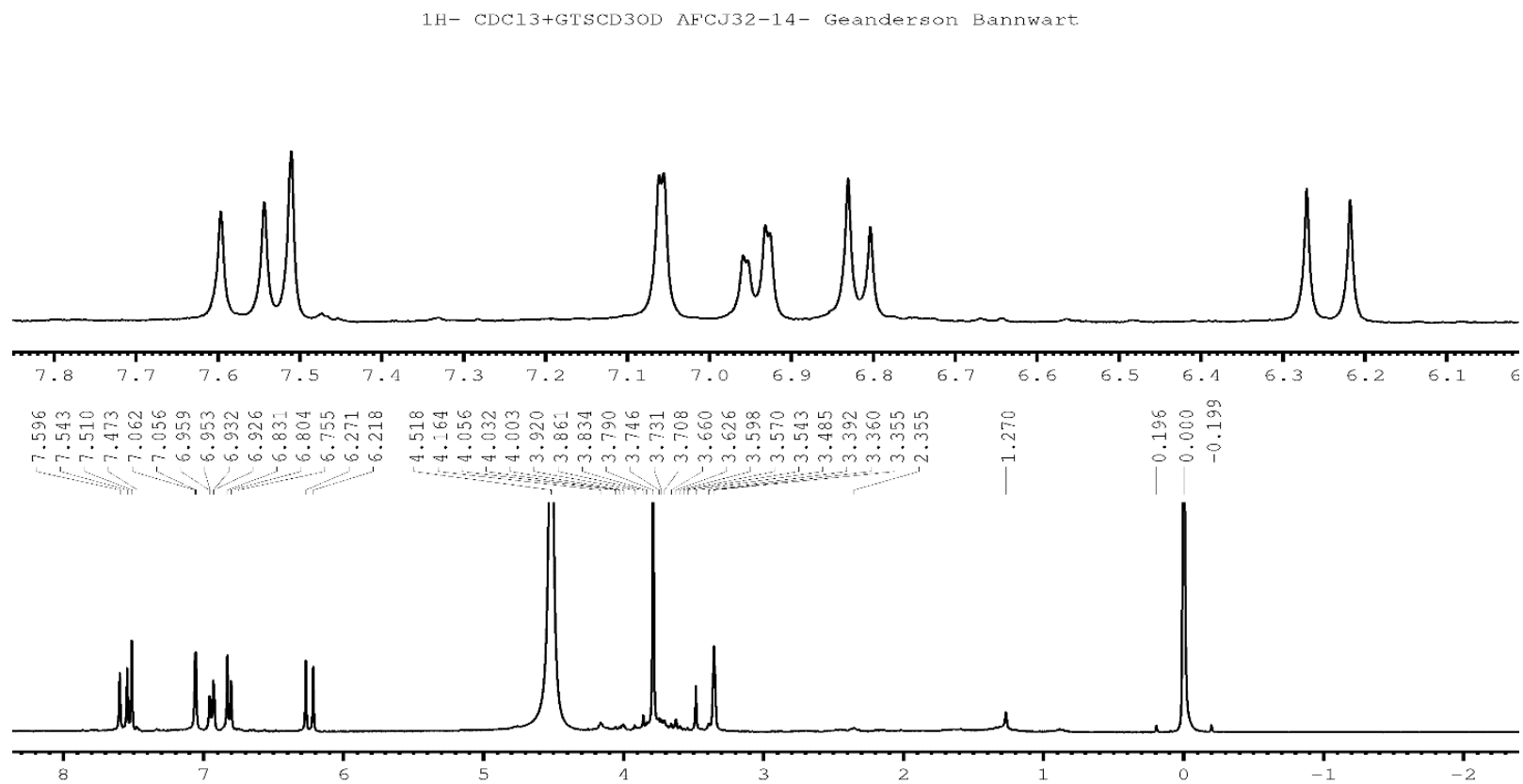


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-8

1H - CDC13+GTS CD3OD- AFCJ32-14 Geanderson Bannwart

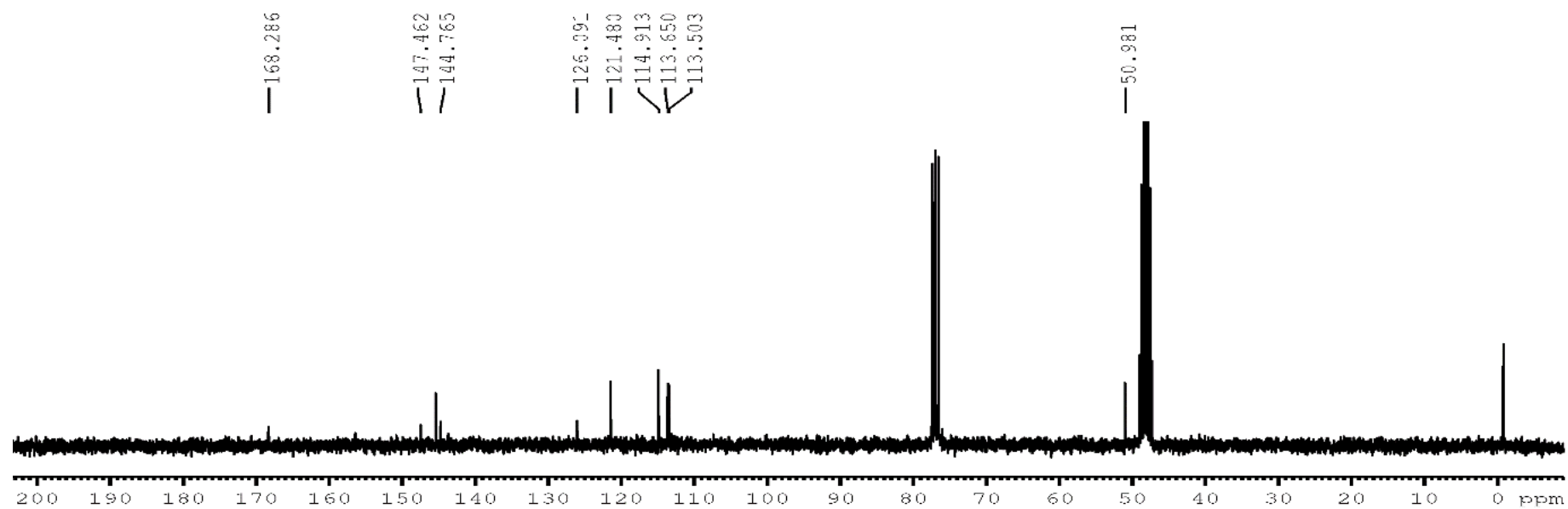


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-8

1H - CDCl3+GTSCD3OD -AFCJ32-14 - Geanderson Bannwart

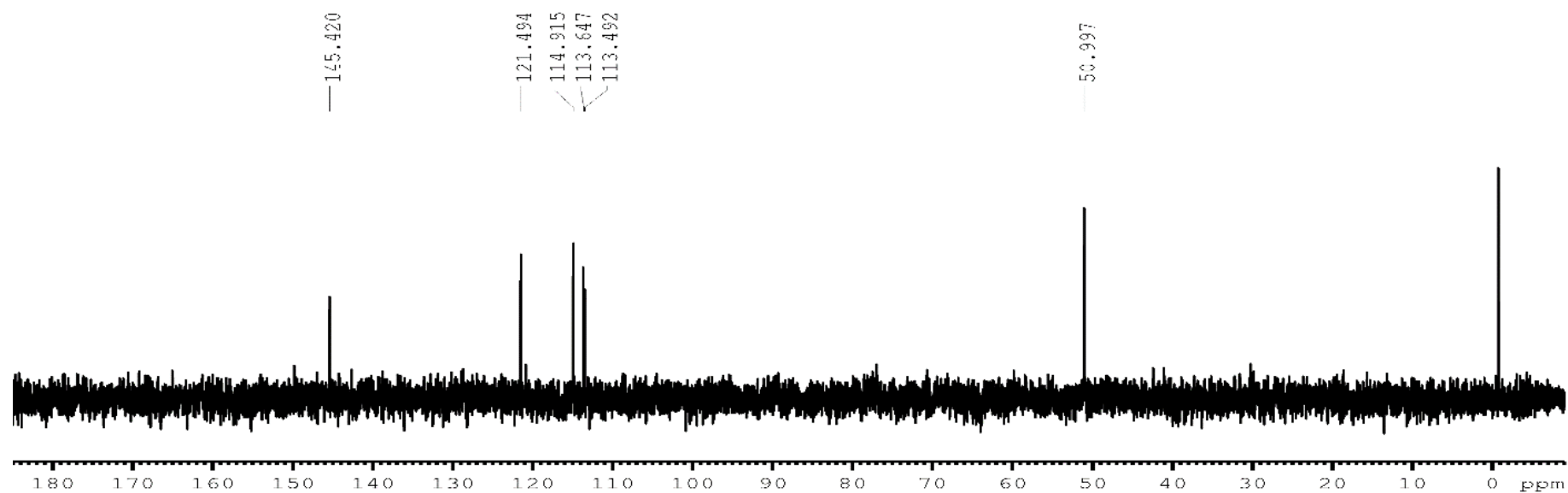


Figura 41. Espectro de RMN de DEPT (75,45 MHz; CDCl₃, gotas CD₃OD) de A-8

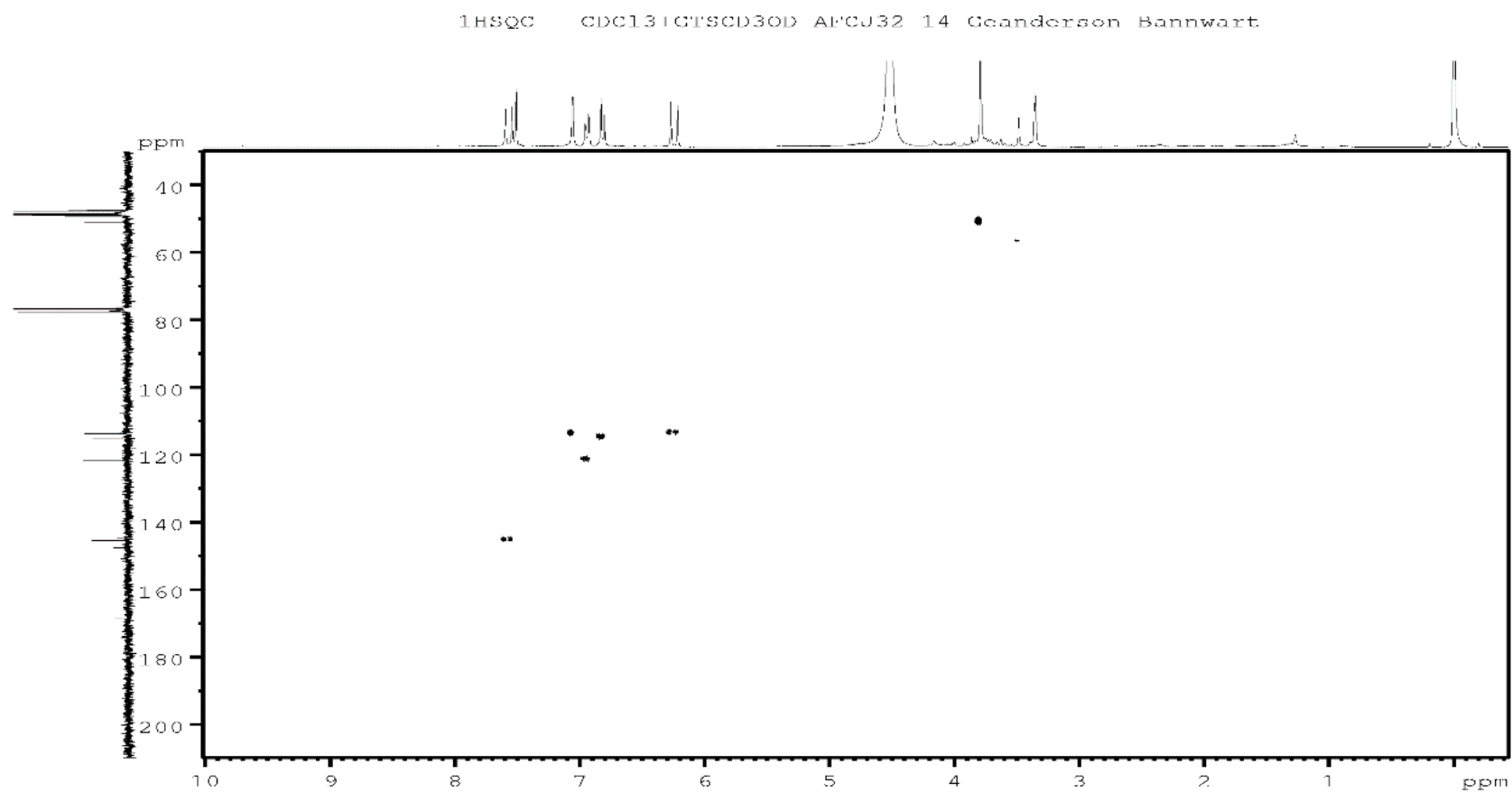


Figura 42. Mapa de contornos HSQC de A-8

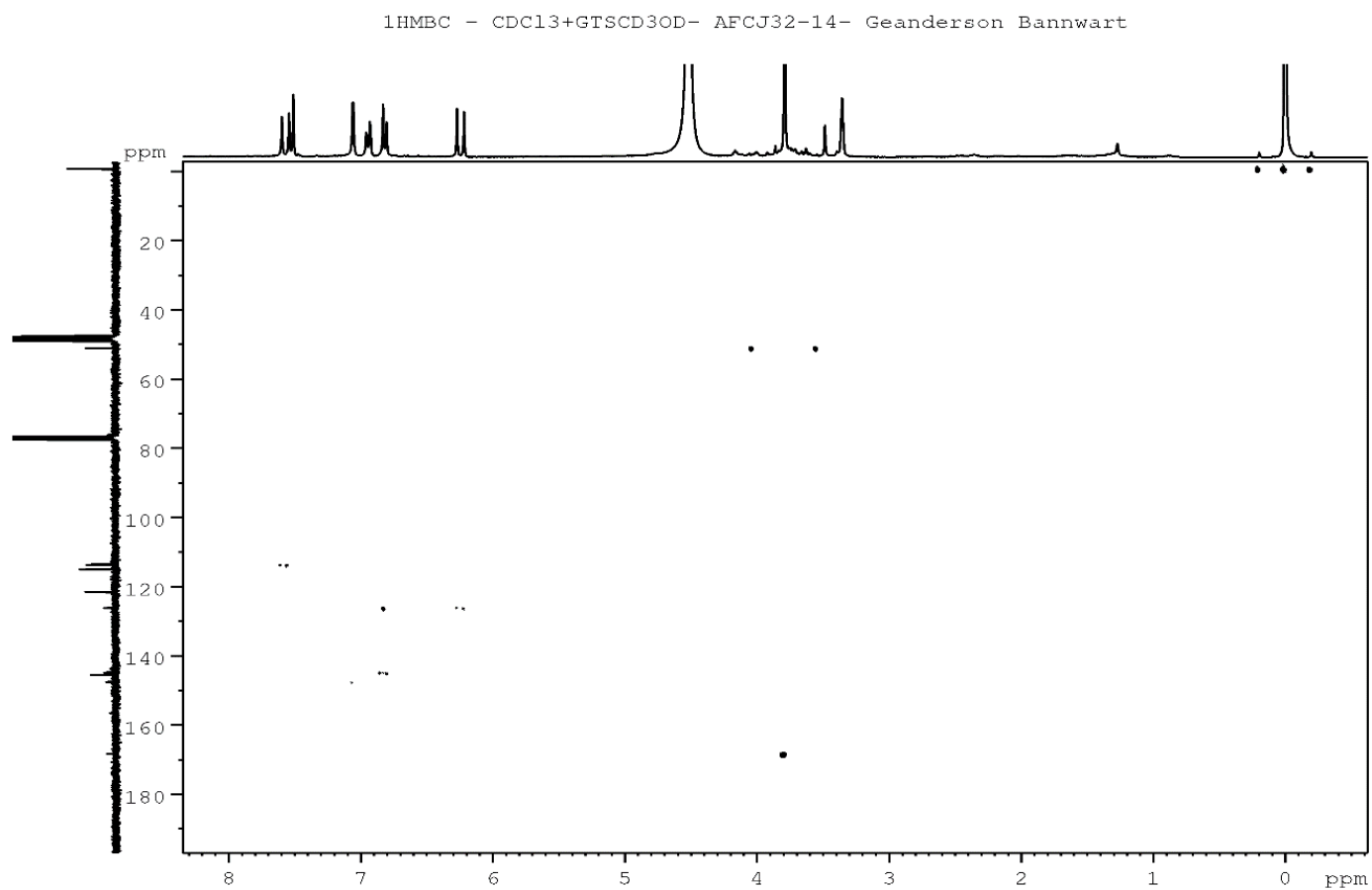


Figura 43. Mapa de contornos HMBC de A-8

4.2.2 Substância A-9

Após submetida a um fracionamento cromatográfico em CLAE a subfração **AFCJ-15-13** (27,0 mg) resultou em 4 picos (**Figura 44**). Fracionada por CLAE semipreparativa, foi coletada a subfração **AFCJ-15-13-p4** (2,3 mg), correspondente ao pico com tempo de retenção em 12,0 minutos, originando a substância **A-9**. Isolada como um sólido de cor amarela solúvel em clorofórmio, quando revelada após CCDA com solução do reagente de Dragendorff, apresentou uma única mancha alaranjada, sendo encaminhada para análise espectral de RMN de ^1H e CLAE-DAD-EM/EM.

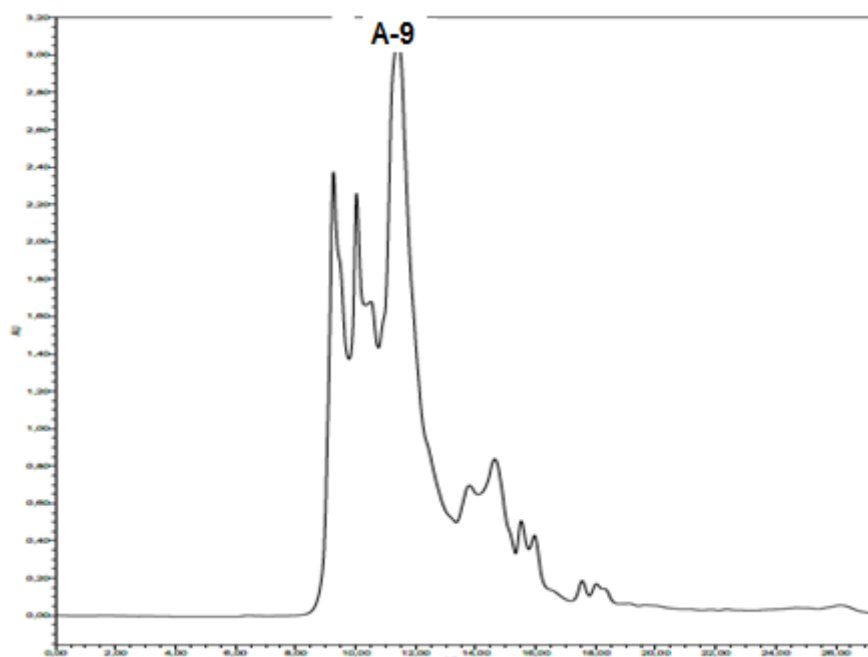


Figura 44. Cromatograma de AFCJ-15-13

Evidenciando a presença de substância da classe dos alcaloides indólicos do tipo copsano (Pereira *et al.*, 2007), as análises de RMN de ^1H para a subfração **AFCJ-15-13-p4** (**Figura 48**) (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) apresentaram sinais de quatro hidrogênios aromáticos, sendo dois dupletos em δ_{H} 7,27 ($J= 7,9$ Hz, 1H) e 6,65 ($J= 7,9$ Hz, 1H) e dois tripletos de dupletos em δ_{H} 7,03 ($J= 1,10$ e 7,51 Hz, 1H) e 6,77 ($J= 1,10$ e 7,51 Hz, 1H) característicos de um anel aromático *orto*-dissubstituído, atribuíveis a hidrogênios de um anel aromático 1,2-dissubstituído, correspondentes aos hidrogênios em H-9 e H-12, e, H-10 e H-11, indicadores de que o anel A encontra-se sem substituições (Bannwart, 2012). Foi observado ainda, sinais de três hidrogênios metínicos em δ_{H} 2,55

(dd, $J = 4,30; 9,80$ Hz, H-6, 1H), δ_H 2,67 (d, $J = 10,85$ Hz; H-16, 1H) e δ_H 3,35 (s, H-21, 1H) (**Tabela 35**).

Estes dados, aliados ao fato de o espectro de massas de alta resolução indicar um íon protonado a m/z 307,1807 $[M+H]^+$ (**Figura 47**), compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{23}N_2O^+$, erro -0,7 ppm, leva a inferir que o **PICO** da fração alcaloídica das folhas **AFCJ-15-13-p4** (**Figura 46**) com tempo de retenção em 11,0 minutos é condizente ao metabolito identificado como copsanona (**Figura 45**). O mesmo foi observado na base de dados (item 3.5) assim sendo a identidade do composto confirmada por comparação dos dados espectrométricos (RMN de 1H e CLAE-DAD-EM/EM) com os relatados na literatura para o alcaloide copsanona (**Figura 45**) (Bannwart, 2012.; Jones, 2011.; Peçanha, 2016). Levantamento bibliográfico para este composto evidenciou a identificação do mesmo em espécies do gênero *Kopsia*, *Kopsia jasminiflora* (Kitajima *et al.*, 2014), também pertencente à família Apocynaceae, sendo encontrada ainda em *Aspidosperma duckei* (Ferreira Filho, 1966) e nas sementes, cascas (Mitaine *et al.*, 1996) e folhas (Bannwart, 2012) de *Aspidosperma macrocarpon*.

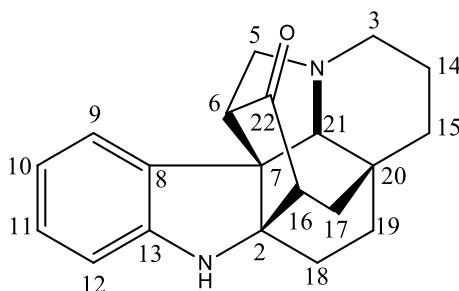


Figura 45. Estrutura química do alcaloide **A-9** (copsanona)

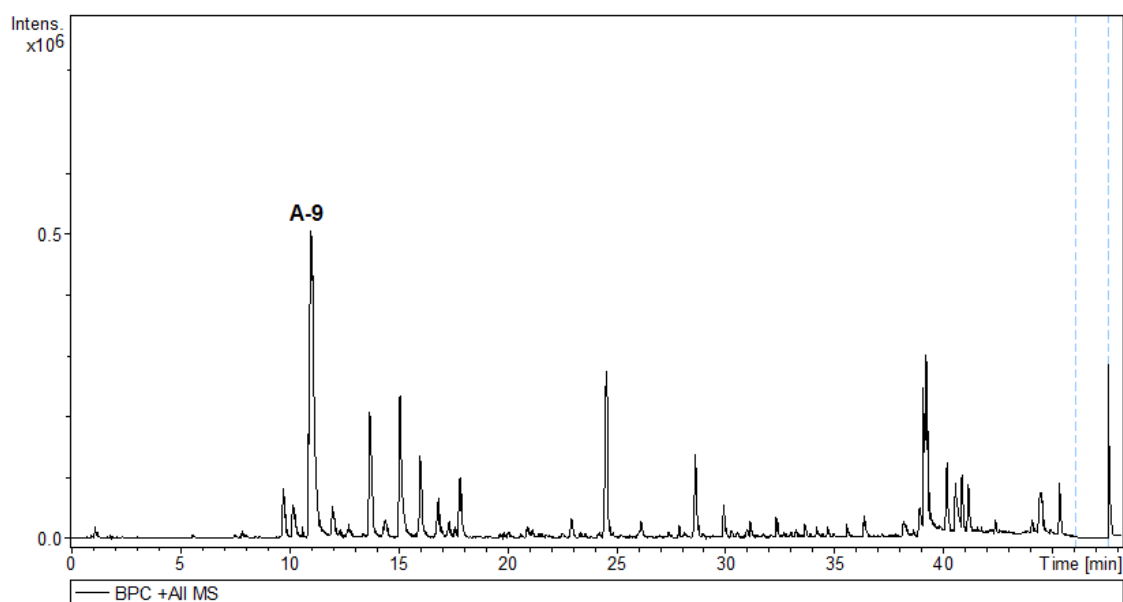


Figura 46. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AVFACI-15-13-p4** das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

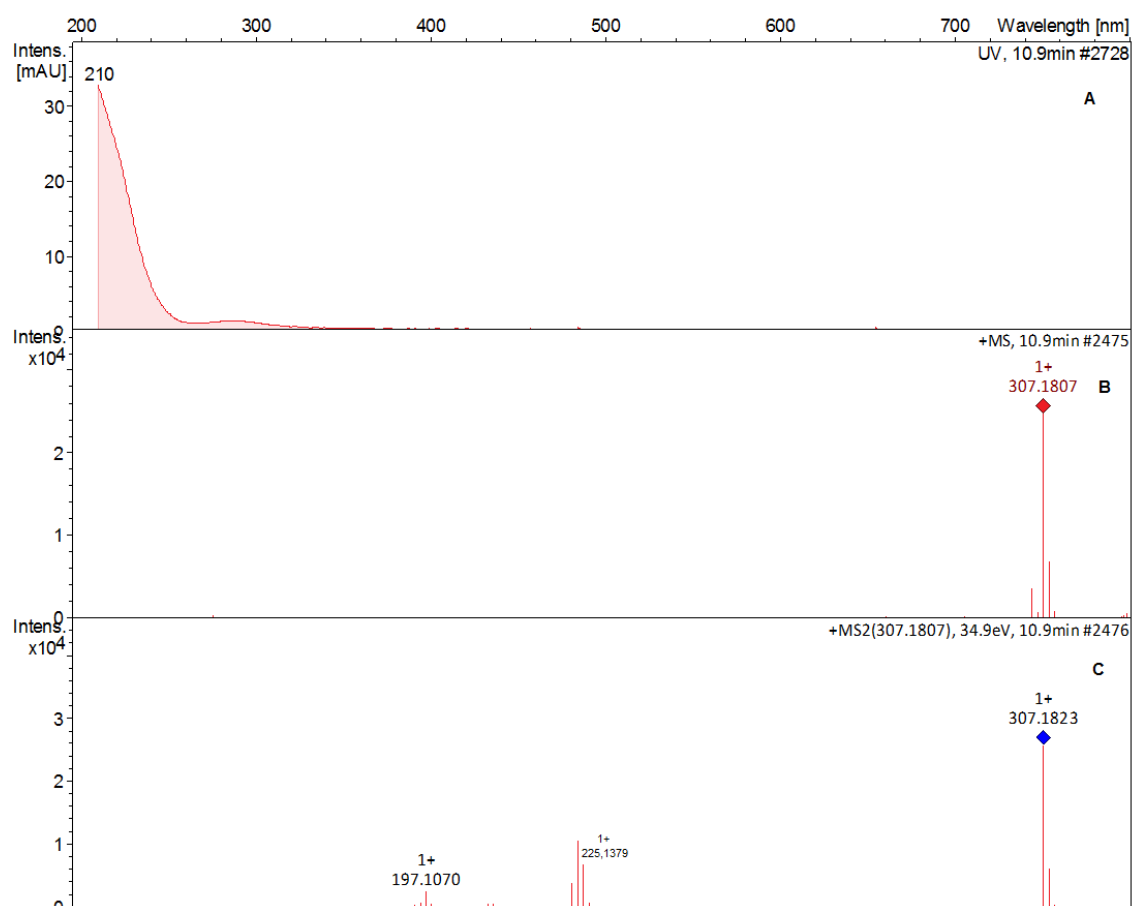


Figura 47. Espectro A: UV de A-9 (copsanona). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanona. Espectro C: Experimento EM/EM

Tabela 35. Dados de RMN de ^1H para a substância **A-9** e comparação com dados de ^1H para a copsanona descrita na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J, H) ^a A-9	δ_{H} (mult., J, H) ^b copsanona (Bannwart, 2012)
2	-	-
3	3,00 (m)	3,02 (m)
5	3,11 (dd, $J=5,1$; 9,5 Hz) 3,48 (t, $J=9,9$ Hz)	3,14 (dd, $J=5,1$; 9,9 Hz) 3,45 (t, $J=9,9$ Hz)
6	2,55 (dd, $J=4,3$; 9,8 Hz)	2,42 (ddd, $J=1,8$; 5,1; 9,9 Hz)
7	-	-
8	-	-
9	7,27 (d, $J=7,9$ Hz)	7,34 (dd, $J=1,2$; 7,5)
10	6,77 (td, $J=1,0$; 7,5 Hz)	6,70 (td, $J=0,9$; 7,5 Hz)
11	7,03 (td, $J=1,0$; 7,5 Hz)	6,99 (td, $J=1,2$ e 7,5 Hz)
12	6,65 (d, $J=7,9$ Hz)	6,63 (d, $J=7,5$ Hz)
13	-	-
14	1,20-1,40 (m)	1,27-1,36 (m) 1,83-1,92 (m)
15	1,20-1,40 (m)	1,31-1,40 (m) 1,50 (dt, $J=3,0$ e 13,5 Hz)
16	2,67 (d, $J=10,8$ Hz)	2,65 (dt, $J=1,2$ e 10,8 Hz)
17	- 2,01 (d, $J=15,2$ Hz)	1,63-1,74 (m) 2,02 (dd, $J=3,0$ e 15,0 Hz)
18	1,50-1,80 (m)	1,66-1,89 (m)
19	-	1,29-1,35 (m)
20	-	-
21	3,35 (s)	3,37 (d, $J=1,8$ Hz)
22	-	-

[^a(CDCl₃; 300,06 MHz para ^1H)] [^b(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H)]

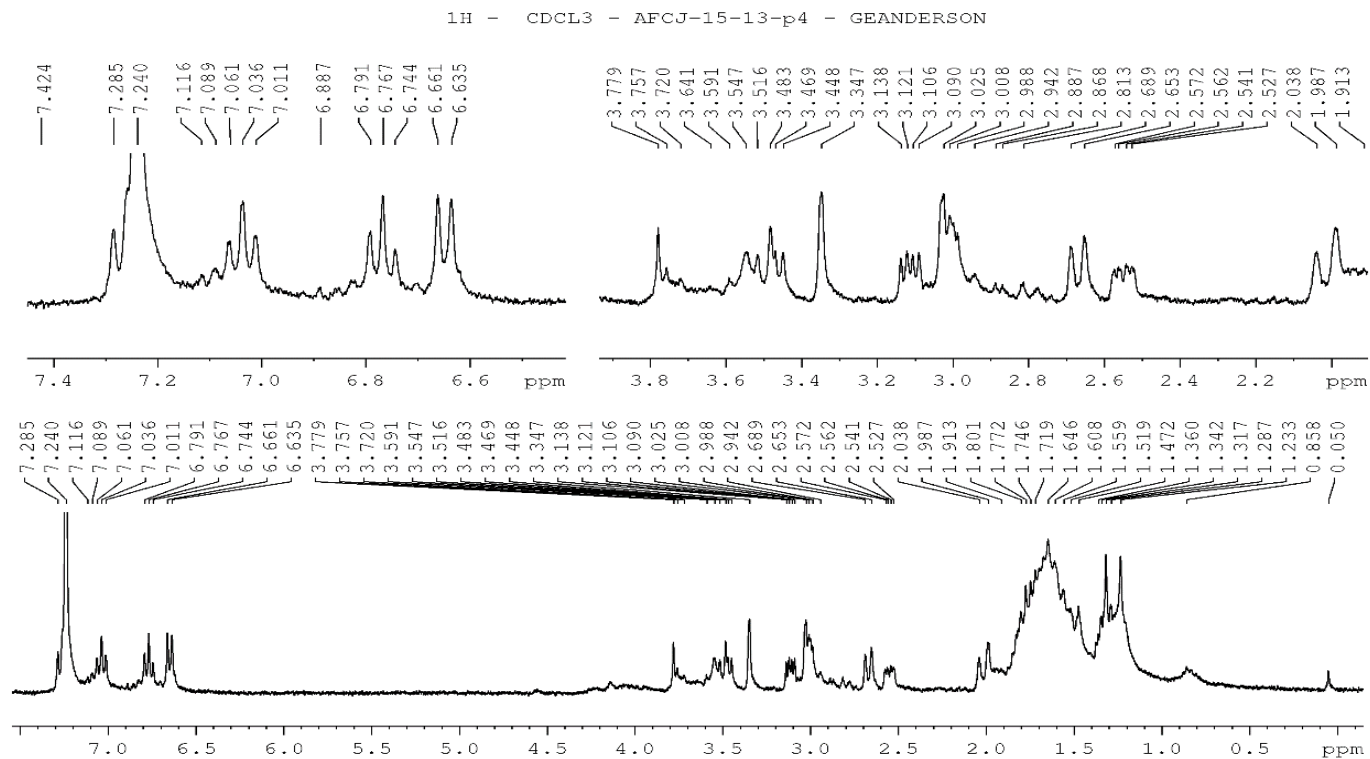


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) de A-9

4.2.3 Substância A-10

A substância **A-10** presente nas frações **AFCJ-28-35**, **AFCJ-32-9/10-9** e **AFCJ-32-9/10-10** apresentou-se como um sólido de cor amarela solúvel em clorofórmio com gotas de metanol, revelando ser um alcaloide através do teste positivo com o reagente de Dragendorff, apresentando uma única mancha alaranjada, sendo encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C /DEPT 135 e CLAE-DAD-EM/EM.

A análise da fração alcaloídica **AFCJ-32-9/10-9** por CLAE-DAD-EM/EM (**Figura 50**) revelou a presença de um pico cujo espectro de massas (EM) (**Figura 51**) mostrou um pico a m/z 323,1761 em 12,7 min, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (Δ -2,1 ppm), valor calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2^+$ (m/z 323,1759). Com base nessa informação e nos dados espectrométricos obtidos, sugere-se que a substância **A-10** dessa forma é o alcaloide indólico monoterpênico copsanona-*N*-óxido (**Figura 49**), corresponde ao íon notado na base de dados (item 3.5) para o alcaloide indólico copsanona-*N*-óxido (**Tabela 48**). Trabalho realizado por Bannwart e colaboradores relata a presença deste alcaloide nas folhas de *A. macrocarpon*, indicando o carbono 22 como uma carbonila (Bannwart, 2012).

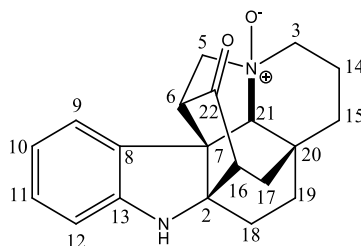


Figura 49. Estrutura química do alcaloide **A-10** (copsanona-*N*-óxido)

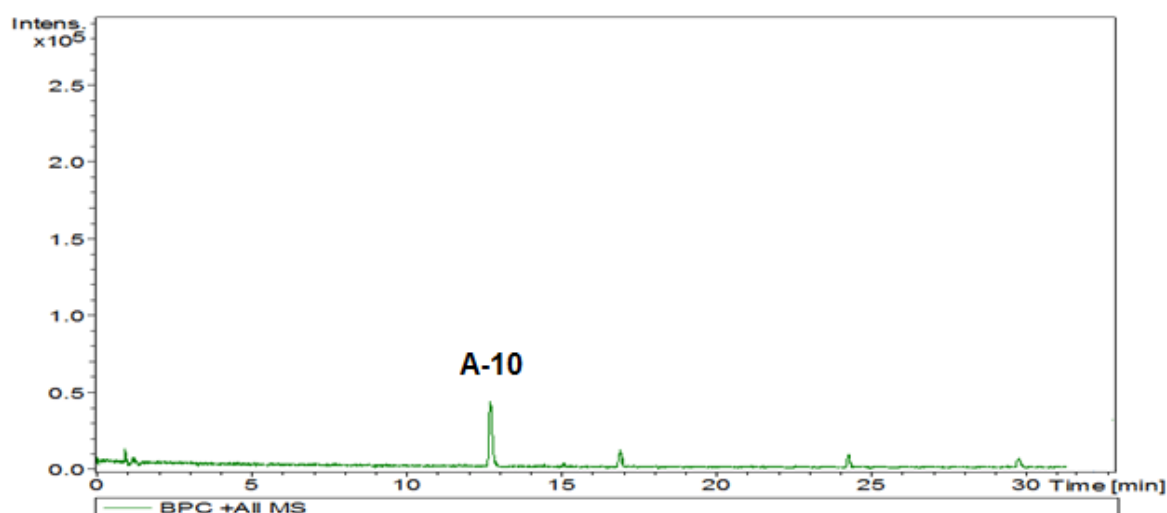


Figura 50. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AFCJ-32-9/10-9** das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

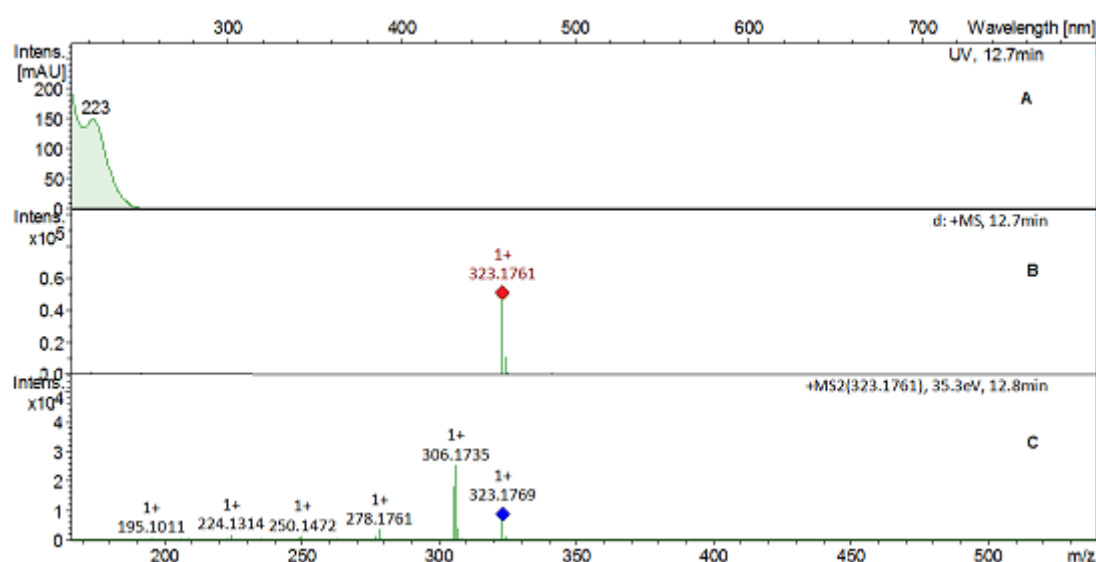


Figura 51. Espectro A: UV de A-10 (copsanona-*N*-óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanona-*N*-óxido. Espectro C: Experimento EM/EM

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 52**) (CDCl_3 com gota de CD_3OD , 300 MHz, δ ppm) apresentou importantes informações para a definição da estrutura de **A-10**. Além de evidenciar a presença de uma substância da classe dos alcaloides indólicos do tipo copsano (Pereira *et al.*, 2007), onde pelos sinais em δ_{H} 8,07 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,61 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), δ_{H} 6,79 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H) e 7,05 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H) referentes aos

hidrogênios (**Figura 52**) correspondentes aos prótons em H-9 e H-12, e, H-10 e H-11 (**Tabela 36**) de um anel aromático *orto*-dissubstituído. Um singlete em δ_H 3,6 atribuído ao H-21 e os valores de deslocamento químico de H-3 (δ_H 3,43) e H-5 (δ_H 3,76) mais desblindados no que se refere aos valores de deslocamento químico dos hidrogênios vizinhos a N-4, indicam a presença de um grupo retirador de elétron, novamente sugerindo tratar-se de um derivado *N*-óxido. Demais correlações e atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática estão descritos na **Tabela 36**.

A presença de um sinal no espectro de RMN de ^{13}C /DEPT (**Figura 52, Figura 53**) em δ_C 214,2 indicou a presença de uma carbonila cetônica não conjugada na estrutura do alcaloide. Sinais de carbonos metilênicos em δ_C 64,6 e 68,4 e de um carbono metínico em δ_C 86,7 atribuídos a C-3, C-5 e C-21, apresentando uma incomum desblindagem, ou seja, valores maiores do que o esperado para os carbonos C-3 (δ_C 64,6 ppm), C-5 (δ_C 68,4 ppm) e C-21 (δ_C 86,7 ppm)) ligados ao nitrogênio N4, indicaram a presença de um grupo retirador de elétrons possivelmente ligado ao nitrogênio. Estes dados corroboram a sugestão de que o alcaloide se trata de um derivado *N*-óxido de **A-9** (**Tabela 36**).

O conjunto de dados espectrais de RMN de 1H e de ^{13}C descritos acima para o alcaloide **A-10** mostraram-se muito semelhantes aos dados apresentados na literatura para o alcaloide indólico copsanona-*N*-óxido (**Figura 49**), anteriormente isolado de um espécime de *Aspidosperma macrocarpon* (Bannwart, 2012) (**Tabela 36**), confirmando assim sua identificação.

Tabela 36. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância **A-10** e comparação com dados de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a copsanona-*N*-óxido descrita na literatura

C/H	δ_{H} (mult., <i>J</i>) ^a A-10	δ_{C} $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ ^a A-10	δ_{C} (C) ^b copsanona- <i>N</i> -óxido (Bannwart, 2012)
2	-	68,6	68,8
3	3,43 (td, <i>J</i> = 2,9; 15,8 Hz)	64,6	64,4
5	3,76 (m)	68,4	68,0
6	2,97 (t, <i>J</i> =8,7; 17,6 Hz)	55,9	55,8
7	-	64,6	64,7
8	-	131,3	131,4
9	8,07 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz)	127,3	127,0
10	6,79 (t, <i>J</i> = 7,41; 15,05 Hz)	120,3	120,0
11	7,05 (t, <i>J</i> = 7,41; 15,05 Hz)	128,7	128,9
12	6,61 (d, <i>J</i> =7,63 Hz)	110,6	110,8
13	-	150,5	151,0
14	1,6-1,9 (m)	20,1	19,8
15	-	31,7	31,5
16	2,75 (d, <i>J</i> = 10,51 Hz)	51,8	51,7
17	1,95 (td, <i>J</i> = 2,9; 15,8 Hz)	32,9	32,6
18	1,80 (m)	23,5	23,1
19	1,5-1,9 (m)	36,8	36,7
20	-	33,7	33,8
21	3,81 (m)	86,7	86,8
22	-	214,2	214,7

[^a(CDCl₃, gota CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CDCl₃, gota de CD₃OD)]
[^b(δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]

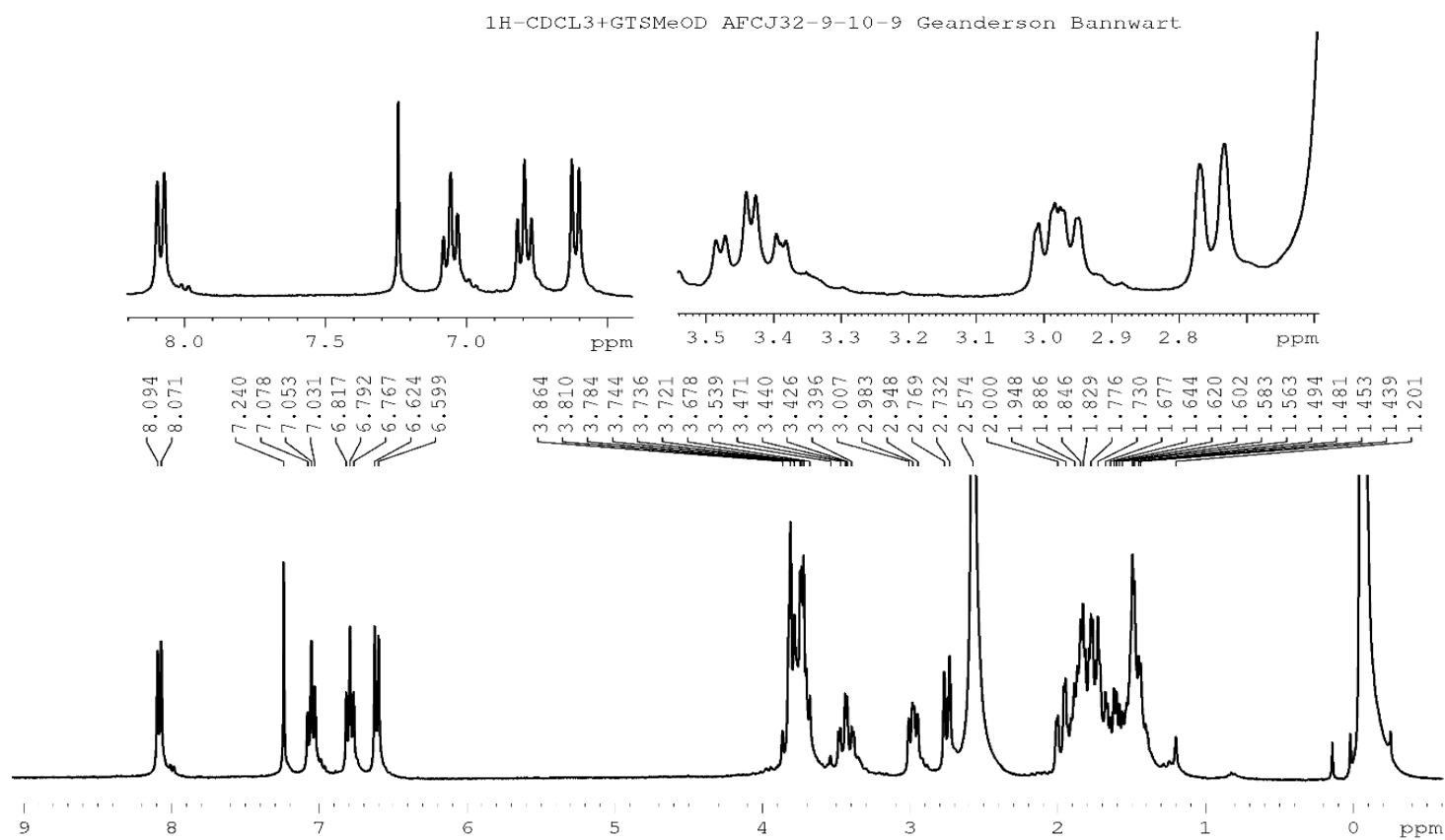


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-10

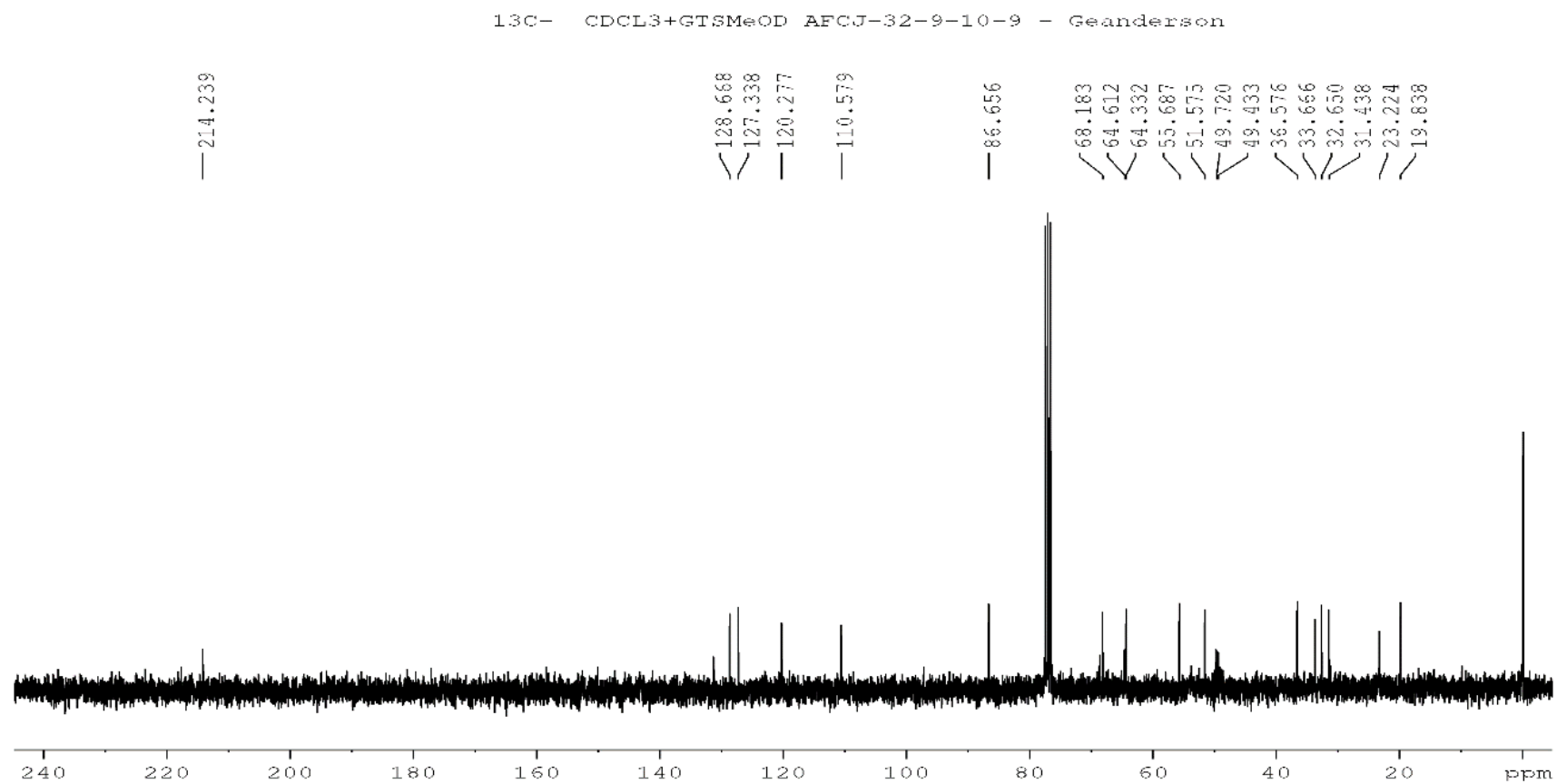


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-10

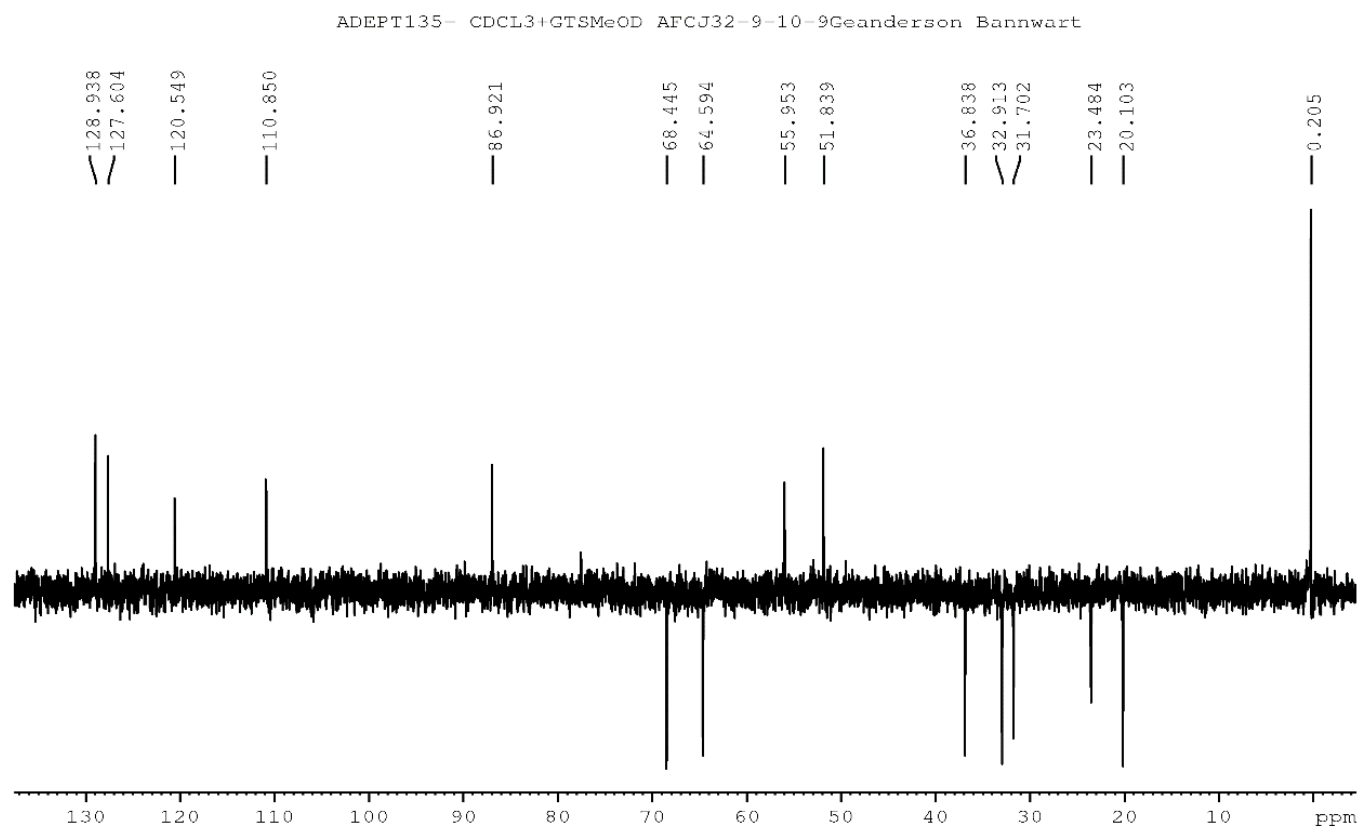


Figura 54. Espectro de RMN de DEPT (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-10

4.2.4 Substância A-11

A substância **A-11** presente nas frações **AFCJ-28-31-9**, **AFCJ-28-32** e **AFCJ-28-34** apresentou-se como um sólido de cor amarela solúvel em clorofórmio com gotas de metanol. Indicando tratar-se de um alcaloide através do teste positivo com o reagente de Dragendorff, apresentando uma única mancha alaranjada, **A-11** foi encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 e CLAE-DAD-EM/EM.

Baseando-se em considerações feitas para as frações **AFCJ-28-31-9**, **AFCJ-28-32** e **AFCJ-28-34**, esta última foi submetida à cromatografia líquida associada à espectrometria de massas revelando a presença de um alcaloide possível (**Figura 54**).

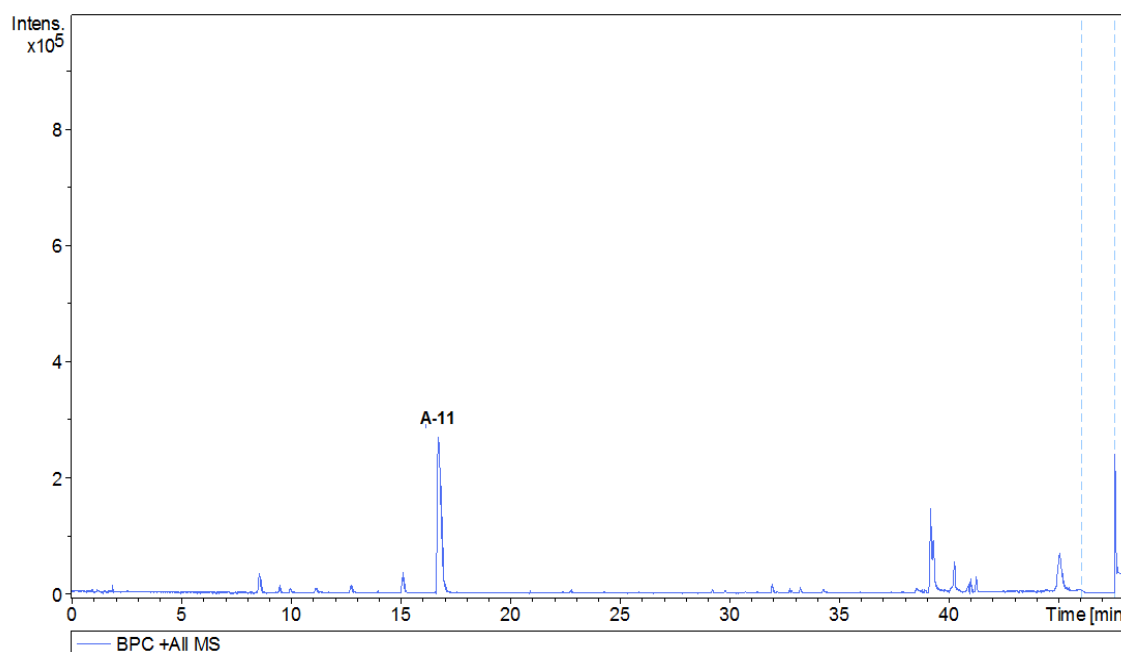


Figura 55. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AFCJ-28-31-9** das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

Os íons observados no perfil de fragmentação da substância **A-11** (**Figura 55**) correspondem aos íons notados na base de dados (item 3.5) para o alcaloide indólico copsinina-*N*-óxido. A análise do espectro de massas de **A-11** revelou a presença do íon protonado a m/z 355,2030 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 56**), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ correspondente à do copsinina-*N*-óxido (Δ -4,0 ppm), valor calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$ (m/z 355,2021). Este composto está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Aspidosperma*, tendo sido relatado anteriormente no espécime *Kopsia dasyrachis*, do gênero *Kopsia* (Kam *et al.*, 1999).

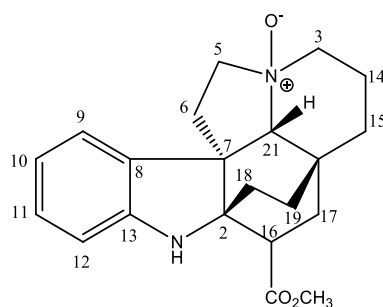


Figura 56. Estrutura química do alcaloide **A-11** (copsinina-*N*-óxido)

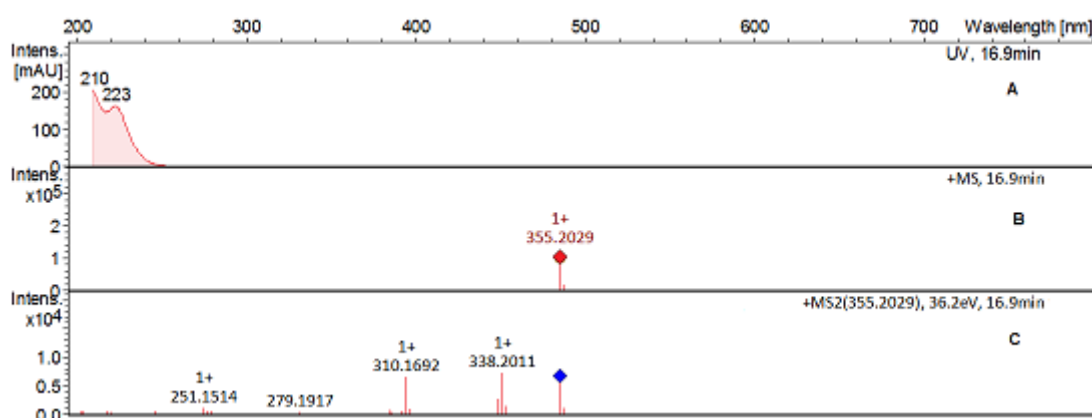


Figura 57. Espectro A: UV de A-11 (copsinina-*N*-óxido). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsinina-*N*-óxido. Espectro C: Experimento EM/EM

Os dados espectrais de RMN de ^1H (**Figura 59**) e de ^{13}C (**Figura 60**) da substância **A-11** evidenciaram que se tratava de um alcaloide indólico com esqueleto do tipo aspido-fractina (Pereira *et al.*, 2007). Os dados espectrais de ^{13}C da substância **A-11** foram comparados com os dados obtidos para as substâncias **A-6** (copsanol-*N*-óxido) (**Figura 23**) e **A-10** (copsanona-*N*-óxido) (**Figura 49**) e mostraram-se semelhantes no que se refere aos valores de deslocamento químico dos carbonos vizinhos ao grupo *N*-óxido, apresentando sinais dos carbonos metilênicos em δ_{C} 64,2 e 64,5 e do carbono metínico em δ_{C} 84,2 no espectro de **A-11**, atribuíveis, respectivamente a C-3, C-5 e C-21 (**Tabela 37**). A desproteção dos carbonos C-3, C-5 e C-21, indicam novamente a presença de um grupo retirador de elétron, esses valores de deslocamento químico sugerem que o alcaloide se trata de um derivado *N*-óxido, porém não apresentou os sinais relativos à carbonila cetônica e ao carbono metínico C-6. No entanto, apresentou um sinal de carbono metilênico em δ_{C} 33,9 e sinais em δ_{C} 174,5 e 52,1 compatíveis com

a presença de um grupo carboximetila (**Figura 59, Tabela 38**). Um singlete em δ_H 3,59 no espectro de RMN de 1H (**Figura 58**) confirmou a presença do grupo metoxila.

Tabela 37. Dados de RMN de ^{13}C para a substância **A-11** e comparação com dados de ^{13}C para o copsanol-*N*-óxido (A-6) e o copsanona-*N*-óxido (A-10)

C/H	δ_c (C) ^a A-11	δ_c (C) copsanol- <i>N</i> -óxido (A-6)	δ_c (C) copsanona- <i>N</i> -óxido (A-10)
3	64,2	64,2	64,4
5	64,5	63,6	68,0
21	84,2	86,9	86,8

O conjunto de dados espectrais de RMN de 1H e de ^{13}C descritos acima para o alcaloide **A-11** mostraram-se muito semelhantes aos dados apresentados na literatura para o alcaloide indólico copsinina descritos anteriormente por Bannwart em 2012 (**Figura 57**) (**Tabela 38**) (Bannwart, 2012).

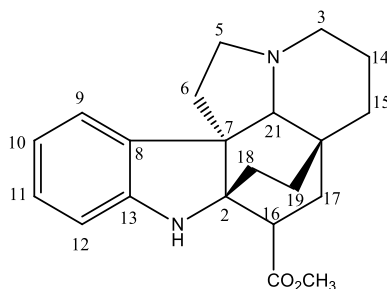


Figura 58. Estrutura química do alcaloide copsinina (Bannwart, 2012)

As principais diferenças observadas são relativas aos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos vizinhos ao nitrogênio N-4, ocorrendo em **A-11** uma desblindagem dos carbonos C-3, C-5 e C-21 e de seus respectivos hidrogênios em função da presença do grupo *N*-óxido (**Tabela 37**). Dessa forma, inferimos a estrutura do alcaloide **A-11** como sendo a do derivado *N*-óxido da copsinina, denominada copsinina-*N*-óxido (**Figura 58**).

Tabela 38. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância **A-11** e comparação com dados de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a copsinina descrita na literatura

C/H	δ_{C} (C) ^a A-11	δ_{H} (mult., J) ^b copsinina (Bannwart, 2012)	δ_{C} (C) ^b copsinina (Bannwart, 2012)
2	65,3	-	66,7
3	64,2	3,05 (m) 3,22 (m)	47,6
5	64,5	3,05 (m) 3,50 (m)	50,7
6	33,9	1,54 (m) 2,84 (ddd, 2,4; 8,7; 14,7 Hz)	36,5
7	58,2	-	57,9
8	136,9	-	140,8
9	124,3	7,26 (dd, J= 0,9; 7,5 Hz)	121,6
10	120,1	6,70 (td, J= 1,2; 7,5 Hz)	119,7
11	127,6	6,95 (td, J= 1,2; 7,8Hz)	126,6
12	110,5	6,64 (d, J=7,5 Hz)	110,8
13	148,5	-	149,0
14	19,3	1,34-1,94 (m)	17,1
15	33,3	1,34- 1,61 (m)	34,8
16	42,8	3,00 (d, J=0,9 Hz)	43,9
17	31,6	1,43 (m) 2,74 (ddd, J= 3,3; 9,3; 14,1 Hz)	31,8
18	31,0	1,36- 1,84 (m)	33,9
19	33,2	1,28- 1,49 (m)	33,9
20	33,3	-	31,2
21	84,2	3,15 (d, J=1,5 Hz)	68,4
22	174,5	-	174,3
O-CH₃	52,1	3,74 (s)	51,9

[^a(δ -ppm, 75,45 MHz, CDCl_3 , gota de CD_3OD)] [^b(δ -ppm, 75,45 MHz, CD_3OD)]

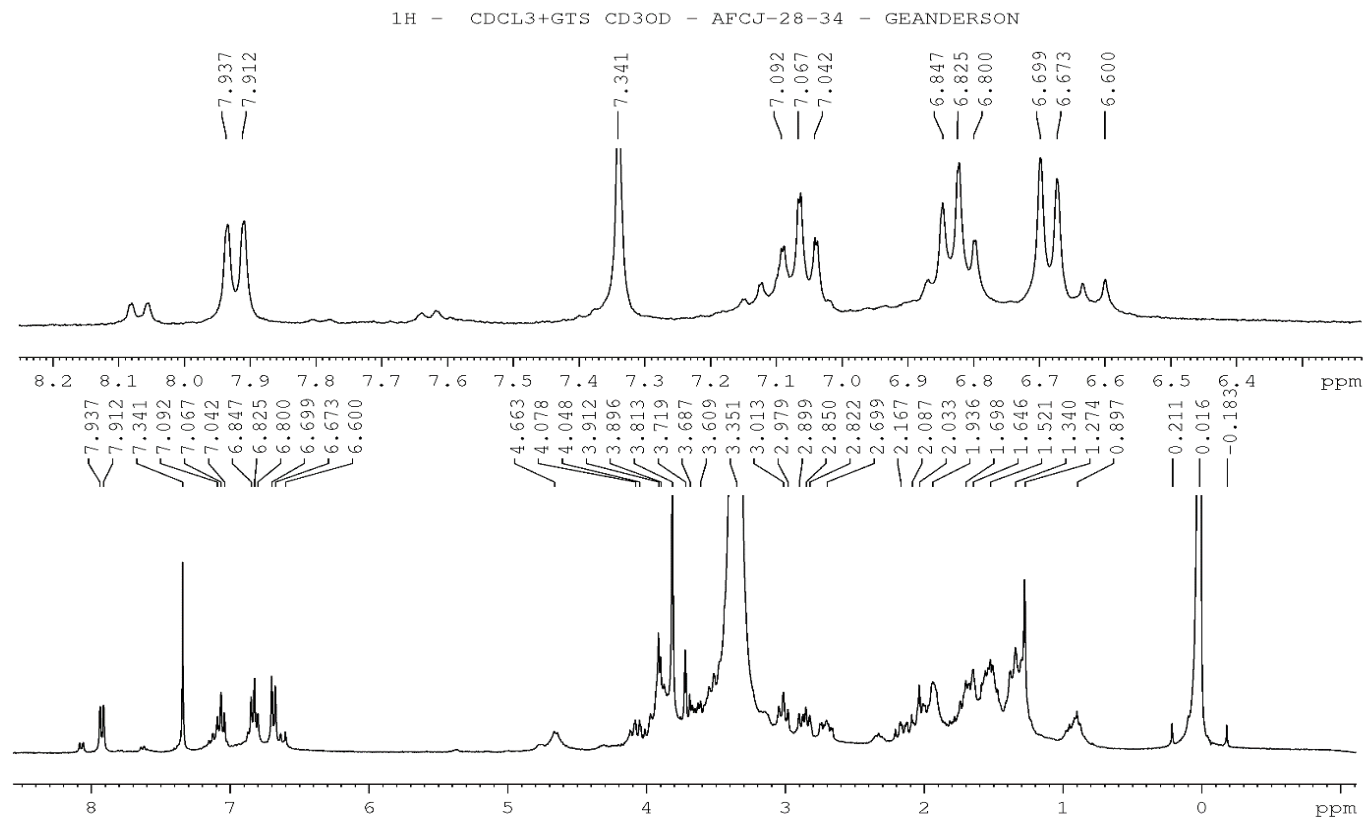


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-11

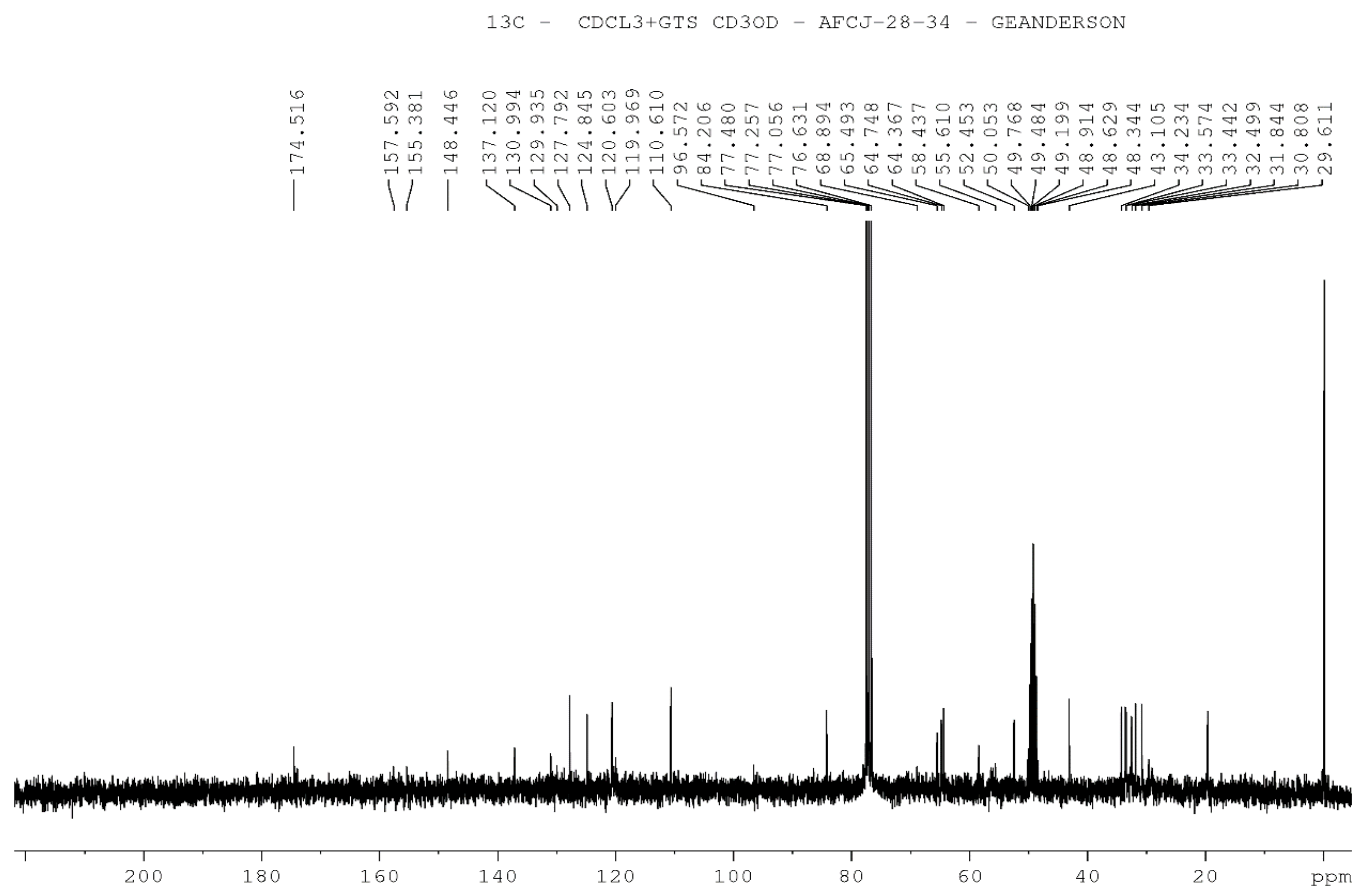


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-11

4.2.5 Substância A-12

A substância **A-12** presente na fração **AFCJ-32-9/10-7** apresentou-se como um sólido de cor amarela solúvel em clorofórmio. Indicando tratar-se de um alcaloide através do teste positivo com o reagente de Dragendorff, apresentando uma única mancha alaranjada, sendo encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e CLAE-DAD-EM/EM.

A identificação do composto 5,22-dioxocopsano por CLAE-DAD-EM/EM baseou-se na determinação das fórmulas moleculares a partir das massas acuradas, sendo que os valores da razão massa/carga (m/z) exibidas pelo íon foi identificada por análises do seu íon protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ e EM e fragmentos EM/EM e posterior comparação com a base de dados (item 3.5). O espectro de massas do composto, apresentou um íon protonado a m/z 321,1599 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 62**), consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2^+$ (Δ -0,4 ppm) nos levou a inferir que o **PICO** com tempo de retenção (Rt) 28,6 min no cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloidica **AFCJ-32-9/10-7** é condizente ao metabólito identificado como 5,22-dioxocopsano (**Figura 61**).

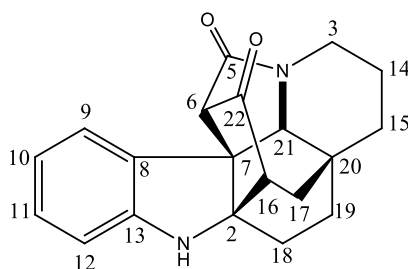


Figura 61. Estrutura química do alcaloide **A-12** (5,22-dioxocopsano)

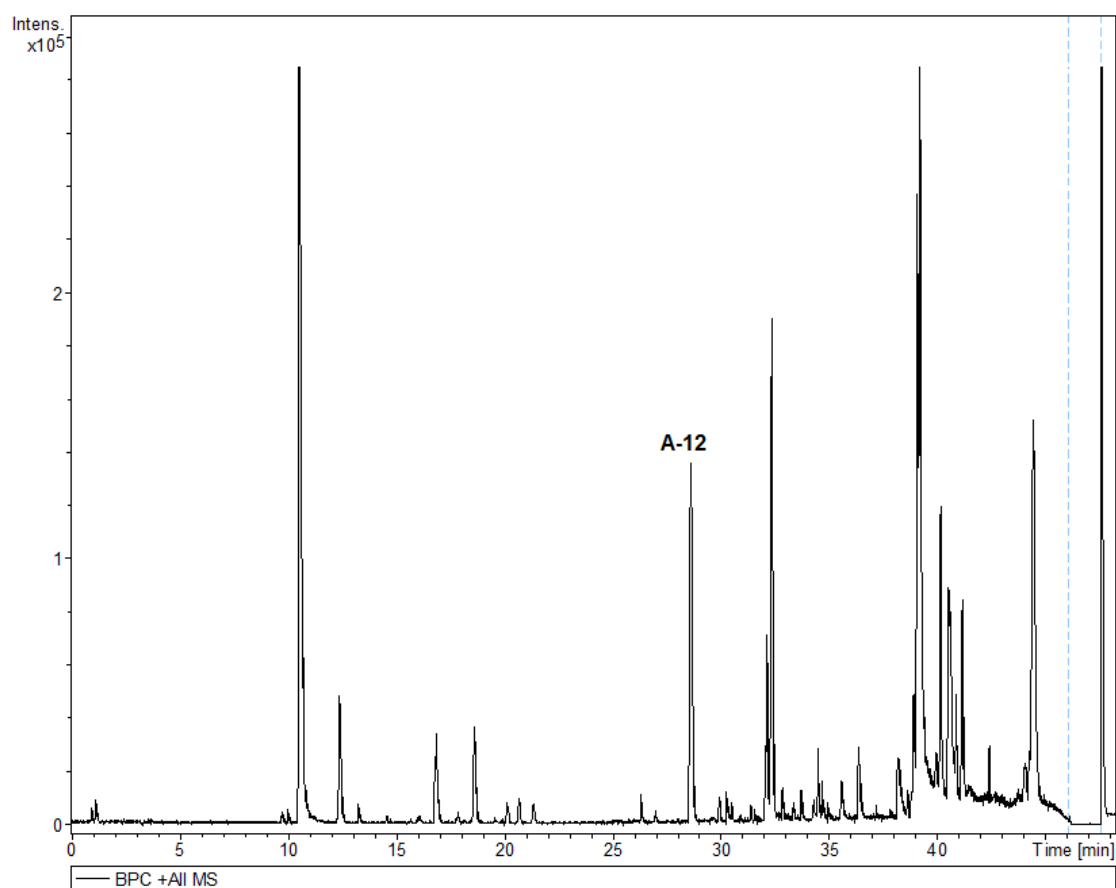


Figura 62. Cromatograma de pico Base (BPC) da fração alcaloídica **AFCJ-32-9/10-7** das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

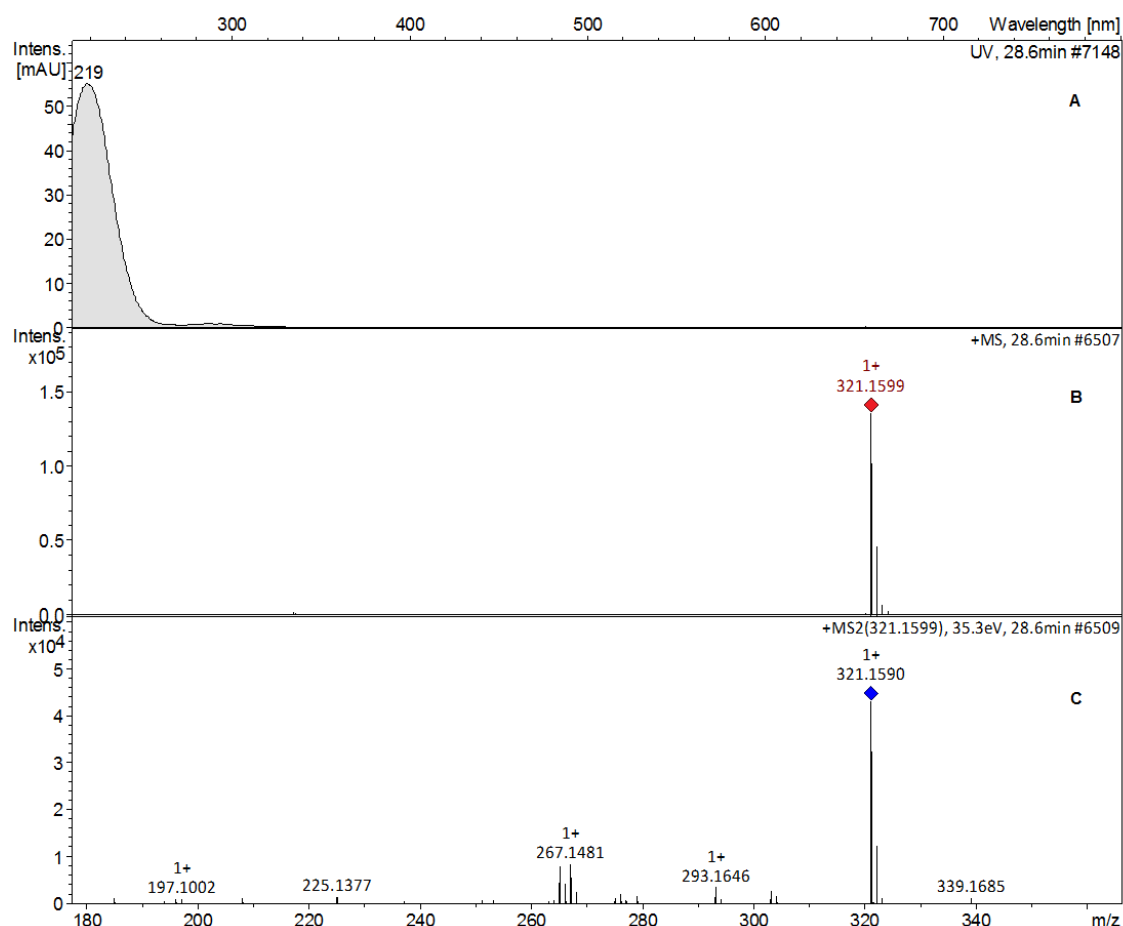


Figura 63. Espectro A: UV de A-12 (5,22-dioxocopsano). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto A-12 (5,22-dioxocopsano). Espectro C: Experimento EM/EM

As análises de RMN ^1H (**Figura 65**) para a subfração **AFCJ-32-9/10-7** evidenciaram além da presença de sinais característicos de um anel aromático *orto*-disubstituído, apresentando quatro sinais de hidrogênios aromáticos, sendo dois dupletos em δ_{H} 7,14 (1H, $J = 7,4$ Hz) e δ_{H} 6,70 (1H, $J = 7,6$ Hz) e dois tripletos de dupletos em δ_{H} 6,80 (1H, $J = 7,4$ e 1,0 Hz) e 7,10 (1H, $J = 7,6$ e 1,2 Hz) atribuíveis a hidrogênios de um anel aromático 1,2-disubstituído, característicos de um núcleo indólico, indicando que o anel A encontra-se sem substituições, correspondentes aos prótons em H-9 e H-12, e, H-10 e H-11, evidenciando novamente a presença de uma substância da classe dos alcaloides indólicos do tipo copsano (Pereira *et al.*, 2007). Estas atribuições foram confirmadas através das correlações heteronucleares a longa distância apresentadas no espectro de HMBC (**Figura 67**) entre C-9 (δ_{C} 122,8)/H-11 (δ_{H} 7,09), C-

10 (δ_c 120,4)/H-12 (δ_H 6,69), C-11 (δ_c 128,9)/H-9 (δ_H 7,14) e C-12 (δ_c 111,7)/H-10 (δ_H 6,79).

A presença de um sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ_c 166,2 indicou a presença de uma lactama e um segundo sinal bastante desprotegido em δ_c 205,9 foi atribuído a presença de uma carbonila cetônica não conjugada na estrutura do alcaloide (**Figura 66, Tabela 39**). A lactama colocada na posição 5, está de acordo com os dados do mapa de contornos HMBC (**Figura 67**), onde se pode observar correlações entre δ_c 166,2 (C-5) com δ_H 4,29 (H-3), 3,72 (H-21) e 2,87 (H-6). Evidencia ainda interligação entre o carbono em δ_c 205,9 (C-22) com os hidrogênios em δ_H 2,87 (H-6) e 2,80 (H-16), tais correlações confirmaram o posicionamento do grupo carbonílico.

O conjunto de dados espectrais de RMN de 1H e de ^{13}C descritos acima para o alcaloide **A-12** mostraram-se muito semelhantes aos dados apresentados na literatura para o alcaloide indólico copsanona (Bannwart, 2012) e copsorinina (**Figura 64**) (Kam & Choo, 2004) (**Tabela 39**).

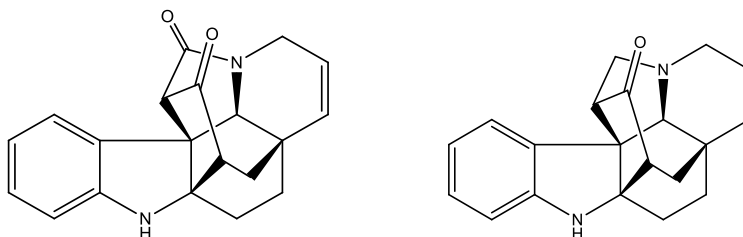


Figura 64. Estrutura química dos alcaloides copsorinina e copsanona

Assim, a estrutura do alcaloide **A-12** foi definida como sendo a do alcaloide indólico 5,22-dioxocopsano (**Figura 61**). Este composto está sendo descrito pela primeira vez na espécie em estudo, tendo sido isolada e identificada por Mariko Kitajima em 2014 a partir de um espécime de *Kopsia jasminiflora* (Kitajima *et al.*, 2014).

Tabela 39. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a substância **A-12** e comparação com dados de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o alcaloide copsanona e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o alcaloide copsorinina descritos na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J) ^a A-12	δ_{C} (C) ^a A-12	δ_{H} (mult., J) ^c copsanona (Bannwart, 2012)	δ_{C} (C) ^c copsanona (Bannwart, 2012)	δ_{C} (C) ^b copsorinina (Kam, 2004)
2	-	69,5	-	70,5	69,2
3	4,23 (dd, $J=13,5$; 5,2 Hz)	40,8	3,02 (m)	47,6	41,8
5	-	166,2	3,1 (dd, $J=5,1$; 9,9 Hz) 3,4 (t, $J=9,9\text{Hz}$)	55,0	167,4
6	2,87 (m)	62,5	2,4 (ddd, $J=1,8$; 5,1; 9,9	58,7	62,1
7	-	56,5	-	64,6	56,1
8	-	131,1	-	134,8	130,6
9	7,14 (d, $J=7,4$ Hz)	122,8	7,3 (d, $J=7,5$ Hz)	123,8	122,6
10	6,79 (td, $J=7,4$; 1,0 Hz)	120,4	6,7 (td, $J=0,9$; 7,5 Hz)	120,2	120,1
11	7,09 (td, $J=7,6$; 1,2 Hz)	128,9	7,0 (td, $J=1,2$; 7,5 Hz)	128,9	128,8
12	6,69 (d, $J=7,6$ Hz)	111,7	6,6 (d, $J=7,5$ Hz)	111,8	111,7
13	-	150,9	-	153,0	150,7
14	1,40-1,50 (m)	19,8	1,3-1,4 (m) 1,8-1,9 (m)	16,2	124,3
15	1,40 (m)	33,7	1,3-1,4 (m) 1,5 (dt, $J=3,0$; 13,5 Hz)	34,7	131,9
16	2,80 (dt, $J=10,6$; 1,4 Hz)	52,5	2,6 (dt, $J=1,2$; 10,8 Hz)	53,5	53,6
17	1,60-1,70 (m)	29,2	1,63-1,74 (m) 2,0 (dd, $J=3,0$; 15,0 Hz)	34,4	33,4
18	1,80 (m)	23,6	1,6-1,9 (m)	24,2	23,4
19	1,40 (m)	33,1	1,3-1,35 (m)	37,4	30,6
20	-	33,5	-	32,1	34,1
21	3,72 (d, $J=1,7$ Hz)	66,0	3,4 (d, $J=1,8$ Hz)	71,6	63,2
22	-	205,9	-	220,2	204,7

[^a(CDCl_3 ; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CDCl_3)] [^b(CD_3OD ; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CD_3OD)] [^c(CDCl_3 ; 400,0 MHz para ^1H); (δ -ppm, 100,0 MHz, CDCl_3)]

AFCJ-32-9-10-7- CDC13 - Geanderson

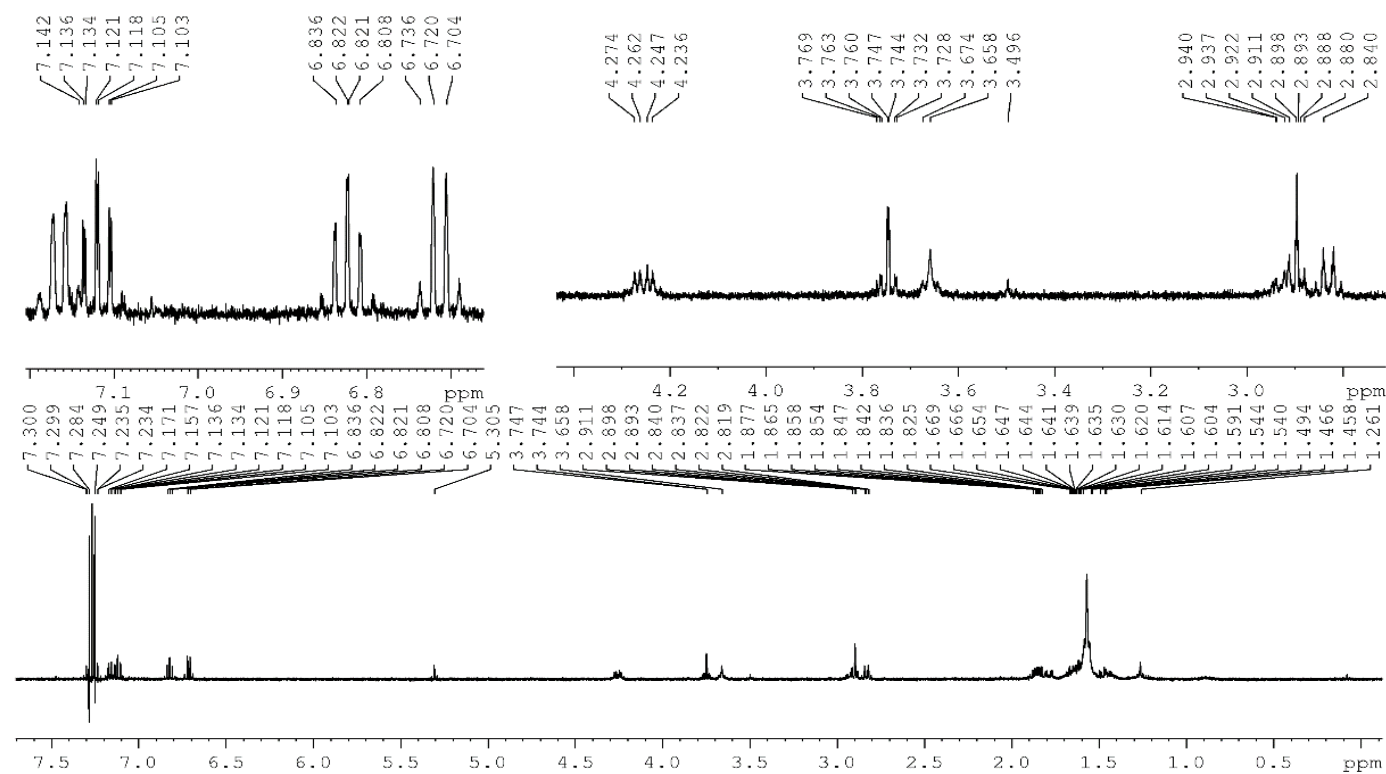


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-12

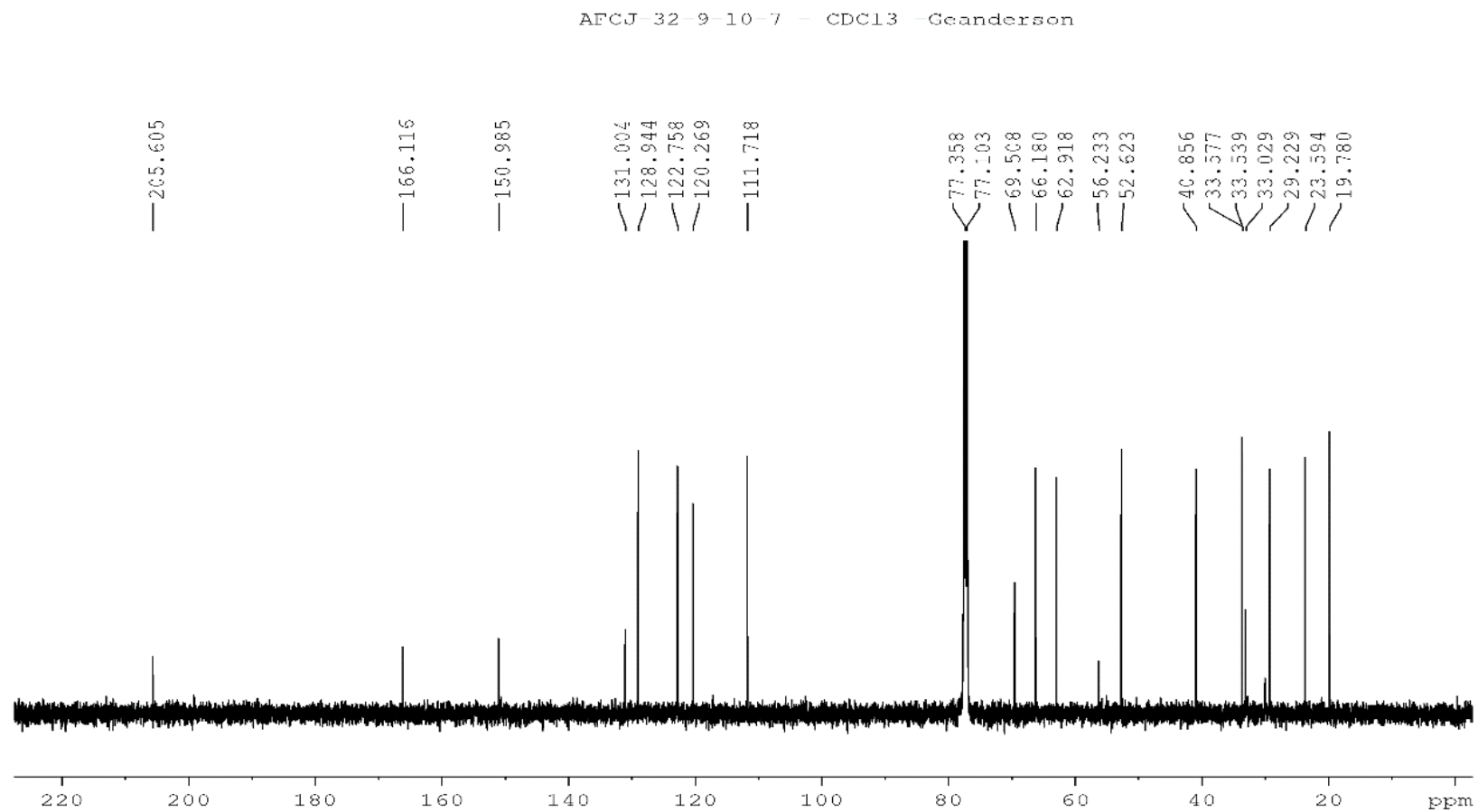


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CDCl_3 , gotas CD_3OD) de A-12

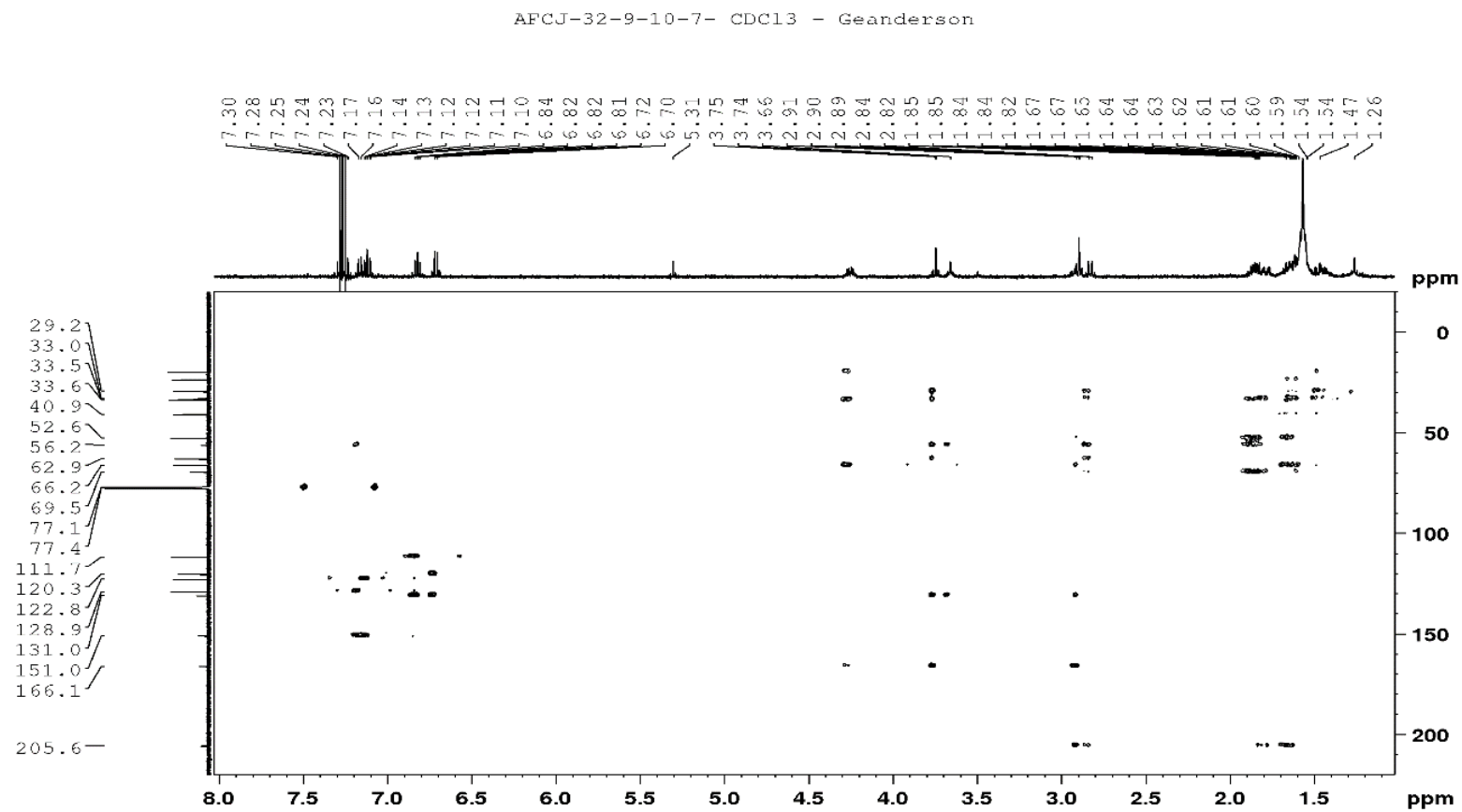


Figura 67. Mapa de contornos HMBC de A-12

4.3 Identificação dos compostos presentes na fase alcaloídica clorofórmica das cascas (AVFACI) por CLAE-DAD-EM/EM

Uma matriz complexa como uma planta possui centenas ou até mesmo milhares de metabólitos secundários, tornando a análise e caracterização dos componentes de um extrato vegetal bruto um processo que exige a aplicação de separações eficientes, aliadas a métodos sensíveis para sua detecção (Wolfender, 2009). Neste sentido, metodologias analíticas eficazes e que acelerem o processo de identificação de substâncias em uma matriz natural complexa são de fundamental importância para sua rápida caracterização. O uso de espectrômetros de massas de alta resolução na aplicação da técnica CLAE-EM permite determinar a fórmula molecular dos componentes dessas misturas (Wolfender, 2009). Além disso, com base na interpretação dos fragmentos presentes nos espectros de massas obtidos pela análise via CLAE-DAD-EM/EM, podem ser obtidas informações complementares sobre a estrutura química dos componentes dos extratos (Wolfender, 2009), sem a necessidade de isolamento. Desta forma, esta técnica tem sido aplicada na desreplicação de amostras complexas.

Assim, no presente estudo, a técnica de CLAE-DAD-EM/EM foi aplicada às fases alcaloídicas das cascas e das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*, com a finalidade de identificar outros constituintes químicos presentes nesta espécie, além daqueles que foram isolados e descritos nos itens 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5.

A detecção por CLAE-DAD-EM/EM dos componentes da fase alcaloídica das cascas de *A. verbascifolium* (AVFACI) foi assistida por métodos de deconvolução de íons, como o algoritmo dissect disponível no software **Bruker DataAnalysis**. O cromatograma obtido apresentou um grande número de picos, especialmente na região de tR 5-35 min, com boa resolução cromatográfica (**Figura 68**). O experimento foi realizado no modo de ionização positivo, método mais sensível para a detecção das substâncias de interesse (alcaloides) por CLAE-DAD-EM/EM.

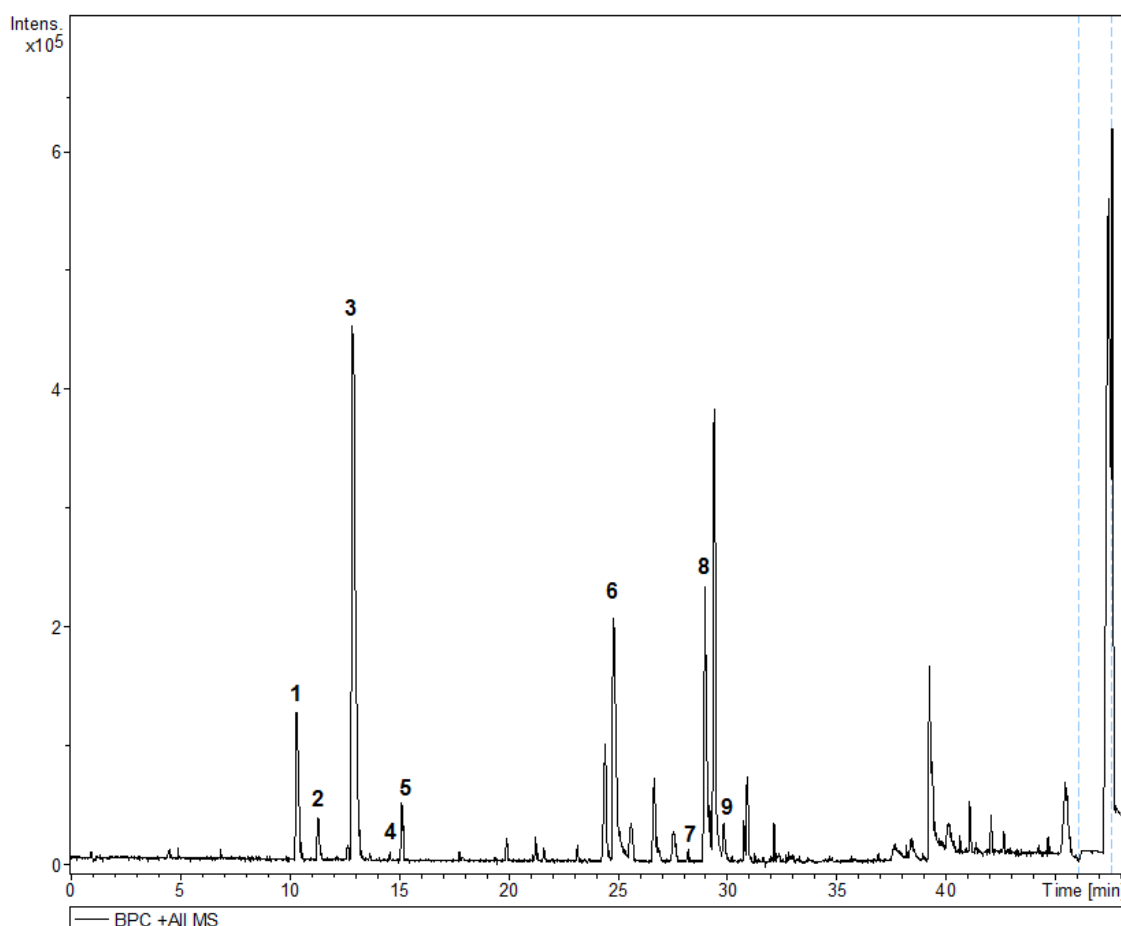


Figura 68. Cromatograma de pico Base (BPC) da fase alcaloídica AVFACI das cascas de *Aspidosperma verbascifolium*

Para a identificação dos picos cromatográficos obtidos por CLAE-DAD-EM/EM, as fórmulas moleculares dos íons foram determinadas a partir dos dados dos espectros de massas de alta resolução para cada pico e os metabólitos secundários de interesse foram listados. Em seguida, a partir da comparação com fórmulas moleculares listadas em uma base de dados construída em função dos compostos previamente descritos para a família Apocynaceae, foi possível realizar a detecção dos metabólitos já conhecidos, sem a necessidade de seu isolamento. Foram consideradas as fórmulas do íon protonado e íons-produto cuja diferença da massa observada e calculada (teórica) não ultrapassasse um erro (Δ) de 10 ppm. Os picos dos íons de interesse foram manualmente selecionados primeiramente de acordo com suas respectivas intensidades.

A literatura relata um estudo sobre mecanismos de fragmentação via espectrometria de massas sequencial (ESI/EM/EM) de alcalóides indólicos de *Aspidosperma* com esqueleto tipo plumerano (Aguiar *et al.*, 2010), porém não foram

encontrados trabalhos sobre fragmentações de alcaloides com esqueletos do tipo copsano e aspidofractina, como os obtidos de *A. verbascifolium*, por ESI-EM/EM. Assim, as propostas de fragmentação descritas para os alcalóides identificados nesta espécie no presente trabalho foram baseadas nas principais classes de reações de fragmentação que ocorrem por ESI-EM/EM (fragmentações com retenção de carga e com migração de carga) (Demarque *et al.*, 2016; Aguiar *et al.*, 2010). Embora diferenças na estereoquímica de diastereoisômeros não possam ser evidenciadas por EM, no caso dos alcaloides que apresentaram fórmulas moleculares idênticas, mesmo padrão de fragmentação e funcionalização em C-22, porém detectados em tempos de retenção diferentes, foi proposto que a diferença na estereoquímica residia neste carbono. Desta forma, através das análises por CLAE-DAD-EM/EM foi possível detectar a presença de seis alcaloides e três flavonoides na fase alcaloídica AVFAC1 das cascas de *A. verbascifolium*.

Os dados obtidos a partir das análises por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-DAD-ESI-EM/EM) foram divididos em grupos, de acordo com a classe dos compostos identificados e seus respectivos tipos de esqueleto.

O primeiro grupo compreende alcaloides indólicos com esqueleto do tipo copsano (Pereira *et al.*, 2007), sendo identificados por análise dos seus íons protonados $[M+H]^+$, fragmentos EM/EM e posterior comparação com a base de dados (item 3.5).

Os espectros de massas dos compostos correspondentes aos picos **2** (Rt 11,4 min) e **3** (13,0 min) (**Figura 68**) apresentaram picos a m/z 309,1958 $[M+H]^+$ e 309,1976 $[M+H]^+$, respectivamente, consistentes com a fórmula molecular $C_{20}H_{24}N_2O$ (**Figura 69; Figura 70; Tabela 40**). Os fragmentos EM/EM gerados em ambos os casos são os mesmos e também correspondentes aos obtidos no espectro EM/EM da substância **A-5** isolada das cascas (item 4.1.4, o que permitiu a identificação destes alcaloides como sendo os diastereoisômeros copsanol (pico 2, substância **A-5**) e 22-epicopsanol (pico 3) (**Figura 68**). A identificação deste último foi baseada também no fato deste alcalóide já ter sido isolado de espécies de *Aspidosperma*. No **Esquema 2** é proposto o mecanismo de formação dos íons a m/z 291, 253 e 210.

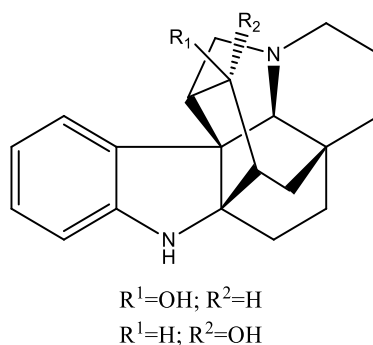


Figura 69. Compostos identificados da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Picos 2 e 3.

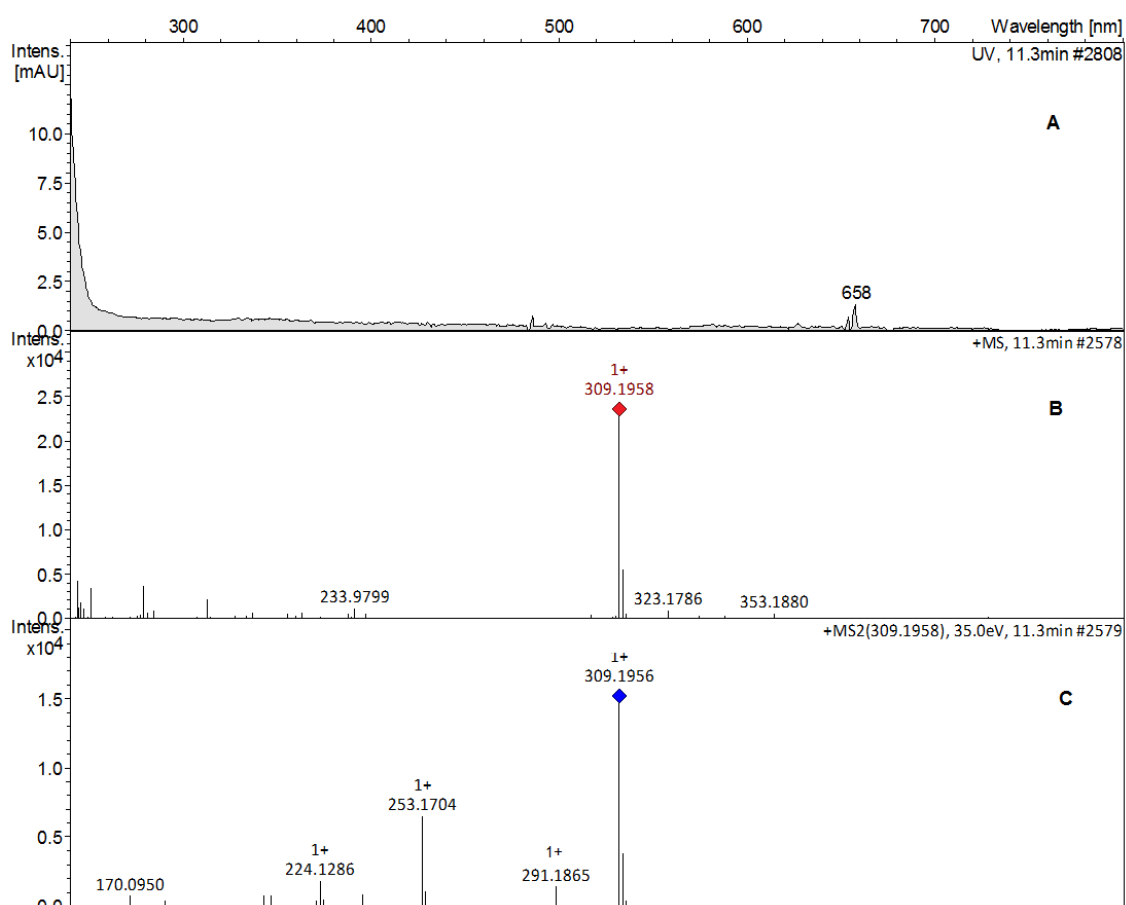


Figura 70. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanol (Pico 2). Espectro C: Experimento EM/EM

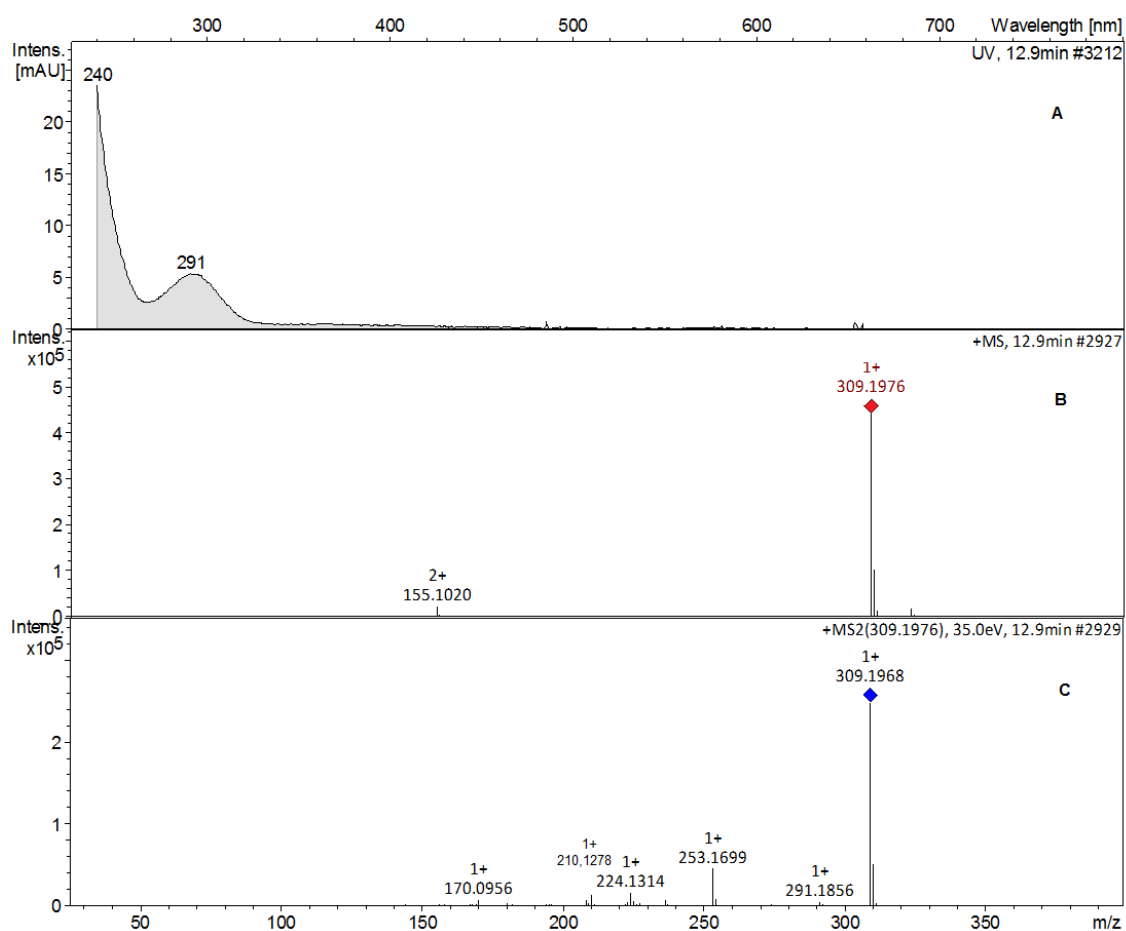
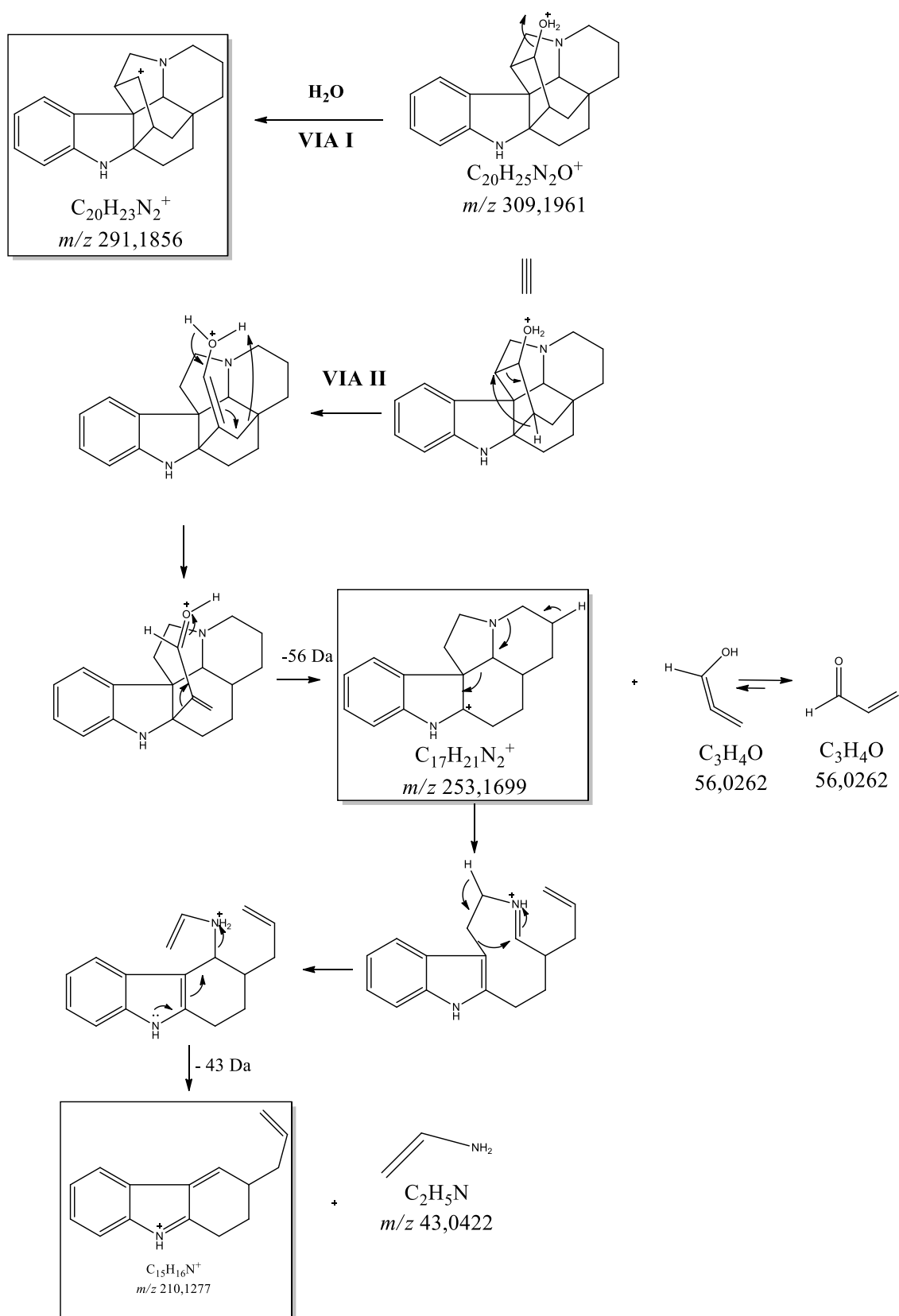


Figura 71. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto 22-epicopsanol (Pico 3). Espectro C: Experimento EM/EM



Esquema 2. Proposta da via mecanística de fragmentação do copsanol (m/z 309) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 40. Alcaloides identificados da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Picos 2 e 3

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
2	11,4	309,1952	3,0	Copsanol	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	291; 253; 210; 170
3	13,0	309,1973	-3,9	22-epicopsanol	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	291; 253; 210; 170

O íon [M+H]⁺ referente ao pico 5, a *m/z* 325,1910 foi indicativo da fórmula molecular C₂₀H₂₅N₂O₂ (Δ 0,1 ppm). Ao ser comparado seu perfil EM/EM (**Tabela 41**) com aquele apresentado pelo alcaloide indólico copsanol-*N*-óxido (substância **A-6**, item 4.1.5) foram observados os mesmos fragmentos, sugerindo assim a presença deste composto em 15,2 min no cromatograma de pico base da fase alcaloídica das cascas (**Figura 37**). De maneira semelhante ao espectro EM/EM do copsanol, observa-se no espectro do copsanol-*N*-óxido (**Figura 22**) a perda de H₂O e de 56 Da., originando os íons a *m/z* 307 e 269, respectivamente. No entanto, diferentemente do espectro EM/EM do copsanol, no espectro do copsanol-*N*-óxido ocorre a perda de 17 Da, gerando o íon a *m/z* 290, compatível com a eliminação de hidroxila radicalar. A perda deste radical foi também observada nos outros alcalóides *N*-óxidos identificados no presente trabalho e discutidos a seguir. No **Esquema 3** é apresentada a proposta de fragmentação para o copsanol-*N*-óxido.

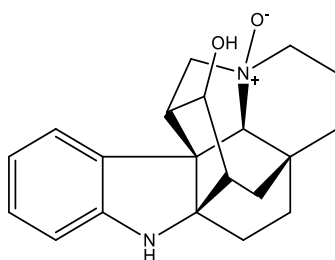
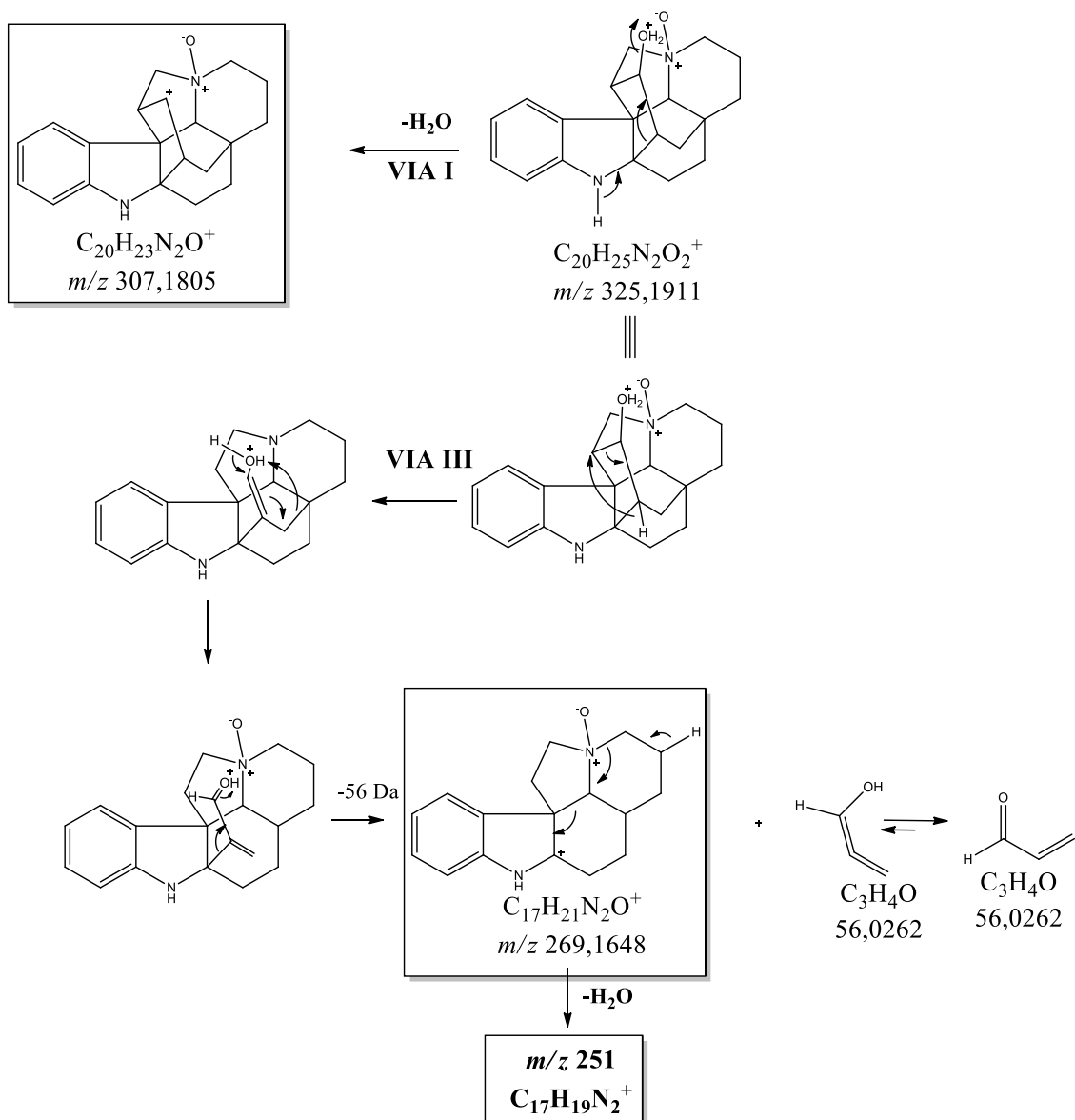


Figura 72. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Pico 5.



Esquema 3. Proposta da via mecanística de fragmentação do copsanol-*N*-óxido (m/z 325) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 41. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 5.

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
5	15,2	325,1910	0,1	Copsanol-<i>N</i>-óxido	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	309; 308; 307; 269; 251; 224; 207

O composto que originou o pico 7 (28,2 min, **Figura 68**) apresentou um íon [M+H]⁺ a *m/z* 323,1742, consistente com a fórmula C₂₀H₂₃N₂O₂. Os íons-produto observados no espectro de massas sequencial (**Figura 74 e Tabela 42**) foram os mesmos gerados no espectro obtido para o alcaloide **A-7** (5-oxocopsanol, item 4.1.6) (**Figura 29**). A presença da hidroxila neste composto, assim como nos compostos **A-5** e **A-6**, leva à formação do íon a *m/z* 305, devido à eliminação de H₂O. Para o íon a *m/z* 277, é proposta a perda de CO a partir de *m/z* 305, devido à presença de uma carbonila no esqueleto de **A-7**. Estas propostas de fragmentação são mostradas no **Esquema 4**.

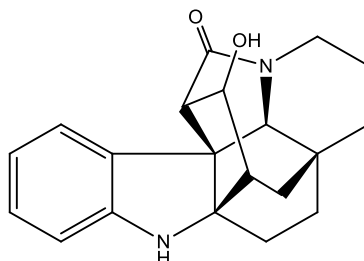


Figura 73. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Pico 7.

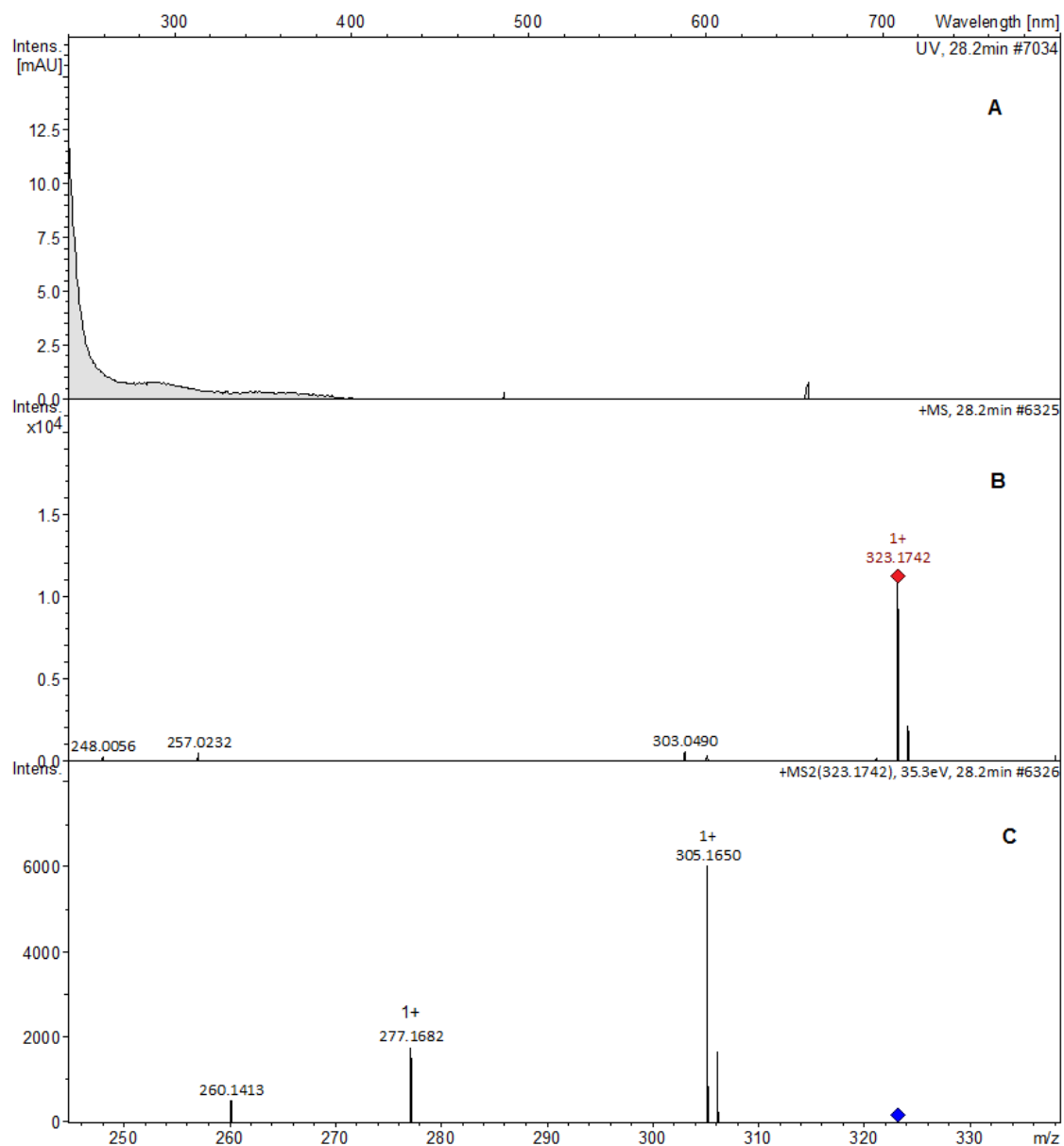
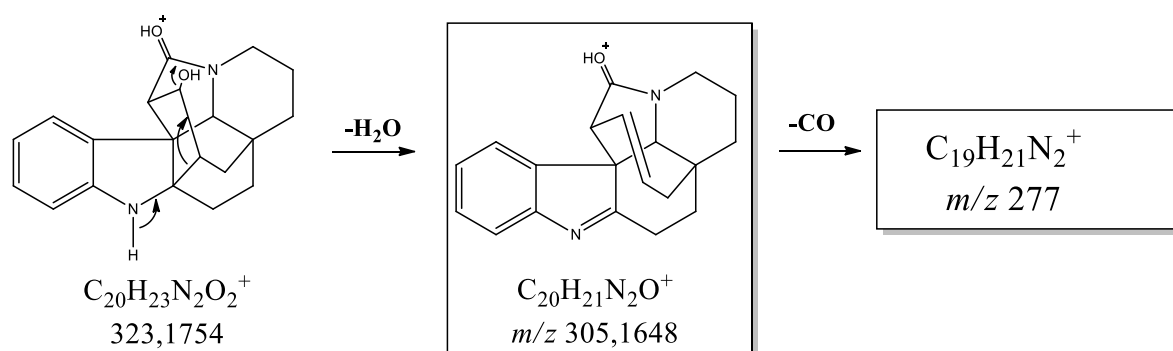


Figura 74. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto 5-oxocopsanol (Pico 7). Espectro C: Experimento EM/EM



Esquema 4. Proposta da via mecanística de fragmentação do 5-oxocopsanol (m/z 323) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 42. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 7.

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
7	28,2	323,1742	3,9	5-oxo-copsanol	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	305; 277

O pico 1 (**Figura 68**), com Rt 10,4 min, foi identificado como sendo relativo à copsanona (**Figura 75**). Os íons-produto presentes no espectro de massas sequencial (**Figura 76**) foram os mesmos observados no espectro do alcaloide **A-9** isolados das folhas (item 4.2.2). Embora sua estrutura contenha um grupo carbonila, não foi observado no espectro EM/EM um íon a m/z 279, correspondente à perda de CO. Para a formação dos íons a m/z 224 e 197 foi proposta a eliminação de C₅H₇O, respectivamente (**Tabela 43**).

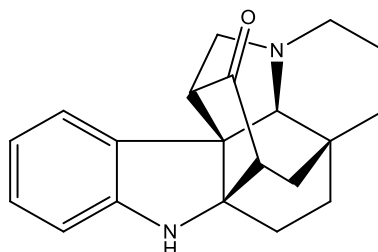


Figura 75. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Pico 1.

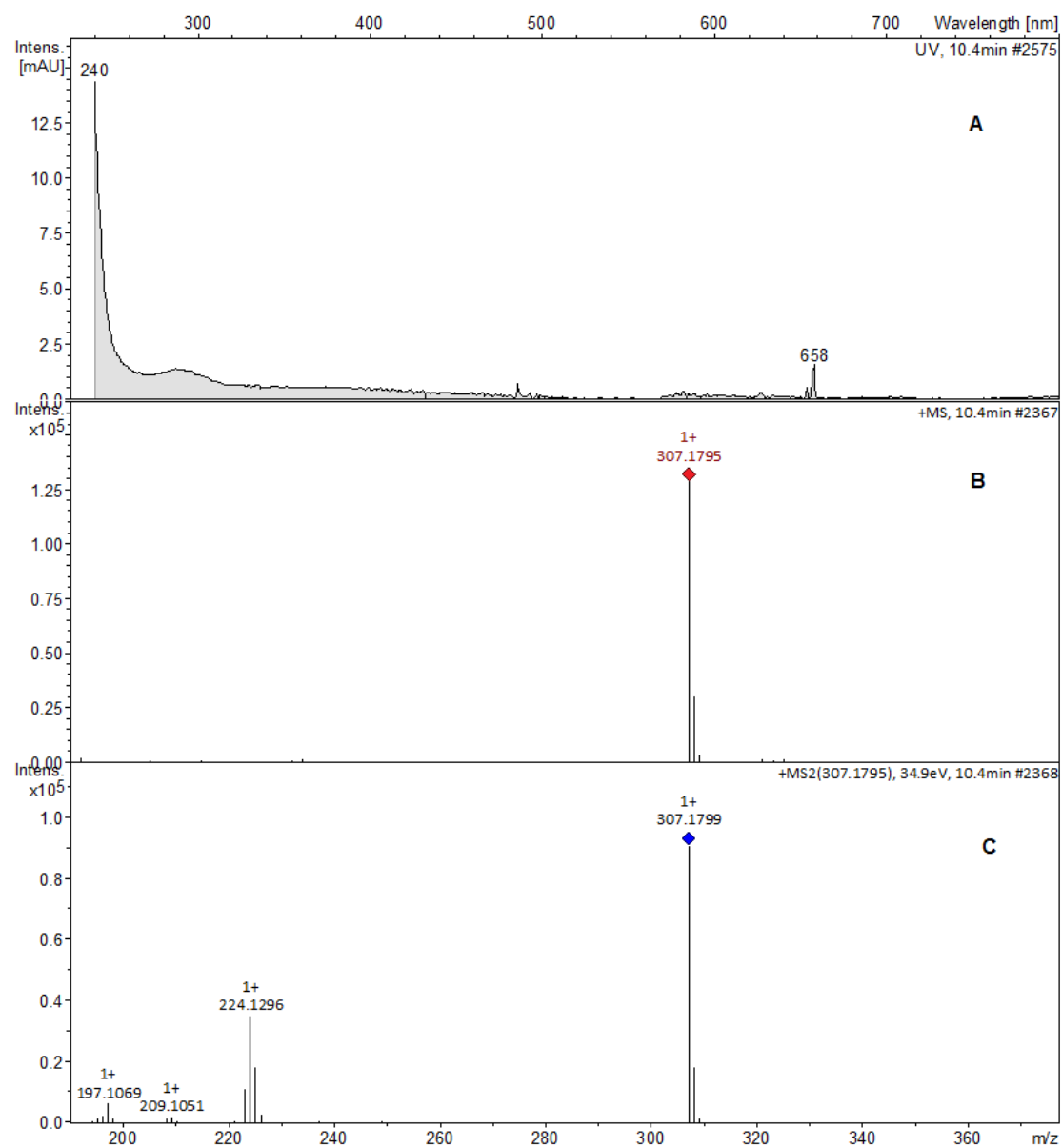


Figura 76. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsanona (Pico 1). Espectro C: Experimento EM/EM

Tabela 43. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 1.

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
1	10,4	307,1795	3,3	Copsanona	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	279; 224; 197

O composto relativo ao pico **4**, eluído em 14,6 min (**Figura 68**), foi caracterizado como pertencente ao segundo grupo de alcaloides identificados no presente trabalho, possuindo o esqueleto do tipo aspidofractina. O íon [M+H]⁺ observado a *m/z* 367,2013 no espectro de massas (**Figura 78**) foi compatível com a fórmula C₂₂H₂₇N₂O₃. De acordo com as informações presentes na base de dados (item 3.5), a fórmula obtida, em conjunto com seu espectro EM/EM (**Figura 78; Tabela 44**) sugeriram que o composto se tratava do alcaloide indólico aspidofractina (**Figura 77**). O íon-produto observado a *m/z* 307 é compatível com a eliminação de HCO₂CH₃ (**Esquema 5**). Este alcaloide foi previamente isolado por Gilbert e colaboradores de um espécime de *A. populifolium* (Gilbert *et al.*, 1965) e, portanto, sua ocorrência em *A. verbascifolium* está sendo descrita pela primeira vez.

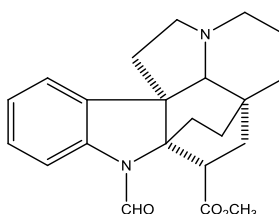


Figura 77. Composto identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 2** – Esqueleto do tipo aspidofractina

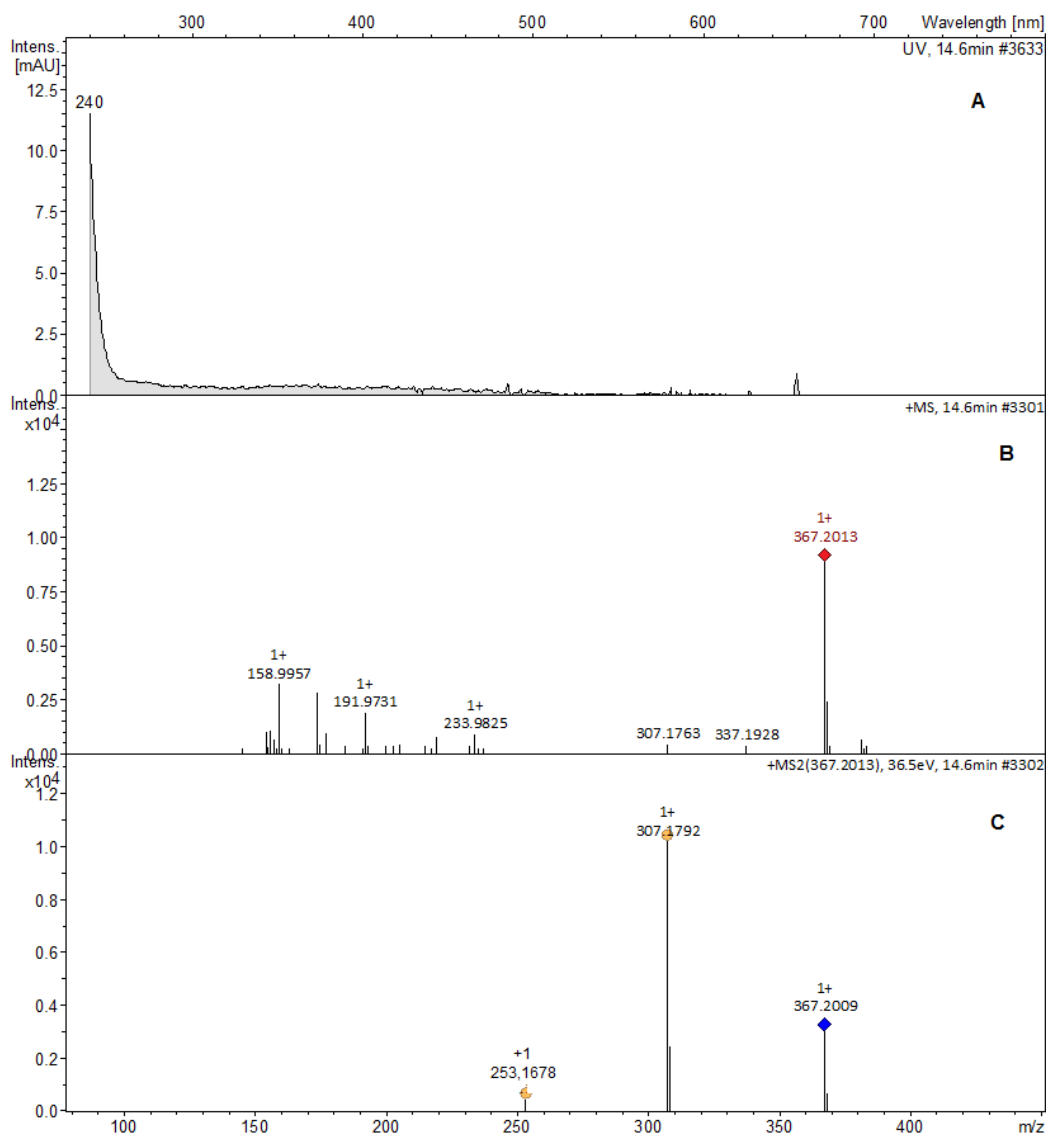
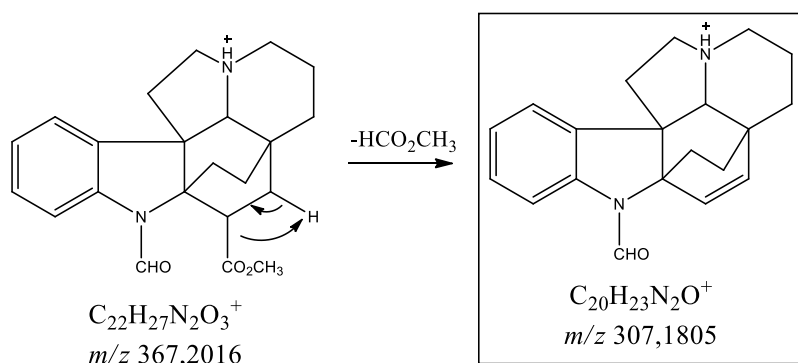


Figura 78. A: Espectro UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto aspidofractina (Pico 4). Espectro C: Experimento EM/EM



Esquema 5. Proposta da via mecanística de fragmentação da aspidofractina (m/z 367) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 44. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloide com esqueleto do tipo aspidofractina

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
4	14,6	367,2013	0,8	Aspidofractina	C ₂₂ H ₂₇ N ₂ O ₃	307; 253

Os compostos pertencentes ao terceiro grupo compreendem compostos da classe dos flavonoides, que são um dos mais característicos grupos de metabólitos presentes em plantas, podendo ser encontrados na forma livre ou na forma de glicoconjugados, ligados via substituintes hidroxila (O-glicosídeos) ou ainda ligados diretamente ao carbono (C-glicosídeos). Em Apocynaceae os flavonoides têm sido encontrados com menor frequência (Carvalho, 2001).

A identificação dos compostos pertinentes ao terceiro grupo baseou-se na determinação das fórmulas moleculares a partir das massas acuradas, sendo que os valores da razão massa/carga (*m/z*) exibidas pelos íons do grupo seis foram identificados por análises dos seus íons protonados [M+H]⁺ e fragmentos EM/EM e posterior comparação com a base de dados (item 3.5). Os espectros de massas dos compostos que originaram os picos **6** e **8** mostraram íons a *m/z* 303,0490 [M+H]⁺ e 287,0551 [M+H]⁺, consistentes com as fórmulas moleculares C₁₅H₁₁O₇⁺ (**6**, Rt 24,8 min, Δ 3,0 ppm) e C₁₅H₁₁O₆⁺ (**8**, Rt 29,0 min, Δ -0,5 ppm), respectivamente (**Figuras 80 e 81**). Uma vez que os flavonoides quercetina (C₁₅H₁₀O₇) e kaempferol (C₁₅H₁₀O₆) foram isolados da fase alcaloídica clorofórmica das cascas (itens 4.1.2 - substância **A-3** e 4.1.3 - substância **A-4**), os compostos relativos aos picos 6 e 8 foram identificados, respectivamente, como sendo estes flavonoides (**Figura 79**). A identificação foi confirmada pelo padrão de fragmentação EM/EM apresentado pelas substâncias (**Esquemas 6 e 7**), que se mostrou condizente com o relatado na literatura para quercetina e kaempferol (Ma *et al.*; 1997; March & Miao, 2004; Rijke *et al.*, 2006). Os valores de absorbância obtidos nos respectivos espectros de UV (255 e 369 nm; 265 e 368 nm) (**Figuras 80 e 81**) também são compatíveis com os descritos na literatura para estes flavonoides (Mabry *et al.*, 1970).

No que se refere à fragmentação de flavonoides no modo de ionização positivo, uma das vias de fragmentação mais importantes é a reação de Retro-Diels-Alder (RDA) (**Esquemas 6 e 7**). A análise dos íons gerados pela fragmentação do anel C fornece informações sobre o tipo de esqueleto desta classe de compostos, como também sobre os substituintes ligados aos anéis (March e Miao, 2004; Rijke *et al.*, 2006; Demarque *et al.*, 2016). Assim, o íon a m/z 153 ($C_7H_5O_4$)⁺ observado em ambos os espectros de massas (**Figuras 80 e 81**) foi compatível com o anel A 5,7-di-hidroxilados presentes na quercetina e no kaempferol. Outras fragmentações típicas desta classe de flavonoides são a perda de H₂O, CO (uma e duas unidades), perda sucessiva de H₂O e CO (uma ou duas unidades), além da fragmentação que origina o íon a m/z 165 contendo o anel A intacto e a resultante da eliminação de CHO (**Esquemas 6 e 7**) (March e Miao, 2004; Rijke *et al.*, 2006). Os principais íons-produtos resultantes da fragmentação dos íons precursores protonados da quercetina e do kaempferol são apresentados na **Tabela 45** e **tabela 46**. Na tabela estão tabuladas as fórmulas, massas observadas, massas calculadas e erros de massa para os íons observados nos espectros de massas destes flavonoides.

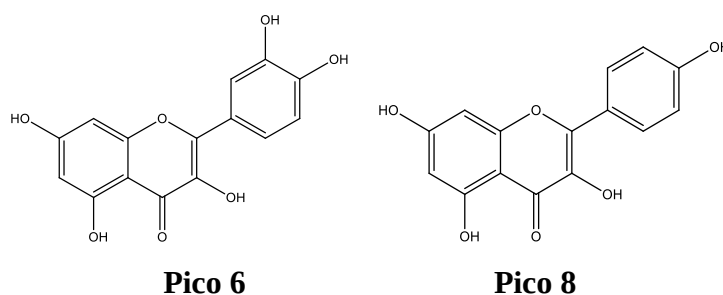


Figura 79. Flavonoides identificados na fase alcaloídica das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI– EM/EM. Grupo 6 – Flavonoides, Esqueleto do tipo-flavonol

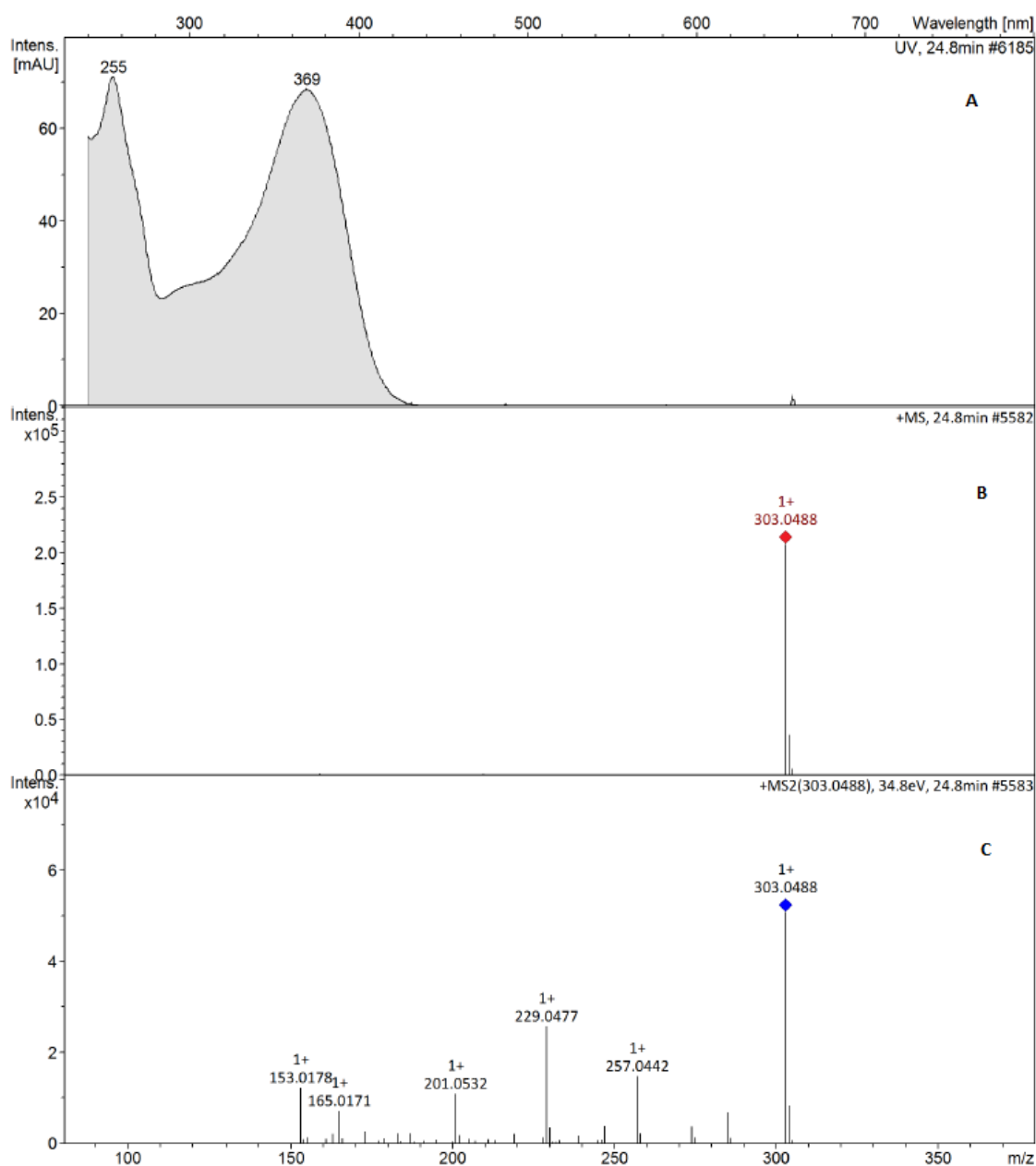


Figura 80. A: Espectro UV da substância eluída em 24,8 minutos (Pico 6 - Quercetina). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução obtido via ionização por electrospray no modo positivo correspondente ao composto quercetina. Espectro C: Experimento EM/EM

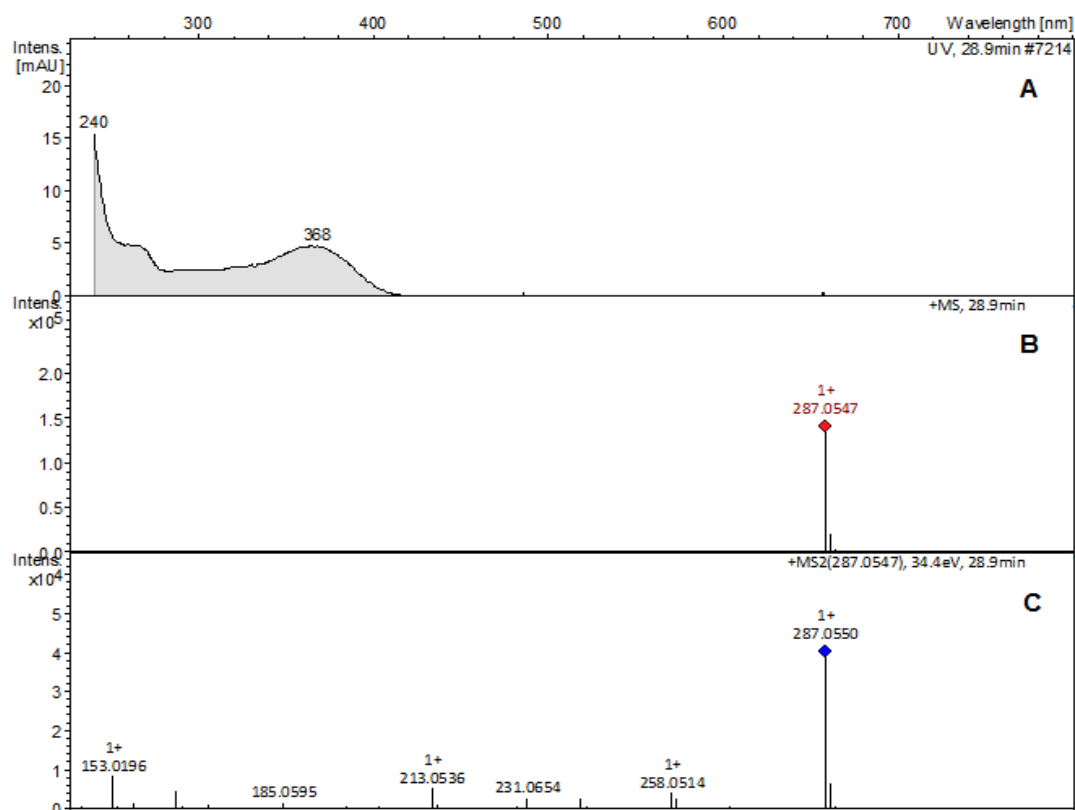


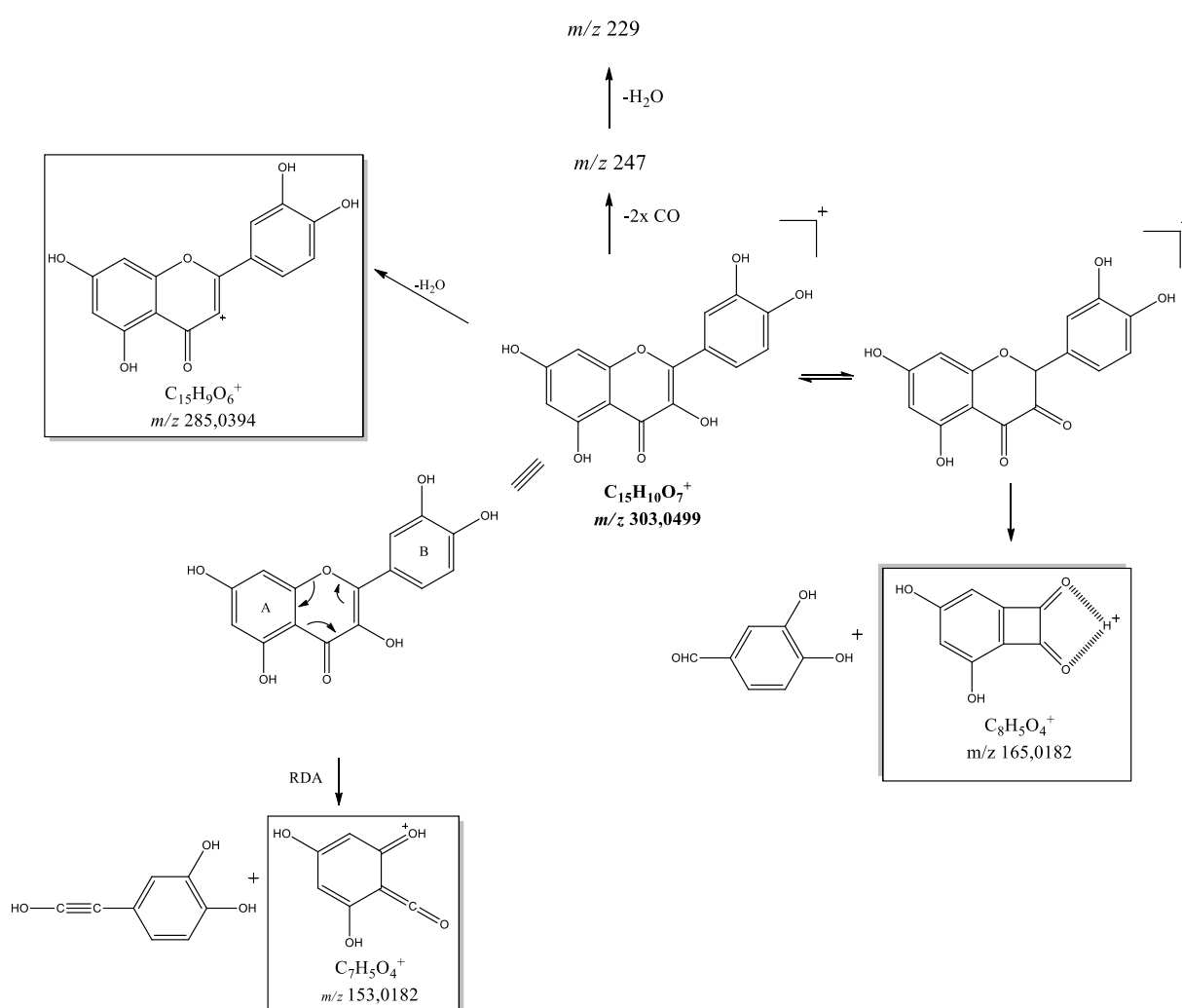
Figura 81. A: Espectro UV da substância eluída em 28,9 minutos (Pico 8 - Kaempferol). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução obtido via ionização por electrospray no modo positivo correspondente ao composto kaempferol. Espectro C: Experimento EM/EM

Tabela 45. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI-EM/EM para quercetina – pico 6)

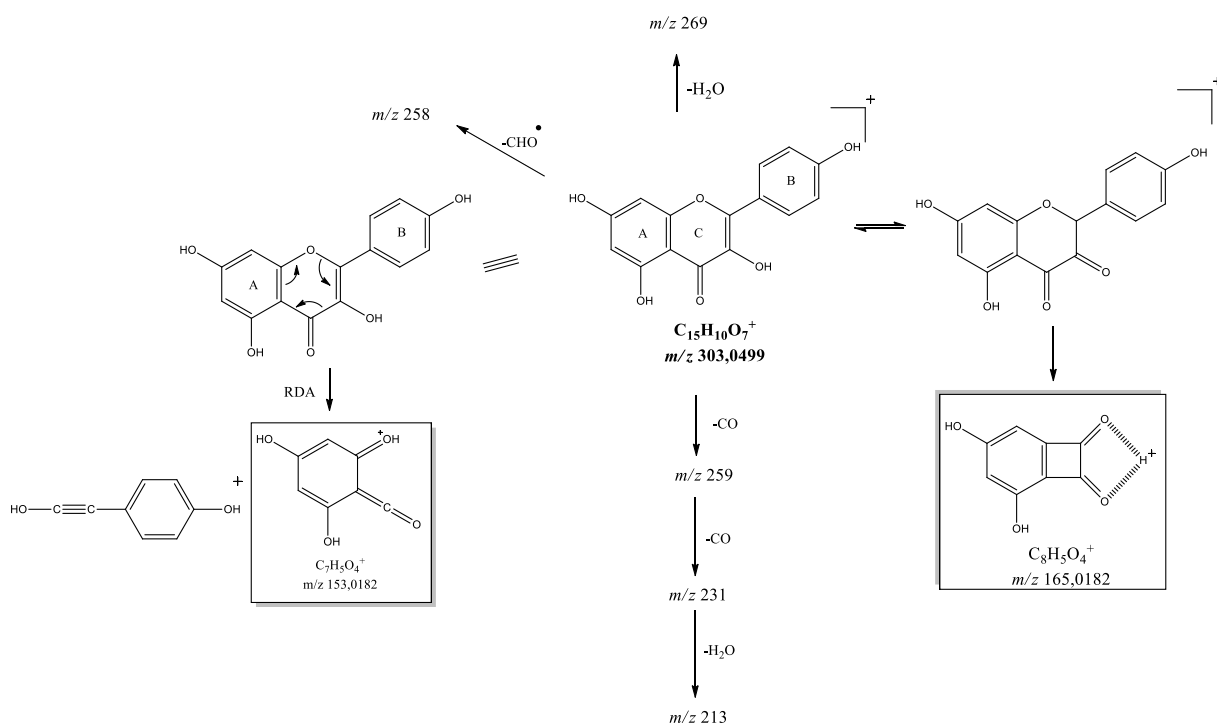
Número do pico	Rt (min)	Composto	Fórmula molecular	m/z calculado	Erro Δ (ppm)	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z) Observados
6	24,8	Quercetina	$C_{15}H_{11}O_7^+$ [M+H] ⁺	303,0499	3,0	303; 285; 257; 229; 165; 153

Tabela 46. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI-EM/EM para kaempferol – pico 8

Número do pico	Rt (min)	Composto	Fórmula molecular	m/z calculado	Erro Δ (ppm)	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z) Observados
8	29,0	Kaempferol	$C_{15}H_{11}O_6^+$ $[M+H]^+$	287	-0,5	287; 269; 259; 258; 241; 231; 213; 165; 153



Esquema 6. Proposta de mecanismos de fragmentação da quercetina ($[M+H]^+$, m/z 303) a partir de EM/EM, em modo positivo (March & Miao, 2004; Rijke *et al.*, 2006).



Esquema 7. Proposta de mecanismos de fragmentação do kaempferol [M+H]⁺, m/z 287) a partir de EM/EM, em modo positivo (March & Miao, 2004; Rijke *et al.*, 2006).

Da mesma forma, a identificação da substância correspondente ao pico **9** foi feita por meio de análise da fase alcaloídica **AVFACI** por CLAE-DAD-EM/EM (**Figura 68**), baseada na determinação das massas acuradas do íon protonado [M+H]⁺ e fragmentos EM/EM, a partir dos seus respectivos valores de razão massa/carga, e posterior comparação com a base de dados (item 3.5). A análise do espectro de massas (**Figura 83**) mostrou um íon [M+H]⁺ a m/z 317,0664 em 29,9 minutos, compatível com a fórmula molecular C₁₆H₁₃O₇⁺ (Δ -2,5 ppm). Uma vez que foram isolados derivados de flavonóis da fase alcaloídica das cascas, a fórmula molecular obtida sugeriu um derivado metilado de flavonol. A presença do íon m/z 153 confirma a ausência de metoxila no anel A. Os demais fragmentos presentes no espectro de massas sugeriram que o flavonoide correspondente ao pico 9 seria a isoramnetina (3'-O-metilquercetina) ou a tamarixetina (4'-O-metilquercetina). Uma vez que o espectro UV apresentou a Banda I (367 nm) bastante semelhante à do espectro da quercetina (369 nm), este dado foi indicativo da metilação em C-3'. De acordo com a literatura, a metilação da hidroxila de um flavonol situada em C-3, C-5 ou C-4' causa um efeito hipsocrômico na Banda I, enquanto que a substituição de hidroxila por metoxila em outras posições do

anel aromático causam pouco ou nenhum efeito sobre o espectro UV (Harborne, 1975). Assim, este flavonoide foi identificado como a isoramnetina (3'-O-metilquercetina) (**Figura 82**).

Devido à presença da metoxila no anel B, observa-se um íon-produto a m/z 302, resultante da perda de um radical metila, comum em flavonóis *O*-metilados (Rijke *et al.*, 2006). Perdas características de metanol, CO, dentre outras, também foram observadas no espectro da isoramnetina (Rijke *et al.*, 2006). Os íons-produto da fragmentação da isoramnetina são mostrados no **Esquema 8**. Na **Tabela 47** estão tabuladas as fórmulas, massa observada, massa calculada e erro de massa para os íons observados no espectro de massas da isoramnetina. Este flavonoide está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Aspidosperma*.

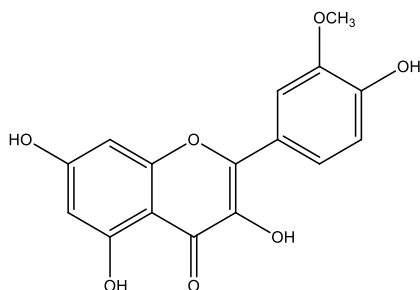
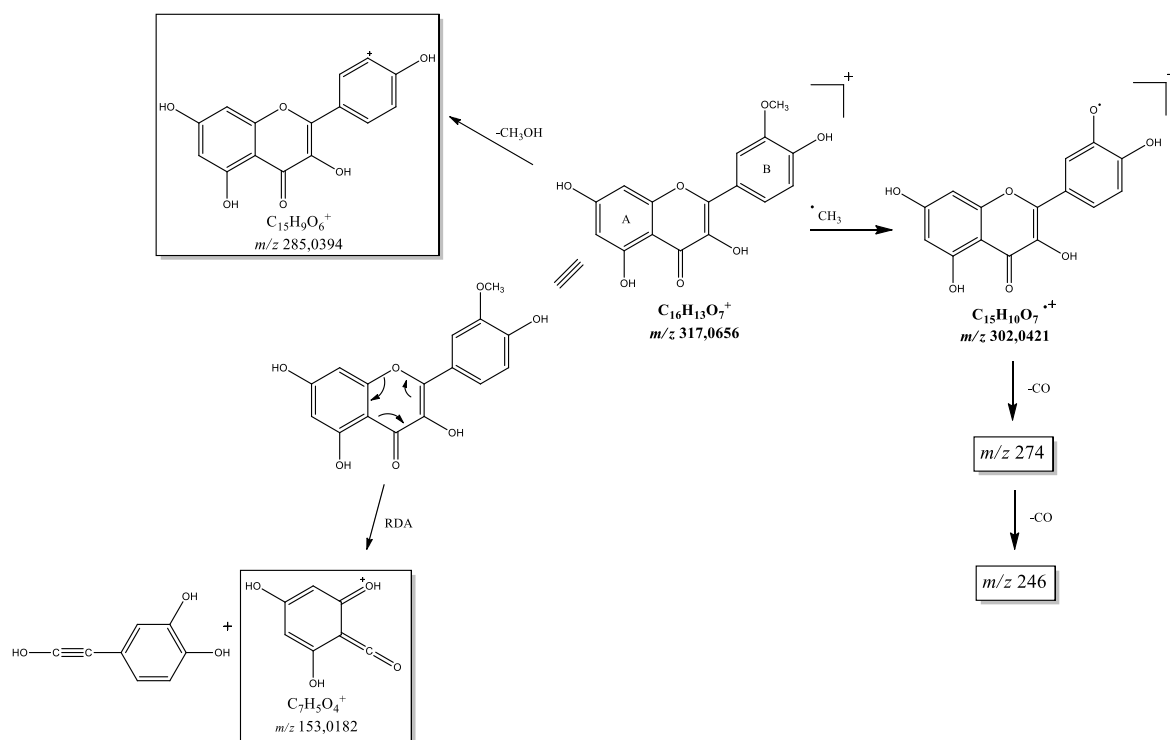


Figura 82. Proposta de mecanismos de fragmentação da isoramnetina $[M+H]^+$, m/z 317 a partir de EM/EM, em modo positivo (Rijke *et al.*, 2006).



Esquema 8. Proposta de fragmentação da isoramnetina (m/z 317) a partir de EM/EM, em modo positivo (Ma *et al.*, 1997; Rijke *et al.*, 2006)

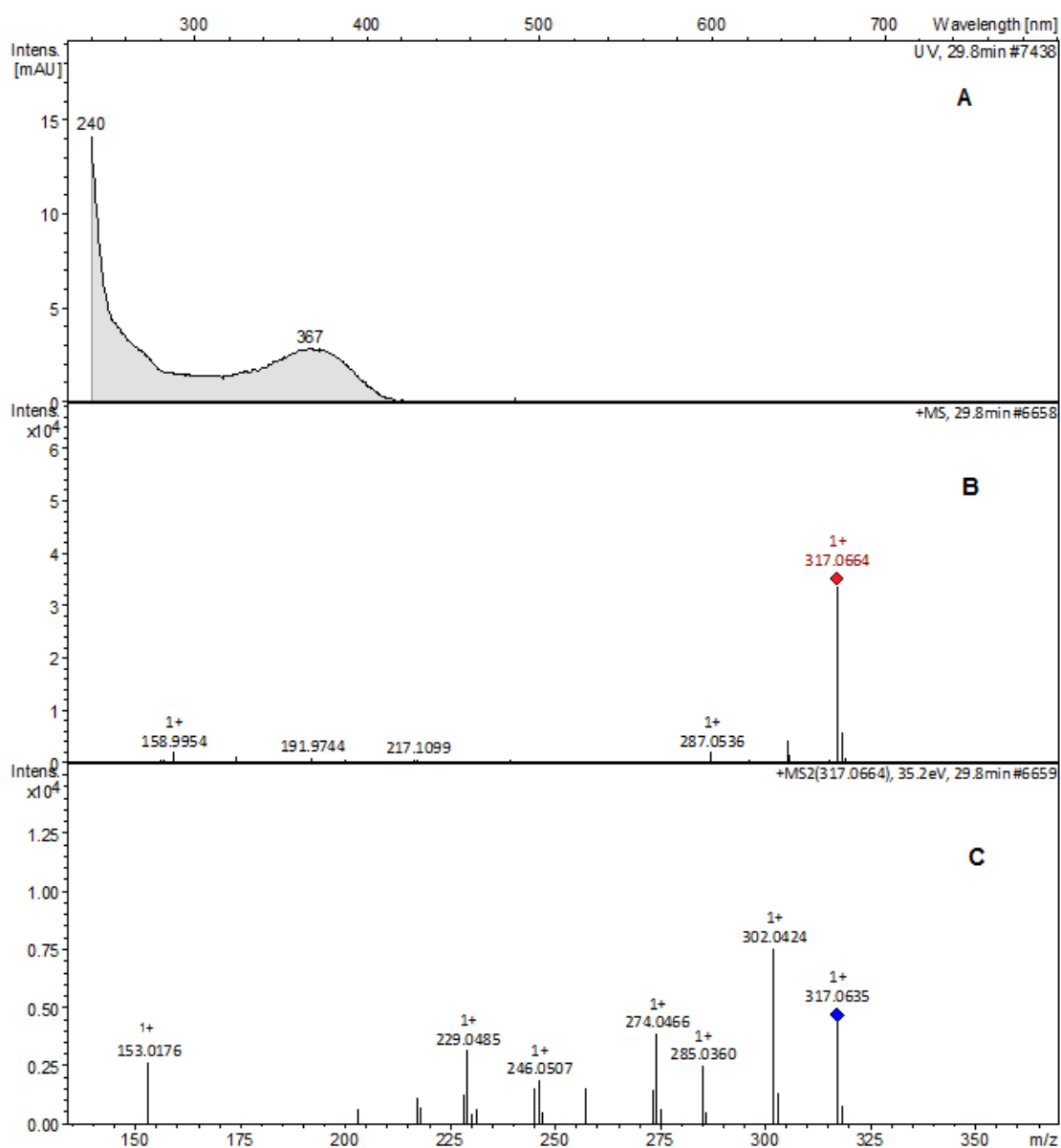


Figura 83. A: Espectro UV da substância eluída em 29,9 minutos (Pico 9 – isoramnetina). Espectro B: Espectro de massas de alta resolução obtido via ionização por electrospray no modo positivo correspondente ao composto isoramnetina. Espectro C: Experimento EM/EM

Tabela 47. Principais íons formados em CLAE-DAD-ESI-EM/EM para isoramnetina – pico 9

Número do pico	Rt (min)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	Erro Δ (ppm)	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
9	29,9	Isoramnetina	C ₁₆ H ₁₃ O ₇ ⁺ [M+H] ⁺	-2,5	317; 302; 285; 274; 246; 229; 153

4.4 Identificação dos compostos presentes na fase alcaloídica clorofórmica (AFCJ) das folhas por CLAE-DAD-EM/EM

O experimento de CLAE-DAD-EM/EM realizado com as folhas aconteceu de forma idêntica ao realizado com as cascas (item 3.5) e o cromatograma de pico base resultante é mostrado na **Figura 84**.

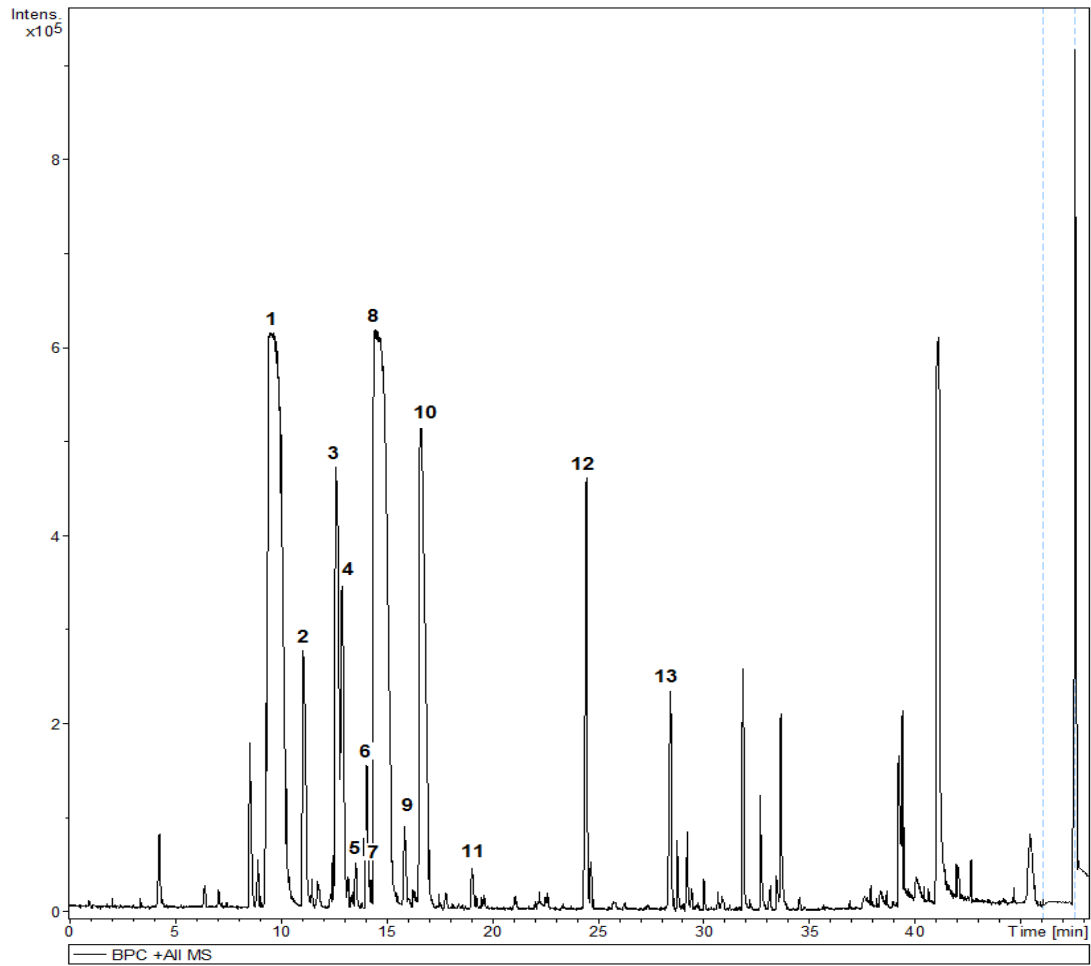


Figura 84. Cromatograma de pico Base (BPC) da fase alcaloídica AFCJ das folhas de *Aspidosperma verbascifolium*

A metodologia empregada para a identificação dos componentes da fase alcaloídica das folhas foi a mesma empregada no estudo dos constituintes da fase alcaloídica das cascas (item 4.3).

Da mesma forma como feito com a fase alcaloídica das cascas, os dados obtidos a partir das análises por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-EM/EM) da fase alcaloídica das folhas permitiram a divisão dos compostos identificados em grupos, de acordo com sua classe e tipo de esqueleto. Assim, foram identificados na fase alcaloídica das folhas sete alcaloides com esqueleto do tipo copsano e cinco do tipo aspidofractina, além de um componente pertencente à classe dos fenilpropanoides.

As primeiras análises foram realizadas através de comparação dos tempos de retenção, valores de m/z observados para os íons $[M+H]^+$ e respectivos íons-produto obtidos nos espectros EM/EM com os dados obtidos para os alcaloides já isolados e/ou identificados nas cascas e folhas do espécime em estudo (itens 4.2.2, 4.1.4 e 4.1.5). Este processo resultou na identificação dos alcaloides: copsanona (**pico 1**), copsanol (**pico 2**) e seu diastereoisômero, possivelmente o 22-epicopsanol (**pico 4**), copsanol-*N*-óxido (**pico 5**) (**Figura 85, Tabela 48**).

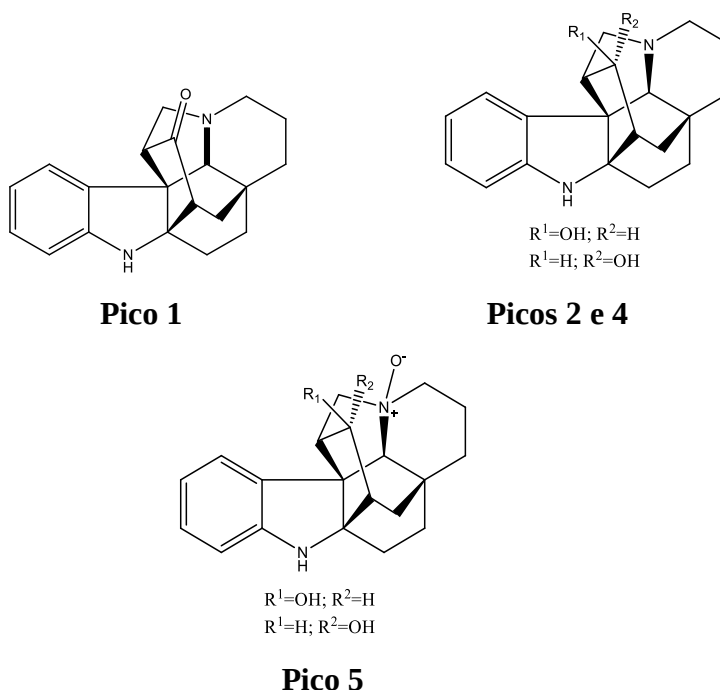


Figura 85. Compostos identificados da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Picos 1,2,4 e 5.

Tabela 48. Alcaloides identificados da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Picos 1,2,4 e 5.

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
1	9,6	307,1816	-3,5	Copsanona	C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ⁺	224
2	11,1	309,1941	5,0	Copsanol	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ⁺	291; 253; 224;
4	12,9	309,1955	2,1	22-epicopsanol	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ⁺	170 291; 253; 224; 170
5	13,6	325,1903	2,4	Copsanol-N-óxido	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₂ ⁺	308; 290; 251; 224

O composto correspondente ao **pico 3** (Rt 12,7 min) (**Figura 84**) mostrou um íon [M+H]⁺ a m/z 323,1749 no espectro de massas, consistente com a fórmula C₂₀H₂₃N₂O₂ (Δ 1,5 ppm). O padrão de fragmentação EM/EM para o composto foi igual ao apresentado pela substância copsanona-N-óxido, isolada das folhas e identificada no presente trabalho (Item 4.3.3). Da mesma forma que o observado no espectro EM/EM do alcaloide copsanol-N-óxido (item 4.1.5), o espectro EM/EM de copsanona-N-óxido apresentou um pico a m/z 306 correspondente à perda de hidroxila radicalar.

O alcaloide copsanona-N-óxido (**3**) (**Figura 86**) (**Tabela 49**) foi identificado anteriormente em *A. macrocarpon*, em estudo realizado por Bannwart e colaboradores (Bannwart *et al.*, 2013).

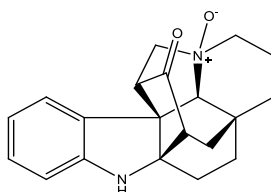


Figura 86. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Pico 3.

Tabela 49. Alcaloide identificado na fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* com esqueleto copsano por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloide com esqueleto do tipo copsano – pico 5.

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
3	12,7	323	1,5	Copsanona-N-óxido	C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₂ ⁺	306; 278; 250; 224

O espectro de massas do composto relativo ao pico **13** (Rt 28,4 min) (**Figura 84**) mostrou um pico a m/z 321,1596 (**Figura 87**), consistente com a fórmula molecular C₂₀H₂₁N₂O₂⁺ (Δ 2,3 ppm). O perfil de fragmentação EM/EM para o composto (**Tabela 50**) foi igual ao obtido para a substância 5,22-dioxocopsano (Item 4.3.5) e a proposta de fragmentação é apresentada no **Esquema 9**.

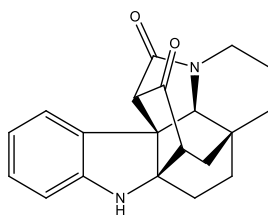
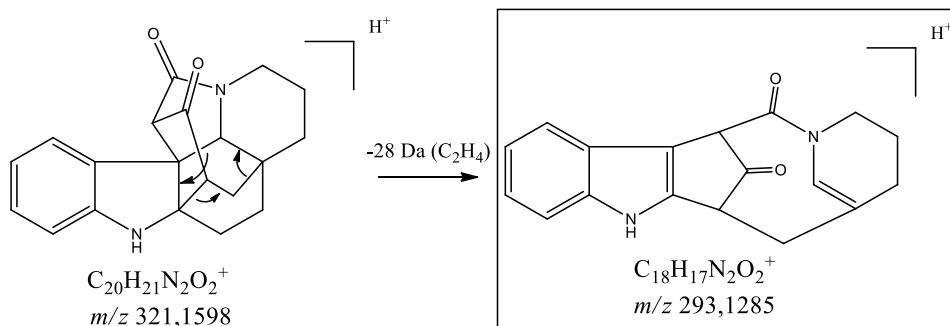


Figura 87. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Pico 13.



Esquema 9. Proposta da via mecanística de fragmentação do 5,22-dioxocopsano (m/z 321) a partir de EM/EM, em modo positivo.

O alcaloide 5,22-dioxocopsano (**13**) (**Figura 87**) foi obtido anteriormente por Toh-Seok Kam e Yeun-Mun Choo de um espécime de *Kopsia fruticosa* em 2008 (Kam & Choo, 2008) e está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Aspidosperma*.

Tabela 50. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano – Pico 13

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
13	28,4	321	2,3	5,22-dioxocopsano	C ₂₀ H ₂₁ N ₂ O ₂ ⁺	303; 293; 267

O **pico 6**, observado no cromatograma de pico base obtido para a fase alcaloídica das folhas em 14,1 minutos (**Figura 84**), originou um íon [M+H]⁺ a m/z 337,2013 (**Figura 89**), compatível com a fórmula C₂₁H₂₅N₂O₂ (Δ 1,3 ppm) e um íon no espectro EM/EM a m/z 305, atribuído à perda de CH₃OH (**Esquema 10; Tabela 51**). Através da consulta à base de dados (item 3.5), foi proposta estrutura do composto como sendo a do alcaloide indólico com esqueleto tipo copsano Nα-formilcopsanol (**Figura 88, Tabela 51**), previamente isolado por Braekman e colaboradores em 1969 de um espécime de *A. verbascifolium*.

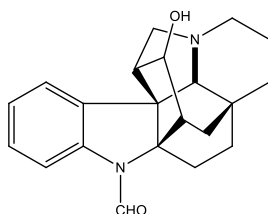


Figura 88. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 1** – Esqueleto do tipo copsano – Pico 6.

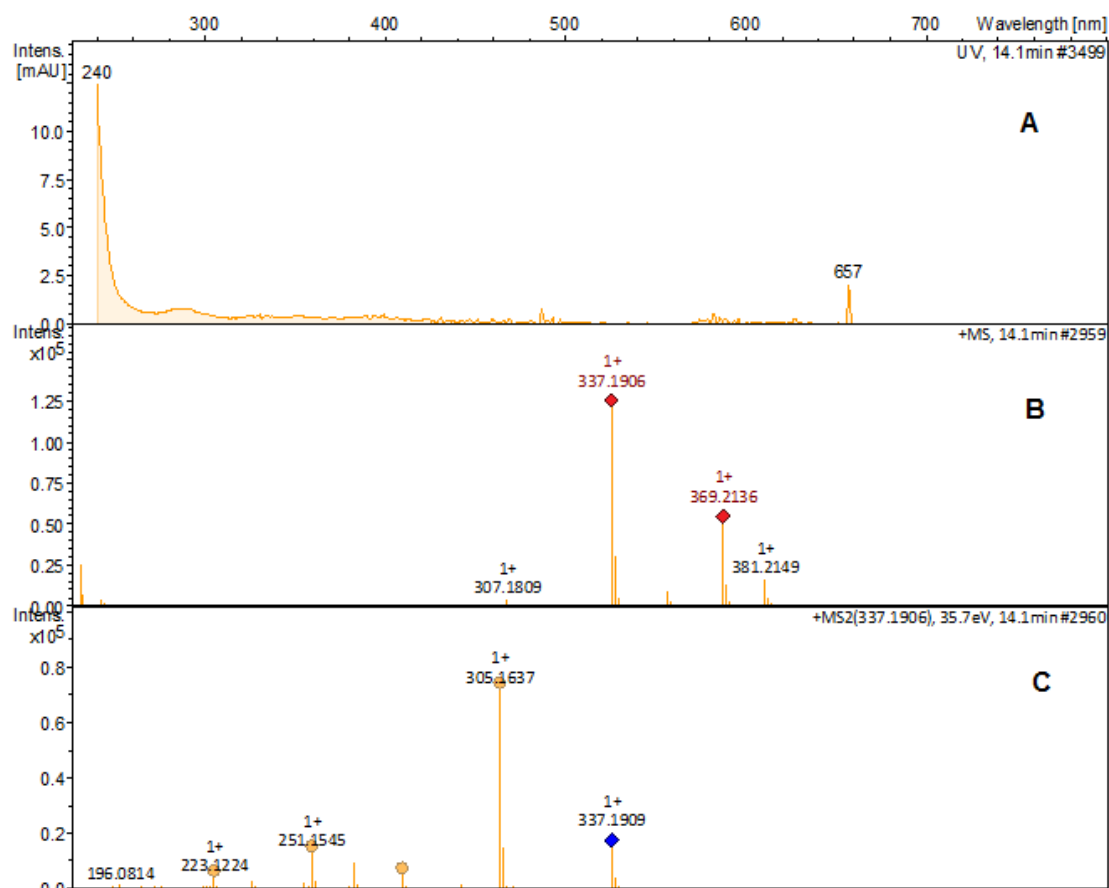
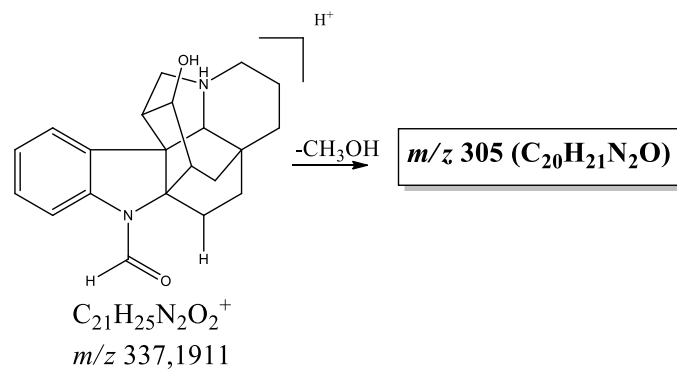


Figura 89. Espectro A: UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto $N\alpha$ -formilcopsanol. Espectro C: Experimento EM/EM



Esquema 10. Proposta da via mecanística de fragmentação do $N\alpha$ -formilcopsanol (m/z 337) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 51. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 1 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo copsano

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
6	14,1	337	1,3	N _α -formilcopsanol	C ₂₁ H ₂₅ N ₂ O ₂ ⁺	305; 251

O segundo grupo de compostos identificados compreende alcaloides indólicos com esqueleto do tipo aspidofractina. Dentre os cinco alcaloides identificados com este esqueleto, um já havia sido identificado por CLAE-DAD-ESI-EM/EM nas cascas (item 4.3) e outro isolado das folhas (item 4.2.1). Os demais foram identificados com bases nas análises dos seus íons protonados [M+H]⁺ e fragmentos EM/EM e posterior comparação com a base de dados (item 3.5).

O íon [M+H]⁺ a m/z 367,2011 obtido no espectro de massas do composto correspondente ao pico 7 (Rt 14,3 min) (**Figura 84**) possui correspondência de fórmula molecular para o alcaloide aspidofractina (**Figura 90**), identificado previamente nas cascas do espécime em estudo (C₂₂H₂₇N₂O₃, Δ 1,5 ppm). O padrão de fragmentação EM/EM para o composto foi igual ao obtido no espectro EM/EM para a substância aspidofractina (Item 4.3) (**Esquema 5; Tabela 52**).

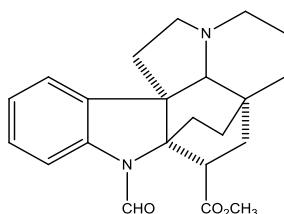


Figura 90. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 2** – Esqueleto do tipo aspidofractina – Pico 7.

Tabela 52. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
7	14,3	367	2,6	Aspidofractina	C ₂₂ H ₂₇ N ₂ O ₃ ⁺	307; 253

Da mesma forma, o íon [M+H]⁺ observado para o composto relativo ao pico **10** (Rt 16,7 min) (**Figura 84**), juntamente com os íons presentes no espectro EM/EM (**Figura 92, Tabela 53**), indicaram que se tratava do alcaloide copsinina-*N*-óxido (**Figura 91**), isolado das folhas no presente trabalho (item 4.3.4). Assim como os outros alcaloides do tipo *N*-óxido descritos no presente trabalho, foi observado no espectro EM/EM de copsinina-*N*-óxido um íon a *m/z* 338, atribuído à perda de hidroxila radicalar. Para a formação do íon a *m/z* 310 foi proposta a eliminação de etileno a partir de íon *m/z* 338 (**Esquema 11**).

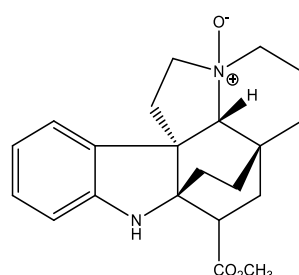
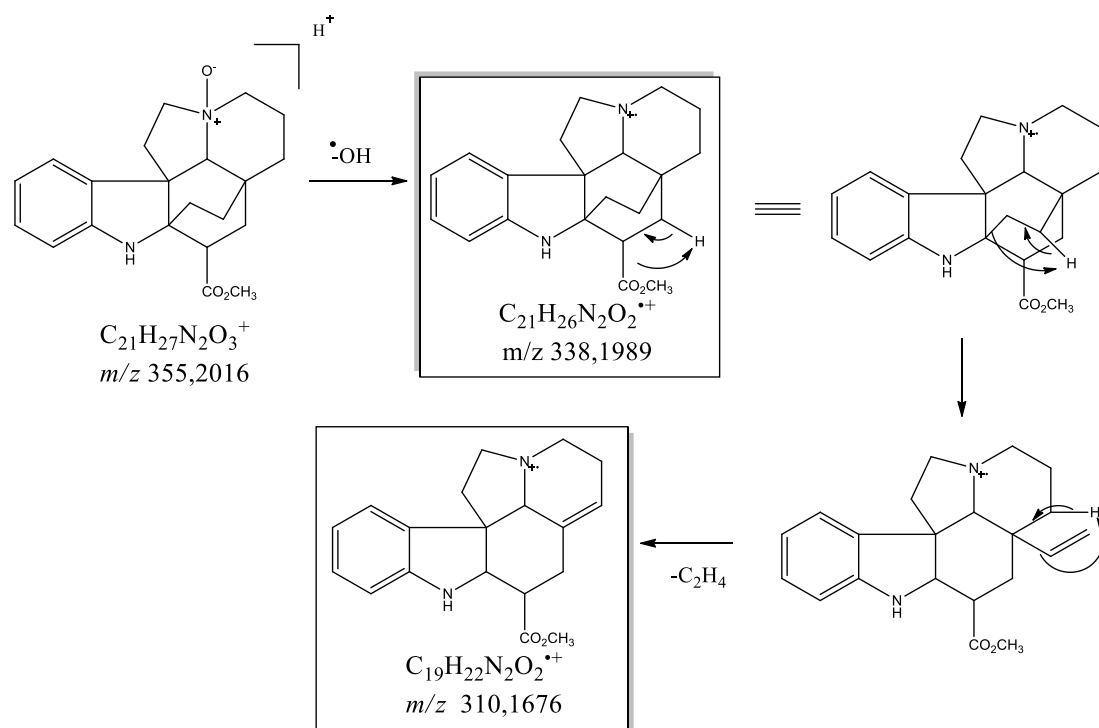


Figura 91. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. **Grupo 2** – Esqueleto do tipo aspidofractina – Pico 10.



Esquema 11. Proposta da via mecanística de fragmentação da copsinina-*N*-óxido (*m/z* 355) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 53. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i> Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (<i>m/z</i>)
12	16,7	355	-3,7	Copsinina- <i>N</i> -óxido	C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O ₃ ⁺	338; 310; 279; 251; 209

Os íons [M+H]⁺ observados nos espectros dos compostos referentes aos picos **8** (Rt 14,7 min) e **9** (Rt 15,9 min) (**Figura 84**) a *m/z* 339,2092 (**Figura 93**) e 339,2071, (**Figura 94**) respetivamente, após consulta à base de dados (item 3.5), foram indicativos da fórmula C₂₁H₂₇N₂O₂ (Δ 7,2 e 1,2 ppm, respetivamente), sugerindo a presença de duas formas diastereoisoméricas do alcaloide copsinina (**Figura 92**).

O padrão de fragmentação EM/EM para o composto está descrito no **Esquema 12**. O alcaloide copsinina foi identificado anteriormente nas folhas de um espécime de *Aspidosperma macrocarpon* (Bannwart, 2012).

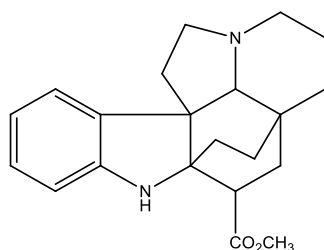


Figura 92. Compostos identificados da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina – Picos 8 e 9.

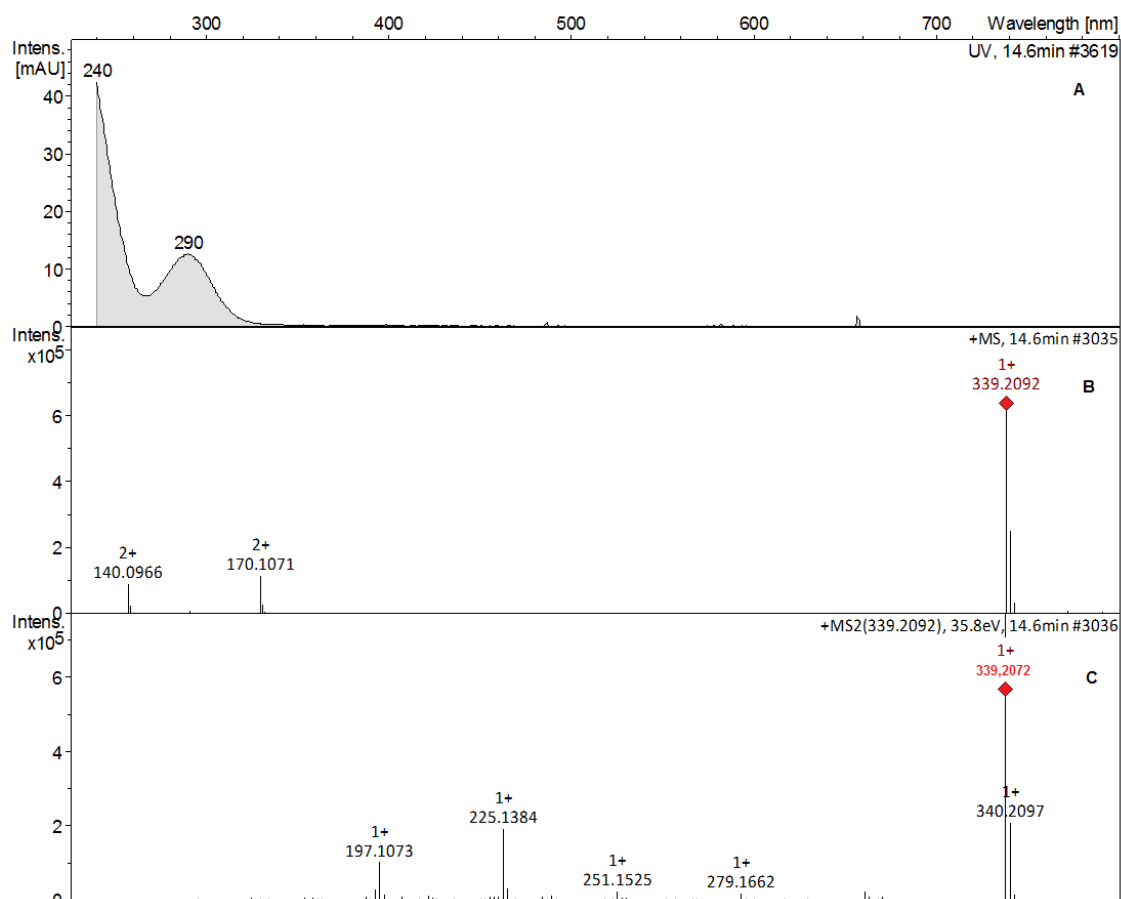


Figura 93. Espectro A: UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto Copsinina (Isômero A). Espectro C: Experimento EM/EM – Pico 8.

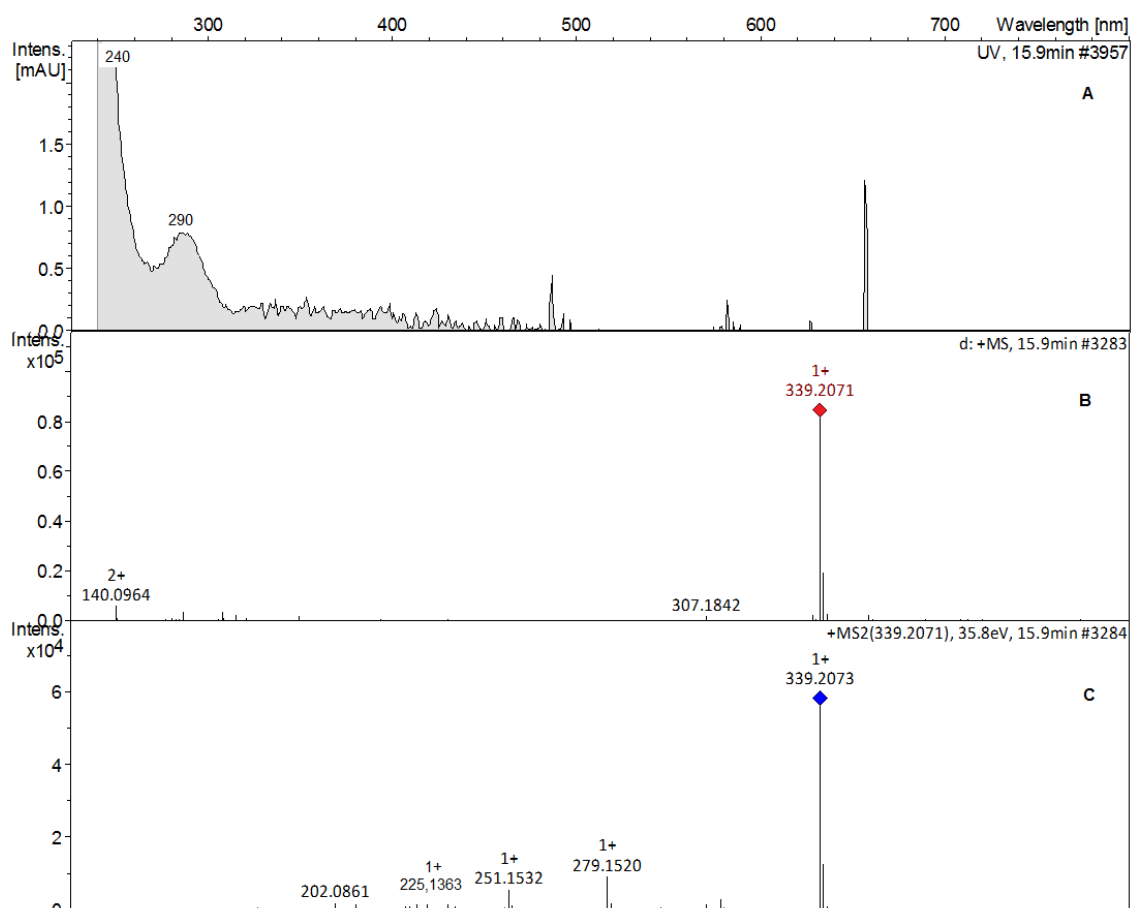
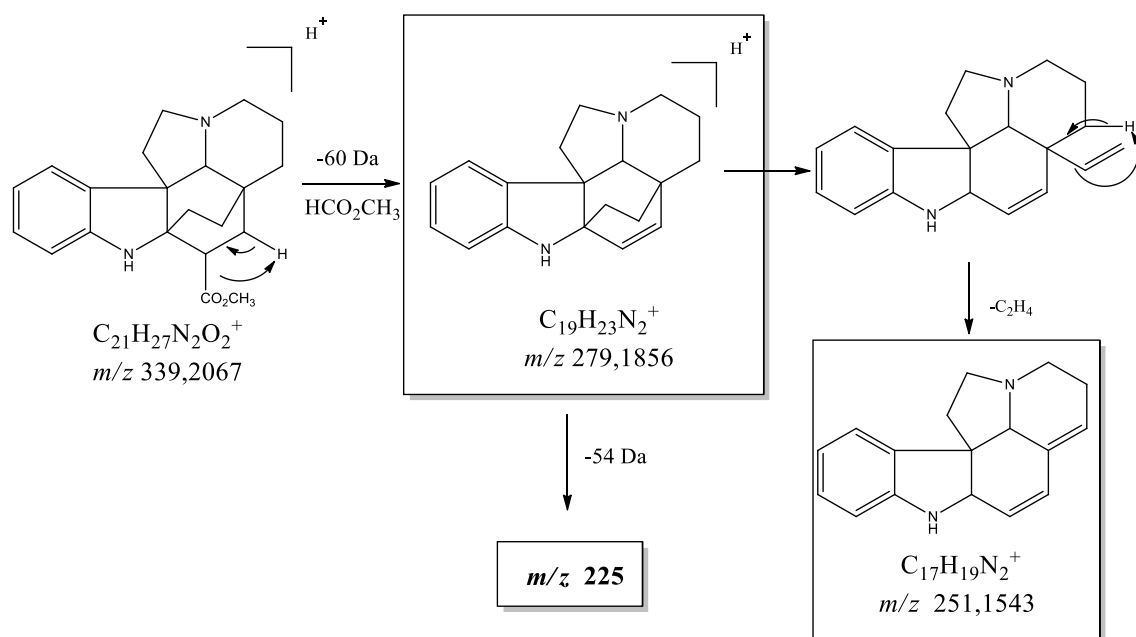


Figura 94. Espectro A: UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto copsinina (Isômero B). Espectro C: Experimento EM/EM-Pico 9.



Esquema 12. Proposta da via mecanística de fragmentação da copsinina (m/z 339) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 54. Alcaloides identificados da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina

Número do pico	Rt (min)	$[M+H]^+$ m/z Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular $[M+H]^+$	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
8	14,7	339	7,2	Copsinina (Isômero A)	$C_{21}H_{27}N_2O_2^+$	279; 251; 225; 197
9	15,9	339	-1,2	Copsinina (Isômero B)	$C_{21}H_{27}N_2O_2^+$	279; 251; 225; 197

O espectro de massas do composto correspondente ao pico **14** Rt (24,5 min) (**Figura 84**) apresentou o íon $[M+H]^+$ a m/z 339,1717 (**Figura 96**), consistente com a fórmula molecular $C_{20}H_{23}N_2O_3$ (Δ -4,1 ppm) (**Tabela 55**). De acordo com a base de dados (item 3.5), esta informação sugeriu que o composto se tratava do alcaloide indólico ácido-5-oxocopsinico (**Figura 95**) de esqueleto do tipo aspidofractina. De maneira semelhante aos alcaloides aspidofractina e copsinina, o íon a m/z 293 observado no espectro EM/EM indicou a perda de ácido fórmico a partir de $[M+H]^+$,

seguida de um rearranjo para eliminação de etileno, levando ao íon a m/z 265. Para a formação do íon a m/z 321 foi proposta a eliminação de água a partir da molécula protonada (**Esquema 13**). O alcaloide ácido-5-oxocopsinico teve seu isolamento descrito anteriormente por Bannwart a partir de um espécime de *Aspidosperma macrocarpon* (Bannwart, 2012), sendo portanto, seu primeiro relato em *A. verbascifolium*.

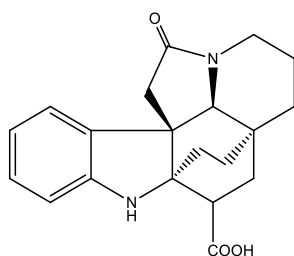


Figura 95. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 – Esqueleto do tipo aspidofractina – Pico 14.

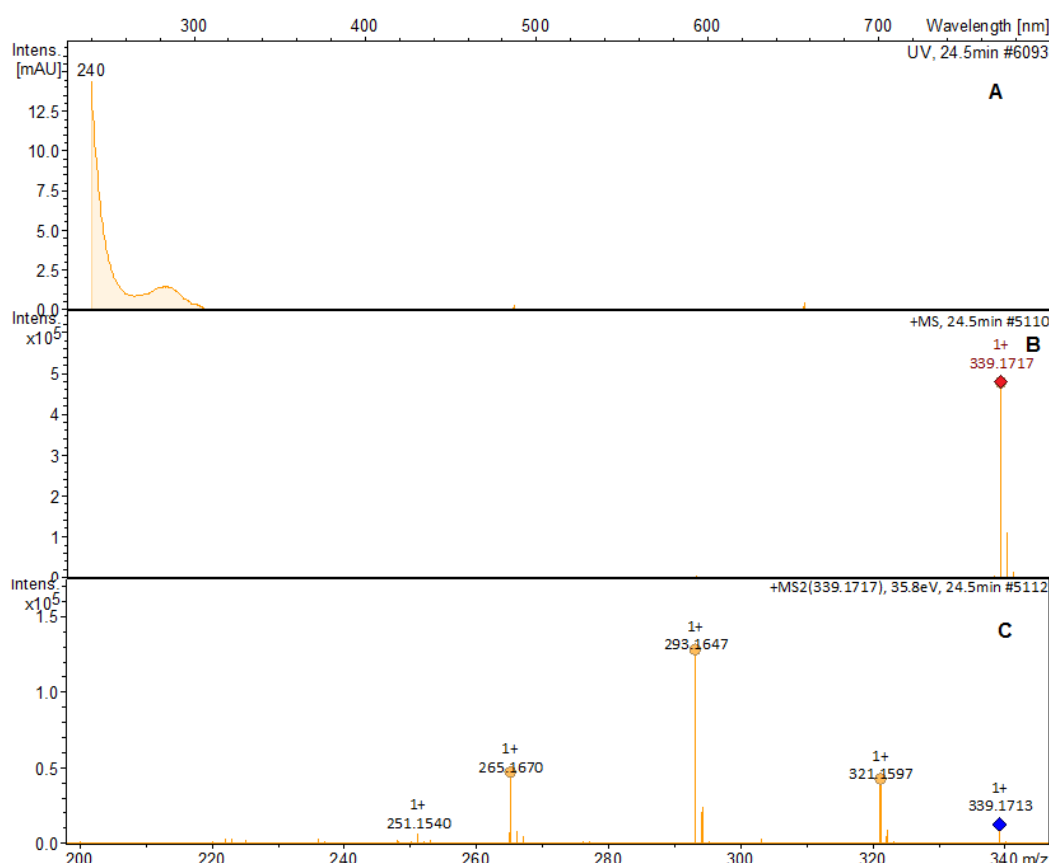
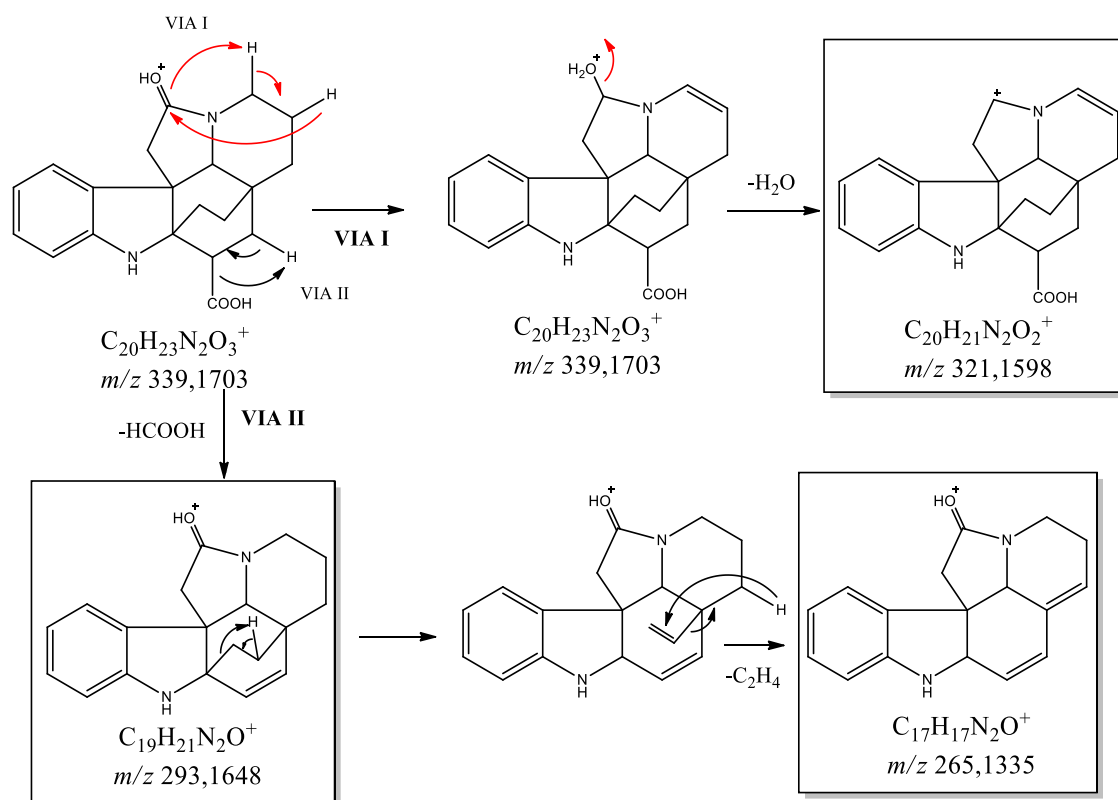


Figura 96. Espectro A: Experimento UV. Espectro B: Espectro de massas de alta resolução correspondente ao composto ácido-5-oxocopsinico. Espectro C: Experimento EM/EM



Esquema 13. Proposta da via mecanística de fragmentação do ácido-5-oxocopsinico (m/z 339) a partir de EM/EM, em modo positivo.

Tabela 55. Alcaloide identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM. Grupo 2 de alcaloides: alcaloides com esqueleto do tipo aspidofractina

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
14	24,5	339	-4,1	Ácido 5-oxocopsinico	$C_{20}H_{23}N_2O_3^+$	321; 293; 265

O terceiro grupo compreende apenas uma substância, correspondente ao pico **11** (tR 19,1 min) (**Figura 84**), identificado por análises do seu íon protonado $[M+H]^+$ e EM e fragmentos EM/EM e posterior comparação com a base de dados (item 3.5) (**Tabela 56**). O espectro de massas do composto **11** registrou o íon protonado a m/z 195,0652 $[M+H]^+$, consistente com a fórmula $C_{10}H_{11}O_4$. Este possui correspondência de fórmula molecular para o fenilpropanoide cafeato de metila (**Figura 97**), isolado das folhas neste

trabalho (item 4.2.1) e em trabalhos anteriores realizados com a espécie *Solanum torvum* (Solanaceae) (Balachandran, 2015).

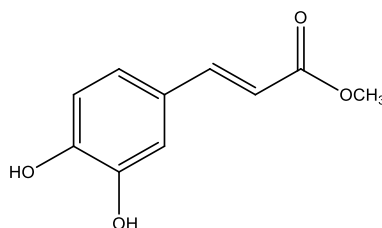


Figura 97. Composto identificado da fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM.

Tabela 56. Fenilpropanoide identificado na fase alcaloídica das folhas de *Aspidosperma verbascifolium* por CLAE-DAD-ESI-EM/EM.

Número do pico	Rt (min)	[M+H] ⁺ m/z Observado	Erro Δ (ppm)	Composto	Fórmula molecular [M+H] ⁺	ESI-EM/EM Fragmentos (m/z)
11	19,1	195	-1,6	Cafeato de metila	C ₁₀ H ₁₁ O ₄ ⁺	163

4.5 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fase acetato de etila (AFAAc) das cascas de *Aspidosperma verbascifolium*

As substâncias isoladas a partir do fracionamento da fase acetato de etila das cascas do espécime *Aspidosperma verbascifolium* (AFAAc) tiveram suas estruturas estabelecidas com base nas análises espectroscópicas, principalmente de RMN uni e bidimensionais, e por comparação com dados existentes na literatura. A identificação destas substâncias é descrita a seguir.

4.5.1 Substância A-13

A substância codificada como **A-13**, solúvel em metanol (CD₃OD) isolado a partir da fração acetato de etila (AFAAc-1-1) das cascas de *Aspidosperma verbascifolium* apresentou-se sob a forma de cristal e foi assim levada para análise em RMN. O espectro de RMN de ¹H (**Figura 99**) apresentou o sinal de um duplete em δ_H 4,23 (J= 7,76 Hz) referente ao próton do carbono 1 (C-1). Além desses, sinais característicos de hidrogênios carbinólicos na região entre δ_H 3,0 e 4,5 ppm foram

observados. Um multipeto em δ_H 3,65 e um tripleto em δ_H 1,21 foram atribuídos aos hidrogênios metoxilas H-6 e H-2'', respectivamente.

Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^{13}C /DEPT (**Figura 100**, **Figura 101**) evidenciaram a presença de sinais para oito átomos de carbono, incluindo um carbono metílico, 2 carbonos metilênicos 3 carbonos carbinólicos e 2 carbonos metínicos. Pode-se observar a presença de um grupo etóxi na fração devido aos sinais presentes em campo baixo (δ_c 102,7 ppm). A presença de um sinal bem pronunciado em δ_c 64,8 (C-1') e 14,0 (C-2') evidencia a presença de um grupo O-etil presente na fração (**Tabela 57**).

Através da análise espectral de RMN de ^{13}C e comparação com dados da literatura de **A-13** (**Tabela 57**), juntamente com dados da literatura para o Etil- α -D-Glucopiranosideo e o Etil- β -D-Glucopiranosideo (Bisht,1998) e mostraram se concordantes com a análise, sugerindo a estrutura de um glicosídeo, o Etil- β -D-Glucopiranosideo (**Figura 98**).

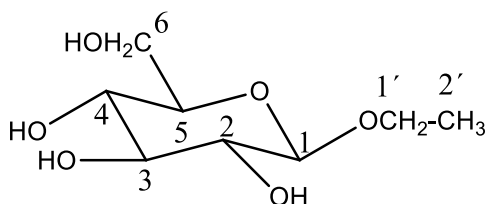


Figura 98. Estrutura química de **A-13** (etil- β -D-Glucopiranosideo)

Tabela 57. Dados de RMN de ^1H para a substância **A-13** e comparação com dados de ^{13}C para o Etil- α -D-Glucopiranosideo e Etil- β -D-Glucopiranosideo descritos na literatura

C/H	δc (C)	$^b\delta\text{c}$ (C)	$^b\delta\text{c}$ (C)
	^a A-13	^b Etil- α -D-Glucopiranosideo (Bisht,1998)	^b Etil- β -D-Glucopiranosideo (Bisht,1998)
1	102,7	99,2	103,4
2	73,7	72,8	74,3
3	76,7	74,2	77,6
4	70,2	71,3	71,0
5	76,5	73,5	77,6
6	61,4	61,9	62,0
1'	64,8	63,4	64,6
2'	14,03	14,6	14,8
[^a (δ -ppm, 75,45 MHz, CD_3OD); [^b (δ -ppm, 75,45 MHz, DMSO-d_6)]			

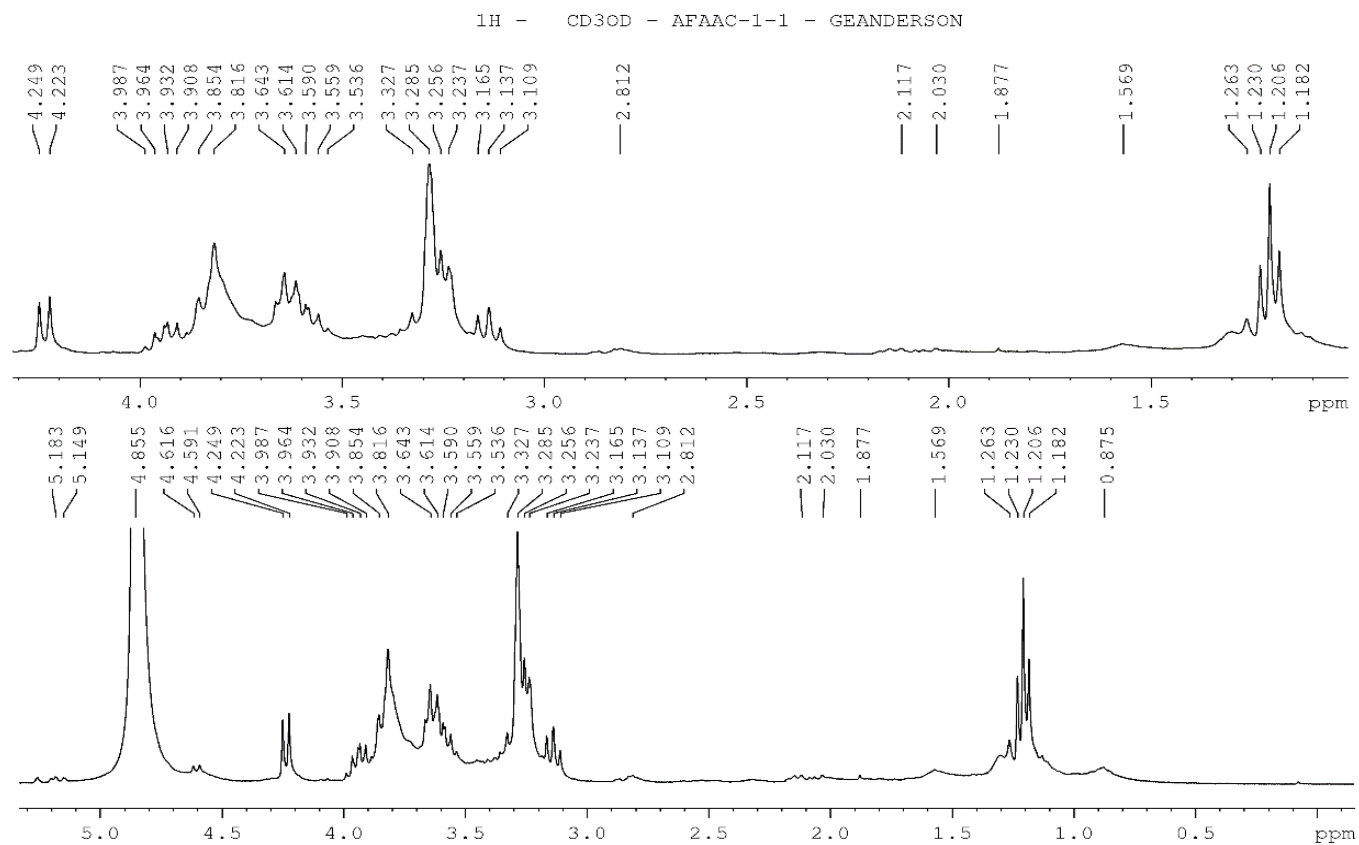


Figura 99. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-13

^{13}C - CD_3OD - AFAAC-1-1 - GEANDERSON

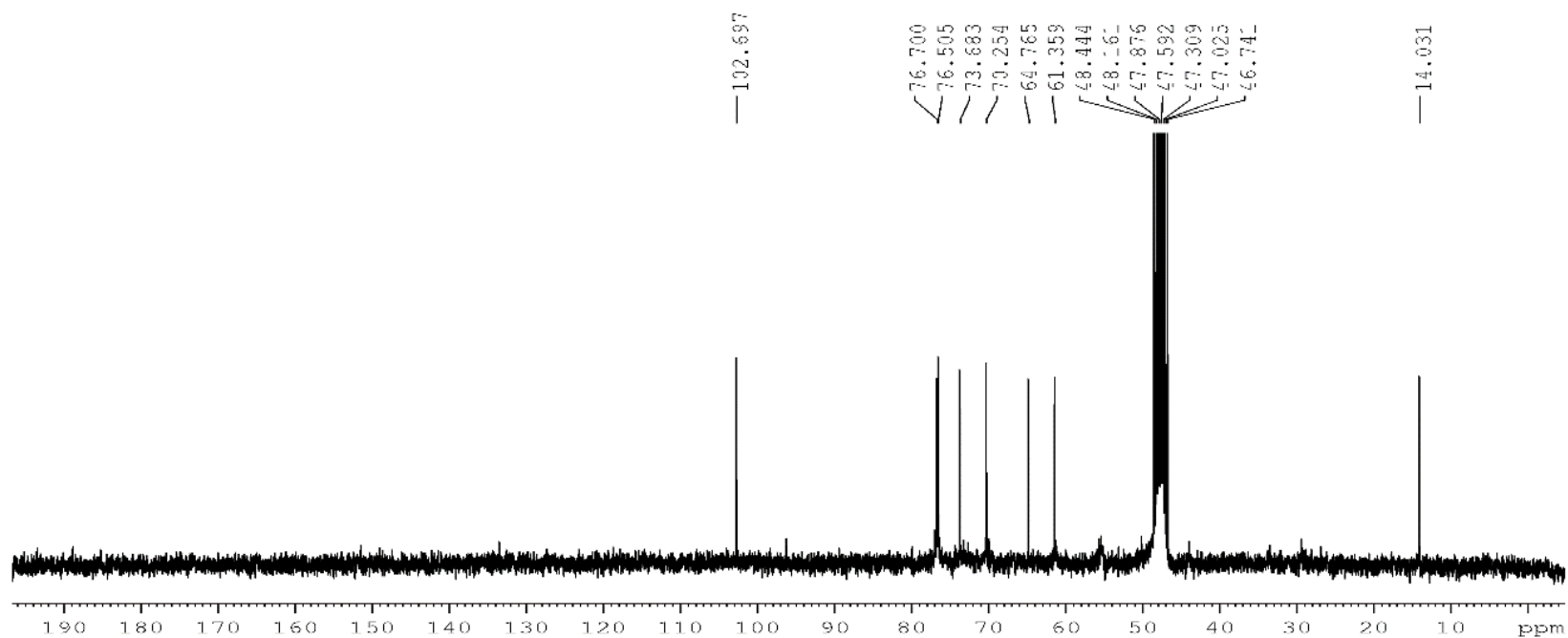


Figura 100. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CD_3OD) de A-13

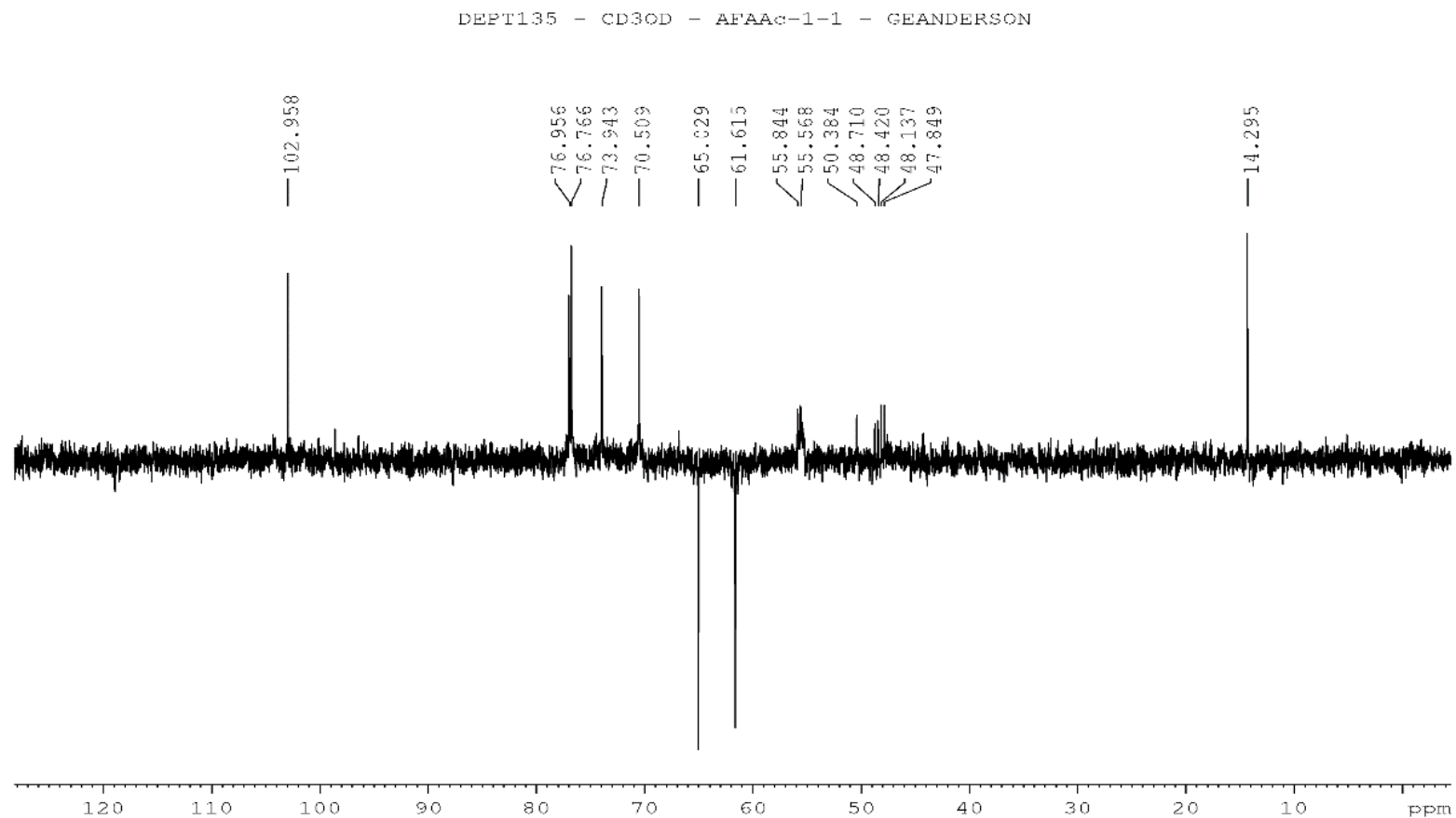


Figura 101. Espectro de RMN de DEPT 135 (75,45 MHz; CD₃OD) de A-13

4.5.2 Substância A-14

A substância codificada como **A-14**, isolada a partir da fração AFAAc-8-4 das cascas apresentou-se sob a forma de pó amarelo-pálido e apresentou absorbância sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 366 nm. As análises de RMN de ^1H (**Figura 103**), portanto, para a fração sugeriram tratar-se da presença de apenas uma substância pertencente à classe dos ácidos fenólicos. Fato este corroborado pela presença de sinais relativos a hidrogênios aromáticos 1,3,4-trissusbtituído característicos referentes a um duplete em δ_{H} 6,77 com ($J= 8,2$ Hz, 1H), um duplo duplete em δ_{H} 7,23 ($J= 8,2$ e 1,9 Hz, 1H) e outro duplete em δ_{H} 7,29 ($J= 2,1$ Hz, 1H), atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-5, H-6 e H-2, respectivamente (**Tabela 58**).

Assim sendo, a identidade do composto foi confirmada por comparação dos dados espectroscópicos (RMN de ^1H) (**Figura 103**) com dados listados da literatura (Souza Filho, 2006) para um ácido fenólico, ácido protocatecuico (**Figura 102**) (**Tabela 58**).

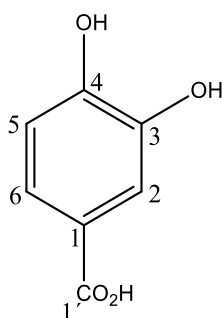


Figura 102. Estrutura química do **A-14** (ácido protocatecuico)

Não foram encontrados na literatura relatos a respeito da existência do ácido protocatecuico em *Aspidosperma verbascifolium*.

Tabela 58. Dados de RMN de ^1H para a substância **A-14** e comparação com dados de ^1H para o ácido protocatecuico descrito na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J, H) ^a A-14	δ_{H} (mult., J, H) ^b ácido protocatecuico (Souza Filho, 2006)
1	-	-
2	7,29 (d, $J= 1,9$ Hz, 1H)	7,52 (d, $J= 1,8$ Hz, 1H)
3-OH	5,83 (s)	-
4-OH	5,76 (s)	-
5	6,77 (d, $J= 8,2$ Hz, 1H)	6,90 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H)
6	7,23 (dd, $J= 1,9; 8,2$ Hz,	7,47 (dd, $J= 1,8; 8,1$ Hz)
1'	-	-
[^a (CD ₃ OD; 300,06 MHz para ^1H); [^b ((CD ₃ OD; 300,06 MHz para ^1H)]		

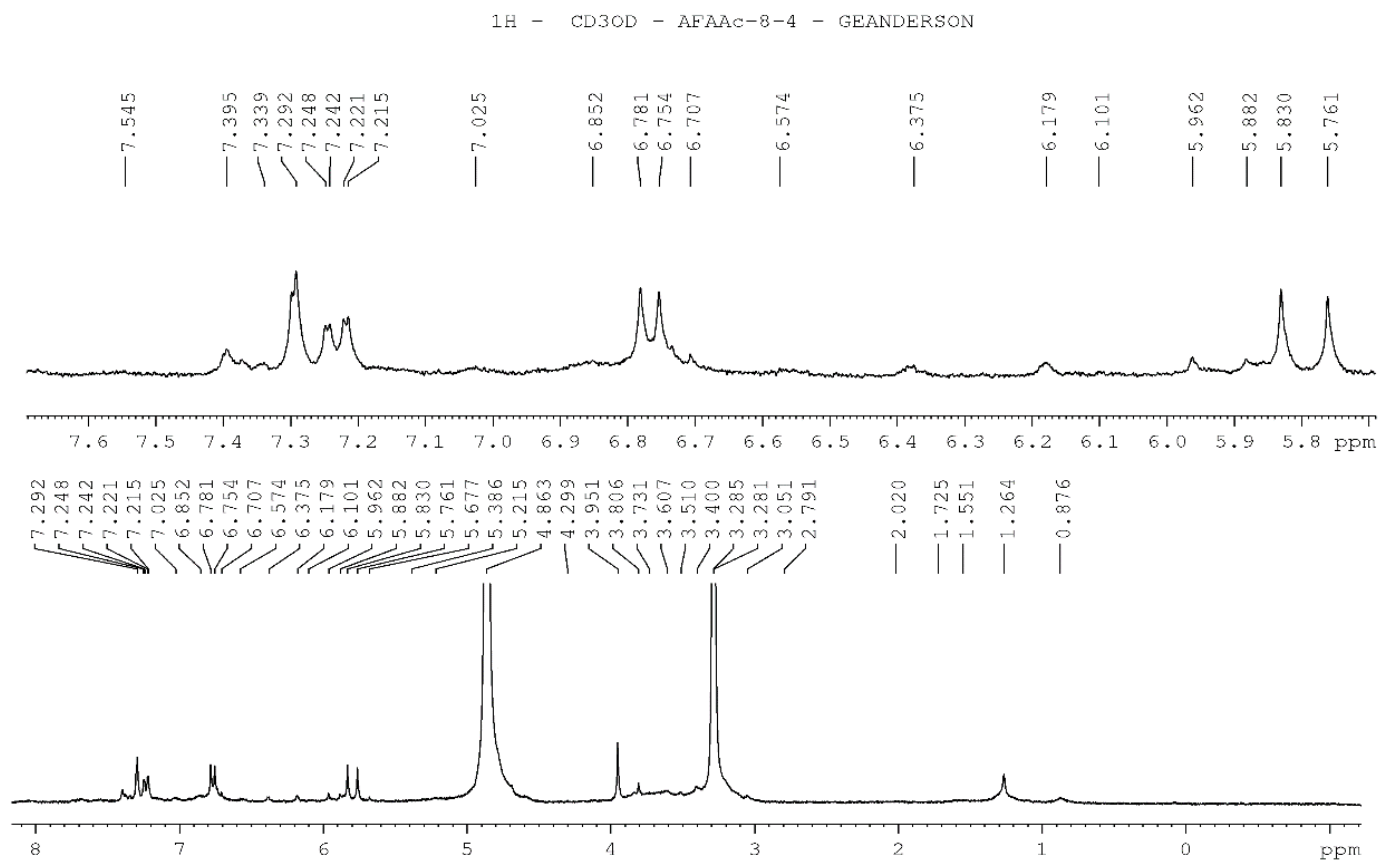


Figura 103. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-14

4.5.3 Substâncias A-14+A-15

As substâncias **A-14** e **A-15** foram isoladas da fração acetato de etila das cascas (subfração AFAAc-6-27) como uma mistura, apresentando-se sob a forma de pó amarelo-pálido solúvel em metanol. Estas apresentaram absorbância sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 366 nm, sendo encaminhada para análises espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C .

As análises de RMN ^1H (**Figura 105**), ^{13}C (**Figura 106**), portanto, para a fração nos sugeriram tratar-se de uma mistura de duas substâncias, ambas pertencentes à classe dos ácidos fenólicos. Através da comparação destes dados com os obtidos para **A-15**, verificou-se que o componente majoritário da mistura se tratava deste ácido fenólico. Fato este corroborado pela presença de sinais relativos a hidrogênios de um anel aromáticos 1,3,4-trissubstituído em 6,77 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5), 7,23 (dd, $J = 8,2$ e 1,9 Hz, 1H, H-6) e 7,29 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-2), (**Tabela 59**). Embasado ainda nos dados de RMN ^{13}C que evidenciaram sinais característicos de um ácido fenólico, evidenciando os sinais em 146,2 e 150,6 referentes aos carbonos C-3 e C-4 ligados a hidrogênio, ainda os sinais de não hydrogenados em 116,3, 115,8 e 121,2 referentes aos carbonos C-2, C-5 e C-6, a presença de um sinal em 172,4 permitiram inferir que a substância possui um carbono um grupo carboxílico em C-1', posterior comparação com dados listados da literatura (Souza Filho, 2006) nos fez assim inferir que uma das substâncias presente na mistura tratava-se do ácido identificado anteriormente, ácido protocatecuico (**A-14**) (**Figura 102**, **Tabela 59**).

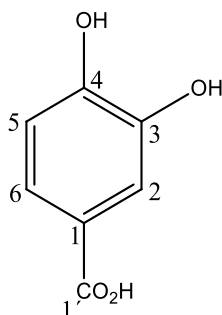


Figura 102. Estrutura química de **A-14** (ácido protocatecuico)

Tabela 59. Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para **A-14** e comparação com dados de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o ácido protocatecuico descrito na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J, H) ^a A-14	δ_{C} (C) ^a A-14	δ_{H} (mult., J, H) ^b ácido protocatecuico (Souza Filho, 2006)	^b δ_{C} (C) ^b ácido protocatecuico (Souza Filho,
1	-	126,2	-	129,9
2	7,29 (d, $J= 1,9$ Hz, 1H)	116,1	7,52 (d, $J= 1,8$ Hz, 1H)	117,8
3-OH	-	146,2	-	146,0
4-OH	-	150,6	-	151,4
5	6,77 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H)	115,8	6,90 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H)	115,7
6	7,23 (dd, $J= 2,1; 8,3$ Hz,	121,2	7,47 (dd, $J= 1,8; 8,1$ Hz)	123,7
1'	-	172,4	-	170,2

[^a(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]; [^b(δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]

A análise dos demais dados presentes nos espectros da mistura sugeriu que o outro componente da subfração AFAAc-6-27, denominado **A-15**, seria o éster do ácido protocatecuico, o 3,4-diidroxibenzoato de etila (Reis, 2008) (**Tabela 60**). O padrão típico de hidrogênios de anel aromático 1,3,4-trissubstituído de derivados de ácidos fenólicos foi observado em δ_{H} 7,4 (d, 1,98 Hz, H-2), δ_{H} 6,7 (d, 8,2 Hz, H-5) e δ_{H} 7,3 (dd, 2,0; 8,2 Hz, H-6) (**Figura 105**). Foram ainda observados um tripleto em δ_{H} 1,15 (7,0 Hz) e um quarteto em δ_{H} 3,6 (7,0 Hz) referentes aos hidrogênios H-3' e H-2', respectivamente (**Tabela 60**).

Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^{13}C para **A-16** (**Figura 106**) evidenciaram sinais correspondentes aos carbonos aromáticos em δ_{C} 123,2 (C-2), 115,3 (C-5) e 117,8 (C-6) do sistema aromático 1,3,4 trissubstituído, além de sinais correspondentes aos carbonos aromáticos oxigenados em δ_{C} 145,4 (C-3) e 149,4 (C-4), destacando-se também o sinal em δ_{C} 58,4 referente ao carbono metilênico (C-2') e um sinal em δ_{C} 18,3 referente ao carbono metila (C-3'). Além destes, destaca-se um carbono carbonílico em δ_{C} 174,5 (C-1') (**Tabela 60**).

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **A-15** com aqueles relatados para o ácido protocatecuico (Souza Filho, 2006) (**Tabela 60**) mostraram similaridades, exceto a presença de sinais referentes ao grupo etila de éster. Esses dados permitiram inferir

que **A-16**, portanto pode ser caracterizado como sendo um éster do ácido protocatecuico, o 3,4-diidroxibenzoato de etilo (Reis, 2008) (**Figura 104**).

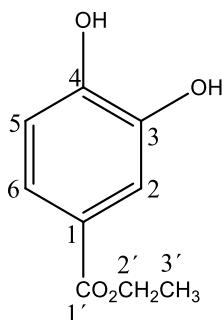


Figura 104. Estrutura química de **A-15** (3,4-diidroxibenzoato de etilo)

Tabela 60. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C /DEPT para **A-15** e comparação com dados de ^1H e de ^{13}C /DEPT para o ácido protocatecuico descrito na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J, H) ^a A-15	δ_{C} (C) ^a A-15	δ_{H} (mult., J, H) ^b ácido protocatecuico (Souza Filho, 2006)	^b δ_{C} (C) ácido protocatecuico (Souza Filho,
1	-	129,0	-	129,9
2	7,4 (d, $J= 1,98$ Hz, 1H)	117,8	7,52 (d, $J= 1,8$ Hz, 1H)	117,8
3-OH	-	145,4	-	146,0
4-OH	-	149,4	-	151,4
5	6,7 (d, $J= 8,2$ Hz, 1H)	115,3	6,90 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H)	115,7
6	7,3 (dd, $J= 2,0; 8,2$ Hz, 1H)	123,2	7,47 (dd, $J= 1,8; 8,1$ Hz)	123,7
1'	-	174,5	-	170,2
CH₂	3,6 (q, $J= 7,0$ Hz, 2H)	58,3		
CH₃	1,15 (t, $J= 7,0$ Hz, 3H)	18,3		

[^a(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H); (δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]; [^b(δ -ppm, 75,45 MHz, CD₃OD)]

A literatura não reporta a existência de ácidos e ésteres fenólicos em *Aspidosperma verbascifolium*, sendo ambas as substâncias, ácido protocatecuico e 3,4-diidroxibenzoato de etilo descritas pela primeira vez nesta espécie.

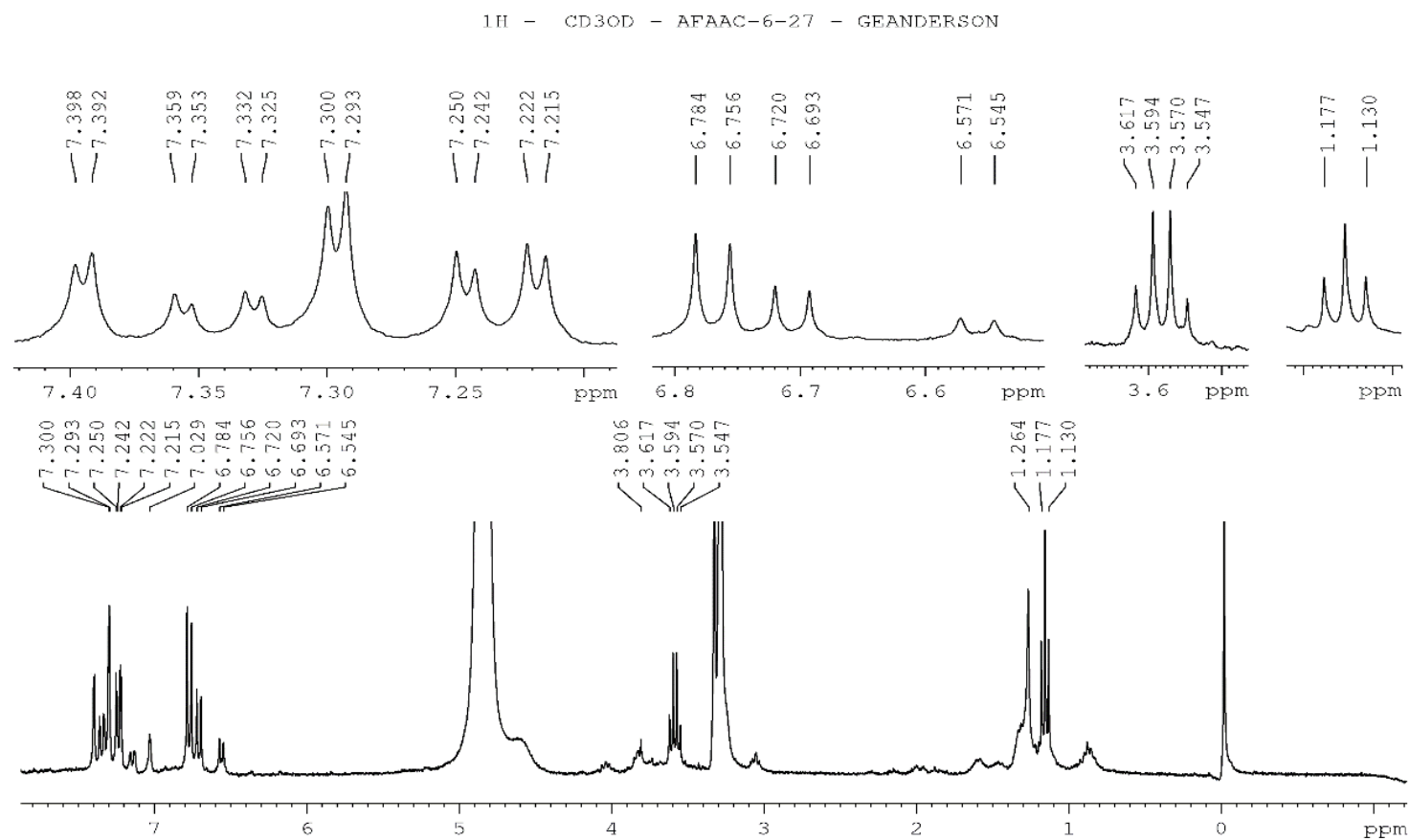


Figura 105. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-14+A-15

^{13}C - CD_3OD - AFAAC-6-27- GEANDERSON

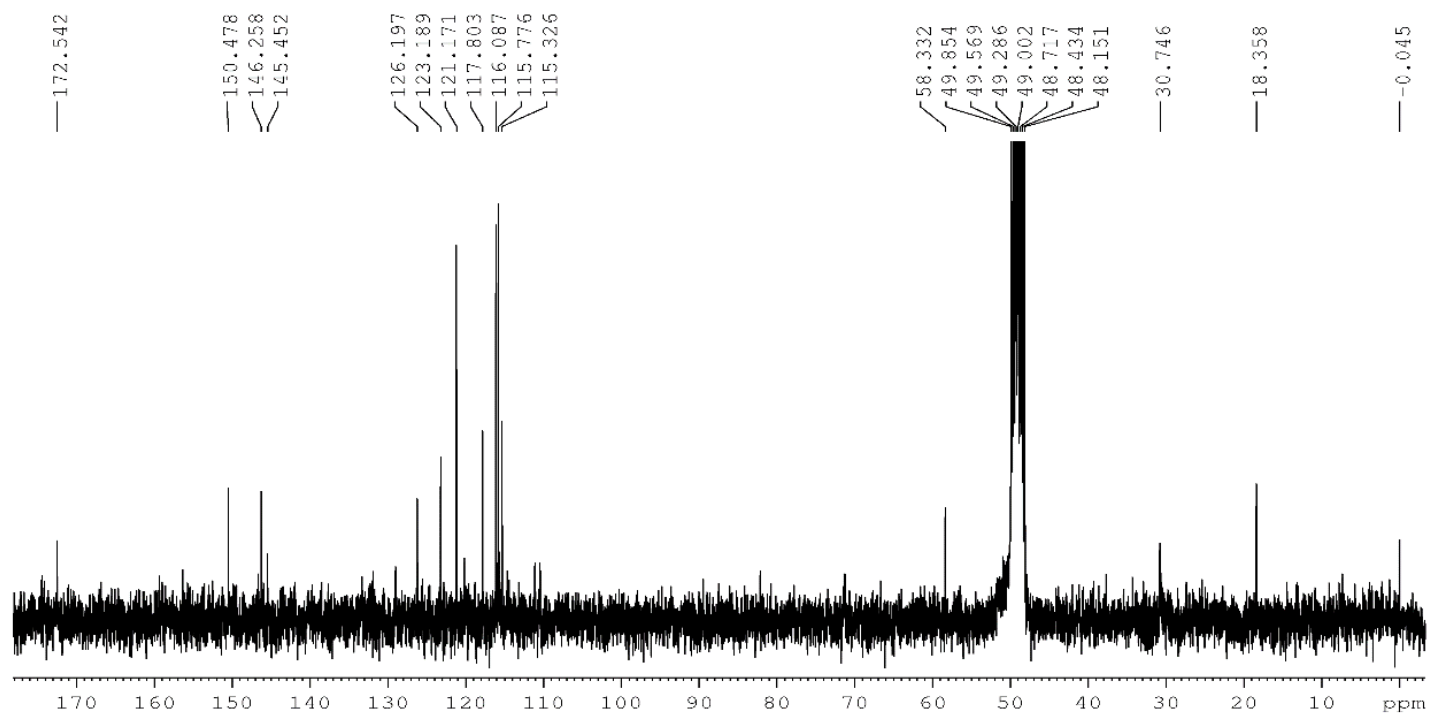


Figura 106. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz; CD_3OD) de A-14+A-15

4.5.4 Substância A-16

A substância **A-16** foi isolada da fração acetato de etila (AFAAc-9-6) e é solúvel em metanol (CH₃OH). Seu espectro de RMN de ¹H (**Figura 108**) apresentou sinais característicos de sistema aromático 1,3,4-trissubstituído, em δ_H 6,76 (d, $J= 8,4$ Hz; H-5') ; δ_H 7,04 (d, $J=2,1$ Hz; H-2') e δ_H 6,94 (dd, $J= 2,1$ e $8,4$ Hz; H-6'). Apresentou ainda sinais de hidrogênios olefínicos em *trans* em 7,58 (d, $J= 15,9$ Hz; H-7') e δ_H 6,26 (d, $J= 15,9$ Hz; H-8'), referentes a uma unidade cafeoíla. Sinais em δ_H 4,16 (d; $J=3,3$ Hz), δ_H 3,72 (dd, $J=3,3$ e $8,4$ Hz) e δ_H 5,32 (ddd, $J=9,3$; $9,3$; $4,5$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios oximetínicos H-3, H-4 e H-5, respectivamente (**Tabela 61**).

A posição do grupo cafeoíla em C-5 do esqueleto ácido quínico foi inferida com base no efeito de desproteção observado para H-5 (δ_H 5,32, ddd, $J=9,3$; $9,3$; $4,5$ Hz) quando comparado ao H-3 em δ_H 4,16 (d; $J= 3,3$ Hz) e H-4 em δ_H 3,72 (dd, $J= 3,3$ e $8,4$ Hz) (**Figura 108**, **Tabela 61**). Os valores de RMN de ¹H foram comparados com dados encontrados na literatura para o 5-O-cafeoilquínico (**Figura 107**) (Santos *et al.*, 2004) (**Tabela 61**) e mostraram-se concordantes.

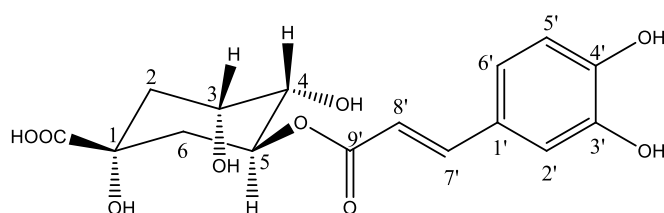


Figura 107. Estrutura química do ácido quínico **A-16** (5-O-cafeoilquínico)

Tabela 61. Dados de RMN de ^1H para **A-16** e comparação com dados de ^1H para o 5-O-cafeoilquínico descrito na literatura

C/H	δ_{H} (mult., J, Hz) ^a A-16	δ_{H} (mult., J, Hz) ^b 5-O-cafeoilquínico (Santos <i>et al</i> 2004)
1	-	-
2	2,06 (d, $J= 2,1$ Hz) 2,17 (dd, $J= 3,3; 10,8$ Hz)	2,05 (d, $J= 12,0$ Hz) 1,96 (d, $J=12,0$ Hz)
3	4,16 (d, $J= 3,3$ Hz)	4,26 (d, $J= 3,0$ Hz)
4	3,72 (dd, $J= 3,3; 8,4$ Hz)	3,87 (dd, $J=10,5; 3,0$ Hz)
5	5,32 (ddd, $J= 9,3; 9,3; 4,5$ Hz)	5,33 (td, $J= 10,5; 10,5; 4,6$ Hz)
6	2,10 (m)	2,15 (m)
7	-	-
1'	-	-
2'	7,04 (d, $J= 2,1$ Hz)	7,15 (d, $J= 1,8$ Hz)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,76 (d, $J= 8,4$ Hz)	6,91 (d, $J= 8,4$ Hz)
6'	6,94 (dd, $J= 8,4; 2,1$ Hz)	7,06 (dd, $J= 8,2; 1,8$ Hz)
7'	7,58 (d, $J= 15,9$ Hz)	7,60 (d, $J= 15,9$ Hz)
8'	6,26 (d, $J= 15,9$ Hz)	6,34 (d, $J= 15,9$ Hz)
9'	-	-

[(CD₃OD; 300,06 MHz para ^1H) (D₂O; 300,06 MHz para ^1H)]

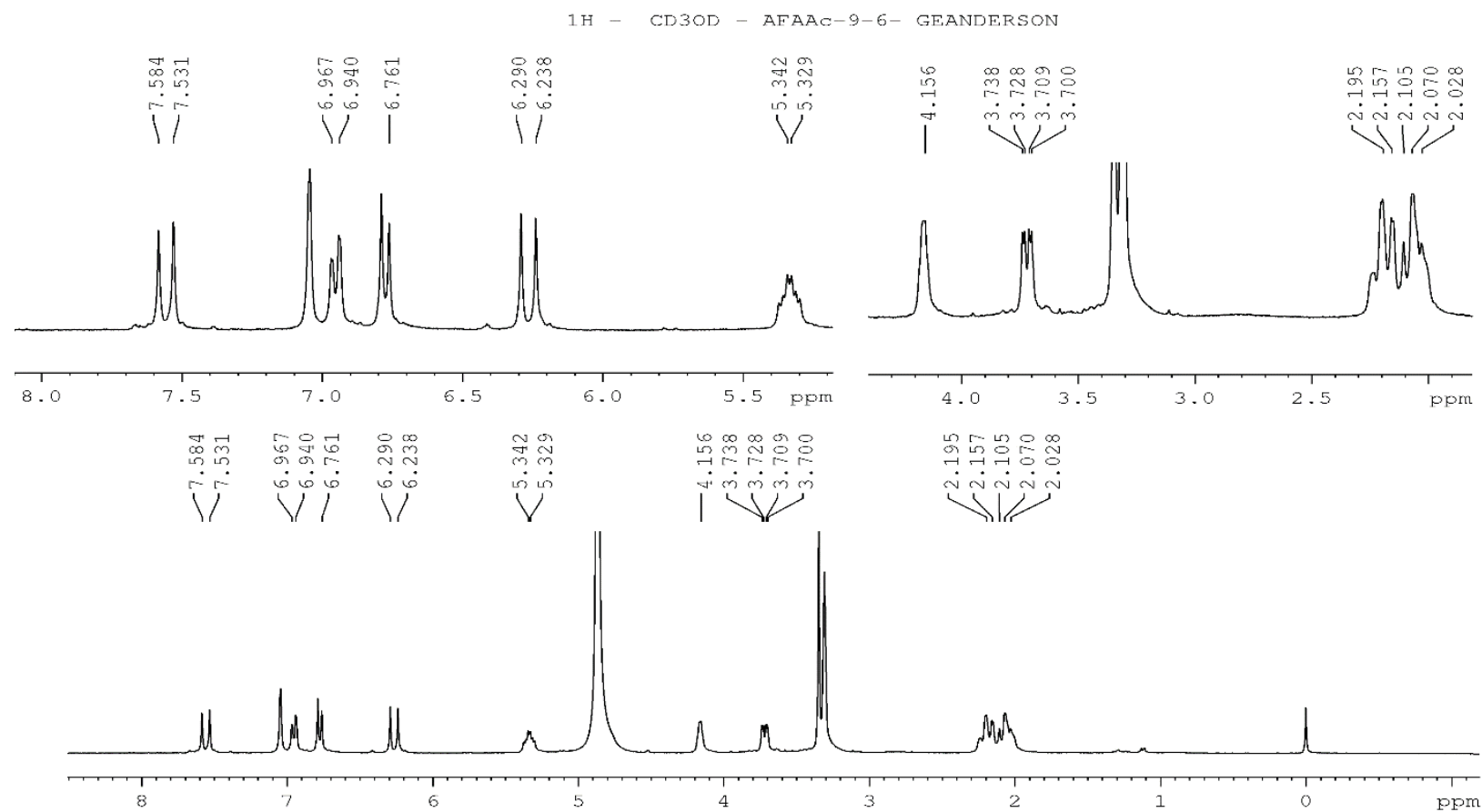


Figura 108. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; CD_3OD) de A-16

4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.6.1 Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico e frações das cascas, folhas e galhos de *Aspidosperma verbascifolium* foram avaliadas *in vitro*, frente a sete diferentes linhagens de células tumorais humanas: MCF7 (mama), HT-29 (cólon), 786-0 (rim), PC-03 (próstata), HL-60 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas), OVCAR-3 (ovário). Também foi incluída a linhagem não tumoral NIH/3T3 (ATCC–CRL 1658, fibroblasto murino) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro para a avaliação da citotoxicidade (Ojeda, 2015). O quimioterápico doxorrubicina foi utilizado como padrão de controle positivo.

O parâmetro GI_{50} , concentração que inibe 50% do crescimento celular, refere-se à atividade inibitória do crescimento. Segundo Itharat *et al.* (2004), são considerados ativos os extratos que apresentem GI_{50} menor que $30\mu\text{g/mL}$ o que representa a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% das células. Deste modo, é possível destacar alguns resultados da **Tabela 62**, cujas amostras apresentaram atividade antiproliferativa.

Tabela 62. Valores de GI₅₀* (µg/mL) dos extratos etanólico e fases da espécie *Aspidosperma verbascifolium* em linhagens celulares

Origem	Amostras	MCF7	HT-29	786-0	PC-03	HL-60	NCI-ADR/RES	OVCAR-3	NIH/3T3
Cascas	Extrato etanólico	24,02 ±1,24	244,12 ±4,0	25,58 ±2,05	>250	24,97 ±5,20	29,79 ±6,05	25,02 ±6,72	246,34 ±4,9
	Fase alcaloídica clorofórmica	20,93 ±7,0	242,43 ±5,0	25,99 ±2,58	249,35 ±6,0	0,25 ±0,08	25,42 ±7,85	4,22 ±4,56	68,21 ±7,0
	Fase acetato de etila	239,54 ±8,02	>250	34,04 ±5,20	>250	25,46 ±7,40	>250	28,56 ±2,8	>250
Folhas	Extrato etanólico	26,76 ±8,4	>250	17,78 ±3,2	>250	2,25 ±0,87	200,92 ±5,52	18,11 ±1,6	>250
	Fase alcaloídica clorofórmica	30,38 ±5,85	241,90 ±2,56	55,81 ±3,2	>250	22,09 ±1,04	35,38 ±6,35	25,52 ±3,0	56,63 ±7,1
	Fase acetato de etila	27,34 ±9,4	81,05 ±4,0	0,25 ±0,06	79,43 ±5,20	0,45 ±0,03	26,82 ±3,15	4,08 ±1,23	31,95 ±6,3
Galhos	Extrato etanólico	244,49 ±12,33	>250	>250	>250	22,06 ±2,34	>250	26,46 ±4,48	>250
	Doxorrubicina µg/mL	0,025 ±0,002	0,25 ±0,09	0,12 ±0,08	0,21 ±0,07	0,04 ±0,02	2,31 ±0,44	0,025 ±0,001	2,27 ±0,27
	Doxorrubicina µM**	0,04	0,43	0,21	0,36	0,07	3,98	0,04	3,91

*GI₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento celular; **GI₅₀: concentração em micromolar (µM); Linhagens de células tumorais humanas: MCF7 (mama), HT-29 (cólon), 786-0 (rim), PC-03 (próstata), HL-60 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas), OVCAR-3 (ovário). Linhagem não tumoral NIH/3T3 (fibroblasto murino); Doxorrubicina: controle positivo; Cada valor representa a média ± desvio padrão (S.D.) de três experimentos independentes.

Para a atividade inibitória de crescimento, o extrato bruto etanólico das cascas mostrou se ativo, apresentando valores de GI₅₀ menores que 30 µg/mL para a maioria das linhagens de células testadas e, portanto, da se destaque para as linhagens: mama (24,02 µg/mL, MCF7), rim (25,58 µg/mL, 786-0), leucemia (24,97 µg/mL, HL-60), ovário resistente a múltiplas drogas (29,79 µg/mL, NCI/ADR-RES) e ovário (25,02 µg/mL, OVCAR-3). Tendo fraca atividade para a linhagem de cólon (GI₅₀=244,1µg/mL) (Itharat *et al.*,2004). Merecendo destaque por mostrar se ativa em 4 das 7 linhagens neoplásicas testadas, o extrato etanólico das folhas tem como principal destaque a linhagem HL-60 (leucêmica) com valor para GI₅₀ de 2,25µg/mL. Destacam se ainda as linhagens MCF7 (mama), 786-0 (rim) e OVCAR-4 (ovário) com valores de GI₅₀ menores que 30µg/mL (Tabela). Para o extrato etanólico dos galhos destaca se apenas as linhagens leucêmicas (HL-60) e de ovário (OVCAR-3).

Tanto nas folhas quanto nas cascas de *Aspidosperma verbascifolium* estão presentes alcaloides como, por exemplo, a copsanona, este alcaloide foi testado por Bannwart e colaboradores frente a 11 linhagens de células carcinogênicas, e mostrou-se ativa frente às linhagens de célula de glioma e leucemia (Bannwart *et al.*, 2013), então, parte de nossa atividade leucêmica pode ser atribuída a presença desse alcaloide.

Para as células leucêmicas (HL-60) todas as amostras apresentaram valores de GI_{50} menores que 30 $\mu\text{g/mL}$, sendo que podemos destacar a fase alcaloídica clorofórmica e fase acetato de etila, que apresentaram valores de GI_{50} iguais a 0,25 e 0,45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Apesar de a fase acetato de etila mostrar boa atividade inibitória de crescimento frente à maioria das linhagens de células tumorais testadas, vale destacar que esta apresentou um baixo valor de GI_{50} (0,25 $\mu\text{g/mL}$) para as células de rim (786-0) e ovário (4,08 $\mu\text{g/mL}$, OVCAR-3).

A fase alcaloídica clorofórmica das cascas também apresentaram uma alta atividade inibitória de crescimento frente a células de ovário (OVCAR-3), uma vez que apresentou GI_{50} igual a 4,22 $\mu\text{g/mL}$, o mesmo não foi observado para a fase alcaloídica cloroformica das folhas frente à mesma linhagem de célula (GI_{50} 25,52 $\mu\text{g/mL}$). O alcaloide copsanona e o flavonoide quercetina identificados dessa fase possuem conhecida atividade anti carcinogênica (Bannwart *et al.*, 2013; Behling *et al.*, 2004), podendo ser atribuída a estes parte da atividade encontrada na fase.

Estudos de atividade antiproliferativa realizado por Bannwart e colaboradores em 2013 com o espécime *A. macrocarpon*, espécie está, inserida junto com *A. verbascifolium*, na série “macrocarpa” (Pereira *et al.*, 2007) relatou significativa atividade antiproliferativa do extrato metanólico das folhas de *A. macrocarpon* contra a linhagem neoplásica de leucêmica, com valor de GI_{50} igual a 0,51 $\mu\text{g/mL}$, sendo este resultado similar á atividade encontrada nesta mesma linhagem para o extrato bruto etanólico e fase acetato de etila das folhas de *A. verbascifolium*, com valores de GI_{50} 2,25 e 0,45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato metanólico das folhas de *A. macrocarpon* apresentou atividade na concentração 23,5 $\mu\text{g/mL}$ (Bannwart *et al.*, 2013), enquanto que o extrato etanólico das folhas de *A. verbascifolium* apresentou um valor de 18,11 $\mu\text{g/mL}$ na mesma linhagem. Valores observados para as linhagens de células carcinogenicas de mama (26,0 $\mu\text{g/mL}$, MCF-7) e carcinoma de ovário (23,5 $\mu\text{g/mL}$, OVCAR-3) para extrato metanólico das folhas de *A. macrocarpon* também mostraram

se bastante próximos aos apresentados nestas mesmas linhagens para o extrato etanólico das folhas de *A. verbascifolium* (GI₅₀ 26,76 e 18,11 µg/mL, respectivamente).

A avaliação das atividades antiproliferativas dos alcaloides isolados das cascas e folhas será realizada na próxima etapa deste trabalho.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de desreplicação utilizada para os extratos alcaloídicos clorofórmicos das cascas e folhas de um espécime de *A. verbascifolium* ocorrente no Cerrado de Mato Grosso do Sul por meio de análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas sequencial CLAE-DAD-EM/EM para a determinação do seu perfil químico possibilitou a detecção de diversos metabólitos secundários, sendo eles: os alcaloides indólicos aspidofractina, copsanol, 22-epicopsanol, copsanol-*N*-óxido, 5-oxo-copsanol, N_{α} -formilcopsanol, copsanona, copsanona-*N*-óxido, 5,22-dioxocopsano, copsinina, epicopsinina, copsinina-*N*-óxido, ácido 5-oxocopsinico, além dos flavonoides quercetina, kaempferol, isoramnetina e do fenilpropanoide cafeato de metila.

O estudo químico das folhas e cascas visando ao isolamento e caracterização de seus metabólitos secundários, particularmente alcaloides, também foi realizado. Das folhas foram obtidos derivados de alcaloides indólicos monoterpênicos já descritos previamente em espécies do gênero *Aspidosperma*, como a copsanona, copsanona-*N*-óxido, copsanol-*N*-óxido e 5,22-dioxocopsano, sendo os três últimos descritos pela primeira vez na espécie, além ainda da copsinina-*N*-óxido, relatado pela primeira vez no gênero. Além dos alcaloides, também foi isolado e caracterizado o cafeato de metila.

Das cascas foram obtidos os alcaloides indólicos, copsanol, copsanol-*N*-óxido, 5-oxocopsanol, os esteroides β -sitosterol e estigmasterol e os flavonoides quercetina e kaempferol. Além do ácido 5-*O*-cafeoilquínico, etil- β -D-glucopiranosídeo, ácido protocatecuico e 3,4-diidroxibenzoato de etila.

Para a avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa foram utilizadas sete diferentes tipos de tecidos, MCF7 (mama), HT-29 (cólon), 786-0 (rim), PC-03 (próstata), HL-60 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplas drogas), OVCAR-3 (ovário). Para avaliação da citotoxicidade, analisada por meio do índice de seletividade (IS), utilizou-se a linhagem normal NIH/3T3 (fibroblasto murino). Dentre os extratos, o extrato bruto das cascas foi quem apresentou alta atividade inibitória de crescimento frente a um maior numero linhagens celulares. Forte atividade inibitória frente a células de ovário (OVCAR-3) foi encontrada na sua fase alcaloídica-clorofórmica. Para as células leucêmicas (HL-60) todas as amostras apresentaram valores de GI_{50} menores que 30 μ g/mL, sendo que podemos destacar a fase alcaloídica-clorofórmica das cascas e fase acetato de etila das folhas, que apresentaram valores de

GI₅₀ iguais a 0,25 e 0,45 µg/mL, respectivamente, com uma alta seletividade para a linhagem leucêmica (IS=272,8 e 71,0) em relação às células não tumorais. Também foi fortemente ativa a fase acetato de etila das folhas frente as linhagens 786-0 e OVCAR-3 com GI₅₀ de 0,25 e 4,08 µg/mL, com alta seletividade para estas linhagens (IS=172,8 e 7,83).

Diante dos resultados espera-se que o estudo desenvolvido com a espécie *A. verbascifolium* venha a contribuir para a ampliação do conhecimento do potencial químico e farmacológico de espécies presentes no ecossistema do cerrado brasileiro, ficando evidente a importância da realização de estudos fitoquímicos e do desenvolvimento de métodos racionais que auxiliem na identificação metabólica em matrizes vegetais, tornando o estudo de produtos naturais mais eficientes na busca por moléculas que tenham potencial biológico (bioativas). Os metabólitos copsanona-*N*-óxido, copsanol-*N*-óxido, 5,22-dioxocopsano e copsanol-*N*-óxido relatados pela primeira vez em *A. verbascifolium*, o alcaloide copsinina-*N*-óxido está sendo relatada pela primeira vez no gênero. Os esteroides β-sitosterol e estigmasterol e os flavonoides quercetina e kaempferol, além do ácido 5-*O*-cafeoilquínico, etil-β-*D*-glucopiranosídeo, ácido protocatecuico, 3,4-diidroxibenzoato de etilo também tem seu primeiro relato em *Aspidospermas*. Este estudo também foi significativo do ponto de vista quimiotaxonômico, pois foi observado que as espécies *A. verbascifolium*, *A. macrocarpon* e *A. duckei* pertencentes a série *Macrocarpa* estão quimicamente relacionadas, visto que, os principais alcaloides encontrados nessas espécies são idênticas. Os resultados deste estudo podem auxiliar assim na correta classificação botânica desta espécie dentro do gênero *Aspidosperma* e da família Apocynaceae.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. **Food and Chemical Toxicology**. v. 39, p. 493-498, 2001.

ACHENBACH, H.; BIEMANN, K. 10,22- Dioxokpsane, N_a- Methyl-10,22-dioxokopsane, and N_a- Carbomethoxy-10,22-dioxokopsane. Three New Alkaloids of *Pleiocarpa mutica* Benth. **Journal of the American Chemical Society**. v. 87, p. 21, 1965.

AGUIAR, G. P.; WAKABAYASHI, K. A. L.; LUZ, G. F.; OLIVEIRA, V. B.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; CROTTI, A. E. M. Fragmentation of plumeran índole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 24, p. 295–308, 2010.

ALMEIDA, M. R. ‘Pereirina: o primeiro alcalóide isolado no Brasil? Caracterização de alcalóides em extratos etanólicos de *Geissospermum vellosii* por CLAE e EM-IES’ (tese de mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

ALPER, K.R. Ibogaine: A review. The Alkaloids. **Chemistry and Biology**. v. 56, p. 1-38, 2001.

ALLORGE, L.; POUPAT, C. Position systématique el révision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trios Guyanes. Le point sur leer chimique. **Letters Botaniques**, v. 138, n. 415, p. 267-301, 1991.

ARMIÓN, A. G.; PEIXOTO P. V.; BARBOSA, J. D.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Nerium oleander* (Apocinaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 14, p. 85-93, 1994.

AMORIM, I. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. L. Flora e estrutura da vegetação arbustiva- arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 615-623, 2005.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, R. A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 4092–4095, 2005.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C.; SILVA, E. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C.; SILVA, L. F.; COSTA, M. R.; NUNOMURA, R. C.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G.; CHAVES, F. C. e VIEIRA, P. P. *In vitro* inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. Mem **Inst Oswaldo Cruz**, v.102. n.3. p 359-66. 2007.

ARAÚJO JÚNIOR, J. X.; ANTHERAUME, C.; TRINDADE, R. C. P.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J. J.; SANT'ANA, A. E. G. Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 183-188, 2007.

BALACHANDRAN, C.; EMI, N.; ARUN, Y.; YAMAMOTO, Y.; AHILAN, B.; SANGEETHA, B.; DURAIPANDIYAN, V.; INAGUMA, Y.; OKAMOTO, A.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N.A.; PERUMAL, P. T. *In vitro* anticancer activity of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. Fruit. **Chemico-Biological Interactions**. v. 242, p. 81-90, 2015.

BANNWART, G. “Contribuição ao estudo da espécie *Aspidosperma macrocarpon* da família Apocynaceae da região do cerrado: fitoquímica e avaliação biológica”. Maringá, 2012, p. 118. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química- PQU – Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas - CCE, Universidade Estadual de Maringá, 2012.

BANNWART, G.; SANTIN, S. M. O.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. Antiproliferative Activity and Constituents of *Aspidosperma macrocarpon* (Apocynaceae) Leaves. **Records of Natural Products**, v. 7, n. 2, p. 137-140, 2013.

BARRACA, S. A. Relatório do Estágio Supervisionado Produção Vegetal II: Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas. Piracicaba, Julho de 1999.

BARATTO, L. C. Estudo químico-analítico e morfoanatômico de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (Müll Arg.) Woodson e *Rauvolfia sellowii* Müll Arg. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná/ UFPR, Curitiba, 2010.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G. B. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 3, p.326, 1991.

BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Morfologia polínica das espécies arbóreas de Apocynaceae do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 577-582, 2 tab., 27 fig., 2008.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BISHT, K. S.; GROSS, R. A.; CHOLLI, A. L. Enzymatic Polymerization of Poly(e - CL) Containing na Ethyl Glucopyranoside Head Group: An NMR Study. **Applied Spectroscopy**, v. 52, n. 11, 1998.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRAEKMAN, J. C.; HOOTELE, C.; VAN MOORLEGHEM, C.; KAISIN, M.; PECHER, J.; ANTONACCIO, L. D.; GILBERT, B. XVII. Five dihydroindole alkaloids from *Aspidosperma verbascifolium*. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**. v. 78, p. 63-68, 1969.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L.M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187-200, 1987.

BOOTH, M. **Opium: A History**. New York, ST Martin's Griffin, 1998.

BUDMAN, N. L. Encapsulation of vincristine in liposomes reduces its toxicity and improves its antitumor efficacy. **Journal of Liposome Research**, v. 5, n. 3, p. 523-541, 1997.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta Médica da Bahia*. Bahia, v. 78, suplemento 1, p. 98- 106, 2008.

CARLOS, L. A. Alcalóides de *Rauvolfia grandiflora* E DE *Rauvolfia mattfeldiana* (Apocynaceae). Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2007.

CARMO, H. M.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. A Novel Alkaloid from *Aspidosperma pyricollum* (Apocynaceae) and Complete ¹H and ¹³C Chemical Shift Assignments. **Helvetica Chimica Acta**. v. 98, p. 1381-1386, 2015.

CARVALHO, M. G.; CRANCHI, D. D.; KINGSTON, D. G. I.; WERLE, A. A. Proposed active constituents of *Dipladenia martia*. **Phytother Research**, v. 15, p. 715, 2001.

CARVALHO, P. E. R.. **Circular Técnica 96**. Embrapa. p.1-12. Peroba-Rosa - *Aspidosperma polyneuron*. Colombo, PR. Dezembro, 2004.

CHATURVEDULA, V. S. P.; HECHT, S. M.; GAO, Z.; JONES, S. H.; FENG, X.; KINGSTON, D. G. I. New neolignans that inhibit DNA Polymerase β Lyase. **Journal of Natural Products**, n. 67, p. 964-967, 2004.

CHIERITO, T. P. C.; AGUIAR, A. C. C.; ANDRADE, I. M.; CERAVOLO, I. P.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; KRETTLI, A. U. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malaria Journal**, v.13, p.142, 2014.

CLARK-LEWIS, J. W.; RANSAY, G. C. XIII. The formation of 1,3-diarylpropan-2-ols and 2,3-diarylpropan-1-ols from flavan-3-ol. FLAVAN DERIVATIVES. **Australian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 389-400, 1965.

CORBETT, C. E. Hipnoanalgésico. Elementos de Farmacodinâmica, 2ª Ed, São Paulo, Editora **Artes Médicas**, p. 217-234, 1966.

COHEN, M. M - The history of opium and opiates. **Texas Medical**, v. 65, p. 76-85, 1969.

CORDELL, G. A.; QUIRN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

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

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. 1931.

CORREIA, A. Atropina e Hiosciamina – Suas aplicações biológicas. Documentação e informação, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Janeiro, 2005.

CORREIA, C. R. D.; COSTA, P. R. R.; FERREIRA, V. F. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 74-81, 2002.

COMINS, D. L.; ZHENG, X.; GOEHRING, R. R. Total Synthesis of the Putative Structure of the Lupin Alkaloid Plumerinine. **American Chemical Society. Organic Letters**. v. 4, n. 9, p. 1611-1613, 2002.

COSTA, N. F. Uma abordagem diferenciada sobre fitoterápico com alunos de ensino médio. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de biologia Roberto Alcantara Gomes. Departamento de ensino de Ciências e Biologia. Trabalho de conclusão de curso. 2010.

DALMARCO, J. B. *Lotus comiculatus* L. cv. São Gabriel: análise fitoquímica e atividade biológica. Florianópolis, p. 91. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSCCHI, R.; LOPESA, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Products Reports**. v. 33, n. 3, p. 367-524, 2016.

DE OLIVEIRA, J. M.; JORDÃO, B. Q.; RIBEIRO, L. R.; DA EIRA, A. F.; MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p. 1775-1780, 2002.

DE OLIVEIRA, M. C.; CARVALHO, M. G. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* mikan. **Química Nova**. v. 22, n. 2, 1999.

DEUTSCH, H. F.; EVERSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from *Aspidosperma* tree source. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical analysis**. v. 12, n. 30, p. 1283-1287, 1994.

DJERASSI, C.; GORMAN, M.; NUSSBAUM A. L.; REYNOSO, J. Alkaloid Studies. V. The Isolation of Reserpine, Serpentine and Ajmaline from *Rauwolfia hetevophyllu Roem and Schult*. v. 76, p. 4463-4465, 1954.

DI STASI, L. C. Asteridae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2º ed. São Paulo: Editora UNESP, p. 372-93, 2002.

DUARTE, D. F. Curarizantes - Das Suas Origens aos Dias de Hoje. **Revista Brasileira Anesthesiol**. v. 4, n. 50, p. 330 – 336, 2000.

DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Revista Brasileira Anesthesiol**. v.1, n. 55, p. 135–146, 2005.

EVANS, W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy. 15. ed. Londres: Saunders. p.585, 2002.

ENDRESS, M. E. Apocynaceae: Brown and now. **Telopea**. v. 10, p. 525-541, 2004.

ENDRESS, M. E.; LIEDE, S. S.; MEVE, U. Advances in Apocynaceae: The enlightenment, an introduction. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 94, p. 259-267, 2007.

ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* GOMES (Apocynaceae): Inibição da enzima conversora de angiotensina (eca) e efeito na quimioprevenção de câncer. Belo Horizonte, MG Faculdade de Farmácia da UFMG Agosto, 2007. Tese de doutorado.

FARNSWORTH, N. R. **Bioactive Compounds from Plants**, ed. D. J. Chadwick e J. Marsh, Ciba Foundation Symposium 154, John Wiley & Sons, Chichester, USA, p.2, 1990.

FERREIRA FILHO, J. M.; GILBERT, B.; KITAGAWA, M.; PAES LEME, L.A.; DURHAM, L. J. Four Heptacyclic Alkaloids from *Aspidosperma* Species. **Journal of the Chemical Society**, p. 1260-1266, 1966.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, n.7, 2006.

FRESHNEY, I.R. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5ª ed., Wiley-Liss: New York, 2005.

GALEY, F. D. Cardiac glycosides, p. 386-388, 2004. In: Plumlee K.H. (Ed.), **Clinical Veterinary Toxicology**. Mosby, St Louis, Missouri.

GAMIER, J.; MHUTEAU, J. Difforlemenine, alcaloide moweau de *vinca difformis* pourr. determination de structure par rmn du ^1H à 400 MHz. **Tetrahedron Letters**. v. 26, n. 12, p. 1513-1514, 1985.

GAN, C. Y.; LOW, Y. Y.; ETOH, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; KAM, T. S. Leuconicines A-G and (-)-Eburnamaline, Biologically Active Strychnan and Eburnan Alkaloids from *Leuconotis*. **Journal Natural Products**. v. 72, p. 2098–2103, 2009.

GARNIER, J.; MAHUTEAU, J. A new alkaloid difforine and normacusine B from *Vinca difformis*. *Planta Medica*. v. 1, p. 153-161, 1986.

GARCIA, B.; LATORRE, S.; TORRE, F.; GÓMEZ, C.; POSTIGO, S.; CALLEJO, A.; ARIZAGA, A. Hidromorfona: uma alternativa em el tratamiento del dolor. **Revista de la Sociedad Española del Dolor**. v. 17, p. 153-161, 2010.

GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1093-1095, 1976.

GILBERT, B.; ANTONACCIO, L. D.; ARCHER, A.A.P.G.; DJERASSI, C. Alkaloid studies. XXIII. Isolation of four new *Aspidosperma* alkaloids-cylindrocarpine, refractine, pyrifoline, and pyrifolidine. **Experientia**, v. 16, p. 61-62, 1960.

GILBERT, B.; DUARTE, A. P.; NAKAGAWA, Y.; JOULE, J. A.; FLORES, S. E.; BRISSOLESE, J. A.; CAMPELLO, J.; CARRAZZONI, E. P.; OWELLWN, R. J.; BLOSSEY, E. C.; BROWN, Jr., K. S.; DJERASSI, C. **Tetrahedron**, v. 21, p. 1141, 1965.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, BRASIL. **Acta Botanica Brasilica**. v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989.

GONZAGA, A.L. Madeira: Uso e Conservação. **Cadernos Técnicos 6**. Brasília, DF: Iphan monumenta, 2006.

GOLONI, R.; ALVES, N. M.; GARROTE, C. F. D.; PAULA, J. R.; VALADARES, M C.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C. ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA DO *Aspidosperma subincanum* MARTIUS. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**. v. 2, n. 2, p. 89-91, 2005.

GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica/editores responsáveis: Joel G. Hardman, Lee E. Limbird; editor- consultor, Alfred Goodman Gilman; [tradução da 10ª. ed. Original, Carla de Mello Vorsatz.. et al.; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca.]. – McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2005.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GRUJIĆ, S. M.; RADOJEVI, I. D.; VASI, S. M.; OMI, L. R.; TOPUZOVI, M. D. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Secondary Metabolites from *Vinca minor* L. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 51, n. 5, p. 572–578, 2015.

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation And Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen**. v. 6, p. 347-377, 1984.

HARBORNE, J. B, MABRY, T. J, MABRY, H. **The flavonoids**. Academic Press: New York, 1975.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. Cap. 29, p. 651-666. In: SIMÕES, C. M. O.; SEBENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3ed. Rev. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / Ed. Da UFSG / p. 833, 2001.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377-387, 2007.

HUEBNER, R. J.; HARTLEY, J. W.; WARD, T. G.; PARROTT, R. H. **American Journal Hygiene**. v. 61, p. 197, 1955.

JENKS, C. W. Extraction studies of *Tabernanthe iboga* and *Voacanga africana*. **Natural Product Letters**, v. 16, p. 71-76, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10ª ed. São Paulo: Editora Nacional. v. 4, p. 777, 1991.

JONES, S. B.; SIMMONS, B.; MASTRACCHIO, A.; MACMILLAN, D. W. C. The Collective Synthesis of Natural Products via Organocascade Catalysis. **Supplementary information**, 2011.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHU, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. Tradução André Olmos Simões *et al.*, 3 ed. Porto Alegre: Artmed. p. 632, 2009.

KAM, T. S.; CHOO, Y. M. Venalstonine and dioxokopsan derivatives from *Kopsia fruticosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2119–2122, 2004.

KAM, T-S.; SUBRAMANIAM, G.; CHEN, W. Alkaloids from *Kopsia dasyrachis*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 159-169, 1999.

KAZMI, S.; Ahmed, Z.; Ahmed, W.; Malik, A., Plumerinine a novel lupine alkaloid from *plumeria rubra*. **Heterocycles**, v. 29, n. 10, p. 1906, 1989.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; BANNWART, G.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; GONTIJO, B.; SILVA, C.C.; FERREIRA, H. D.; HEYDEN, Y. V.; PASSOS, C. S.; HENRIQUES, A. T.; SANTIN, S. M. O. Kopsanone and N(4)-oxide-kopsanone: two β -carbolinic indole alkaloids with monoamine oxidase A inhibitory activity. **Planta Medica**. v. 81,p. 119, 2015.

KITAJIMA, M.; ANBE, M.; KOGURE, N.; WONGSERIPIPATANA, S.; TAKAYAMA, H. Indole alkaloids from *Kopsia jasminiflora*. **Tetrahedron**, v. 70, p. 9099-9106, 2014.

KLOHS, M. W.; KELLERR, F.; WILLIAMS, E.; KUSSEROW, G. W. Alkaloids of *Rauwolfia Canescens* Linn. IV. The Structure of Pseudoreserpine. v. 79, p. 3763-3765, 1957.

KONTRIMAVICIUTÈ, V.; MATHIEU, O.; MATHIEU-DAUD, J. C.; VAINAUSKAS, P.; CASPER, T.; BACCINO, E.; BRESSOLLE, F. M. M. Distribution of Ibogaine and

Noribogaine in a Man Following a Poisoning Involving Root Bark of the *Tabernanthe iboga* Shrub. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, p. 434-440, 2006.

KOENING, X.; HILBER, K. The Anti-Addiction Drug Ibogaine and the Heart: A Delicate Relation. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2208–2228, 2015.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: Rima, 2000.

LEEUWENBERG, A. J. M. Taxa of the Apocynaceae above the genus level. Series of revisions of Apocynaceae XXXVIII. **Wageningen Agricultural University Papers**. v. 94, n. 3, p. 47-60, 1994.

LIM, K. H.; HIRAKU, O.; KOMIYAMA, K.; KOYANO, K.; HAYASHI, M.; KAM, T. S. Biologically Active Indole Alkaloids from *Kopsia arborea*. **Journal Natural Products**, v. 70, p. 1302-1307, 2007.

LIM, K. H.; LOW, Y. Y.; TAN, G. H.; KAM, T. S. Kopsine and Danuphylline Alkaloids from *Kopsia*. Biomimetic Partial Synthesis of Danuphylline B. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, 2008.

LIU, L.; CAO, J-X.; YAO, Y-C.; XU, S-P. Progress of pharmacological studies on alkaloids from Apocynaceae. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 2, p. 166–184, 2013.

LOTSOF, H. S. Ibogaine in the Treatment of Chemical Dependence Disorders: Clinical Perspectives. **Mpas**, v. 5, n. 5, 1995.

LOPES, J. F. Ioimbina e uleína isolados de *Himatanthus lancifolius* (Muell.-Arg.) Woodson, Apocynaceae. Dissertação de Mestrado. 2008.

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

MABRY, T. J.; ULUBELEN, A. Flavonoids and related plant phenolics. In: WALLER, G. R.; DERMER, O. C. **Offprints from biochemical applications of mass spectrometry**. London: John Wiley & Sons, Cap. 35. 1980.

MACHATE, D. J.; ALVES, F. M.; FARINACCIO, M. A. *Aspidosperma* (Apocynaceae) no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 4, p. 1011-1024, 2016.

MARCH, R. E.; MIAO, X, S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, p. 157–167, 2004.

MABRY, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**, p. 58-65-77, 1970.

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos Naturais: Um Voo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, v.32, n. 9, p. 2501-2507, 2009.

MARTINS, L, R. R.; CORTEZ, L. E. R.; DIAS-FILHO, B, P.; NAKAMURA, C, V.; FERREIRA, A, G, F.; CORTEZ, D, A, G. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ^1H e ^{13}C do acetato de acantoaustralida. **Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 490-496, Out./Dez. 2006.

MANN, J. Secondary Metabolism. 2.ed. Oxford Science Publication, p. 374, 1987.

MAZZEI, L; RUSCHEL, A. Estoque comercial para o segundo ciclo de corte na floresta nacional do tapajós – área experimental KM-67 – EMBRAPA. p.161-166. 2º Seminário de Pesquisa Científica da Floresta Nacional do Tapajós. Anais do 2º seminário de pesquisa científica da Floresta Nacional do Tapajós.

MEDEIROS, L. F. S.; PEREIRA, M. Espécies com princípios tóxicos, empregados na arborização urbana do bairro Nossa Senhora das Graças-Miguelópolis, SP. **Nucleus**, v. 5, n. 2, p. 209-220, out. 2008.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165–170, 2007.

MITAINE, A. C.; MESBASH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, C.; ARRAZOLA, S.; MORETTI, C.; ZECHES-HANROT, M.; Alkaloides from *Aspidosperma* species from Bolívia. Le Men Olivier, L. Faculte Pharmacie, CNRS, Reims, Fr. **Planta Médica**, v. 62, n. 5, p. 458-461, 1996.

MITAINE, A. C.; WENINGER, B.; SAUVAIN, M.; LUCUMI, E.; ARAGON, R.; ZECHES-HANROT, M. Indole alkaloid from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. **Planta Medica**, v. 64, p. 487, 1998.

MORAGAS, C. J. Tese de doutorado, Rio de Janeiro, Brasil, 2006. Estudo do gênero *Himatanthus*: anatomia vegetal, fitoquímica, farmacologia e biotransformação. 2006.

MORENO, P. R. H.; POULSEN, C.; HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 18, p. 99-107, 1996.

MONKS, A. D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MUKHOPADHYAY, S.; CORDELL, G. A. **Tetrahedron**, v. 39, p. 3639, 1983.

NEUSS, N. Alkaloids from Apocynaceae. Ibogaline, a New Alkaloid from *Tabernanthe iboga* Baill. **Journal Organic Chemistry**. v. 24. p. 2047-2048, 1959.

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, A. A consensus classification for the order Gentinales with additional details on the suborder Apocynineae. **Botanical Reviews**, v. 60, p. 440-482, 1994.

NOBLE, R. L. The Discovery of the vinca alkaloids – chemotherapeutic agents against câncer. **Biochemistry and Cell Biology**. Reviews/syntheses. n. 68. p. 1344-1351, 1990.

NOGUEIRA, P. C. L.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; RIBEIRO, A. S.; MORAES, V. R. S.; MACHADO, S. M. F.; ALVES, P. B.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H. Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae do Estado de Sergipe. II Seminário de Pesquisa FAP-SE. p. 1-3, 2004

OJEDA, M. Atividade antineoplásica *in vitro* da espécie *Aspidosperma verbascifolium* Müll.Arg. (Apocynaceae). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS. Trabalho de conclusão de curso – TCC. Curso de Farmácia. Campo Grande – MS, dezembro – 2015.

OLIVEIRA, C. B.; KNISS, C. T.; DIAS, L. B.; BACAICOA, M. H. Estudo da nicotina através da quimioprevenção. **Revista Ibirapuera**, n. 1, p. 26-30, 2011.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira Planta Medica**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

OLIVEIRA, M. P.; COSTA, C. D. F.; HERCULANO, E. A.; AQUINO, P. G. V.; SANT'ANA, A. E. G.; RIBEIRO, Ê. A. N.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Cardiovascular effects of the *Aspidosperma macrocarpum* leaves ethanol extract in rats, v. 1, p. 102–107, 2012.

OLIVEIRA FILHO, A. T. Espécies de ocorrência do domínio do cerrado e da caatinga. In: OLIVEIRA FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R.(Ed.). **Inventário Florestal de Minas Gerais: Espécies Arbóreas da Flora Nativa. Lavras: UFLA.** cap. 8, p. 547-575, 2008.

PAIS, T. A. “Drug Profiling: O caso da Heroína”. Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense. Universidade de Coimbra. Setembro 2011.

PEÇANHA, J. S. “Identificação dos constituintes químicos das folhas de um espécime de *Aspidosperma verbascifolium* (Apocynaceae) ocorrente no Cerrado de Mato Grosso do Sul”. Trabalho de conclusão de curso, UFMS. 2016.

PEDROSO, P. M. O.; BANDARRA, P. M.; BEZERRA-JÚNIOR, P. S.; RAYMUNDO, D. L.; BORBA, M. R.; LEAL, J. S.; DRIEMEIER, D. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 29, n. 5, p. 404-408, 2009.

PEDROZA, H. P., FERREIRA, M. G., CARVALHO, J. G., MELO, K. D. A., KELLER, K. M., MELO, M. M., BLANCO, B. S. Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores da floração. **Ciência Rural**, 2014.

PEREIRA, M. M. Alcalóides Indólicos Isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PILLI, R. A.; CORRÊA Jr, I.; MALDANER, A. O.; ROSSO, G. B. Total synthesis and structural elucidation of natural products: (–)-Delactonmycin, (+)-plumerinine, and (–)-parvistemoamide. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 7, p. 1153–1160, 2005.

PINTO, A. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPEMA J. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Legminosae). **Química Nova**. v. 26, p. 466-46, 2003.

RAPINI, A.; Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000. Apud. PEREIRA, M. M. Alcalóides Indólicos Isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

REIS, B. M. M. S. Síntese de derivados de ácidos fenólicos e estudo da sua actividade antioxidante. Dissertação de Mestrado. Engenharia Química, ISEP, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2008.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; GOOIJER, C. F. A.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31–63, 2006.

RIZZO, J. M.; NASCIMENTO, M. E. C.; NASCIMENTO, V. C. Hidromorfona de liberação lenta: uma nova opção agonista opioide forte. **Revista Dor**. v. 11, n. 1, p. 68-73, 2010

ROBERTS, M. F.; WINK, M. Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. New York: **Plenum Press**. p. 486, 1998.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmac**, v. 1, p. 364-369, 2001.

SANTOS, A. R., BARROS, M. P., SARRAGIOTTO, M. H., SANTIN, S. M. O. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 525-527, 2004.

SEBBEN, C. Investigação Química e Biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmaceuticas. Dissertação de Mestrado. 2005.

SENNBLAD B.; BREMER B. Classification of Apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. **Systematic Biology**, v. 51, p. 389-409, 2002.

SHAVEL, J. Jr.; STRANDTMANN, M. M. V.; TOWNSHIP, R.; COHEN, M. P. Heterocyclic substituted indazole compounds and process therefor. Patented Oct. 6, 1964. United States Patent Office.

SINGH, R.; SINGH, B.; SINGH, S.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; ARORA, S. Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. Toxicology *in Vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1965–1970, 2008.

SILVA, J. A.; LEITE, E. J.; NASCIMENTO, A. R. T.; REZENDE, J. M. Padrão de distribuição espacial e diamétrica de indivíduos de *Aspidosperma* spp na reserva genética florestal Tamanduá, DF. Comunicado Técnico 119, 2004.

SMITH, W. A Dictionary of Greek and Roman Biography and Mythology. London, United Kingdom: I. B. Tauris; 1 eq, 2007.

SIMÕES, SCHEKEL, GOSMANN, MELLO, MENTZ, PETROVICK. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª edição, UFRGS editora, 2007.

SILVEIRA, N. P. R. *Atropa Beladona*. Curso de Formação de Especialista em FARMACOTÉCNICA HOMEOPÁTICA. Instituto de Hahnemanniano do Brasil. Turma de 1991-1992.

SOARES, H. L. R.; MOSCON, J. A.; MOREIRA, L. G.; BASTOS, R. B.; OLIVEIRA, R. W. D. Dependência de opióides. Uma Revisão da Literatura. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Dependência Química da Universidade Federal de São Paulo como pré-requisito parcial para a obtenção ao Título de Especialista em Dependência Química. SÃO PAULO, DEZEMBRO DE 2008.

SING, S. N.; VATS, P.; SHYAM, S. S, R. Effect of antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats, **Journal Ethnopharmacol**, v. 76, n. 3, p. 269-77, 2001.

SOUZA, S. A.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Flavonóides da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke). XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Bento Gonçalves, RS, 2012.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia de ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum. p. 704, 2008.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Revista Fitos**, p. 25-42, 2007.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

TAVARES, C. T.; SANTANA, A. L. B. D. Estudo químico da madeira de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Pereiro). XII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – **JEPEX 2013** – UFRPE: Recife, 09 a 13 de dezembro.

TEIXEIRA, V. A.; COELHO, M. F. B.; MING, L. C. Poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stoves]: aspectos da memória cultural dos poaieiros de Cáceres - Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira Planta Medica, Botucatu**, v. 14, n. 2, p. 335-343, 2012.

TRINDADE, R. C. P.; SILVA, P. P.; ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; LIMA, I. S.; DE PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1813-1816, 2008.

TOFÓLI, D. Busca de substâncias bioativas em Lauráceas de Mato Grosso do Sul: constituintes fixos e voláteis de *Aniba heringerii vattimo-gil* e *Mezilaurus crassramea* (Meissner) Taubert ex Mez. Dissertação de Mestrado – UFMS, Campo Grande, MS, 2013.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <www.tropicos.org>. Acesso em: 17 fev 2016.

TORRES, Z. E. S.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, L. F. R.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ-FILHO, R.; POHLIT, A. M. Chemical Composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and Antiplasmodial Activity of Selected Indole Alkaloids. **Molecules**. v. 18, p. 6281-6297, 2013.

TWYFORD, K. L.; BAXTER, G. S. Chemical control of blue periwinkle (*Vinca major* L.) in Croajingolong National Park, Victoria. **Plant Protection Quarterly**, v. 14, n. 2, p. 47-50, 1999.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MORENO, P. R. H. Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *The alkaloids*, v. 49, p. 221-229, 1997.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILHENA, T. C. Avaliação da toxicidade e dos efeitos do extrato etanólico seco das cascas de *Himatanthus articulatus* (vahl) woodson (Apocynaceae) sobre as alterações oxidativas na malária experimental in vivo. Universidade Federal do Pará, Instituto de

Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém – PA, 2012.

YAMADA, T. Resistencia de plantas a pragas e doenças pode ser afetada pelo manejo da cultura?. **Informações agronômicas**. n. 108. Dezembro/2004.

WOLFENDER, J. L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. Review. **Planta Medica**, v. 75, p. 719–734, 2009.

WOODSON JR, R. E. Studies in the Apocynaceae. VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of Missouri Botanical Garden**, St. Louis. v. 38, n. 1, p. 119-204, 1951.

ZHANG, Z. J.; Du, R. N.; HE, J.; WU, X. D.; LI, Y.; LI, R. T.; ZHAO, Q. Vinmajorines C–E, MonoterpenoidIndole Alkaloids from *Vinca major*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 99, p. 157–160, 2016a.

ZHANG, Z. J.; Du, R. N.; HE, J.; WU, X. D.; LI, Y.; LI, R. T.; ZHAO, Q. Three new monoterpenoid indole alkaloids from *Vinca major*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 18, n. 4, p. 328-33, 2016b.