



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba
(*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades
quilombolas de Oriximiná – PA**

Mariana Neves Vieira

Rio de Janeiro

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FACULDADE DE FARMÁCIA

**Departamento de Produtos Naturais e Alimentos
Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia**



Mariana Neves Vieira

**Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba
(*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de
Oriximiná – PA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadores: Prof^ª Dr^ª Suzana Guimarães Leitão
Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliveira**

Rio de Janeiro, maio de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA:

V658p Vieira, Mariana Neves.

Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba (*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de Oriximiná – PA/ Mariana Neves Vieira; orientadores Suzana Guimarães Leitão e Danilo Ribeiro de Oliveira. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.

109f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Carapanaúba. 2. Alcalóides indólicos. 3. Acetilcolinesterase.
4. Tuberculose. 5. Refinamento por Zona de pH. I. Leitão, Suzana Guimarães.
II. Oliveira, Danilo Ribeiro. III. Título.

CDD 615.1

Mariana Neves Vieira

**Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba
(*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de
Oriximiná – PA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Federal do
Rio de Janeiro.

Aprovada em

Prof^a Dr^a Suzana Guimarães Leitão (FF/UFRJ)
Orientadora

Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliveira (FF/UFRJ)
Orientador

Prof. Dr. Benjamin Gilbert (Farmanguinhos, FIOCRUZ, RJ)

Prof^a Dr^a Gilda Guimarães Leitão (NPPN/ UFRJ)

Prof^a Dr^a Valéria Pereira de Sousa (FF/UFRJ)

Dedico este trabalho ao meu pai, meu maior exemplo de pessoa e de vida.

Dedico também aos pesquisadores que admiro: Prof. Dr. Benjamin Gilbert, Prof. Dr. Otto Gottlieb, Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho, Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Kaplan, e minha (muito mais que) orientadora Prof^a Dr^a Suzana Guimarães Leitão; profissionais extremamente competentes, que se dedica(ra)m de corpo e alma à pesquisa de produtos naturais, que são exemplos de boa vontade em ensinar e que me inspiram a fazer sempre o melhor que eu puder para contribuir com a preservação da natureza e o desenvolvimento do meu país. Pessoas que representam verdadeiramente o conceito de Mestre.

Agradecimentos

Aos meus orientadores Suzana e Danilo pelos ensinamentos, pela paciência e amizade. Obrigada por acreditarem em mim e por terem me aceitado como aluna.

À minha família, minha mãe Eliane e meu irmão/afilhado Guilherme, pela compreensão (ou não) das minhas escolhas e pelo apoio imprescindível. Em especial ao meu irmão Pedro Henrique, que fez os gráficos da dissertação e da apresentação.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores componentes da banca, Prof. Dr. Benjamin Gilbert, Prof^a Dr^a Gilda Guimarães Leitão, Prof^a Dr^a Valéria Pereira de Souza, Prof^a Dr^a Mirian Ribeiro e Prof. Dr. Antônio Carlos Siani, por terem aceitado meu convite.

Às professoras da banca de acompanhamento, Prof^a Dr^a Mirian Ribeiro e Prof^a Dr^a Nancy Barbi, por terem aceitado o meu convite e por terem-no honrado com tanta dedicação.

Aos professores Gilda G. Leitão, Newton Castro, Ney Brito (UFRJ), Raimundo Braz-Filho, Ivo Vieira (UFRRJ), Pedro Eduardo Almeida Silva (FURG/RS), Washington Marcondes-Ferreira (UNICAMP), pela boa vontade em me atender e pelas colaborações estabelecidas.

Ao Andre, que sempre esteve ao meu lado, meu melhor companheiro e amigo para sempre.

Aos meus colegas de laboratório: Shaft, João, Márcia, Fernanda, Aline, Alex, Cleidson, Maria Cristina, André, Nathália, Priscilla e Paula, pela amizade e momentos inesquecíveis juntos.

Aos funcionários do NPPN Francisco Santos e Gisele Oliveira, pela prontidão em realizar as análises.

Aos professores Peter Winterhalter e Gerold Jerz, e a todos os demais integrantes do Laboratório de Química de Alimentos da Technische Universität Braunschweig (Alemanha), por terem me aceitado e me orientado em seu laboratório.

Às minhas amigas do VLAX e Avit Sharidu, que tornaram a “vida fora do laboratório” essencial e muito mais alegre.

A todos os meus amigos e às pessoas que torceram por mim.

Aos amigos que ganhei na Alemanha, que mudaram a minha forma de ver a vida.

Ao universo, que conspira sempre a favor daqueles que acreditam nos seus sonhos.

Ao CNPq e à CAPES, pelas bolsas concedidas.

“As cenas de nossa vida são como imagens em um mosaico tosco; vistas de perto, não produzem efeitos – devem ser vistas à distância para ser possível discernir sua beleza. Assim, conquistar algo que desejamos significa descobrir quão vazio e inútil este algo é; estamos sempre vivendo na expectativa de coisas melhores, enquanto, ao mesmo tempo, comumente nos arrependemos e desejamos aquilo que pertence ao passado. Aceitamos o presente como algo que é apenas temporário e o consideramos como um meio para atingir nosso objetivo. Deste modo, se olharem para trás no fim de suas vidas, a maior parte das pessoas perceberá que viveram-nas ad interim [provisoriamente]: ficarão surpresas ao descobrir que aquilo que deixaram passar despercebido e sem proveito era precisamente sua vida – isto é, a vida na expectativa da qual passaram todo o seu tempo.

(...)

Além disso: por que haveria de ser insensato preocupar-se sempre em usufruir ao máximo o presente único e seguro, se a vida inteira não passa de um fragmento maior do presente e como tal é absolutamente efêmera?”

Arthur Schopenhauer

Resumo

VIEIRA, Mariana Neves. **Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba (*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de Oriximiná – PA.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A pesquisa de novos fármacos oriundos de plantas continua a fornecer importantes moléculas, ativas em diversos alvos farmacológicos, inclusive no combate ao câncer, malária, tuberculose, doença de Alzheimer e dor. As espécies *Aspidosperma rigidum* e *A. excelsum*, popularmente conhecidas como carapanaúba, foram selecionadas durante um estudo etnofarmacológico realizado com comunidades tradicionais de Oriximiná, PA. As espécies desse gênero são conhecidas pela rica composição de alcalóides indólicos presentes nas cascas de suas árvores. Na região amazônica, o decocto das cascas da carapanaúba é utilizado com indicações para males do fígado, febre, malária, ameba, como tônico para os nervos e anticoncepcional. Os principais objetivos do presente trabalho foram a comparação dos perfis químicos e atividade biológica dos decoctos preparados a partir de cascas de *A. rigidum* e *A. excelsum*, bem como o isolamento biodirigido de seus alcalóides, com base nas atividades inibidora da enzima acetilcolinesterase (AchE) e antimicobacteriana. Os resultados mostraram inibição da AchE de 79,60, 75,80 e 62,94% respectivamente para os extratos em etanol, metanol e diclorometano de *A. excelsum* a 2mg/mL. Os menores valores de concentração inibitória mínima encontrados, nos testes frente a diferentes cepas de *Mycobacterim tuberculosis*, foram 25µg/mL para os extratos em hexano e em diclorometano de *A. excelsum* e 50µg/mL para o extrato em diclorometano de *A. rigidum*, assim como para a maioria dos extratos de *A. excelsum*. Do extrato em diclorometano de *A. rigidum*, foram isolados três alcalóides, identificados como 3α-aricina, isoreserpilina e 3β-reserpilina, por cromatografia contracorrente com *refinamento por zona de pH*. A 3α-aricina e a isoreserpilina são inéditas na espécie estudada. A identificação de novos metabólitos bioativos de extratos de plantas pode levar à concepção de novos quimioterápicos para o tratamento de várias doenças.

Palavras chave: carapanaúba, alcalóides indólicos, acetilcolinesterase, tuberculose, *refinamento por zona de pH*.

Abstract

VIEIRA, Mariana Neves. **Chemical and biological prospection of Carapanaúba's species (*Aspidosperma* spp.) utilized by "quilombola" communities in Oriximiná – PA.** Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The search for new drugs from plants sources continues to provide important molecules, active on several pharmacological targets, including against cancer, malaria, tuberculosis, Alzheimer's disease and pain. The species *Aspidosperma rigidum* and *A. excelsum*, popularly known as Carapanaúba were selected during an ethnopharmacological study conducted with traditional communities in Oriximiná, PA. Species of this genus are known by their rich variety of indole alkaloids present in the barks of the trees. In the Amazon region, the decoction made from the barks of Carapanaúba is indicated for the treatment of liver ailments, fever, amebiasis, as a tonic for nerves and for contraception. The main objectives of this study were to compare the chemical profile and biological activity of decoctions prepared from the barks of *A. rigidum* and *A. excelsum*, and the bioguided isolation of alkaloids, based on the acetylcholinesterase enzyme's inhibitory activity (AChE) and on the antimycobacterial activity. The results showed AChE inhibition of 79,60, 75,80 and 62,94%, respectively, for the ethanol, methanol and dichloromethane extracts of *A. excelsum*. The minimal inhibitory concentration values, against various *Mycobacterium tuberculosis* strains, were found to be 25µg/mL for the hexane and dichloromethane extracts of *A. excelsum* and 50µg/mL for the dichloromethane extract of *A. rigidum* and for most of the *A. excelsum*'s extracts. From the *A. rigidum* dichloromethane's extract, three alkaloids were isolated, by countercurrent chromatography in the pH-zone refining mode, and identified as 3α-aricine, isoreserpiline and 3β-reserpiline. Isoreserpiline and 3α-aricine are also being described for the first time in this species. The identification of new bioactive metabolites from plant extracts can lead to the design of new chemotherapeutic agents for the treatment of various diseases.

Key-words: Carapanaúba, indole alkaloids, acetylcholinesterase, tuberculosis, pH-zone refining

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. CARAPANAÚBAS.....	17
1.2. ALCALÓIDES INDÓLICOS.....	19
1.3. ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO.....	23
1.3.1. TRATAMENTO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	25
1.4. TERAPIA CONTRA TUBERCULOSE.....	27
1.5. A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NO ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL.....	29
1.5.1. CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE.....	29
1.5.1.1 pH em CCC.....	31
1.5.1.2. <i>REFINAMENTO POR ZONA DE pH</i>	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	36
3.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	36
3.3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	39
3.3.1. ATIVIDADE INIBIDORA DA ACETILCOLINESTERASE (<i>in vitro</i>)	39
3.3.2. ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA	40
3.4. PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS.....	42
3.4.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	42
3.4.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	43
3.4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS (CLAE/EM)	44
3.4.4. CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE (CCC) COM <i>REFINAMENTO POR ZONA DE pH</i>	44

3.4.4.1. ESCOLHA DO SISTEMA DE SOLVENTES PELO TESTE EM TUBO DE ENSAIO.....	44
3.4.4.2. SEPARAÇÃO POR HSCCC COM <i>REFINAMENTO POR ZONA DE pH</i>	45
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DE <i>A. rigidum</i>	46
3.5.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	46
3.5.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	47
4.1.1. ATIVIDADE INIBIDORA DA ACETILCOLINESTERASE (<i>in vitro</i>).....	47
4.1.2. ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA.....	50
4.2. COMPARAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS.....	51
4.2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	51
4.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	57
4.3. ISOLAMENTO DOS ALCALÓIDES POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE.....	59
4.3.1. <i>REFINAMENTO POR ZONA DE pH</i>	60
4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DE <i>A. rigidum</i>	64
4.4.1. ANÁLISE POR CLAE.....	64
4.4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE A ₁ , A ₂ E A ₄	66
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
7. ANEXOS.....	88

Lista de Figuras e Gráficos

- Figura 1** – Foto da carapanaúba de terra firme, com destaque para os septos na base do caule. Foto: Danilo Oliveira..... 18
- Figura 2** - Representação dos tipos de matas da Amazônia. Extraído de Ribeiro (1999)... 19
- Figura 3** – Biossíntese do alcalóide indólico ioimbina (adaptado de Dewick, 2009). E = enzima..... 20
- Figura 4** - Alcalóides indólicos isolados de *A. rigidum* (PEREIRA et al, 2007)..... 21
- Figura 5**– Alcalóides isolados de *A. excelsum* (BOLZANI et al,1987; PEREIRA et al, 2007). **1-** (+)-uleína, **2-** tubotaiwina, **3-** *N*-acetilaspidospermidina, **4-** (+)-des-*O*-metilaspidospermina, **5-** 3 α -10-metoxigeissochizol, **6-** 11-metoxitubotaiwina, **7-** ajmalicina, **8-** quebrachina, **9-** ioimbina, **10-** compactinervina, **11-** 3 α -aricina, **12-** exelcinina, **13-** 10-metoxiioimbina, **14-** *O*-acetilioimbina, **15-** ocolifuanina, **16-** didesmetoxicarboniltetraidrosecamina, **17-** 16-desmetoxicarboniltetraidrosecamina, **18-** 16-hidroxi,16-desmetoxicarboniltetraidrosecamina, **19-** tetraidrosecamina, **20-** 16-hidroxitetraidrosecamina..... 22
- Figura 6** - Placas neuríticas (a) e novos neurofibrilares (b), visualizados com diversos corantes, agregados protéicos envolvidos no processo condutor da degeneração neuronal progressiva e morte na doença de Alzheimer. Extraído de AlzheimerMed (2011).....26
- Figura 7** – Estruturas das substâncias utilizadas no tratamento sintomático da doença de Alzheimer.....27
- Figura 8** – Esquema de partição de analitos ionizáveis entre as fases de um sistema de solventes. A forma livre (3) permanece, preferencialmente, na fase orgânica. Quando esta entra em contato com a fase aquosa ácida, o sal formado a partir dela (2) migrará para esta fase (1). Quando o sal entra em contato com a fase orgânica, que contém uma base com valor de p*K*_b maior que o de sua base livre, a ionização é desfeita (4) e o analito migra para esse solvente (3). Adaptado de Ito (2005).....34
- Figura 9** – Fluxograma das extrações realizadas e código dos respectivos extratos obtidos das espécies *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba do baixo, CBA) e *A. excelsum* (carapanaúba de terra firme, CTF).....37
- Figura 10** – Decoctos de *Aspidosperma rigidum* (CBACH) e *A. excelsum* (CTFCh) pelo método tradicional do “chá fervido”.....38
- Figura 11** – Reação colorimétrica proposta por Ellman - extraído de Oliveira (2009).....40
- Figura 12** – Tubos de vidro estéril com rosca contendo as culturas de micobactéria (Foto: Fernanda Leitão)..... 41

- Figura 13** – Microplacas de 96 poços com fundo U, para os testes de triagem e CIM (Foto: Fernanda Leitão). 42
- Figura 14** – Cromatogramas de CBAEt (a) e CTFEt (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm..... 52
- Figura 15** – Cromatogramas de CBACH (a) e CTFCh (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm. Os sinais de T_R em 14,75 minutos estão marcados com asterisco (*)....54
- Figura 16** – Cromatogramas de CBAM (a) e CTFM (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm..... 55
- Figura 17** – Cromatogramas de CBAD (a) e CTFD (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. O Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm..... 56
- Figura 18** – Cromatogramas de UV de CBACH (a) e CTFCh (b) obtidos por CLAE no método Perfil DE. O tempo de análise foi de 50 min., fluxo: 0,25 mL/min e a detecção de 200 a 700 nm..... 57
- Figura 19** – CCD dos testes para CCC (*com refinamento por zona de pH*) para a amostra CBAD nas seguintes proporções (v/v/v) do sistema de solventes MtBE:AcN:H₂O - 1:0:1 (D1), 4:1:5 (D2), 6:3:8 (D3) e 2:2:3 (D4), FS – fase orgânica superior, FI – fase aquosa inferior, pH 2 - tubo com o ácido e pH 10 – tubo com a base. CCD - eluente: acetato de etila: acetona: água – 25: 8: 2 (v/v/v), com duas gotas de NH₄OH. Revelador: Reagente de Dragendorff..... 60
- Figura 20** – Cromatograma em CCD do fracionamento do extrato CBAD por CCC com *refinamento por zona de pH*. Sistema de solventes MtBE: H₂O (1:1, v/v); na fase superior orgânica TEA a 10 mM e na fase inferior aquosa ácido fórmico a 15 mM; velocidade de rotação: 850 rpm; fluxo: 2 mL/min; A₁ – A₄: principais substâncias encontradas; Pd- padrão extrato CBAD. CCD - eluente: acetato de etila: acetona: água – 25: 8: 2 (v/v/v), com duas gotas de NH₄OH. Revelador: Reagente de Dragendorff..... 61
- Figura 21** – Cromatograma em CCD do fracionamento do extrato CTFD por CCC com *refinamento por zona de pH*. Sistema de solventes MtBE: H₂O (1:1, v/v); na fase superior orgânica TEA a 10 mM e na fase inferior aquosa ácido fórmico a 15 mM; velocidade de rotação: 850 rpm; fluxo: 2 mL/min; Pd- padrão extrato CTFD. CCD - eluente: acetato de etila: acetona: água – 25: 8: 2 (v/v/v), com duas gotas de NH₄OH. Revelador: Reagente de Dragendorff..... 63

- Figura 22** - Cromatograma da amostra A₁ obtido por CLAE no método Perfil DE. Em destaque, o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 18,9 minutos, varredura de 180 a 410 nm..... 65
- Figura 23** - Cromatograma de A₂ (1) + A₃ (2) obtido por CLAE no método Perfil DE. Em destaque, no canto direito superior, o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 16,7 minutos (1); e no canto direito inferior o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 20,3 minutos (2), varredura de 180 a 410 nm..... 65
- Figura 24** - Cromatograma de A₄ obtido por CLAE no método Perfil DE. Em destaque, o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 18,9 minutos, varredura de 190 a 410 nm..66
- Figura 25** - Estrutura proposta para o alcalóide A₁, identificado como 3 α -aricina.....67
- Figura 26** - Estereoquímica proposta para os hidrogênios do alcalóide A₁, identificado como 3 α -aricina. Os acoplamentos foram medidos nos sinais do espectro RMN em ¹H (400 MHz), de A₁ solubilizado em CDCl₃..... 70
- Figura 27** – Reações de fragmentação da 3 α -aricina propostas pelo prof. Dr. Raimundo Braz-Filho e gentilmente cedidas para publicação no presente trabalho, que justificam os principais íons observados no fragmentograma de A₁ (Anexo 7.3). Análise realizada por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70 eV..... 71
- Figura 28** - Estrutura proposta para o alcalóide A₂, identificado como isoreserpilina.....72
- Figura 29** – Reações de fragmentação da isoreserpilina, propostas pelo prof. Dr. Raimundo Braz-Filho e gentilmente cedidas para publicação no presente trabalho, que justificam os principais íons observados nos fragmentogramas de A₂, identificada como isoreserpilina, e A₄, 3 β -reserpilina. Análise realizada por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os fragmentogramas se encontram respectivamente nos Anexos 7.6 e 7.7..... 74
- Figura 30** - Estrutura proposta para o alcalóide A₄, identificado como 3 β -reserpilina.....75
- Figura 31** – Visualização tridimensional das estruturas dos alcalóides indólicos isoreserpilina (A₂) e 3 β -reserpilina (A₄), do tipo heteroioimbanos.....77
- Gráfico 1** – Valores de pH das frações obtidas no fracionamento do extrato CBAD por CCC com *refinamento por zona de pH*..... 61
- Gráfico 2** – Valores de pH das frações obtidas no fracionamento do extrato CTFD por CCC com *refinamento por zona de pH*..... 63

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Extratos obtidos das cascas de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF), com seus respectivos rendimentos..... 37
- Tabela 2** – Atividade inibidora da AchE para os extratos de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF), na concentração de 2 mg/mL, utilizando o método de Ellman modificado. O controle positivo de inibição foi realizado pela eserina a 0,1 mg/mL.....48
- Tabela 3** – Atividade antimicobacteriana, para todos os extratos de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF), frente a cepas do *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis a rifampicina e izoniazida (H37Rv), resistentes a rifampicina (RMP_r) e resistentes a izoniazida (INH_r). 50
- Tabela 4** – Dados cromatográficos (tempo de retenção, T_R) e de ultravioleta (valores de absorção máxima, λ_{máx}) dos extratos em etanol de *A. rigidum* (carapanaúba do baixio, CBA) e *A. excelsum* (carapanaúba de terra firme, CTF). 53
- Tabela 5** – Dados cromatográficos (tempo de retenção, T_R), de espectrometria de massas (íon molecular, [M⁺+1] m/z) e de ultravioleta (máximos de absorção, λ_{máx}) dos decoctos de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF)..... 58
- Tabela 6** – Resultados dos experimentos de RMN em 1D/2D de ¹H (500 MHz) e ¹³C (100 MHz), incluindo as correlações ¹H ¹³C HSQC e ¹H ¹³C HMBC de A₁ em CD₃OD..... 67
- Tabela 7** – Comparação dos resultados dos experimentos de RMN de ¹H (400 MHz) de A₁ com os valores de ¹H (300 MHz) da 3α-aricina em CDCl₃ (extraídos de VERPOORTE et al, 1983)..... 69
- Tabela 8** – Resultados dos experimentos de RMN em 1D/2D de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz), incluindo as correlações ¹H ¹³C HSQC e ¹H ¹³C HMBC de A₂ em CDCl₃.....72
- Tabela 9** – Comparação dos resultados dos experimentos de RMN de ¹H (400 MHz) de A₂ com os valores ¹H (500 MHz) da isoreserpilina em CDCl₃ (extraídos de BRUYN; ZHANG; BUDEZINSKY, 1989). Obs.: a referência não explicitou a multiplicidade dos sinais de hidrogênio da isoreserpilina..... 73
- Tabela 10** – Resultados dos experimentos de RMN em 1D/2D de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz), incluindo as correlações ¹H ¹³C HSQC e ¹H ¹³C HMBC de A₄ em CDCl₃.....76

Lista de Siglas e Abreviaturas

- ACN - acetonitrila
- AchE - acetilcolinesterase
- ATCI – acetiltiocolina
- BAW – butanol, ácido acético e água
- CBA - carapanaúba de baixo
- CBAA – extrato em acetato de etila de *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba de baixo)
- CBACH - decocto de *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba de baixo)
- CBAD - extrato em diclorometano de *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba de baixo)
- CBAEt - extrato em etanol de *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba de baixo)
- CBAH - extrato em hexano de *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba de baixo)
- CBAM - extrato em metanol de *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba de baixo)
- CCC - cromatografia contracorrente
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, Ministério do Meio Ambiente
- CIM - concentração inibitória mínima
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- COSY - *correlation spectroscopy*
- CTF - carapanaúba de terra firme
- CTFA - extrato em acetato de etila de *Aspidosperma excelsum* (carapanaúba de terra firme)
- CTFCh - decocto de *Aspidosperma excelsum* (carapanaúba de terra firme)
- CTFD - extrato em diclorometano de *Aspidosperma excelsum* (carapanaúba de terra firme)
- CTFEt - extrato em etanol de *Aspidosperma excelsum* (carapanaúba de terra firme)
- CTFH - extrato em hexano de *Aspidosperma excelsum* (carapanaúba de terra firme)
- CTFM - extrato em metanol de *Aspidosperma excelsum* (carapanaúba de terra firme)
- CUP – concordância de uso principal
- CUPc - concordância de uso principal corrigido
- DAD – detector de arranjo de diodo
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EM – espectrometria de massas
FC_{CAR} – fator de correção para carapanaúba
HIV – *human immunodeficiency virus*
HSCCC – *high-speed countercurrent chromatography*
HSQC - *heteronuclear single quantum correlation*
HMBC - *heteronuclear multiple bond correlation*
HPLC – *high-performance liquid chromatography*
IC₅₀ - concentração inibitória de 50%
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
K – coeficiente de partição
MDR – *multiple drug resistance*
MM – massa molecular relativa
MtBE - éter metil-*t*-butílico
OADC - ácido oléico, albumina, dextrose, catalase
OMS – Organização Mundial de Saúde
REMA – *Resazurin Microtiter Assay*
R_f – fator de retenção
RMN - ressonância magnética nuclear
TB - tuberculose
TEA – trietilamina
TMS - tetrametilsilano
TFA - ácido trifluoroacético
T_R - tempo de retenção
UP – uso principal
UV – ultravioleta
UT – uso total

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARAPANAÚBAS

As árvores popularmente conhecidas na região amazônica como carapanaúba pertencem ao gênero *Aspidosperma*, da família Apocynaceae. Essa família possui cerca de 250 a 550 gêneros, com aproximadamente 3.700 a 5.100 espécies tropicais e subtropicais, sendo algumas poucas registradas em regiões temperadas. Inclui espécies arbustivas, herbáceas e arbóreas, muitas das quais são trepadeiras e suculentas (PEREIRA et al, 2007).

Cerca de 41 gêneros e 400 espécies são registrados na flora brasileira. Dentre estes, o gênero *Aspidosperma* se destaca, devido à presença de látex abundante de coloração branca ou vermelho-acastanhado, em alguns casos visível apenas nos ramos terminais (RIBEIRO et al, 1999), e pela sua composição química abundante em alcalóides do tipo indólico (ARNDT et al, 1967; BOLZANI et al, 1987; GILBERT et al, 1965; NICHOLAS; BAIJNATH, 1994; ROCHA; LUZ; RODRIGUES, 1982).

As espécies compreendidas no gênero *Aspidosperma* foram classificadas em subgrupos botânicos. O presente trabalho trata, especificamente, do estudo das espécies *Aspidosperma rigidum* Rusby e *Aspidosperma excelsum* Benth, que pertencem aos subgrupos Rígida e Nítida, respectivamente. Os demais são Quebrachine, Polyneura, Pyricolla, Nobile, Macrocarpa e Tomentosa (PEREIRA et al, 2007).

As espécies de *Aspidosperma* em questão, que são árvores encontradas nas Américas do Sul e Central, são comumente conhecidas no Norte do Brasil como “carapanaúba”, que significa “ninho de mosquitos” (carapanã = mosquito e ubá = árvore) (OLIVEIRA et al, 2008). Outras espécies também são conhecidas pelo mesmo nome vulgar, dentre elas *A. auriculatum*, *A. carapanauba*, *A. desmanthum*, *A. discolor*, *A. nitidum*, *A. oblongum*, *A. marcgravianum* e *A. vergasii* (BARBOSA; TAVARES; SOARES, 2003; CARVALHO et al, 1991; REVILLA, 2002).

Trata-se de árvores de grande porte cujo nome popular se refere ao fato delas possuírem o caule profundamente sulcado no sentido vertical e cheio de septos capazes de abrigar o carapanã, uma denominação muito comum para mosquito na região amazônica (Figura 1). Nas outras regiões brasileiras, as árvores desse gênero são conhecidas,

principalmente, como peroba (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010) e guatambú (GEMMA DE LA CRUZ, 2008).



Figura 1 – Foto da carapanaúba de terra firme, com destaque para os septos na base do caule. Foto: Danilo Oliveira

Essas espécies são notoriamente reconhecidas pelo seu potencial efeito terapêutico no tratamento da malária e de males do fígado pelos povos da Floresta Amazônica. Alguns poucos estudos já demonstram essa atividade para espécies de *Aspidosperma* da Amazônia (carapanaúbas) e de outras regiões do Brasil (DOLABELA et al, 2008; CARDENAS et al, 2008; MITAINE-OFFER et al, 2002).

No contexto desse trabalho, a diferença entre as espécies de *Aspidosperma* estudadas está no local onde elas são encontradas. A *A. excelsum* cresce em matas de platô, ou seja, em regiões que ficam relativamente distantes de lagos. Esse tipo de local é também conhecido como mata de “terra firme” (Figura 2) e por isso, nesse estudo, a *A. excelsum* foi chamada de “carapanaúba de terra firme” (CTF).

Já a *A. rigidum* cresce em regiões próximas aos lagos ou rios, onde a terra é muito mais úmida, próxima a áreas inundáveis, ou seja, que ficam submersas em época de chuva. Essa mata é chamada de “baixio” ou “várzea”, sendo assim, a *A. rigidum* foi denominada “carapanaúba do baixio” (CBA). Esse fato faz com que tais espécies cresçam sob condições muito diferentes em relação ao tipo de solo, oferta de nutrientes, vizinhança, etc, o que pode levar a uma significativa diferença de seus constituintes químicos (RIBEIRO et al, 1999).

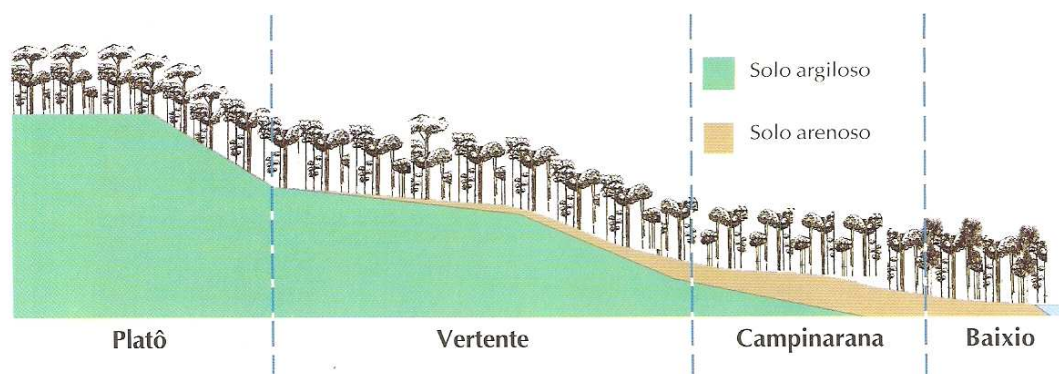


Figura 2 - Representação dos tipos de matas da Amazônia. Extraído de Ribeiro (1999).

1.2. ALCALÓIDES INDÓLICOS

Vários estudos sobre a composição química das espécies de *Aspidosperma* revelaram que esse gênero se caracteriza pela presença de diversos tipos de alcalóides, principalmente indólicos (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010; PEREIRA et al, 2007). Os alcalóides indólicos de *Aspidosperma* são originados a partir do triptofano e possuem, geralmente, esqueleto do tipo β -carbolínico, com sistemas tricíclicos de anéis piridoindólicos combinados com resíduos terpenoídicos derivados da secologanina (DEWICK, 2009). Os alcalóides indólicos constituem excelentes marcadores quimiotaxonômicos para espécies de *Aspidosperma* (BOLZANI et al, 1987; HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010; PEREIRA et al, 2007).

Na via de biossíntese desses alcalóides, a descarboxilação do ácido aminado triptofano dá origem à triptamina, que se combina com a secologanina, por condensação de Mannich, para formar os anéis do grupamento β -carbolínico. A secologanina, por sua vez, possui origem biossintética na via do mevalonato a partir de um rearranjo do geraniol. Trata-se de um tipo de iridóide que adiciona 10 átomos de carbono à porção derivada dos ácidos aminados (DEWICK, 2009).

A Figura 3 ilustra essas reações, com o exemplo da via biossintética da ioimbina, um alcalóide indólico muito conhecido por suas propriedades afrodisíacas, presente nas espécies *A. discolor*, *A. excelsum*, *A. eburneum*, *A. marcgravianum*, *A. oblongum*, *A.*

peroba, *A. polyneuron*, *A. pruinosum*, *A. pyricollum* e *A. quebracho-blanco* (PEREIRA et al, 2007).

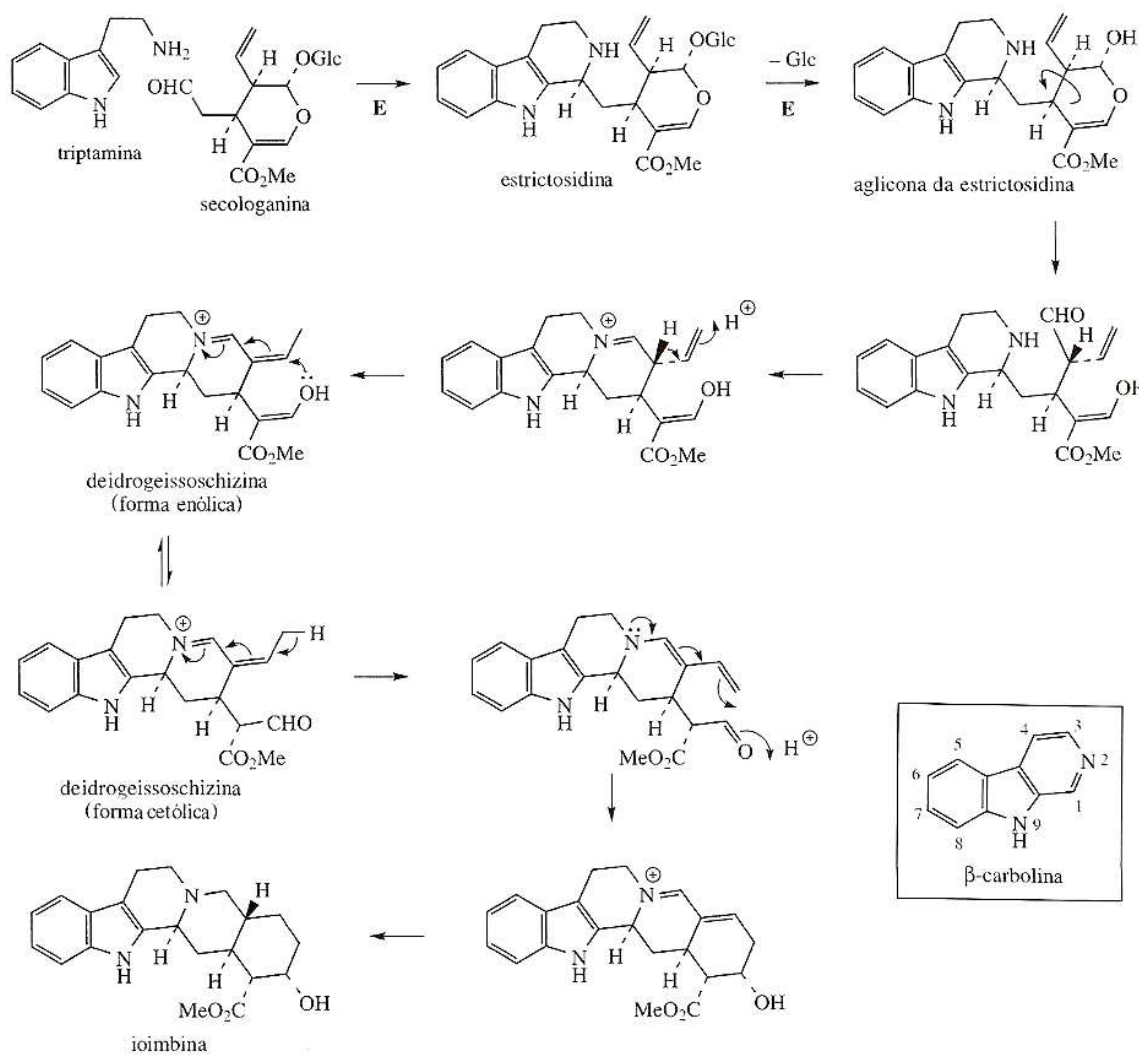


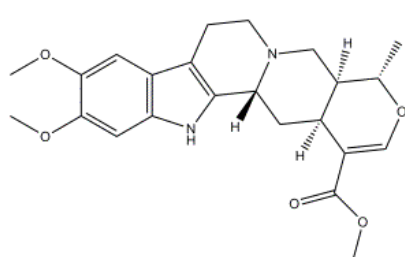
Figura 3 – Biossíntese do alcalóide indólico ioimbina (adaptado de Dewick, 2009). E = enzima.

Os alcalóides indólicos possuem grande importância econômica devido às suas atividades farmacológicas. Eles podem atuar como agonistas ou agonistas parciais nos receptores alfa-adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgico e dopaminérgico. As diversas atividades biológicas exercidas estão relacionadas à forma com que cada receptor age no

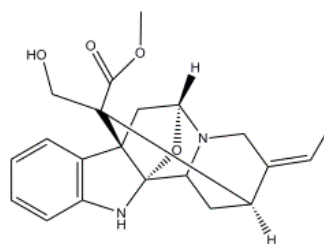
tecido e, como cada receptor possui diferentes subclasses, a gama de atividades dos alcalóides indólicos é enorme (SCHRIPEMA; DAGNINO; GRACE, 2007).

Na Colômbia, por exemplo, o látex da carapanaúba é utilizado pelos índios Makuna e Taiwano no tratamento da hanseníase. Além disso, as cascas de *A. quebrachoblanco* são usadas na região andina como afrodisíaco e contra febre. No Brasil, essa espécie é usada também em casos de efisema, bronquite e pneumonia, bem como no tratamento de impotência, contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispnéia asmática e cardíaca (PEREIRA et al, 2006). Há, também, referências que citam o uso dessas espécies como estimulante respiratório, contra asma (broncodilatador) e para disfunções eréteis (BARBOSA; TAVARES; SOARES, 2003; OLIVEIRA et al, 2008; PEREIRA et al, 2007).

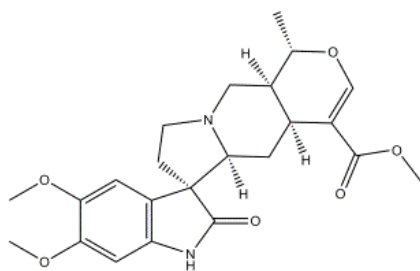
No caso das espécies abordadas neste trabalho, há descrição de apenas quatro alcalóides isolados de *A. rigidum* (Figura 4) e vinte de *A. exelsum* (Figura 5), os quais possuem poucos estudos acerca de suas atividades biológicas.



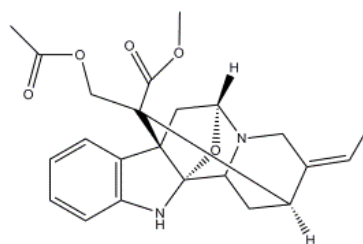
3β-reserpilina (MM 412 u, $C_{23}H_{28}N_2O_5$)



burnamina (MM 368 u, $C_{21}H_{24}N_2O_4$)



(-)-carapanaubina (MM 428 u, $C_{23}H_{28}N_2O_6$)



picralina (MM 410 u, $C_{23}H_{26}N_2O_5$)

Figura 4 - Alcalóides indólicos isolados de *A. rigidum* (PEREIRA et al, 2007).

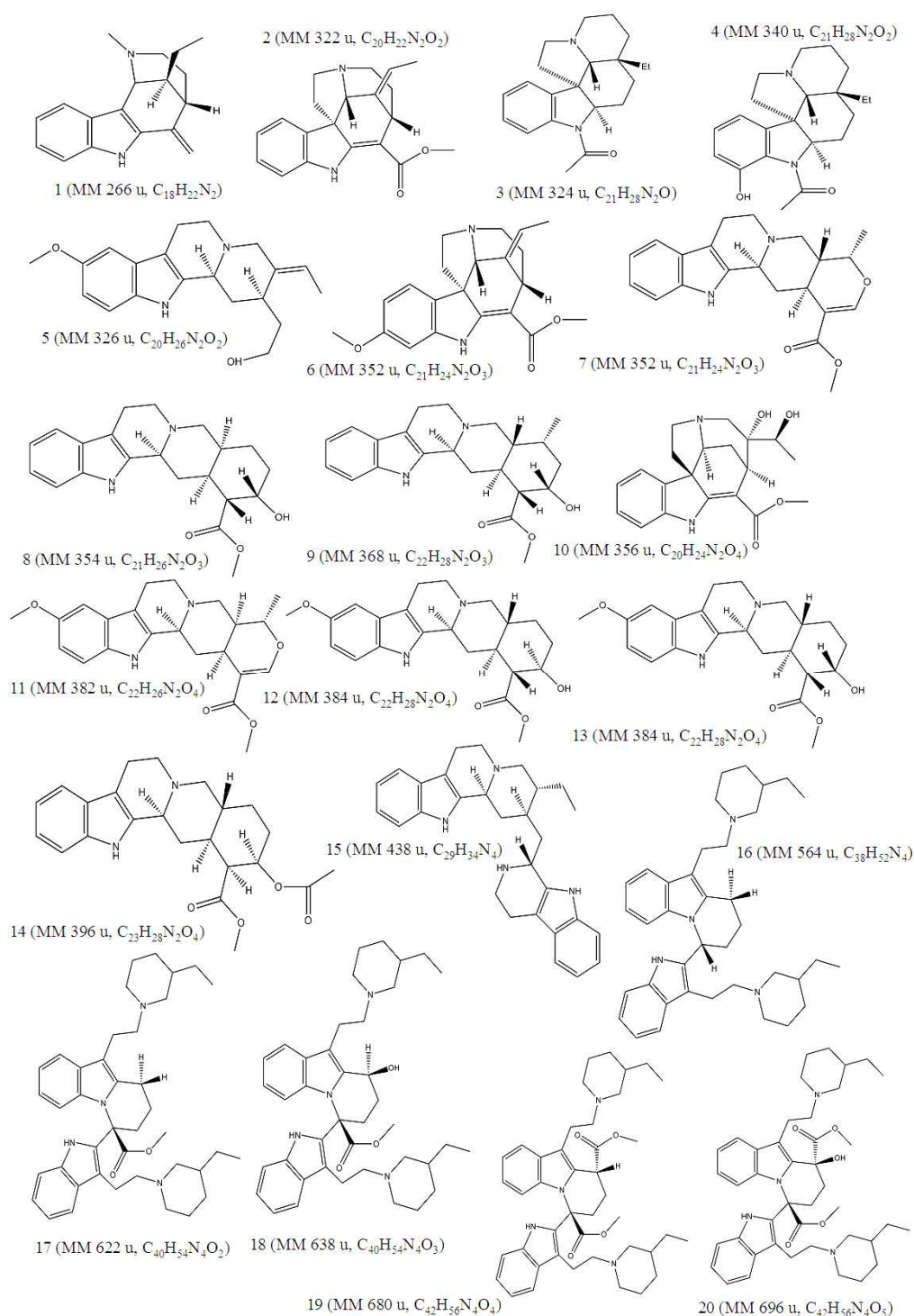


Figura 5– Alcalóides isolados de *A. excelsum* (BOLZANI et al,1987; PEREIRA et al, 2007). **1-** (+)-uleína, **2-** tubotaiwina, **3-** *N*-acetilspidospermidina, **4-** (+)-des-*O*-metilspidospermina, **5-** 3 α -10-metoxigeissochizol, **6-** 11-metoxitubotaiwina, **7-** ajmalicina, **8-** quebrachina, **9-** ioimbina, **10-** compactinervina, **11-** 3 α -aricina, **12-** exelcicina, **13-** 10-metoxiioimbina, **14-** *O*-acetilioimbina, **15-** oclrolifuanina, **16-** didesmetoxicarboniltetraidrosecamina, **17-** 16-desmetoxicarboniltetraidrosecamina, **18-** 16-hidroxi,16-desmetoxicarboniltetraidrosecamina, **19-** tetraidrosecamina, **20-** 16-hidroxitetraidrosecamina.

Os alcalóides conhecidos de *A. rigidum* possuem estruturas bem variadas (Figura 4), sendo que a carapanaubina e a picralina, juntamente com a burnamina, contam com esqueletos característicos. Somente a 3 β -reserpilina pode ser classificada no grupo dos alcalóides heteroioimbanos, segundo a classificação proposta por Pereira e outros (2007), além de outros com esqueletos também característicos. Já entre os alcalóides de *A. excelsum* (Figura 5) é possível encontrar representantes do tipo condilocarpina (2, 6 e 10), aspidospermina (3 e 4), heteroioimbano (7 e 11), ioimbano (8, 9, 12 e 14) e secamina (16 a 20). Essas informações são essenciais quando se quer caracterizar um extrato.

1.3. ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO

Durante o desenvolvimento de sua tese de doutorado, Oliveira (2009) baseou-se no conhecimento tradicional de cinco comunidades quilombolas do Município de Oriximiná, PA, para realizar a coleta de 254 amostras vegetais para identificação botânica e 34 para fins de bioprospecção e estudo de suas atividades biológicas.

Esse projeto, intitulado “Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais Utilizadas por Comunidades Quilombolas do Município de Oriximiná-PA, com fins de Bioprospecção”, foi o primeiro no Brasil a obter autorização do CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, Ministério do Meio Ambiente) para acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional a ele associado com fins de bioprospecção. Seguindo as regulamentações do CGEN, este acordo foi realizado diretamente com as comunidades, e poderá proporcionar diversos benefícios tanto para o grupo de pesquisadores, quanto para a população daquela localidade (BIANCOVILLI, 2008; ESCOBAR, 2008).

Dentre as plantas coletadas, encontravam-se as duas espécies de carapanaúba, *Aspidosperma rigidum* Rusby e *Aspidosperma excelsum* Benth, que são amplamente utilizadas e difundidas entre as comunidades tradicionais do Norte do país. Em Oriximiná, as cascas da carapanaúba são utilizadas sob a forma tradicionalmente chamada de "chá fervido" (que corresponde ao um decocto) ou "infusão" (que, apesar do nome, pela descrição do modo de preparo corresponderia à maceração em água fria), com indicações para males do fígado (hepatite), vesícula, colesterol, febre, malária, diarreia com

hemorragia, ameba, anemia, dor de estômago, corrimento, como diurético, contra diabetes, como tônico para os nervos e anticoncepcional (OLIVEIRA, 2009).

Pelos resultados obtidos no estudo etnofarmacológico e no laboratório, assim como pela pouca quantidade de publicações relacionadas a essas plantas, aliado ao fato de existirem duas espécies diferentes sendo utilizadas como se fossem apenas uma (mesma etnoespécie), as carapanaúbas *A. excelsum* e *A. rigidum* foram selecionadas para o estudo mais aprofundado, justificando a realização do presente trabalho.

Para quantificar tais estudos etnofarmacológicos, foi utilizado como ferramenta o cálculo da Concordância dos Usos Principais (CUP). A CUP foi determinada como a relação entre o número de entrevistados que citaram de forma independente os usos principais (UP) da espécie, e o número total de entrevistados que mencionaram a espécie para qualquer uso (uso total, UT). Para obter a CUP corrigida (CUP_C) é necessário que se calcule primeiro o Fator de Correção para a carapanaúba (FC_{CAR}), considerando a espécie mais citada nas entrevistas, que foi o “cumarú” (*Dypterix* sp. - 23 informantes). Depois se multiplica a CUP pelo FC_{CAR} para obter a CUP_C (OLIVEIRA, 2009). As fórmulas são:

$$CUP = \frac{\text{Número de informantes que citaram o uso principal (UP)}}{\text{Número de informantes que citaram qualquer uso para a espécie (UT)}} \times 100$$

$$FC_{CAR} = \frac{\text{Número de informantes que citaram a espécie (UP)}}{\text{Número de informantes que citaram a espécie mais citada (UP}_{Dypterix\ sp.})}$$

$$CUP_C = CUP \times FC_{CAR}$$

Dentro deste levantamento, a carapanaúba foi uma planta que demonstrou grande relevância e importância para os membros das comunidades quilombolas, sendo seus usos citados por 10 informantes para o tratamento de malária (CUP = 100%), males do fígado (CUP = 70%), ameba (CUP = 30%), fortificante para os nervos (CUP = 30%) e os demais usos menos expressivos para enxaqueca, cicatrizante, dor no corpo, febre, males do intestino (CUP = 10%).

1.3.1. TRATAMENTO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

Estima-se que o Brasil será, em 2025, a sexta nação do mundo com mais pessoas acima de 60 anos - cerca de 34 milhões (mais de 10% da população) e que o número de idosos irá mais do que triplicar nas próximas quatro décadas, de menos de 20 milhões em 2010 para aproximadamente 65 milhões em 2050 (GRAGNOLATI, 2011). Hoje, são mais de 13 milhões. A expectativa de vida do brasileiro atingiu 71,9 anos em 2005 e aumentará gradativamente nas próximas décadas, determinando que o perfil das causas de morte e doenças invalidantes seja definitivamente relacionado com males crônicos e degenerativos: hipertensão, diabetes, infarto, derrames, doença de Alzheimer, câncer, osteoporose, etc (ALZHEIMERMED, 2011).

A doença de Alzheimer é atualmente uma das formas mais comuns de demência, afetando aproximadamente 10% da população acima de 65 anos de idade (mais de 1,2 milhões de pessoas). Ela se caracteriza principalmente pela perda progressiva de memória, falta de compreensão, problemas de linguagem e diminuição da capacidade de aprendizagem.

No entanto, a patogênese dessa doença ainda não foi totalmente elucidada. Acredita-se que formação de dois agregados de proteínas, as placas neuríticas (acúmulo de peptídeo β -amilóide, circundado por um anel formado de partículas de neurônios anormais) e os novelos neurofibrilares (alterações intracelulares em forma de chama de vela, verificadas no citoplasma dos neurônios), promovidos por anormalidades na função da proteína τ , estariam envolvidas no processo condutor da degeneração neuronal progressiva e morte (ZHANG, 2005). A Figura 6 apresenta esses agregados, corados por diferentes reagentes.

Disfunções celulares, bem como morte de grupos de células responsáveis pela manutenção de sistemas específicos de neurotransmissão, também acarretam a redução dos níveis neuronais de acetilcolina, norepinefrina e serotonina. Outras hipóteses se baseiam no acúmulo de metais tóxicos no sangue, estresse oxidativo ou infecções virais (CUMMINGS, 2004).

Essas observações fornecem um grande número de possíveis alvos terapêuticos no tratamento da Doença de Alzheimer, dentre eles a inibição da β -secretase, para reduzir a formação do peptídeo β -amilóide; inibição da agregação do peptídeo β -amilóide e da proteína τ ; quelatação dos metais tóxicos; inibição da acetilcolinesterase ou também da monoamino-oxidase (ZHANG, 2005)

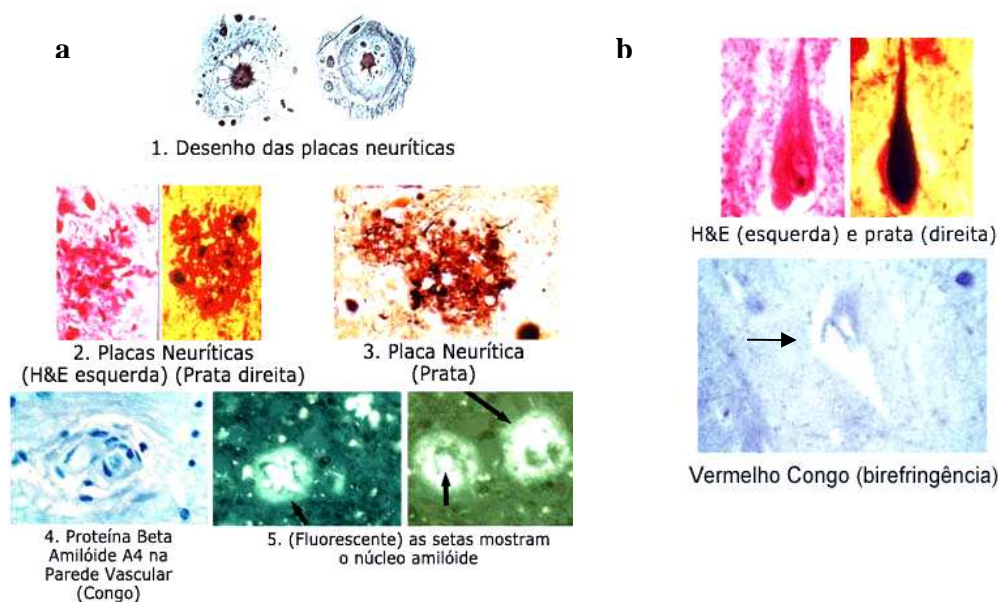


Figura 6 - Placas neuríticas (a) e novos neurofibrilares (b), visualizados com diversos corantes, agregados protéicos envolvidos no processo condutor da degeneração neuronal progressiva e morte na doença de Alzheimer. Extraído de AlzheimerMed (2011).

Foi observado que o nível sanguíneo de acetilcolina (neurotransmissor decisivo no desempenho cognitivo) encontra-se reduzido em portadores da doença de Alzheimer, seja por diminuição na sua produção ou por excessiva destruição pela ação da enzima acetilcolinesterase. Dessa forma os sintomas podem ser melhorados com o uso de agonistas colinérgicos ou por inibidores colinesterásicos, ambos aumentando a atividade colinérgica (ALZHEIMERMED, 2011).

Sendo assim, a terapia atualmente utilizada para melhorar a função cognitiva de tais pacientes se baseia, principalmente, na potencialização da atividade colinérgica central, que é alcançada clinicamente pelo uso de inibidores de acetilcolinesterase - AchE (SCARPINI; SCHELTENS; FELDMAN, 2003; CUMMINGS, 2004). Dentre essas substâncias, se destacam os alcalóides naturais galantamina e huperzina A, bem como os análogos

sintéticos rivastigmina (análogo da fisostigmina, excelente inibidor da AchE, que possui baixa absorção intestinal) e a tacrina. A memantina foi a primeira substância da classe de inibidores glutamatérgicos e seu uso é aprovado para a terapia de casos moderados ou graves da Doença de Alzheimer. A donepezila, por sua vez, é um inibidor colinesterásico do tipo piperidínico, que exerce inibição reversível não competitiva e possui estrutura bem distinta em relação aos demais inibidores utilizados (ALZHEIMER'S DISEASE, 2010). As estruturas dessas moléculas estão apresentadas na Figura 7.

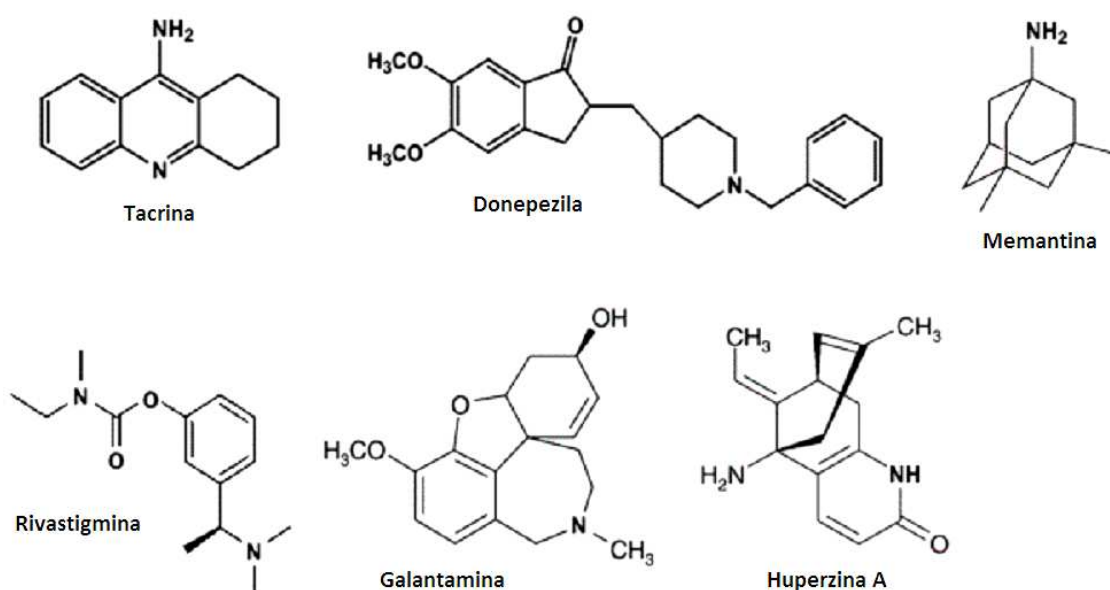


Figura 7 – Estruturas das substâncias utilizadas no tratamento sintomático da doença de Alzheimer.

Nesse contexto destaca-se a indicação popular da carapanaúba como “fortificante dos nervos”, com CUP= 30%; CUPc= 12,5% (OLIVEIRA, 2009) e a comprovada atividade de alcalóides indólicos na inibição da acetilcolinesterase (LEVY-APPERT-COLLIN, 1978; MUKHERJEE et al, 2007; GUIMARÃES et al, 2010; PEREIRA et al, 2010) .

1.4. TERAPIA CONTRA TUBERCULOSE

A busca de novos agentes naturais com ação antimicrobacteriana tem sido uma estratégia de pesquisa desenvolvida no Departamento de Produtos Naturais e Alimentos,

que se iniciou em 2006 e hoje é uma das principais linhas de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica (UFRJ), tendo rendido diversas publicações (CASTELLAR, 2011; OLIVEIRA, 2011a; SANTOS, 2009).

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte por doença infecciosa no mundo, mostrando ser uma calamidade mundial, em especial, nos países em desenvolvimento. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 1,7 milhões de pessoas morreram por causa de TB em 2009, dentre elas 600.000 mulheres, incluindo também 380.000 portadores do vírus HIV. Esses números representam que 4.700 mortes por dia são causadas por TB. Essa doença também se encontra entre as três maiores causas de morte em mulheres com 15 a 44 anos (WHO, 2010).

Trata-se de uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo agente patogênico *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria gram-positiva que estabelece sua infecção geralmente nos pulmões. Sua transmissão se dá pela emissão de partículas contaminadas com os bacilos, dispensadas no ar através da tosse característica dos pacientes com tuberculose ativa, como um resultado de um processo inflamatório pulmonar crônico (DUCATI et al, 2006).

As micobactérias desenvolvem rapidamente resistência a agentes quimioterápicos isolados, devido à presença do gene MDR (*Multiple Drug Resistance*) que codifica proteínas responsáveis pelo desenvolvimento da resistência dessas bactérias frente a múltiplos fármacos. A OMS estima que houve 440.000 novos casos de *M. tuberculosis* resistentes em 2008 e 150.000 casos de morte em decorrência desse fato (WHO, 2010).

Essa observação evidencia que a terapia efetiva das infecções micobacterianas exige um curso prolongado (de vários meses ou anos) de múltiplos fármacos. Os agentes de primeira escolha são a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol ou estreptomicina, sendo comum o emprego da associação de rifampicina e isoniazida (CHAN; ISEMAN, 2002).

Também se tornou clara a necessidade da busca de novos potenciais agentes antimicobacterianos. Em uma triagem randômica realizada em nosso laboratório à procura de substâncias com atividade contra TB, os extratos de carapanaúba se destacaram por terem demonstrado ser bastante ativos (OLIVEIRA, 2011a). Esse dado é coerente, uma vez que atividade antimicobacteriana de alcalóides indólicos já fora descrita (COPP, 2003).

Além disso, há artigos na literatura que descrevem o uso popular de espécies de *Aspidosperma* no tratamento da hanseníase, que também é causada por micobactérias (PEREIRA et al, 2006).

1.5. A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NO ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL

A CLAE é uma técnica de separação que pode ser usada tanto qualitativa quanto quantitativamente e ainda pode auxiliar em processos de identificação. Trata-se de um tipo de cromatografia onde a fase móvel é líquida e a fase estacionária está depositada sobre um suporte sólido, empacotada em uma pequena coluna. Geralmente essa fase possui baixa granulometria e, por esse motivo, a análise somente pode ser feita sob alta pressão. Isso permite a realização de separações mais difíceis do que em outros tipos de cromatografia líquida (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Para se poder fazer uso dessa técnica é necessário desenvolver um bom sistema de solventes para ser utilizado como fase móvel. Outro ponto interessante é que o aparelho de CLAE com detector DAD permite também a obtenção do espectro de ultravioleta (UV) da amostra, o que pode auxiliar na sua identificação.

O acoplamento de um detector de espectrometria de massas (EM) a um sistema de CLAE torna esse método analítico um dos mais sensíveis, pois o detector EM possui grande poder de separação de massas. Além disso, esta técnica tem o potencial de fornecer informações sobre a massa molecular dos compostos analisados, bem como, em determinados casos, informações estruturais importantes a partir da fragmentação dos sinais obtidos (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

1.5.1. CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica que se baseia na partição de uma amostra entre duas fases de solventes imiscíveis (coeficiente de partição, K). Trata-se de um tipo de cromatografia de partição líquido-líquido, pois a fase móvel utilizada também está no estado líquido. Porém, diferentemente das outras técnicas clássicas de

cromatografia líquida, em que a fase estacionária encontra-se no estado sólido, na CCC a fase estacionária está no estado líquido (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Esta metodologia permite o isolamento em larga escala de produtos naturais usando apenas um sistema bifásico de solventes imiscíveis, sem necessidade de suporte sólido. Dentre muitas vantagens cromatográficas, essa técnica é capaz de reduzir a perda e degradação da amostra, evitando a adsorção irreversível dos seus componentes na fase estacionária; é também bastante previsível e foi especialmente desenvolvida para análises em escala preparativa (ITO, 2005).

A Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (*High-Speed Countercurrent Chromatography* - HSCCC) se mostrou, em inúmeras aplicações, uma técnica versátil de separação em escala preparativa e especialmente útil na área de isolamento de produtos naturais. A teoria geral desta técnica de separação é baseada na mistura e separação rápida e contínua de sistemas bifásicos de solventes imiscíveis em forte e rápida alternância de campos de força centrífuga. Misturas altamente complexas de origem natural ou sintética podem ser eficazmente fracionadas (ITO; CONWAY, 1986).

O uso de tal instrumentação é simples, mas requer conhecimentos técnicos específicos, uma vez que a seleção das condições experimentais e a técnica do processo de separação são muito diferentes daqueles dos métodos convencionais de cromatografia em coluna (ITO, 2005). No caso da CCC, o maior desafio é obter um sistema bifásico de solventes adequado (BERTHOD et al, 2009). Geralmente, são utilizados sistemas ternários, onde devem estar contidos dois solventes imiscíveis (para que se formem as duas fases, que serão utilizadas como fase estacionária e fase móvel) e mais um de miscibilidade intermediária para reduzir a tensão superficial entre os dois (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Ao se trabalhar com CCC na separação de produtos naturais, uma abordagem diferente deve ser considerada, uma vez que a maioria dos estudos é feita com misturas desconhecidas. Esse método é particularmente valioso no fracionamento de extratos brutos de origem vegetal, porque reduz a possibilidade de perda da atividade biológica durante o processo de separação (CASE et al, 2007). A aplicação dessa técnica no fracionamento de produtos naturais com potencial atividade antimicrobacteriana já foi descrita na literatura (PAULI et al, 2005).

A combinação das possibilidades e vantagens oferecidas pelas diversas metodologias de CCC disponíveis atualmente (ITO, 2005), tais como separações em escala preparativa e com 100% de recuperação da amostra, permite não somente o isolamento de compostos majoritários em uma única corrida, como também o acúmulo de compostos minoritários, que normalmente não seriam detectados em análises por cromatografia convencional, em quantidades adequadas para posterior purificação e identificação.

Em uma abordagem mais prática, por exemplo, na busca de novas substâncias potencialmente terapêuticas de origem natural, que demanda a produção de quantidades comercialmente disponíveis de compostos puros para possibilitar a realização de testes biológicos e ensaios clínicos, a CCC também pode desempenhar um papel importante, devido à sua natureza preparativa e às possibilidades de aumento de escala (De BEER et al, 2009).

Embora a descoberta de substâncias provenientes de plantas medicinais continue a constituir uma importante fonte de novos medicamentos, muitos desafios estão presentes neste tipo de pesquisa, tais como a seleção e aplicação de bioensaios adequados e também a produção em larga escala com alto rendimento. O recente desenvolvimento biotecnológico, os novos métodos de estudo fitoquímico biodirigido, triagens automatizadas e processos analíticos de alta performance introduziram novos conceitos e possibilidades para o planejamento racional de novos fármacos (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARRERO, 2006).

Neste contexto, as possibilidades de aumento de escala proporcionadas pelas técnicas CCC, aliadas à reduzida degradação e à alta recuperação das amostras, fazem desta metodologia um instrumento valioso para a descoberta de novas substâncias terapêuticas a partir de produtos naturais. A identificação de novos metabólitos bioativos de extratos de plantas pode levar à concepção de novos quimioterápicos para o tratamento de várias doenças.

1.5.1.1. pH em CCC

Ao se trabalhar com alcalóides, um parâmetro adicional pode ser utilizado para realizar uma separação por CCC - o valor de pK_a . Essa classe de substâncias possui caráter básico, por isso elas podem, geralmente, ser protonadas quando submetidas ao meio ácido.

Quando se introduz a variação de pH ao sistema de fases de uma análise por CCC, a separação dos compostos se dá não somente com base no coeficiente de partição dos analitos, como também pela sua força iônica (HERMANS-LOKKERBOL; VERPOORTE, 1986).

Nesse contexto, a primeira técnica para CCC que levava em consideração o valor pH de uma das fases do sistema bifásico de separação foi a do *gradiente descontínuo de pH*, descrita por Galeffi em 1985. Essa técnica consiste em se utilizar soluções-tampão em várias faixas de pH como fase móvel, passadas na coluna uma após a outra. Com isso é possível extrair os componentes de acordo com o valor de seu pK (MARINI-BETTOLO; GALEFFI, 1985). Quando se inicia em uma solução de pH 6,0; indo até outra de pH 3,0 as substâncias mais básicas serão eluídas primeiro e conforme se aumenta a acidez os analitos menos básicos também são eluídos em seguida. Dentre as principais desvantagens dessa técnica estão o longo tempo de duração da análise e que ela foi desenvolvida para os antigos aparelhos de CCC, ou seja, nem sempre funciona nos aparelhos utilizados atualmente.

1.5.1.2. REFINAMENTO POR ZONA DE pH

Uma técnica desenvolvida no contexto da ionização das substâncias aplicada à CCC foi o “*refinamento por zona de pH*”, descrito pela primeira vez em 1994 (WEISZ et al, 1994). Para executar esse método na separação de analitos básicos, como os alcalóides, deve-se adicionar ácido à fase aquosa móvel (*eluidor*) e base à fase orgânica estacionária (*retentor*). Deste modo opera-se em modo invertido, de maneira análoga à fase inversa da CLAE. Essa técnica se baseia na partição do analito protonado (presente na fase aquosa) e na forma de base livre (presente na fase orgânica) entre as duas fases do sistema de solventes.

A CCC com *refinamento por zona de pH* é uma técnica preparativa, destinada à aplicação no fracionamento de substâncias ionizáveis, cuja existência de carga elétrica é condicionada ao valor de pH do meio em que se encontram. Seu potencial foi descoberto ao acaso, durante análises realizadas por Weisz e outros (1994), mas depois a técnica foi mais bem estudada e sua teoria foi justificada por Ito e Ma (1996).

No caso de um extrato contendo alcalóides, que nada mais é que uma mistura de substâncias com caráter básico, a separação das substâncias por esse método se dá pela adição, à fase orgânica estacionária, de uma base que seja mais forte que todos os componentes a serem separados. Essa mistura irá entrar em contato com a fase móvel aquosa contendo o ácido, e conseqüentemente, os alcalóides serão eluídos na forma de sais puros (RENAULT et al, 1999). A base conjugada do ácido se torna o contra íon dos sais formados, por isso, a concentração desse na fase aquosa determina a concentração das frações obtidas. No entanto, o aumento da concentração do ácido também resulta na diminuição da resolução da análise (ITO; MA, 1996).

A principal vantagem dessa técnica em relação às demais metodologias de CCC é a de permitir o aumento em até 10 vezes da quantidade de amostra que pode ser injetada no mesmo tipo de coluna. Além disso, esse método possibilita a obtenção de frações altamente concentradas e também o monitoramento da separação por meio do valor de pH do eluente. Outra observação importante nesse contexto é o formato característico dos sinais no cromatograma obtido por detecção em UV. Devido à alta concentração das frações, esses se apresentam com formato retangular, geralmente fundidos, porém sem sobreposição, correspondendo a frações puras. As substâncias não ionizáveis são concentradas e eluídas em momento distinto em relação aos componentes principais, de acordo com seus valores de pK_a e hidrofobicidade (ITO, 2005).

O formato desses sinais é fundamental na compreensão dos fundamentos da técnica. A teoria de CCC se baseia na partição do analito entre as duas fases de um sistema de solventes, por meio de múltiplas transferências. No caso do *refinamento por zona de pH*, as características de partição da amostra são evidenciadas pela variação de pH do meio. Para as substâncias básicas, tem-se que o sal formado a partir delas permanecerá, preferencialmente, na fase aquosa e a forma livre na fase orgânica. Quando o sal entra em contato com a fase orgânica, que contém uma base com valor de pK_b maior que o de sua base livre, a ionização é desfeita e o analito migra para esse solvente (WEISZ et al, 1994) (Figura 8).

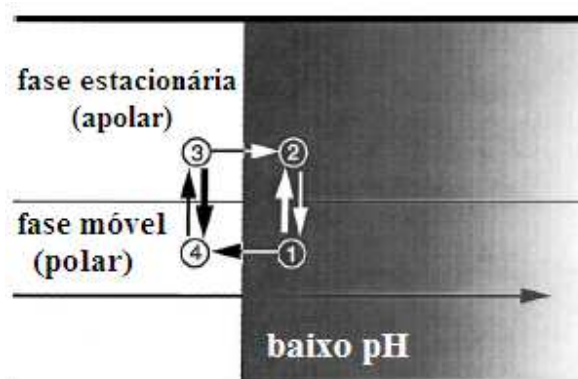


Figura 8 – Esquema de equilíbrio de analitos ionizáveis entre as fases de um sistema de solventes. A forma livre (3) permanece, preferencialmente, na fase orgânica. Quando esta entra em contato com a fase aquosa ácida, o sal formado a partir dela (2) migrará para esta fase (1). Quando o sal entra em contato com a fase orgânica, que contém uma base com valor de pK_b maior que o de sua base livre, a ionização é desfeita (4) e o analito migra para esse solvente (3). Adaptado de Ito (2005).

O resultado disso é que o alcalóide que apresentar maior valor de pK_b e menor hidrofobicidade irá eluir primeiro. No caso de substâncias com o mesmo valor de pK_b , eluirá mais rápido aquela que for mais hidrofílica. Da mesma forma, se a hidrofobicidade for igual, eluirá primeiro a que possui maior valor de pK_b . O ponto crítico da técnica se encontra no fato das substâncias serem responsáveis pela alteração no pH do eluente. Isso permite o monitoramento da separação pela avaliação desse parâmetro e também diferencia essa metodologia do gradiente descontínuo de pH (HERMANS-LOKKERBOL; VERPOORTE, 1986). A estreita influência do valor de pK_b também permite que essa técnica seja usada na separação de substâncias com estruturas muito semelhantes, porém tridimensionalmente diferentes, como, por exemplo, estereoisômeros (WEISZ et al, 1994).

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivos principais extrair, isolar e identificar alcalóides indólicos em extratos de duas espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae), conhecidas na Região Amazônica como “carapanaúba” - *A. excelsum*, sendo esta encontrada em áreas de terra firme, e *A. rigidum*, encontrada em áreas de baixio. Esses alcalóides serão avaliados quanto às suas atividades biológicas, tendo como base as indicações etnofarmacológicas de seu uso popular e os resultados prévios obtidos no laboratório.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os perfis químicos e atividades biológicas dos chás preparados a partir de cascas de *A. rigidum* e *A. excelsum*; e também com os extratos etanólicos de ambas as espécies.
- Determinar o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, para todos os extratos, com base na indicação popular de “fortificante dos nervos”.
- Determinar a atividade antimicrobacteriana, para todos os extratos, através da avaliação *in vitro* frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (triagem randômica).
- Estabelecer metodologia inovadora de isolamento de alcalóides indólicos por cromatografia contracorrente com *refinamento por zona de pH*.
- Realizar o isolamento biodirigido e identificação de alcalóides ativos dos extratos de *A. rigidum* e *A. excelsum*.

3. METODOLOGIA

3.1. MATERIAL VEGETAL

As amostras (cascas) de *Aspidosperma rigidum* Rusby (carapanaúba do baixo, CBA) e *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba de terra firme, CTF) foram coletadas, em agosto de 2008, pelo Prof. Dr. Danilo Oliveira na comunidade Jauari (S 01°15.326', W 056°02.437'), no município de Oriximiná-PA, com o apoio de mateiros/extrativistas da própria comunidade. Posteriormente, o material vegetal foi identificado pelo botânico Dr. Washington Marcondes-Ferreira, especialista na família Apocynaceae. As exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, em Manaus, AM, sob os registros INPA 233366 para *A. rigidum* (CBA) e INPA 233367 para *A. excelsum* (CTF); e também no herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob os registros UEC 148194 Oliveira 195 e 216, para *A. rigidum* (CBA) e UEC 148195 Oliveira 207 e 217 para *A. excelsum* (CTF).

3.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As cascas e entrecascas de *A. rigidum* (CBA) e *A. excelsum* (CTF) foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C durante três dias, e moídas em moinho de martelo. A seguir, foram realizadas três etapas de extração: maceração em percolador com etanol, maceração com solventes de polaridades diversas (diretamente a partir do pó) e a extração com água (decocto, segundo método tradicional), com posterior liofilização (Figura 9).

A maceração em percolador com etanol foi realizada utilizando cerca 302 g de pó de cascas e entrecascas de CBA e 300 g de CTF exatamente pesados, gerando os extratos CBAEt e CTFEt, respectivamente. Para a maceração com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade foram utilizados 505,95 g de pó de cascas de CBA e 502,37 g de CTF também exatamente pesados, gerando os extratos CBAH e CTFH (da extração com hexano), CBAD e CTFD (com diclorometano), CBAA e CTFA (com acetato de etila) e CBAM e CTFM (com metanol).

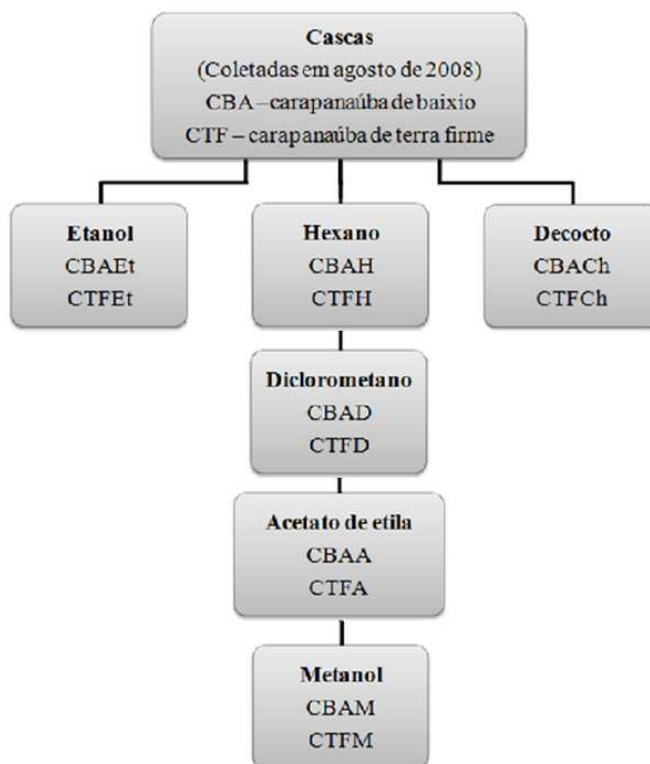


Figura 9 – Fluxograma das extrações realizadas e código dos respectivos extratos obtidos das espécies *Aspidosperma rigidum* (carapanaúba do baixo, CBA) e *A. excelsum* (carapanaúba de terra firme, CTF).

Todos os extratos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. Os extratos obtidos, bem como suas respectivas massas e rendimentos (calculado sobre a massa pesada de cascas e entrecascas) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Extratos obtidos das cascas e entrecascas de *A. rigidum* (baixo, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF), com seus respectivos rendimentos.

Extrato em:	<i>A. rigidum</i> (CBA)			<i>A. excelsum</i> (CTF)		
	Código	Massa obtida	Rendimento	Código	Massa obtida	Rendimento
Etanol	CBAEt	28,5702 g	9,5 %	CTFEt	10,2722 g	3,2 %
Hexano	CBAH	3,1283 g	0,6 %	CTFH	1,2059 g	0,2 %
Diclorometano	CBAD	3,9895 g	0,8 %	CTFD	2,4061 g	0,5 %
Ac.de etila	CBAA	0,4310 g	0,08 %	CTFA	0,6353 g	0,1 %
Metanol	CBAM	51,4040 g	10,2 %	CTFM	22,8924 g	4,6 %

Os valores de rendimento foram calculados pela dividindo-se a massa de extrato seco obtido pela massa total de casca e entre casca pesada para o preparo do respectivo extrato e multiplicando por 100. Sendo assim, os extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol se basearam na mesma massa de material vegetal inicial. Um exemplo pode ser ilustrado com o cálculo do rendimento do extrato CBAD. O resultado da divisão de 3,9895 por 505,95 é 0,0078, que multiplicado por 100 é igual a aproximadamente 0,8. O mesmo procedimento foi aplicado para o cálculo do rendimento dos decoctos.

Por fim, a extração com água (decocto) gerou os extratos CBACH e CTFCh (Figura 10). Para o preparo dos decoctos foram pesados aproximadamente 30 g de cascas de cada uma das espécies, que foram colocados em 300 mL (decocto a 10%) de água fria e posteriormente levados ao aquecimento em placa (segundo o método tradicional do “chá fervido”).

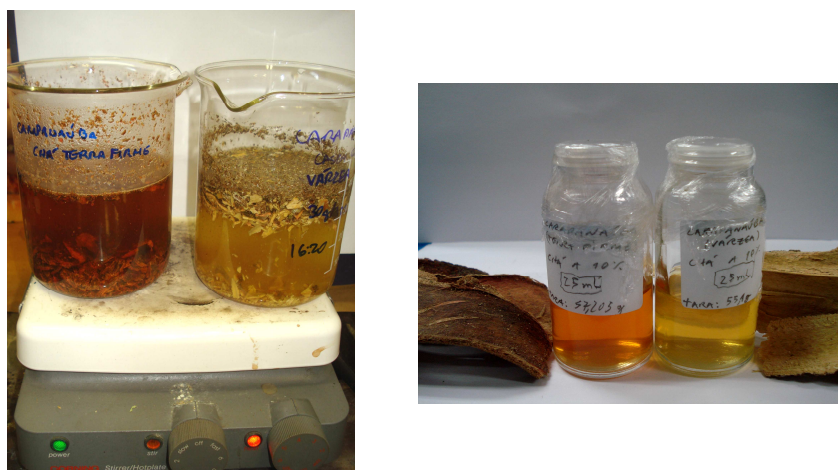


Figura 10 – Decoctos de *Aspidosperma rigidum* (CBACH) e *A. excelsum* (CTFCh) pelo método tradicional do “chá fervido”.

Os decoctos foram preparados com o objetivo de reproduzir a forma de extração utilizada tradicionalmente. A massa de 30 g de casca corresponde aproximadamente ao “punhado” mostrado aos pesquisadores no ato de entrevista etnofarmacológica. A partir das cascas da carapanaúba de terra firme foram obtidos 541 mg (rendimento de 1,8%) e do baixio 1,4610 g (rendimento de 4,9%) de pó do decocto liofilizado. Tanto no caso decoctos,

quanto para os extratos citados no item anterior, foi observado maior rendimento para os extratos obtidos a partir da espécie *A. rigidum* (CBA).

3.3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

3.3.1. ATIVIDADE INIBIDORA DA ACETILCOLINESTERASE (*in vitro*)

O teste de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) é realizado pelo nosso grupo, em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Newton G. Castro do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, ICB/UFRJ. Trata-se de um ensaio *in vitro* baseado no método quantitativo de Ellman (1961) modificado, que avalia a inibição da AChE da enguia elétrica *E. electricus* (OLIVEIRA, 2009).

Esse teste consiste de uma reação colorimétrica (mudança de cor de incolor para amarelo), realizada em microplacas de 96 poços, onde são adicionados 15 µL de solução a 0,23 U/mL da enzima AChE tipo VI-S (C3389, 200 – 1000 unidades/mg proteína – Sigma, St. Louis, MO, EUA) em tampão 50 mM de Tris-HCl (nº 1.08219.0100 – Merck, Darmstadt, Alemanha) pH 8, com 0,1% de albumina de soro bovino (A2153 – Sigma, St. Louis, MO, EUA); 10 µL do reagente colorimétrico (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB, D8130 – Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 5 mM (em tampão 50 mM de Tris-HCl, pH 7 e 80 mM de MgCl₂.6H₂O), 20 µL das soluções a 2 mg/mL das amostras (solubilizadas em tampão Tris-HCl, pH 8), 10 µL do substrato iodeto de acetiltiocolina (ATCI, A5751 – Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 10 mM solubilizado em água desionizada e 145 µL de tampão 50 mM de Tris-HCl, pH 8, com 0,1% de albumina, para completar o volume do poço.

O produto formado era, posteriormente, lido em um espectrofotômetro do modelo Soft Max 250 a 412 nm, no modo cinético a cada 13 segundos durante 5 minutos. O controle positivo da inibição foi realizado pela adição de solução a 0,1 mg/mL de fisostigmina (eserina, nº 45710 – Fluka, Buchs, Suíça), um conhecido alcalóide com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase. Todos os extratos foram avaliados em triplicada.

No teste, o substrato ATCI sofre a ação da enzima acetilcolinesterase, formando ácido acético e tiocolina. A tiocolina reage com o DTNB formando um produto de coloração amarela. Se a enzima for inibida, esse produto não é formado (Figura 11).

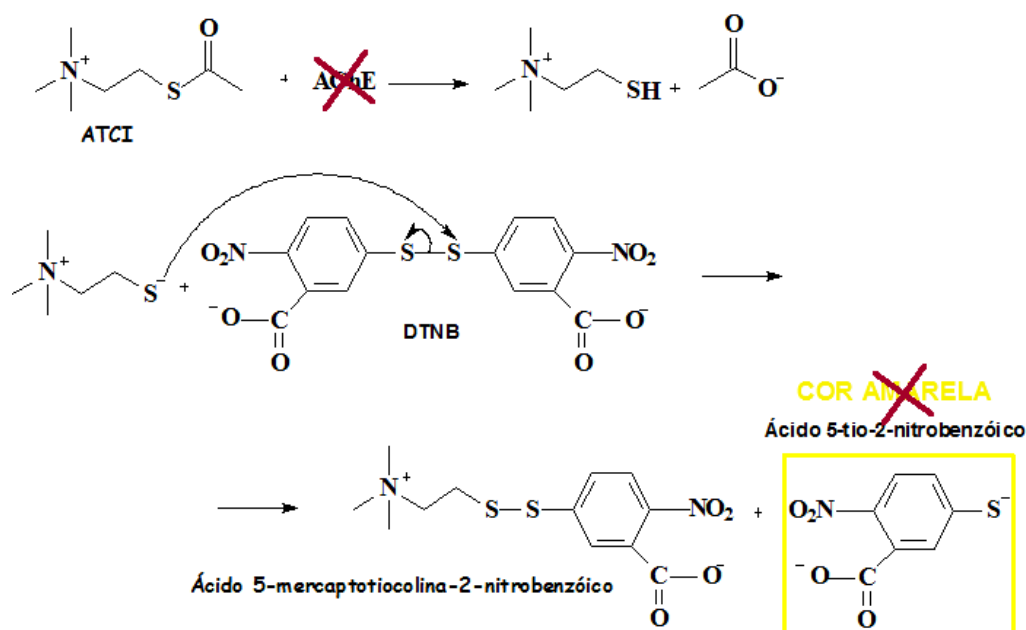


Figura 11 – Reação colorimétrica proposta por Ellman - extraído de Oliveira (2009).

3.3.2. ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

Os ensaios de atividade antimicobacteriana foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Pedro Almeida da Silva – Laboratório de Micobactérias/DP/FURG, Rio Grande, RS. Os extratos foram testados frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis (H37RV ATCC n° 27294) e resistentes a rifampicina (RMP_r n° 35338) e a isoniazida (INH_r e 35822). Para a determinação da atividade biológica e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ativos, foi utilizado o Método REMA (*Resazurin Microtiter Assay*) em microplaca, com algumas adaptações (PALOMINO et al, 2002).

A técnica REMA se baseia na reação de oxidorredução do reagente colorimétrico resazurina. Esse reagente indica a presença de crescimento microbiano quando ocorre a passagem da coloração azul não fluorescente (resazurina) para rosa fluorescente (resorufina), por meio de redução. O crescimento microbiano pode então ser quantificado

por um fluorímetro ou espectrofotômetro, ou ainda ser determinado pela observação visual da mudança de cor.

As culturas de micobactéria foram preparadas em tubos de vidro estéril com rosca (Figura 12) contendo pérolas de vidro e pesados, individualmente, na balança de precisão. As colônias de cada cepa foram inoculadas em tubos separados com o auxílio de palitos estéreis. Após esse procedimento, foi realizada novamente a pesagem e calculada a diferença. Para cada 0,001 g de cepa adicionou-se 1 mL de água destilada estéril, iniciando com 500 μ L de água, seguido por agitação no vórtex e, depois, completando o restante com água e agitando outra vez. Essa suspensão de células corresponde ao valor 1,0 da escala de MacFarland. O inóculo da cepa foi preparado a partir desta suspensão, em uma proporção de 1:20 em meio 7H9 líquido.

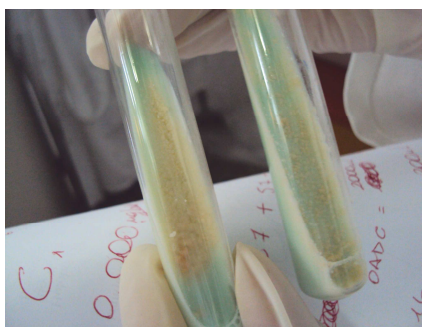


Figura 12 – Tubos de vidro estéril com rosca contendo as culturas de micobactéria (Foto: Fernanda Leitão).

Os testes de triagem foram realizados em microplacas de 96 poços com fundo U (Figura 13). No centro da placa, foram adicionados 100 μ L de meio de cultura (7H9) associado a OADC (ácido oléico, albumina, dextrose, catalase), 100 μ L do extrato vegetal a ser testado (solubilizado em DMSO) e 100 μ L do inóculo bacteriano, de maneira que a concentração final do extrato no poço totalizasse 200 μ g/mL.

Para monitorar o experimento, dois controles foram utilizados, um para medir a viabilidade da cepa (com 100 μ L de meio de cultura e 100 μ L do inóculo bacteriano) e um para testar a esterilidade do meio (com 200 μ L de meio de cultura apenas). Aos poços da periferia foram adicionados 200 μ L de água destilada estéril, para evitar a rápida evaporação do meio líquido quando incubado na estufa. Depois, a microplaca era incubada por sete dias numa estufa a 37°C.

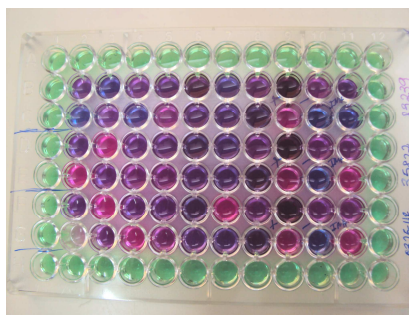


Figura 13 – Microplacas de 96 poços com fundo U, para os testes de triagem e CIM (Foto: Fernanda Leitão).

Para o cálculo da CIM dos extratos que apresentaram atividade, os mesmos foram testados com procedimento similar, mas em diferentes concentrações. Partiu-se de 200 $\mu\text{g/mL}$, no primeiro poço da série, até obter a concentração de 0,39 $\mu\text{g/mL}$ no último poço, fazendo microdiluições (1:2), sendo possível testar até seis extratos por placa. Em seguida, a microplaca era incubada por sete dias numa estufa a 37°C.

Após o período de incubação, nos dois experimentos, acrescentou-se 30 μL de resazurina a 0,02% em cada poço de teste, permanecendo por mais dois dias na estufa (a 37°C). A leitura foi feita pela observação visual da coloração rosa para o controle da suspensão bacteriana, indicativo de viabilidade celular, e azul para os demais controles.

3.4. PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS

A partir dos extratos foram realizados processos de isolamento dos constituintes da amostra. Foram utilizadas a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e técnicas de cromatografia contracorrente (CCC).

3.4.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As cromatografias em camada delgada foram executadas no decorrer desse trabalho para o acompanhamento de fracionamentos e testes preliminares. Para essas análises, placas de gel de sílica 60, F₂₅₄ – Cromatofolhas AL, MERCK foram utilizadas. As soluções analisadas foram aplicadas nas placas com um capilar de vidro, a 1,0 cm de distância das

bordas laterais e inferior e cerca de 0,7 cm entre as amostras. O caminho cromatográfico percorrido pelas amostras contava com 5,0 cm.

O sistema de solventes utilizado para eluir os componentes dos extratos polares (em metanol, etanol e chás) foi o BAW – butanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v). Os solventes eram misturados em uma proveta com tampa e, em seguida, a mistura era transferida para um funil de separação. Após a decantação, as duas fases eram separadas e somente a fase superior orgânica era utilizada. Para os extratos menos polares (em hexano, diclorometano e acetato de etila), utilizou-se um sistema de solventes composto por acetato de etila: acetona: água (25: 8: 2, v/v/v), com duas gotas de NH_4OH .

Após o desenvolvimento da cromatografia, as placas foram visualizadas sob luz UV em ondas curtas (254 nm) e ondas longas (366 nm) no Spectronline Model CC-80, Spectronics Corporation e reveladas com Reagente de Dragendorff, preparado segundo método descrito por Wagner, Bladt e Zgainski (1984) para a detecção dos alcalóides. O registro foi realizado por digitalização.

3.4.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para as análises realizadas por CLAE no laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica do DPNA, FF/UFRJ, foi utilizado o aparelho CLAE D-7000 Merk-HITACHI com detector UV/DAD e coluna RP-18 analítica Rexchrom (REGIS) de 25 cm x 4.6 mm, 5 micron (100 Å). Os cromatogramas foram visualizados no programa de computador D-7000 HPLC System Manager.

O sistema de solventes utilizado como fase móvel foi um gradiente linear iniciado com 80% de água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) até pH 3 e 20% acetonitrila, até 10% de água ácida e 90% de acetonitrila em 18 minutos, com mais dois minutos de lavagem da coluna utilizando 100% de acetonitrila ((método desenvolvido durante a execução desse projeto e denominado Perfil BR). Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza HPLC. O tempo total de análise foi de 20 minutos, volume de injeção: 20 μL , fluxo 1 mL/min, a concentração das amostras de aproximadamente 2 mg de extrato solubilizada em 1 mL de fase móvel inicial e a detecção em 250 nm. Para os espectros de UV, realizou-se a varredura na faixa de 220 a 400 nm com o DAD.

3.4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS (CLAE/EM)

As análises realizadas por CLAE/EM foram possibilitadas graças a uma colaboração com o grupo do Prof. Dr. Peter Winterhalter, do Instituto de Química de Alimentos da Universidade Técnica de Brunsvique, na Alemanha. Utilizou-se o equipamento HCT-Ultra ETD II (Bruker Daltonics), com coluna Prontosil C18-Aq de 250 x 2.0 mm, 5 micron (100 Å), com précoluna do mesmo material. Os resultados foram avaliados no programa de computador Bruker Compass – Versão 1.1. Analisou-se somente as soluções do decocto, pois a coluna cromatográfica utilizada era específica para substâncias polares e esse extrato representa melhor o modo de utilização tradicional.

O sistema de solventes utilizado como fase móvel foi um gradiente linear iniciado com 80% de água acidificada com ácido fórmico a 0,5% e 20% de acetonitrila também acidificada com ácido fórmico a 0,5%, indo até 10% de água ácida e 90% de acetonitrila em 50 minutos (método desenvolvido durante a execução desse projeto e denominado Perfil DE). Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza HPLC. O volume de injeção era de 10 µL, o fluxo 0,25 mL/min e as amostras foram solubilizadas na fase móvel inicial. A detecção por EM foi programada para substâncias com relação m/z na faixa de 100 a 2000 e a ionização se deu por *eletrospray*, no modo positivo. Os fragmentos obtidos representam m/z $[M^+ + 1]$. Os cromatogramas e espectros de UV foram obtidos pelo DAD, realizando a varredura entre 200 e 700 nm.

3.4.4. CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE (CCC) COM *REFINAMENTO POR ZONA DE pH*

3.4.4.1. ESCOLHA DO SISTEMA DE SOLVENTES PELO TESTE EM TUBO DE ENSAIO

Para testar a eficiência de um sistema de solventes na separação por cromatografia contracorrente antes de utilizar o aparelho, utilizou-se uma técnica simples, realizada por CCD. Em um tubo de ensaio dissolve-se alguns miligramas (uma ponta de espátula) da

amostra a ser fracionada (extrato CBAD) em cerca de 2 mL dos sistemas bifásicos a serem testados. No caso da CCC com *refinamento por zona de pH*, contudo, o teste teve que ser realizado com dois tubos de ensaio. Em um deles estava contido o sistema bifásico com o ácido e no outro o mesmo sistema com a base. Após agitação e decantação, as fases superior e inferior foram aplicadas separadamente e em igual quantidade na placa de sílica e o resultado foi avaliado, após o desenvolvimento da CCD, segundo descrito no item 3.4.1 desta seção, para extratos apolares.

Para substâncias básicas, como os alcalóides, o resultado ideal para esse teste é que no tubo com ácido a amostra se encontre principalmente na fase aquosa ($K_{\text{ácido}} \ll 1$) e, no tubo com base, na fase estacionária ($K_{\text{base}} \gg 1$) (ITO; MA, 1996).

3.4.4.2. SEPARAÇÃO POR HSCCC COM REFINAMENTO POR ZONA DE pH

O fracionamento por HSCCC com *refinamento por zona de pH* foi realizado no equipamento Multilayer Coil Separator-extractor da P.C.Inc., com bomba Waters M-45 de 2 pistões e coletor de frações Dynamax Fraction Collector, modelo Fc-1. As condições utilizadas na análise presente nesse trabalho foram: fase estacionária – superior (orgânica, alcalinizada com trietilamina, TEA, na concentração de 10 mM), fase móvel – inferior (aquosa, acidificada com ácido fórmico na concentração de 15 mM, pH 2,7), modo de operação – modo inverso (conexão cabeça-cauda), coluna - 80 mL, amostra (extratos em diclorometano) – 302,6 mg dissolvidos em 2,5 mL de fase aquosa (sem adição de ácido) e 2,5 mL de fase orgânicas (alcalinizada com TEA 10 mM), *loop* de 5 mL, rotação – 845 rpm, temperatura – ambiente, fluxo – 2 mL/min, volume das frações – 4 mL. O extrato CBAD foi escolhido para o desenvolvimento e ajuste do método, pois foi obtido em maior quantidade que o CTFD.

Primeiramente, a coluna foi preenchida com a fase estacionária. A seguir, carregou-se o *loop* com a amostra filtrada em algodão. Após girar a válvula para a posição “*inject*”, iniciou-se o bombeamento da fase móvel. A etapa de equilíbrio do sistema não foi realizada, sendo assim, o cálculo de retenção da fase estacionária foi realizado utilizando-se o volume de fase estacionária que eluiu até a primeira fração que apresentou duas fases. Foram coletados dois volumes de coluna (160 mL) de fase móvel com a rotação e mais um

volume (80 mL) sem rotação. O resultado foi avaliado por CCD, segundo descrito no item 3.4.1 desta seção, para extratos apolares, e pela determinação manual do valor de pH das frações, utilizando potenciômetro de bolso com eletrodo e cabo (Modelo G400BC – Quimis Aparelhos Científicos LTDA).

3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES ISOLADOS (A₁, A₂ e A₄) DE *A. rigidum*

As frações obtidas por CCC foram secas e os alcalóides isolados foram analisados, utilizando-se as técnicas descritas a seguir, sem a necessidade de etapas posteriores de purificação.

3.5.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os experimentos de RMN de A₁ foram realizados em espectrômetro Varian 500 MHz, do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN/UFRJ), e os experimentos de A₂ e A₄ em um espectrômetro Bruker 400 MHz, do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN/UFRJ). Obtiveram-se os espectros de ¹H, ¹³C em 1D/2D, bem como HSQC, HMBC e COSY. Todos os experimentos foram feitos em temperatura ambiente, o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna e as substâncias foram dissolvidas em aproximadamente 0,6 mL de metanol deuterado (CD₃OD), somente A₁, e clorofórmio deuterado (CDCl₃). Os deslocamentos químicos foram medidos em partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento medidas em Hertz (Hz). Os espectros foram processados no programa MestRenova, versão 6.0.2-5475.

3.5.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os fragmentogramas foram obtidos no equipamento GCMS QP 5000 Shimadzu, do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN/UFRJ). Cerca de 1 mg de cada amostra foi solubilizado em aproximadamente 100 µL de clorofórmio e, dessa solução, 1 µL foi injetado por injeção direta. A ionização se deu por impacto de elétrons a 70 eV e os fragmentos obtidos representam m/z [$M^+ + 1$].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

As plantas têm sido utilizadas como fonte de agentes terapêuticos ao longo da história e continuam a servir como base para muitos medicamentos usados atualmente, devido à sua grande capacidade biossintética e também à sua complexa composição química, que consiste de coleções de substâncias relacionadas a diversas ações farmacológicas que interagem para uma maior atividade total (SCHMIDT et al, 2008).

A descoberta de novos fármacos oriundos de plantas continua a fornecer novas e importantes moléculas ativas em diversos alvos farmacológicos, inclusive no combate ao câncer, malária, tuberculose, doença de Alzheimer e dor. Os produtos naturais podem ser diretamente empregados ou fornecer um ponto de partida para novos compostos sintéticos com estruturas diversificadas e muitas vezes com múltiplos estereocentros, que representam um grande dificuldade para a química sintética (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A fim de direcionar o fracionamento dos extratos, foram feitos testes biológicos com base nas indicações observadas durante o estudo etnofarmacológico precedente a este trabalho (OLIVEIRA, 2009), isto é, atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, correspondente à indicação de “fortificante dos nervos” e para a memória; e atividade contra a tuberculose, identificada durante uma triagem randômica realizada no laboratório, por meio da inibição do crescimento de diferentes culturas do *Mycobacterium tuberculosis*.

4.1.1. ATIVIDADE INIBIDORA DA ACETILCOLINESTERASE (*in vitro*)

A principal terapia empregada no tratamento sintomático da Doença de Alzheimer se baseia na hipótese colinérgica. Ao se inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina, obtém-se um aumento na concentração dessa substância na fenda sináptica, melhorando as funções neurológicas (CUMMINGS, 2004). As substâncias utilizadas atualmente, entretanto, apresentam não somente baixa biodisponibilidade, como também fortes efeitos colaterais (distúrbios gastrointestinais e hepatotoxicidade). Por esse motivo, a pesquisa de alternativas terapêuticas

para o tratamento da Doença de Alzheimer está focada na busca de novas moléculas capazes de inibir a enzima AchE (MUKHERJEE et al, 2007).

Dentre os produtos naturais, os alcalóides se apresentam como promissores candidatos a inibidores da AchE, devido ao fato de serem substâncias nitrogenadas (como o neurotransmissor acetilcolina). Essa atividade biológica já foi descrita na literatura para alcalóides esteroidais isolados de espécies das famílias Amaryllidaceae e Buxaceae, para isoquinolinas de Papaveraceae, quinolizidinas de Lycopodiaceae e alcalóides indólicos de Leguminosae. Na família Apocynaceae, essa atividade foi verificada apenas para os alcalóides isolados da espécie *Tabernaemontana australis* (ANDRADE et al, 2005).

No estudo desenvolvido por Oliveira (2009, 2011b), os extratos da carapanaúba (terra firme) apresentaram-se bastante ativos e foram os únicos, dentre as amostras testadas, que mantiveram a atividade após a precipitação do seu conteúdo de taninos. No presente trabalho, a atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AchE) foi determinada para todos os extratos de ambas carapanaúbas, inclusive para os decoctos (uso tradicional), por meio do teste descrito no item 3.3.1 da metodologia. Com isso, visou-se direcionar o fracionamento dos extratos para a busca de uma substância com maior atividade biológica. A concentração das amostras foi de aproximadamente 2 mg/mL. Os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade inibidora da AchE para os extratos de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF), na concentração de 2 mg/mL, utilizando o método de Ellman modificado. O controle positivo de inibição foi realizado pela eserina a 0,1 mg/mL.

Extrato em:	<i>A. rigidum</i> (CBA)			<i>A. excelsum</i> (CTF)		
	Código	% de inibição	Desvio padrão	Código	% de inibição	Desvio padrão
Hexano	CBAH	-2,33	0,382	CTFH	25,44	3,695
Diclorometano	CBAD	47,90*	2,940	CTFD	62,94*	2,679
Ac.de etila	CBAA	34,64	4,689	CTFA	44,75	2,574
Metanol	CBAM	31,42	4,776	CTFM	75,80*	0,690
Etanol	CBAEt	33,33	1,190	CTFEt	79,60*	1,158
Água (decocto)	CBACH	17,96	4,098	CTFCh	53,34	2,931
Eserina	controle	98,30	0,413			

Nota da Tabela: Os asteriscos (*) destacam os maiores valores de inibição.

Ao observar esses dados é possível verificar que ambas as espécies demonstraram exercer atividade inibidora da AchE, o que era esperado, uma vez que essa atividade já fora descrita na literatura para alcalóides indólicos isolados, por exemplo, das espécies *Picralima nitida* (LEVY-APPERT-COLLIN, 1978), *Tabernaemontana australis* (MUKHERJEE et al, 2007), *T. catharinensis*, *T. laeta*, *Rauvolfia mattfeldiana* e *R. grandiflora* (GUIMARÃES et al, 2010), todas da família Apocynaceae.

Nota-se também que os extratos de CTF mostraram ser mais ativos, de um modo geral, que os de CBA. O único extrato de CBA que alcançou aproximadamente 50% de inibição da atividade da AchE, na concentração testada, foi o CBAD. Já os extratos CTFD, CTFM e CTFEt apresentaram atividade inibitória relativamente alta, acima de 60%, sendo que o CTFCh apresentou inibição de cerca de 50%. Não coincidentemente, estes foram os extratos onde se encontrou maior concentração de alcalóides nos testes preliminares realizados por CCD com reagente de Dragendorff (dados não mostrados).

Vale ainda ressaltar que os extratos que apresentaram maior atividade na concentração testada (CTF) foram os que forneceram menor rendimento na etapa da extração (Item 4.1). É possível que a proporção total de alcalóides seja importante na observação do efeito terapêutico durante o uso tradicional, uma vez que uma quantidade maior de alcalóides é obtida na extração da carapanaúba do baixo.

Com base nos resultados observados, optou-se por iniciar os experimentos de fracionamento com os extratos em diclorometano (CBAD e CTFD), uma vez que esses apresentaram maior atividade biológica no modelo testado e também a presença de alcalóides. Após isso, a repetição do teste com os compostos isolados auxiliará na determinação do agente que mais contribui para a ação global ou mostrará se as substâncias se potencializam.

Ademais, a comparação dos perfis químicos fez-se necessária, tendo em vista que houve diferenças na inibição exercida pelas espécies, embora elas sejam popularmente utilizadas sem distinções, para os mesmos fins. Cabe também salientar que os testes foram realizados em apenas um modelo experimental; e para afirmar se uma espécie é mais eficaz que outra contra os sinais da Doença de Alzheimer seria imprescindível realizar testes também em outros modelos, inclusive *in vivo*.

4.1.2. ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

Todos os extratos foram submetidos ao teste REMA (descrito no item 3.3.2 da metodologia), que avalia a atividade antimicobacteriana. Os testes mediram a atividade inibidora do crescimento de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis a rifampicina e izoniazida (H37Rv), resistentes a rifampicina (RMP_r) e resistentes a izoniazida (INH_r). Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade antimicobacteriana, para todos os extratos de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF), frente a cepas do *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis a rifampicina e izoniazida (H37Rv), resistentes a rifampicina (RMP_r) e resistentes a izoniazida (INH_r).

Código	CIM frente H37Rv (sensível)	CIM frente 35338 (RMP_r)	CIM frente 35822 (INH_r)
CBAH	50µg/mL	25µg/mL*	25µg/mL*
CBAD	50µg/mL	50µg/mL	25µg/mL*
CBAA	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL
CBAM	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL
CBAEt	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL
CBACH	resistente	resistente	resistente
CTFH	200µg/mL	resistente	200µg/mL
CTFD	50µg/mL*	50µg/mL*	50µg/mL*
CTFA	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL
CTFM	resistente	resistente	resistente
CTFEt	200µg/mL	100µg/mL	200µg/mL
CTFCh	resistente	resistente	resistente

Nota da Tabela: Os asteriscos (*) destacam os menores valores de CIM.

É possível observar que, de um modo geral, os extratos mais ativos foram os que contêm as substâncias mais apolares, como os extratos em hexano (da CBA) e em diclorometano de ambas as espécies. Por esse motivo, pode-se supor que tal efeito farmacológico não seja exercido necessariamente pelos alcalóides indólicos, uma vez que esses não foram detectados nos extratos em hexano (por meio do teste com o reagente de Dragendorff). Os decoctos, que são extratos aquosos, ou seja, os de maior polaridade não

apresentaram atividade para ambas as espécies. Vale ressaltar que, de maneira geral, os extratos da carapanaúba de terra firme se mostraram novamente mais ativos que os do baixio.

Essa diferença na atividade biológica evidenciou a necessidade da comparação do perfil químico entre as duas espécies de carapanaúba. Além disso, os extratos em diclorometano apresentaram-se novamente dentre os mais ativos e tal resultado corrobora com a seleção dessas amostras para o fracionamento.

Permanecem como perspectivas futuras a pesquisa de outras classes de produtos naturais que possam estar presentes nos extratos apolares dessas carapanaúbas, bem como a determinação de seu potencial antimicobacteriano.

4.2. COMPARAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi escolhida como metodologia para a determinação e comparação dos perfis químicos das duas espécies de carapanaúba em estudo. Os experimentos de CLAE acoplada ao Detector de Arranjo de Diodo (DAD) foram realizados no Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e os de Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE/EM) no Instituto de Química de Alimentos da Universidade Técnica de Brunsvique, na Alemanha. Este último equipamento também dispunha de DAD.

Para a comparação dos perfis cromatográficos, primeiramente foram selecionados os decoctos e os extratos em etanol. Os primeiros por tratarem-se do método tradicional de consumo pelos quilombolas e o outro pela capacidade de extração de maior variedade de componentes. Com base nos resultados obtidos nessas análises, optou-se por avaliar também a similaridade desses extratos com os em metanol, uma vez que esses foram obtidos em maior quantidade.

4.2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O método de análise por CLAE denominado “Perfil BR” foi desenvolvido, neste trabalho, com o objetivo de comparar os perfis químicos dos decoctos e extratos brutos

preparados a partir das cascas de *Aspidosperma rigidum* e *A. excelsum*; e também com os demais extratos de ambas espécies. Para tal, todas as amostras foram analisadas sob as mesmas condições.

Na Figura 14 (a e b) estão apresentados os cromatogramas dos extratos em etanol de ambas espécies de carapanaúba, *A. rigidum* e *A. excelsum*, respectivamente. Os perfis químicos se mostram bem diferentes quanto à proporção dos componentes majoritários. Entretanto, é possível estabelecer correspondências entre os tempos de retenção (T_R) das substâncias presentes.

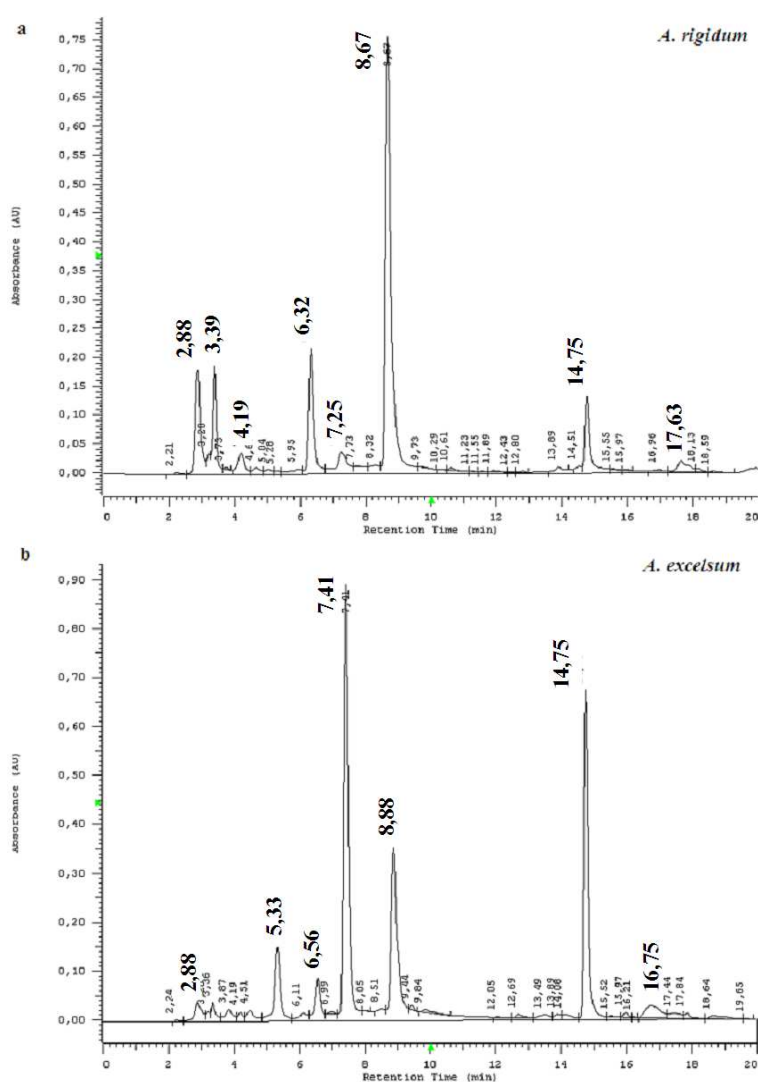


Figura 14 – Cromatogramas de CBAEt (a) e CTFEt (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm.

Os principais sinais do extrato CBAEt correspondem aos T_R – 6,32; 7,25; 8,67 e 14,75 minutos. Foi visto, pela análise dos espectros de UV, que os dois primeiros sinais que aparecem nesse cromatograma, em T_R 2,88 e 3,39 minutos, não possuem valores de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) característicos de alcalóides indólicos (GABETTA; MUSTICH, 1975). Já os principais sinais presentes no cromatograma do CTFEt correspondem aos T_R – 5,33; 6,56; 7,41; 8,88 e 14,75 minutos. Os espectros de UV correspondentes aos sinais de CBAEt e CTFEt encontram-se respectivamente nos Anexos 7.1 e 7.2.

Os valores de T_R e $\lambda_{\text{máx}}$ encontrados foram dispostos na Tabela 4, de forma a facilitar a visualização dos dados para comparação. Nota-se que o único sinal que se apresenta bastante distinto dos demais é o correspondente em T_R 7,25 minutos, do CBAEt, pois é o único que apresenta somente duas bandas de absorção máxima.

Tabela 4 – Dados cromatográficos (tempo de retenção, T_R) e de ultravioleta (valores de absorção máxima, $\lambda_{\text{máx}}$) dos extratos em etanol de *A. rigidum* (carapanaúba do baixio, CBA) e *A. excelsum* (carapanaúba de terra firme, CTF).

<i>A. rigidum</i> (CBA)		<i>A. excelsum</i> (CTF)	
T_R (min.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	T_R (min.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
-	-	5,33	235,9; 289,2; 398,0
6,32	240,8; 288,5; 396,0	6,56	232,2; 287,8; 396,0
7,25	235,0; 273,0	7,41	238,6; 275,1; 301,8; 367,7
8,67	238,8; 273,9; 302,0; 366,0	8,88	239,3; 273,9; 300,6; 366,0
14,75	250,9; 278,8; 334,3	14,75	251,8; 279,8; 330,9

O CTFEt mostrou-se mais rico em quantidade de componentes (no comprimento de onda em que foi realizada a análise), com dois sinais, em tempos de retenção diferentes, cujos espectros de UV correspondem àquele de um sinal com espectro de UV semelhante na CBA. Tal relação foi observada no sinal em T_R 6,32 minutos do CBAEt, que possui valores de $\lambda_{\text{máx}}$ correspondentes aos dos sinais em T_R 5,33 e 6,56 minutos de CTFEt. Da mesma forma, isso ocorre com o sinal em T_R 8,67 minutos do CBAEt, que corresponde aos sinais em T_R 7,41 e 8,88 minutos de CTFEt.

É possível que se trate de diferentes substâncias com estrutura semelhante. A presença de grupos substituintes que não possuam pares de elétrons não compartilhados ou

insaturações (grupos cromóforos) é capaz de alterar a polaridade da molécula, e consequentemente o seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, sem causar efeito auxocrômico. Foi encontrada apenas uma substância aparentemente idêntica com o mesmo T_R em 14,75 minutos e espectro de UV semelhante, para os extratos em etanol de *A. rigidum* e *A. excelsum*.

Apesar de técnica de CLAE/DAD ser bastante útil quando se trabalha com misturas complexas, ela não fornece dados conclusivos quanto à análise estrutural das substâncias presentes. Em suma, com base nos resultados obtidos pode-se sugerir que os extratos brutos dessas espécies de carapanaúba podem ser semelhantes quanto à composição química, porém diferem quanto à variedade estrutural e proporção das substâncias encontradas.

A Figura 15 mostra os cromatogramas dos decoctos:

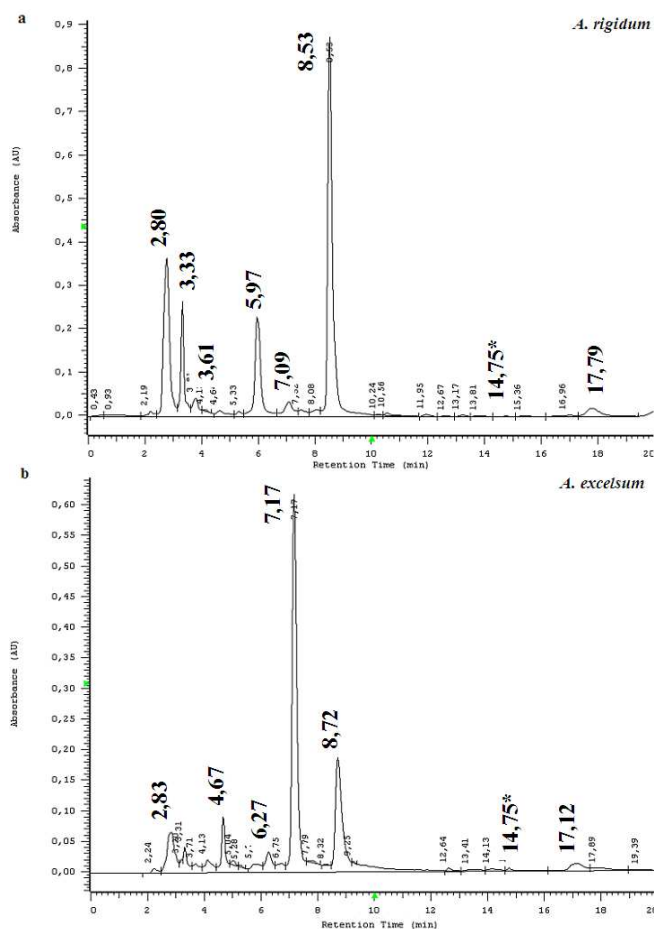


Figura 15 – Cromatogramas de CBACH (a) e CTFCh (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm. Os sinais de T_R em 14,75 minutos estão marcados com asterisco (*).

Foi possível observar que cada um possui perfil cromatográfico semelhante ao do extrato em etanol preparado a partir da mesma espécie. Nota-se, porém, a maior proporção de sinais no início do cromatograma, evidenciando a maior concentração de substâncias polares, uma vez que essas ficam menos tempo retidas na coluna apolar, de octadecilsilano.

No entanto, o alcalóide com T_R em 14,75 minutos foi detectado em quantidade mínima, próxima à linha de base, em ambos os decoctos. O alto tempo de retenção mostra que se trata de uma substância com maior caráter apolar, portanto, com pouca tendência de ser extraída para solvente aquoso. O processo extrativo utilizado, porém, envolvia o uso de temperatura elevada (ver item 3.2 da Metodologia), o que pode ter favorecido a passagem, ainda que em baixa concentração, de componentes menos polares das cascas para a fase aquosa.

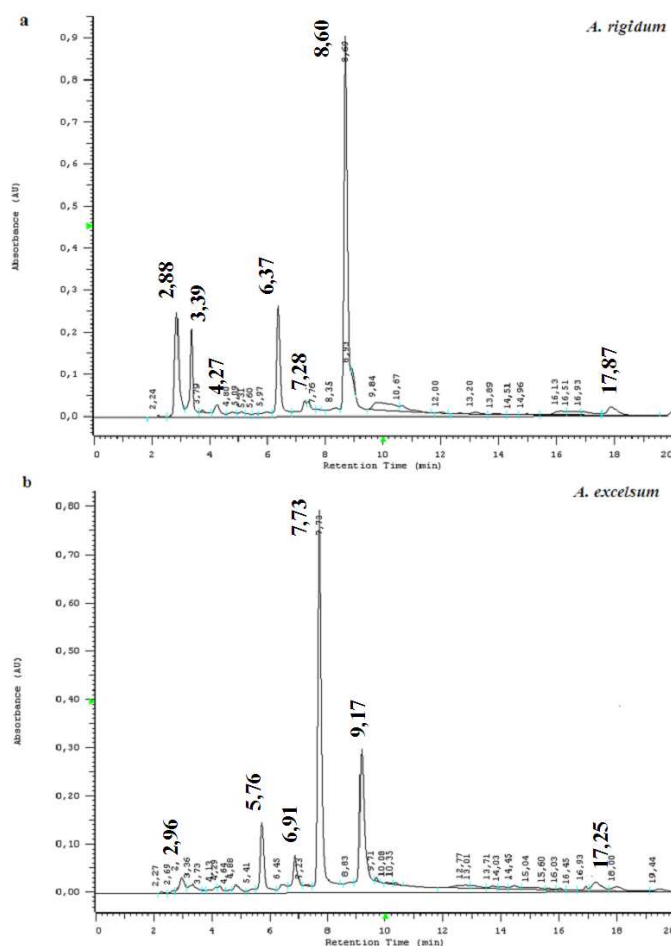


Figura 16 – Cromatogramas de CBAM (a) e CTFM (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm.

Os perfis cromatográficos dos extratos em metanol (Figura 16) apresentam também maior proporção de componentes polares semelhantes ao do extrato em etanol, assim como no decocto. Nesses cromatogramas percebe-se a maior presença de sinais próximos à linha de base, isso dificulta a identificação de substâncias muito pouco concentradas no extrato.

Outra possibilidade, no caso desses extratos, é que o alcalóide com T_R em 14,75 minutos não esteja efetivamente presente. Isso se deve ao fato de o material vegetal utilizado para a maceração com metanol ter sido previamente extraído com outros solventes mais apolares. Por se tratar de uma substância pouco polar, esse alcalóide seria preferencialmente extraído nas etapas anteriores de maceração.

Finalmente, foram analisados os extratos em diclorometano (Figura 17), com a finalidade de responder essa última questão, apesar de se saber que essas não eram as condições de CLAE mais indicadas para extratos de baixa polaridade. Para tal, a análise foi realizada, propositadamente, nas mesmas condições.

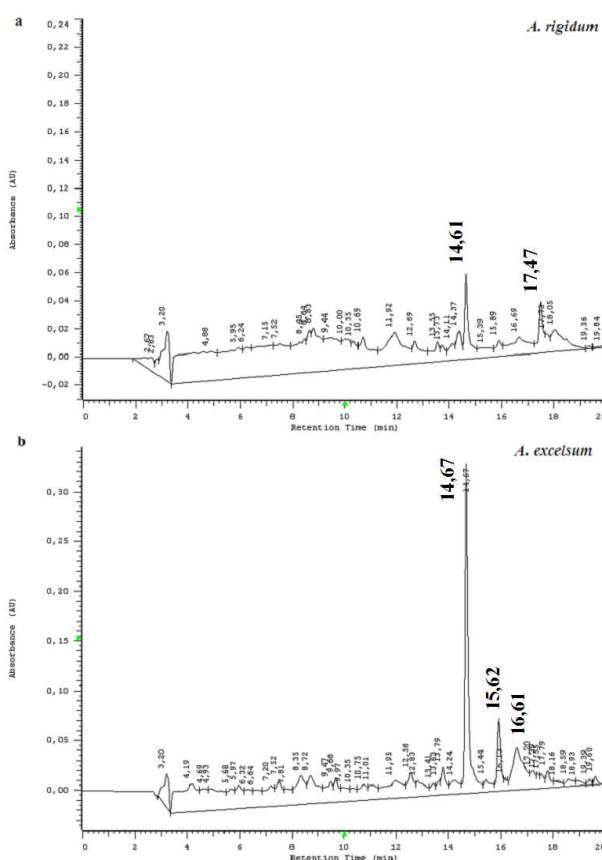


Figura 17 – Cromatogramas de CBAD (a) e CTFD (b) obtidos por CLAE no método Perfil BR. O Tempo de análise: 20 min., fluxo: 1 mL/min, conc. das amostras: 2 mg/mL, detecção: 250 nm.

Como se esperava, o sinal referente ao T_R em 14,75 minutos estava presente, confirmando a hipótese proposta. Outros sinais, referentes a substâncias possivelmente menos polares, também são visualizados. No entanto, para se avaliar a composição desse extrato, seria necessário o desenvolvimento de outro método mais adequado aos extratos apolares.

4.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Os decoctos de ambas as espécies de carapanaúba foram analisados por CLAE/EM, utilizando-se o método “Perfil DE” descrito no item 3.4.3 da Metodologia, a fim possibilitar a caracterização química geral da bebida, no modo como ela é consumida pelos quilombolas. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 18. Esses cromatogramas, contudo, foram monitorados por DAD. Os demais resultados dessas análises, em termos de espectro de UV e de massas referentes aos sinais pertencentes a cada cromatograma, foram dispostos na Tabela 5.

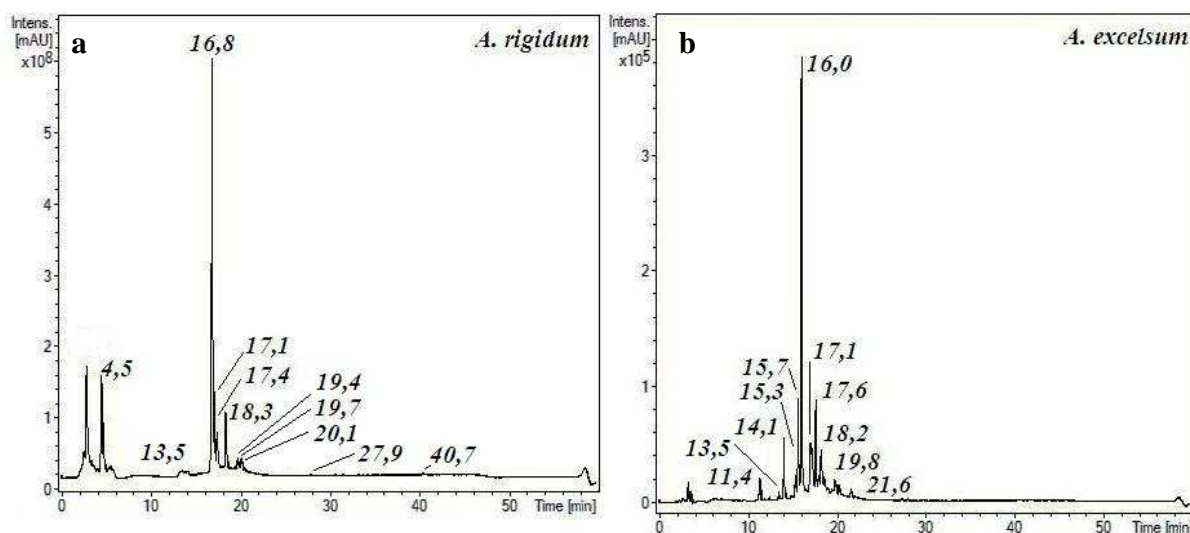


Figura 18 – Cromatogramas de UV de CBACH (a) e CTFCh (b) obtidos por CLAE no método Perfil DE. O tempo de análise foi de 50 min., fluxo: 0,25 mL/min e a detecção de 200 a 700 nm.

Esses cromatogramas apresentaram um número muito maior de componentes que os obtidos anteriormente. Isso foi possível devido ao aumento de resolução proporcionado

pela redução no diâmetro da coluna cromatográfica, o que também possibilitou a redução do fluxo de fase móvel (de 1 mL/min no Perfil BR, para 0,25 mL/min no Perfil DE). De posse dos dados de UV e massas das substâncias presentes nos decoctos de cada espécie, é possível iniciar a caracterização desses extratos com base na comparação com os dados existentes na literatura, citados no item 1.2 da Introdução.

Atualmente, somente quatro alcalóides oriundos de *A. rigidum* são conhecidos (PEREIRA et al, 2007). O cromatograma de CBACH, no entanto, apresentou mais de onze sinais. Dentre esses, somente dois valores de m/z foram correspondentes aos das substâncias já isoladas. Esses são m/z 413 (dos sinais em T_R 13,5; 17,1; 17,4 e 18,3 minutos) igual ao da 3- β -reserpilina (MM 412 u) e o m/z 411 (do sinal em T_R 19,7 minutos), como o da picralina (MM = 410 u). Esses alcalóides apresentam dois átomos de nitrogênio em suas estruturas e, portanto, possuem valor de MM par. Vale ressaltar que vários sinais com m/z 413 foram encontrados e somente um deles, em T_R 17,1 minutos, apresentou perfil de UV distinto dos demais. Esse resultado ressalta a importância de se fracionar e caracterizar os extratos de *A. rigidum*, uma vez que se verificou que ele apresenta muitas substâncias que ainda não foram descritas para esta espécie.

Tabela 5 – Dados cromatográficos (tempo de retenção, T_R), de espectrometria de massas (íon molecular, $[M^+ + 1] m/z$) e de ultravioleta (máximos de absorção, $\lambda_{m\acute{a}x}$) dos decoctos de *A. rigidum* (baixio, CBA) e *A. excelsum* (terra firme, CTF).

<i>A. rigidum</i> (CBACH)			<i>A. excelsum</i> (CTFCh)		
T_R (min.)	$[M^+ + 1] m/z$	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	T_R (min.)	$[M^+] m/z$	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
4,5	587	239, 288, 311 (o), 405	11,4	687/655	205, 238 (o), 305
13,5*	413	221, 300	13,5*	341/355	216, 241, 284, 304 (o), 402
16,8	571	215, 235, 273, 303, 375	14,1	573	218, 237, 289, 309 (o), 404
17,1	413	191, 238, 278, 331	15,3*	587	199, 213 (o), 239, 286, 311 (o), 405
17,4	413	223, 299	15,7	227	197, 212, 239, 269, 298, 368
18,3	413	223, 300	16,0	557	193, 215, 237, 272, 304, 374
19,4*	267	221, 276 (o), 295 (o)	17,1	355	196, 220, 271
19,7*	411	201, 225, 283	17,6	571	192, 215, 237, 273, 304, 374
20,1*	587	212, 237 (o), 395	18,2	427	206, 222, 298
27,9*	343	197, 229 (o), 282	19,8*	383	201, 223, 288 (o)
40,7	353	197, 223, 283	21,6*	379	206, 220, 247, 332, 370 (o)

Nota da Tabela: Os asteriscos (*) destacam as substâncias presentes em proporção muito baixa, (o) – ombro.

Substâncias diferentes, com mesma massa e perfil no UV são relativamente comuns entre os alcalóides indólicos (LOUNASMAA; TOLVANER, 1986). No caso do extrato em questão, a 3- β -reserpilina, conhecidamente presente em *A. rigidum*, possui quatro centros quirais. Essa característica possibilita que essa molécula apresente pelo menos 16 diastereoisômeros distintos, sendo que eles teriam a mesma massa e perfil no UV. A mudança na estereoquímica da molécula, todavia, altera sua configuração espacial e, conseqüentemente, sua polaridade. Por essa razão, podem ser observadas diferenças no tempo de retenção dessas substâncias durante uma análise cromatográfica.

Quanto à *A. excelsum*, até o presente momento vinte alcalóides já foram descritos (BOLZANI et al, 1987; PEREIRA et al, 2007). No cromatograma referente ao CTFCh foi possível, também, relacionar onze sinais aos respectivos perfis no UV e massas. Dentre eles, os sinais em T_R 13,5 e 17,1 minutos, que possuem relação m/z 355 e espectros de UV compatíveis com o esqueleto da quebrachina; o sinal T_R 19,8 minutos, de relação m/z 383, como o da 3 α -aricina e, por fim, o sinal também em T_R 13,5 minutos, com m/z 341, que pode corresponder à (+)-des-*O*-metilaspidospermina. Possivelmente existem dois sinais, com espectros de UV semelhantes, sobrepostos em T_R 13,5 minutos, uma vez que foram observados dois sinais de m/z majoritários (com a mesma proporção, de 100%). Não foi possível encontrar correspondência entre as outras relações de m/z obtidas com os alcalóides já isolados de *A. excelsum*.

As técnicas acopladas fornecem informações importantes, porém são insuficientes para a caracterização completa de um extrato. Para tal, a determinação estrutural das substâncias se faz necessária, e com isso, o isolamento e purificação de tais componentes a fim de possibilitar também análises por RMN e cristalização, por exemplo. Sendo assim, as etapas seguintes do presente trabalho tratam do isolamento e identificação dos alcalóides.

4.3. ISOLAMENTO DOS ALCALÓIDES POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica essencialmente preparativa que não utiliza suporte sólido. Isso faz com que ela ofereça várias vantagens em comparação a outras técnicas cromatográficas, dentre elas a total recuperação da amostra

injetada, baixo risco de degradação e menor consumo de solvente. Além disso, a CCC permite a injeção de uma quantidade maior de amostra por experimento que na CLAE. No entanto, para que se possa utilizá-la é necessário desenvolver um sistema de solventes adequado, que seja capaz de separar os componentes da amostra. (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). No caso do aparelho disponível para utilização na UFRJ, que não possui detector, o acompanhamento dos testes foi feito por cromatografia em camada delgada. Em se tratando especificamente das análises realizadas no presente trabalho, foi possível utilizar também a determinação dos valores de pH como método de detecção.

4.3.1. REFINAMENTO POR ZONA DE pH

O método de CCC com *refinamento por zona de pH* foi utilizado para separação dos alcalóides dos extratos em diclorometano de ambas as espécies de carapanaúba. Nos testes em CCD para a escolha do sistema de solventes, foram avaliadas as proporções 1:0:1, 4:1:5, 6:3:8 e 2:2:3 dos solventes éter metil-*t*-butilílico (MtBE): acetonitrila (AcN): água (H₂O), por se tratar de um extrato com substâncias de baixa polaridade (ITO; MA, 1996). Um tubo foi acidificado com ácido fórmico e outro foi alcalinizado com trietilamina (TEA).

O resultado obtido (Figura 19) mostrou que o sistema mais adequado foi o D1, que consistia de MtBE:H₂O - 1:1. Nessa cromatografia é possível observar que a banda que revela a presença de alcalóides se encontra na fase inferior aquosa em pH ácido ($K_{\text{ácido}} \ll 1$) e na fase superior orgânica em pH básico ($K_{\text{base}} \gg 1$).

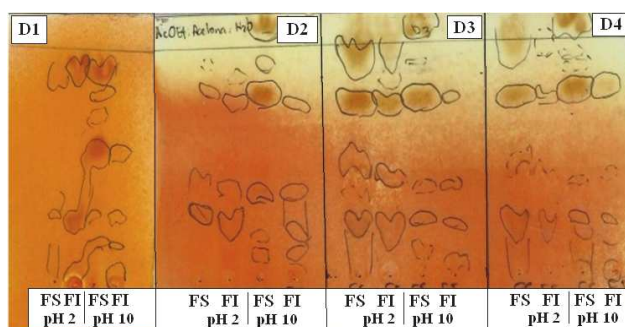


Figura 19 – CCD dos testes para CCC (*com refinamento por zona de pH*) para a amostra CBAD nas seguintes proporções (v/v/v) do sistema de solventes MtBE:AcN:H₂O - 1:0:1 (D1), 4:1:5 (D2), 6:3:8 (D3) e 2:2:3 (D4), FS – fase orgânica superior, FI – fase aquosa inferior, pH 2 - tubo com o ácido e pH 10 – tubo com a base. CCD - eluente: acetato de etila: acetona: água – 25: 8: 2 (v/v/v), com duas gotas de NH₄OH. Revelador: Reagente de Dragendorff.

Foram obtidas 60 frações e a retenção da fase estacionária foi de 67,5%, indicando uma boa resolução para essa análise. No cromatograma nota-se a presença de quatro componentes principais (marcados de A₁ a A₄ na Figura 20), que são revelados pelo Reagente de Dragendorff.

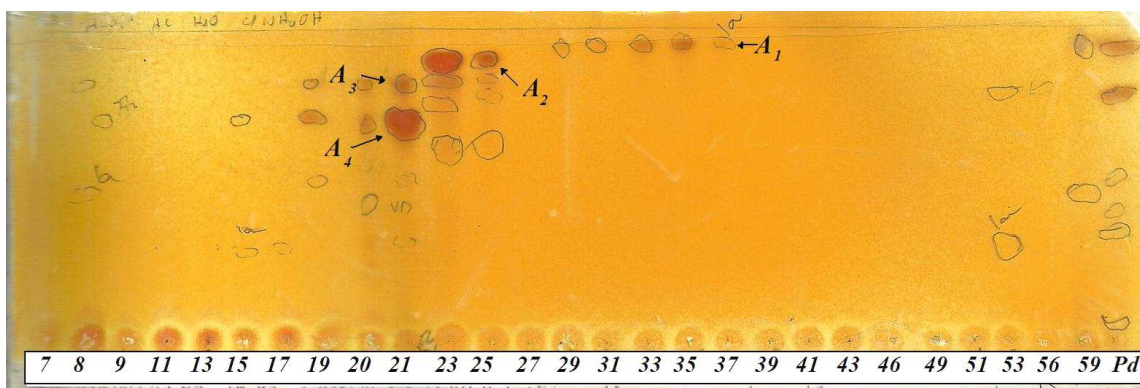


Figura 20 – Cromatograma em CCD do fracionamento do extrato CBAD por CCC com *refinamento por zona de pH*. Sistema de solventes MtBE: H₂O (1:1, v/v); na fase superior orgânica TEA a 10 mM e na fase inferior aquosa ácido fórmico a 15 mM; velocidade de rotação: 850 rpm; fluxo: 2 mL/min; A₁ – A₄: principais substâncias encontradas; Pd- padrão extrato CBAD. CCD - eluente: acetato de etila: acetona: água – 25: 8: 2 (v/v/v), com duas gotas de NH₄OH. Revelador: Reagente de Dragendorff.

É possível observar que primeiramente é eluída uma mistura dos alcalóides A₄ e A₃, seguida por uma fração com maior concentração de A₄ em relação ao outro. Essa eluição se inicia próximo à fração 19 e segue até a 21. Na fração 23 já se nota a maior concentração de A₂, presente até a 25. A partir da fração 27 somente A₁ é eluído até o fim do experimento.

Esse comportamento se reflete no gráfico de pH, mostrado no Gráfico 1:

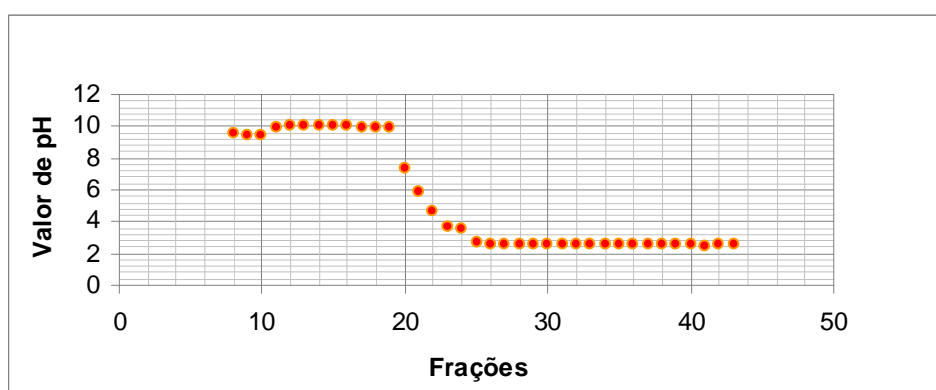


Gráfico 1 – Valores de pH das frações obtidas no fracionamento do extrato CBAD por CCC com *refinamento por zona de pH*.

A eluição de A₄ e A₃ provoca uma queda brusca no valor de pH da fase móvel entre as frações 19 e 22. As frações 23 e 24 formam um pequeno platô em valor próximo a pH 4 e, a partir da fração 25, há outro platô em valor próximo a pH 2.

Segundo os princípios da técnica de *refinamento por zona de pH*, quando um componente é eluído deve-se observar uma mudança no valor do pH da fase móvel que o transporta. Enquanto esse componente não sair totalmente do sistema, o valor de pH não se altera, formando um platô no gráfico de pH. Quando o valor se alterar, significa que outra substância será eluída. Essa particularidade da técnica faz com que os cromatogramas das análises, obtidos com DAD, tenham formato retangular característico, correspondendo a frações altamente concentradas de substâncias puras (ITO; MA, 1996).

No presente experimento, foram obtidos 17,2 mg de A₁, 22,0 mg de A₂ e 41,6 mg de A₄ isolados. Esse fracionamento foi repetido diversas vezes, a fim de acumular mais material para os testes biológicos e para as análises estruturais, por métodos físicos (RMN ¹H e ¹³C). A correspondência entre as frações foi feita com base no valor de fator de retenção (R_f) obtido nas análises por CCD e pelo espectro de UV determinados. A técnica se mostrou eficiente na separação dos alcalóides do extrato CBAD e reprodutível, salvo pequenas diferenças na pureza das amostras obtidas.

O mesmo método foi aplicado na separação do extrato CTFD, que era bem mais complexo que o CBAD. O volume da fração foi reduzido pela metade, a fim de aumentar a resolução dos componentes com eluição muito próxima. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 21.

Foram recolhidas 120 frações de 2 mL e a retenção da fase estacionária foi de 71,25%, valor considerado muito bom. Nota-se a eluição de muitas substâncias de natureza não alcaloídica no início da separação, o que se reflete também no gráfico de pH dessa análise (Gráfico 2). A eluição das substâncias que são reveladas pelo reagente de Dragendoff na CCD começa na fração 47, onde também se observa o início do decréscimo do valor de pH da fase móvel. Segue-se um pequeno platô até a fração 49 e em seguida uma nova queda. A partir da fração 55 forma-se o platô final, no valor de pH próximo a 2,5.

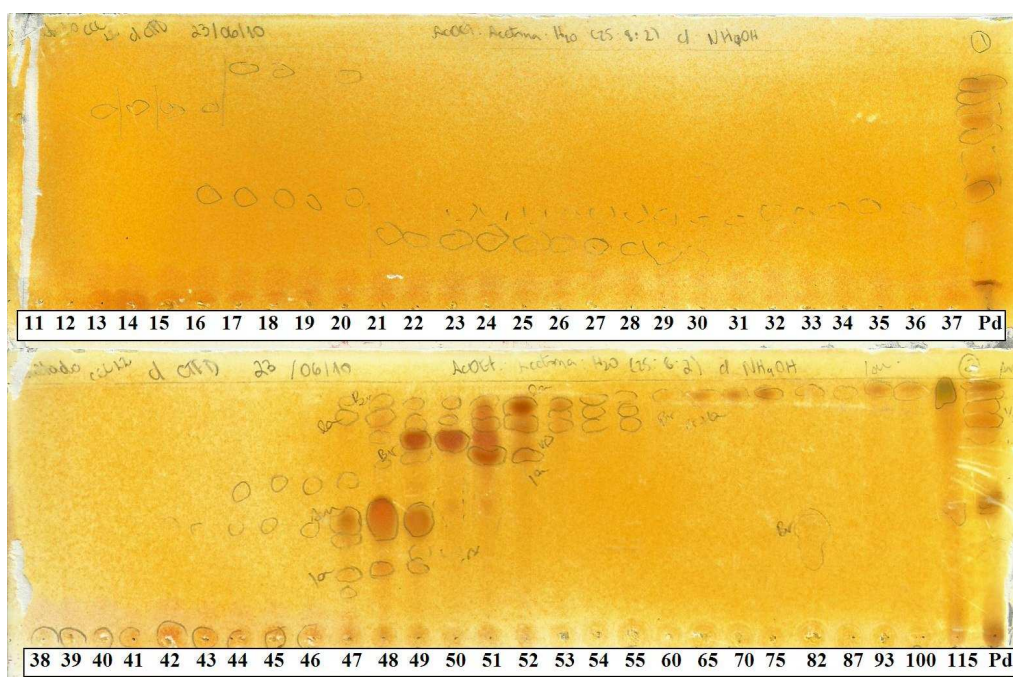


Figura 21 – Cromatograma em CCD do fracionamento do extrato CTFD por CCC com *refinamento por zona de pH*. Sistema de solventes MtBE: H₂O (1:1, v/v); na fase superior orgânica TEA a 10 mM e na fase inferior aquosa ácido fórmico a 15 mM; velocidade de rotação: 850 rpm; fluxo: 2 mL/min; Pd- padrão extrato CTFD.

CCD - eluente: acetato de etila: acetona: água – 25: 8: 2 (v/v/v), com duas gotas de NH₄OH. Revelador: Reagente de Dragendorff.

A seguir, as frações obtidas foram reunidas por similaridade cromatográfica. O presente método levou ao isolamento de três substâncias do extrato CTFD, entretanto, a pureza de tais substâncias ainda necessita ser determinada. Devido à baixa quantidade de material obtido, a avaliação desses resultados será realizada em trabalhos futuros.

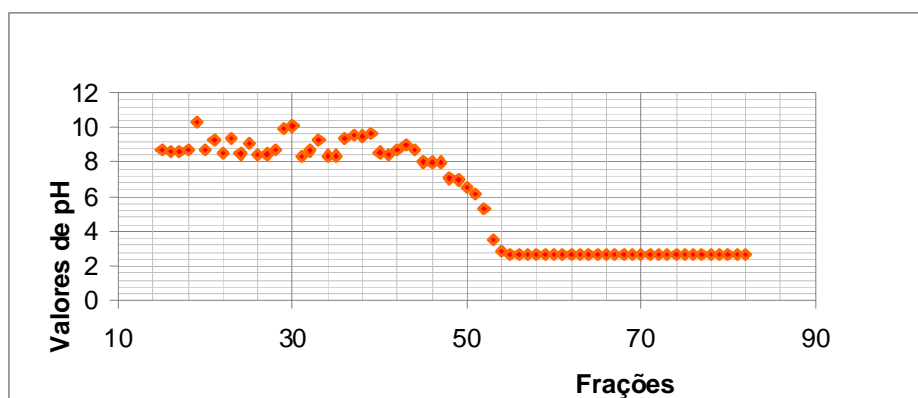


Gráfico 2 – Valores de pH das frações obtidas no fracionamento do extrato CTFD por CCC com *refinamento por zona de pH*.

Em comparação com a técnica de CCC por gradiente descontínuo, ue também levam em consideração o parâmetro pH (MARINI-BETTOLO; GALEFFI, 1985), o *refinamento por zona de pH* se mostrou mais eficiente na separação dos alcalóides em questão (resultados não mostrados). O tempo de análise, bem como a quantidade de frações obtidas foram reduzidos consideravelmente.

Com vista nesses resultados, pode-se dizer que o *refinamento por zona de pH* possibilitou o isolamento de três alcalóides do extrato CBAD e três do CTFD, ainda em processo de identificação. Sendo assim, essa técnica foi aplicada com sucesso no isolamento de alcalóides indólicos de *Aspidosperma* spp. A resolução dos métodos, no entanto, precisa ser melhorada.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DE *A. rigidum*

As substâncias obtidas em quantidade e pureza (observada na análise por LC-EM) suficientes para a análise estrutural foram as correspondentes aos códigos A₁, A₂ e A₄ do extrato CBAD. Essas amostras foram submetidas a análises por CLAE/DAD, CLAE/EM e espectroscopia de RMN e de massas para que pudessem ser identificadas.

4.4.1. ANÁLISE POR CLAE

As análises por CLAE foram realizadas com as amostras isoladas, para que se pudesse verificar o grau de pureza das mesmas, bem como informações sobre o espectro de UV e massa molecular. A metodologia utilizada está descrita no item 3.4.3 deste trabalho.

O alcalóide A₁ (Figura 22) apresentou T_R em 18,9 minutos, bandas de absorção máxima no de UV em $\lambda_{\text{máx}}$ 221 e 272 nm e m/z 383,2.

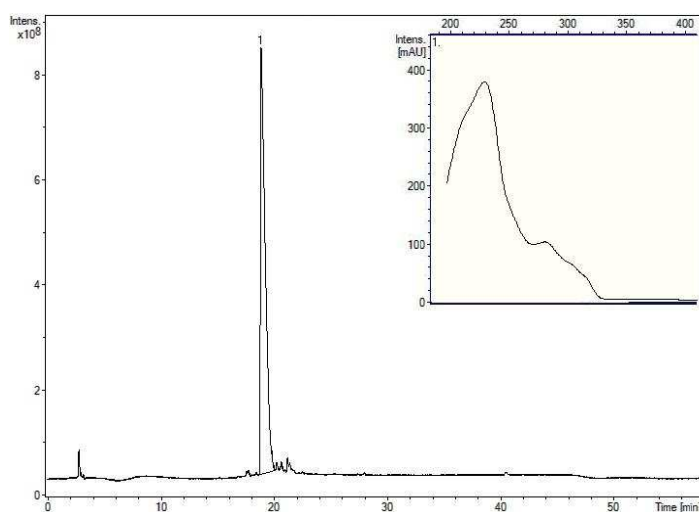


Figura 22 - Cromatograma da amostra A₁ obtido por CLAE no método Perfil DE. Em destaque, o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 18,9 minutos, varredura de 180 a 410 nm.

O alcalóide A₃ foi obtido somente misturado ao A₂ (Figura 23). O primeiro apresentou T_R em 20,3 minutos, sinais de UV em $\lambda_{\text{máx}}$ 213 e 396 nm, com ombro em 237 nm e m/z 411,2. Já o alcalóide identificado como A₂ apresentou T_R em 16,7 minutos, sinais de UV em $\lambda_{\text{máx}}$ 223 e 300 nm e m/z 413,2. Este último foi isolado em outras análises e, por isso, foi possível fazer a distinção entre os dois no cromatograma.

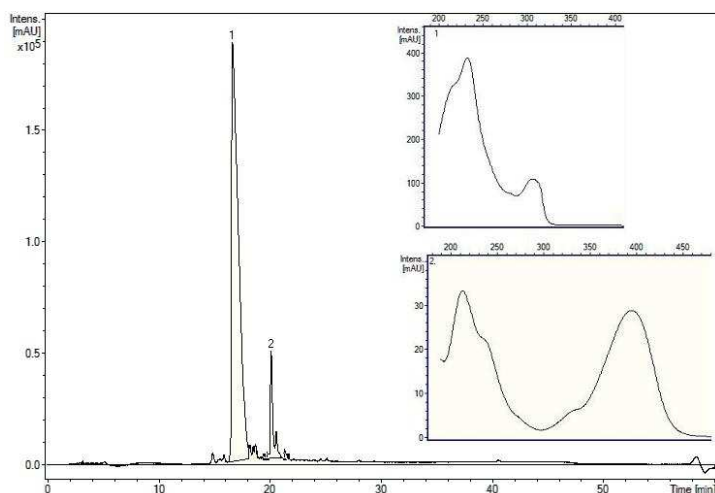


Figura 23 - Cromatograma de A₂ (1) + A₃ (2) obtido por CLAE no método Perfil DE. Em destaque, no canto direito superior, o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 16,7 minutos (1); e no canto direito inferior o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 20,3 minutos (2), varredura de 180 a 410 nm.

Por fim, o alcalóide A_4 apresentou T_R em 18,0 minutos, bandas de absorção máxima no UV em $\lambda_{m\acute{a}x}$ 222 e 300 nm e m/z 413,2 (Figura 24). Nota-se que as amostras A_2 e A_4 possuem dados cromatográficos, de UV e massas idênticos, entretanto, os experimentos de RMN mostram que se trata de substâncias distintas, embora estereoisoméricas.

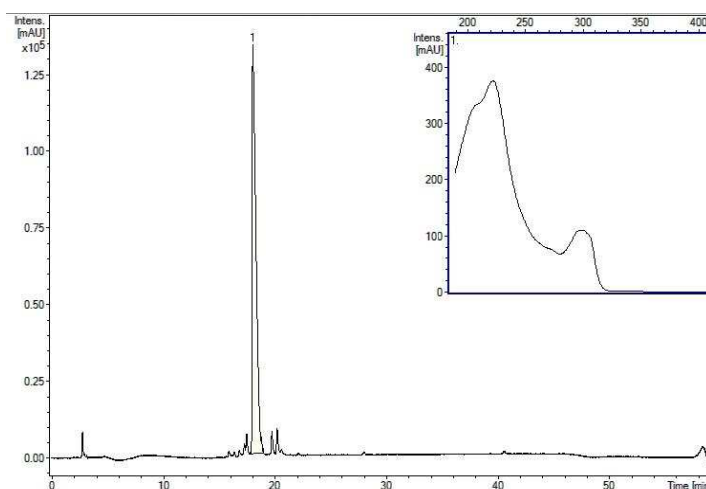


Figura 24 - Cromatograma de A_4 obtido por CLAE no método Perfil DE. Em destaque, o espectro de UV correspondente ao sinal em T_R 18,9 minutos, varredura de 190 a 410 nm.

4.4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE A_1 , A_2 E A_4

Para elucidação estrutural dos alcalóides indólicos isolados foram realizados experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C , em uma e duas dimensões (1D/2D), além de experimentos de espectrometria de massas por injeção direta, com ionização por impacto de elétrons. As substâncias apresentadas a seguir foram isoladas a partir do extrato em diclorometano de *A. rigidum* (CBAD).

A Figura 25 mostra a estrutura proposta para o alcalóide A_1 , identificado como 3α -aricina (tipo heteroioimbanos). A seleção das substâncias que poderiam corresponder à A_1 foi realizada com base na massa molecular encontrada nos experimentos de CLAE/EM. A seguir, os valores máximos de absorção no UV da amostra foram comparados com os descritos na literatura para tais substâncias, bem como o padrão de fragmentação na análise por espectrometria de massas por impacto de elétrons. O fragmentograma de A_1 encontra-se no Anexo 7.3. Os principais fragmentos observados para essa amostra foram os de m/z 186 (100%), 253, 199 e 281.

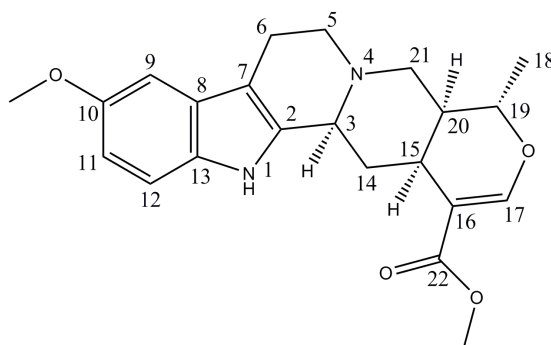


Figura 25 - Estrutura proposta para o alcalóide A₁, identificado como 3 α -aricina.

A estrutura de A₁ foi proposta com base nos resultados obtidos nos experimentos de RMN em 1D/2D, que estão dispostos na Tabela 6:

Tabela 6 – Resultados dos experimentos de RMN em 1D/2D de ¹H (500 MHz) e ¹³C (100 MHz), incluindo as correlações ¹H ¹³C HSQC e ¹H ¹³C HMBC de A₁ em CD₃OD.

Átomo	HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	$^2J_{C,H}$	$^3J_{C,H}$
2	134.95	-	-	-
3	60.43	3.34 (m)*	H-14 ^a	H-5a, H-15, H-21a, H-21b
5	53.48	a - 2.55 (td, $J = 11.5, 4.5$ Hz); b - 3.03 (dd, $J = 11.2, 5.7$ Hz)	H-6a	H-21a
6	21.04	a - 2.68 (dt, $J = 6.9, 4.0$ Hz); b - 2.91 (dddd, $J = 14.9, 11.5, 5.9, 2.3$ Hz)	H-5a, H-5b	-
7	106.42	-	H-6a, H-6b	H-5b, H-9
8	127.17	-	-	H-12
9	99.49	6.89 (d, $J = 2.4$ Hz)	-	H-11
10	153.60	-	H-9	MeO-10, H-12
11	110.25	6.68 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz)	-	H-9
12	111.17	7.15 (d, $J = 8.7$ Hz)	-	-
13	131.85	-	-	H-9, H-11
14	33.32	a -1.47 (q, $J = 12.0$ Hz)* ² , b - 2.64 (m)	-	-
15	31.24	2.76 (td, $J = 11.8, 4.1$ Hz)	H-14a	H-17, H-20b
16	109.49	-	H-15, H-17	H-14a
17	155.48	7.57 (s)	-	-
19	72.15	4.49 (dd, $J = 10.5, 6.1$ Hz)	Me-18	H-15, H-17, H-21b
20	38.44	1.72 (d, $J = 10.3$ Hz)	H-21b	Me-18
21	55.66	a - 2.76 (m); b - 3.19 (dd, $J = 12.6, 1.8$ Hz)	-	-
22	168.16	-	-	H-17, Me-22
Me-18	17.43	1.38 (d, $J = 6.2$ Hz)	-	-
MeO-10	54.83	3.78 (s)	-	-
MeO-22	50.21	3.74 (s)	-	-

Notas da Tabela: * sinal sobreposto ao do CD₃OD, *² sinal sobreposto com ao da metila 18.

Os espectros completos e expansões encontram-se na seção 7.4 dos Anexos. Primeiramente efetuou-se a correspondência dos sinais de carbono, com base nos valores de deslocamento químico (δ_C). Depois disso, os hidrogênios da porção indólica foram facilmente identificados no espectro de ^1H , pois possuem valor de deslocamento químico (δ_H) próximo a 7 ppm (MACOMBER, 1998). Os sinais foram atribuídos às posições correspondentes na molécula com base nas correlações observadas nos espectros em 2D. O sinal com δ_H em 6.89 ppm só poderia corresponder à posição 9, uma vez que era o único que acopla com o carbono em 106.42 ppm, da posição 7. Os outros hidrogênios também foram facilmente atribuídos, com base nos resultados do experimento de HSQC, que indica qual sinal hidrogênio que está ligado a um determinado átomo de carbono.

A posição da metoxila no grupamento indólico foi determinada com base nos valores de constante de acoplamento (J) entre os hidrogênios do anel benzênico. O H-9, que apresentou valor de deslocamento químico (δ_H) igual a 6.89 ppm, é um dubleto com $J = 2.4$ Hz. Já H-11 corresponde a um duplo dubleto com δ_H de 6.68 ppm e valores de $J = 8.7$ e 2.4 Hz. Por fim, o H-12 apresentou outro dubleto em δ_H de 7.15 ppm e $J = 8.7$ Hz. Essas observações significam que H-11 acopla com H-9 com $^4J_{11,9} = 2.4$ Hz, indicando que esses hidrogênios se encontram em posição relativa *meta*, e também com H-12, com $^3J_{11,12} = 8.7$ Hz, indicando a relação em posição *orto* (MACOMBER, 1998).

No entanto, para se determinar a estereoquímica dos hidrogênios da porção terpênica, era necessário calcular as constantes de acoplamento dos multipletos a eles correspondentes. O espectro obtido com a amostra dissolvida em metanol deuterado (CD_3OD), todavia, apresentou a maioria dos hidrogênios como sinais de segunda ordem e esse cálculo não foi possível. Além disso, os dados disponíveis na literatura também dispunham sobre amostras dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

Tendo isso em vista, novos experimentos foram realizados com a amostra dissolvida em CDCl_3 . Esses resultados estão apresentados na Tabela 7, em comparação com os dados da 3 α -aricina (VERPOORTE et al, 1983), que é a proposta de identificação. O espectro de ^1H de A_1 solubilizada em CDCl_3 apresentou não somente melhor resolução dos sinais, como também possibilitou a visualização do hidrogênio ligado ao nitrogênio do núcleo indólico, que não estava presente nos espectros realizados com A_1 solubilizada em CD_3OD .

Tabela 7 – Comparação dos resultados dos experimentos de RMN de ^1H (400 MHz) de A_1 com os valores de ^1H (300 MHz) da 3α -aricina em CDCl_3 (extraídos de VERPOORTE et al, 1983).

Átomo	Amostra A_1	3α -Aricina
	δ_{H}	δ_{H} (modelo)
HN - 1	7.71 (s)	7.75 (s)
3	3.37 (d, $J = 12.0$ Hz)	3.32 (dd, $J = 12, 2$ Hz)
5	a - 2.57 (td, $J = 11.0, 4.1$ Hz); b - 2.92 (dd, $J = 7.4, 4.4$ Hz)	a - 2.53 (dd, $J = 14.5, 11.5$ Hz); b - 2.94 (dd, $J = 14.5, 11.5$ Hz)
6	a - 2.66 (dd, $J = 14.9, 4.0$ Hz); b - 2.88 (td, $J = 5.8, 2.3$ Hz)	a - 2.68 (d largo, $J = 15$ Hz); b - 2.93-2.83 (m)
9	6.91 (d, $J = 2.3$ Hz)	6.90 (d, $J = 2.5$ Hz)
11	6.78 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz)	6.77 (dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz)
12	7.17 (d, $J = 8.7$ Hz)	7.15 (d, $J = 8.7$ Hz)
14	a - 1.56 (q, $J = 12.0$ Hz), b - 2.52 - 2.46 (m)	a - 1.52 (q, $J = 12$ Hz), b - 2.48 (ddd, $J = 12, 4.5, 2$ Hz)
15	2.78 (t, $J = 4.6$ Hz)	2.75 (dt, $J = 12, 4.5$ Hz)
17	7.55 (s)	7.56 (s)
19	4.50 (dd, $J = 10.4, 6.2$ Hz)	4.49 (dq, $J = 12, 6.2$ Hz)
20	1.71 (m)	1.70 (m)
21	a - 2.74 (dd, $J = 12.2, 3.7$ Hz); b - 3.13 (dd, $J = 12.3, 1.6$ Hz)	a - 2.71 (dd, $J = 12, 3.5$ Hz); b - 3.09 (dd, $J = 12, 2$ Hz)
Me-18	1.40 (d, $J = 6.2$ Hz)	1.40 (d, $J = 6.2$ Hz)
MeO-10	3.84 (s)	3.84 (s)
MeO-22	3.74 (s)	3.74 (s)

O sinal do H-19, um duplo dubleto em δ_{H} 4.50 ppm e valores de $J = 10.4$ e 6.2 Hz, indica que esse átomo de hidrogênio acopla com os hidrogênios da metila, na posição 18, com $^3J_{19, 18} = 6.2$ Hz e portanto a outra constante se refere ao acoplamento entre esse hidrogênio e o da posição 20. Além disso, o valor de deslocamento químico do H-19 fornece uma indicação sobre a posição relativa desse hidrogênio. Quando seu valor de δ_{H} se encontra entre 4.2 e 4.5 ppm, ele pertence à série H-19 β , 20 α (BRUYN; ZHANG; BUDESINSKY, 1989). Entretanto, se esses átomos estiverem dispostos em posição *cis*, o valor de δ_{H} do H-19 estará, de qualquer maneira, nessa faixa. Por isso, é importante, também, atentar para o valor de δ_{H} do H-20. No caso em questão, esse se encontra em 1,70 ppm, confirmando a substituição com relação *trans*. O valor de $^3J_{19, 20} = 10.4$ Hz corrobora para esse resultado.

A relação entre os átomos de hidrogênio das posições 15 e 20 pode ser também determinada por meio da constante de acoplamento. O sinal do H-15 foi observado como um tripleto em δ_{H} 2.78 ppm com valor de $J = 4.6$ Hz. Considerando que esse é o valor correspondente ao acoplamento $^3J_{15, 20}$, é possível sugerir que esses átomos se encontram

relacionados em posição *cis*, pois encontra-se na faixa entre 1 e 6 Hz. Tendo isso em vista, se foi determinado anteriormente o H-20 α , conseqüentemente tem-se H-15 α .

O quarteto correspondente ao δ_H 1.56 ppm foi atribuído a um átomo de hidrogênio na posição 14, com valor de $J = 12$ Hz, com base nas informações fornecidas pelo experimentos em 2D. Sendo assim, tal H-14 possui acoplamento vicinal tanto com o H-15, quanto com o H-3. A constante encontrada não deixa dúvidas que a relação do H-14 com ambos os outros deve ser antiperiplanar, definindo também H-3 α . A Figura 26 destaca os acoplamentos utilizados na determinação da estereoquímica dos hidrogênios presentes na molécula de A₁.

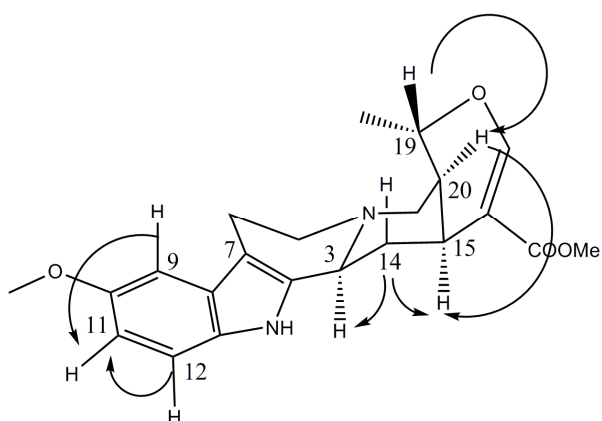


Figura 26 - Estereoquímica proposta para os hidrogênios do alcalóide A₁, identificado como 3 α -aricina. Os acoplamentos foram medidos nos sinais do espectro RMN em ¹H (400 MHz), de A₁ solubilizado em CDCl₃.

De posse da provável estrutura de A₁ foi possível realizar a fragmentação da molécula, a fim de confirmar o perfil encontrado no fragmentograma. A Figura 27 mostra as reações de fragmentação que justificam os principais íons observados.

A identificação sugerida para o segundo alcalóide isolado do extrato CBAD, que recebeu o código A₂, foi de que se trata da isoreserpilina. A estrutura desse alcalóide é apresentada na Figura 28. A diferença entre essa substância e a 3 α -aricina está somente na substituição do átomo de hidrogênio da posição 11 por um grupamento metoxila.

A estrutura de A₂ também foi elucidada com base nos espectros de RMN em 1D/2D (Tabela 8 e Anexo 7.5). Além disso, foram levados em consideração os principais fragmentos obtidos na análise por espectrometria de massas por impacto de elétrons, com injeção direta. Os íons encontrados foram os de m/z 216 (100%), 283, 172, 122, 229 e 311 (Anexo 7.6). Esses dados foram utilizados na confirmação da estrutura proposta.

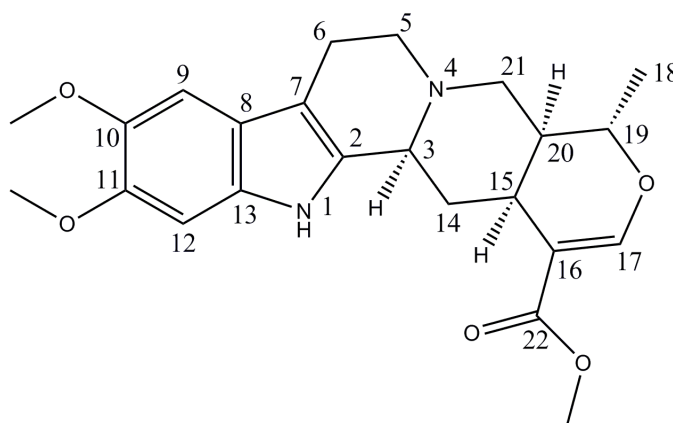


Figura 28 - Estrutura proposta para o alcalóide A₂, identificado como isoreserpilina.

Tabela 8 – Resultados dos experimentos de RMN em 1D/2D de ¹H (500 MHz) e ¹³C (100 MHz), incluindo as correlações ¹H ¹³C HSQC e ¹H ¹³C HMBC de A₂ em CDCl₃.

Átomo	HSQC		HMBC		
	δ_C	δ_H	$^2J_{C,H}$	$^3J_{C,H}$	$^4J_{C,H}$
2	133.41	-	HN-1, H-3	H-14	H-5, H-21a
3	60.15	3.31 (dd, $J = 11.4, 1.4$ Hz)	H-14a	H-5a, H-21a	H-6a
5	53.81	a - 2.56 (dd, $J = 13.2, 9.0$ Hz), b - 2.91 (dd, $J = 10.1, 5.4$ Hz)	H-6a, H-6b	H-21a	-
6	22.08	a - 2.63 (d, $J = 17.2$ Hz), b - 2.84 (dd, $J = 11.7, 2.2$ Hz)	H-5a, H-5b	-	H-21b
7	108.07	-	H-6a	HN-1, H-5a, H-9	-
8	120.19	-	H-9	HN-1	-
9	95.10	6.81 (s)	-	-	H-12
10	145.04	-	H-9	H-12, MeO-10	-
11	146.67	-	H-12	H-9, MeO-11	-
12	100.62	6.89 (s)	-	-	H-9
13	130.39	-	HN-1, H-12	-	-
14	34.52	a - 2.47 (d, $J = 13.1$ Hz), b - 1.54 (q, $J = 12.0$ Hz)	-	H-20	-
15	31.54	2.76 (t, $J = 4.8$ Hz)	H-14a, H-14b	H-17, H-21a	-
16	109.75	-	H-15, H-17	H-14	-
17	155.97	7.56 (s)	-	-	-
19	72.70	4.49 (dd, $J = 10.2, 6.1$ Hz)	Me-18	H-17, H-21a, H-21b	-
20	38.66	1.70 (m)	H-21a	Me-18	-
21	56.45	a - 2.70 (t, $J = 4.5$ Hz), b - 3.09 (dd, $J = 12.3, 1.2$ Hz)	-	H-3, H-5a	-
22	168.25	-	-	H-17, Me-22	-
Me-18	18.72	1.40 (d, $J = 6.2$ Hz)	-	-	-
MeO-10	56.67	3.90 (s)	-	-	-
MeO-11	56.51	3.88 (s)	-	-	-
MeO-22	51.33	3.74 (s)	-	-	-
HN-1	-	7.72 (s)	-	-	-

Para confirmar a estrutura proposta, os valores de δ_H obtidos na análise de A_2 por RMN de 1H (500 MHz) foram comparados aos valores descritos por Bruyn, Zhang e Budezinsky (1989) para a isoereserpilina (Tabela 9). Salvo algumas diferenças nos valores das constantes de acoplamento calculadas, os resultados obtidos foram coerentes com a identificação proposta.

Tabela 9 – Comparação dos resultados dos experimentos de RMN de 1H (400 MHz) de A_2 com os valores 1H (500 MHz) da isoereserpilina em $CDCl_3$ (extraídos de BRUYN; ZHANG; BUDEZINSKY, 1989). Obs.: a referência não explicitou a multiplicidade dos sinais de hidrogênio da isoereserpilina.

Átomo	Amostra A_2	Isoereserpilina
	δ_H	δ_H (modelo)
HN-1	7.72 (s)	7.68 (s)
3	3.31 (dd, $J = 11.4, 1.4$ Hz)	3.32 ($J = 12.2, 3.3$ Hz)
5	a - 2.56 (dd, $J = 13.2, 9.0$ Hz), b - 2.91 (dd, $J = 10.1, 5.4$ Hz)	a - 2.53 ($J = 8.2, 3.9$ Hz), b - 2.91 ($J = 11.1, 5.7$ Hz)
6	a - 2.63 (d, $J = 17.2$ Hz), b - 2.84 (dd, $J = 11.7, 2.2$ Hz)	a - 2.60 ($J = 3.9$ Hz), b - 2.88 ($J = 14.9, 8.2$ Hz)
9	6.81 (s)	6.82 (s)
12	6.89 (s)	6.89 (s)
14	a - 2.47 (d, $J = 13.1$ Hz), b - 1.54 (q, $J = 12.0$ Hz)	a - 2.48 ($J = 12.4, 4.5, 3.3$ Hz), b - 1.52 (q, $J = 12.0$ Hz)
15	2.76 (t, $J = 4.8$ Hz)	2.72 ($J = 4.5$ Hz)
17	7.56 (s)	7.55 (s)
19	4.49 (dd, $J = 10.2, 6.1$ Hz)	4.50 ($J = 10.2, 6.2$ Hz)
20	1.70 (m)	1.68
21	a - 2.70 (t, $J = 4.5$ Hz), b - 3.09 (dd, $J = 12.3, 1.2$ Hz)	a - 2.71, b - 3.09 ($J = 12.3$ Hz)
Me-18	1.40 (d, $J = 6.2$ Hz)	1.40
MeO-10	3.90 (s)	3.88
MeO-11	3.88 (s)	3.88
MeO-22	3.74 (s)	3.74

Tanto o alcalóide A_1 , identificado como 3α -aricina, quanto o A_2 (isoereserpilina) foram isolados de diversas espécies do gênero *Aspidosperma*, dentre elas *A. discolor* e *A. marcgravianum*, ambas pertencentes ao subgrupo Nítida (PEREIRA et al, 2007). No entanto, o isolamento de tais substâncias a partir de extratos de *A. rigidum* foi descrito pela primeira vez neste trabalho.

De posse da estrutura sugerida para a identificação de A_2 , reações de fragmentação foram propostas a fim de justificar os principais fragmentos iônicos encontrados no fragmentograma dessa amostra (Figura 29), obtido por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

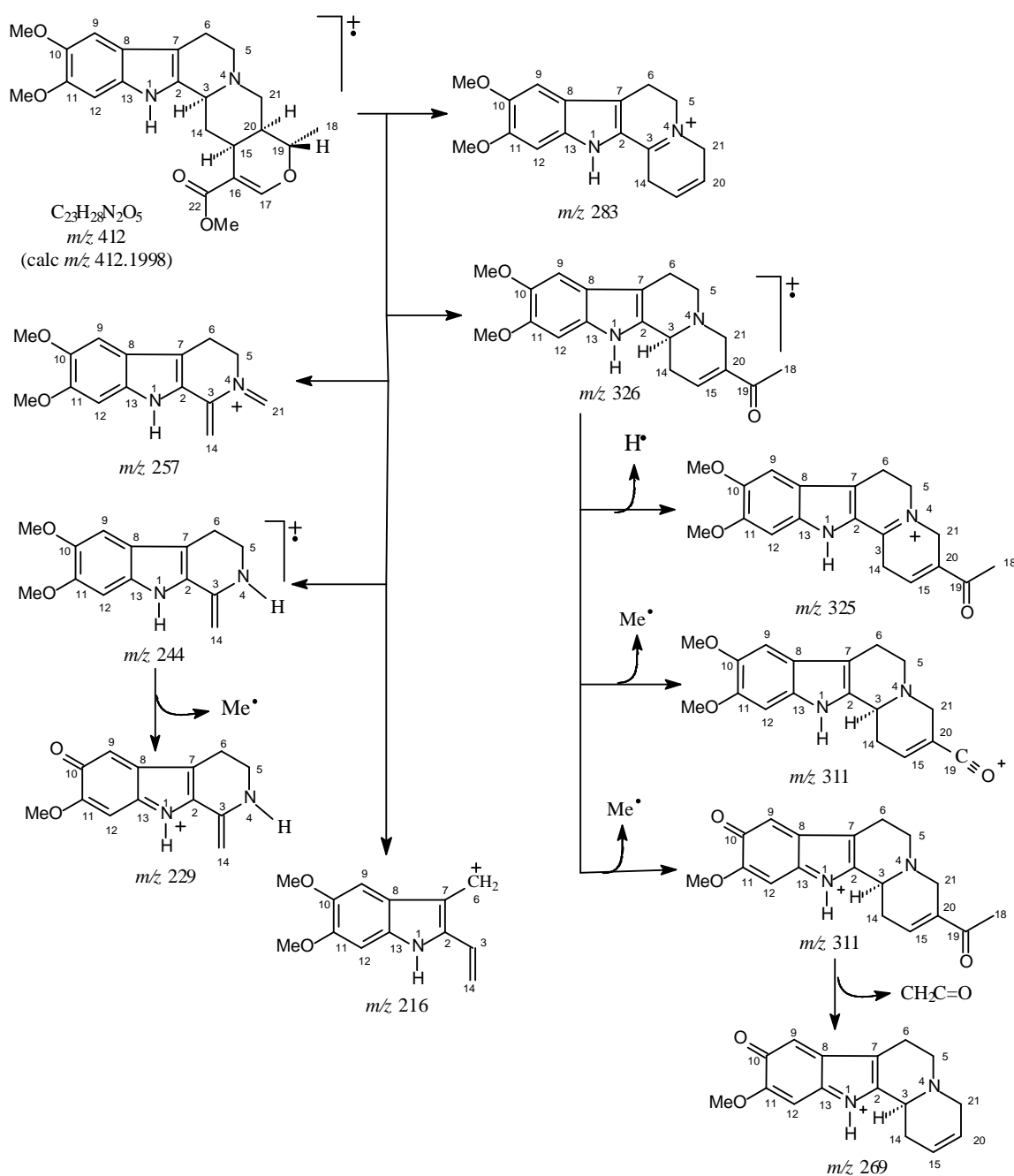


Figura 29 – Reações de fragmentação da isoreserpilina, propostas pelo prof. Dr. Raimundo Braz-Filho e gentilmente cedidas para publicação no presente trabalho, que justificam os principais íons observados nos fragmentogramas de A_2 , identificada como isoreserpilina, e A_4 , 3 β -reserpilina. Análise realizada por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os fragmentogramas se encontram respectivamente nos Anexos 7.6 e 7.7.

Tais fragmentos foram idênticos aos observados no fragmentograma da amostra A_4 (Anexo 7.7), com alterações apenas nas proporções. Além disso, a massa molecular

encontrada para A₄ nos experimentos de CLAE/EM, bem como as bandas máximas de absorção no UV, se mostraram idênticos aos observados para A₂. Com base nesses resultados, é possível confirmar a hipótese levantada anteriormente, de que essas substâncias sejam estereoisômeras.

Tendo isso em vista, o alcalóide A₄ foi identificado como 3 β -reserpilina (Figura 30). A diferença entre esse alcalóide e a isoreserpilina se encontra na estereoquímica do hidrogênio na posição 3. Na isoreserpilina este se encontra em posição α , ou seja, para trás do plano da molécula, e na 3 β -reserpilina ele se encontra β posicionado em relação ao plano. Essa diferença exerce um grande efeito na estrutura tridimensional da molécula, sem alterar seu espectro de UV e massa molecular.

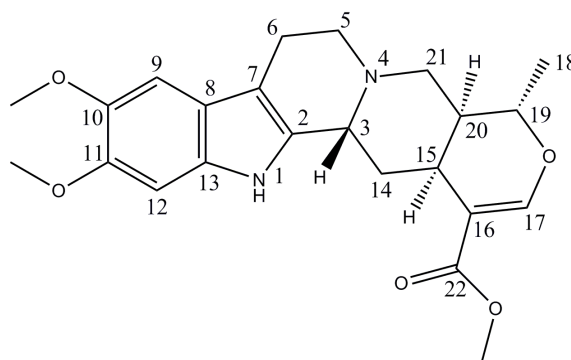


Figura 30 - Estrutura proposta para o alcalóide A₄, identificado como 3 β -reserpilina.

As justificativas para essa proposta de identificação se baseiam não somente nos fragmentos observados, ou nos resultados das análises por CLAE/EM, mas também no fato do isolamento dessa substância a partir de extratos de *A. rigidum* já estar descrita na literatura (PEREIRA et al, 2007).

Os resultados obtidos nas análises por RMN, entretanto, não foram conclusivos. Os principais sinais de correlações observados foram dispostos na Tabela 10 e os espectros se encontram no Anexo 7.8. Pode-se notar que alguns dos sinais fundamentais para a determinação das estruturas dos alcalóides anteriores não foram observados nos espectros dessa substância.

No entanto, fica claro, tendo em vista a massa molecular e os fragmentos iônicos encontrados, que a alteração dos resultados observados se deve a uma característica conformacional dessas substâncias. A diferença na estereoquímica dos hidrogênios do

núcleo terpenoídico causa uma grande alteração na estrutura tridimensional desses alcalóides. Essas estruturas podem ser observadas na Figura 31.

Bruyn, Zhang e Budezinsky (1989) descreveram o mesmo problema, quando estavam trabalhando com a reserpilina. Eles observaram que ao se tentar analisar essa substância na forma de base livre solubilizada em CDCl_3 , ocorria a coalescência dos sinais dos espectros de ^1H e de ^{13}C . Isso significa que alguns sinais se juntavam, aparecendo como um único sinal no espectro. Para solucionar tal problema, os experimentos devem ser realizados com tal alcalóide na forma de cloridrato.

Essa observação não somente justifica o problema observado nos espectros de RMN de A_4 , como também corroboram com a proposta de identificação para a amostra. No entanto, novas análises devem ser realizadas, a fim de possibilitar a comparação dos sinais encontrados para A_4 com os descritos para a 3β -reserpilina na literatura.

Tabela 10 – Resultados dos experimentos de RMN em 1D/2D de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz), incluindo as correlações ^1H ^{13}C HSQC e ^1H ^{13}C HMBC de A_4 em CDCl_3 .

Átomo	HSQC			HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{C,H}}$	$^3J_{\text{C,H}}$	$^4J_{\text{C,H}}$
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
5	52.25	3.14 (s largo)	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	107.45	-	-	H-3, H-5, H-9	H-14
8	120.15	-	H-9	-	-
9	95.11	6.92 (s)	-	-	H-12, MeO-11
10	144.79	-	H-9	H-12, MeO-10	-
11	146.46	-	H-12	H-9, MeO-11	-
12	100.22	6.92 (s)	-	-	H-9, MeO-10
13	130.11	-	H-12	-	-
14	29.69	-	-	H-20	-
15	25.85	-	-	H-17	-
16	-	-	H-15, H-17	H-14	-
17	155.37	7.57 (s)	-	-	-
19	73.25	4.46 (s largo)	Me-18	H-17	-
20	30.75	-	-	-	-
21	54.60	2.67 – 2.57 (m)	H-20	-	-
22	167.94	-	-	H-17, Me-22	-
Me-18	18.53	1.37 (d, $J = 5.8$ Hz)	-	-	-
MeO-10	56.29	3.91 (s)	-	-	-
MeO-11	56.44	3.94 (s)	-	-	-
MeO-22	51.12	3.75 (s)	-	-	-
HN-1	-	8.22 (s)	-	-	-

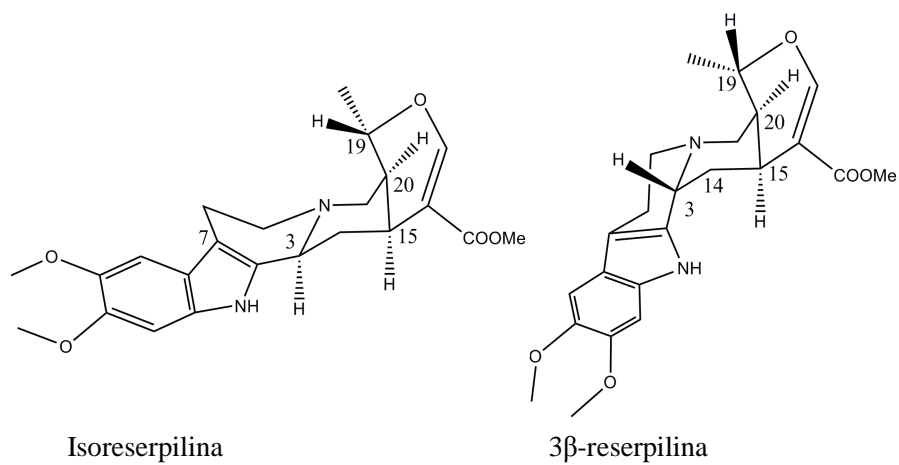


Figura 31 – Visualização tridimensional das estruturas dos alcalóides indólicos isoreserpilina (A₂) e 3β-reserpilina (A₄), do tipo heteroimbanano.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento dos métodos cromatográficos utilizados nesse trabalho não somente possibilitaram a caracterização dos extratos de carapanaúba, como também forneceram uma ferramenta analítica que pode ser expandida, também para o controle de qualidade, a outras espécies que contenham alcalóides com estrutura semelhante. Nessas análises também se tornou clara a necessidade e o grande número de oportunidades para a continuação dos estudos de caracterização dos extratos de *A. rigidum* e *A. excelsum*.

As análises evidenciaram que as duas espécies de carapanaúba, apesar de serem pouco distinguidas pelos membros das comunidades quilombolas, apresentam diferenças significativas tanto na sua composição química, quanto em seu potencial farmacológico. Na comparação dos perfis cromatográficos dos extratos das duas espécies de carapanaúba foi observado que ambos podem apresentar substâncias semelhantes, porém *A. rigidum* provavelmente possui maior variedade de componentes.

Os extratos de ambas espécies foram ativos nos testes biológicos realizados. Sendo que tanto na avaliação da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, quanto no potencial antimicobacteriano, os extratos de *A. excelsum* foram mais ativos que os de *A. rigidum* na concentração testada. Os resultados obtidos mostraram, portanto, que tais extratos se apresentam como fontes de promissoras substâncias candidatas a potenciais agentes terapêuticos para problemas cognitivos, no tratamento sintomático da doença de Alzheimer, e contra tuberculose.

Nesse contexto, é possível dizer que a cromatografia em contracorrente se mostrou como um método altamente recomendável para o isolamento em larga escala de produtos naturais bioativos. O isolamento de três alcalóides indólicos de *A. rigidum* foi realizado em apenas uma etapa cromatográfica, sem necessidade de purificação posterior, sendo que dois desses são estereoisômeros (isoreserpilina e 3 β -reserpilina) e apenas um deles fora descrito anteriormente na espécie (3 α -aricina).

Esses resultados apontam a importância da continuidade das pesquisas com espécies amazônicas, especialmente com enfoque nas que contém alcalóides indólicos, uma vez que essas substâncias apresentam bons resultados nos testes biológicos e baixa toxicidade. Além disso, o desenvolvimento de novos métodos para o fracionamento de extratos

contribuirá para a viabilização de processos mais eficientes e com menor custo, possibilitando a exploração comercial de tais resultados.

Tendo isso em vista, permanecem como perspectivas para a realização de futuros trabalhos:

- A confirmação da identificação da estrutura dos alcalóides isolados, onde se sugere preparar o sal hidrocloreto de 3β -reserpilina e refazer as análises por RMN, ou utilizar temperatura diferente. Bem como isolar e identificar a estrutura de A_3 e dos alcalóides isolados de CTFD;
- Testar as atividades biológicas dos alcalóides isolados;
- Aprimorar a metodologia de CCC com *refinamento por zona de pH*;
- Testar a atividade antiplasmódica dos extratos e dos alcalóides isolados, uma vez que essa é a principal indicação etnofarmacológica para essas espécies. Essa atividade já está prevista no projeto escrito por grupos de cientistas do Brasil e da Alemanha (Research Network Natural Products against Neglected Diseases), visando o estabelecimento de uma rede de colaboração em pesquisas na busca por novas substâncias com uso potencial para o combate a doenças negligenciadas submetido no edital nº 72/2010 do CNPq;
- Isolar, identificar e testar a atividade de mais alcalóides (dos extratos polares). Esse trabalho já foi iniciado, em colaboração com o laboratório do prof. Dr. Peter Winterhalter (Universidade Técnica de Brunsvique, Alemanha).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZHEIMER's Disease. **FACT SHEET**. Alzheimer's Disease Education & Referral (ADEAR) Center. Disponível em: <<http://www.nia.nih.gov/NR/rdonlyres/7DCA00DB-1362-4755-9E87-96DF669EAE20/13991/ADFactSheetFINAL2510>>. Acesso em: 28 de março de 2011.

ALZHEIMERMED. **Conceitos**. Disponível em: <<http://www.alzheimermed.com.br>>. Acesso em: 24 de abril de 2011.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A.; PINTO, A. J.; 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 (12), p. 4092-4095, 2005.

ARNDT, R. R.; BROWN S. H.; LING, N. C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA, J.M.; GILBERT, B.; MIRANDA, E. C.; FLORES, S. E.: Alkaloids studies – LVIII. The alkaloids of six *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**. v. 6, p. 1653-1658, 1967.

BALUNAS, M.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v. 78, p. 431 – 441, 2005.

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

BERTHOD, A.; MARYUTINA, T.; SPIVAKOV, B.; SHPIGUN, O.; SUTHERLAND, I. Countercurrent Chromatography in Analytical Chemistry (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v. 81, n. 2, p. 355–387, 2009.

BIANCOVILLI, P. UFRJ fecha acordo inédito com comunidades quilombolas. **Olhar Vital, Publicação Eletrônica da Coordenadoria de Comunicação da UFRJ**. Rio de Janeiro. Edição 115, 21 fev. 2008. Disponível em: <<http://www.olharvital.ufrj.br/>>. Acesso em: 16 de março de 2008.

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

BRUYN, A.; ZHANG, W.; BUDESINSKY, M. NMR study of three heteroyohimbine derivatives from *Rauwolfia serpentina* stereochemical aspects of the two isomers of reserpiline hydrochloride. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 27, p. 935-940, 1989.

CARDENAS, G. C.; ROCHA, F. D.; DOLABELA, M. F.; JACOMÉ, R. L. R. P.; OLIVEIRA, S. G.; GOMES, F. M. A.; MARIANO, M. C. F.; NEIVA, R. M. T.; STEHMANN, J. R.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* and *in vivo* evaluation of *Aspidosperma* species traditionally used to treat malaria in Minas Gerais. In: XX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL E X CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 2008, São Paulo. **Programação Científica**. p. 111, ref. 06.170.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L. F.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medicine Biology Research**. v. 24, p. 1113-1123, 1991.

CASE, R.; WANGA, T.; FRANZBLAU, S.; SOEJARTO, D.; MATAINAHU, L.; PISCKAU, P.; PAULI, G. Advanced applications of counter-current chromatography in the isolation of anti-tuberculosis constituents from *Dracaena angustifolia*. **Journal of Chromatography A (4th International Conference on Countercurrent Chromatography)**. v. 1151, 1-2, p. 169-174, 2007.

CASTELLAR, A.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; RAMOS, D. F.; LOURENÇO, M. C. S.; LAGE, SALGUEIRO, C. L.; JULIÃO, L. S.; BARBOSA, Y. A. G.; LEITÃO, S. G. The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (no prelo). 2011.

CAZAL, C.; BATALHÃO, J.; DOMINGUES, V.; BUENO, O.; FILHO, E.; FORIM, M.; SILVA, M.; VIEIRA, P.; FERNANDES, J. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. **Journal of Chromatography A**. v. 1216 (19), p. 4290-4, 2009.

CHAN, E. D.; ISEMAN, M. D. Current medical treatment for tuberculosis. **British Medical Journal**. v. 325, p. 30, 2002.

COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 535-557, 2003.

CUMMINGS, J. L. Drug Therapy: Alzheimer's Disease. **Massachussets Medical Society**. v. 235 (1), p. 56-57, 2004.

CUNHA, A. G. **Dicionário histórico das palavras portuguesas de origem Tupi**. 5 ed. São Paulo: Companhia Melhoramentos; Brasília: Universidade de Brasília, 1999. 397 p. Bibliografia: p. 104 e 304. ISBN: 85-06-03083-8.

De BEER, D.; JERZ, G.; JOUBERT, E.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Isolation of isomangiferin from honeybush (*Cyclopia subternata*) using high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, 19, p. 4282-4289, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3 ed. England: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. 539 p., 24,6 cm. Bibliografia: p. 368 – 379. ISBN: 978-0-470-74168-9.

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; LOMBARDI, J. A.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, A. B. Screening *Aspidosperma* plant species for antiplasmodial activity. In: XX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL E X CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 2008, São Paulo. **Programação Científica**. p. 111, ref. 06.177.

DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101(7), p. 697-714, 2006.

ESCOBAR, H. Cientistas buscam fitoterápicos na floresta. **Estadão de Hoje – edição on-line**. 22 março 2008. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/>>. Acesso em: 24 de março de 2008.

EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. 15 ed. England: W. B. Saunders, 2002. 585 p. Bibliografia: p. 61 – 63. ISBN: 0-7020-2618.

GABETTA, P.; MUSTICH, G. **Spectral Data of Indole Alkaloids**. Milan, Italy: Inverni Della Beffa, 1975. 449 p.

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

GILBERT, B.; DUARTE, A. P.; NAKAGAWA, Y.; JOULE, J. A.; FLORES, S. E.; BRISSELESE, J. A.; CAMPELLO, J.; CARRAZZONI, E. P.; OWELLEN, R. J.; BLOSSEY, E. C.; BROWN JR, K. S.; DJERASSI, C. Alkaloid studies – L. The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species. **Tetrahedron**. v. 21, p. 1141-1166, 1965.

GRAGNOLATI, M.; JORGENSEN, O. H.; ROCHA, R.; FRUTTERO, A. **Envelhecendo em um Brasil mais Velho**. 2011. 64 f. Sumário - Banco Internacional para a Reconstrução e o Desenvolvimento / BANCO MUNDIAL. Washington, D.C. EUA.

GUIMARÃES, H. A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L. GONÇALVES, M. S.; OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; LEITÃO, S. G.; CASTRO, N. G. Avaliação da Atividade Anticolinesterásica de Alcalóides Indólicos Monoterpênicos Isolados de Apocynaceae. In: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia, SP. **Livro de Resumos**.

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

HERMANS-LOKKERBOL, A.; VERPOORTE, R. Droplet Counter-Current Chromatography of Alkaloids. The Influence of pH-Gradients and Ion-Pair Formation on the Retention of Alkaloids. **Planta Medica**, p. 299-302, 1986.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152p., 25,5 cm. (Série de textos da Escola de Verão em Química, vol. IV). Bibliografia: p. 80 - 94. ISBN: 85-85173-99-8

ITO, Y.; CONWAY, W. High-speed countercurrent chromatography. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 17: 1, p. 65–143, 1986.

ITO, Y.; MA, Y. pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 753, p. 1-36, 1996.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1065, p. 145–168, 2005.

LEVY-APPERT-COLLIN, M. Sur les propriétés anticholinestérasiques de la pseudo-akuammigine, alcaloïde du *Picralima nitida* Stapf (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v. 36, n. 1-2, p. 77-83, 1978.

LOUNASMAA, M.; TOLVANER, A. ^1H NMR data of monoterpene indole alkaloids. **Heterocycles**. v. 24, n. 11, p. 3229-3281, 1986.

MACOMBER, R. S. **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1998. 378p. Bibliografia: 132-157. ISBN: 0-471-15736-8.

MARINI-BETTOLO, G. B.; GALEFFI, C. Discontinuous Systems in the Counter Current Distribution (CDD). The use of discontinuous mobile phases. In: A. J. P. Martin honorary symposium, Urbino, May 27-31, 1985. **Journal of Chromatography Library**, v. 32, p. 283-301, 1985.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÉCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**. v. 9, p. 142-145, 2002.

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

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, H. A Consensus classification for the order Gentiales with additional details on the suborder Apocyninae. **The Botanical Review**. v.60, p. 440-482, 1994.

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

OLIVEIRA, D. R. **Bioprospeção de espécies vegetais do conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético em comunidades quilombolas de Oriximiná-PA**. 2009. 303 f. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais) – Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; ARQMO; LEITÃO, S. G. Comparison between ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (no prelo). 2011a.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; CASTRO, N. G.; VIEIRA, M. N.; ARQMO; LEITÃO, S. G. Ethnomedical Know ledge among the Quilombolas from the Amazon Region of Brazil with a Special Focus on Plants Used as Nervous System Tonics (aceito para publicação). In: RAI, M.; RASTRELLI, L.; MARINOF, M.; MARTINEZ, J. L.; CORDELL, G. (Org.). **Medicinal Plants: Diversity and Drugs**. 01 ed. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2011b, v. 01, p. -.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and inexpensive meted for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 8, p. 2720-2722, ago 2002.

PAULI, G. F.; CASE, R. J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N. H.; FRANZBLAU, S. G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**. v. 78, p. 485 – 494, 2005.

PEREIRA, M. M.; SOUZA JÚNIOR, S. N., ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n.3, p.1-8, 2006.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**. v. 30, p. 970-983, 2007.

PEREIRA, D. M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J. M. A.; GASPAR, L.; FARIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE. P. B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. **Phytomedicine**. v. 17, p. 646–652, 2010.

RENAULT, J.; NUZILLARD, J.; CROUÉROUR, G.; THÉPENIER, P.; ZÉCHES-HANROT, M.; LE MEN-OLIVIER, L. Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode. **Journal of Chromatography A**. v. 849, p. 421–431, 1999.

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

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. S. A.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. 816 p. 24 cm. Bibliografia: p. 8-9. ISBN: 85-211-0011-6.

ROCHA, A. I.; LUZ, A. I. L.; RODRIGUES, W. A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. VII – Apocynaceae. **Acta Amazônica**. v. 12, p. 381-387, 1982.

SANTOS, F. L. **Plantas Medicinais Vendidas em Feiras Livres dos Municípios de Petrópolis e Nova Friburgo, RJ: Análise Fitoquímica de Espécies Potenciais**. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **Lancet Neurology**, v. 2, p. 539–547, 2003.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**. v. 57 (Suppl 1), p. S3–S9, 2008.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GRACE, G. 2007. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 1104 p. ISBN: 85-7025-682-5.

SEVERINO, V.; CAZAL, C.; FORIM, M.; SILVA, M.; FILHO, E.; FERNANDES, J. VIEIRA, P. Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1216 (19), p. 4275-81, 2009.

SILVA, R.; LEITÃO, G.; BRUM, T.; LOBATO, A.; PINTO, M.; PINTO A. Applications of counter-current chromatography in organic synthesis purification of heterocyclic derivatives of lapachol. **Journal of Chromatography A**. v. 1151 (1-2), p. 197-202, 2007.

VERPOORTE, R.; KOS-KUYCK, E.; TSOI, T. A.; RUIGROK, C. L. M.; JONG, G.; SVENDSEN, A. B. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Medica**. v. 48, p. 283—289, 1983.

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

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. Alemanha. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984. 322 p. Bibliografia: 300-301. ISBN: 0-387-13195-7 (U.S.).

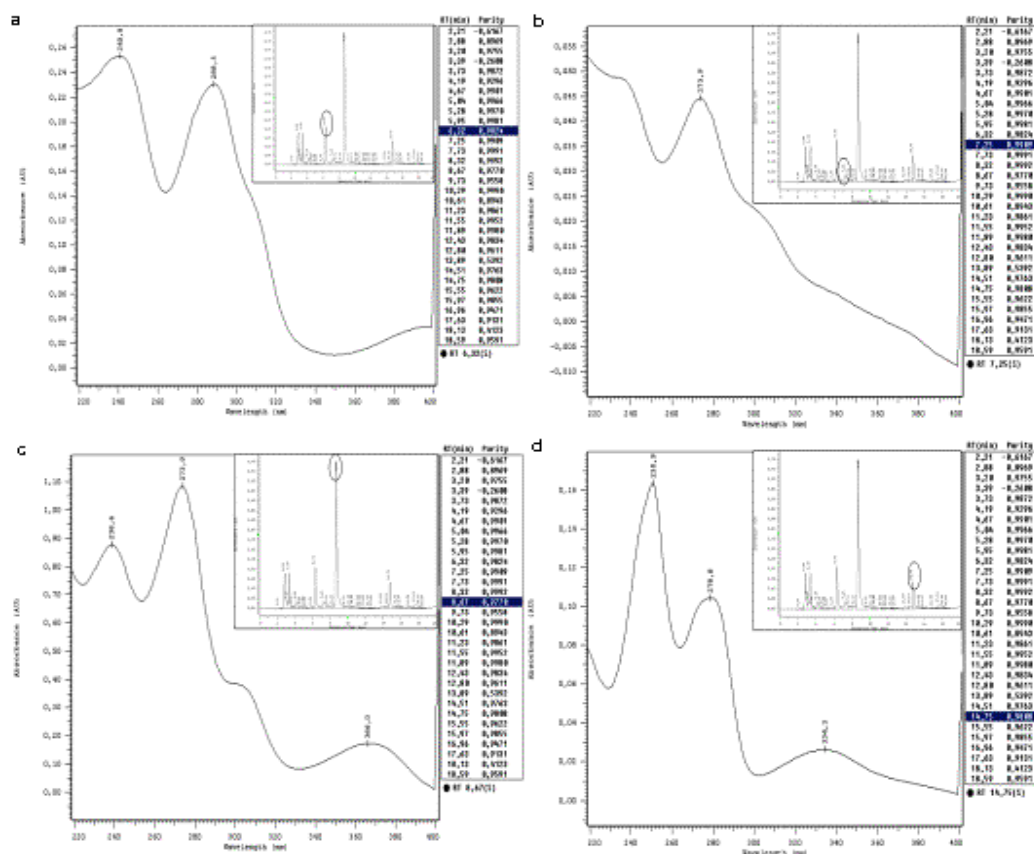
WEISZ, A.; SCHER, A. L.; SHINOMIYA, K.; FALES, R. M.; ITO, Y. A New Preparative-Scale Purification Technique: pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography. **Journal of the American Chemical Society**. v. 116, p. 704-708, 1994.

WHO. **2010/2011 TUBERCULOSIS GLOBAL FACTS**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/2010/factsheet_tb_2010_rev21feb11>. Acesso em: 28 de março de 2011.

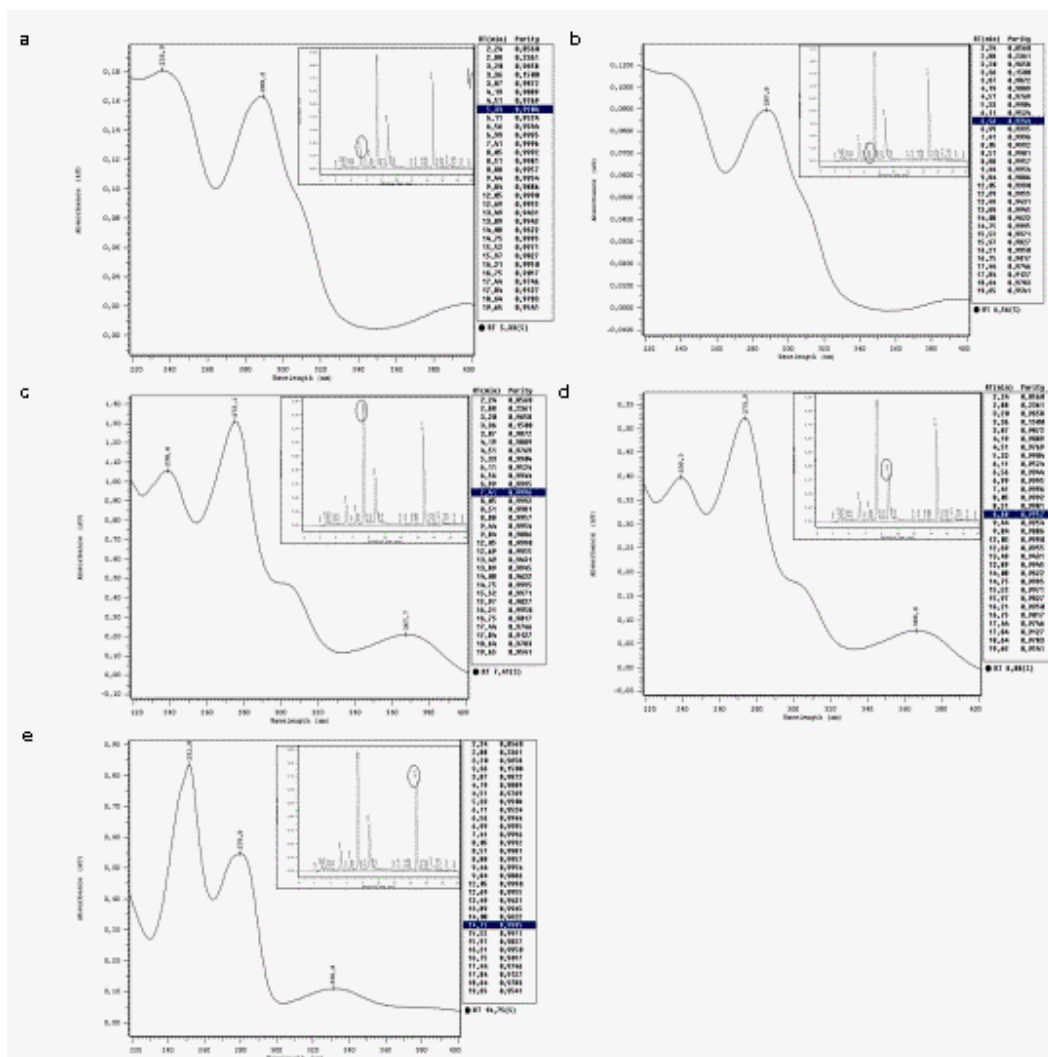
ZHANG, H. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5260–5264, 2005.

7. ANEXOS

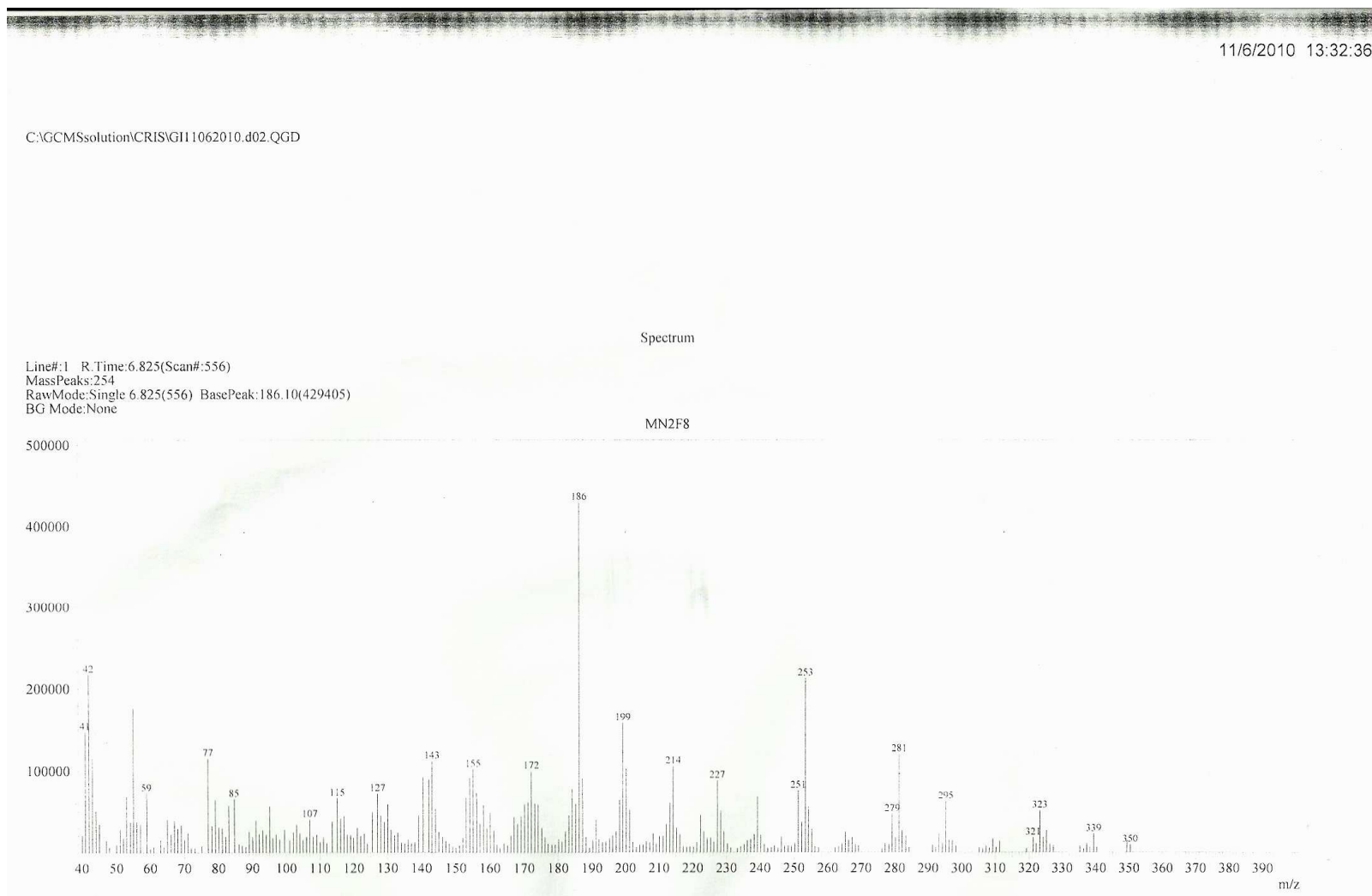
7.1. Espectros de UV correspondentes aos sinais de CBAEt, obtidos por DAD com varredura de 220 a 400 nm. **a** - sinal com T_R em 6,32 minutos, **b**- T_R em 7,25 minutos, **c** - T_R em 8,67 minutos e **d** - T_R em 14,75 minutos.



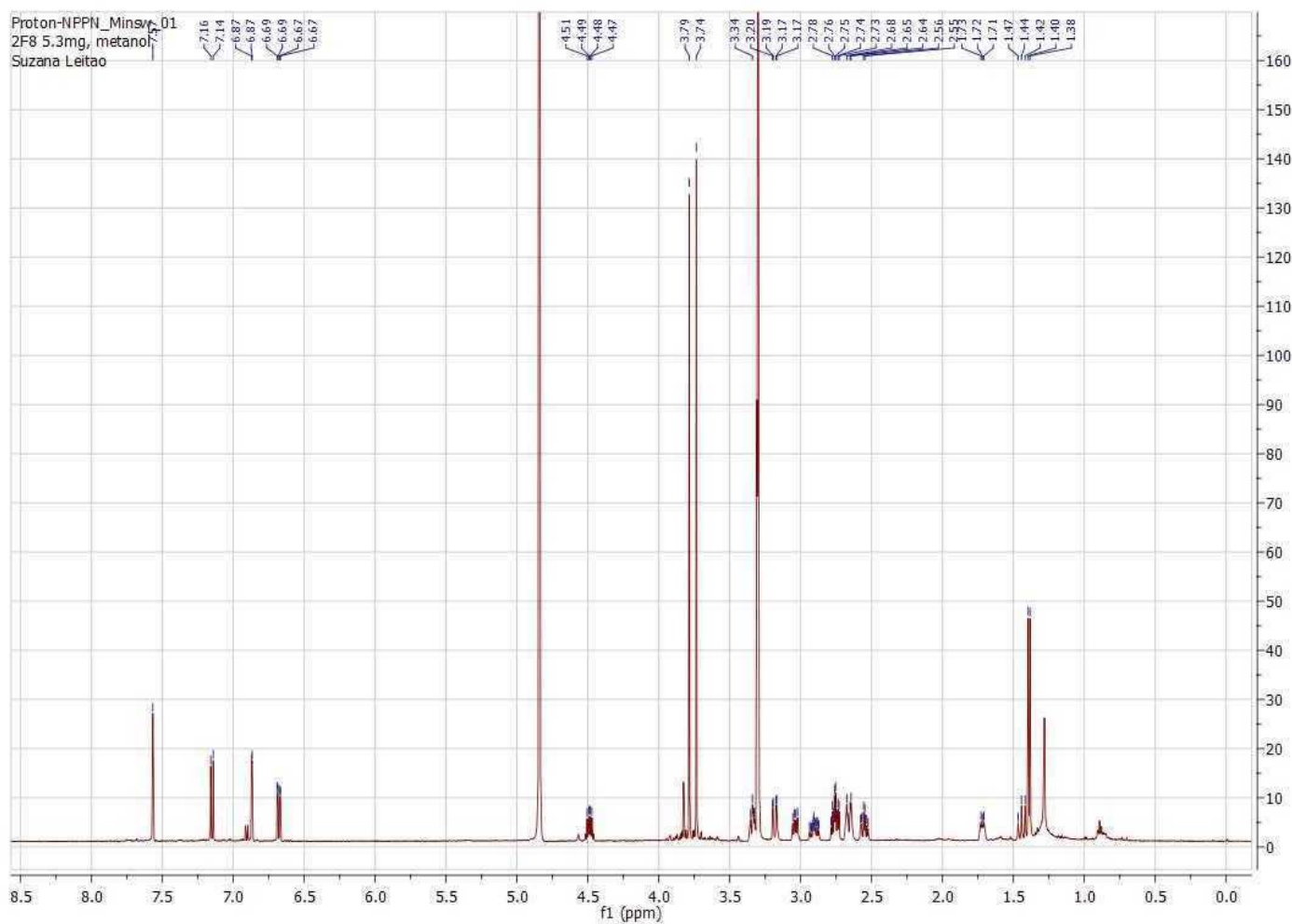
7.2. Espectros de UV correspondentes aos sinais de CTFEt, obtidos por DAD com varredura de 220 a 400 nm. **a** - sinal com T_R em 5,33 minutos, **b** - T_R em 6,56 minutos, **c** - T_R em 7,41 minutos, **d** - T_R em 8,88 minutos e **e** - T_R em 14,75 minutos.



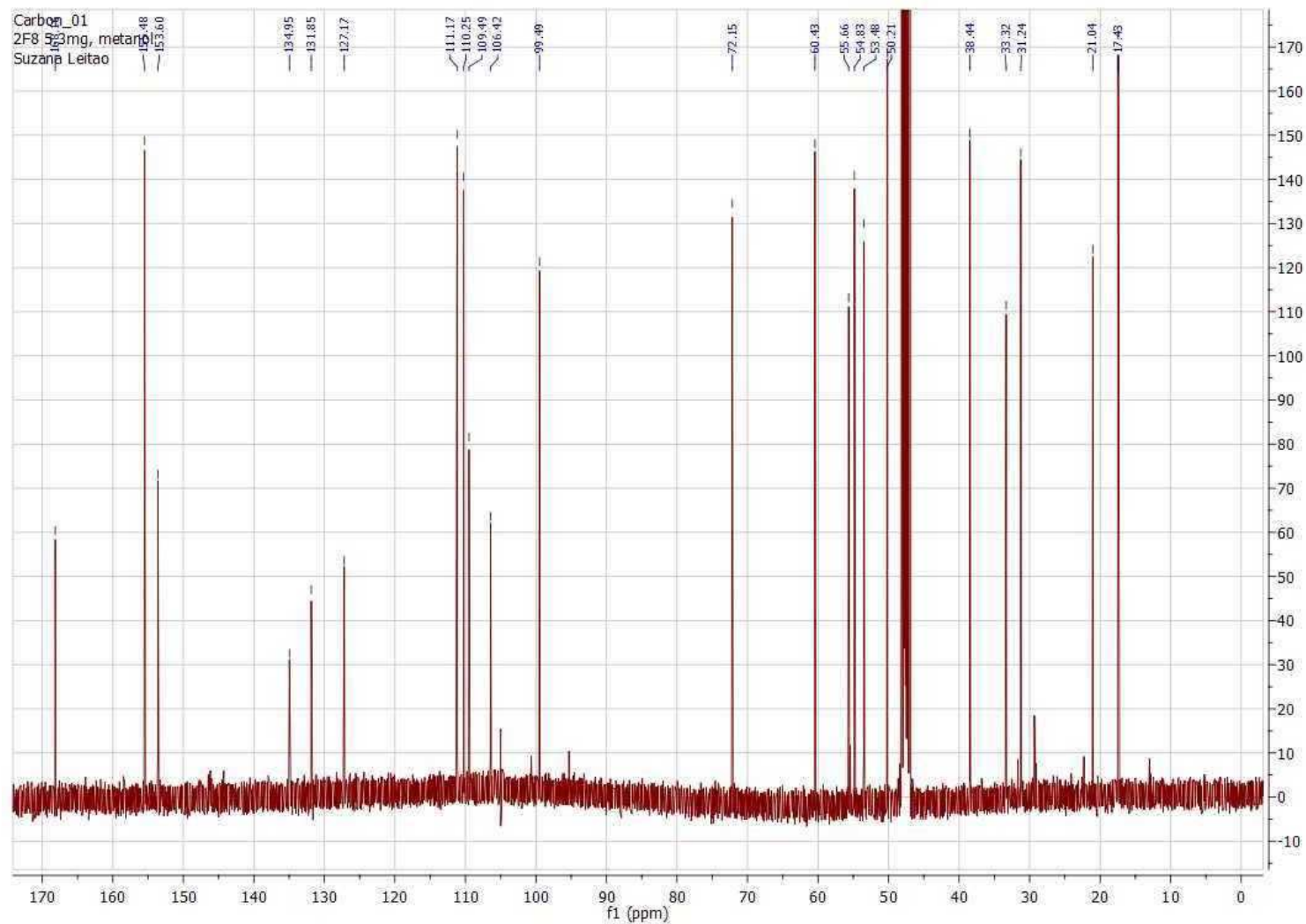
7.3. Fragmentograma de A₁, identificado como 3 α -aricina, obtido por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70 eV.



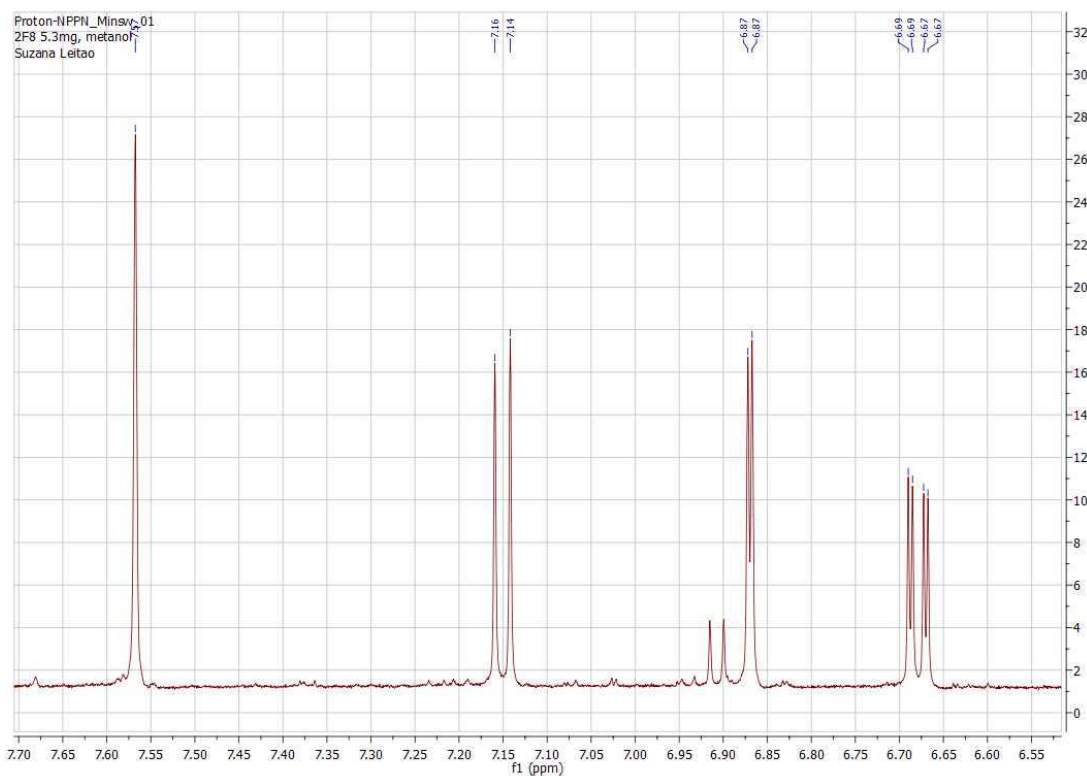
7.4. Espectros de RMN em 1D/2D de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e expansões de A_1 , identificado como 3α -aricina.



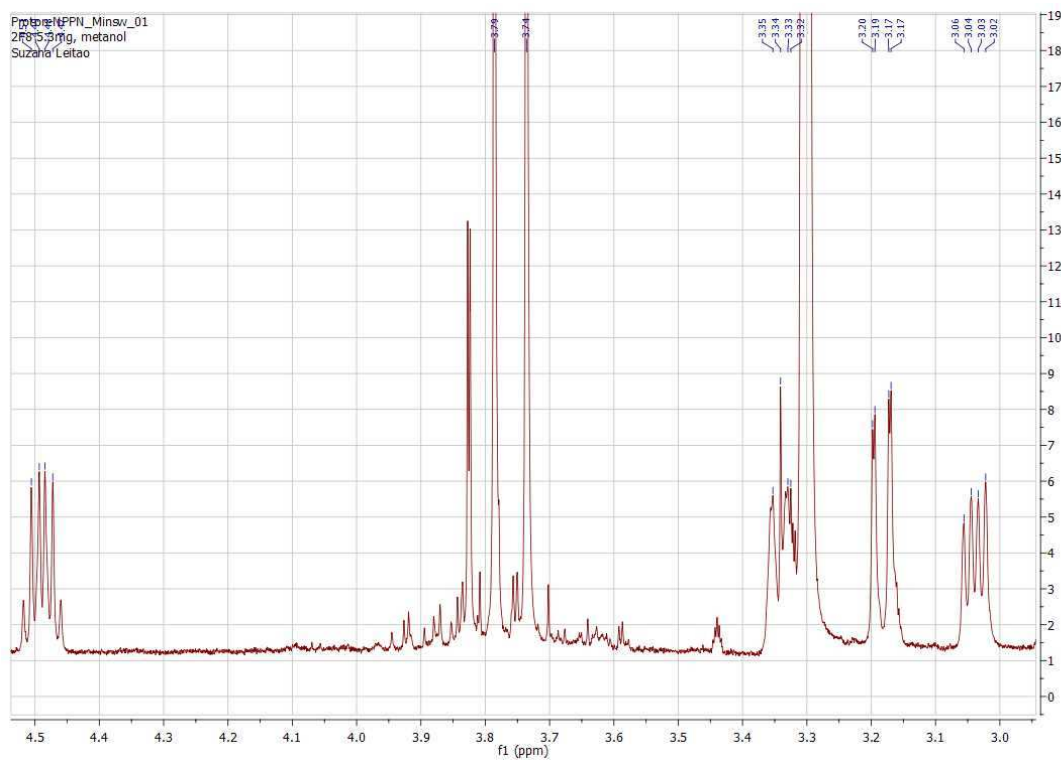
7.4.1. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de A_1 em CD_3OD .



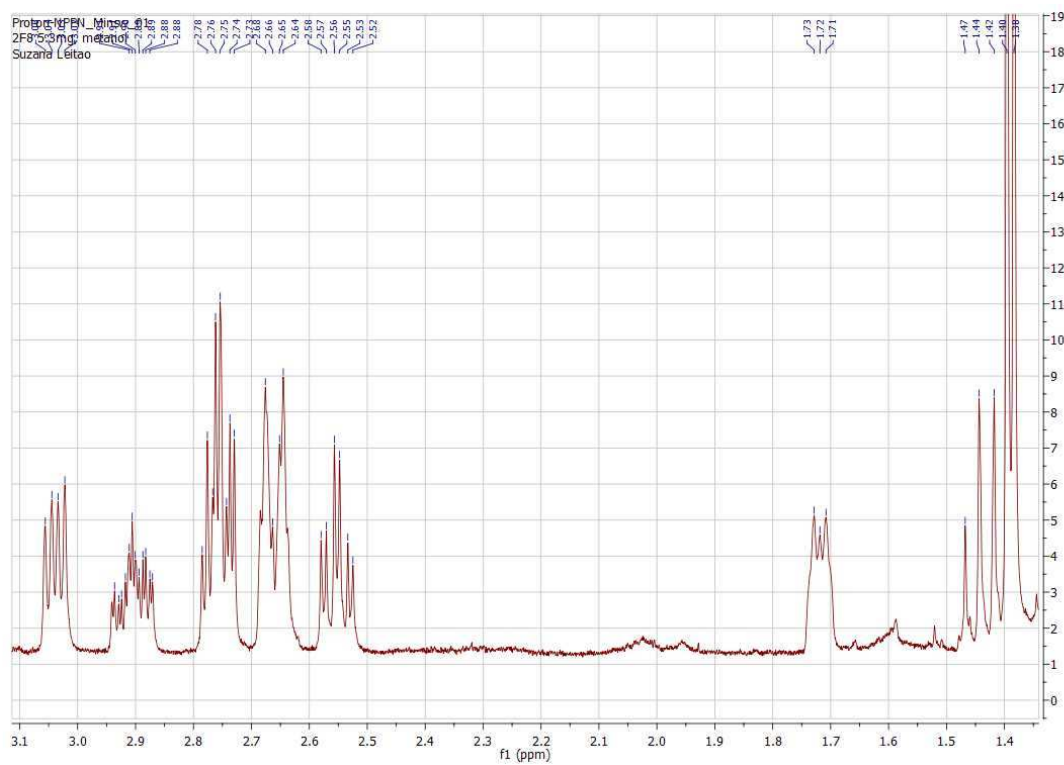
7.4.2. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de A_1 em CD_3OD .



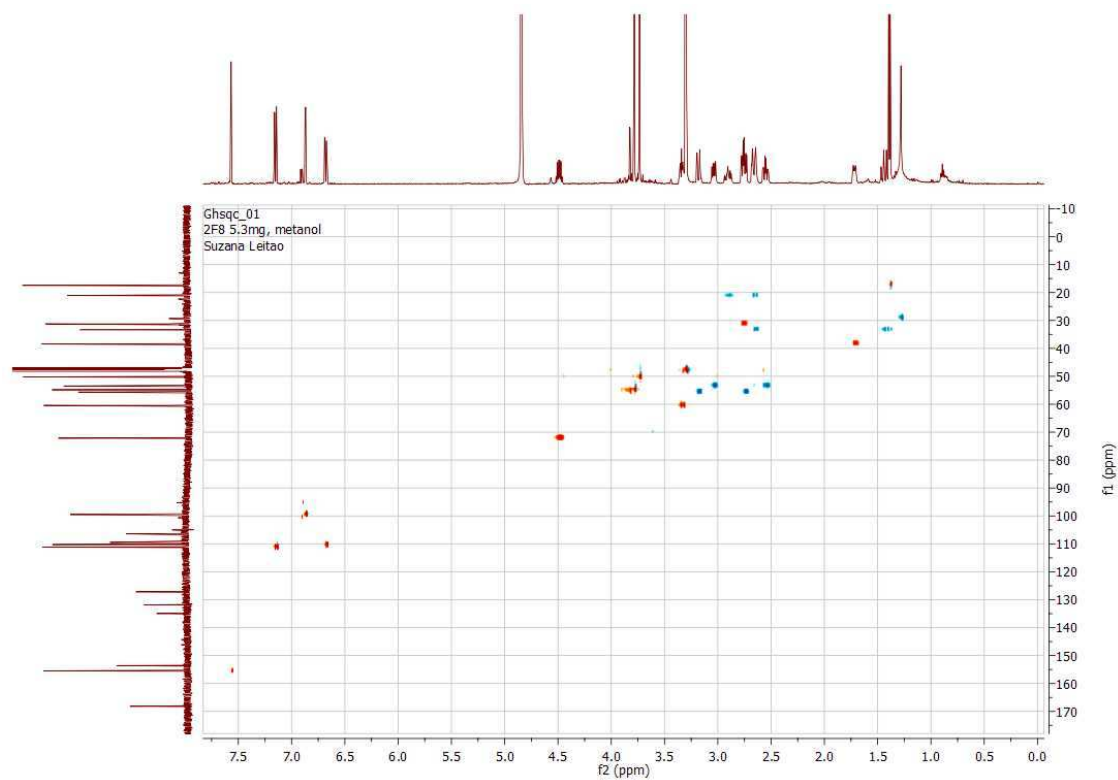
7.4.3. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de A_1 em CD_3OD – expansão 1.



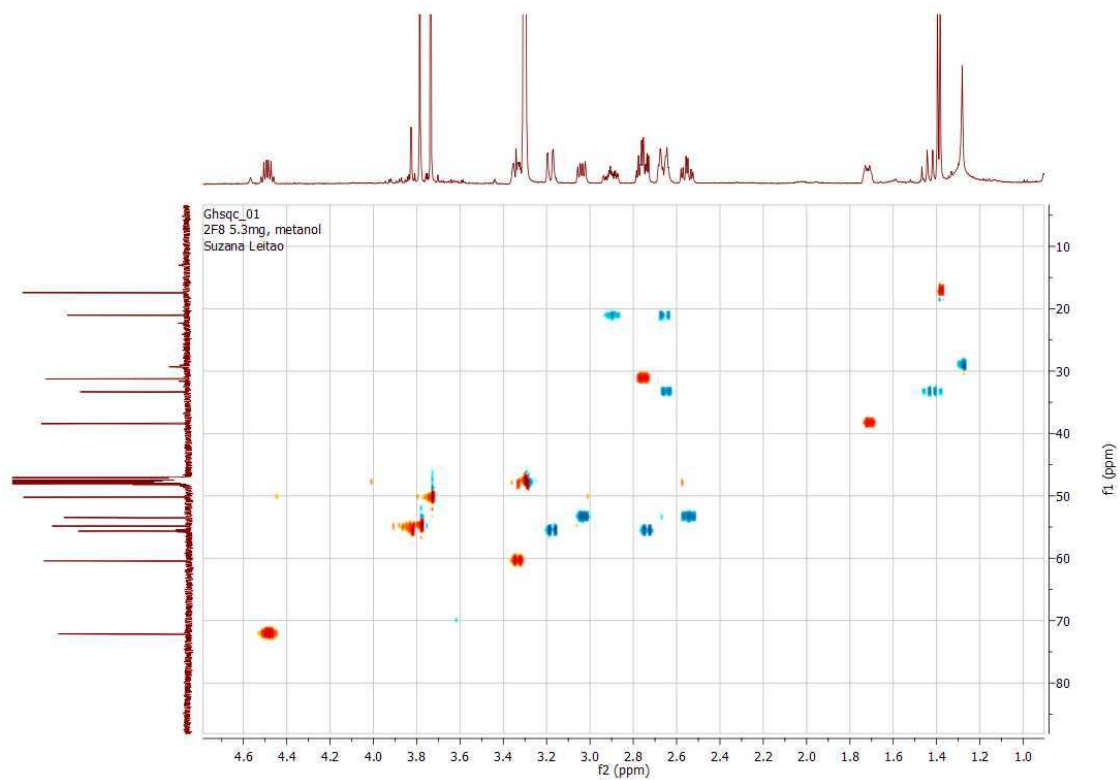
7.4.4. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de A_1 em CD_3OD – expansão 2.



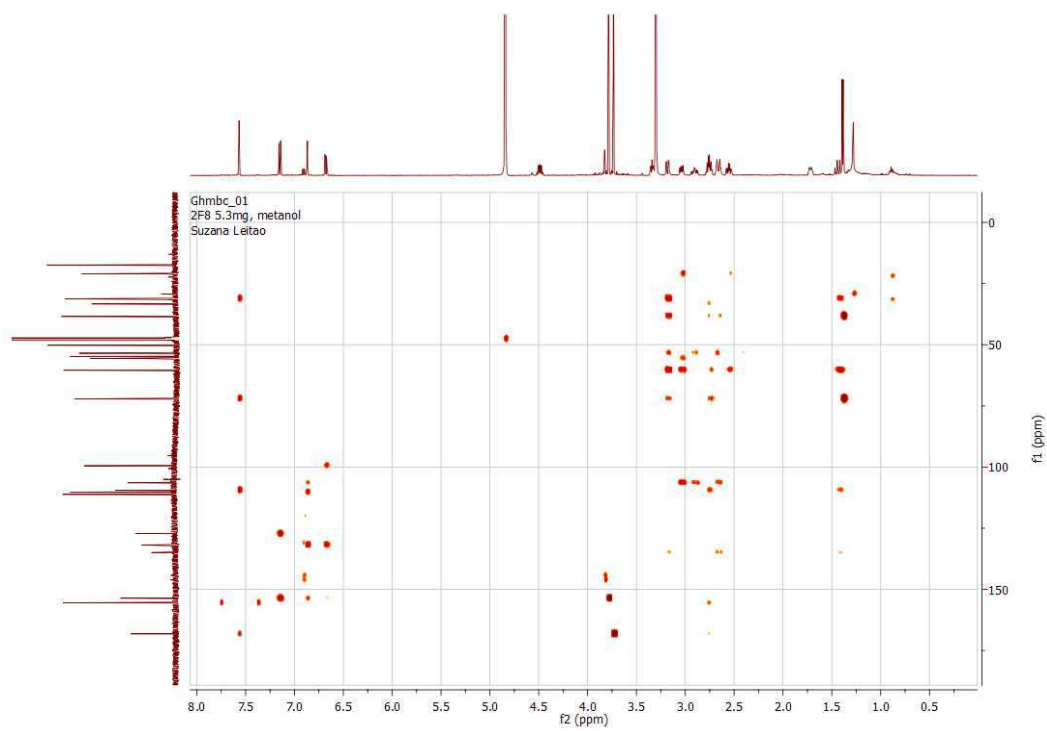
7.4.5. Espectro de RMN em de ^1H (500 MHz) de A_1 em CD_3OD – expansão 3.



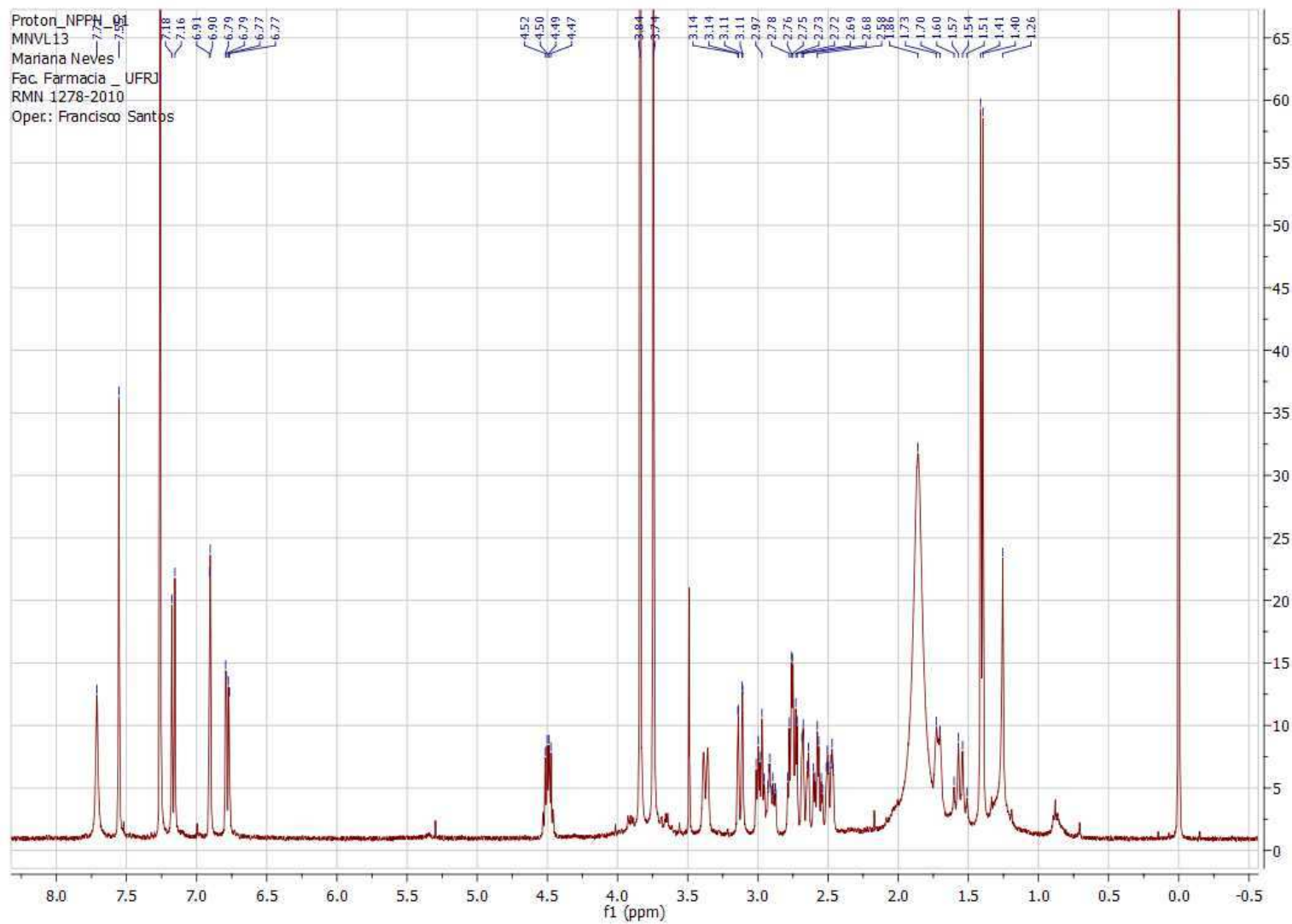
7.4.6. Espectro de RMN em de ^1H ^{13}C HSQC de A_1 em CD_3OD .



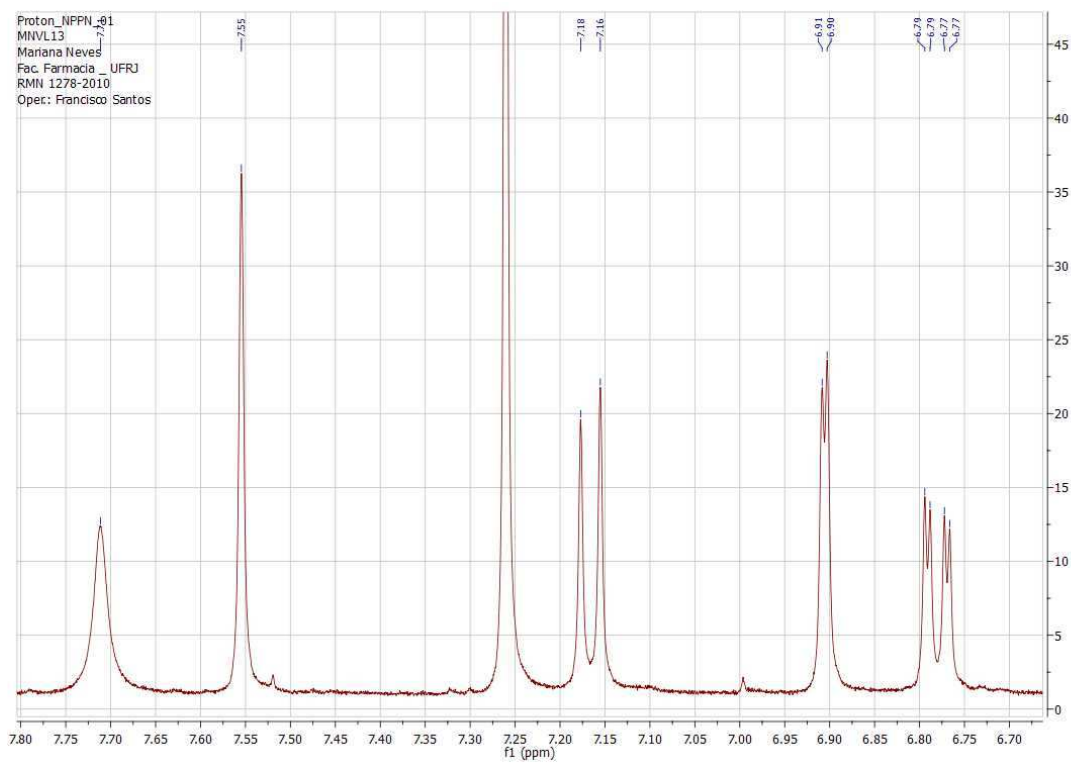
7.4.7. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HSQC de A_1 em CD_3OD – expansão 1.



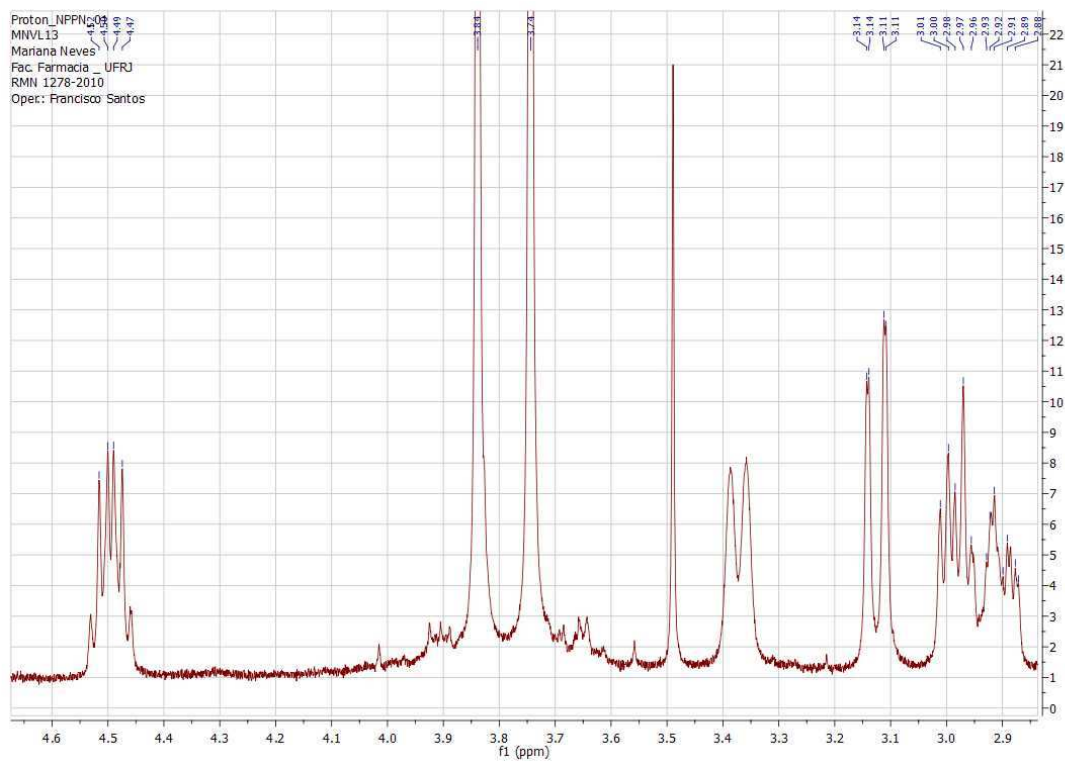
7.4.8. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HMBC de A_1 em CD_3OD .



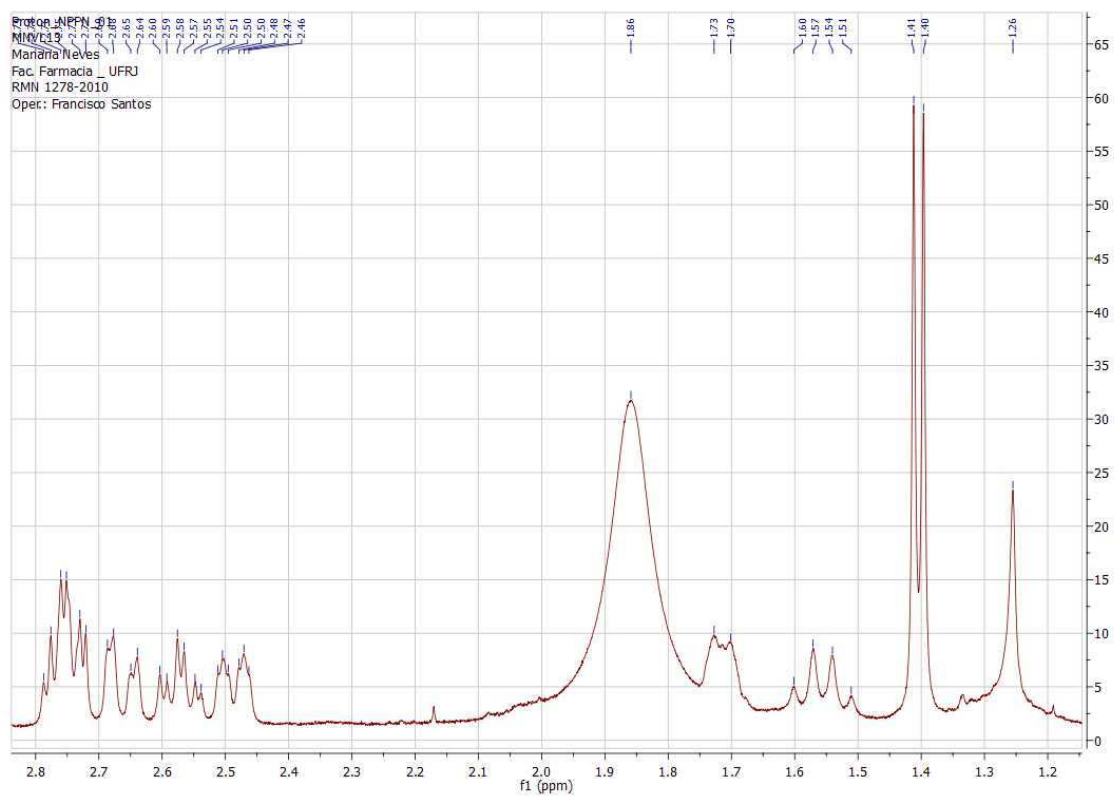
7.4.9. Espectro de RMN em de ^1H (400 MHz) de A_1 em CDCl_3 .



7.4.10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_1 em CDCl_3 – expansão 1.

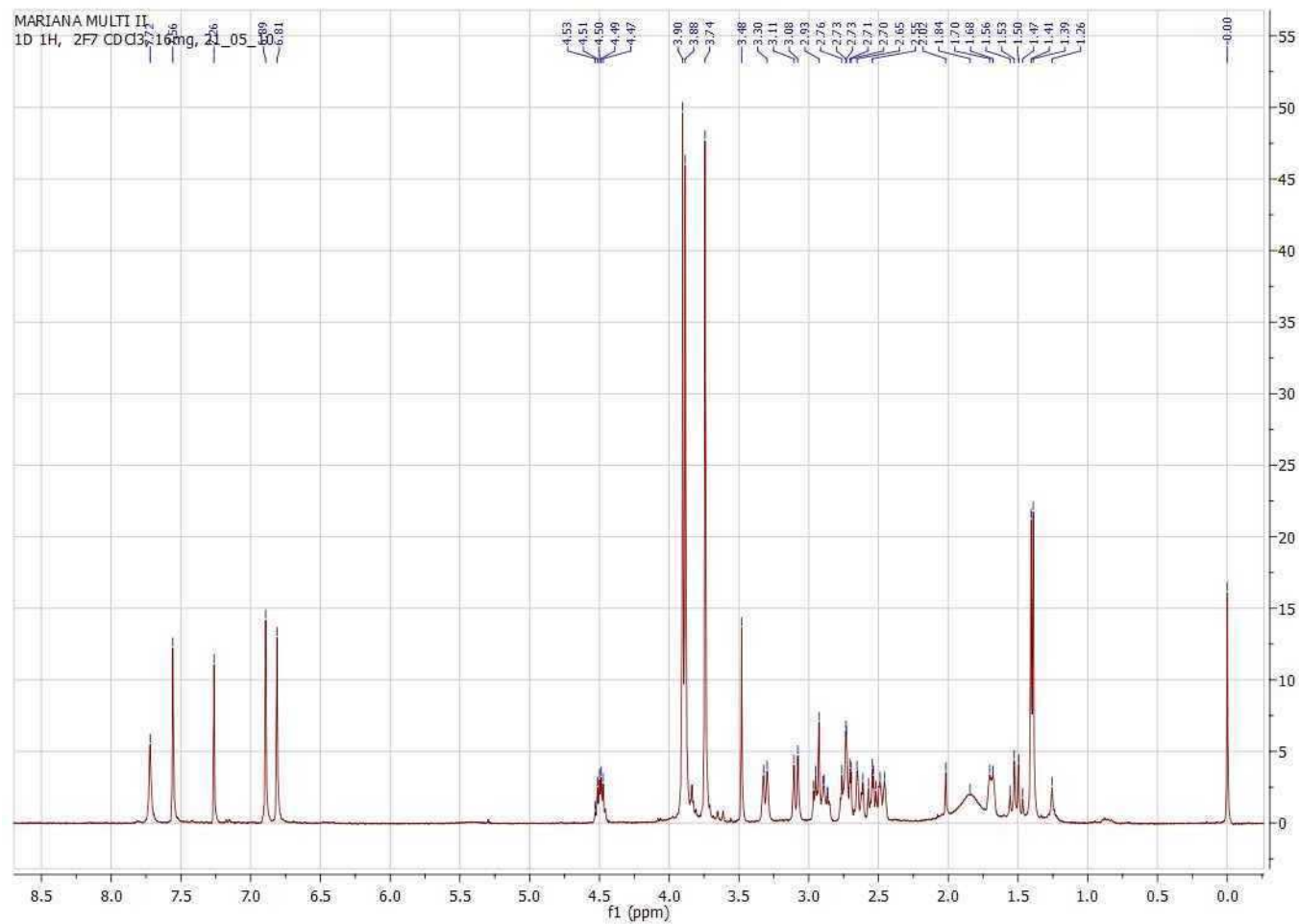


7.4.11. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_1 em CDCl_3 – expansão 2.

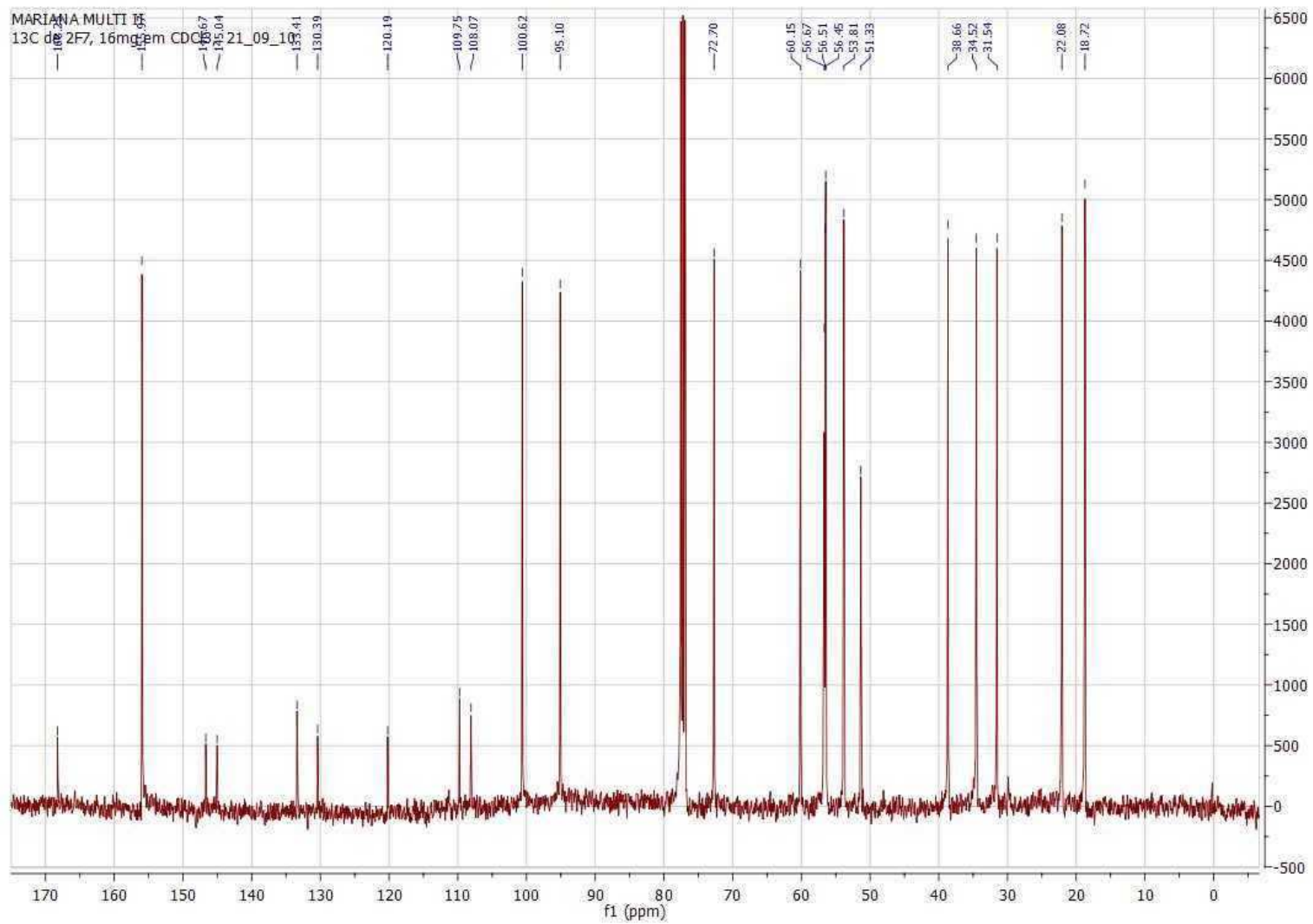


7.4.12. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_1 em CDCl_3 – expansão 3

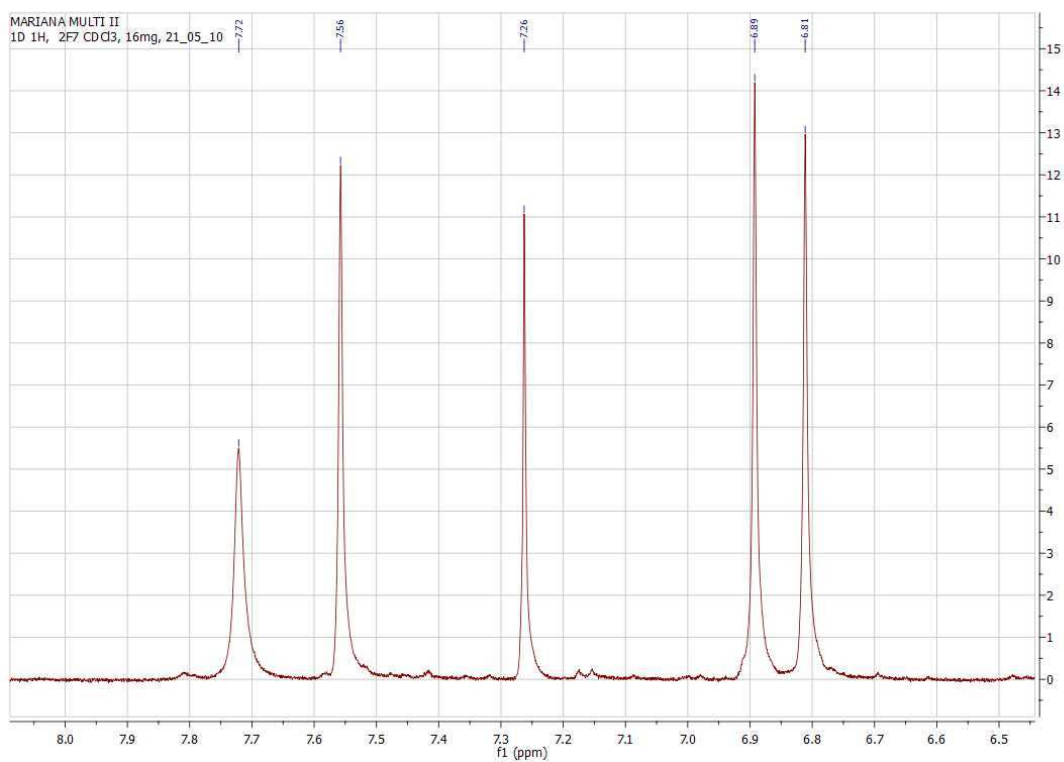
7.5. Espectros de RMN em 1D/2D de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e expansões de A_2 , identificado como isoreserpilina.



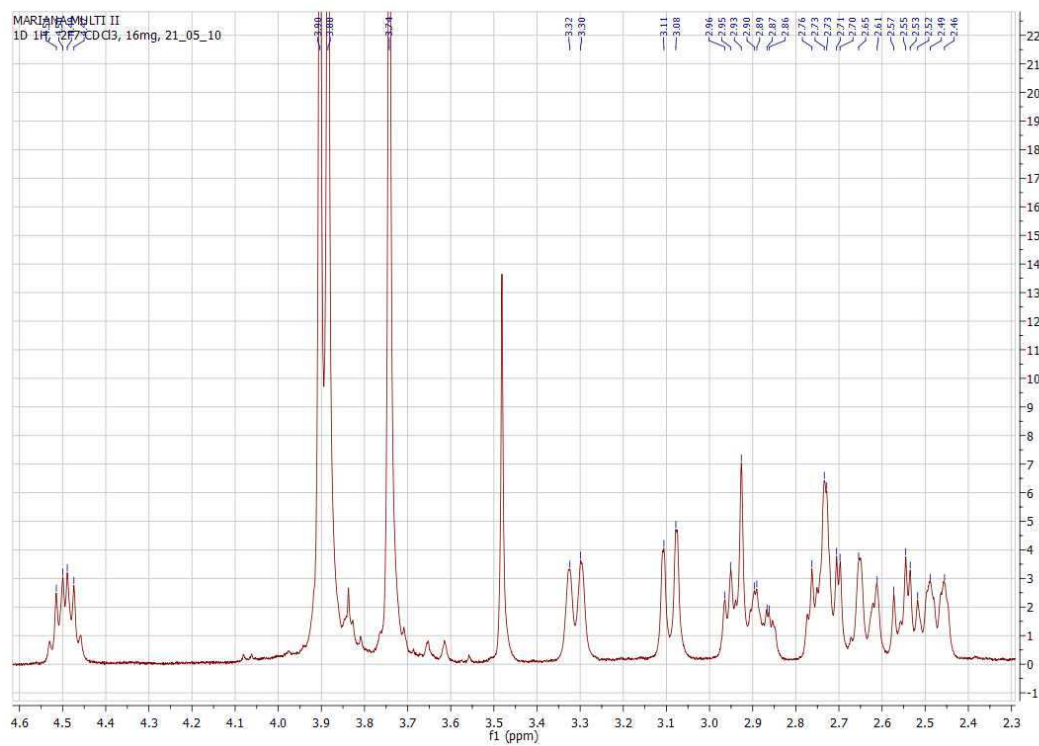
7.5.1. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_2 em CDCl_3 .



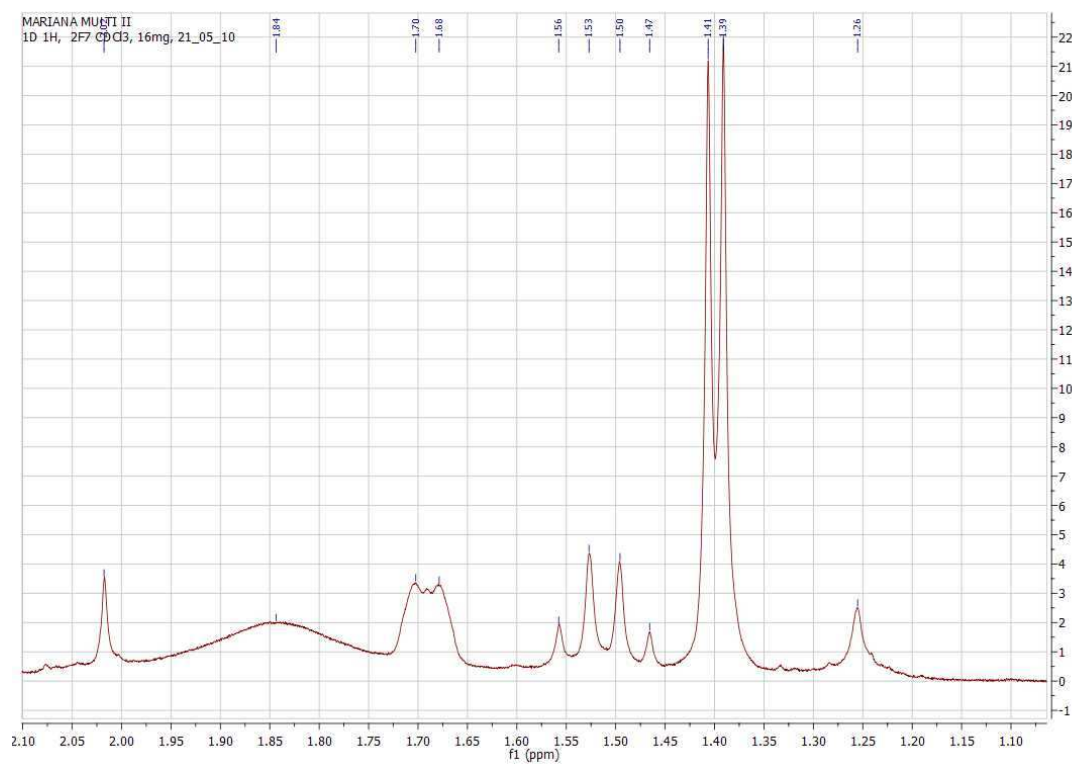
7.5.2. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de A_2 em CDCl_3 .



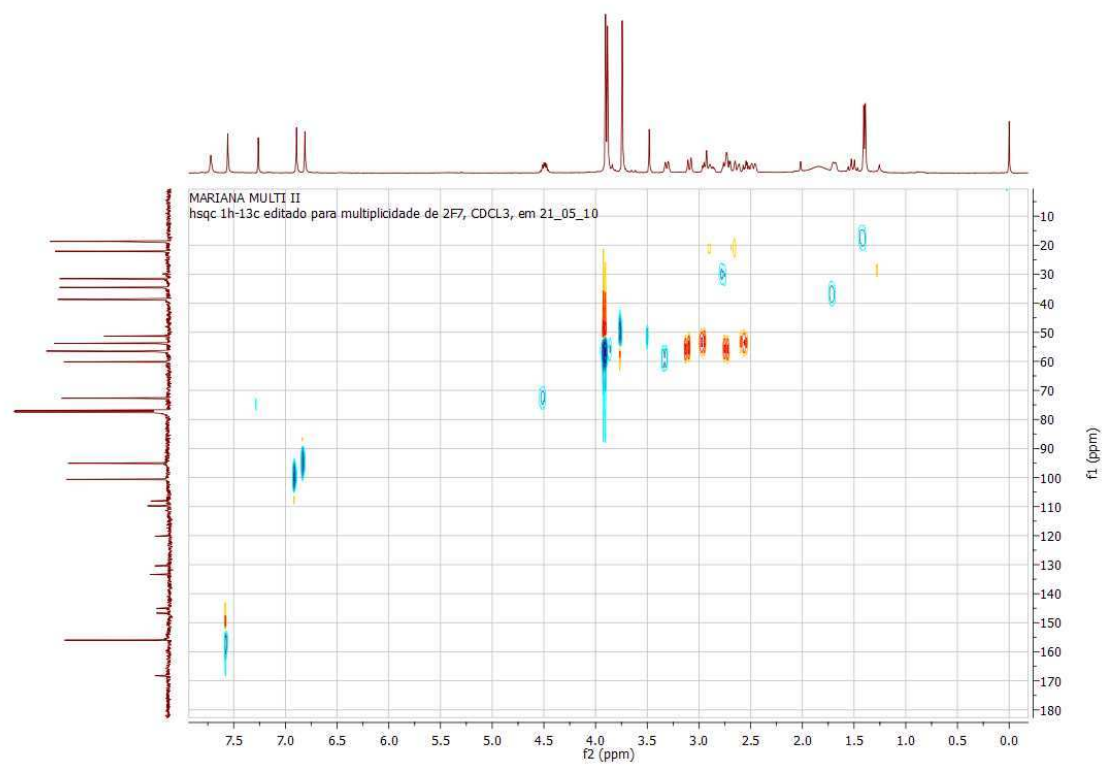
7.5.3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_2 em CDCl_3 – expansão 1.



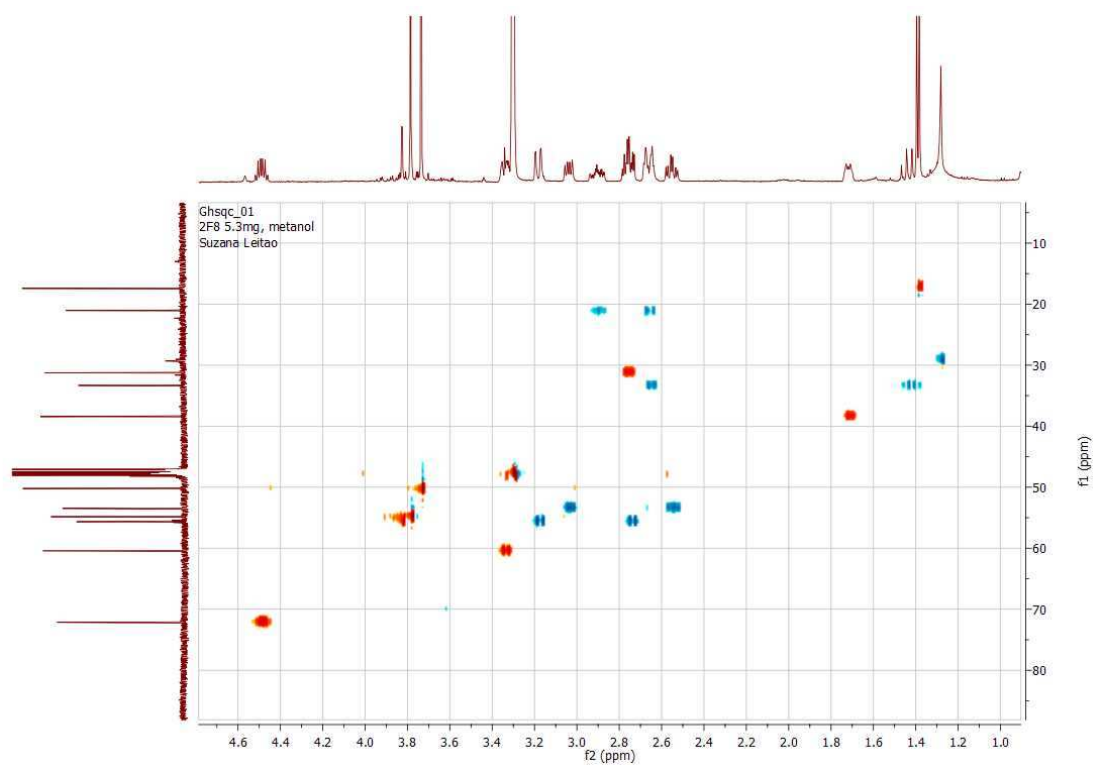
7.5.4. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_2 em CDCl_3 – expansão 1.



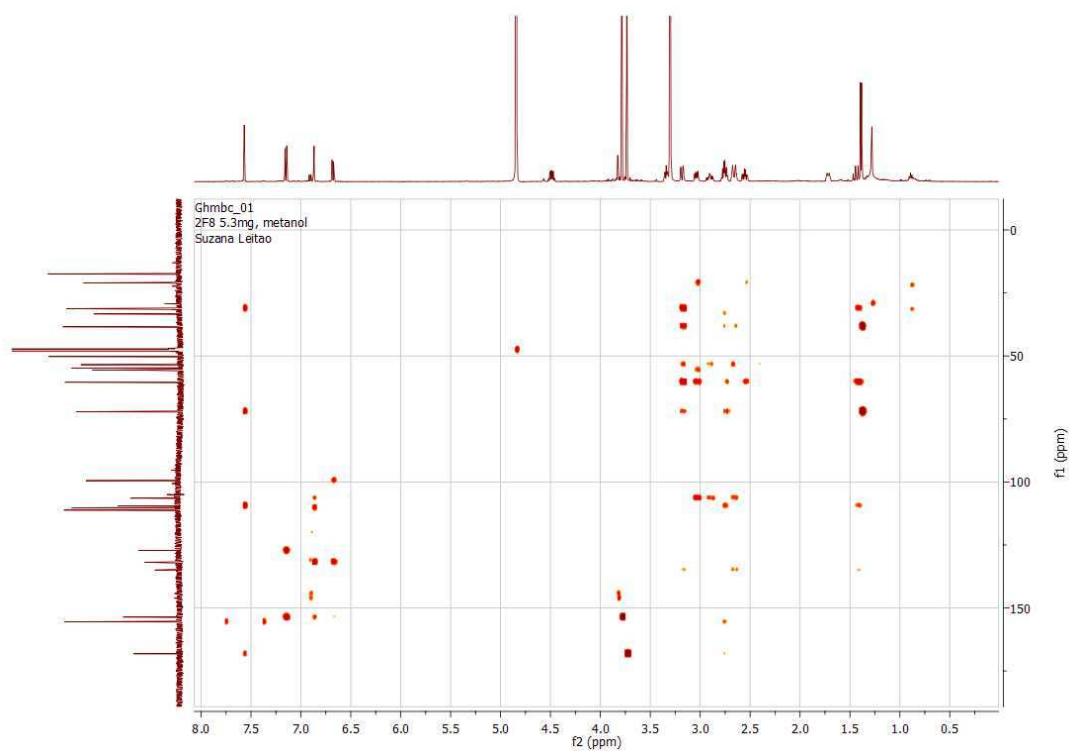
7.5.5. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_2 em CDCl_3 – expansão 3.



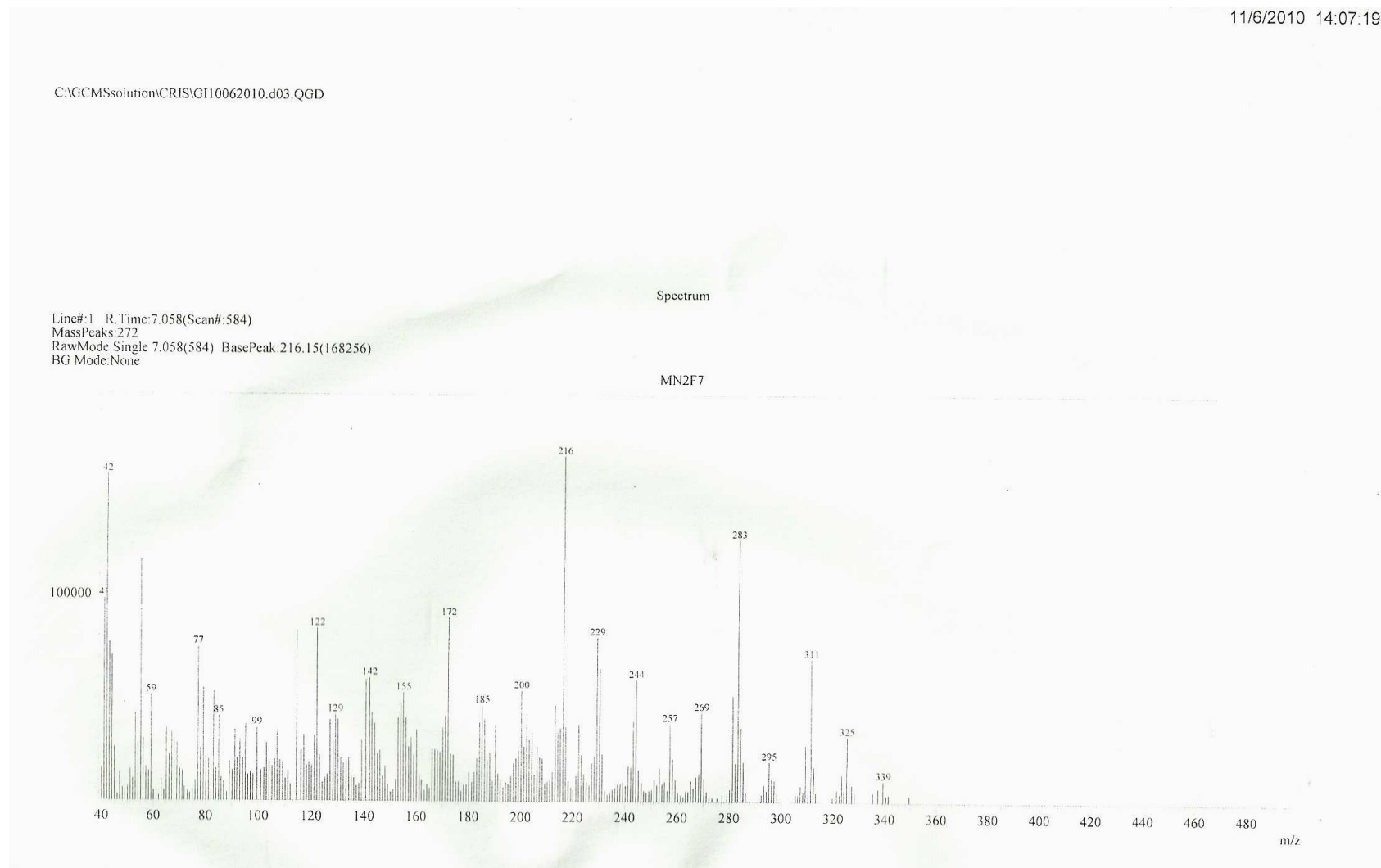
7.5.6. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HSQC de A_2 em CDCl_3 .



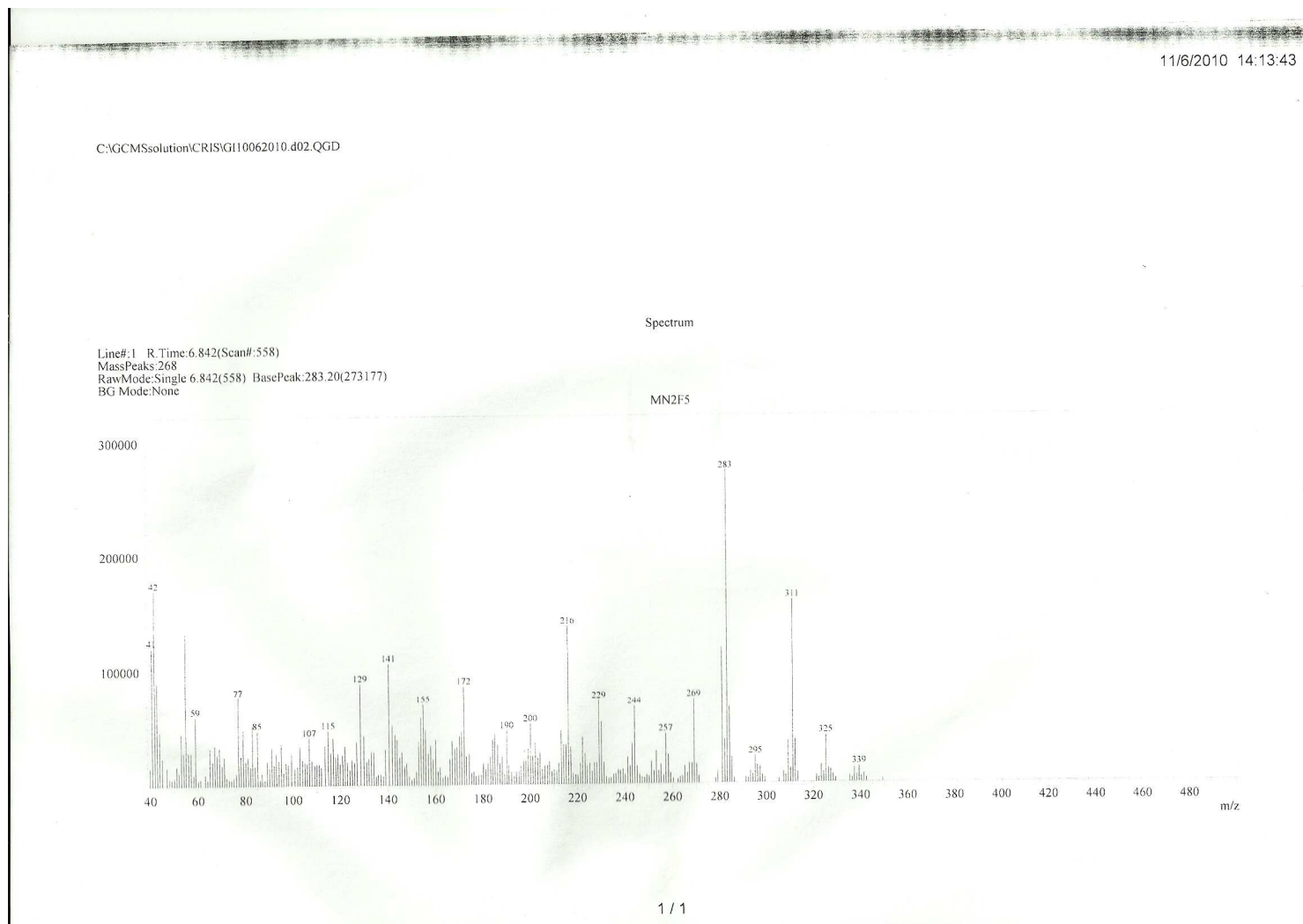
7.5.7. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HSQC de A_2 em CDCl_3 – expansão 1.



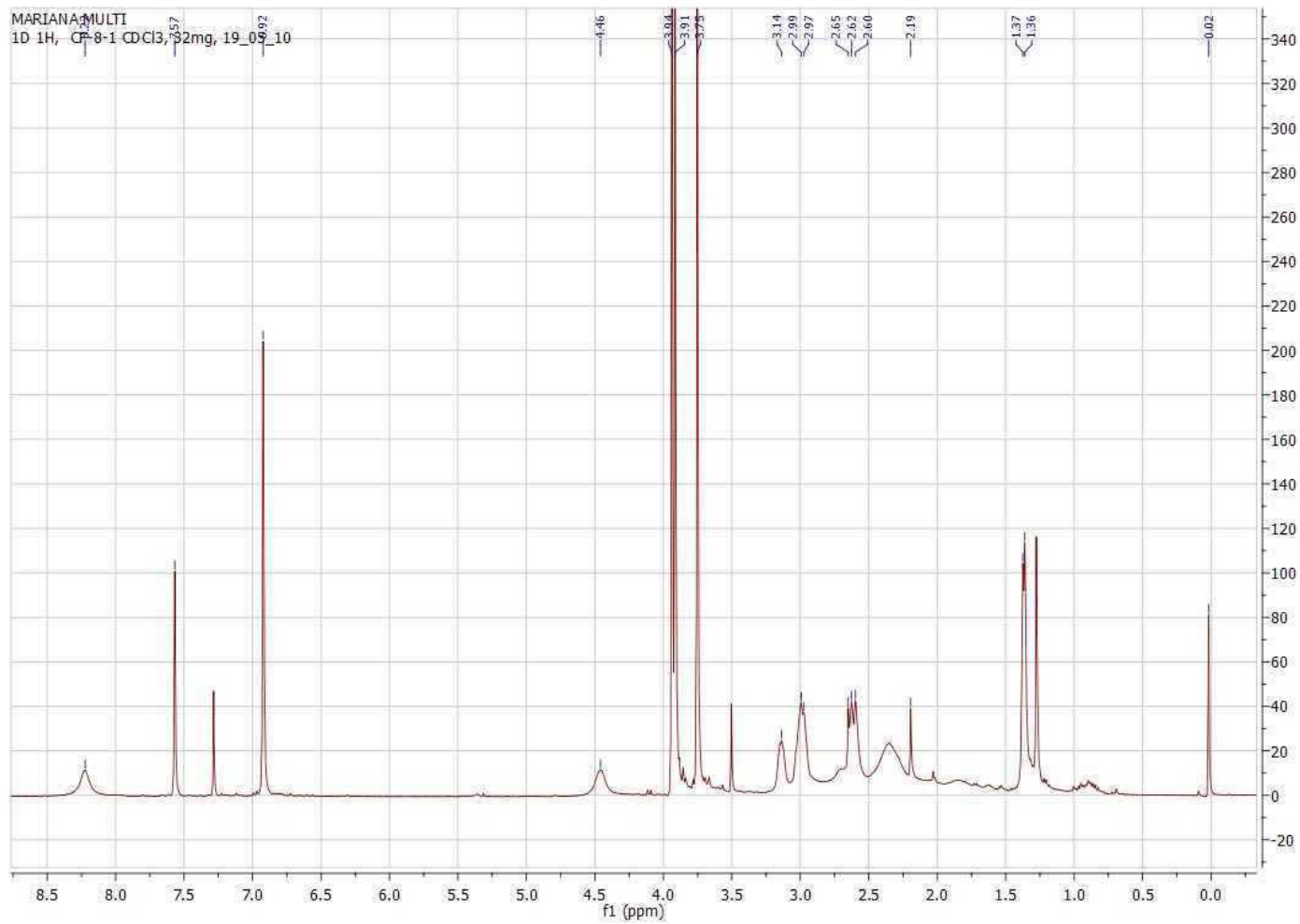
7.5.8. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HMBC de A_2 em CDCl_3 .

7.6. Fragmentograma de A₂, identificado como isoreserpilina, obtido por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

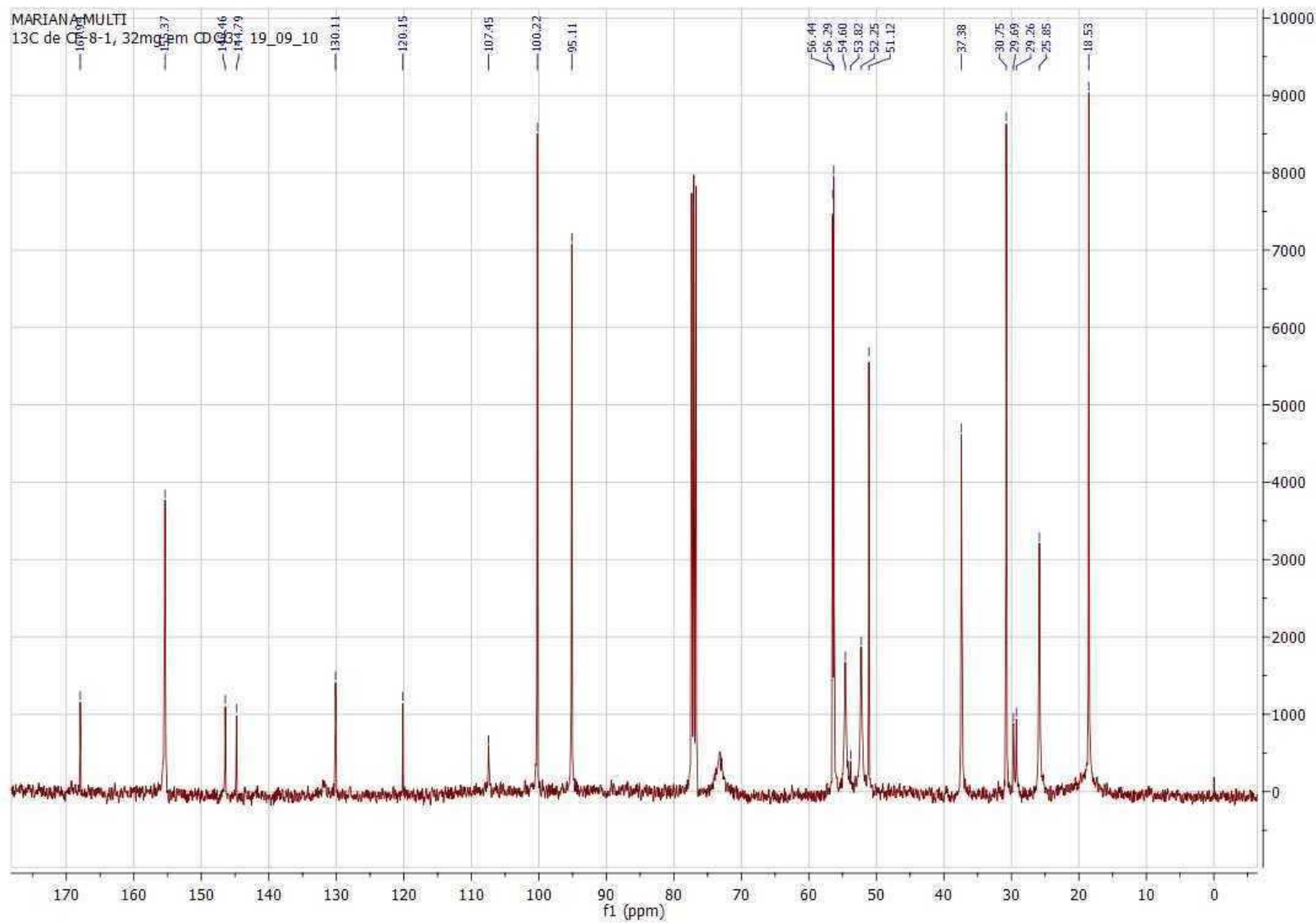
7.7. Fragmentograma de A₄, identificado como 3 β -reserpilina, obtido por injeção direta com ionização por impacto de elétrons a 70eV.



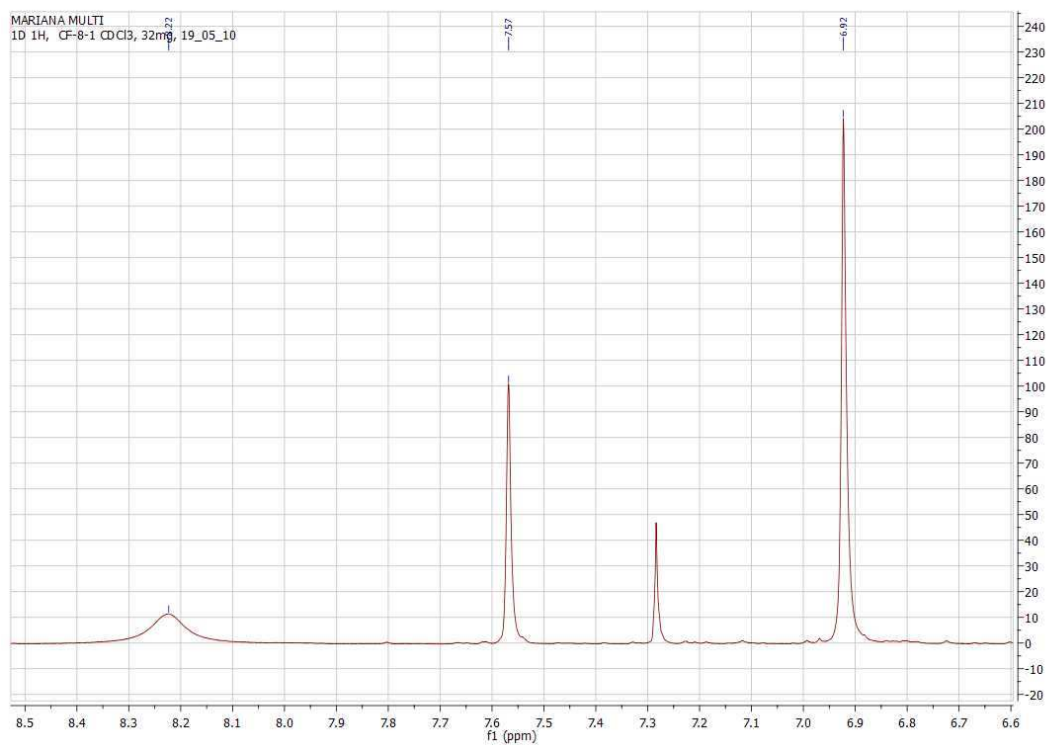
7.8. Espectros de RMN em 1D/2D de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e expansões de A₄, identificado como 3 β -reserpilina.



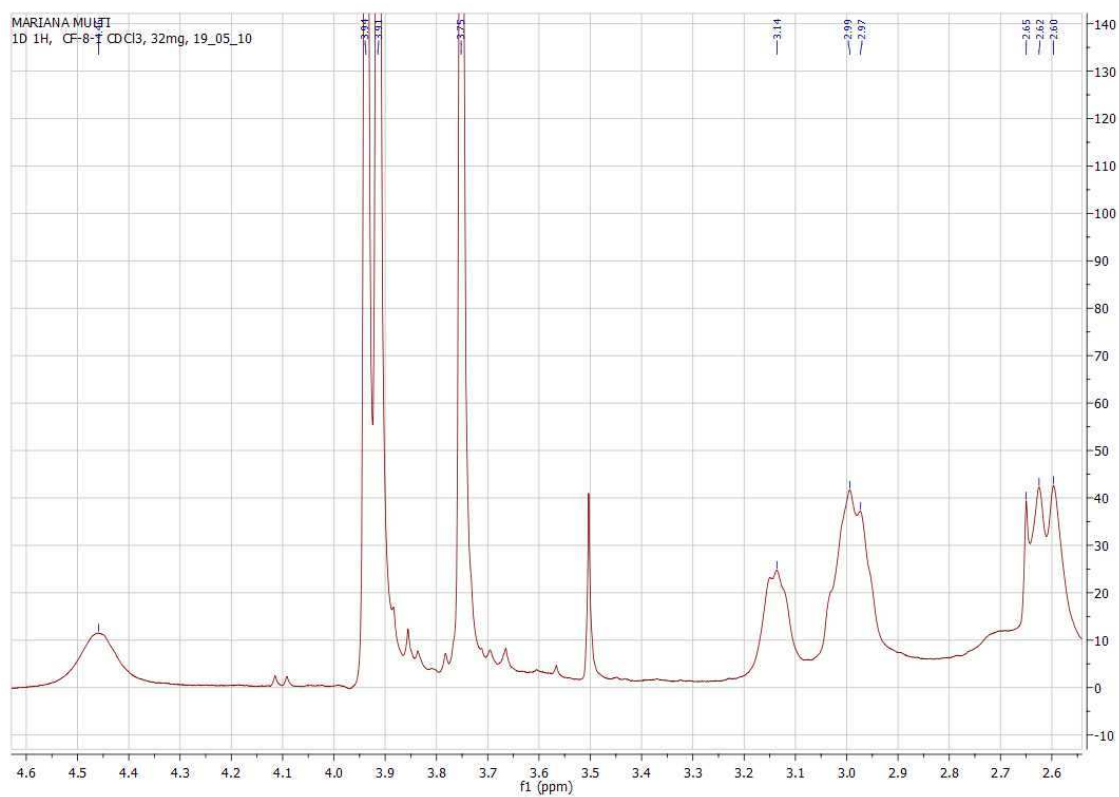
7.8.1. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A₄ em CDCl₃.



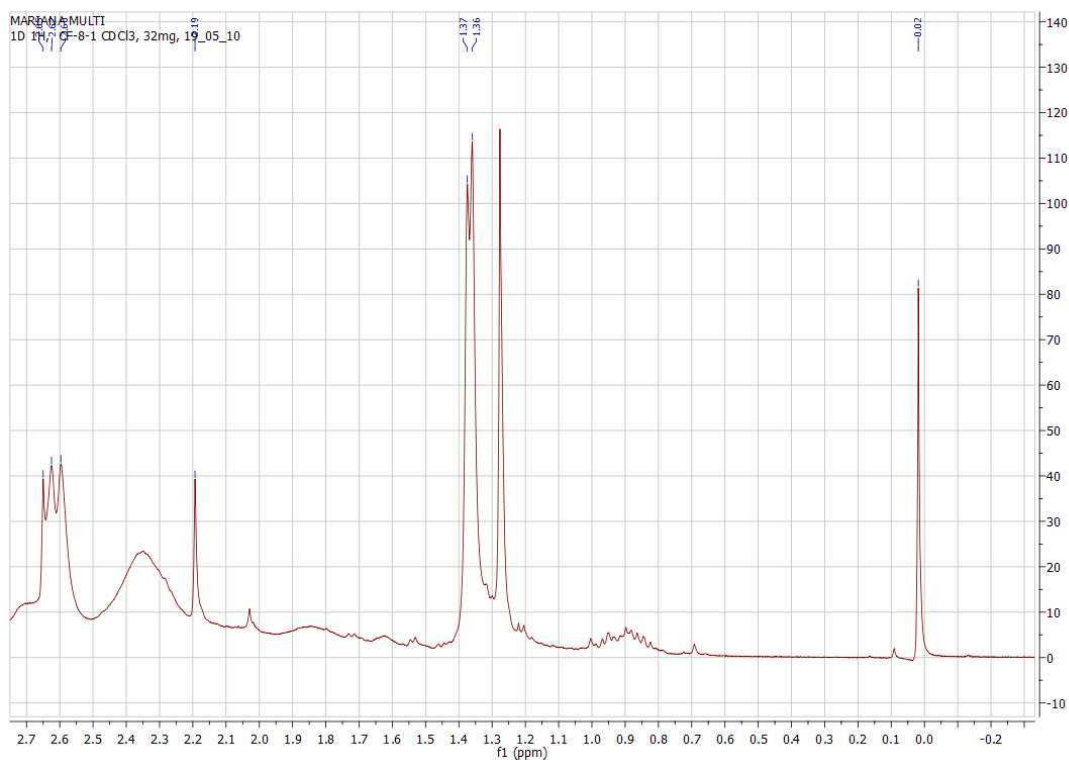
7.8.2. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de A_4 em CDCl_3 .



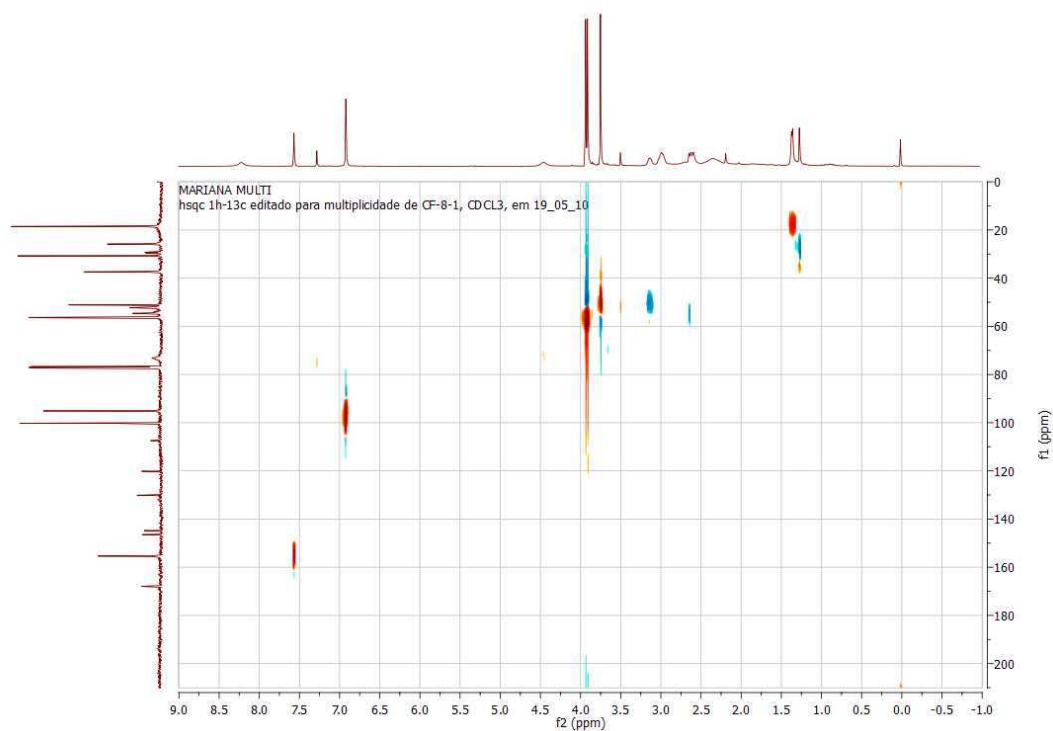
7.5.3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_4 em CDCl_3 – expansão 1.



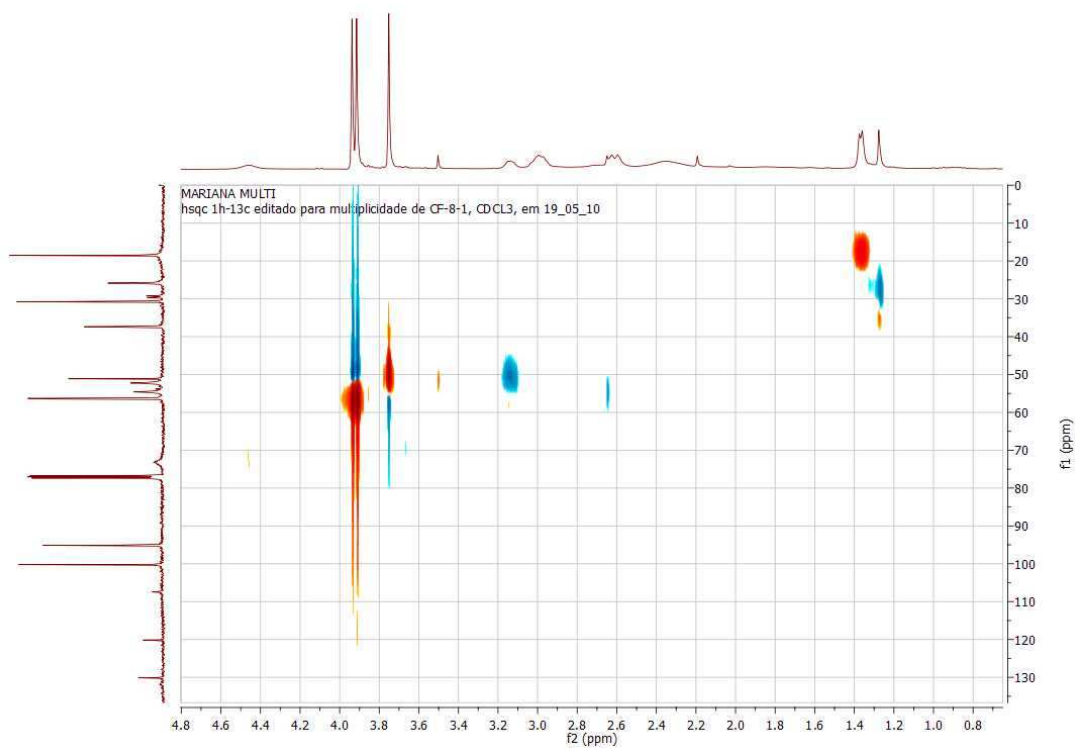
7.5.4. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_4 em CDCl_3 – expansão 2.



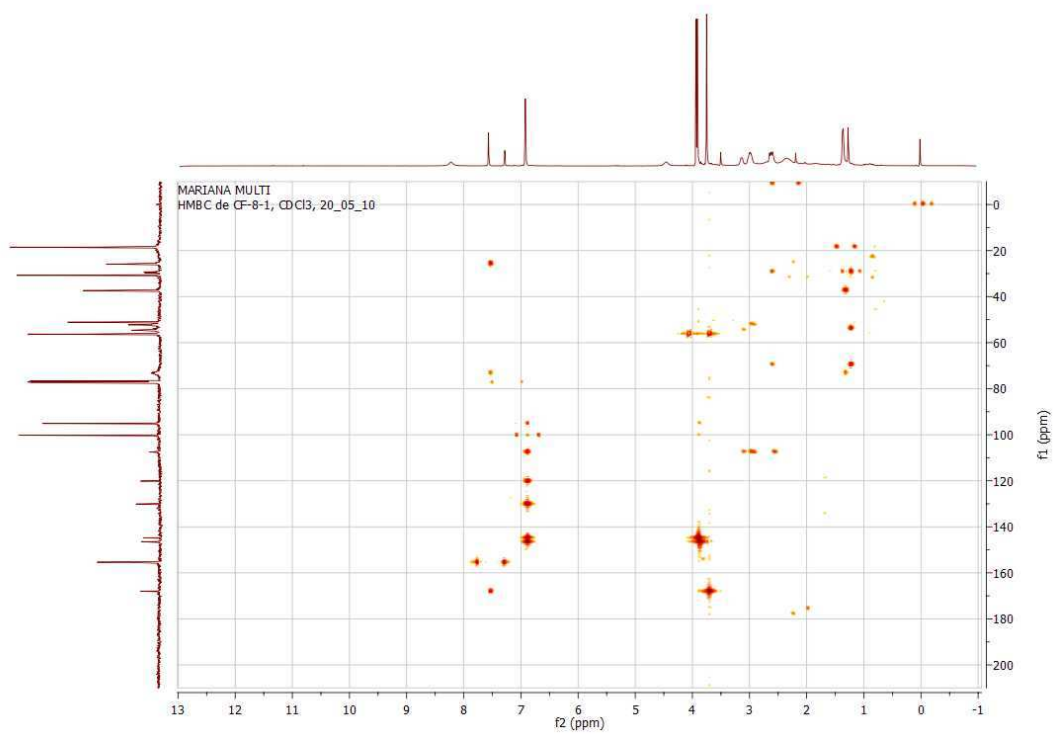
7.8.5. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de A_4 em CDCl_3 – expansão 3.



7.8.6. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HSQC de A_4 em CDCl_3 .



7.8.7. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HSQC de A₄ em CDCl₃ – expansão 1.



7.8.8. Espectro de RMN de ^1H ^{13}C HMBC de A₄ em CDCl₃.