

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PÓS- GRADUAÇÃO EM QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS



ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS CONSTITUINTES DO CERNE DE
ABUTA RUFESCENS AUBL. (MENISPERMACEAE)

VANESSA HOMOBONO SANTA BRIGIDA DE ALBUQUERQUE

Manaus-AM

2004

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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS CONSTITUINTES DO CERNE DE
ABUTA RUFESCENS AUBL. (MENISPERMACEAE)**

VANESSA HOMOBONO SANTA BRIGIDA DE ALBUQUERQUE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de *Mestre em Química de Produtos Naturais*, com área de conhecimento em Química de Produtos Naturais.

MANAUS - AMAZONAS

28 de setembro de 2004

VANESSA HOMOBONO SANTA BRIGIDA DE ALBUQUERQUE

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS CONSTITUINTES DO CERNE DE
ABUTA RUFESCENS AUBL. (MENISPERMACEAE)**

Orientadora: DRA. MARIA LÚCIA BELÉM PINHEIRO

MANAUS - AMAZONAS

28 de setembro de 2004

ALBUQUERQUE, Vanessa Homobono Santa Brígida de
Estudo Químico e Biológico dos Constituintes do Cerne de *Abuta*
rufescens Aubl. (Menispermaceae).

120p. ilustr.

Dissertação de Mestrado

- | | |
|----|----|
| 1. | 4. |
| 2. | 5. |
| 3. | |

Dedico este trabalho à minha filha
Ana Clara e aos meus pais, José (*in
memoriam*) e Edina.

Banca Examinadora

Agradecimentos

- À minha família, pelo apoio e compreensão.
- À minha orientadora, Professora Lúcia, pela orientação, pelos ensinamentos e pela paciência.
- A todos os meus colegas de mestrado que, após varias batalhas, vitórias e derrotas, se tornaram parte da minha vida.
- A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.
- A Deus por todas as conquistas, e também pelas derrotas e dificuldades que serviram para consolidar meu caráter.

RESUMO

A bôta, *Abuta rufescens* Aubl. (MENISPERMACEAE), é uma planta medicinal usada popularmente no tratamento da malária, de inflamações uterinas, de doenças hepáticas e úlcera gástrica, além de ter ação como antimicótico, diurético e abortivo. Estudos químicos anteriores revelaram a presença em seu caule de alcalóides oxoaporfínicos e azafluorantenos. A partir do fracionamento cromatográfico do extrato do cerne em diclorometano isolou-se, através de técnicas cromatográficas, um cristal em forma de agulhas alaranjadas que foi identificado por métodos espectrométricos (IV, EM., RMN de ^{13}C , RMN de ^1H) como o alcalóide Homomoschatolina. Este trabalho relata os resultados obtidos da avaliação da toxicidade deste alcalóide pelo bioensaio em *Artemia franciscana*, e de atividade antitumoral com linhagens de células de tumores de mama humano (MCF-7), de cólon humano (HCT-8), de leucemia promielocítica humana (HL-60) e pele murino (B-16).

Palavras chaves:

Abuta, Menispermaceae, alcalóides, *Artemia franciscana* e antitumoral.

ABSTRACT

The bôta, *Abuta rufescens* Aubl. (MENISPERMACEAE), is a medicinal plant used popularly in the treatment of malaria, uterine inflammations, hepatic illnesses and gastric ulcer, besides having action as antimycotic, diuretic and abortive. Previous chemical studies had disclosed to the presence in its stem of oxoaporphines and azafluoranthenes alkaloids. Of the chromatographic fractionate of the extract of stem in dichloromethane it was isolated, from chromatographic techniques, a crystal in form of orange needles that was identified through spectrometric methods (IR, MS, ^{13}C NMR, ^1H NMR) as the Homomoschatoline alkaloid. This work tells the gotten results of the toxicity evaluation of this alkaloid by the bioessay in *Artemia franciscana*, and of antitumoral activity with ancestries of cells of human breast tumors (Mcf-7), of human colon (Hct-8), of promyelocitic human leukemia (HL-60) and tumor skin (B-16).

Keywords:

Abuta, Menispermaceae, alkaloids, *Artemia franciscana* and antitumoral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1.1 Taxonomia	17
1.1.1 Filo: <i>Magnoliophyta</i> (angiospermas)	17
1.1.2 Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas).....	20
1.1.3 Ordem: Ranunculales	21
1.1.4 Família: Menispermaceae	21
1.1.5 Gênero: <i>Abuta</i>	22
1.2. Fitoquímica das Menispermáceas	22
1.2.1 Ocorrência de Alcalóides	30
1.3. Aspectos farmacológicos das menispermáceas	69
1.3.1 Atividade imunomoduladora	69
1.3.2 Inibição dos canais de cálcio e citotoxicidade.....	70
1.3.3 Ação antiinflamatória e antiespasmolítica	71
1.3.4 Atividade antidepressiva	71
1.3.5 Atividade antiinfeciosa	72

1.3.6 Atividade antidiabética	73
1.3.7 Atividade antitumoral	73
1.4 Aspectos botânicos, químicos e farmacológicos do gênero <i>Abuta</i>	74
1.5 Biogênese dos Alcalóides do gênero <i>Abuta</i>	78
2 OBJETIVOS	84
3 PARTE EXPERIMENTAL	85
3.1 Materiais	85
3.2 Estudo fitoquímico do cerne de <i>Abuta rufescens</i>	86
3.2.1 Coleta do material	86
3.2.2 Classificação taxonômica	86
3.2.3 Preparo da amostra	87
3.2.4 Obtenção dos extratos	87
3.3 Estudo cromatográfico	87
3.4 Ensaio Biológico	91
3.4.1 Teste de toxicidade frente a <i>Artemia franciscana</i>	91
3.4.2 Teste com <i>Aedes aegypti</i>	92
3.4.3 Teste de atividade antitumoral	92
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.1 Aspectos físicos e cromatográficos de 1V15a	94
4.2 Identificação de 1V15a	94
4.3 Análise do espectro de RMN ¹ H	95
4.4 Análise do espectro de IV	99

4.5 Análise do espectro de RMN ^{13}C	100
4.6 Análise do espectro de COSY	101
4.7 Avaliação dos testes biológicos	103
CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970)	33
Tabela 4.1. Comparação entre dados da literatura e valores obtidos de RMN ^1H	99
Tabela 4.2. Bioatividade do alcalóide	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Biogênese dos alcalóides	80
Figura 1.2: Biogênese dos alcalóides	81
Figura 1.3: Biogênese dos alcalóides	82
Figura 1.4: Biogênese dos alcalóides	83
Figura 3.1: Cromatoplaça das frações da coluna filtrante em alumina.....	88
Figura 3.2: Cromatoplaça das frações 1- 1V7F4DL 2- 1V7F4M; 3- 1V7F4D; 4- 1V11F4M	90
Figura 4.1: Sistema de numeração da homomoschatolina	95
Figura 4.2: Ação dos grupos vizinhos sobre o hidrogênio da posição 2	96
Figura 4.3: Sinais dos grupos metilas no espectro de RMN ^1H	96
Figura 4.4: Interações do hidrogênio 8 e 11e os grupos vizinhos	97
Figura 4.5: Região aromática ampliada RMN ^1H	98
Figura 4.6: Espectro de absorção em IV	100
Figura 4.7: Espectro de RMN ^{13}C	101
Figura 4.8: Ampliação da região aromática do Espectro COSY	102
Figura 4.9: Correlação entre os hidrogênios	102
Figura 4.10: Gráfico de citotoxicidade	103

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 Derivados benzilisoquinolínicos	79
Esquema 3.1 Preparação dos extratos	88
Esquema 3.2 tratamento da fração diclorometano-metanol 1:1	89
Esquema 3.3 Obtenção da amostra 1V15A	90

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto o homem. Plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Maciel, 2002).

O estudo dessas plantas contribui de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais e na descoberta de novas drogas, uma vez que constituem fontes de novos compostos bioativos (Moraes, 2003).

As espécies do gênero *Abuta* constituem boa fonte de pesquisa por serem ricas em alcalóides isoquinolínicos, que já são estudados por apresentarem atividade antimicrobiana, antitumoral e imunossupressora (Ivanovska, 1997). Com o objetivo de contribuir para o conhecimento da química e da bioatividade de uma das espécies deste gênero, foi realizado estudo fitoquímico do cerne da espécie *Abuta Rufescens*.

Segundo Cronquist(1981) classifica-se botanicamente conforme quadro:

REINO	Plantae
FILO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Ranunculales
FAMÍLIA	Menispermaceae
GÊNERO	Abuta
ESPÈCIE	Abuta rufescens

1.1.1 Filo: *Magnoliophyta* (angiospermas)

As angiospermas possuem frutos, suas sementes, ou óvulos, são protegidas e inclusas nos carpelos. Os óvulos guardam em seu interior o saco embrionário. Quando o carpelo atinge seu desenvolvimento, o óvulo fica encerrado em uma câmara fechada. Com isto surge uma formação especial do carpelo: O pistilo com o estigma, que é o órgão receptor do pólen.

A polinização pode ser efetuada pelo vento, por animais, ou até, em certos casos especiais, pela água. Os grãos de pólen germinam no estigma e produzem tubos polínicos. Estes, pelo seu crescimento, percorrem o pistilo até penetrarem no óvulo e alcançarem o saco embrionário, onde ocorre o desenvolvimento do embrião que pode ser monocotiledôneo e dicotiledôneo.

Seus órgãos sexuais acham-se reunidos como flores. As flores podem ser unissexuais (monoclinas) ou hermafroditas (diclinas). Comumente são hermafroditas e envoltas por um perigônio de folhas coloridas ou verdes. Os órgãos da flor são dispostos em verticilos em redor do eixo floral. Os verticilos dos órgãos florais são chamados de gineceu (localizado interiormente e formado pelos carpelos) e androceu (verticilo dos estames).

O gineceu ou ovário pode ser unicarpelar ou pluricarpelar. Se houver um óvulo em cada carpelo, chamar-se-á uniovulado; se houver vários, pluriovulado. Os ovários pluricarpelares podem ser apocarpos ou sincarpos. Os sincarpos estão divididos em uniloculares e pluriloculares.

Os frutos dividem-se em simples e compostos. Os frutos simples podem ser repartidos em duas classes, conforme a natureza da casca: secos e carnosos. A casca é denominada pericarpo, que é composto de duas ou três camadas, de constituições diferentes, denominadas epicarpo, mesocarpo e endocarpo, seguindo a seqüência de fora para dentro.

Em uma flor hermafrodita, segue ao gineceu o verticilo dos estames: o androceu. O número de estames em uma flor varia bastante, geralmente são formados por uma antera, presa na ponta de um filete, que corresponde ao pecíolo da folha.

As pétalas, onde o conjunto forma a corola, podem ser independentes entre si ou mais ou menos concrescidas. São tipicamente coloridas e mostram feitios os mais variados. A corola chamar-se-á regular, se todas as pétalas forem iguais; e irregular se forem diferentes. As corolas apresentam-se sob formas muito diferentes.

As sépalas constituem o verticilo exterior denominado cálice. Observam-se agrupamentos florais que constituem as inflorescências. Estas se distinguem das ramificações vegetativas pela posição densa de seus ramos floríferos. As inflorescências podem ser classificadas em racemosas ou indefinidas, e em cimosas ou definidas. Para a descrição da infrutescência, usam-se os mesmos termos.

O pólen possui duas membranas. A interior apresenta pequenos poros, cujo número e posição variam nas diferentes espécies e famílias. Estes poros chamam-se poros de germinação, porque saem por ele os tubos polínicos. A forma exterior do pólen é redonda e tetraédrica.

As folhas apresentam uma grande variedade de formas, originando um grande número de termos que se referem, basicamente, à forma do limbo das folhas. As folhas podem ser simples ou compostas. As folhas compostas são formadas por várias folhas menores denominadas folíolos, que também apresentam uma grande variedade de formas.

Sob o critério de disposição das folhas sobre o caule, distribui-se em três grupos: alternas, opostas e verticiladas. Em relação ao tronco, as angiospermas apresentam todos os tipos assim como árvores, arbustos, ervas, etc.

1.1.2 Classe: *Magnoliopsida* (dicotiledôneas)

São vegetais de todos os tipos, caracterizados pela existência de duas folhas germinais (cotilédones) nas sementes. Há ervas, arbustos e árvores. Os caules são, em regra, cilíndricos e ramificados. No centro fica a medula, tecido formado por células parenquimáticas, freqüentemente com conteúdo morto. Em redor da medula encontra-se o parênquima lignificado e neste os vasos lenhosos, que se distinguem do parênquima por seu diâmetro maior. O conjunto de medula, parênquima lignificado e lenho chama-se corpo central.

O corpo central é limitado por um meristema secundário em forma de cilindro, denominado câmbio. O câmbio efetua o crescimento do tronco, em espessura. A casca é constituída pelo

parênquima e o líber dos feixes líbero-lenhosos e outros tecidos. Seu aumento de volume ocorre pelo cilindro cambial. É revestido por epiderme, produzidas por um meristema secundário chamado felogênio.

Os caules e os ramos podem ser redondos, quadrangulares ou de circunferência irregular. As raízes são axiais e seu crescimento em espessura, deve-se a existência do câmbio. As folhas geralmente são articuladas em lâmina, pecíolo e estípulas. O limbo mostra inervação penínérvea, palminérvea ou peltinérvea. A maioria das flores pertence aos tipos pentâmero, tetrâmero e dímero. O perigônio é formado por dois verticilos diferenciados em corola e cálice.

1.1.3 Ordem: *Ranunculales*

Compreende ervas, arbustos e árvores. As flores mostram sinais de primitividade, tipicamente espiraladas (com ângulo de divergência dos membros florais igual ao das folhas vegetativas) com um número inconstante e grande de membros em cada órgão. Seguem famílias com maior constância depois do androceu e do gineceu, reduzindo o número de carpelos a um só. As famílias mais desenvolvidas mostram flores completamente cíclicas, pelo menos no androceu e gineceu. A simetria é de preferência radial, poucas vezes bilateral.

1.1.4 Família: *Menispermaceae*

São plantas lenhosas, geralmente escandecentes, poucas vezes arbustos eretos, comumente apresentam-se como cipós, raramente na forma de ervas ou árvores. Normalmente são trepadeiras que se enroscam ao tronco.

As folhas são alternantes, estão em espiral normalmente com brotos axilares consecutivos, são inteiras ou lobadas, sempre palminérveas. Pecíolo normalmente simples e raramente composto. Nas raízes há substâncias amargas. Os frutos e sementes são narcóticos, muitas vezes venenosos. São ricos em alcalóides.

As flores, pequenas, são em regra unissexuais. São cíclicas, actnomorfas, trímeras ou dímeras de perigônio simples ou diferenciado em corola e cálice. Frequentemente há mais de um verticilo de sépalas e pétalas. Geralmente há dois verticilos de sépalas, dois de pétalas, dois de estames de três ou muitos carpelos livres com um ou dois óvulos pendentes da sutura ventral.

O caule apresenta casca superficial, nós trilacunares, floema interno ausente, com feixes periféricos anormalmente largos e concêntricos. Apresenta xilema com recipientes simples, parênquima apotraqueal, ou seja, difuso e em pequenas linhas tangenciais com tecido conjuntivo entre as sucessivas camadas. Fruto tipo drupa com inflorescência racemosa ou panicular.

1.1.5 Gênero: *Abuta*

Também chamada de BUTUA, as espécies desse gênero são todas arbustos trepadores de caule lenhoso e irregular, com feixes fibro-vasculares dispostos em círculos concêntricos. Folhas, em geral, orbiculares e coriáceas. A espécie *A. rufescens* é descrita como uma planta de cipós lenhosos com caule de estrutura anômala; Apresenta folhas alternas e pecioladas. Flores masculinas e femininas em inflorescência paniculiformes multiflora e racemosa respectivamente. Ambas apresentam seis sépalas e apétalas. Fruto tipo drupa com contorno oblongo.

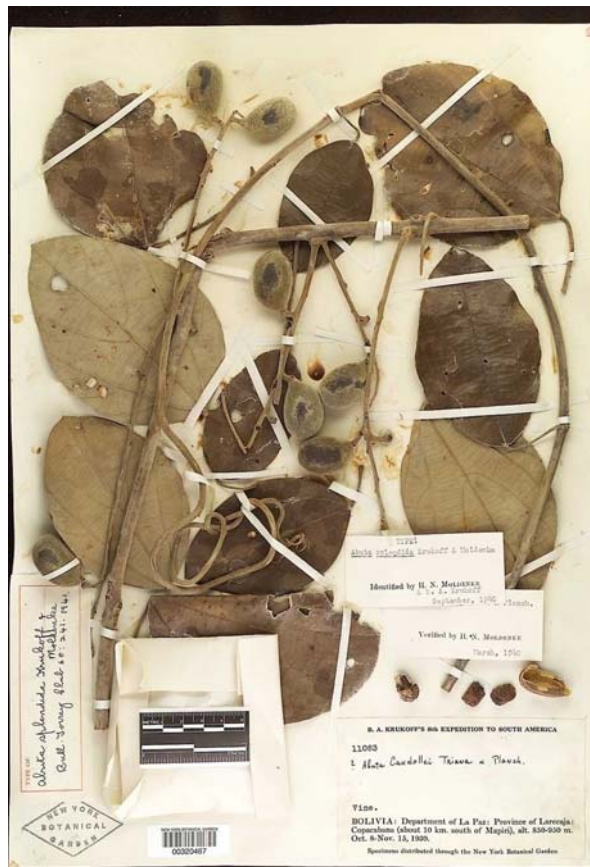


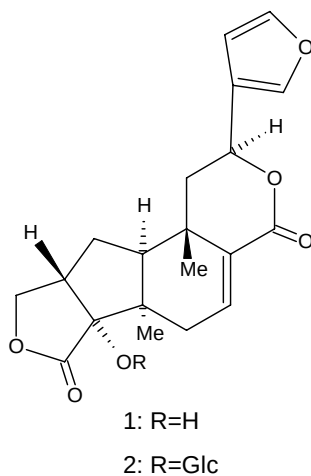
Figura 1.3: Exsicata de *Abuta splendida*

1.2 Fitoquímica das Menispermáceas

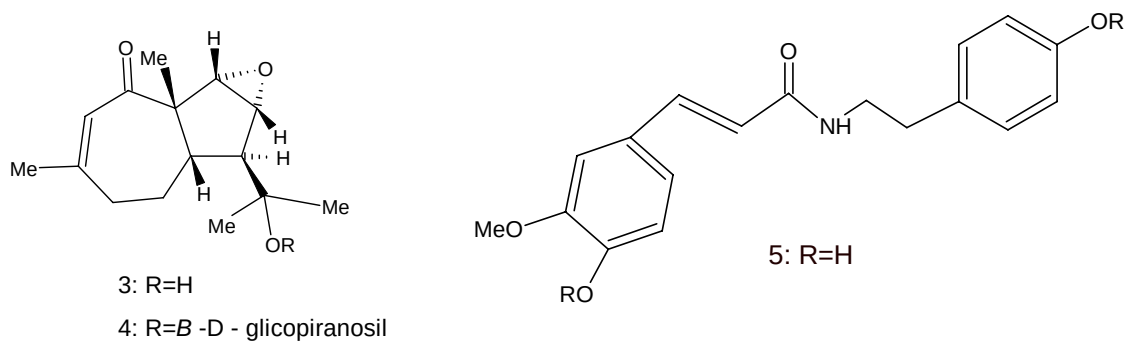
As espécies pertencentes à família Menispermaceae são caracterizadas pela freqüente ocorrência de alcalóides seguida de alguns outros grupos químicos com atividade farmacológica. Estudos recentes mostram a variedade química nesta família que pode estar associada a alguma atividade terapêutica.

O gênero *Tinospora* é largamente empregado como planta medicinal na Ásia e África. A espécie *T. baenzigeri* é usada como antitérmico e antimalárico na Tailândia. Estudos das folhas e

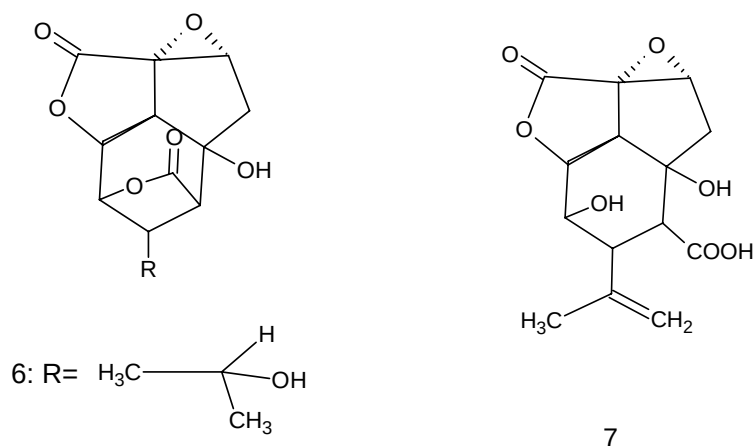
casca deste gênero revelaram a presença de diterpenos clerodano, flavonóides, esteróides, lignanas e alcalóides. Investigações químicas revelaram a presença de dois novos derivados diterpeno: Baenzigerida A [1] e baenzigerosideo A [2] (Tuntiwachwuttikul *et al.*, 1999).



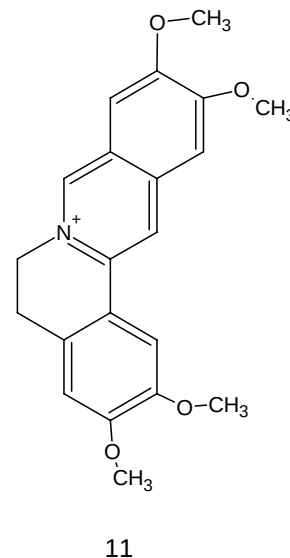
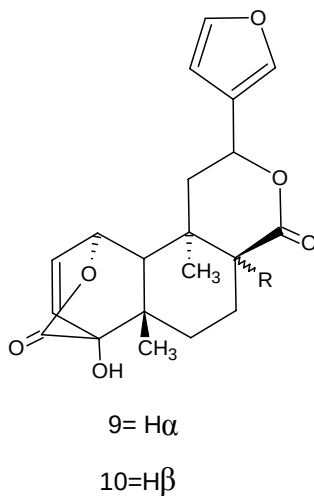
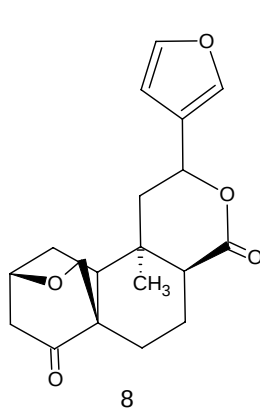
O sesquiterpeno Tinocordifolina [3] foi isolado da espécie *Tinospora cordifolia* junto com o tinocordilfoliosideo [4], N-trans-feruloil tiramina [5] e ácido 4-hidro3-metoxi benzóico. Esta planta é utilizada na Índia para o tratamento de doenças de pele, diabetes e anemia (Maurya e Handa, 1997).



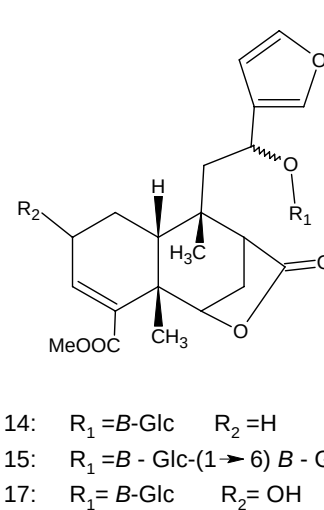
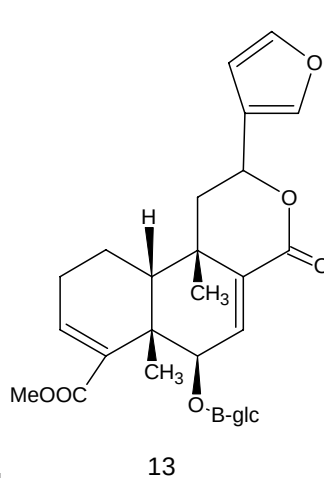
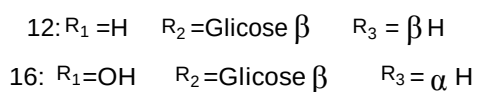
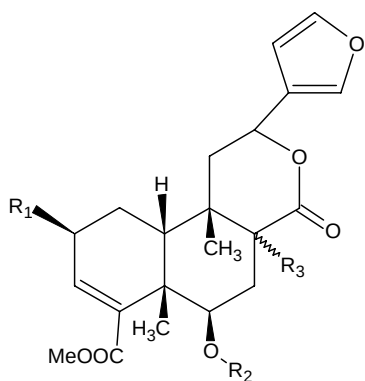
A espécie *Anamirta cocculus*, tem prevalência geográfica no sudeste da Ásia e Índia. Sua baga é utilizada como veneno para corvos, sendo necessária apenas uma pequena quantidade para este fim. É muito tóxica e letal para humanos. O princípio ativo tóxico é uma mistura de sesquiterpenos denominada picrotoxina. Desta espécie foram isoladas duas novas lactonas sesquiterpênicas do grupo picrotoxano: dihidroxipicrotoxina [6] e o ácido picrotóxico [7]. (Agarwal *et al.* 1999).



O diterpenóide penianquerina [8] foi obtido a partir do extrato diclorometano: metanol (1:1) da casca de *Penianthus zenkeri*. No mesmo extrato, isolou-se a columbina [9], isocolumbina [10] e a pseudopalmatina [11], após fracionamento em coluna cromatográfica de sílica. Esta espécie é muito comum no centro-oeste africano, sendo utilizada para tratar constipação, dores estomacais e, o decoto da raiz amarga, como vermífugo (Tane *et al.*, 1997).

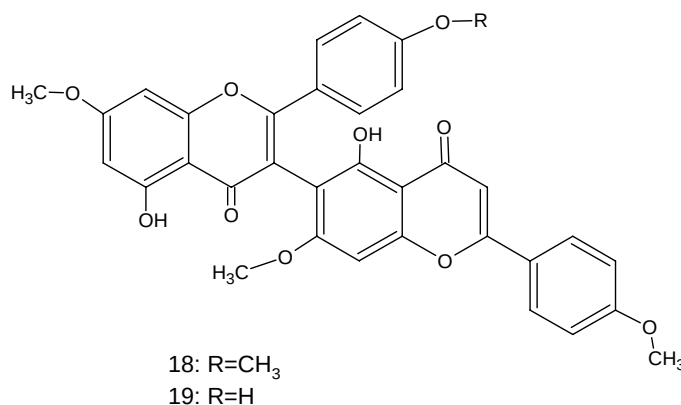


Seis compostos glicosídeo-furanoditerpênicos foram obtidos, por coluna cromatográfica de fase reversa, a partir da fração butanólica do extrato metanólico da casca de *T. rumphii*, particionado sucessivamente com éter, 1-butanol e água: Borapentosídeo C [12] e F [13]; Borapentosídeo D [14] e E [15]; Borapentosídeo B [16] e Runfiosída I [17] (Martin *et al.*, 1996).

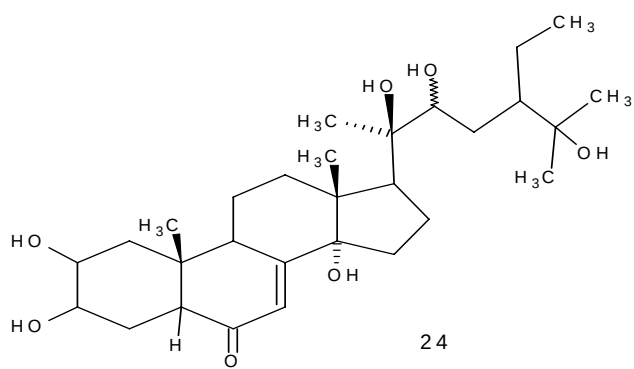
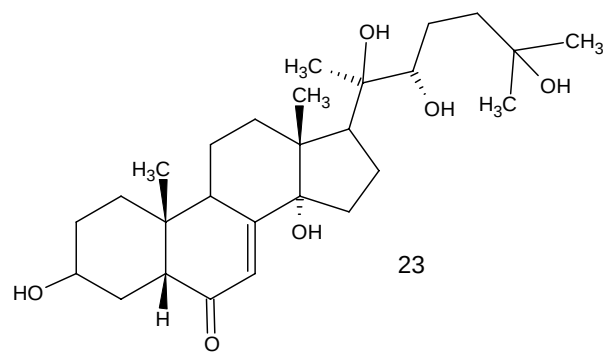
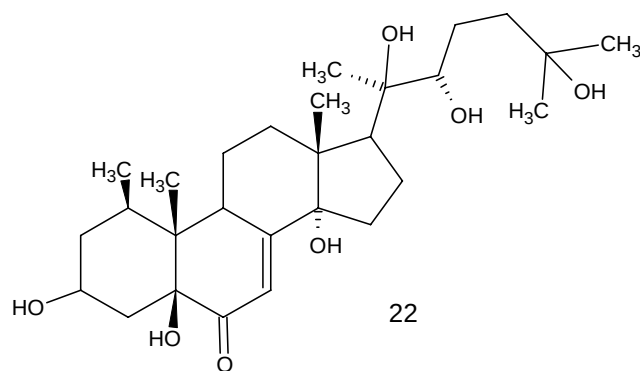
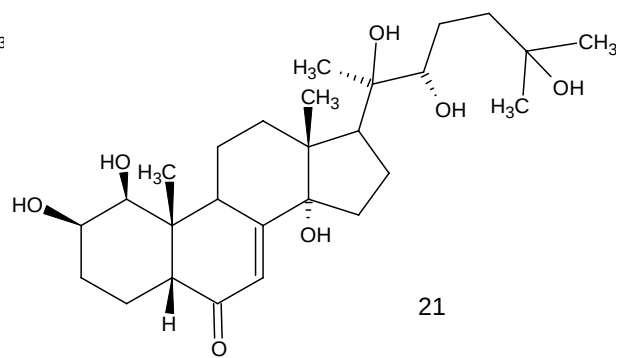
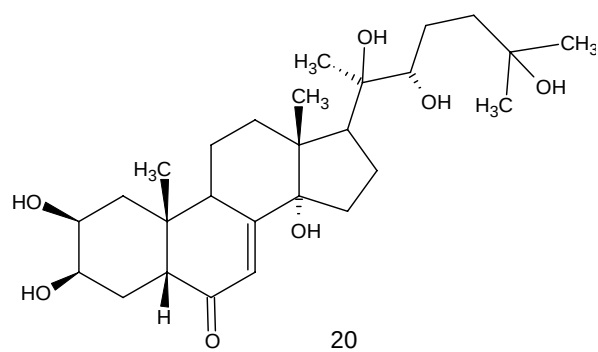


Os compostos 3 e 4 foram hidrolisados com uma enzima denominada asparaginase, produzindo uma aglicona com um anel α -lactona localizado entre C-6 e C-8. Os borapentosídeos E e D tem a lactona localizada entre os carbonos C-4 e C-6. Essa nova conformação foi estabelecida por experimentos em HMBC que mostram significativa correlação entre os sinais de H-6 e C-17, e entre os sinais de H-8 e C-17 da aglicona.

Dois novos biflavonoídes foram isolados a partir do extrato etanólico da parte aérea de *Stephania tetrandra*. Foi a primeira vez que identificaram biflanóides em Menispermáceas. Foram denominados de estefaflavona A [18] e B [19]. Dados de RMN e IR indicam que os dois compostos possuem o mesmo sistema flavonoídico. (D. Si *et al.*, 2001).

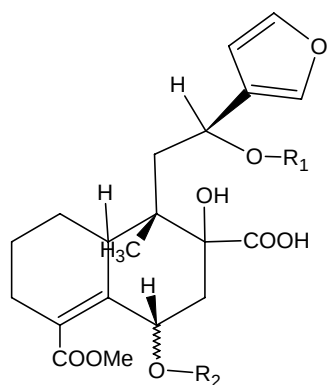


As folhas de *Diploclisia glaucescens* são utilizadas para o tratamento de doenças biliares e venéreas na Índia e Sri Lanka. Cinco ecdiesteróides foram isolados do fruto desta planta: 20-hidroxiecdisona [20], que também está presente na folha; 3-deoxi-1 β ,20-dihidroxiecdisona [21], presente no caule e folhas; 2-deoxi-5 β ,20-dihidroxiecdisona [22]; 1,2,2-deoxi-20-hidroxiecdisona [23]; makisterona C [24]. Os dois últimos foram descritos pela primeira vez nesta família (L. Jayasinghe *et al.*, 2003).

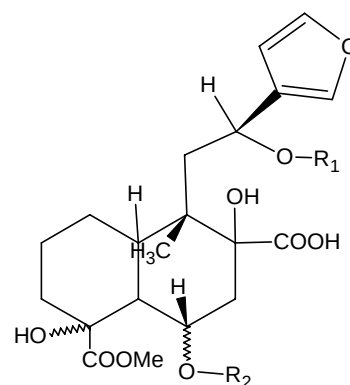


Uma chalconoflavona dímera foi isolada do extrato cetônico de *Cissampelos pareira*. Esse extrato apresentou boa atividade antiprotozoária, e testes farmacológicos mostraram que a substância isolada é ativa contra *Trypanosoma cruzi* (forma intracelular) e *T. brucei rhodesiense* (forma extracelular), (I. Ramíres *et al*, 2003).

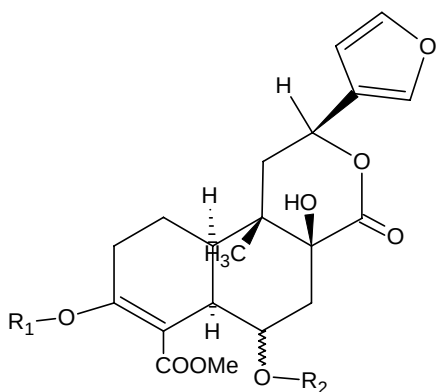
De *Tinospora cordifolia*, outros quatro novos glicosídeos furanoditerpênicos foram extraídos: Anritosídeo A [25], B [26], C [27] e D [28] (Maurya *et al*, 2004).



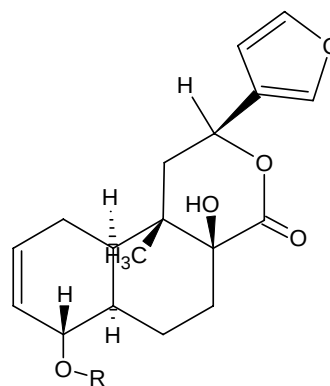
25: $R_1=H$ $R_2= \beta$ -D-glicopiranosil, Anritosídeo A



26: $R_1= H$ $R_2=$ glicopiranosil, Anritosídeo B



27: $R_1=H$ $R_2= \beta$ -D-glicopiranosil, Anritosídeo C

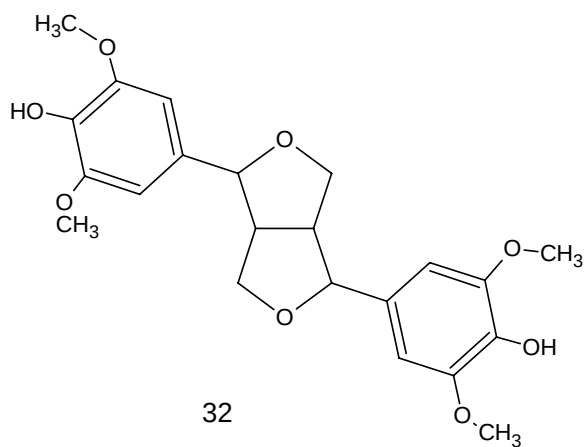
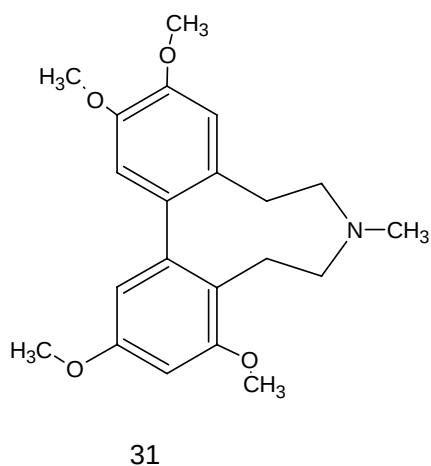
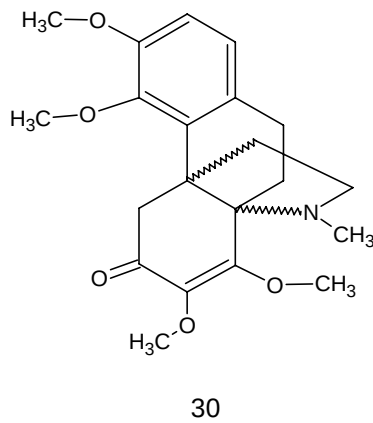
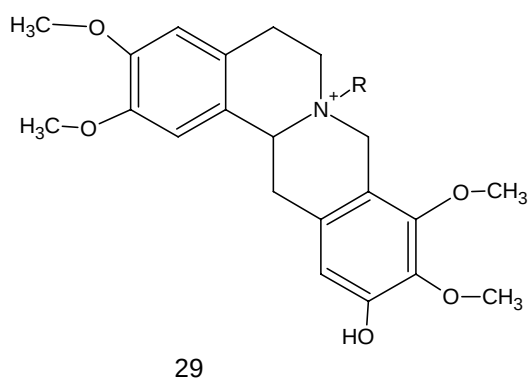


28: $R= \beta$ -D- glicopiranosil, Anritosídeo D

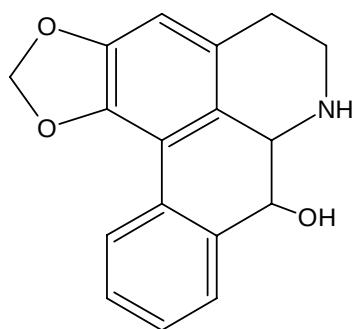
1.2.1 Ocorrência de Alcalóides:

Possuem grande importância farmacológica por serem capazes de produzir poderosos efeitos fisiológicos. São, na maior parte dos casos, venenos muito ativos, dotados de uma ação específica. Constituem um vasto grupo de metabolitos secundários com grande diversidade estrutural, dessa forma, tornaram-se constantes objetos de estudo. Podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, contudo acumulam-se preferencialmente em tecidos com crescimento ativo, célula epidérmica e hipodérmica, bainhas vasculares e vasos lactíferos. O local de estoque geralmente é diferente do local de síntese, ou seja, podem ser sintetizados na raiz e migrarem para as folhas onde ficariam estocados sob a forma de sais de ácidos orgânicos solubilizados no suco celular. A grande maioria dos alcalóides encontrados nas menispermáceas e famílias vizinhas é do tipo isoquinolínico e muitas revisões foram publicadas para discutir a química desse grupo.

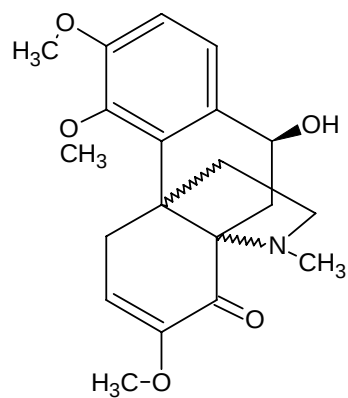
Observa-se que a estefaratina, uma 1-benzilisoquinolina, é um composto pentaoxygenado [29]. A hasubanonina [30] e a protostefanina [31] podem ter sido originados de um anel isoquinolínico trioxigenado. Além da estefaratina, o outro composto com o mesmo nível de oxigenação, encontrado nas menispermáceas é o sirigaresinol [32], isolado de *Sinomenium acutum* (Thornber, 1970).



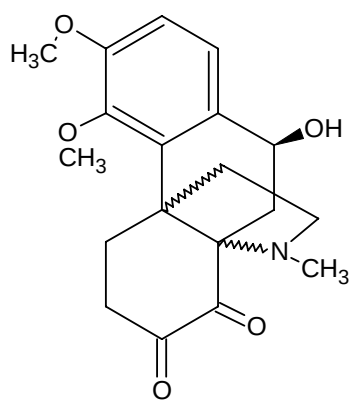
Michelalbina [33] mostra oxidação na posição benzilíca, assim como a prometafanina [34] e metafanina [35]. Uma característica interessante entre os alcalóides aporfínicos [36] é que uma ligação metileno-dioxi na posição 1,2 nunca ocorre junto com uma substituição no carbono 11, embora exemplos desse tipo tenham sido observados em outras plantas. Os alcalóides derivados da morfina, como a sinomenina [37], das menispermáceas tem configuração oposta aos da família Papaveraceae (Thornber, 1970).



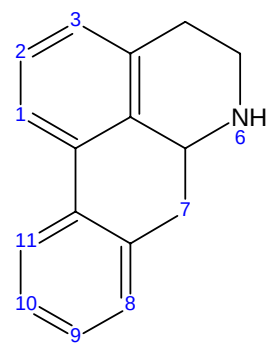
33



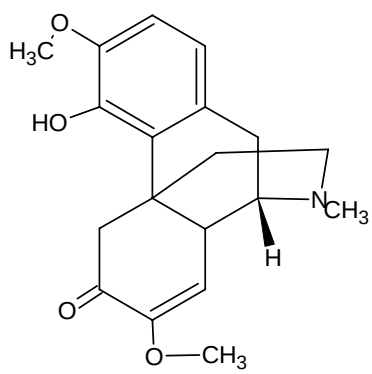
34



35

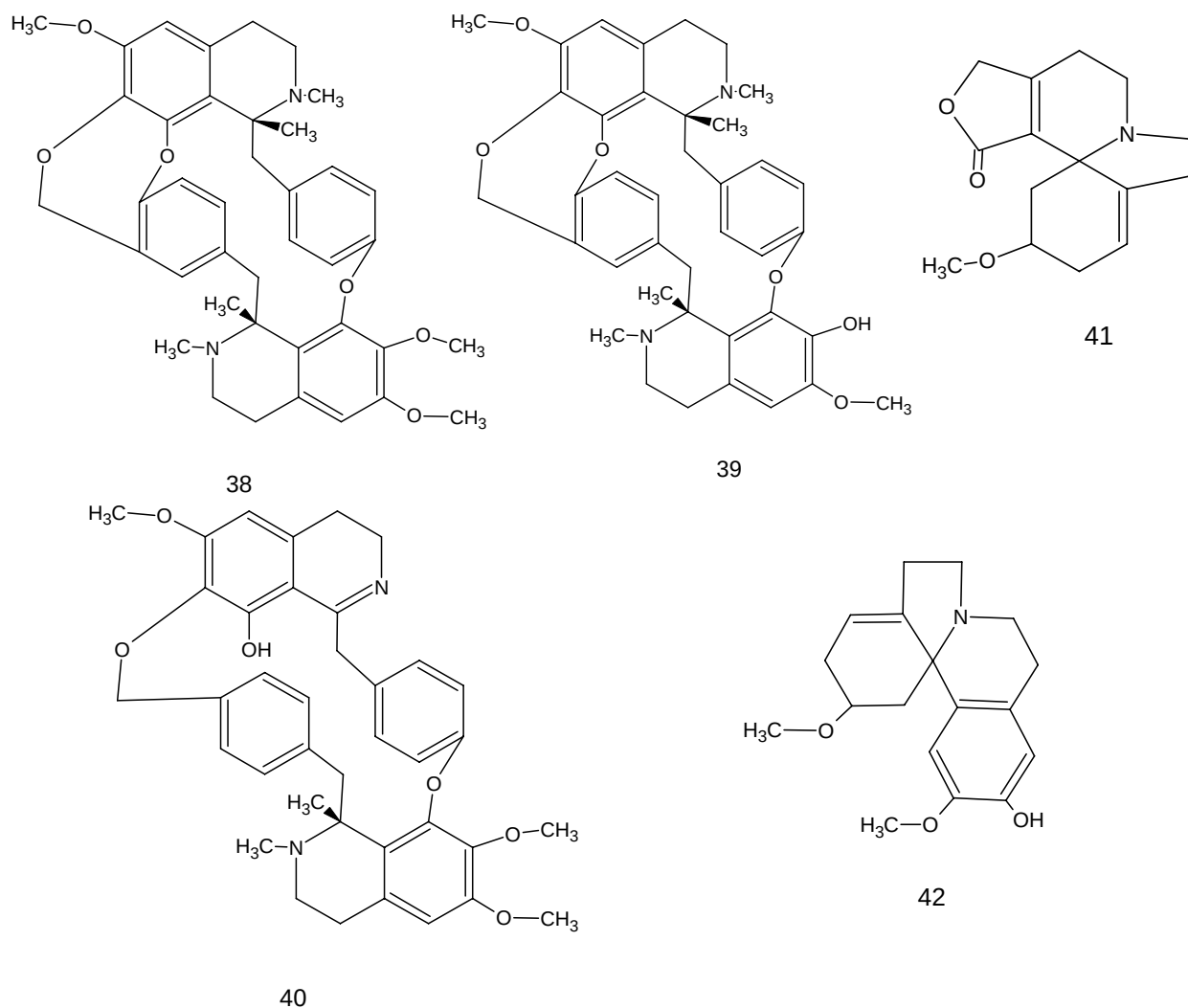


36



37

Entre as bisbenzilisquinolinas, nota-se estruturas atípicas como a insularina [38], insulanolina [39] e cissampareína [40]. A estrutura da cocculolidina [41] é um alcalóide que possui uma γ -lactona e, junto com a di-hidroerisodina [42], é o raro exemplo de um esqueleto eritrina fora do gênero *Erythrina* (Leguminosae). (Thornber, 1970).



A ocorrência dos vários alcalóides na família Menispermaceae é mostrada na tabela 1.1

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

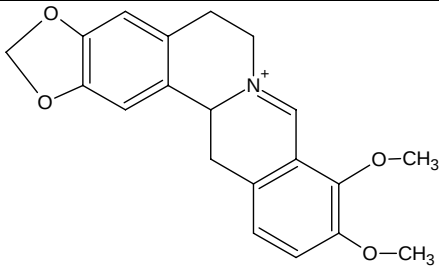
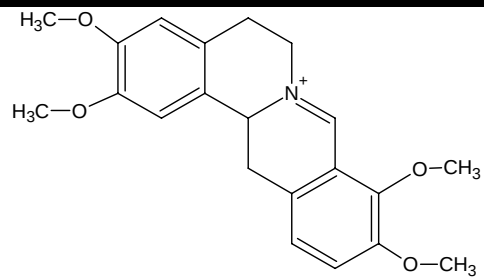
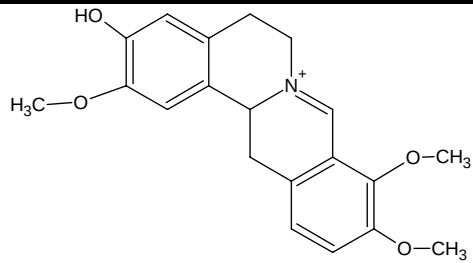
Substância	Estrutura	Espécie
Berberina		<i>Archangelisia flava</i>
		<i>Archangelisia lemniscata</i>
		<i>Coscinium blumeum</i>
		<i>Coscinium fenestratum</i>
		<i>Tinospora crispa</i>
		<i>Tinospora rumphii</i>
Palmatina		<i>Archangelisia flava</i>
		<i>Burasaia madgascariensis</i>
		<i>Cocculus leaeba</i>
		<i>Coscinium blumeum</i>
		<i>Fibraurea chloroleuca</i>
		<i>Parabaena hirsuta</i>
		<i>Stephania glabra</i>
		<i>Tinospora bakis</i>
Columbamina		<i>Jatrorrhiza palmata</i>
		<i>Archangelisia flava</i>
		<i>Burasaia madgascariensis</i>
		<i>Stephania glabra</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

Substância	Estrutura	Espécie
Jatrorrhizina		<i>Archangelisia flava</i>
		<i>Burasaia madagascariensis</i>
		<i>Coscinium blumeum</i>
		<i>Fibraurea chloroleuca</i>
		<i>Jatrorrhiza palmata</i>
		<i>Stephania glabra</i>
d-isocondodendrina		<i>Chondodendron candicans</i>
		<i>Chondodendron limaciifolium</i>
		<i>Chondodendron microphyllum</i>
		<i>Chondodendron tomentosum</i>
		<i>Chondodendron platyphyllum</i>
		<i>Cissampelos insularis</i>
		<i>Cissampelos pareira</i>
		<i>Cissampelos ochiaiana</i>
		<i>Cissampelos mucronata</i>
		<i>Cyclea peltata</i>
		<i>Epinetrum cardifolium</i>
		<i>Epinetrum manganati</i>
		<i>Pleogyne australis</i>
		<i>Stephania hernandifolia</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

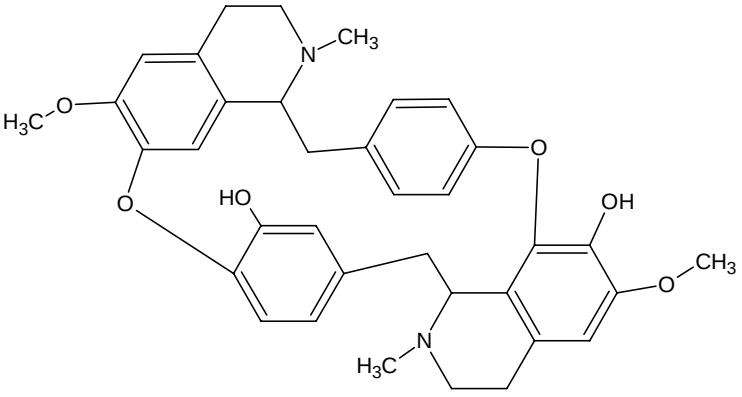
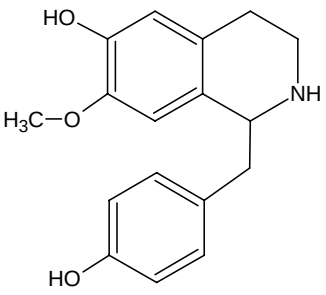
Substância	Estrutura	Espécie
d-bebeerina ou curina		<i>Chondodendron candicans</i> <i>Chondodendron microphyllum</i> <i>Chondodendron platyphyllum</i> <i>Tinospora bakis</i>
l-isococlaurina		<i>Chondodendron platyphyllum</i> <i>Chondodendron microphyllum</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

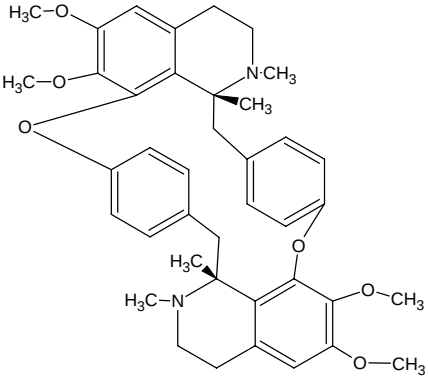
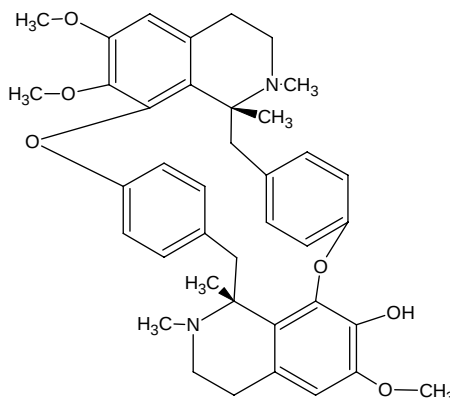
Substância	Estrutura	Espécie
Cicleanina		<i>Chondodendron tomentosum</i> <i>Cissampelos insularis</i> <i>Cissampelos ochiaiana</i> <i>Epinetrum cardifolium</i> <i>Epinetrum manganati</i> <i>Stephania capitata</i> <i>Stephania cepharantha</i> <i>Stephania glabra</i>
Norcicleanina		<i>Chondodendron tomentosum</i> <i>Cissampelos insularis</i> <i>Epinetrum cardifolium</i> <i>Epinetrum manganati</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

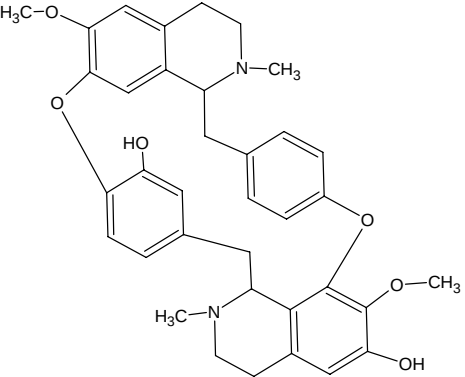
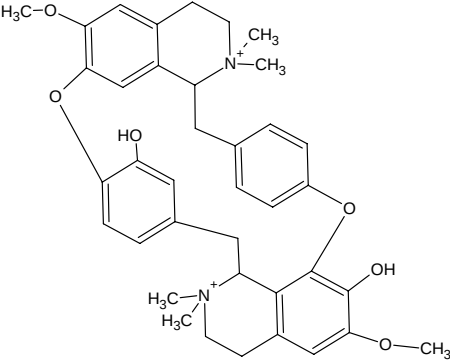
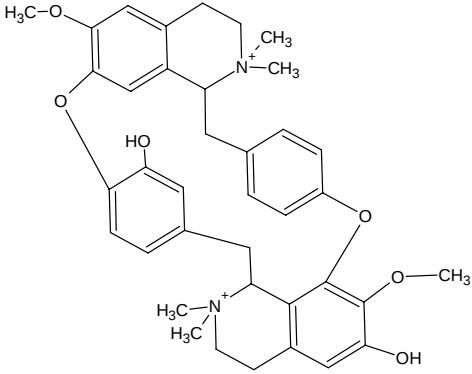
Substância	Estrutura	Espécie
d-condocurina		<i>Chondodendron tomentosum</i>
d,1-tubocurarina		<i>Chondodendron tomentosum</i>
d-condocuranina		<i>Chondodendron tomentosum</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

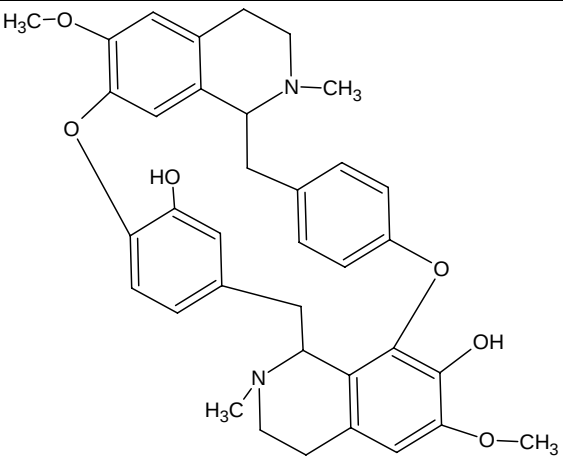
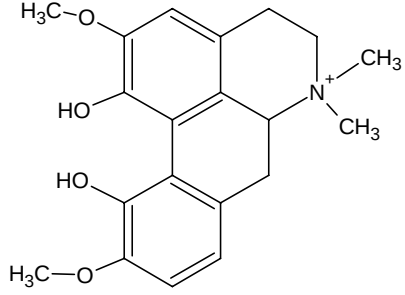
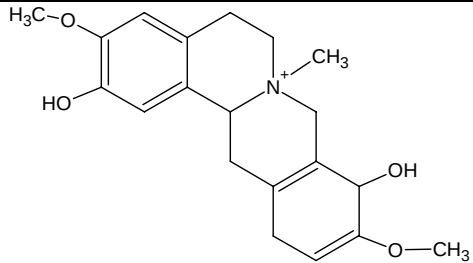
Substância	Estrutura	Espécie
L-curina		<i>Chondodendron tomentosum</i> <i>Cissampelos pareira</i> <i>Cissampelos ochiaiana</i> <i>Pleogyne australis</i>
Magnoflorina		<i>Cissampelos insularis</i> <i>Cocculus laurifolius</i> <i>Cocculus trilobus</i> <i>Sinomenium actutum</i> <i>Stephania glabra</i>
Ciclanolina		<i>Cissampelos insularis</i> <i>Cissampelos pareira</i> <i>Stephania japonica</i> <i>Stephania tetrandra</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

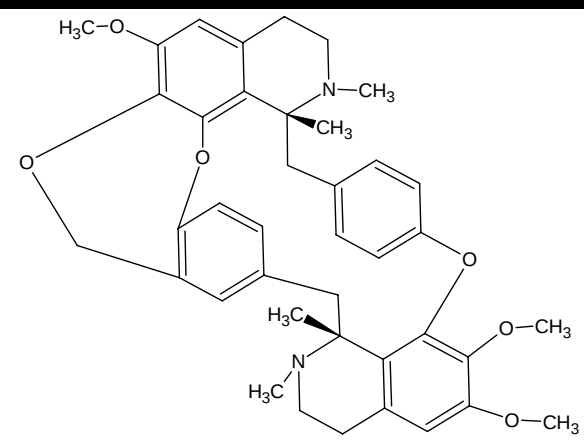
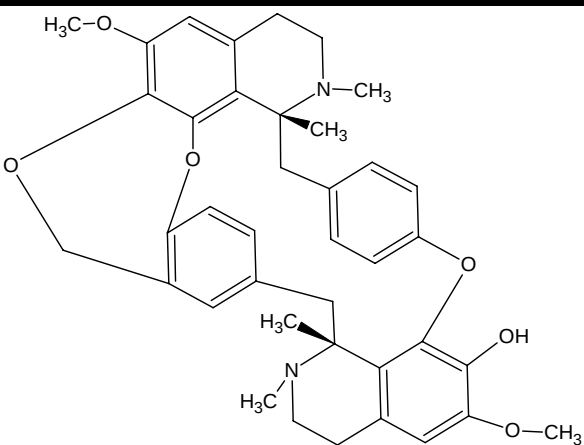
Substância	Estrutura	Espécie
Insularina		<i>Cissampelos insularis</i> <i>Cissampelos ochiaiana</i> <i>Stephania japonica</i>
Insulanolina		<i>Cissampelos insularis</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

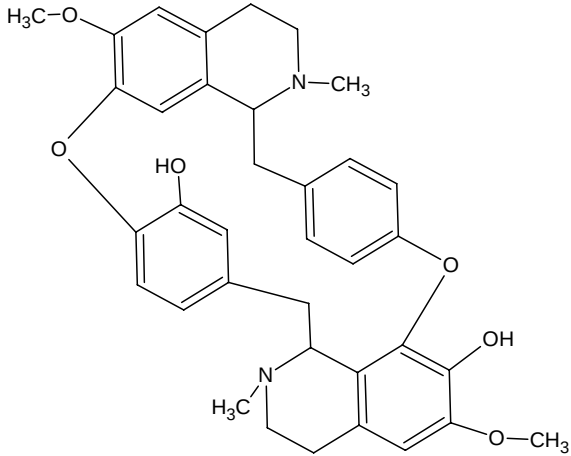
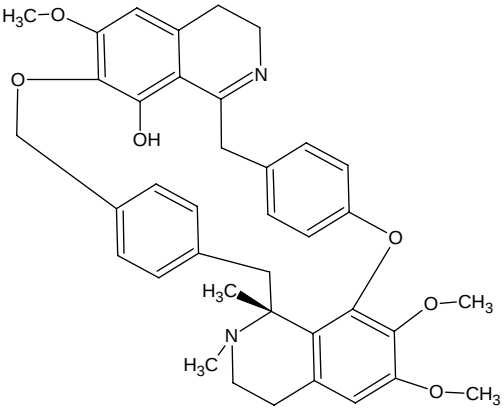
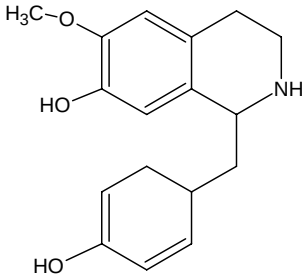
Substância	Estrutura	Espécie
d,l-curina		<i>Cissampelos pareira</i>
Cissampareina		<i>Cissampelos pareira</i>
d,l-coclaurina		<i>Cocculus hirsutus</i> <i>Cocculus laurifolius</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

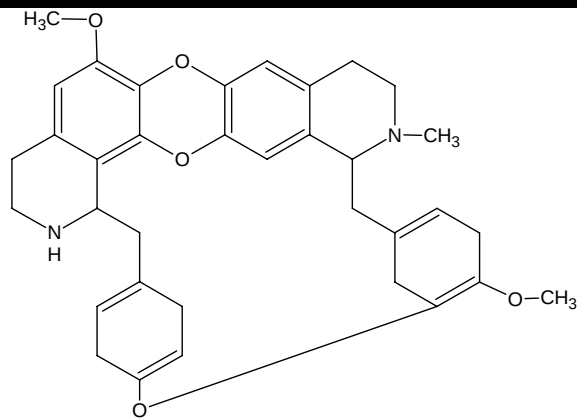
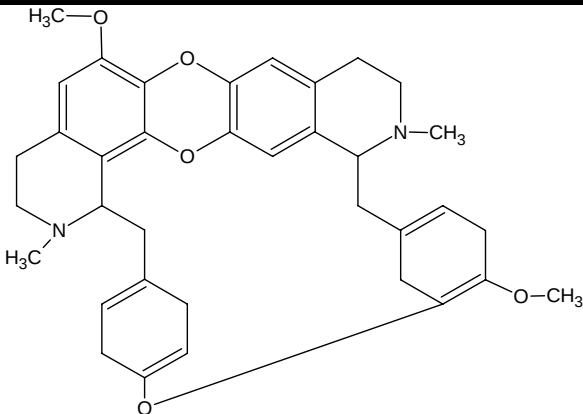
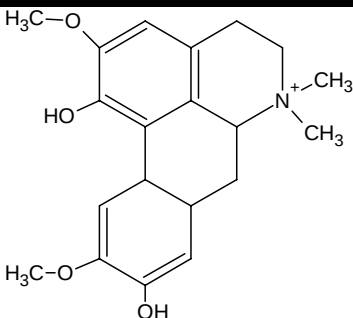
Substância	Estrutura	Espécie
trilobina		<i>Cocculus hirsutus</i> <i>Cocculus laurifolius</i> <i>Cocculus sarmentosus</i> <i>Cocculus trilobus</i>
Isotrilobina		<i>Cocculus sarmentosus</i> <i>Cocculus trilobus</i> <i>Stephania hernandifolia</i>
Laurifolina		<i>Cocculus laurifolius</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

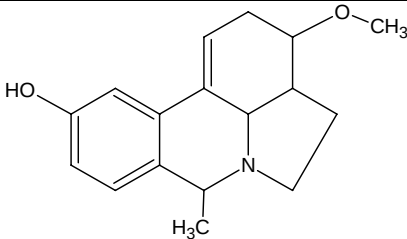
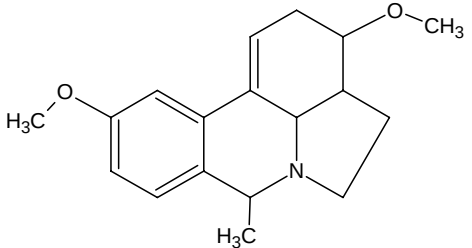
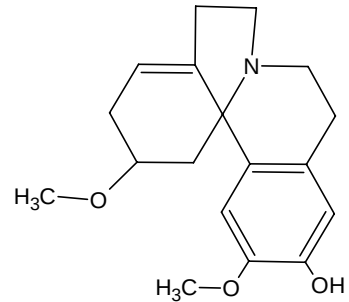
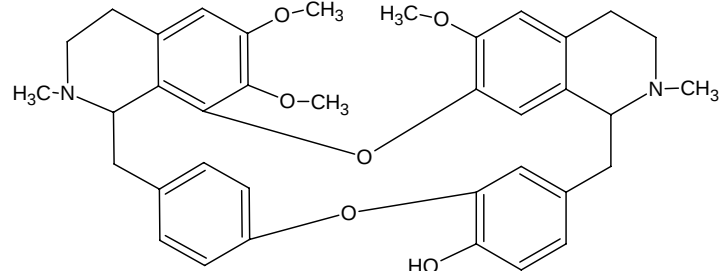
Substância	Estrutura	Espécie
Cocculina		<i>Cocculus laurifolius</i>
Cocculidina		<i>Cocculus laurifolius</i>
Dihidroerisodina		<i>Cocculus laurifolius</i>
Oxicantina		<i>Cocculus leaeba</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

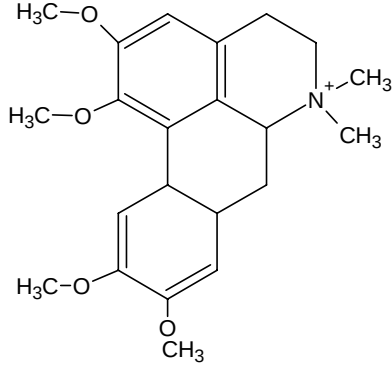
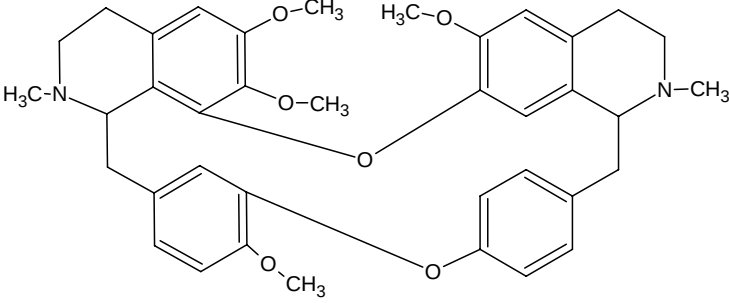
Substância	Estrutura	Espécie
Cocsarmina		<i>Cocculus sarmentosus</i>
Tetrandrina (L,L) Isotetrandrina (D,L) Faeantina (D,D)		<i>Cocculus sarmentosus</i> <i>Cyclea burmanii</i> <i>Cyclea peltata</i> <i>Menispermum canadense</i> <i>Menispermum dauricum</i> <i>Stephania hernandifolia</i> <i>Stephania tetrandra</i> <i>Cyclea barbata</i> <i>Pycnarrhena manillensis</i> <i>Stephania cepharantha</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

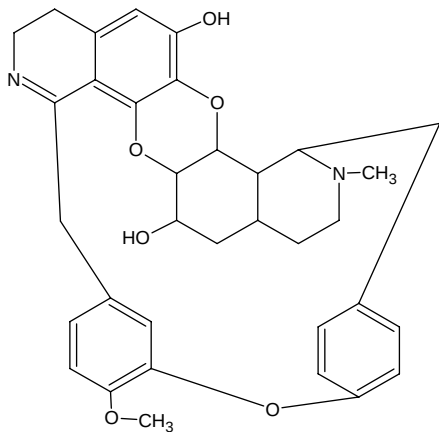
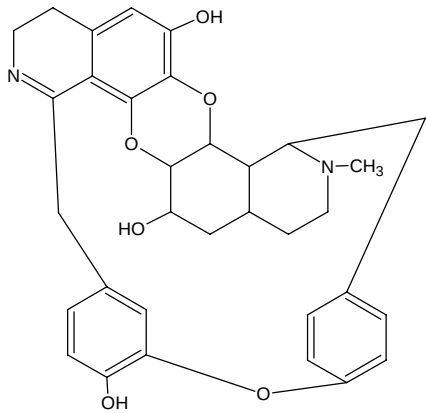
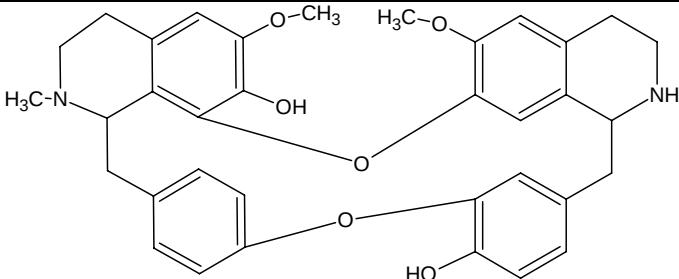
Substância	Estrutura	Espécie
Menisarina		<i>Cocculus sarmentosus</i>
Normenisarina		<i>Cocculus trilobus</i>
Trilobamina		<i>Cocculus trilobus</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

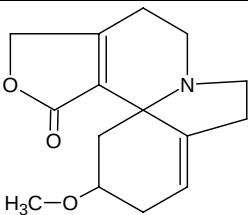
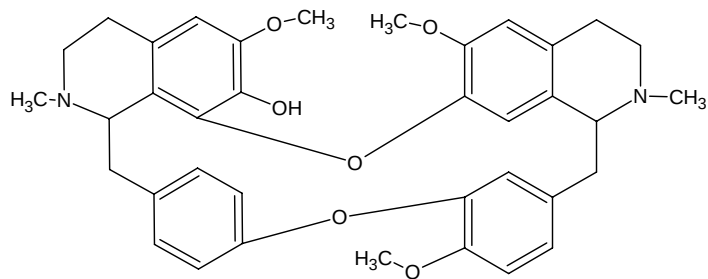
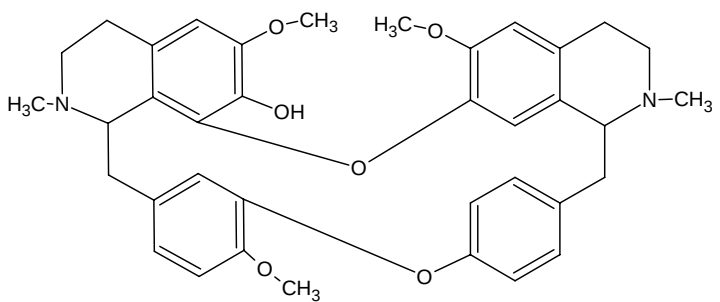
Substância	Estrutura	Espécie
Cocculolidina		<i>Cocculus trilobus</i>
Homoaromolina (L,D) Limaquina (D,D)		<i>Cyclea barbata</i> <i>Stephania cepharantha</i> <i>Limacia oblongata</i> <i>Limacia cuspidata</i>
Fangchinolina (L,L) Limaquina (D,D)		<i>Cyclea peltata</i> <i>Limacia cuspidata</i> <i>Limacia oblongata</i> <i>Stephania</i> <i>hernandifolia</i> <i>Stephania tetrandra</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

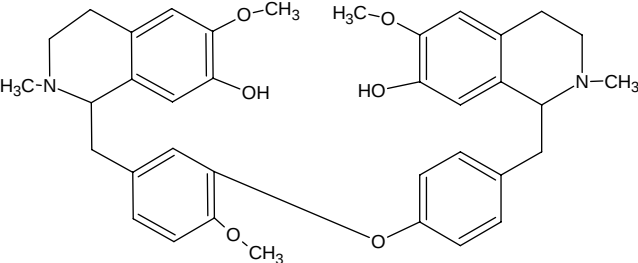
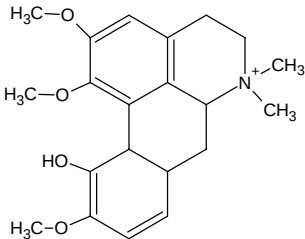
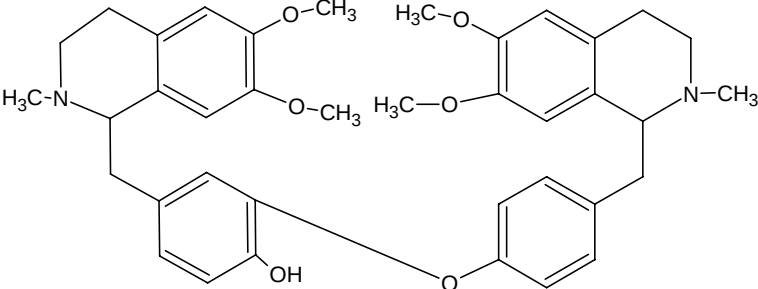
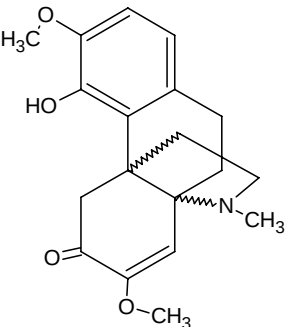
Substância	Estrutura	Espécie
Cuspidalina		<i>Limacia cuspidata</i> <i>Limacia oblongata</i>
Menisperina		<i>Legnephora moorei</i> <i>Menispermum dauricum</i>
Dauricina		<i>Menispermum canadense</i> <i>Menispermum dauricum</i>
sinomenina		<i>Menispermum dauricum</i> <i>Sinomenium actutum</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

Substância	Estrutura	Espécie
Acutumina		<i>Menispermum dauricum</i> <i>Sinomenium actutum</i>
Acutumidina		<i>Menispermum dauricum</i> <i>Sinomenium actutum</i>
Daurinolina		<i>Menispermum dauricum</i>
Estefarina		<i>Pericampylus formosanus</i> <i>Sinomenium actutum</i> <i>Stephania japonica</i> <i>Stephania glabra</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

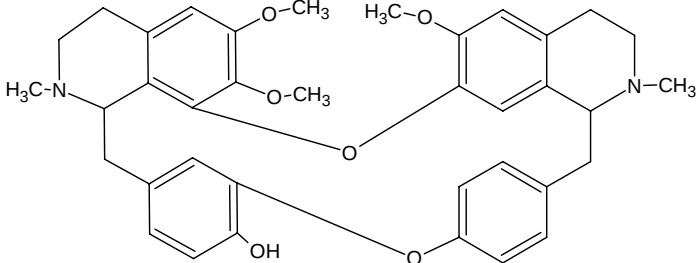
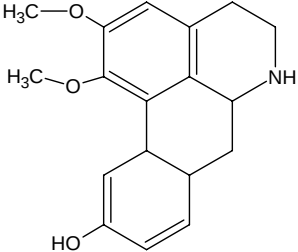
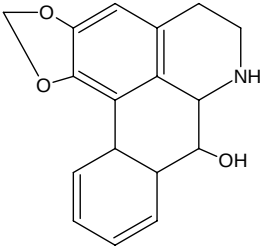
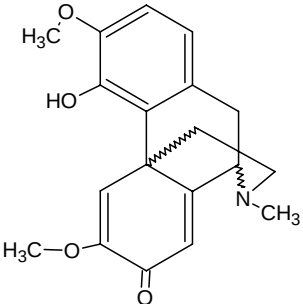
Substância	Estrutura	Espécie
Picnamina (D,D) Berbamina (D,L)		<i>Pycnarrhena manillensis</i> <i>Stephania cepharantha</i>
Tuduranina		<i>Sinomenium actutum</i> <i>Stephania glabra</i>
Michelalbina		<i>Sinomenium actutum</i>
Norsinoacutina		<i>Sinomenium actutum</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

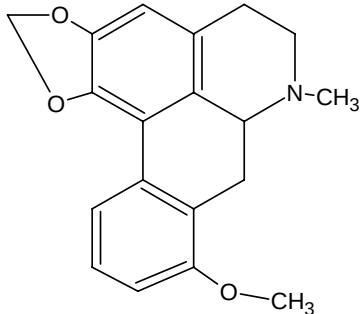
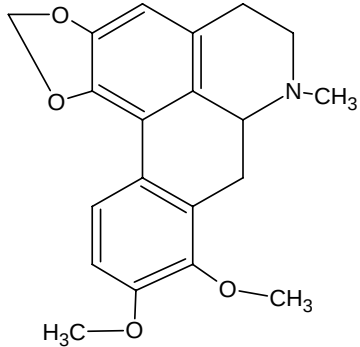
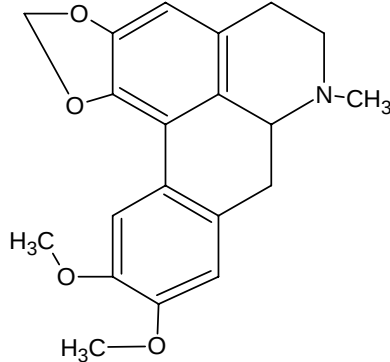
Substância	Estrutura	Espécie
Estefanina		<i>Stephania capitata</i> <i>Stephania japonica</i>
Crebanina		<i>Stephania capitata</i> <i>Stephania sasakii</i>
Dicentrina		<i>Stephania capitata</i> <i>Stephania dinklagei</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

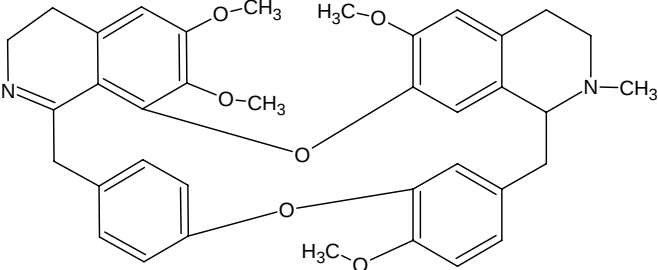
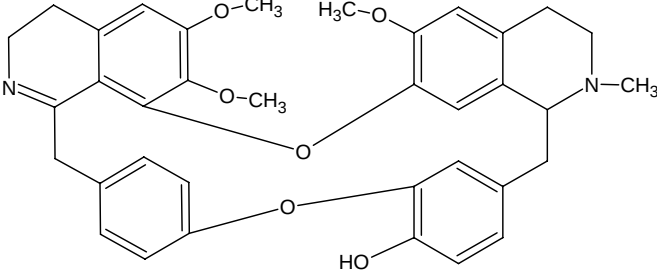
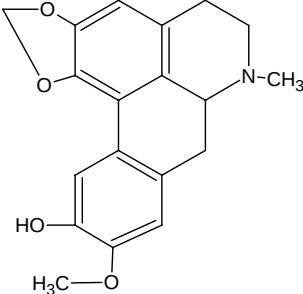
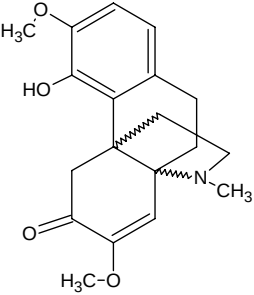
Substância	Estrutura	Espécie
Epistefanina		<i>Stephania capitata</i> <i>Stephania japonica</i>
Hipoepistefanina		<i>Stephania japonica</i>
Fanostenina		<i>Stephania capitata</i> <i>Stephania sasakii</i>
Cefaramina		<i>Stephania cepharantha</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

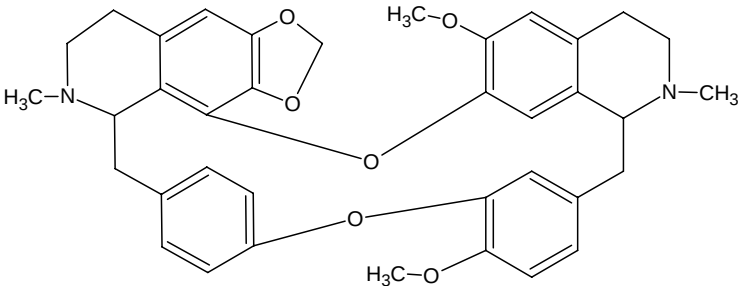
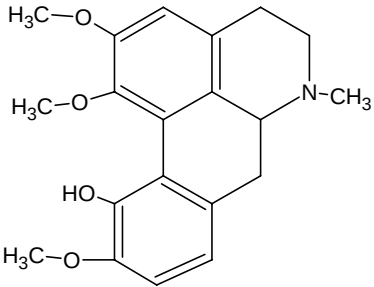
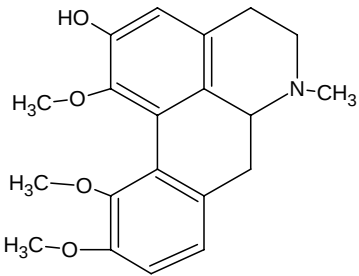
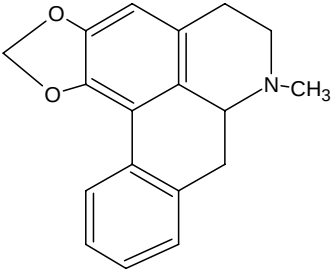
Substância	Estrutura	Espécie
Cefarantina		<i>Stephania cepharantha</i> <i>Stephania sasakii</i>
Isocoridina		<i>Stephania dinklagei</i>
Coridina		<i>Stephania dinklagei</i> <i>Stephania venosa</i>
Roemerina		<i>Stephania dinklagei</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

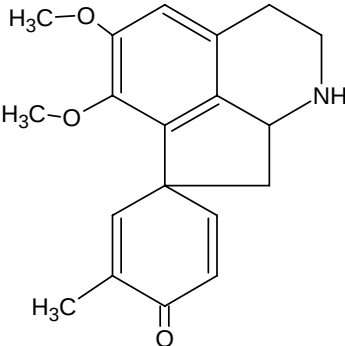
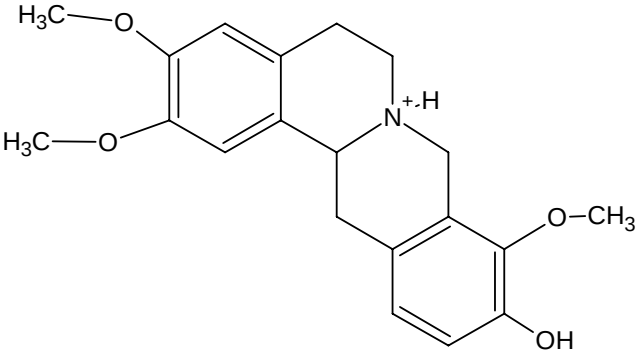
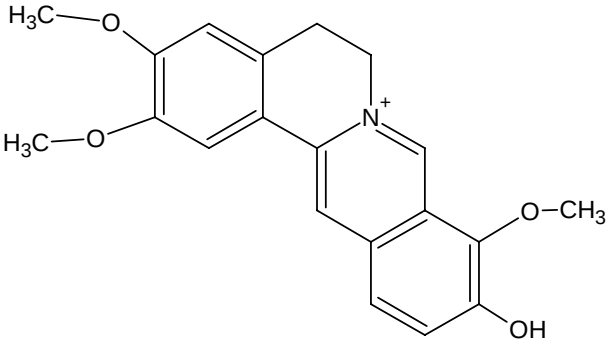
Substância	Estrutura	Espécie
Pronuciferina		<i>Stephania glabra</i>
Coridalmina		<i>Stephania glabra</i>
Dihidrocoridalmina		<i>Stephania glabra</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

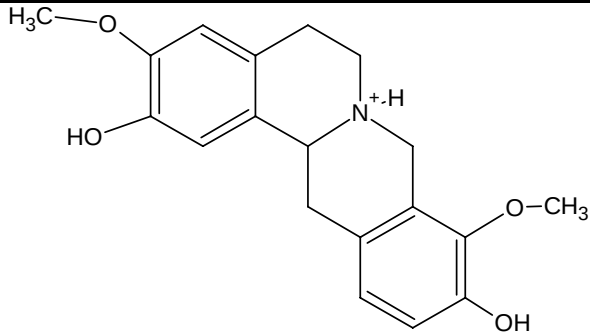
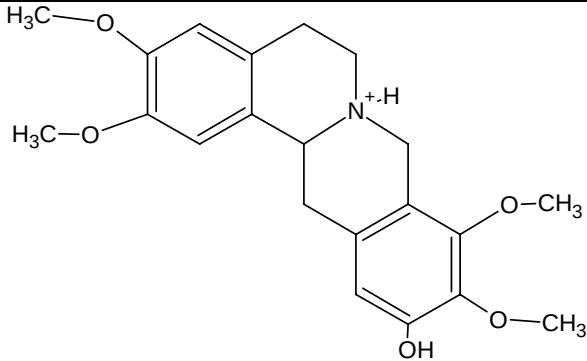
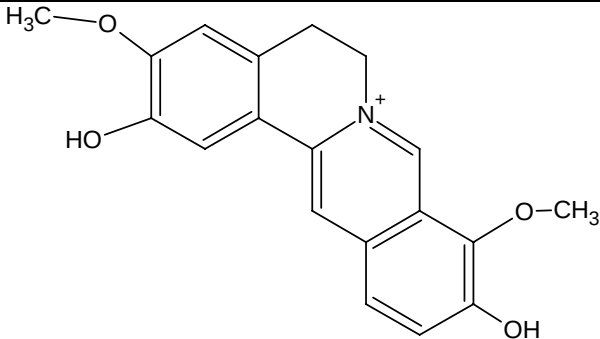
Substância	Estrutura	Espécie
Estefolidina		<i>Stephania glabra</i>
Estefaratina		<i>Stephania glabra</i>
Estefaranina		<i>Stephania glabra</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

Substância	Estrutura	Espécie
4-desmetil hasubanonina		<i>Stephania hernandifolia</i>
4-desmetil norhasubanonina		<i>Stephania hernandifolia</i>
Hasubanonina		<i>Stephania japonica</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

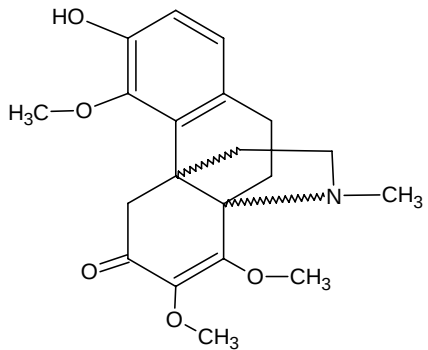
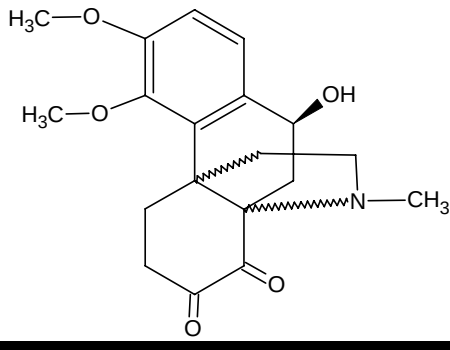
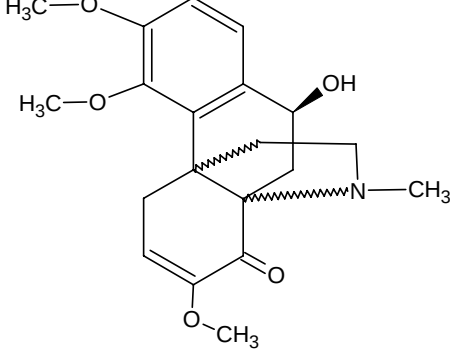
Substância	Estrutura	Espécie
Homostefanolina		<i>Stephania japonica</i>
Metafanina		<i>Stephania japonica</i>
Prometafanina		<i>Stephania japonica</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

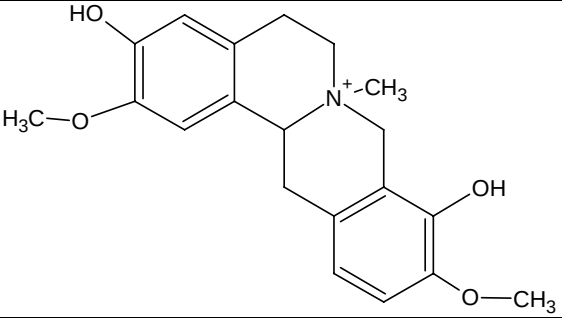
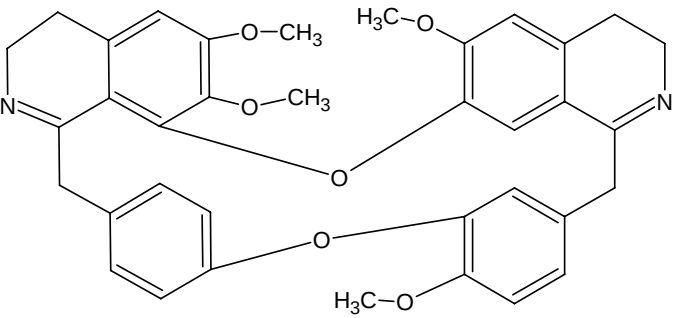
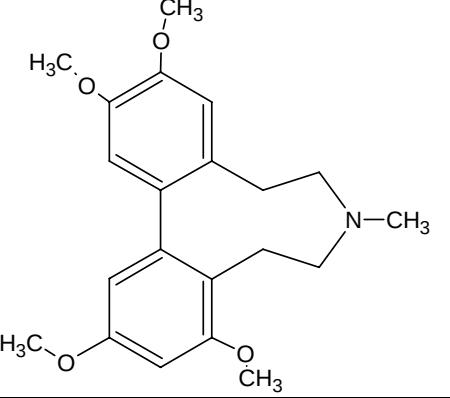
Substância	Estrutura	Espécie
Esteponina		<i>Stephania japonica</i> <i>Stephania sasakii</i>
Estebisimina		<i>Stephania japonica</i>
Protostefanina		<i>Stephania japonica</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

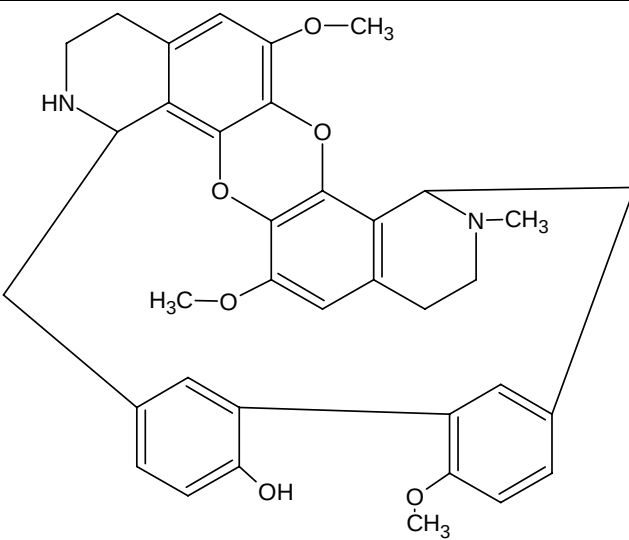
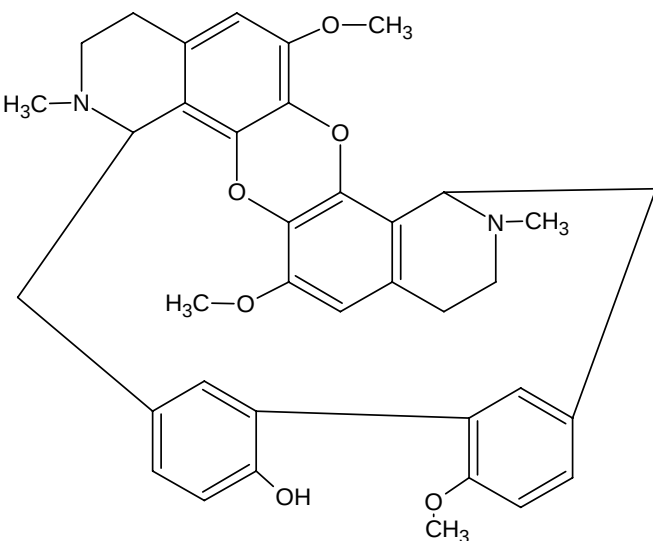
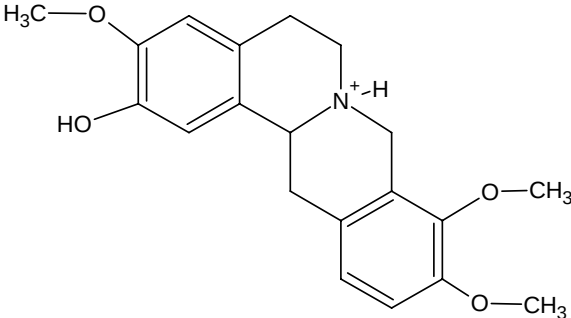
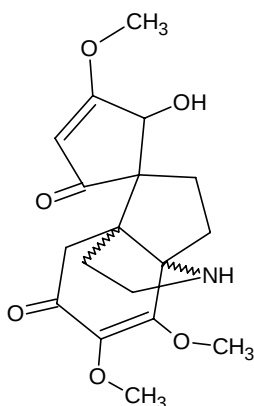
Substância	Estrutura	Espécie
Tiliarina		<i>Tiliacora acuminata</i>
Tiliacorina		<i>Tiliacora acuminata</i>

Tabela 1.1. Alcalóides na Menispermaceae (Thornber, 1970).

Substância	Estrutura	Espécie
Isocoripalmina		<i>Tinomiscium petiolare</i>

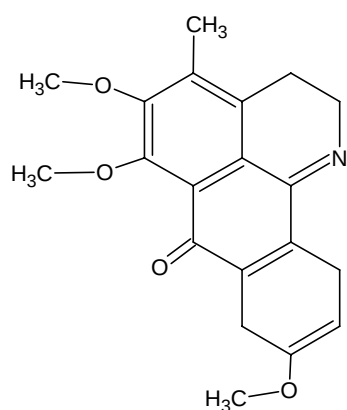
A espécie *Menispermum dauricum* é largamente distribuída na china e seu rizoma faz parte da medicina tradicional chinesa como analgésico e antipirético. Além de vários alcalóides já conhecidos, do rizoma isolaram-se mais dois: descloro-acutumidina [43] e 1-epi-descloro acutumina [44] (Bing-Wu Yu *et al*, 2002).



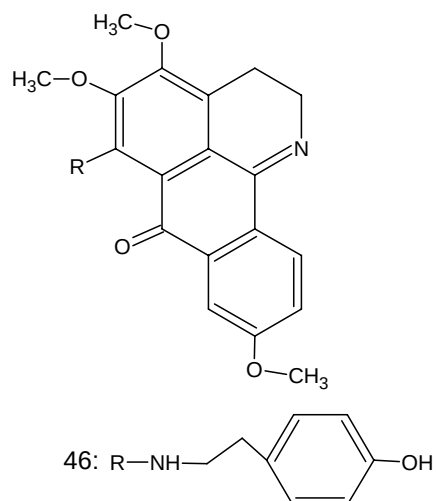
43

Tem sido relatado como a única fonte, de ocorrência natural, de alcalóides do tipo oxaisoaporfinicos (Sugimoto, 1999). Sete oxaisoaporfinicos foram identificados e isolados desta espécie: Menisporfina (Kunitomo & Satoh, 1983), 2,3-dihidromenisporfina (Kunitomo, Kaede & Satoh, 1985), 6-O-demetilmenisporfina (Hu *et al*, 1993), bianfugecina, biafugedina (HOU & XUE, 1985), dauriporfina (bianfugenina) (Takani, Takasu & Takahashi, 1983) e dauriporfinolina (Zhao, Ye, Tan & Xia, 1989).

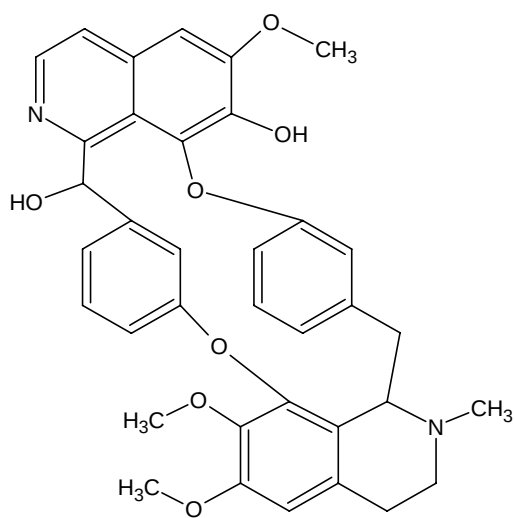
Da raiz tratada com cetoconazol, um inibidor do citocromo P-450, isolaram dois alcalóides derivados da tirosina: 2,3-dihidroauriporfina [45] e tiraminoporfina [46] (Sugimoto *et al*, 1999).



45

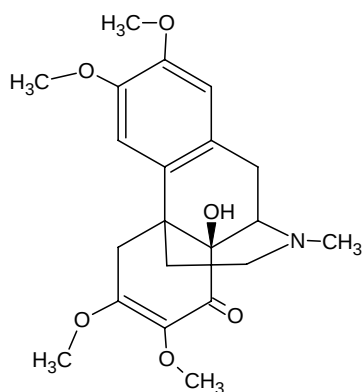


Cavanina [47], um alcalóide do grupo α -hidroxibisbenzilisoquinolina, foi identificado na espécie *Sciadotenia toxifera* (Menachery, 2000).



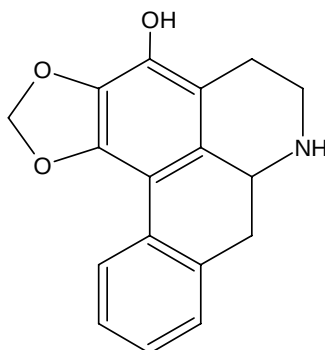
47

O (+)-14-hidroxisostefodelina [48], um novo alcalóide morfínico, foi obtido do extrato etanólico das folhas de *Pachygone dasycarpa*. Esta planta é utilizada na Tailândia como diurético, antinefrítico e antipirético (H. Guinedeau *et al*, 1996).



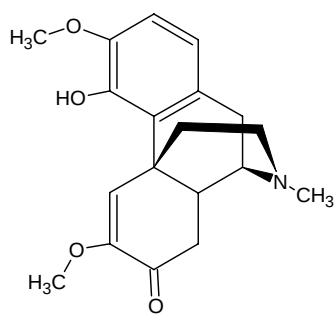
48

O gênero *Cissampelos* sp. É muito utilizado no Brasil para o tratamento de diversas doenças e dele foram isolados vários alcalóides pertencentes a diferentes grupos. De *Cissampelos glaberrima* foi identificado um novo alcalóide aporfínico denominado cissaglaberrimina [49] (J.M. Barbosa-Filho *et al*, 1997).



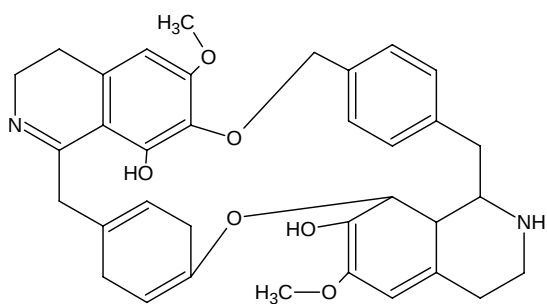
49

O alcalóide milonina [50], um 8,14-dihidromorfinondienona, está presente no extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* (M. R. Freitas *et al*, 1995).

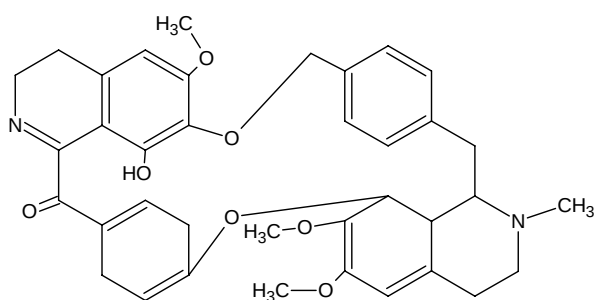


50

As bisbenzilisquinolinas warifteína [51] (P.S. Melo *et al*, 2003) e roraimina [52] (G.A. Lira *et al*, 2002) foram isoladas da casca da raiz de *Cissampelos sympodialis*.

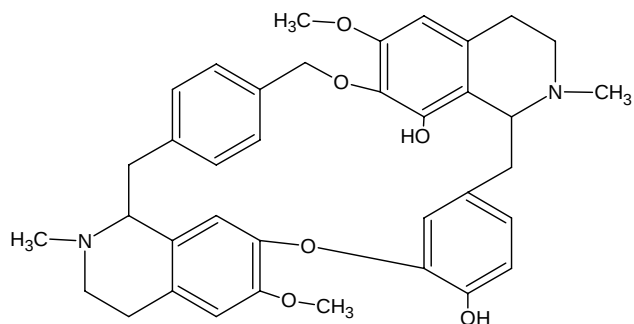


51



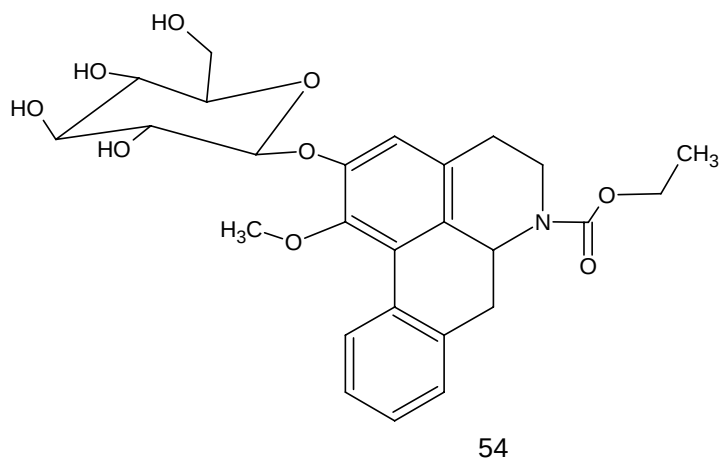
52

Da parte aérea da espécie *Cissampelos fasciculata*, obteve-se o alcalóide cissampentina [53], que apresenta uma ligação oximetileno considerada rara (D. L. Galinis *et al*, 1993).

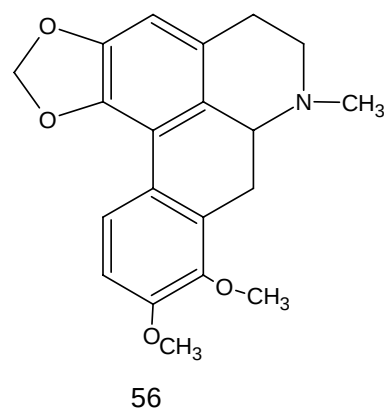
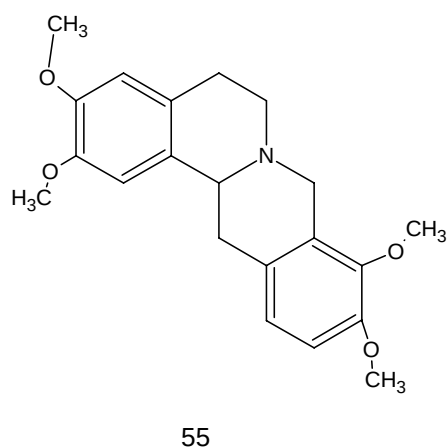


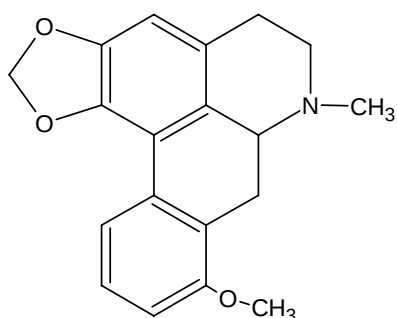
53

Do cerne de *Stephania venosa* um alcalóide aporfínico, extremamente polar, foi extraído e denominado camalina [54] (Banerji *et al*, 1994).

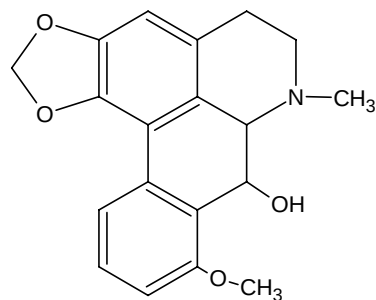


O gênero *Stephania*, na Austrália, é utilizado pelos aborígenes com finalidade terapêutica. As espécies *S. bancroftii*, *S. aculeata* e *Stephania japonica* foram exaustivamente estudadas. O alcalóide (-)-Tetrahidropalmatina [55] é majoritário em *S. bancroftii* (constitui cerca de 70% dos alcalóides presentes) e é um componente comum neste gênero. O composto purificado é utilizado na China como analgésico e a literatura descreve atividade hipotensora, bradicárdica e sedativa. O segundo alcalóide prevalente nesta espécie é a (-)-estefanina [56]. Dois alcalóides minoritários foram separados da estefanina por coluna cromatográfica: crebanina (alcalóide aporfínico) [57] que difere da estefanina apenas pela adição de um grupo metoxila, e (-) aiuthianina [58] (J.T. Blanchfield *et al*, 2003).





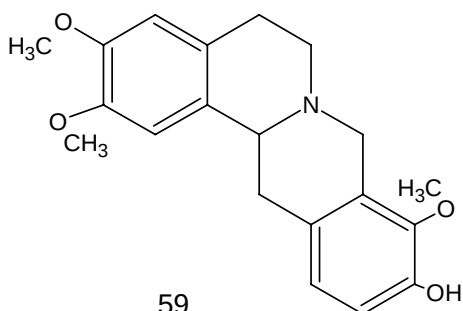
57



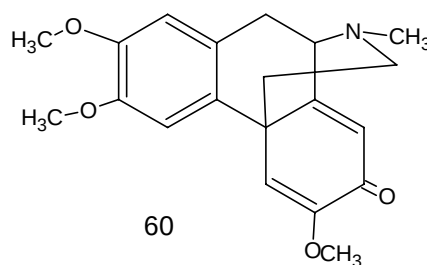
58

Estefanina foi isolada também da *Stephania japonica* (Kondo & Sanada, 1928); crebanina ocorre em *S. sasakii* e *S. capitata* (Kunitomo et al, 1981). Muitas dessas plantas, incluindo *S. bancroftii*, são usadas na medicina tradicional e seus maiores efeitos fisiológicos são registrados na interação com os receptores do sistema nervoso central dos mamíferos (Chen *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1989; Han & Liu, 1988; Ma *et al.*, 1990; Li, 1989).

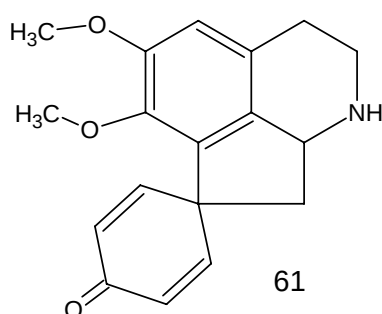
O alcalóide coridalmina [59] foi isolado mais tarde de *S. bancroftii*, seu espectro indica a presença de três metoxilas e um grupo hidroxila. Os compostos alcaloídicos sebiferina [60] e estefarina [61] também foram isolados desta espécie (J.T. Blanchfield *et al*, 2003).



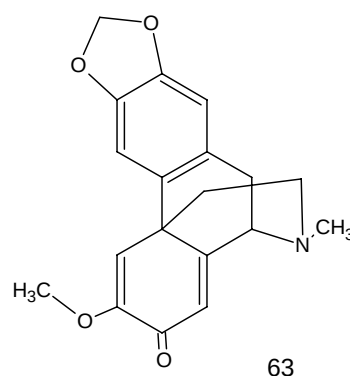
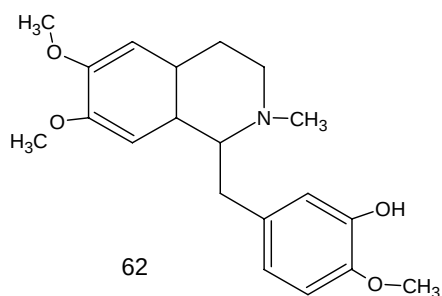
59



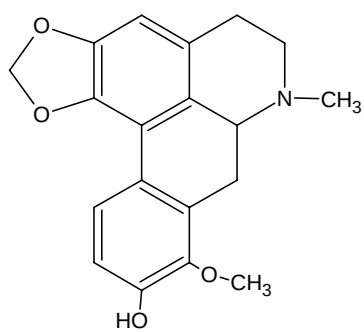
60



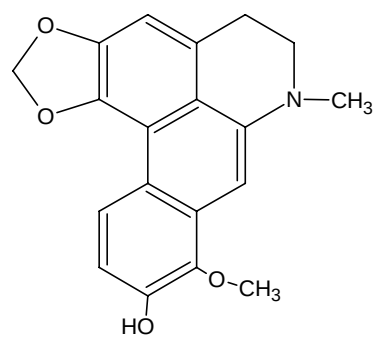
A raiz de *Estefania aculeata* possui o alcalóide laudanidina [62]. Esse composto tem sido isolado de muitas plantas incluindo a papoula do ópio, *Papaver somniferum* (Proksa *et al*, 1979) e da casca de *Cryptocarya amygdalina* (Borthakur *et al*, 1981) e das famílias *Machilus* e *Thalictrum* (Southon & Buckingham, 1989). Da raiz também se isolou o composto amurina [63], um morfinano alcalóide. Este composto foi isolado primeiramente em 1960 da espécie *Papaver amurense*, mas sua estrutura só foi corretamente elucidada em 1968 (Dopke *et al*, 1968).



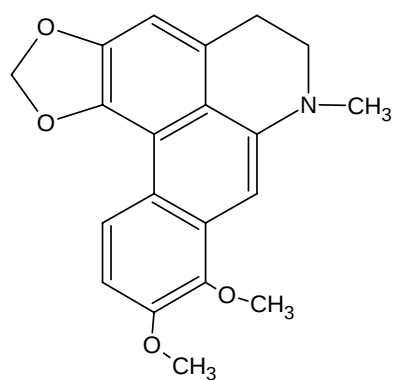
Cinco alcalóides, que não haviam sido descritos na literatura, foram isolados a partir do extrato metanólico do caule e raiz de *Stephania sasakii*: estesaquina [64], dehidroestesaquina [65], dehidrocrebanina [66], 4,5-dioxodehidrocrebanina [67] e bisaquinadinina [68] (J. Kunitomo *et al*, 1980).



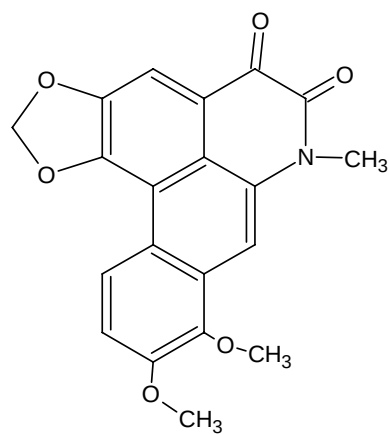
64



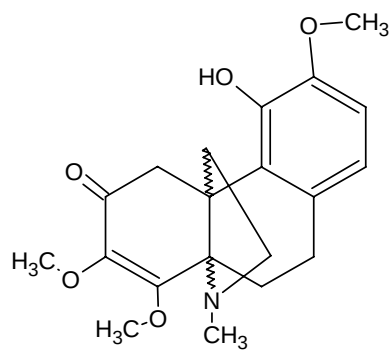
65



66

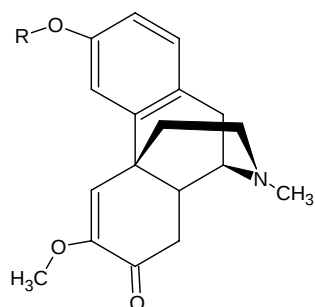


67



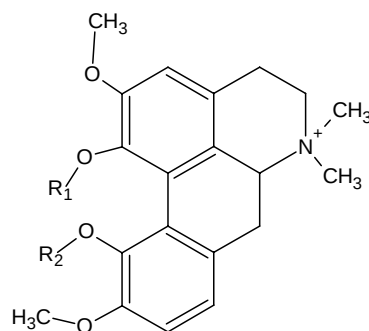
68

O-metilflavinantina [69], flavinantina [70], N-metilcoridina [71], coridina [72], O-acetil N-metilcoridina [73], O-acetilcoridina [74], magnoflorina [75] foram isolados da espécie *Kolobopetalum auriculatum* (Dewuma-Badu *et al*, 1980).



69: R= Me

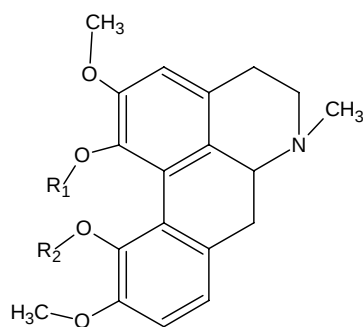
70: R= H



71: R₁ = H, R₂ = Me

72: R₁ = Ac, R₂ = Me

73: R₁=R₂= H



74: R₁=H, R₂= Me

75: R₁=Ac, R₂= Me

1.3. Aspectos farmacológicos das menispermáceas

Muitas substâncias terapêuticas foram obtidas a partir do estudo das propriedades farmacológicas de determinadas plantas. A família Menispermaceae é muito utilizada na medicina tradicional para tratar diversas patologias e tem demonstrado grande aplicabilidade, justificada por pesquisas, na terapêutica racional.

1.3.1 Atividade imunomoduladora:

Os agentes quimioterápicos sintéticos, em sua maioria, são imunossupressores, citotóxicos e apresentam uma grande variedade de efeitos colaterais. Essas substâncias causam um aumento da resistência não-específica do organismo denominada adaptogênese. O desenvolvimento de agentes capazes de retirar o paciente do estado de imunodeficiência para um estado de normalidade causará um impacto significativo sobre a doença. Não possuem a função de curar, mas de controlar as manifestações e o curso da doença. Avaliou-se a atividade imuno-farmacológica de *Tinospora cordifolia* e seu potencial como tratamento de suporte em quimioterapia do câncer (S. Diwanay *et al*, 2004).

São descritas várias atividades imuno-farmacológicas desta espécie, como propriedade antioxidante, redução dos efeitos tóxicos da ciclofosfamida e atividade imunomoduladora, observadas em ratos com sarcoma ascítico que foram tratados com ciclofosfamida e extrato etanólico de *T. cordifolia*. Houve significativa redução da quimiotoxicidade causada pelos radicais livres e aumento dos anticorpos IgG no plasma (S. Diwanay *et al*, 2004). Mostrou-se que o extrato aquoso desta espécie estimula a fagocitose e atividade bactericida dos

neutrófilos e macrófagos, e a mitogênese das células B, observada na cultura de células esplênicas de ratos (Chintalwar et al, 1999).

1.3.2 Inibição dos canais de cálcio e citotoxicidade:

A infusão da raiz fresca da espécie *Cissampelos sympodialis* é utilizada popularmente para tratar asma, artrite e reumatismo. O estudo fitoquímico tem indicado a presença de alcalóides aporfinicos, bisbenziltetrahidroisoquinolínicos e tetrahidroprotoberberínicos. Isolaram-se três alcalóides terciários (varifteína, metilvarifteína e milonina), um alcalóide quaternário (laurifolina) e um alcalóide morfínico (milonina). Varifteína mostrou ser um componente com ação espasmolítica, inibidor do influxo de cálcio dos canais de cálcio, sendo considerado um inibidor não específico da contração da musculatura lisa (Moreira *et al*, 2003).

Demonstrou-se que a milonina tem efeito espasmolítico semelhante ao da varifteína (Melo *et al*, 2003).

Os efeitos citotóxicos dos alcalóides varifteína e milonina foram avaliados *in vitro*, em culturas de hepatócitos de ratos e células V79 (fibroblastos) tratadas com cimetidina (inibidor do citocromo P450). Varifteína mostrou elevada toxicidade nos hepatócitos com similar citotoxicidade nas células V79. Milonina foi menos tóxica que a varifteína tanto nos hepatócitos quanto nas células V79. Mostrou-se também que a cimetidina não protege as células dos efeitos tóxicos de ambos os alcalóides, comprovando que a toxicidade independe do sistema citocromo P450 (Melo *et al*, 2003).

1.3.3 Ação antiinflamatória e antiespasmolítica:

Estudos farmacológicos têm mostrado que o extrato de *C. sympodialis* relaxa a musculatura traqueal e inibe o broncoespasmo. Tem-se mostrado também que o extrato hidroalcólico de suas folhas aumenta o número de células mononucleares no fluido broncoalveolar, sugerindo a possibilidade de atividade quimiotática. Também reduziu a migração dos neutrófilos e o edema na cavidade peritoneal de ratos indicando atividade antiinflamatória (Moreira *et al*, 2003).

O mesmo extrato hidroalcólico suprime a resposta das células T e modifica o padrão de secreção das citocinas, além de ter um efeito inibidor não específico sobre a secreção de linfócitos B provavelmente devido ao aumento dos níveis de AMPc intracelular, causado pela inibição da fosfatidilesterase (Moreira *et al*, 2003).

Os alcalóides cefarantina, isotetrandrina, cicleanina, tetrandrina e condocurina inibiram a produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos. A produção de grandes quantidades de NO pode resultar em toxicidade letal devido ao efeito hipotensor, durante o choque por endotoxinas. Pela ação imunomoduladora, são considerados antiinflamatórios naturais (Kondo *et al*, 1993).

1.3.4 Atividade antidepressiva:

Outros estudos mostraram que o extrato hidroalcólico das folhas de *C. sympodialis* tem ação antidepressiva sobre o SNC. Ratos que apresentaram catalepsia induzida por reserpina e receberam doses do extrato, tiveram o tempo de duração do efeito bastante reduzido em

relação ao grupo controle. O aumento da incidência do ato de cuidar-se e da motilidade, observados, são indicativos de atividade do SNC. Outro dado que comprova a atividade antidepressiva do extrato é a diminuição no tempo de imobilidade após o teste natatório forçado. Na literatura, agentes que inibem a enzima fosfatidilesterase são descritos por ter atividade antidepressiva (Almeida *et al*, 1998).

Alguns testes mostraram que o extrato *Limacia scanden* tem atividade simpatomimética similar à noradrenalina. Esse extrato injetado intravenosamente em ratos e gatos causou um aumento, dose-dependente, da pressão arterial. Um pré-tratamento com fentolamina, um bloqueador α e β não específico, cortou este efeito. O mesmo não ocorreu com a administração de propanolol um β -bloqueador seletivo. Estudos eletrofisiológicos da atividade neural do caracol da espécie *Achantina fulica* revelaram que esse extrato induz respostas excitatórias similares às causadas pela serotonina (5HT). Sugeriu-se que este efeito deve-se ao estímulo da produção de 5HT ou a inibição de sua recaptação no SNC. Isso justificaria o uso desta planta na depressão e desordens afetivas (Hwi & Lay, 1998).

1.3.5 Atividade antiinfeciosa:

Albertisia villosa, é uma planta subtropical muito utilizada em preparos, da medicina tradicional africana, contra várias doenças. Cicleanina é o alcalóide mais abundante nesta espécie e apresenta ação antibacteriana, antiprotozoária (ativa contra *Plasmodium falciparum* e *Leishmania sp*) e antifúngica potente, que justifica o uso da infusão da raiz desta planta na medicina popular (Lohombo-Ekomba *et al*, 2004).

O extrato dos talos de *Tinospora crispa* apresentou atividade antifilariose contra a espécie *Brugia malayi* (Zaridah et al, 2001).

1.3.6 Atividade antidiabética:

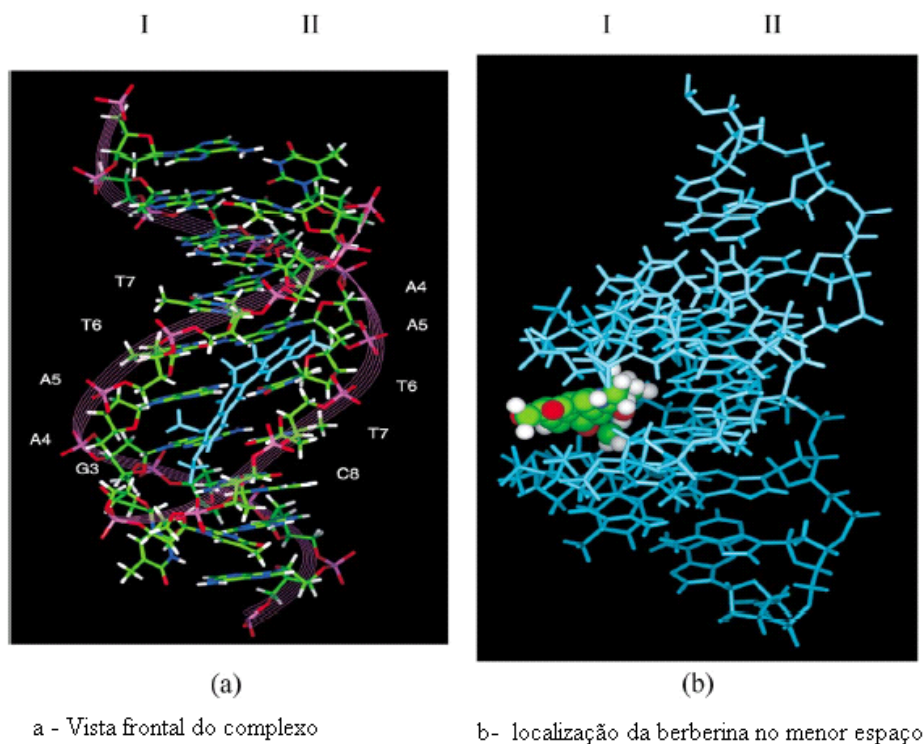
A eficácia do extrato de *Tinospora crispa* para o tratamento de diabetes foi previamente verificado em animais. O efeito anti-hiperglicemiante é devido ao aumento da liberação de insulina via modulação da concentração de cálcio dentro das células β (Noor & Ashcroft, 1998).

1.3.7 Atividade antitumoral:

A topologia do DNA é controlada pela enzima DNA-topoisomerase que catalisa o rompimento e a união dos fragmentos de DNA. Esta enzima nuclear também está envolvida na replicação exata do modelo durante a transcrição do RNA. Há dois tipos principais: Topoisomerase I e II. A atividade antitumoral dos agentes que atuam nesta enzima está associada à capacidade de estabilizar o complexo enzima-DNA. Os alcalóides protoberberínicos e seus análogos sintéticos têm essa capacidade, impedindo a replicação das células tumorais (Li et al, 2003).

A interação da berberina com muitos oligonucleotídeos, estudada por espectrometria de RMN, mostrou que se liga preferencialmente a seqüência AT do DNA, encaixando-se no menor espaço da dupla-hélice, no nível dos pares A4 e T7 e A5 e T6. A seqüência não é quebrada na presença da berberina. Ocorre uma interação iônica não específica entre seu

átomo de nitrogênio, carregado positivamente, e superfície negativa do nucleotídeo (Mazzini *et al*, 2003).



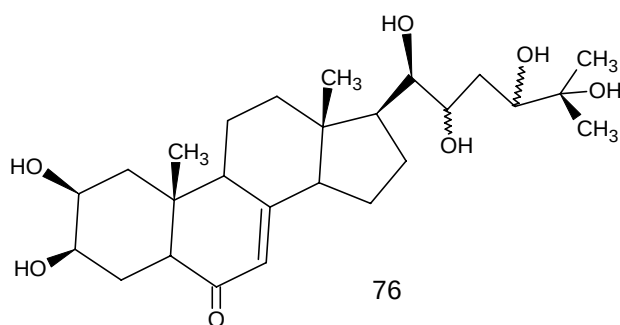
1.4 Aspectos botânicos, químicos e farmacológicos do gênero *Abuta*.

A espécie vegetal *Abuta rufescens* Aubl. (Menispermaceae) é um arbusto ferrugineo-tomentoso com ramos cilíndricos, folhas ovado-cordiformes ou orbiculares, com ápice mais ou menos obtuso, um pouco coriáceas, 11 a 24 cm de comprimento; flores dispostas em racimos fasciculados, axilares, fruto baga cotonosa, sulcada, fornece raiz grossa e acre, tóxica e é encontrada na Região Amazônica.

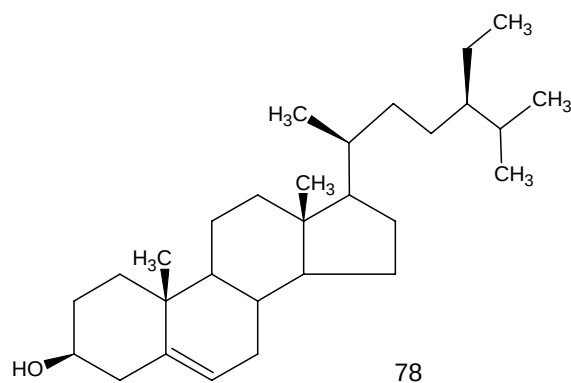
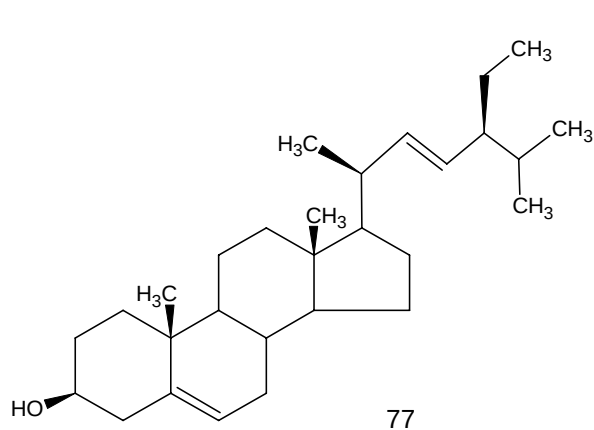
De acordo com a medicina popular, esta espécie tem sido muito utilizada para o tratamento de malária, enfermidades hepáticas, úlcera gástrica, como antimicótico, diurética e no tratamento de mordedura de cobra. Na Amazônia equatoriana, os Quíchuas preparam

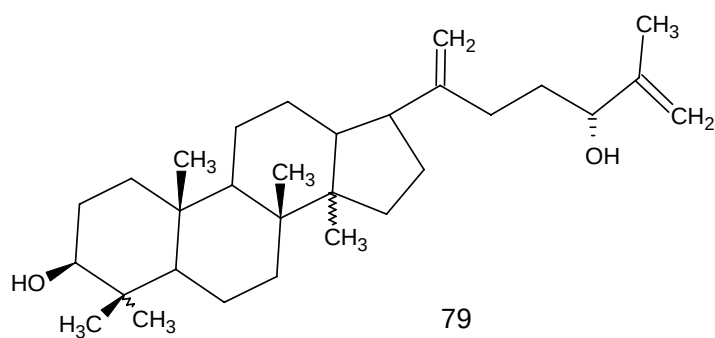
compressas com a decocção de suas folhas para o tratamento de cefaléias intensas e esse mesmo decoto é utilizado por puérperas como fortificante. O infuso das folhas é ingerido como febrífugo. O decoto do tronco e das casca é usado pelos povos ribeirinhos como abortivo e no tratamento de inflamações uterinas. Além de suas propriedades medicinais, vários povos indígenas da Amazônia empregam essa espécie no preparo do curare.

Entre as espécies do gênero *Abuta*, a literatura descreve o isolamento da abutasterona [76] e de uma mistura de sitosteróis de *Abuta velutina* (Pinheiro *et al*, 1983).

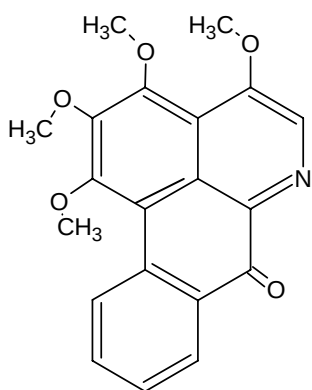


Algumas outras substâncias não alcaloídicas foram isoladas como estigmasterol [77], sitosterol [78], ecdisonas, como a Dammara-20,25-dien-3 β ,24 α -diol [79] da *A. racemosa*, e outros fitoconstituintes.

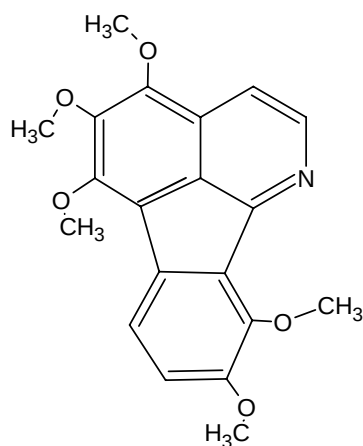




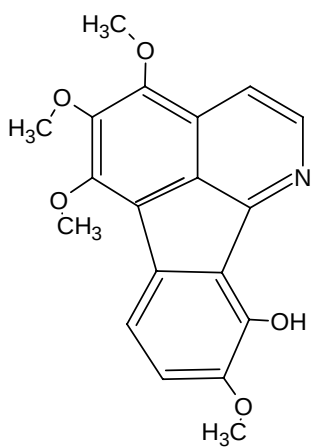
Em estudos realizados com as espécies *A. rufescens* e *A. imene* foram identificados seis tipos de alcalóides imenina [80], imeluteína [81], rufescina [82], homomoschatolina [83], imerubrina [84] e norrufescina [85].



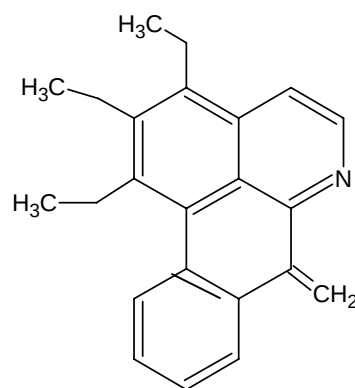
80



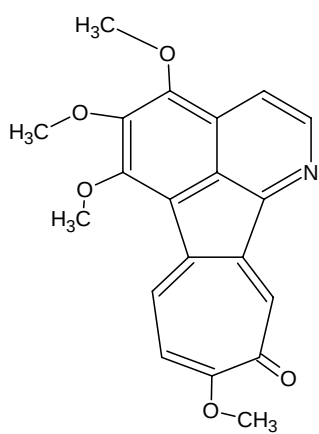
81



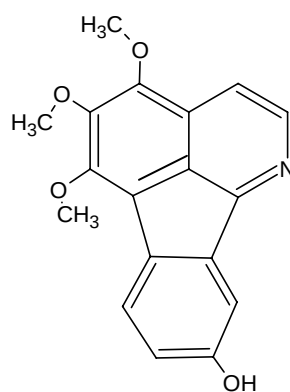
82



83

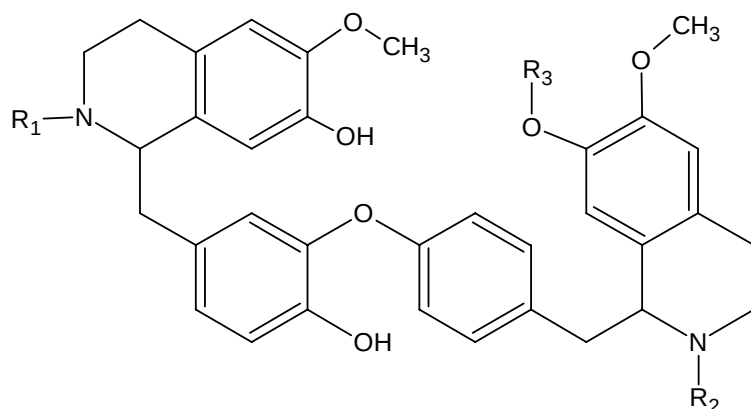


84



85

Da espécie *Abuta pahni*, foi isolada vários alcalóides bis-benzilisoquinolinas (estruturas **XIa** a **XIf**).



86: $R_1=R_2=R_3= \text{Me}$

87: $R_1=\text{Me}$ $R_2=\text{H}$ $R_3= \text{Me}$

88: $R_1=R_2=R_3=\text{H}$

89: $R_1=\text{Me}$ $R_2=\text{H}$ $R_3= \text{H}$

90: $R_1=\text{H}$ $R_2=\text{Me}$ $R_3= \text{H}$

91: $R_1=\text{Me}$ $R_2=\text{Me}$ $R_3= \text{H}$

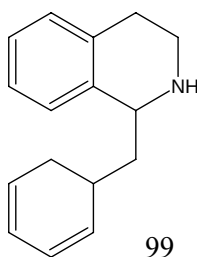
1.5 Biogênese dos Alcalóides do gênero *Abuta*

Todos os alcalóides da família Menispermaceae, e conseqüentemente do gênero *Abuta*, ou são benzilisoquinolinas ou são derivados deste precursor (Thornber, 1971). São moléculas cíclicas que contêm azoto, apresentando propriedades básicas, e são derivados da tirosina (92).

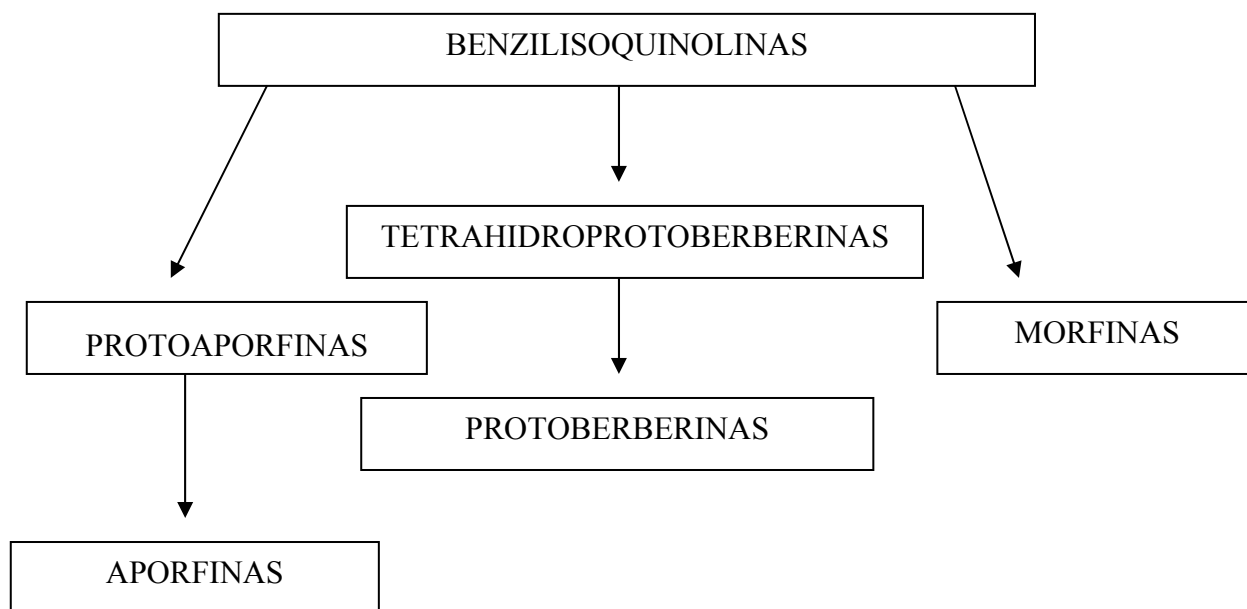
Uma descarboxilação, piridoxo-5-fosfato dependente, da tirosina leva a formação de um derivado feniletilamino simples, denominado tiramina (93). Muito comumente, derivados da tirosina apresentam 3,4-di ou 3,4,5-trihidroxiilações e são provenientes da metilação e hidroxilação da dopamina (94) (FIGURA 1.4).

A adição de átomos de carbono é realizada a partir do ácido pirúvico (95), pela formação de uma base de Schiff (96). A ciclização que origina o sistema isoquinolínico dar-se através do mecanismo de Mannich (97). O carbânion é providenciado pelo efeito mesomérico do grupo substituinte metoxila. A restauração da aromaticidade ocorre pela perda de H^+ originando o esqueleto tetraisoquinolínico (98) (FIGURA 1.5).

A incorporação de uma unidade feniletil no composto feniletilamina origina o esqueleto benziltetrahydroisoquinolina (99).



Mudanças fundamentais para o aumento neste esqueleto, cria uma diversidade de tipos estruturais de benzilisoquinolinas (ESQUEMA 1.1).



Esquema 1.1 Derivados benzilisoquinolínicos

Duas moléculas de tirosina são utilizadas na biosíntese da benziltetrahydroisoquinolina, mas somente o fragmento feniletilamino é formado via DOPA. Os restantes dos carbonos originam-se da tirosina por via do ácido 4-hidroxifenilpirúvico (100) (FIGURA 1.6).

Os alcalóides aporfínicos (101) são obtidos do acoplamento oxidativo orto-fenol da tetrahydroisoquinolina e o para-fenol do benzil substituinte (FIGURA 1.7).

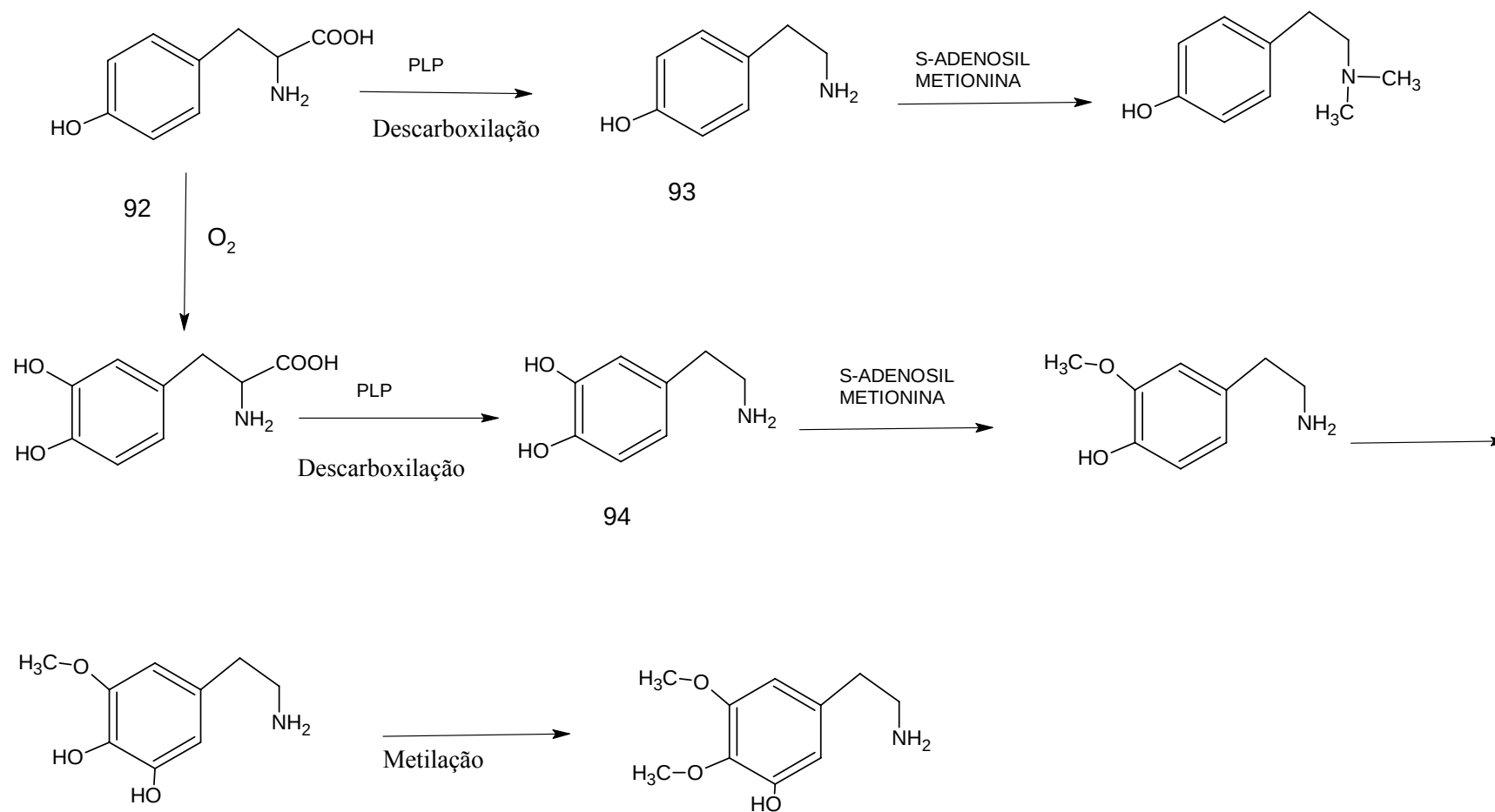


Figura 1.4: Biogênese dos alcalóides

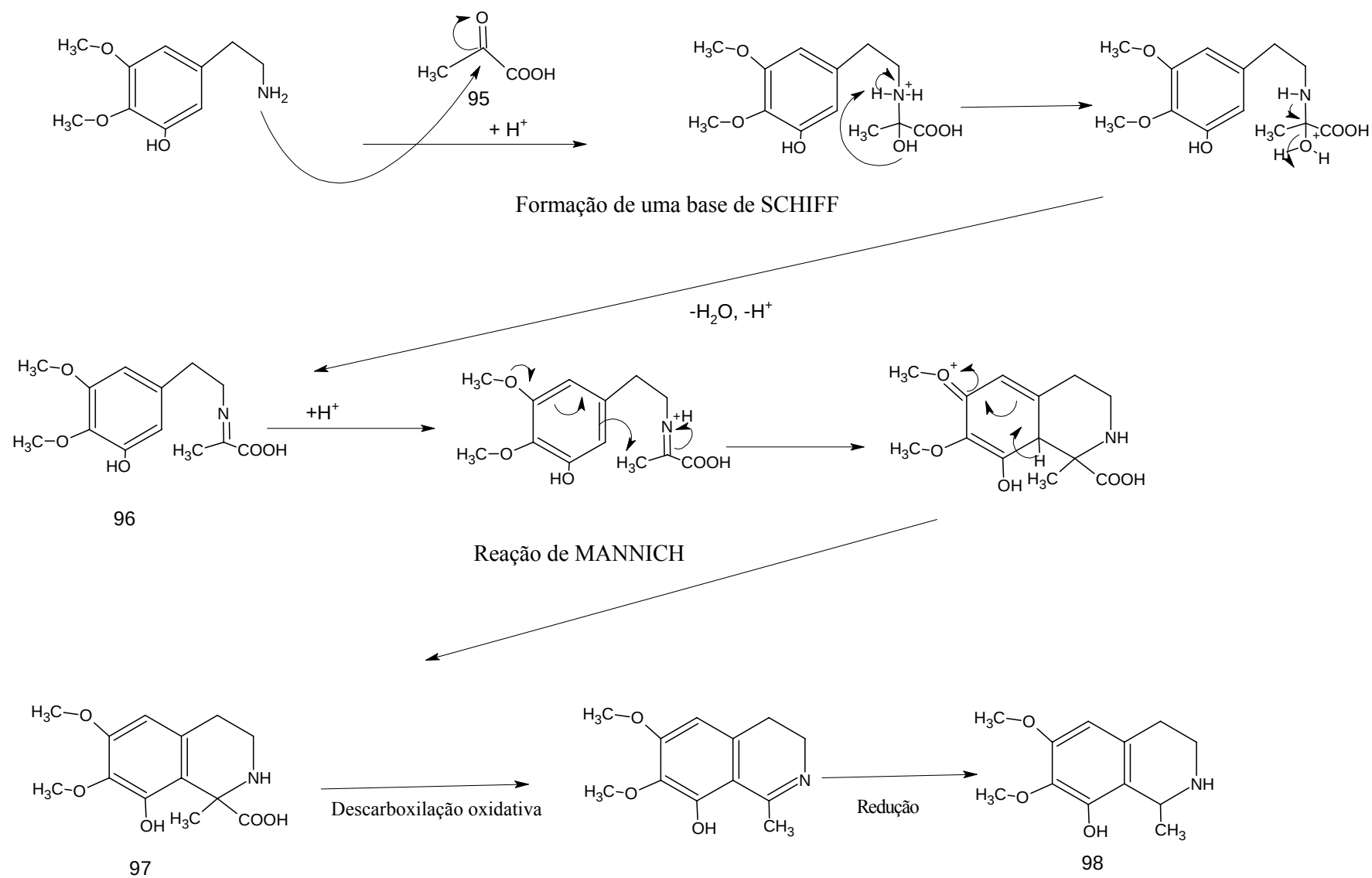


Figura 1.5: Biogênese dos alcalóides

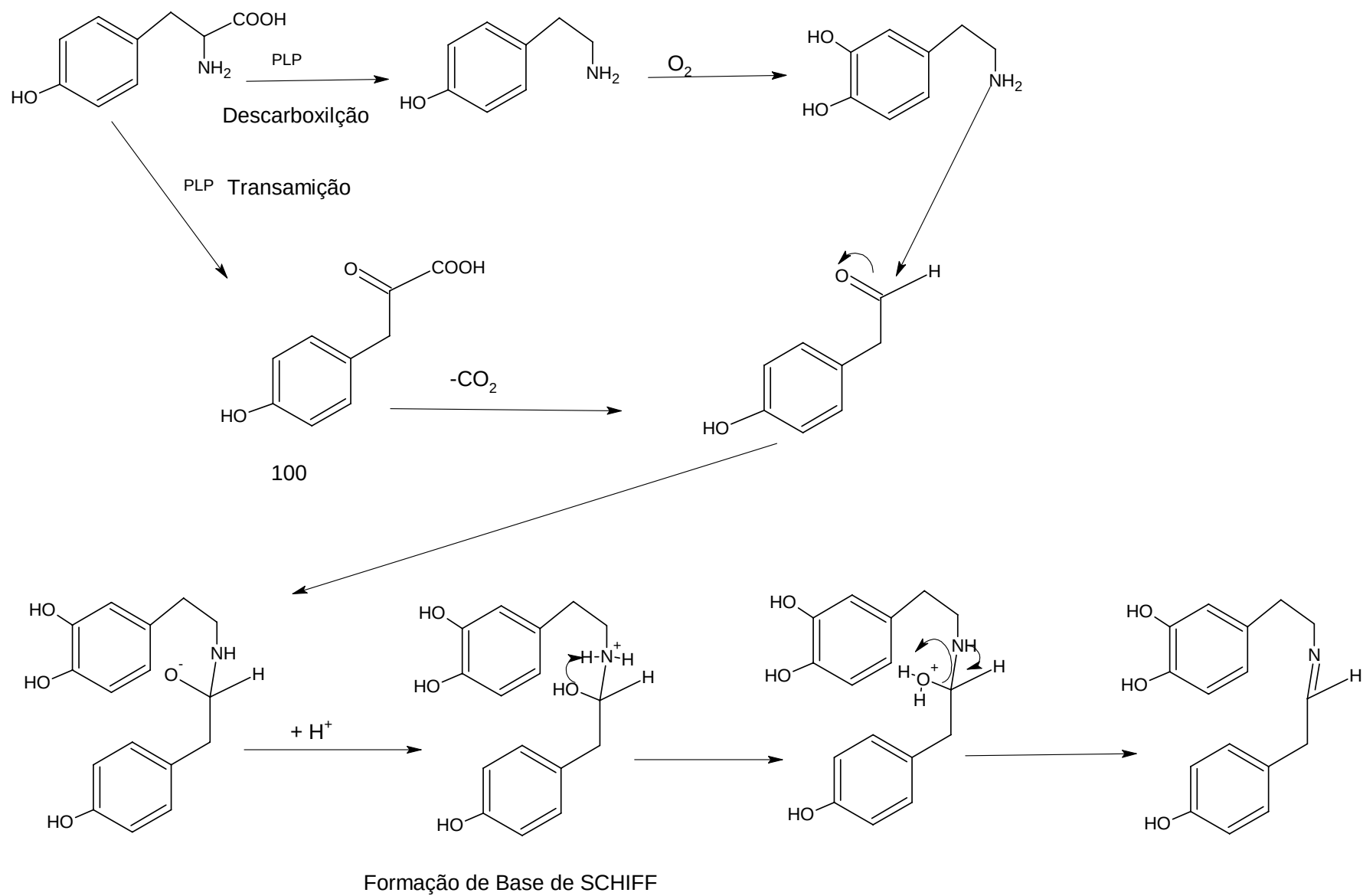
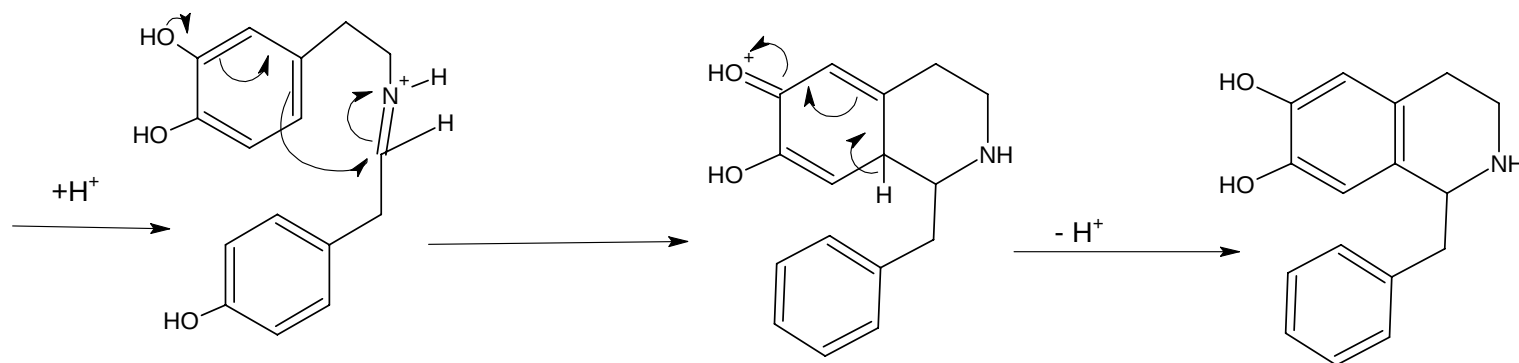
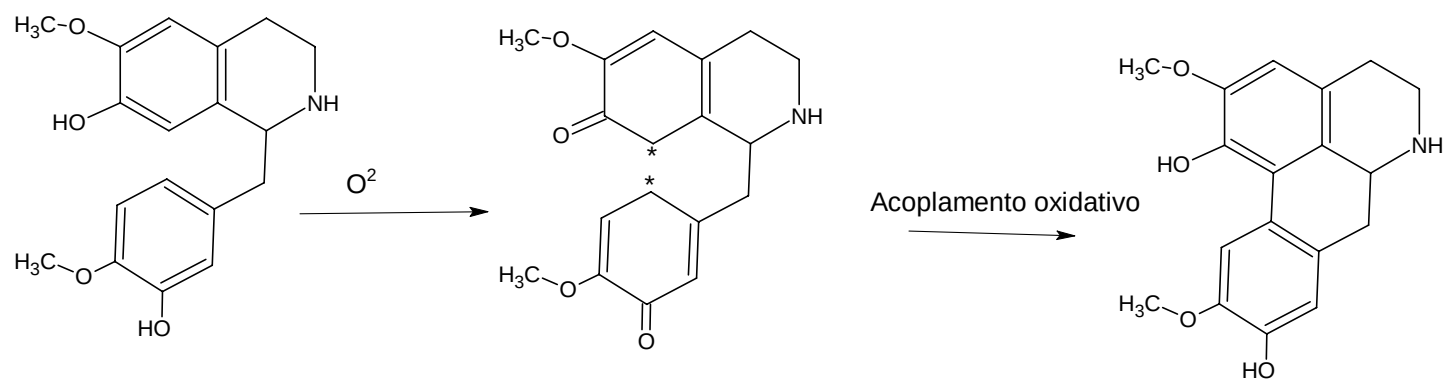


Figura 1.6: Biogênese dos alcalóides



Reação de MANNICH

Figura 1.6: Biogênese dos alcalóides (Continuação)



2 OBJETIVOS

Realizar estudo químico das frações provenientes dos extratos de hexano, diclorometano e metanol do cerne de *Abuta rufescens*.

Isolar constituintes do cerne de *Abuta rufescens* e elucidar suas estruturas utilizando métodos espectroscópicos.

Efetuar testes com as substâncias isoladas para atividade citotóxica contra as larvas de *Artemia franciscana* e *Aedes aegypti*, e antitumoral contra linhagens de células de tumores de mama, pele, colon e leucemia humana.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Para a extração e os estudos cromatográficos, os solventes hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, etanol, metanol, isopropanol e hidróxido de amônio (todos padrão analítico) foram adquiridos de Merck e Grupo Química, e foram utilizados sem tratamento prévio.

Nos trabalhos cromatográficos foram utilizados os seguintes suportes: Placas prontas de sílica gel Merck, 0,25mm de espessura; placas de alumina neutra com 0,50mm de espessura; sílica gel nº 60 com 0,063-0,200 mm da Merck; alumina neutra da Merck.

Os espectros no infravermelho foram registrados em aparelho FT-IR Spectrometer Perkin Elmer modelo Spectrum 2000, empregando suporte de KBr, da Central analítica da Universidade do Amazonas.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em aparelho Bruker DRX 400 pelo Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, empregando Clorofórmio como solvente e TMS como referência interna.

Os testes de Toxicidade frente a *Artemia franciscana* e larvas de *Aedes aegypti* foram realizados no Laboratório de Farmacologia do INPA sob a supervisão da Dra. Cecília Verônica Nuñez.

O teste de Citotoxicidade in vitro foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade do Ceará sob a supervisão do Dr. Manoel Odorico de Moraes.

3.2 Estudo fitoquímico do cerne de *Abuta rufescens*

A metodologia empregada foi baseada em procedimentos já descritos por Matos (1997).

3.2.1 Coleta do material

O caule foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke no Km 25 da estrada Manaus-Itacoatiara (AM 010).

3.2.2 Classificação taxonômica

A classificação taxonômica foi realizada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Manaus-AM) a partir da análise da exsicata preparada logo após a coleta do material.

3.2.3 Preparo da amostra

Após a coleta, o caule foi seco à temperatura ambiente, porém como mostrou sinais de proliferação de fungos, a casca foi removida e o cerne seco em estufa semi-aberta à temperatura de 40°C e, em seguida, triturado e moído, fornecendo uma amostra de 1,5Kg de material seco.

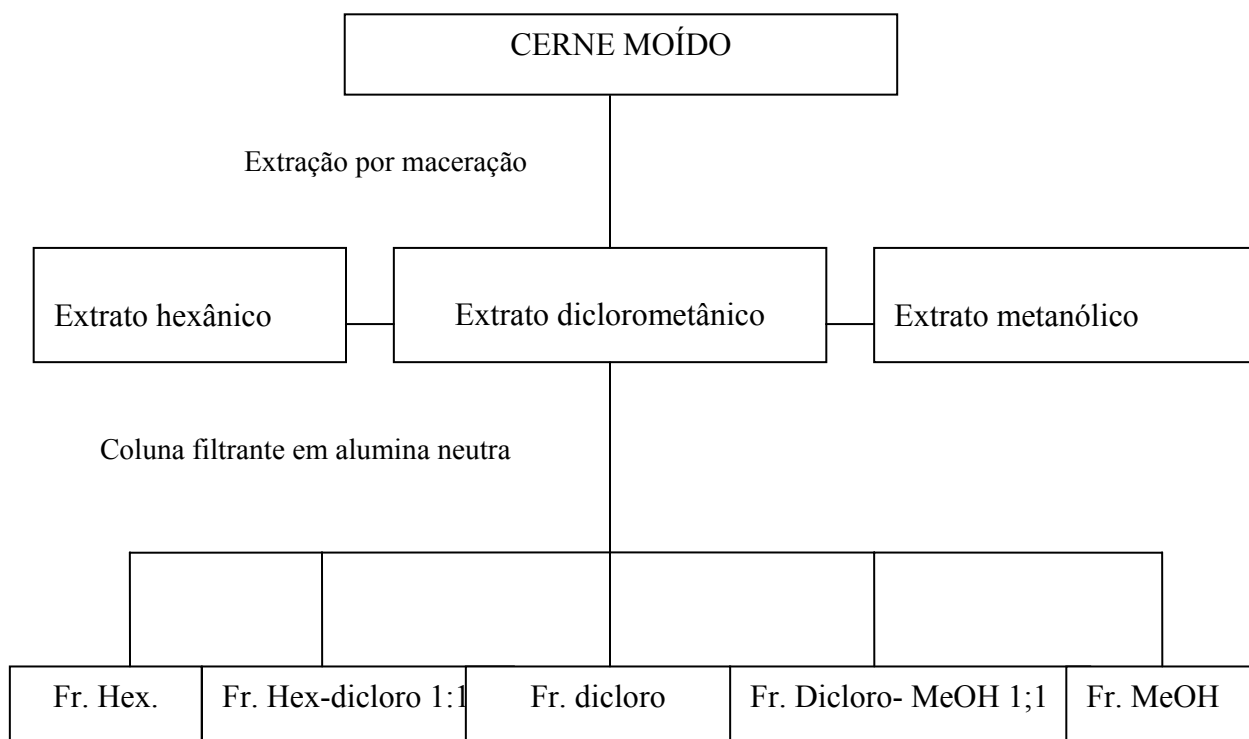
3.2.4 Obtenção dos extratos

A amostra foi submetida a três extrações sucessivas em hexano, diclorometano e metanol, a frio em mariote, com duração de 10 dias cada uma. Os extratos obtidos foram concentrados a pressão reduzida utilizando evaporador rotativo, obtendo-se 10g de extrato bruto em hexano, 16g de extrato bruto em diclorometano e 52g de extrato bruto em metanol. As análises foram realizadas com os extratos diclorometano e hexano.

3.3 Estudo cromatográfico

Os extratos de hexano e diclorometano foram submetidos, inicialmente a avaliação em CCD. Observou-se que o extrato em diclorometano apresentou resultado sugestivo para alcalóide.

O extrato diclorometano bruto (4g) foi submetido a uma coluna filtrante em alumina neutra, empregando-se seqüencialmente os eluentes: Hexano (0,01g), dicloro+hexano 1:1(0,001g), diclorometano (0.5g), dicloro+metanol 1:1(1,4g) e metanol (1,0g).



Esquema 3.1 Preparação dos extratos

A análise dessas frações em CCD sugeriu que a fração diclorometano-metanol 1:1 conteria alcalóides (Figura 3.1).

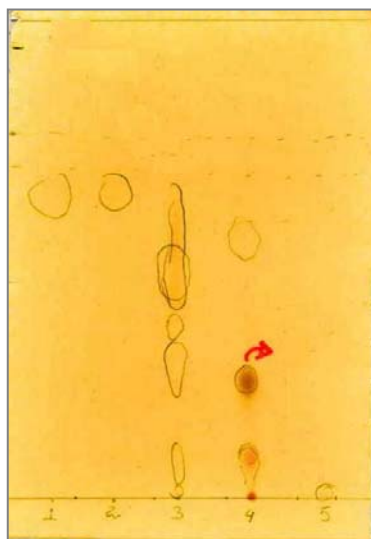
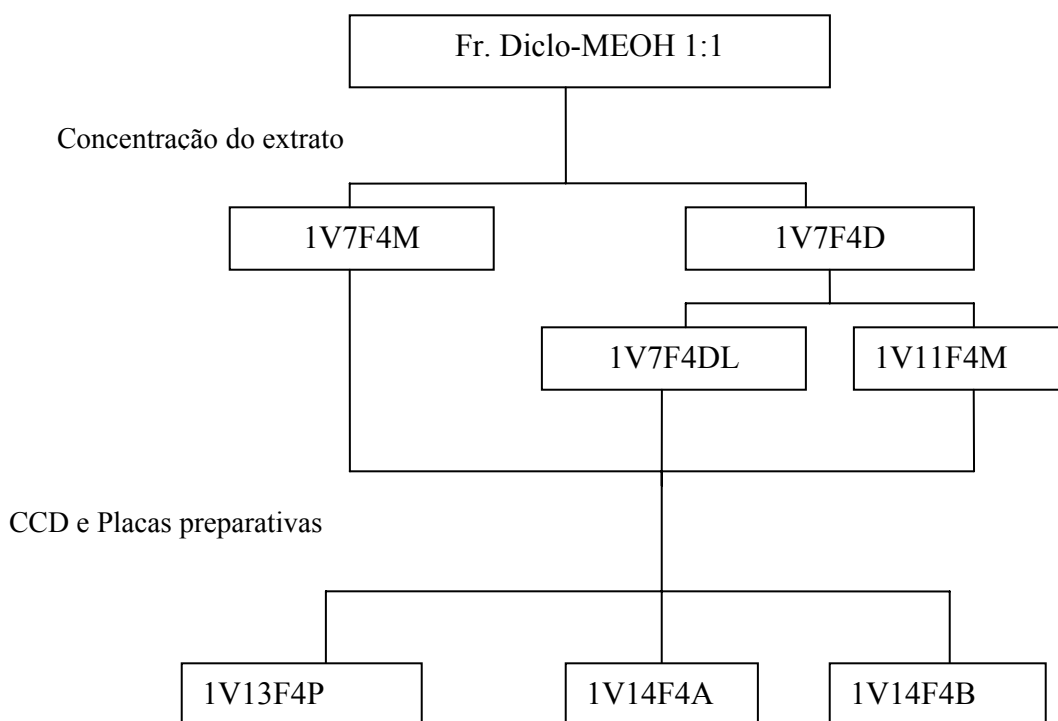


Figura 3.1: Cromatoplaça das frações da coluna filtrante em alumina. 1- fração hexano; 2- fração Hex/dicloro 1:1; 3- fração diclorometano; 4- fração dicloro/metanol 1:1; 5- fração metanol.

A fração diclorometano-metanol 1:1 foi concentrada observando-se formação de duas fases, uma sólida e outra líquida, denominadas 1V7F4M e 1V7F4D. A fase sólida foi lavada com metanol, originando a amostra 1V7F4DL, e a água mãe 1V11F4M.

As quatro frações foram analisadas por CCD, indicando sinal sugestivo de nas frações 1V7F4M e 1V11F4M (Figura 3.2). Realizou-se placa separativa destas amostras.



Esquema 3.2 tratamento da fração diclorometano-metanol 1:1

A fração obtida da placa preparativa que continha alcalóide, 1V13F4P, foi submetida ao processo de recristalização com acetato de etila e hexano 1:3 para se obter a amostra 1V15a, caracterizada por cristais na forma de agulhas de cor laranja.

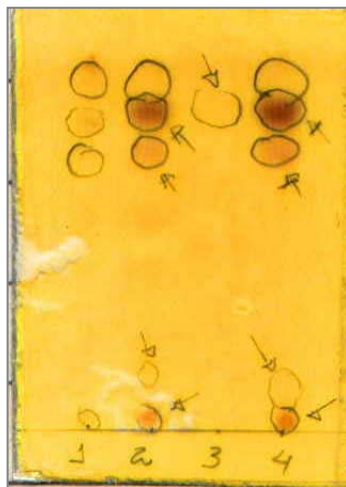
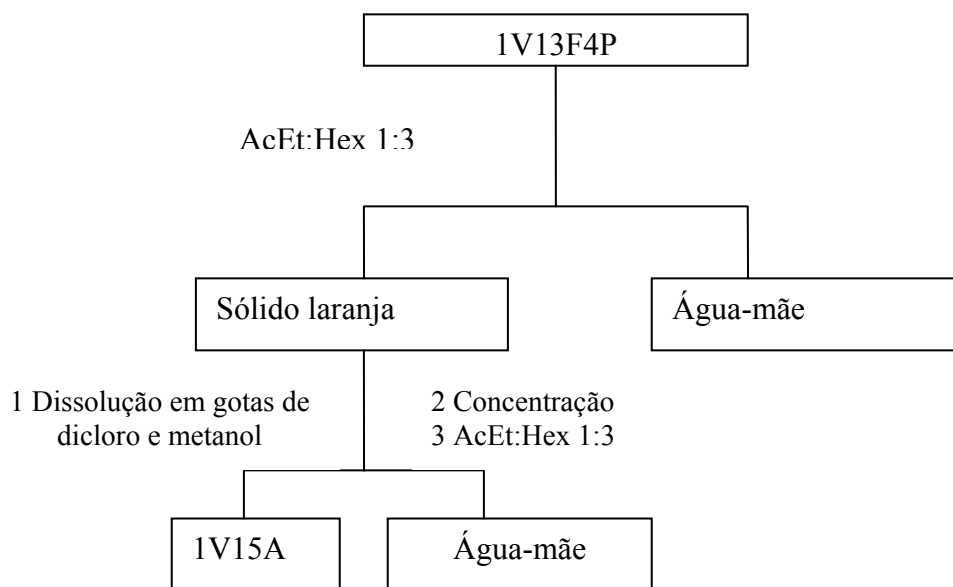


Figura 3.2: Cromatoplaça das frações 1- 1V7F4DL 2- 1V7F4M; 3- 1V7F4D; 4- 1V11F4M.

A amostra 1V15a (0,04g) foi submetida estudos de identificação espectrométrica por RMN ^{13}C e ^1H na Universidade Federal de São Carlos.



Esquema 3.3 Obtenção da amostra 1V15A

3.4 Ensaio Biológico

Têm-se utilizado, desde tempos antigos, plantas com finalidade medicinal. Esse uso tem grande importância, já que podem fornecer drogas para o arsenal terapêutico. Entretanto muitas plantas são conhecidas por serem tóxicas, graças à presença de substâncias que lhes conferem essa característica. (Parra *et al.*, 2001).

A amostra 1V15a (4,9mg) foi submetida ao teste de toxicidade média e citotoxicidade para determinar a toxicidade dessa substância e prever uma possível ação farmacológica.

3.4.1 Teste de toxicidade frente a *Artemia franciscana*

A *Artemia franciscana* L., um camarão de salmoura, pode ser utilizada em bioensaios para prever a concentração letal média (CL₅₀), ou seja, quantidade de droga capaz de produzir a morte em determinada percentagem de uma espécie, usualmente 50%. Esse método que determina a CL₅₀ de compostos ativos ou extratos (µg/mL) em meio salino, tem resultados tão satisfatórios quanto os ensaios realizados *in vivo* (A. Lagarto Parra *et al.*, 2001).

Os ovos de *Artemia franciscana* foram incubados e eclodidos numa placa de Petri contendo solução salina numa concentração de 35g/L de sal marinho sintético, a temperatura ambiente e na presença de luz fluorescente por um período de 48 horas.

Após esse período, acrescentou-se a 12 poços, 10 larvas de *Artemia franciscana* e 10µL da amostra em cada um e 2mL de solução salina. Após 24 horas procedeu-se a contagem das larvas vivas.

3.4.2 Teste com *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti* foram incubados e eclodidos em água potável por um período de 4 dias. Após eclosão, grupos de 10 larvas foram transferidos para copos de plástico juntamente com alimento e 10mL de água destilada.

As amostras testadas foram dissolvidas em DMSO ou Tween 80, de acordo com a polaridade apresentada, e aplicadas em cada copo. Os testes foram realizados com uma concentração de 500 µg/mL de amostra em meio de cultura. A atividade larvicida da amostra foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 horas de incubação.

3.4.3 Teste de atividade antitumoral

O objetivo desta etapa do trabalho foi verificar a citotoxicidade *in vitro* da amostra 1V15a em 4 linhagens de células tumorais. Os testes foram realizados com linhagens de células dos tumores de mama (MCF-7), pele murino (B16 melanoma), cólon humano (HCT-8) e leucemia humana (HL60).

Foram utilizadas 4 placas de 96 cavidades, sendo uma placa para cada linhagem celular. Em cada placa foram deixados 12 cavidades contendo apenas células (grupo controle) e 8 cavidades

onde nada é colocado. As células foram plaquetadas nas concentrações de: HCT-8 e B-16 $0,67 \times 10^5$ cél/mL; MCF-7 e HL 60 $0,3 \times 10^6$ cél/mL;

As células foram cultivadas em meio ROMI 1640 com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, as células controle foram fixadas em ácido tricloroacético 50% gelado e as demais placas foram incubadas com a amostra 1V15a na concentração de 0,39 a 25 µg/mL. A amostra foi diluída em DMSO na concentração estoque de 5mg/mL.

Os resultados dos testes foram expressos em percentual de crescimento celular, o qual foi calculado através da comparação da absorbância do poço teste e o do controle (células em crescimento pleno: 100%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos físicos e cromatográficos de 1V15a

A amostra apresentou –se como um sólido cristalino, de coloração vermelho-alaranjado em forma de agulha. Em placas de CCD revela em presença do reativo de Dragendorff, apresentando intensa coloração marrom-avermelhado, característico de alcalóide. Ponto de fusão em torno de 185°C.

4.2 Identificação de 1V15a

A análise dos espectros de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C em comparação com dados da literatura, levou a conclusão de que 1V15a corresponde ao alcalóide aporfinico Homomoschatolina (**102**) , isolado anteriormente do caule da espécie *Abuta rufescens* e *Abuta imene* (Cava, 1975).

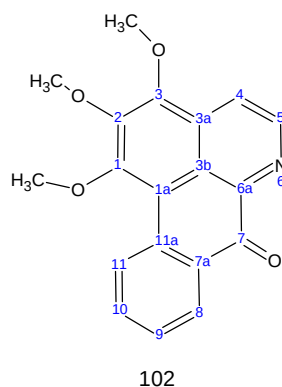


Figura 4.1: Sistema de numeração da homomoschatolina

4.3 Análise do espectro de RMN ^1H

O espectro apresentou um conjunto de sinais característicos e consistentes com a literatura (TABELA 4.1).

Na região do campo relativamente alto do espectro, observa-se singletos em δ 4.02, 4.08 e 4.13 atribuídos aos hidrogênios dos grupos metilas nas posições 1 (OMe), 3 (OMe) e 2 (OMe), respectivamente, da estrutura **102**. O hidrogênio da metila na posição 2 absorve energia em campo mais baixo devido a desblindagem deste próton, causada por seus vizinhos oxigenados e pela proximidade com o nitrogênio do anel piridínico (FIGURA 4.2).

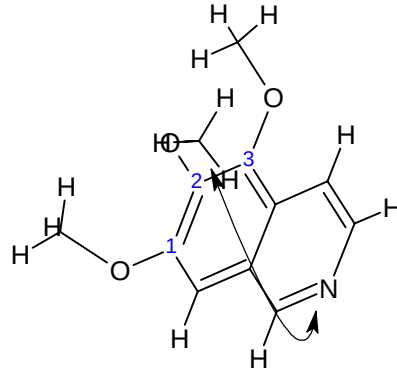


Figura 4.2: Ação dos grupos vizinhos sobre o hidrogênio da posição 2

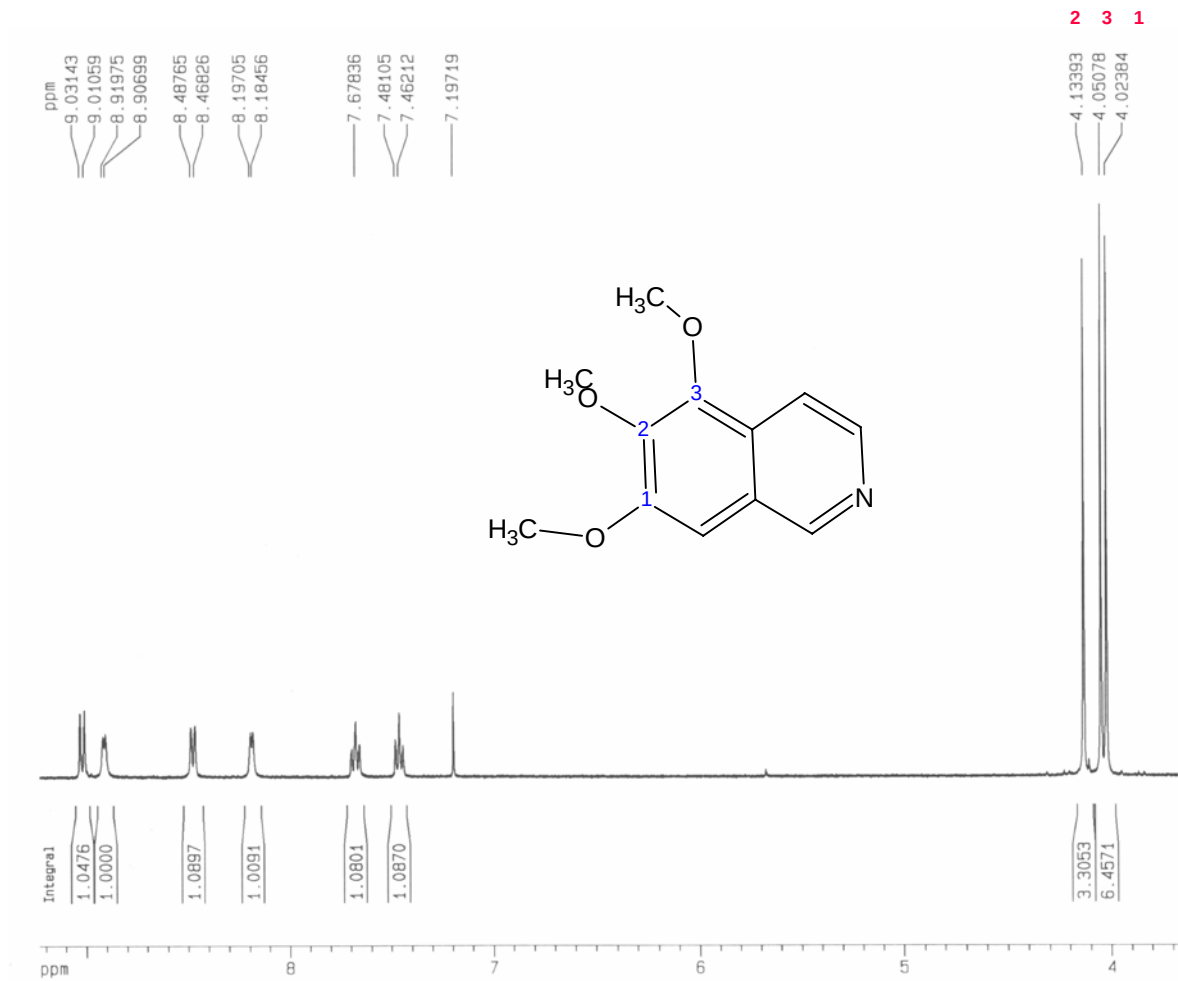


Figura 4.3: Sinais dos grupos metilas no espectro de RMN ^1H

A maior concentração de sinais ocorre na região aromática. Na ampliação dessa região observa-se um tripleto centralizado em δ 7.5, com integral para um hidrogênio, que foi atribuído ao hidrogênio 9 do composto 102. Apresenta constante de acoplamento 7.38 Hz.

Em δ 7.7 há um tripleto com constante de acoplamento 7.74 Hz e integral para um hidrogênio. Esse sinal é atribuído ao hidrogênio 10.

O dubleto centrado em δ 8.18 e o dubleto em δ 8.9, são caracterizados como sinais correspondentes aos hidrogênios 4 e 5 do anel piridínico, como indicado por suas constantes de acoplamento 5 Hz e 5.1 Hz, respectivamente. Cada um possui integral para um hidrogênio.

Ainda na região aromática, observa-se dois dubletos em δ 8.4 e 9.0 com J de acoplamento de 7.76 e 8.34 Hz. Suas integrais são para um hidrogênio. Esses sinais correspondem ao hidrogênio 8 e hidrogênio 11 da estrutura 102. Esses dois hidrogênios estão localizados em campo baixo no espectro por sofrerem ação dos grupos que são capazes de deslocar a nuvem eletrônica. O H-11 interage com o grupo metiléter, por ligação intramolecular, e H-8 com o grupo carbonila (FIGURA 4.4).

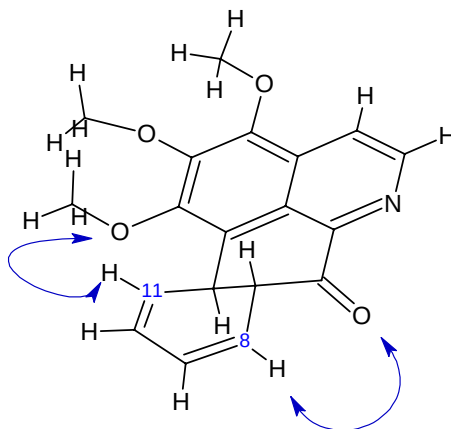


Figura 4.4: Interações de H-8 e H-11 com os grupos vizinhos

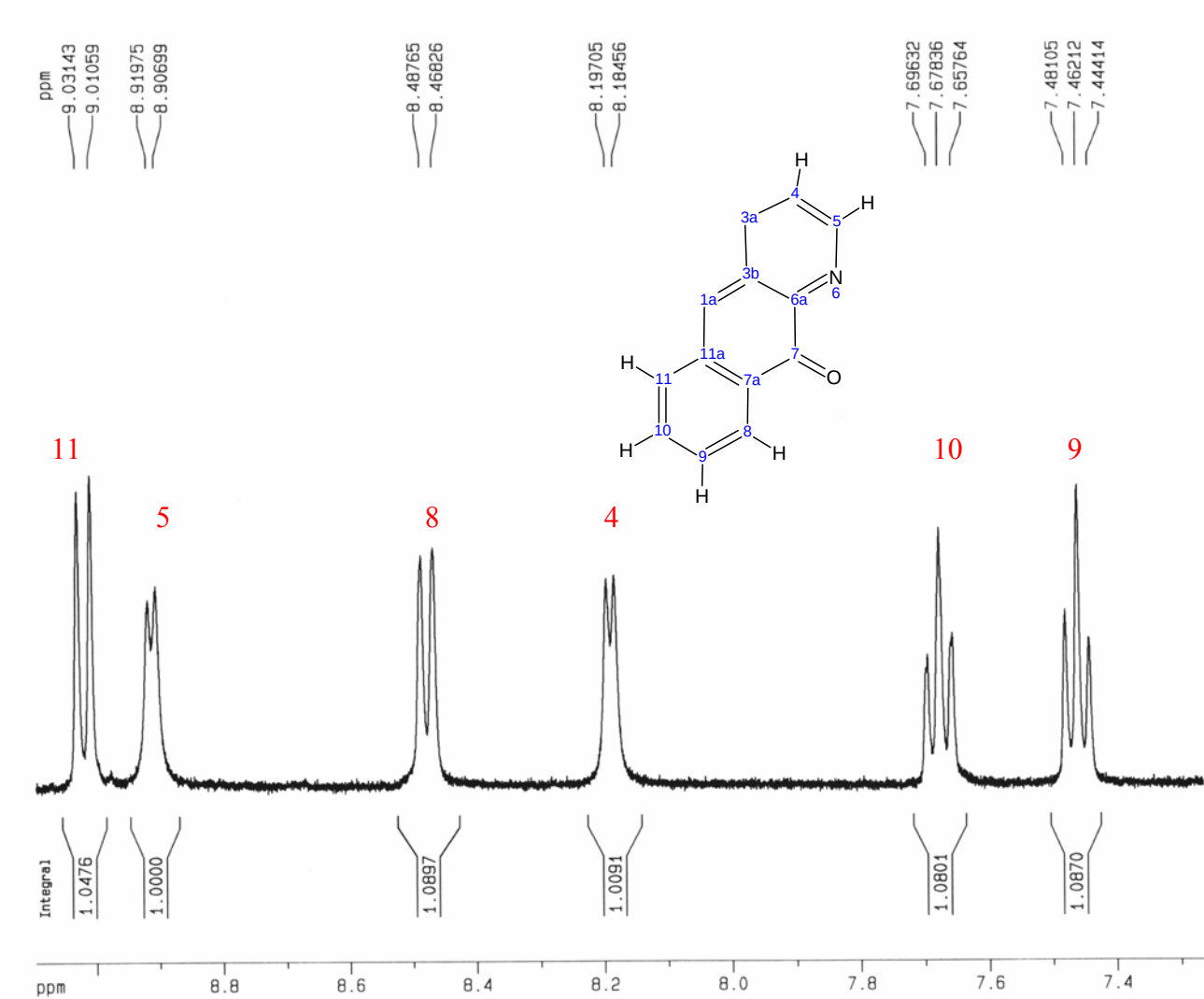


Figura 4.5: Região aromática ampliada RMN ^1H

Tabela 4.1 Comparação entre dados da literatura e valores obtidos de RMN ^1H

No. H	400 MHz, CDCl_3			
	Literatura (WIJERATNE, 1996)		Valores obtidos	
1	4.05	S, 3H	4.02	S, 3H
3	4.08	S, 3H	4.05	S, 3H
2	4.17	S, 3H	4.13	S, 3H
9	7.54	t (J = 7,54 Hz), 1H	7.5	t (J = 7,38 Hz), 1H
10	7.75	dt (J = 7.93, 1.22 Hz), 1H	7.7	t (J = 7.73 Hz), 1H
4	8.21	d (J = 5.49 Hz), 1H	8.2	d (J = 5.0 Hz), 1H
8	8.58	dd (J = 7.93, 1.22 Hz), 1H	8.4	dd (J = 7.8, 1.2 Hz), 1H
5	8.97	d (J = 5.49 Hz), 1H	8.9	d (J = 5.1 Hz), 1H
11	9.10	d (J = 7.93 Hz), 1H	9.0	d (J = 8.34 Hz), 1H

4.4 Análise do espectro de IV

O espectro na região do infravermelho apresentou uma banda de absorção 2854 cm^{-1} atribuída à deformação axial C-H das metilas do grupo metiléter.

Em 1662 cm^{-1} observa-se uma banda de absorção que foi atribuída ao grupo carbonila conjugado com 2 anéis aromáticos. Essa conjugação diminui a frequência de absorção devido a deslocalização dos elétrons π da carbonila.

A banda de absorção em 1476 cm^{-1} corresponde à deformação axial C-C da região aromática. O valor em 1393 cm^{-1} pode ser atribuído à deformação axial C-N do anel piridínico. A absorção em 1311 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de C-O-C.

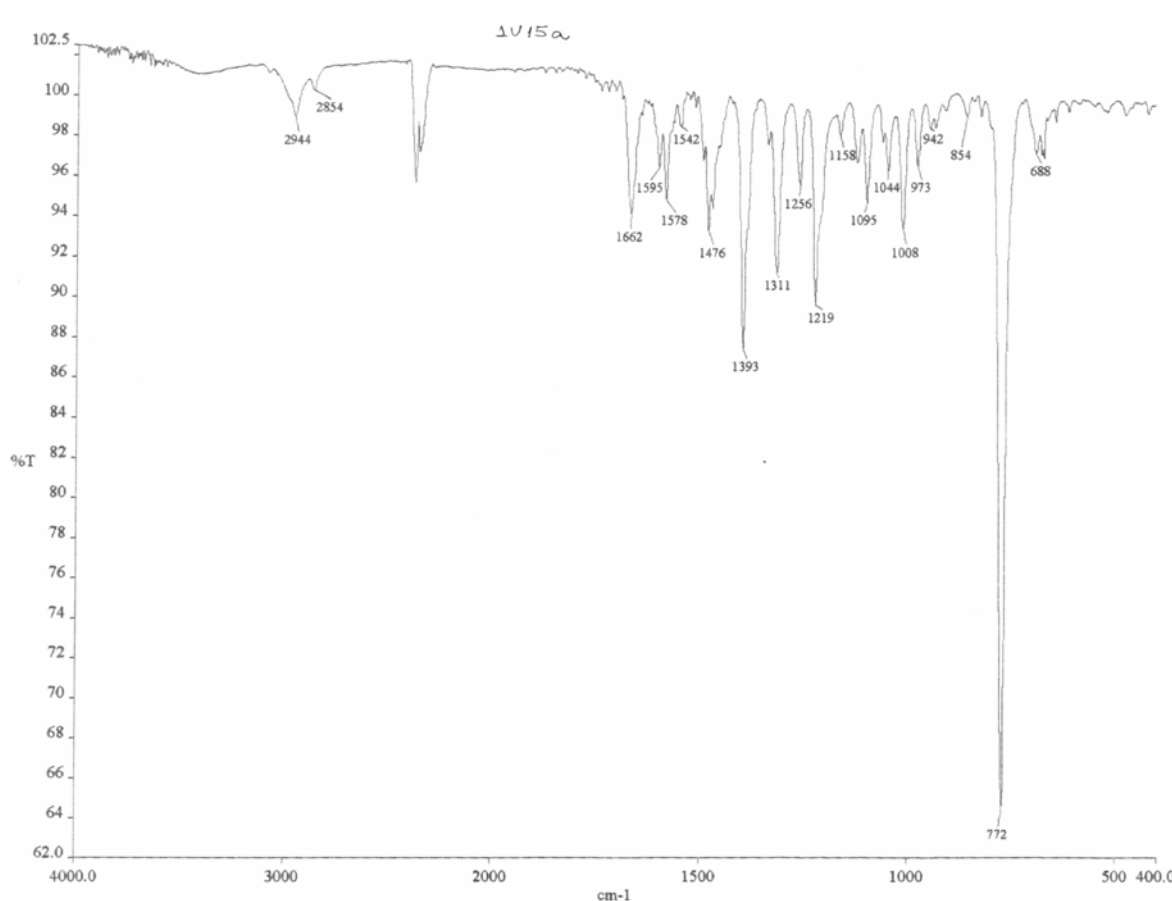


Figura 4.6: Espectro de absorção em IV

4.5 Análise do espectro de RMN ^{13}C

O espectro não é completo o suficiente para uma Análise precisa. O deslocamento em δ 144.6 é característico para anel piridínico e corresponde ao carbono 5, ligado diretamente ao nitrogênio. Os valores que variam entre δ 126 e 134.3 correspondem aos carbonos pertencentes ao anel aromático. O deslocamento em δ 119 foi atribuído ao carbono 4 da estrutura.

Tabela 4.2 Comparação entre dados obtidos de RMN ^{13}C , HMBC e HSQC

No. C	Dados de RMN ^{13}C deslocamento em ppm	Dados de HMBC deslocamento em ppm	Dados de HSQC deslocamento em ppm
1Me	61		61
2Me	61.8		61.8
3Me	61.4		61.4
1		169	
2		178	
3		168	
3a		166	
3b	77		
4	119		119
5	144.65		144
6	—		
6a		153	
7			
7a			
8	128.1		128
9	127.6		127.6
10	134.3		134
11	126.1		126
11a	128.9		

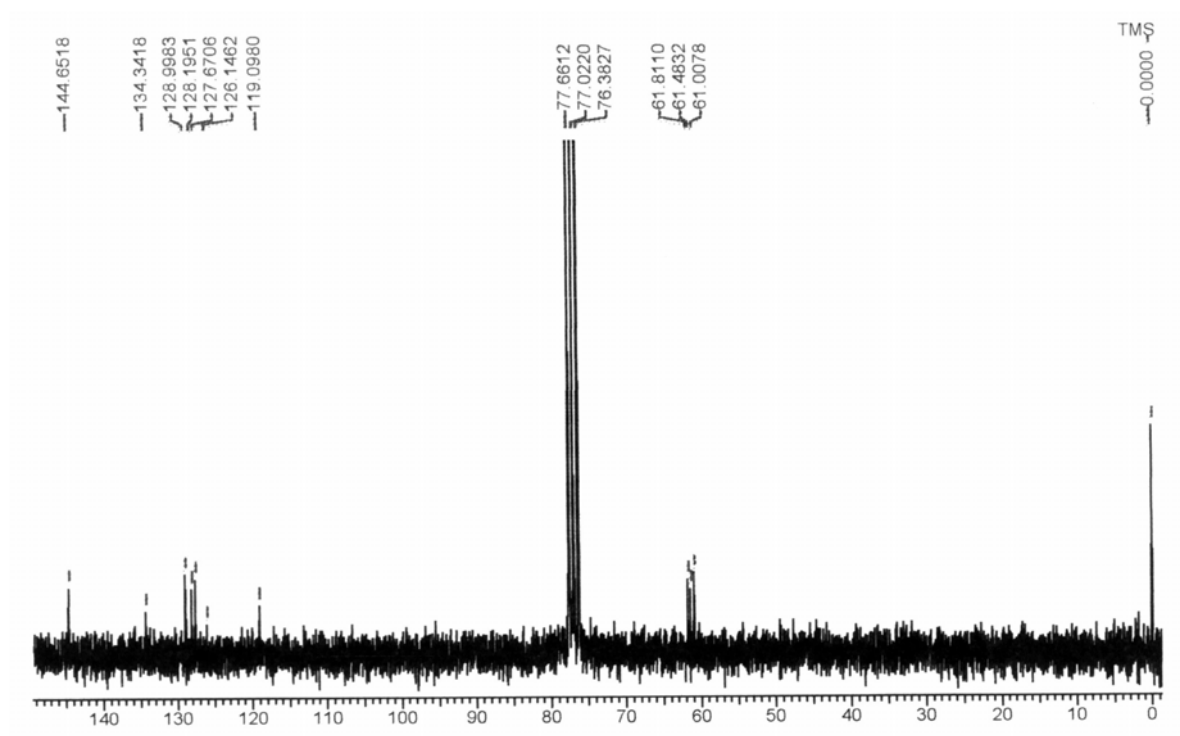


Figura 4.7: Espectro de RMN ^{13}C

4.6 Análise do espectro de COSY

O espectro de correlação ^1H - ^1H confirma a análise feita com o espectro de ^1H . Na FIGURA 4.8 pode-se verificar que os hidrogênios H-5 e H-4, pertencentes ao anel piridínico, estão acoplados apesar da diferença no deslocamento químico. O próton H-11 acopla apenas com H-10. Os hidrogênios 8, 9 e 10 estão acoplados no mesmo sistema aromático.

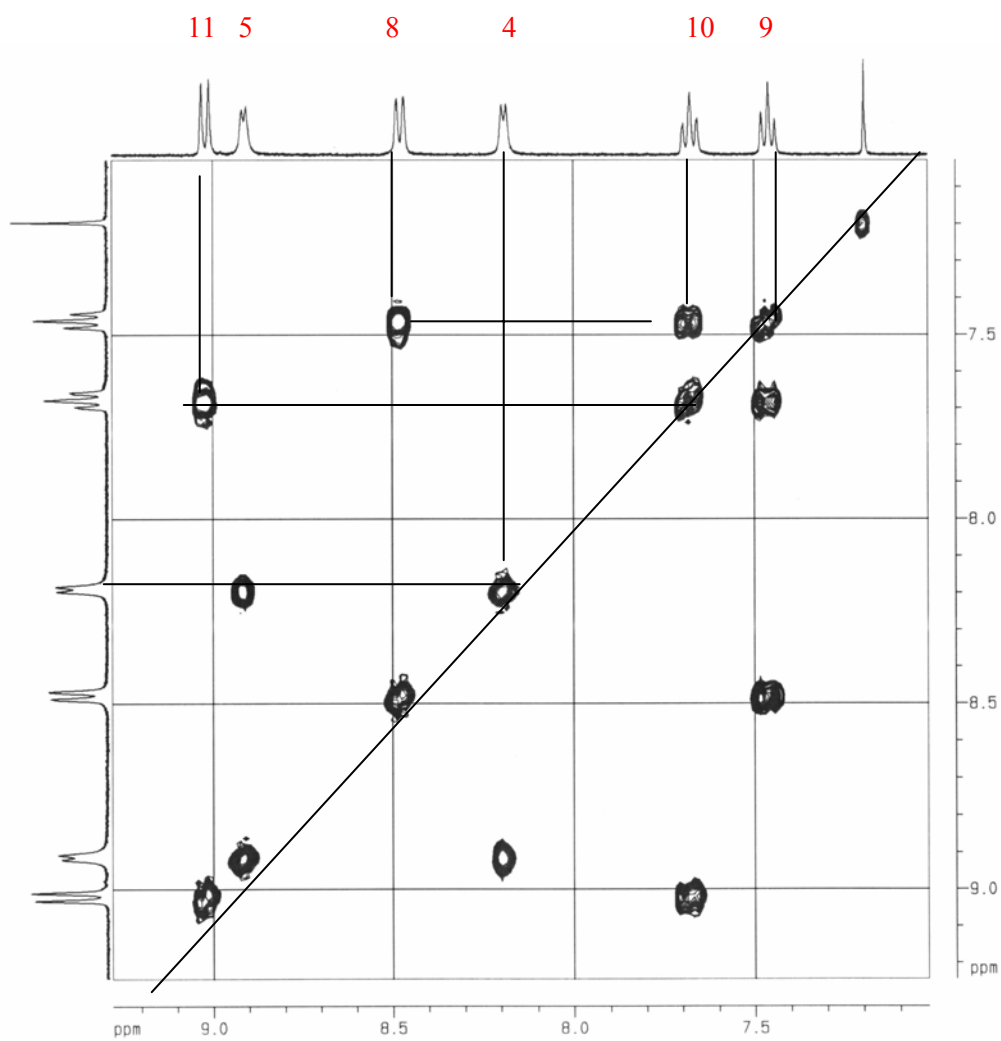


Figura 4.8: Ampliação da região aromática do Espectro COSY

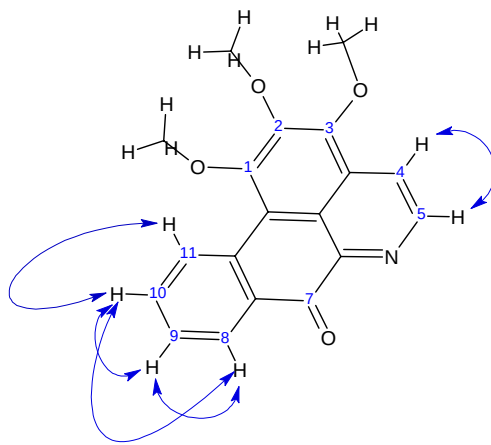


Figura 4.9: Correlação entre os hidrogênios

4.7 Análise do espectro de HMBC

O espectro de correlação ^1H - ^{13}C mostra, conforme FIGURA 4.9, o acoplamento entre os carbonos quaternários e os prótons dos carbonos vizinhos. Os prótons H-2 e o H-3 estão correlacionados com o C-1 e com C-3, enquanto que o próton H-1 acopla-se apenas com o C-2.

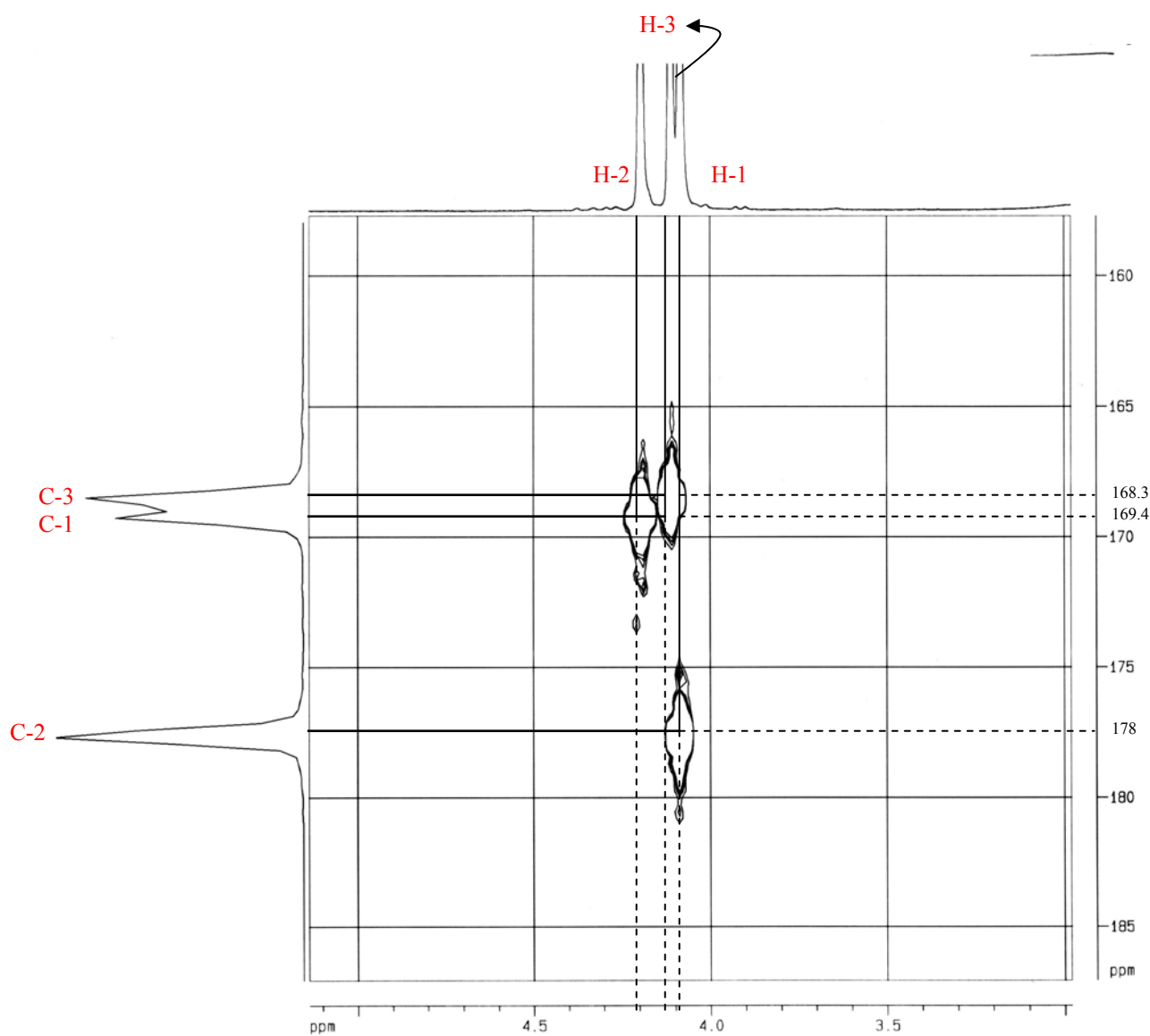


Figura 4.10: Ampliação do Espectro HMBC

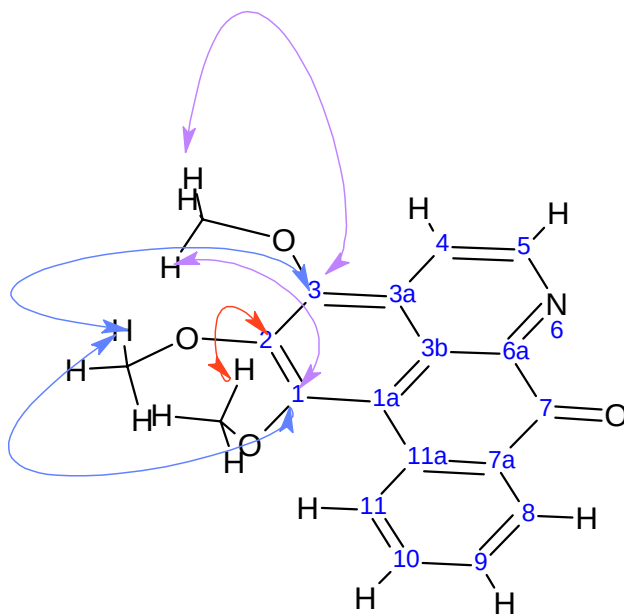


Figura 4.11: Correlação entre carbonos quaternários e prótons das metoxilas

Na FIGURA 4.13 observamos a correlação entre o próton H-4 e os carbonos C-5, C-3 e C-3a, e o próton H-5 e os carbonos C-3a e C-6a.

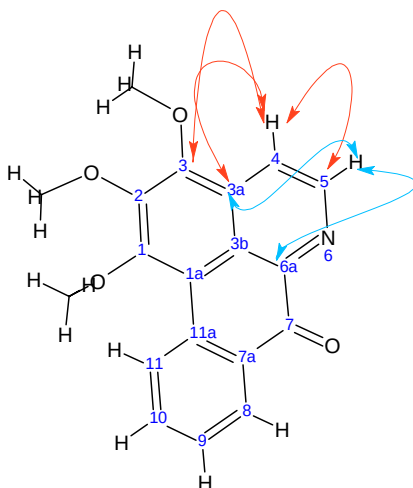


Figura 4.12: Correlação entre carbonos e prótons do anel isoquinolínico

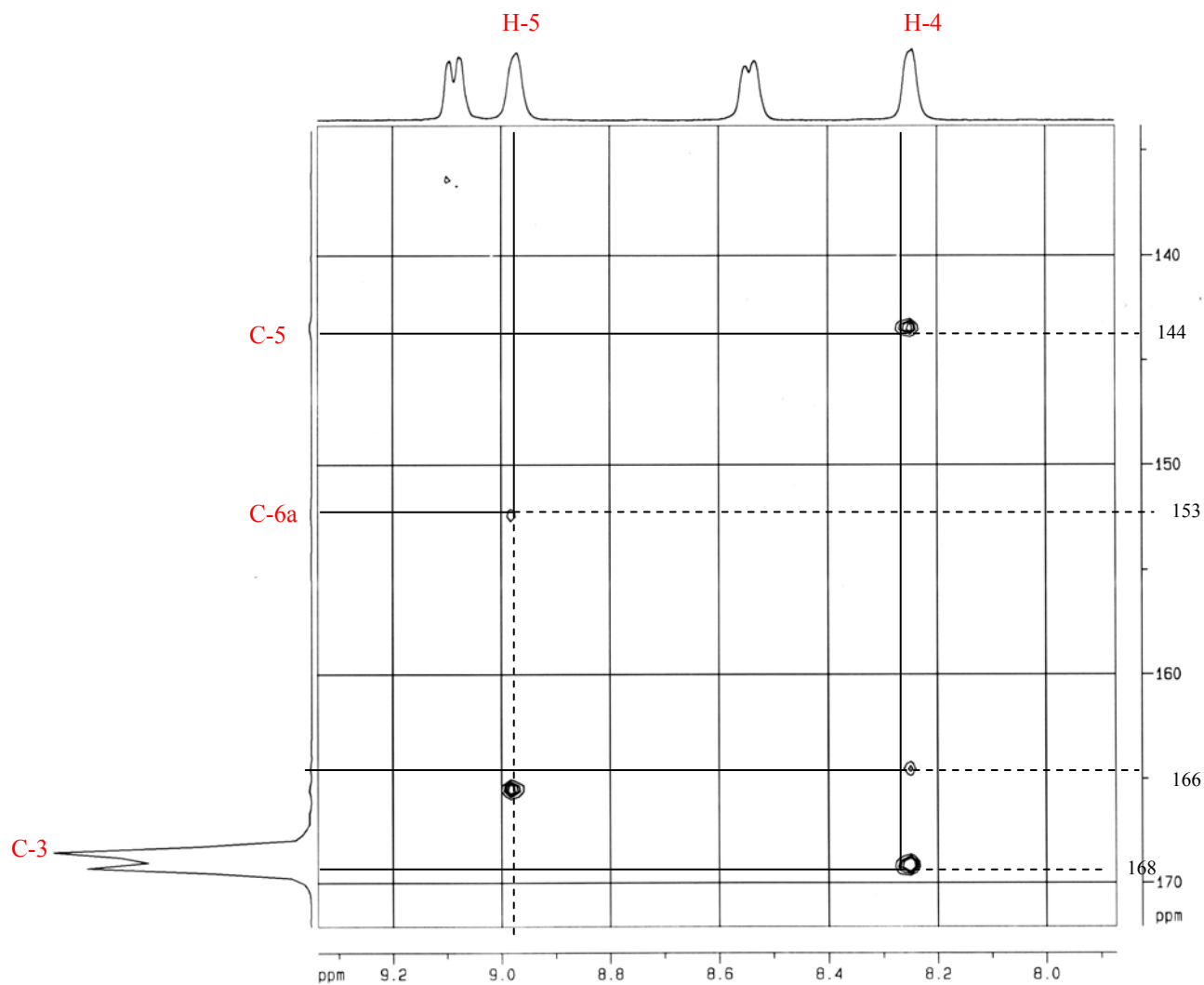


Figura 4.13: Ampliação do Espectro HMBC

4.8 Análise do espectro de HSQC

Neste espectro verificamos a correlação entre os carbonos protonados e seus respectivos prótons. Na FIGURA 4.14 observamos a relação entre os prótons metílicos e seus respectivos carbonos com deslocamento entre 60 e 61ppm.

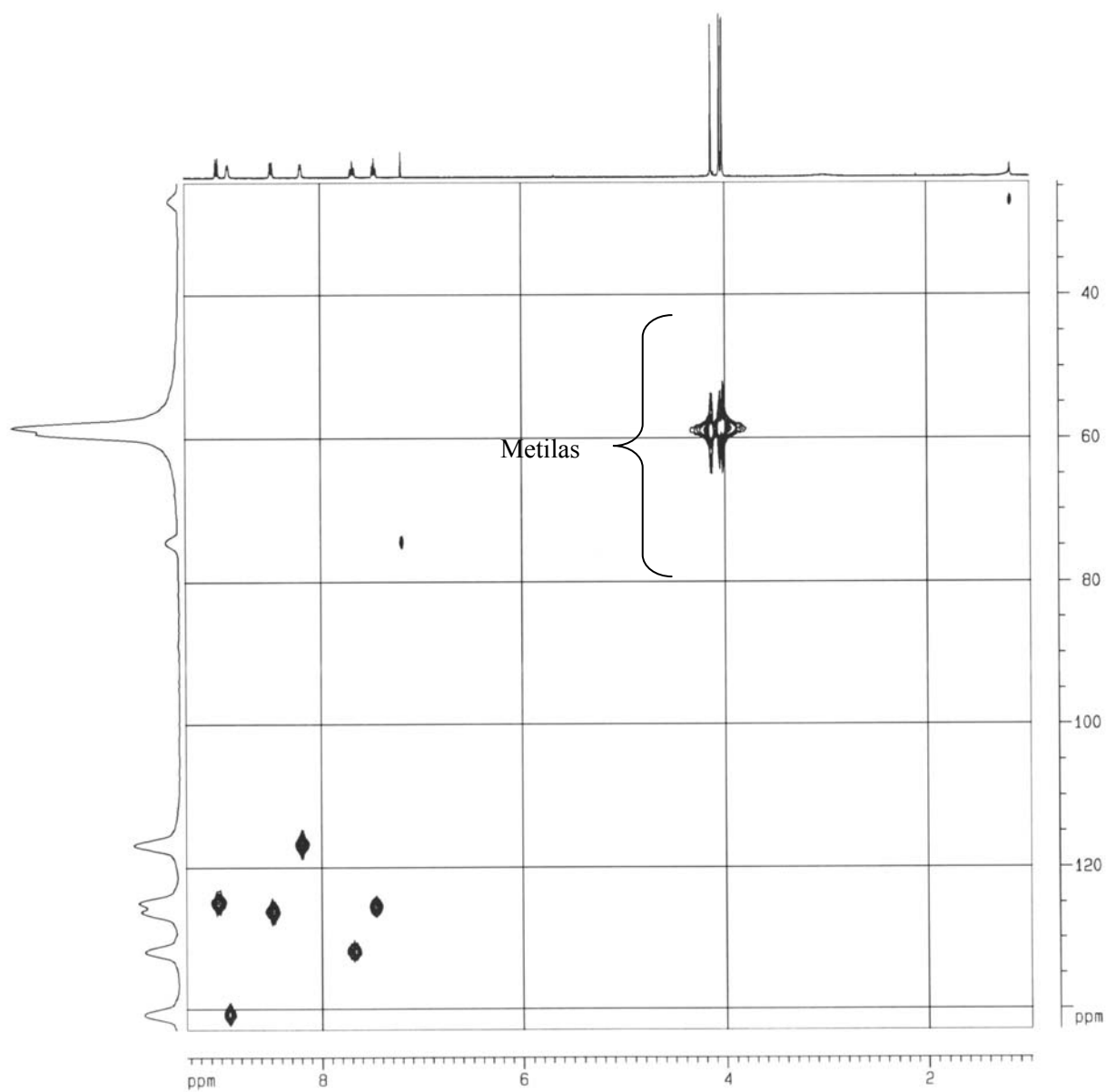


Figura 4.14: Ampliação do Espectro HSQC

Na FIGURA 4.15 temos a correlação entre os prótons e os carbonos do anel aromático e piridínico.

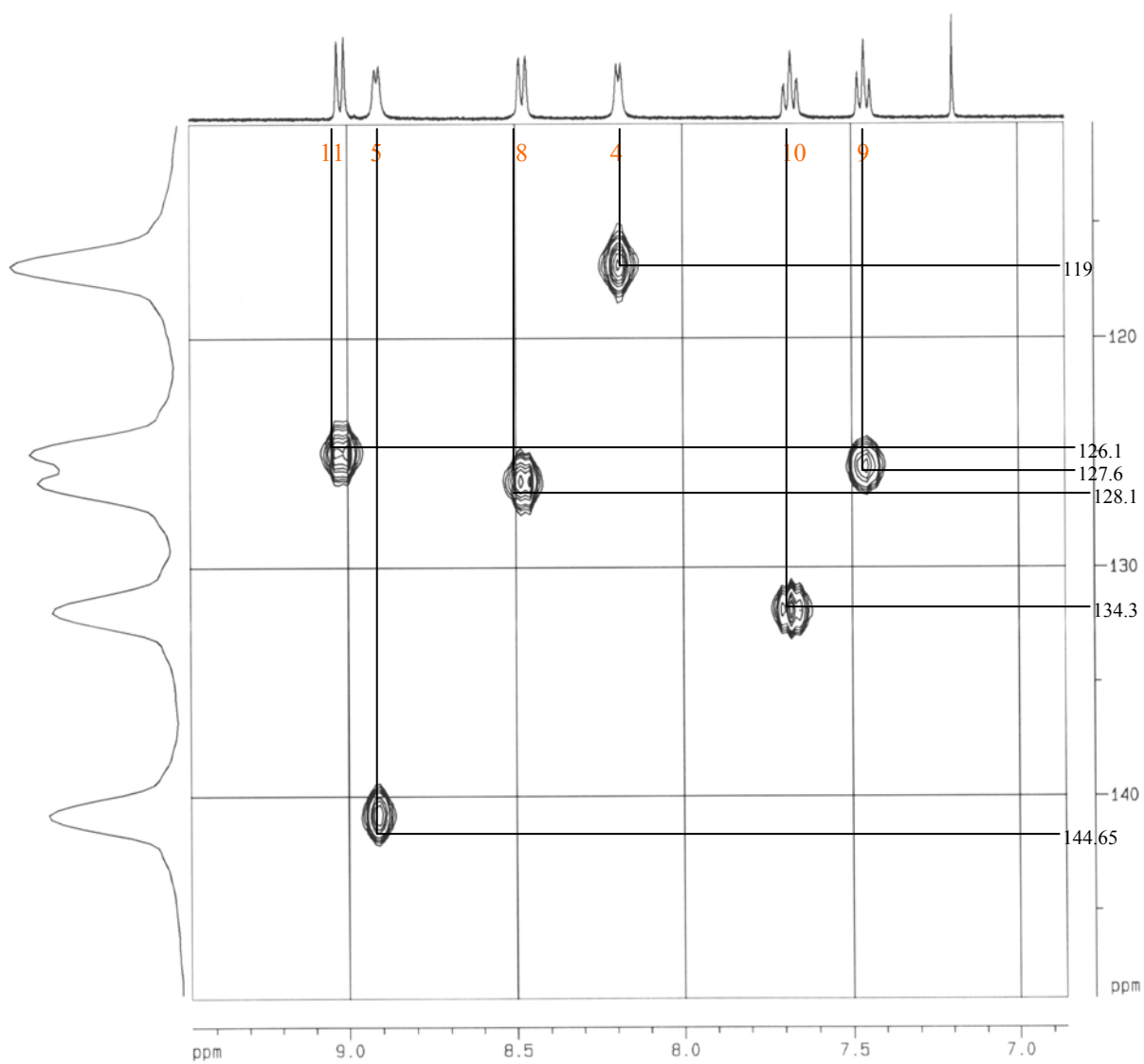


Figura 4.15: Ampliação do Espectro HSQC

4.9 Avaliação dos testes biológicos

A homomoschatolina mostrou-se pouco ativa contra as larvas de *Aedes aegypti*, embora tenha apresentado letalidade significativa contra as larvas de *Artemia franciscana*. No estudo da atividade antitumoral, teve uma CI_{50} maior que $25\mu\text{g/mL}$ nas quatro linhagens de células testadas, não apresentando potencial citotóxico em nenhuma delas.

Tabela 4.2. Bioatividade do alcalóide

Amostra	<i>Artemia franciscana</i>		<i>Aedes aegypti</i>
	Mortalidade %	$CL_{50} \mu\text{g/mL}$	Mortalidade%
Homomoschatolina	94	500	17

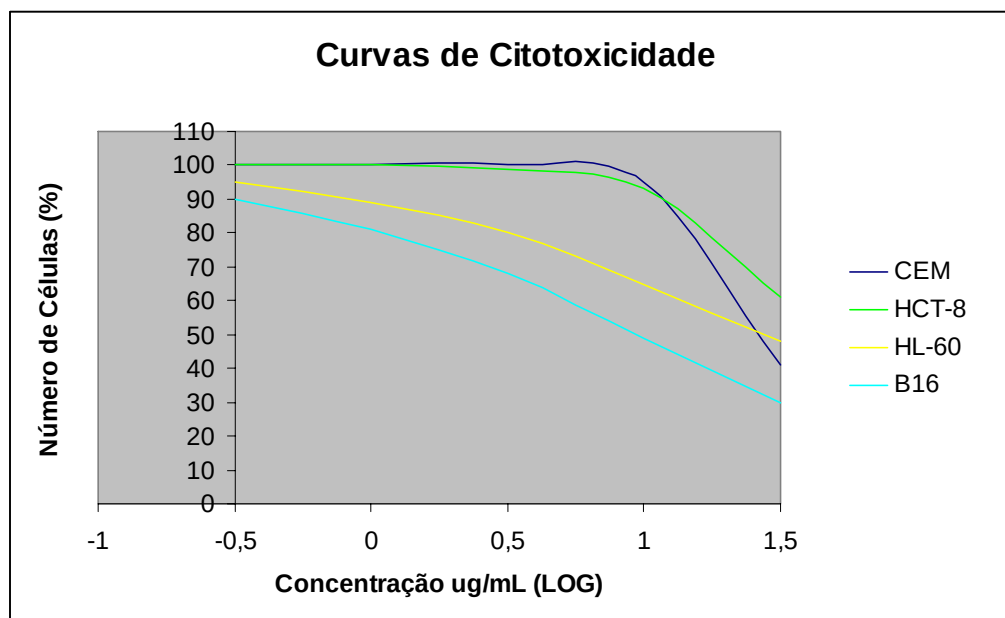


Figura 4.10: Gráfico de citotoxicidade

CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do cerne da *A. rufescens* resultou na identificação da estrutura Homomoschatolina, que já havia sido isolada nesta mesma espécie (CAVA, 1975) . Este alcalóide apresentou significativa letalidade in vitro contra *Artemia franciscana* e baixo potencial larvicida contra *Aedes aegypti*.

Este alcalóide apresenta uma estrutura planar, aquiral e susceptível a redução. Essas características agregadas ao fato de ter apresentado boa taxa de letalidade sugeriram um potencial terapêutico. No entanto, com os testes antitumorais, mostrou-se pouco útil como antineoplásico com baixa atividade contra as células testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.; NAVARRO, D.; MEDEIROS, I. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 247–252, 1998.

ALMEIDA, R.; NAVARRO, D.; MEDEIROS, I. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 63, p.247-52, 1998.

BLANCHELDA, J.; SANDS, D.; BYRIEL, K. Characterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. **Phytochemistry**, v. 63, p. 711-720, 2003.

CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P.; SOLIS, P.; GUPTA, M.; PIETERS, L.; VAUQUELIN, G. In vitro effect of sanguinarine alkaloid on binding of [3H] candesartan to the human angiotensin AT1 receptor. **European Journal of Pharmacology**, v.458, 257– 262, 2003.

CAVA, M.; BUCK, K.; RAO, M.G. The alkaloids of *Abuta imene* and *Abuta rufescens*. **Tetrahedron**, v. 31, p. 1667-69, 1975.

CHINTALWAR, G.; JAIN, A.; SIPAHIMALANI, A.BANERJI, A.; SUMARIWALLA, P.; RAMAKRISHNAN, R.; SAIANIS, K. An immunologically active arabinogalactan from *Tinospora cordifolia*. **Phytochemistry**, v.52, p. 1089-1093, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York, 1981.

DE MARCO, F.; MARCANTE, M.; ROSEI, M. Citotoxicity dopamine-derived tetrahydroisoquinolines on Melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.1503-12, 2002.

DIWANAY, S.; CHITRE, D.; PATWARDHAN, B. Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.49–55, 2004.

DUTÉ, P.; WEBER, F.; CAVÉ, A.; BRUNETON. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta pahni*, **Phytochemistry**, v. 26, p. 2136-37, 1987.

DUTY, P.; WEBER, J.; FOURNET, A. Bis-benzylisoquinoline alkaloid from *Abuta pahnii*. **Phytochemistry**, v. 28, p.2136-37, 1987.

FREITAS, M.; ALENCAR, J.; CUNHA, E. Milonine, na 8,14-dihidromorfinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1553-55, 1995.

GAHMS, D.; WREMER, D.; CAZM, J. Cissampentin: A New Bisbenzylisoquinoline Alkaloid from *Cissampelos fasciculata*. **Tetrahedron**, v.49, n.1, p. 1337-41, 1993.

GUINADEAU, H. ; BASHIR, M.; COLTON, M.; FREYER, A.; SHAMMA, M. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cocculus penduculus*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 829-32, 1987.

HAMMOND, G.; BAENZIGER, N.; WIEMER, D. Dammara-20,25-dien-3 β , 24 α -diol: A natural repellent of *Acromyrmex octospinus*. **Phytoschemistry**, v. 29, p. 783-85, 1990.

ITOIGAWA, M.; ITO, S.; WU, T.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive acivity of acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. **Cancer Letters**, 2003.

JAYASINGHE, L.; OYAMA, K.; FUJIMOTO, Y. 3-Deoxy-1,20-dihydroxyecdysone from the leaves of *Diploclisia glaucescens*. **Steroids**, vol.67, p. 555-558, 2002.

JAYASINGHE, L.; OYAMA, K.; FUJIMOTO, Y. A new ecdysteroid, 2-deoxy-5,20-dihydroxyecdysone from the fruits of *Diploclisia glaucescens*. **Steroids**, v. 68, p. 447-450, 2003.

JAYASINGHE, L.; OYAMA, K.; FUJIMOTO, Y. Bidesmosidic saponins from the fruits of *Diploclisia glaucescens*. **Phytochemistry**, v. 62, p.563–567, 2003.

KANG, Y.; LEE, B. ; LEE, Y.; SEO, H. Supression of tumor necrosis and inducible nitric oxide synthase gene expression by THI-52, a new synthetic alkaloid. . **Biochemical Pharmacology**, v. 65 , p. 457-464, 2003.

KONDO, Y.; TAKANO, F.; HOJO, H. Inhibitory effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on nitric oxide production in activated macrophages. **Biochemical pharmacology**, v. 46, p.1887-92, 1993.

LE COINTE, Paul. Amazônia brasileira III: árvores e plantas úteis. 2ed. Companhia, 363p. São Paulo, 1947.

LIRA, G.; ANDRADE, L.; FLORÊNCIO, K.; SILVA, M. BARBOSA, J. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v.73, p. 356-358, 2002.

MAURYA, R.; MANHAS, L.; GUPTA, P. Amritosides A, B, C and D: clerodane furano

diterpene glucosides from *Tinospora cordifolia*. **Phytochemistry**, 2004.

MAZZINI, S.; BELLUCCI, M.; MONDELLI, R. Mode of Binding of the Cytotoxic Alkaloid berberine with the Double Helix Oligonucleotide D(AAGAATTCTT). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 505-514, 2003.

MELO, P.; CAVALCANTE, H.; BARBOSA-FILHO, J. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 143-151, 2003.

MENACHERY, M.; STERN, W. ; STEINBEISER, S.; KILLMER, L. Cavanine, a novel-hydroxybisbenzylisoquinoline alkaloid from *Sciadotenia toxifera* (Krukoff and A. C. Smith). **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 2843–2846, 2000.

PINHEIRO, M.; WOLTER, W.; ROCHA, A.; PORTER, B. Abutasterone, an ecdysone from *Abuta velutina*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2320-21, 1983.

PIUVEZAM, M.; PEÇANHA, L.; ALEXANDER, J. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 93–101, 1999.

ROCHA, I.; CAVA, M. A presença de palmatina na *Abuta grandifolia*. **Publicação INPA** n.11, 1969.

SATO, K.; NAGAI, F.; ONO M.; AOKI, N. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by the extract of *Stephania cepharantha* and bisbenzylisoquinoline alkaloid cycleanine, a major constituent.

Biochemical Pharmacology, v. 66, p. 379–385, 2003.

SCHULTZ, Alarich. **Introdução ao estudo da botânica sistemática**. 3ed. 2v. Editora Globo. Porto Alegre, 1963.

SI, D.; ZHONG, D.; SHA, Y.; LI, W. Biflavonoids from the aerial part of *Stephania tetrandra*.

Phytochemistry, v.58, p. 563–566, 2001

SILVERTON, J.; KABUTO, C.; CAVA, M. Structure of imerubrine, a novel condensed tropolone-isoquinoline alkaloid. **Journal of the American Chemical Society**, 1977.

Sugimoto, Y.; Babiker, H.; Inanaga, S.; Kato, M.; Isogai, A. Oxoisoaporphines from *menispermum dauricum*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1431-1435, 1999.

TANTISEWIE, B.; PHARADA, K.; AMNAUYPOL, S.; GUINAUDEAU, H.; SHAMMA, M. A new subgroup of bisbenzylisoquinoline alkaloids: Cycleatjehene and cycleatjehine. **Tetrahedron**, v. 46, p. 325-330, 1990.

THORNER, C. W. Alkaloids of the Menispermaceae. **Phytochemistry**, v. 9, p. 157-187, 1970.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; BOONRASRI, N.; BREMNER, J.; TAYLOR, W. Rearranged

clerodane diterpenes from *Tinospora baenzigeri*. **Phytochemistry**, v.52p. 1335-1340, 1999.

YU, B.; CHEN, J.; WANG, Y.; CHENG, K. Alkaloids from *Menispermum dauricum*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 439–442, 2002.

ZARIDAH, M.; ADID, S.; OMAR, W.; KHOZIRAH, S. In vitro antifilarial effects of three plant species against adult worms of subperiodic *Brugia malayi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 79-84, 2001.