



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE ALCALOIDES DE
ESPÉCIES DE *ASPIDOSPERMA SPP* POR LC-MS**

BETINA RAQUEL DE OLIVEIRA ARAUJO
MESTRADO

MANAUS
2022

BETINA RAQUEL DE OLIVEIRA ARAUJO

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE ALCALOIDES DE
ESPÉCIES DE *ASPIDOSPERMA SPP* POR LC-MS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, exigida para o título de mestre em Química com ênfase na Linha de Pesquisa de Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Prof.a Dra. RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA
ORIENTADORA

MANAUS
2022

Ficha Catalográfica

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

A663i Araujo, Betina Raquel de Oliveira
Investigação do perfil de alcaloides de espécies de *Aspidosperma* spp por LC-MS / Betina Raquel de Oliveira Araujo . 2022
100 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rita de Cassia Saraiva Nunomura
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aspidosperma desmanthum*. 2. *Aspidosperma marcgravianum*.
3. *Aspidosperma nitidum*. 4. alcaloide. 5. gnps. I. Nunomura, Rita de Cassia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Investigação do perfil de alcaloides de espécies de
Aspidosperma spp por LC-MS)*

BETINA RAQUEL DE OLIVEIRA ARAUJO

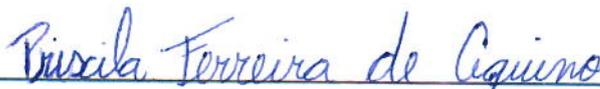
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre (a) em Química.

Aprovada em, 31 de março de 2022.



RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador



PRISCILA FERREIRA DE AQUINO (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



PATRICIA HIDALGO (UEA)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 31 de março de 2022.

“Este projeto de pesquisa é dedicado aos meus avós, João Oliveira (*in memoriam*) e Isabel Barbosa, por todo cuidado e carinho. Grata por tudo!”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção e refúgio nos momentos de desesperança e incertezas;

À Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura pelas suas orientações, acolhimento, oportunidade de crescimento, paciência, tolerância e confiança para com a realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, e aos laboratórios da Central Analítica pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e infraestrutura;

À Fundação de Amparo e Pesquisa no Amazonas pelo auxílio financeiro;

Ao prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura, ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi pelas análises de Espectrometria de Massas Acopladas a Cromatografia Líquida, fundamentais na execução deste projeto;

Aos técnicos Felipe Moura Araújo da Silva (UFAM) e Magno Perêa Muniz (INPA) pelo conhecimento compartilhado e paciência.

Ao Dr. Gemilson Pontes e a Dra. Simone Schneider Weber pela colaboração nos testes de atividade biológica;

Aos amigos do Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos (LAEQ) pelo companherismo e conhecimento dividido, pela ajuda na parte experimental, pelos lanches, por cada carona e principalmente, por sempre manterem o ambiente de trabalho leve e saudável.

A minha família pelo incentivo e apoio dado durante minha caminhada, pela preocupação e cuidado.

Aos amigos por cada frase de carinho e motivação;

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

"Devemos acreditar que somos talentosos para alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada."

Marie Curie

RESUMO

O gênero *Aspidosperma* é conhecido pelos seus metabólitos secundários, dentre os quais se destaca os alcaloides indólicos, classe de composto amplamente conhecido pela indústria farmacêutica devido suas diversas funções no sistema biológico. Assim, este estudo objetivou contribuir com o conhecimento sobre o perfil alcaloídico presente na casca de *A. desmanthum*, *A. marcgravianum* e *A. nitidum* por meio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), avaliar o potencial antioxidante, a inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade citotóxica e avaliar a atividade antimicrobiana por meio de ensaios *in vitro*. As cascas das espécies de *Aspidosperma* foram submetidas a extração em metanol, seguido de um fracionamento ácido-base; e obteve ainda o extrato aquoso. As amostras obtidas foram analisadas pela plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Networking*) para a construção de uma rede molecular, onde foi possível identificar nove alcaloides indólicos, sendo estes compartilhado entre as espécies. Entre os alcaloides identificados destacam-se a ioimbina, reserpilina e ajmalicina, por serem alcaloides precursores de outros alcaloides de grande relevância. Por meio da avaliação da atividade antioxidante pode-se observar a importância da realização de mais de um método para determinar o poder inibição dos radicais livres de uma amostra, uma vez as amostras testadas neste trabalho demonstraram atividade antioxidante no teste poder de redução do íon ferro (FRAP) e tiveram pouca eficiência no ensaio de sequestro do radical DPPH. Na análise da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase a fração proveniente da *A. marcgravianum* possui maior percentual de inibição, 72,32%, porém a amostra do extrato metanólico apresentou maior efetividade, CI_{50} 3,38. A citotoxicidade das frações alcaloídicas foram analisadas por meio no método MTT, em células normais e células tumorais (células HL60). No entanto, frações testadas demonstraram ausência de seletividade frente as células avaliadas. O extrato metanólico da *A. marcgravianum* obteve 3,12 $\mu\text{g/mL}$ de concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus* e foi a única amostra reativa contra *P. aeruginosa* com CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$. As espécies estudadas tem significativo potencial para isolamento de alcaloides indólicos e representa uma opção para investimento de estudos futuros.

Palavras-chaves: *Aspidosperma desmanthum*; *Aspidosperma marcgravianum*; *Aspidosperma nitidum*; alcaloide; GNPS.

ABSTRACT

Aspidosperma genus is known for its secondary metabolites, among which we can highlight the indolic alkaloids, a class of compounds widely known by the pharmaceutical industry due to their various functions in the biological system. Thus, this study's objective is to contribute to the knowledge about the alkaloid profile present in the bark of *A. desmanthum*, *A. marcgravianum*, and *A. nitidum* through liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and to evaluate the antioxidant potential, the inhibition of acetylcholinesterase enzyme, cytotoxic activity and to assess the antimicrobial activity through in vitro assays. The barks of *Aspidosperma* species were submitted to methanol extraction, followed by an acid-base fractionation, and the aqueous extract was also prepared. The samples obtained were analyzed by LC-MS, and the GNPS (Global Natural Products Social Networking) platform was used to construct a molecular network, where it was possible to identify nine indolic alkaloids, which were shared among the species. Among the identified alkaloids, ioimbin, reserpiline, and ajmalicine stand out because they are precursor alkaloids of other alkaloids of great relevance. Through the evaluation of the antioxidant activity, it is possible to observe the importance of performing more than one method to determine the antioxidant activity of a sample. In this study, for example, the samples tested showed antioxidant activity by the Ferric Reduction Antioxidant Power (FRAP) and had lower efficiency in the DPPH radical scavenging assay. The inhibitory activity of the acetylcholinesterase assay showed the fraction from *A. marcgravianum* with the highest percentage of inhibition, 72.32%, but the sample of the methanolic extract showed higher effectiveness, CI50 3.38. The alkaloidic fractions' cytotoxicity was analyzed using the MTT method in normal cells and tumor cells (HL60 cells). However, the tested fractions showed no selectivity against the evaluated cells. The metabolic extract of *A. marcgravianum* obtained 3.12 of minimum inhibitory concentration (MIC per µg/mL) against *S. aureus* and was the only sample reactive against *P. aeruginosa* with MIC of 50 µg/mL. The species studied has significant potential for the isolation of indolic alkaloids and represents an option for investment in future studies.

Keywords: *Aspidosperma desmanthum*; *Aspidosperma marcgravianum*; *Aspidosperma nitidum*; alkaloid; GNPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da família Apocynaceae.	19
Figura 2 – Algumas substâncias extraídas de Apocynaceae	21
Figura 3 - Alcaloides isolados de <i>A. cylindrocarpon</i>	24
Figura 4 - Alcaloides isolados de <i>A. olivaceum</i>	24
Figura 5 - Árvore de <i>Aspidosperma desmanthum</i>	26
Figura 6 – Alcaloides isolados de <i>Aspidosperma desmanthum</i>	28
Figura 7 - Árvore de <i>Aspidosperma marcgravianum</i>	29
Figura 8 - Alcaloides isolados de <i>Aspidosperma marcgravianum</i>	30
Figura 9 - Árvore de <i>Aspidosperma nitidum</i>	31
Figura 10 - Alcaloides isolados de <i>Aspidosperma nitidum</i>	32
Figura 11 - Principais tipos de alcaloides e seus precursores.....	37
Figura 12 - Rota biossintética dos alcaloides indólicos monoterpênicos.....	38
Figura 13 - Representação esquemática de um espectrômetro de massas	39
Figura 14 - Representação do processo de construção da rede molecular	41
Figura 15 - A) Alcaloides 3-aminoespirostanos anotados na fração de <i>S. paniculatum</i> . B) Rede molecular para os alcaloides esteroides de <i>S. paniculatum</i>	42
Figura 16 - Esquema de fracionamento Ácido-Base dos extratos.....	45
Figura 17 - Análise cromatográfica das frações alcaloídicas das amostras de <i>Aspidosperma</i> – CCD fase normal.....	55
Figura 18 - Análise cromatográfica das frações alcaloídicas das amostras de <i>Aspidosperma</i> – CCD fase reversa	56
Figura 19 - Rede molecular obtida pela plataforma GNPS formada pelas frações alcaloídica (FA-Ad-C, FA-Am-C e FA-An-C) de <i>Aspidosperma</i> por LC-MS/MS	64
Figura 20 - Espectro de MS/MS do corinanteído.....	65
Figura 21 - Proposta de fragmentação para o corinanteído.	65
Figura 22 - Espectro de MS/MS do ácido ioimbinico.....	66
Figura 23 - Proposta de fragmentação para o ácido ioimbinico.	66
Figura 24 - Espectro de MS/MS do ajmalicina	67
Figura 25 - Proposta de fragmentação para o ajmalicina.....	67
Figura 26 - Espectro de MS/MS do ioimbina.....	68
Figura 27 - Proposta de fragmentação para o ioimbina.	68

Figura 28 - Espectro de MS/MS do ocroposinina.....	69
Figura 29 - Proposta de fragmentação para ocroposinina.	69
Figura 30 - Espectro de MS/MS do reserpinina.....	70
Figura 31 - Proposta de fragmentação para reserpinina.	70
Figura 32 - Espectro de MS/MS do 11-metoxi-ioimbina.	71
Figura 33 - Proposta de fragmentação para 11-metoxi-ioimbina.....	71
Figura 34 - Espectro de MS/MS do 16, 18-reserpinadiol.....	72
Figura 35 - Proposta de fragmentação para 16,18-reserpinadiol.	72
Figura 36 - Espectro de MS/MS do reserpilina.....	73
Figura 37 - Proposta de fragmentação para reserpilina.	73
Figura 38 - Curvas de calibração do Ácido Gálico	76
Figura 39 - Curvas de calibração do Sulfato Ferroso.	77
Figura 40 - Curva de inibição a partir do percentual de inibição pela concentração do controle	79
Figura 41 - Atividade citotóxica das frações alcaloídicas contra a linhagem celular HL60.....	81
Figura 42 - Atividade citotóxica das frações alcaloídicas contra a linhagem celular Vero.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa dos extratos em metanol das cascas de espécies de <i>Aspidosperma</i>	44
Tabela 2 - Massa dos extratos aquosos das cascas de espécies de <i>Aspidosperma</i>	44
Tabela 3 - Rendimento dos extratos bruto, extrato aquoso e fração alcaloídica	54
Tabela 4 - Dados espectrométricos obtidos pelo LC-MS/ion trap das espécies de <i>Aspidosperma</i> reportados na literatura como alcaloides indólicos	57
Tabela 5 - Substâncias identificadas através da análise da rede molecular	64
Tabela 6 - Atividade antioxidante total (AAT) das <i>Aspidosperma</i>	78
Tabela 7 - Percentual de inibição e concentração inibitória da enzima acetilcolinesterase para as frações alcaloídicas e extratos de <i>Aspidosperma</i> spp. ...	80
Tabela 8 - Atividade citotóxica das <i>Aspidosperma</i>	81
Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras obtidas de <i>Aspidosperma</i> spp.	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> *, segundo Bolzani (1987) e Garcia (1976).	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%CI	porcentagem da capacidade de Inibição
μM	micromolar
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
CC ₅₀	concentração citotóxica para 50%
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHCl ₃	clorofórmio
CI ₅₀	concentração inibitória para 50%
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficência
CL	concentração letal para 50%
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa
CS ₅₀	capacidade de sequestro para 50%
DAD	<i>Diode Array Detection</i>
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2 -difetil-2-picril-hidrazina
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EA-Ad-C	extrato aquoso da casca da <i>A. desmanthum</i> ;
EA-Am-C	extrato aquoso casca da <i>A. marcgravianum</i> ;
EA-An-C	extrato aquoso casca da <i>A. nitidum</i> ;
EM-Ad-C	extrato metanólico da casca da <i>A. desmanthum</i>
EM-Am-C	extrato metanólico da casca da <i>A. marcgravianum</i> ;
EM-An-C	extrato metanólico da casca da <i>A. nitidum</i> ;
ESI	<i>Eletronspray Ionisation</i>
FA-Ad-C	fração alcaloídica da casca da <i>A. desmanthum</i> ;
FA-Am-C	fração alcaloídica da casca da <i>A. marcgravianum</i> ;
FA-An-C	fração alcaloídica da casca da <i>A. nitidum</i> ;

FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GI ₅₀	concentração inibitória para 50% da proliferação celular
GNPS	<i>Global Natural Products Social Networking</i>
H ₂ O	água
HCl	ácido clorídrico
HL60	leucemia promielocítica aguda
IC ₅₀	inibição de crescimento dos parasitos para 50%
Íon trap	Armadilha de íons
IS	índice de seletividade
LC	Cromatografia Líquida
LC-HRMS	Cromatografia Líquida Acoplada A Espectrometria De Massas De Alta Resolução
LC-LRMS	Cromatografia Líquida Acoplada A Espectrometria De Massa De Baixa Resolução
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada À Espectrometria De Massas
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MDL ₅₀	mínima dose letal para 50%
MeOH	Metanol
MN	Redes Moleculares
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectro de massa por massa
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol
NH ₄ OH	hidróxido de amônia
QTOF	Quadrupolo-Tempo-De-Vôo
SD	Desvio Padrão
TOF	Tempo De Voo
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
UV	Ultravioleta
Vero	Linhagem de células oriundas de rim

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
3.1. FAMÍLIA APOCYNACEAE	19
3.2. GÊNERO <i>Aspidosperma</i>	21
3.3. <i>Aspidosperma desmanthum</i> Benth. ex Mull. Arg.....	26
3.4. <i>Aspidosperma marcgravianum</i> Woodson.....	28
3.5. <i>Aspidosperma nitidum</i> Benth.....	30
3.6. ESTUDOS DE <i>A. desmanthum</i> , <i>A. marcgravianum</i> E <i>A. nitidum</i>	32
3.7. ALCALOIDES.....	35
3.7.1. Alcaloides indólicos	37
3.8. FUNDAMENTOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM).....	38
3.9. REDES MOLECULARES.....	40
4. METODOLOGIA.....	43
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS.....	43
4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	43
4.2.1. Obtenção do extrato metanólico.....	43
4.2.2. Obtenção do extrato aquoso	44
4.3. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA.....	44
4.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA – CCD	45
4.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS).....	45
4.5.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de baixa resolução - LC-LRMS	46

4.5.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução - LC-HRMS	46
4.6. CONSTRUÇÃO DA REDE MOLECULAR.....	47
4.7. TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
4.7.1. Teste da capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH).....	48
4.7.2. Teste do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).....	49
4.8. TESTE DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	49
4.9. TESTE DE CITOTOXICIDADE	51
4.10. TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÃO.....	53
5.2. Caracterização do perfil cromatográfico das espécies de <i>Aspidosperma</i>	54
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ALCALOÍDICO POR ESPECTROMÉTRIA DE MASSAS	56
5.3.1. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas de baixa resolução.....	57
5.3.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução	63
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	75
5.5. ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	78
5.6. Avaliação da Citotoxicidade	80
5.7. Avaliação da atividade antimicrobiana	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com a finalidade de prevenir, tratar e curar doenças é uma das práticas mais antigas realizadas pela humanidade, sendo esse um conhecimento consolidado por séculos de observação e repassado de geração após geração (MACIEL et al., 2002; CRAGG; NEWMAN, 2013). Estima-se que por no mínimo um século cerca de 13.000 espécies de plantas tenham sido empregadas como medicinais (YUDHARAJ et al., 2016).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais como terapia é uma prática difundida devido a disponibilidade de recursos vegetais e pela miscigenação das culturas indígenas, negra, europeia e asiática (OLIVEIRA et al., 2003). As plantas utilizadas como medicamento natural podem ser facilmente encontradas tanto nas pequenas cidades quanto nas grandes metrópoles, em feiras livres, mercados populares, lojas de produtos naturais, em farmácias, quintais residenciais e nas praças públicas (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A Região Amazônica é detentora de 20% da biodiversidade existente no planeta (SUFFREDINI et al., 2002), com uma estimativa de 40.000 espécies de plantas, das quais aproximadamente 1.200 são comercializadas como plantas medicinais (MACIEL et al., 2002; BARROSO et al., 2012). Para a população rural e ribeirinha que habita a região, as plantas medicinais representam a principal forma de tratamento de doenças, devido principalmente o alto custo de fármacos, bem como a sua disponibilidade e as influências culturais (FRAUSIN et al., 2015; VEIGA; SCUDELLER, 2015).

Em meio a esta vasta biodiversidade, encontram-se espécies pertencentes à família Apocynaceae, considerada uma das mais importantes fontes de metabólitos secundários amplamente utilizados na medicina moderna (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Várias espécies dessa família que são empregadas na medicina popular têm sido objeto de estudo, dentre as quais se destacam espécies do gênero *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (LORENZI, 2000; PEREIRA; SIMOES; SANTOS, 2016). Esse gênero tem chamado a atenção de pesquisadores pelos seus princípios ativos, como os alcaloides indólicos monoterpênicos, uma classe terapeuticamente valiosa de produtos naturais, por apresentar efeitos biológicos promissores e diversos fitoconstituintes similares ou superiores à de um fármaco sintético (EVANS SCHULTES, 1979; CECHINEL FILHO et al., 2003).

Os vegetais representam a principal fonte de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO et al., 2010). Os produtos químicos sintetizados pelas plantas são úteis para o controle e tratamento de diversas doenças, como os antimaláricos quinina e artemisinina, isolados de *Cinchona* spp. e *Artemisia annua*, respectivamente (POHLIT et al., 2013). Em uma revisão sobre produtos naturais utilizados como fármacos, Newman e Cragg (2016) estimam que a maioria dos medicamentos atualmente provenha de produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Embora no Brasil as pesquisas sobre o princípio ativo das plantas medicinais tenham crescido, muitas espécies ainda são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades terapêuticas, o que é preocupante visto que muitas substâncias podem causar efeitos colaterais graves (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016). Assim, esse trabalho visou contribuir com conhecimento químico e biológico do gênero *Aspidosperma*, realizando estudos sobre o extrato metanólico, o extrato aquoso e a fração alcaloídica de *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Mull. Arg, *Aspidosperma marcgravianum* Woodson e *Aspidosperma nitidum* Benth para o conhecimento da sua composição de alcaloides e o potencial farmacológico dessas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir com o conhecimento do perfil alcaloídico das espécies *A. desmanthum*, *A. marcgravianum* e *A. nitidum* utilizando a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS), assim como avaliar o potencial antioxidante e as possíveis atividade biológicas das espécies.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar por cromatografia de camada delgada (CCD) o perfil químico das frações obtidas por fracionamento ácido-base;
- Realizar uma análise qualitativa da composição química alcaloídica dos extratos metanólicos das espécies por meio da técnica LC-MS;
- Realizar a desreplcação das frações alcaloídicas das espécies de *Aspidosperma* através da análise dos dados de LC-MS/MS pela plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS);
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato metanólico das espécies por meio do ensaio de sequestro do radical DPPH e do poder de redução do íon ferro (FRAP);
- Avaliar a atividade inibitória do extrato metanólico e da fração alcaloídica na enzima acetilcolinesterase (AChE);
- Avaliar o potencial citotóxico das frações ricas em alcaloides;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico e do extrato aquoso em bactérias gram-positivas e gram-negativas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FAMÍLIA APOCYNACEAE

A família Apocynaceae Juss., também conhecida como família Dogbane, é uma das cinco famílias da ordem Gentianales e subclasse Asteridae, considerada uma das maiores famílias do reino vegetal (MOROKAWA; SIMÕES; KINOSHITA, 2013; DEY; MUKHERJEE; CHAUDHURY, 2017). A família Apocynaceae tem aproximadamente 424 gêneros, com mais de 4.600 espécies distribuídas predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, tendo pouca representatividade em regiões temperadas (figura 1) (BHADANE et al., 2018). No Brasil, são registrados 94 gêneros e 974 espécies distribuídas em todos os domínios fitogeográficos brasileiros (FLORA DO BRASIL 2020., 2021). Os gêneros mais importantes dessa família são *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Rauwolfia*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancornia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Himatanthus (Plumeria)* e *Wrightia* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

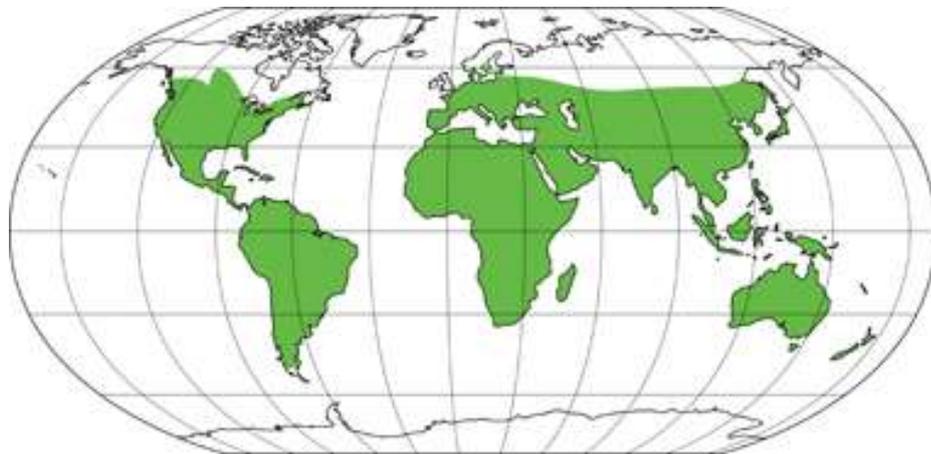


Figura 1 - Distribuição geográfica da família Apocynaceae.
(Fonte: http://www.thecompositaeht.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/apocynaceae.html.)

As espécies da família Apocynaceae consistem em árvores, arbustos, subarbusto, trepadeiras e ervas aromáticas, apresentam látex nos tecidos (XU; CHANG, 2017). Suas folhas são simples, opostas, alternas ou verticiladas, geralmente

sem estípulas; inflorescência cimosa, racemosa, umbelada ou raramente flores solitárias; flores pentâmeras (à exceção do gineceu), estiletos unidos no ápice e frutos usualmente bifoliculares, com sementes geralmente comosas (RAPINI, 2000; MOROKAWA; SIMÕES; KINOSHITA, 2013).

A família Apocynaceae é considerada uma importante fonte de compostos bioativos, como terpenos, esteroides, flavonoides, glicosídeos, lactonas, hidrocarbonetos e alcaloides, de interesse medicinal (RAPINI, 2000; BHADANE et al., 2018). Várias substâncias extraídas dessa família (figura 2) são utilizadas na terapêutica, como os alcaloides reserpina (1), ajmalicina (2), ajmalina (3), e serpentina (4) encontrados na espécie de *Rauwolfia serpentina*, usados para tratar casos de hipertensão e arritmias cardíacas; no gênero *Strophantus*, nas espécies *Strophantus gratus*, *Strophantus combe* e *Strophantus sarmentosus*, são encontrados os glicosídeos cardiotônicos ouabaína (5), estrofantinidina (6) e cimarina (7); e os alcaloides antitumorais vimblastina (8) e vincristina (9) isolados em espécies de *Vinca* e *Catharanthus* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; SCOTTI et al., 2015).

As espécies de Apocynaceae apresentam ainda grande importância econômica no setor madeireiro, por serem produtoras de látex e pela boa qualidade de madeira (SOUZA; LORENZI, 2005; RIBEIRO et al, 1999).

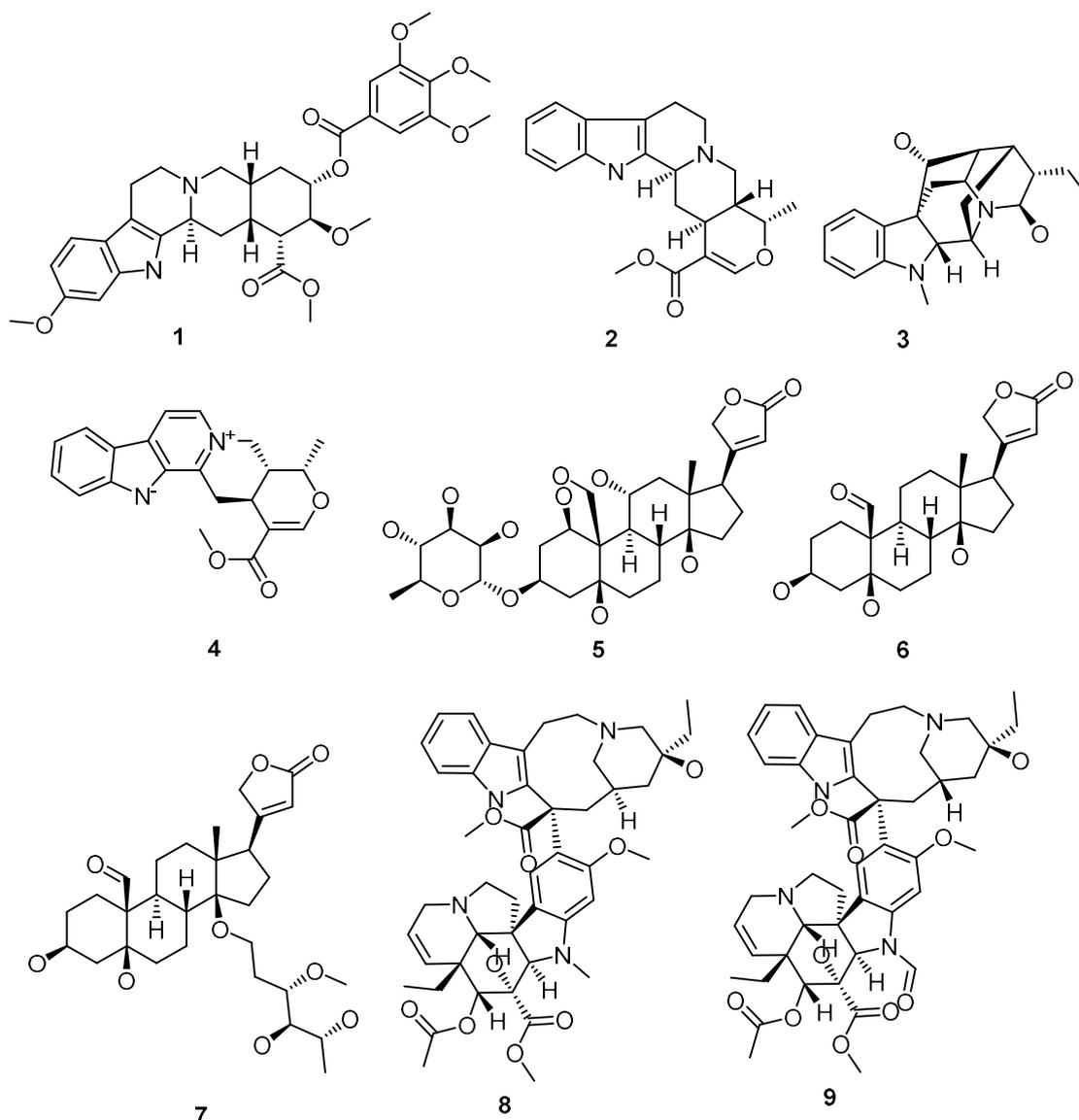


Figura 2 – Algumas substâncias extraídas de Apocynaceae

3.2. GÊNERO *Aspidosperma*

Aspidosperma Mart. & Zucc. é um dos gêneros mais representativos da família Apocynaceae, possui cerca de 300 espécies distribuídas nas Américas, principalmente entre o México e a Argentina (DE ALMEIDA et al., 2019). No Brasil são registradas aproximadamente 68 espécies, 29 dessas espécies são endêmicas, distribuídas por todo território brasileiro (Castello, 2022).

As espécies do gênero *Aspidosperma* são tipicamente árvores 2-48m de altura; de tronco cilíndrico, com látex branco, laranja ou avermelhado; folhas alternativas mais

ou menos em espiral, excepcionalmente opostas (ALLORGE; POUPAT, 1991; PEREIRA; SIMOES; SANTOS, 2016). Inflorescências dicásiosmodificados corimbiformes; coléteres no cálice ausentes; corola tubular ou hipocrateriforme; ovário súpero, apocárpico; cabeça do estilete fusiforme a globosa (MOROKAWA; SIMÕES; KINOSHITA, 2013). Frutas com um ou dois folículos lenhosos compactados que se abrem em duas válvulas. Semente com asa orbicular membranosa translúcida; cordilédones cordados, aluminosos (ALLORGE; POUPAT, 1991).

As espécies de *Aspidosperma* são amplamente utilizadas na medicina popular como potenciais agentes antimaláricos e contraceptivos, no tratamento de leishmaniose, inflamação uterina e ovário, diabetes, doenças do fígado, problemas estomacais, câncer, febre e reumatismo; e são de interesse econômico por fornecer madeira de boa qualidade, com larga aplicação na carpintaria (OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA; SIMOES; SANTOS, 2016; BHADANE et al., 2018). São conhecidas popularmente na região Amazônica como carapanaúba (árvore do mosquito), paracanaúba e casca de caepana, e nas demais regiões brasileiras como peroba, guatambu, pau-pereira, amargoso e quina (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

O gênero *Aspidosperma* sofreu duas revisões sistemáticas, dado que espécies distintas vinham sendo classificadas com o mesmo nome e por desentendimentos sobre o número exato de espécies que pertenciam ao gênero. Atualmente, a classificação quimiotaxômica proposta por Woodson (1951) e Bolzani (1987) compreende 48 espécies distribuídas em 8 séries: *Rigida*, *Nitida*, *Quebrachines*, *Polyneura*, *Pyricolla*, *Nobile*, *Macrocarpa* e *Tomentosa* (quadro 1) (PEREIRA et al., 2007).

Fitoquimicamente o gênero se caracteriza pela ocorrência de alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos, uma característica que a família Apocynaceae compartilha com a Loganiaceae e Rubiaceae (BOLZANI et al., 1987). Outras classes de produtos naturais também são sintetizadas pelas espécies de *Aspidosperma*, como flavonoides, saponinas e ácidos orgânicos (DE ALMEIDA et al., 2019).

Quadro 1 - Classificação das espécies do gênero *Aspidosperma**, segundo Bolzani (1987) e Garcia (1976).

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

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

(Fonte: Autora adaptado de Pereira et al. (2007).

Pereira e colaboradores (2007) realizaram um levantamento dos alcaloides identificados até 2006 em espécies do gênero *Aspidosperma*, no qual foram catalogados 247 alcaloides indólicos classificados de acordo com as características estruturais. Rosales e colaboradores (2020) relataram 261 alcaloides desta classe isolados no período de 2012 a 2018 em diferentes gêneros, alguns com atividades

farmacológicas promissoras. Dentre estes 9 foram isolados de *Aspidosperma*, *N*-benzoil-12-demetoxicilindrocarina (10) e *N*-cinamoil-12-demetoxicilindrocarina (11) isolados da *A. cylindrocarpon* (figura 3), e os alcaloides aspido carpina (12), uleina (13), aparacina (14), demetoxi-aspidospermina (15), *N*-metiltetrahydro-olivacina (16), olivacina (17) e aspidospermina (18) isolados da *Aspidosperma olivaceum* (figura 4), estes já haviam sido reportados nessa espécie e em outras espécies de gêneros *Aspidosperma*.

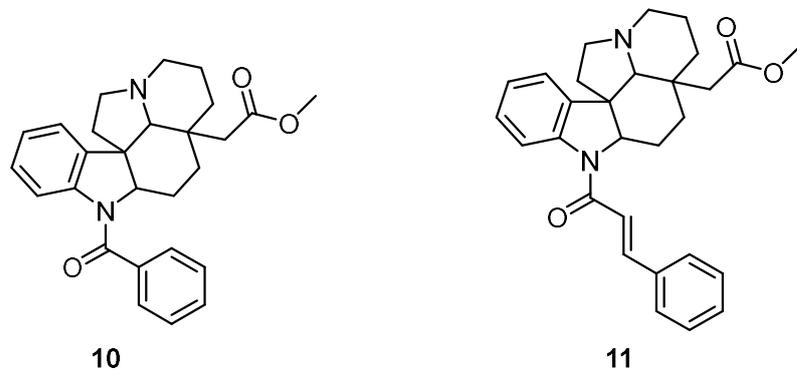


Figura 3 - Alcaloides isolados de *A. cylindrocarpon*

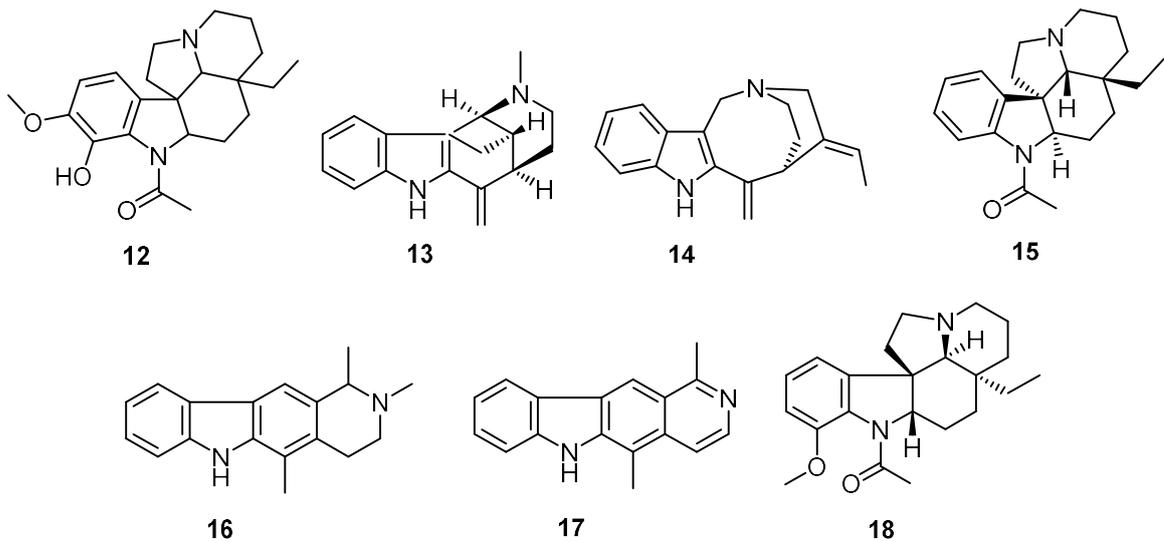


Figura 4 - Alcaloides isolados de *A. olivaceum*

As espécies de *Aspidosperma* na medicina popular são utilizadas por infusão das folhas ou casca para o tratamento de doenças cardiovasculares, malária, febre, diabetes, reumatismo, inflamação de útero e ovário, como agentes antivirais e antiprotozoários (REINA et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2019). Alguns dos usos populares facultados às espécies de *Aspidosperma* já foram comprovadas por testes biológicos e tais efeitos foram atribuídos aos alcaloides isolados ou presentes nas espécies de *Aspidosperma*, bem como sua atividade antitumoral, antiplasmódica, antimicrobiana, antibacteriana (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010; COUTINHO et al., 2013; DEY; MUKHERJEE; CHAUDHURY, 2017) e anti-hipertensiva (FURTADO et al., 2017).

Um dos usos medicinais mais antigos das *Aspidosperma* é o tratamento de malária, em um levantamento realizado por De Paula e colaboradores (2014) foram catalogadas de 26 espécies de *Aspidosperma*, onde 24 espécies são reportadas como usadas no tratamento de malária. Desta, um total de 19 espécies tiveram extratos e/ou alcaloides isolados avaliados para atividade antimalárica por diferentes ensaios, apresentando resultados positivos. Entre os alcaloides de *Aspidosperma* spp. testados com atividade antimalárica, uleina mostrou-se o mais promissor nos testes *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, apresentando boa atividade e nenhuma citotoxicidade em várias linhas de células cancerígenas humanas. A elipticina nos testes *in vivo* contra *Plasmodium berghei*, mostrou 100% supressão de parasita em uma dose oral de 50 mg/kg/dia e sem sinais de mortalidade ou toxicidade (DE PAULA; DOLABELA; DE OLIVEIRA, 2014).

Almeida e colaboradores (2019) reportaram que os extratos e compostos isolados de *A. subincanum* Mart. e *A. tomentosum* Mart. mostraram atividades antitumorais e antimalárica.

De Paula e colaboradores (2019) realizaram testes de atividade antileishmania *in vitro* em sete espécies de plantas brasileiras usadas na medicina popular. Os extratos de *Aspidosperma tomentosum* e *Dyospiros hispida* apresentaram resultados promissores contra *Leishmania infantum*.

Devido as suas características, *Aspidosperma* é considerado um dos gêneros mais importantes da América do Sul, principalmente, pela predominância dos alcaloides do tipo indólicos e suas diversas estruturas, muitos deles contendo esqueleto β -carbólico simples, sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (ALLEN; HOLMSTEDT, 1980).

3.3. *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Mull. Arg

A espécie *Aspidosperma desmanthum* (figura 5) caracteriza-se como uma árvore de até 35m de altura com tronco reto e ramo cilíndrico, com súber levemente espessado. As folhas estão dispostas alternada no ramo com venação craspedódroma; e possuem látex vermelho. Possuem inflorescências de 6,1-10,3 cm de comprimento, são terminais do tipo cimeira corimbiforme. As flores podem ser subsessivas ou pediceladas e o fruto apresentam costas evidentes, possuem estipes e a lenticelas inconspícua (PEREIRA; SIMOES; SANTOS, 2016).



Figura 5 - Árvore de *Aspidosperma desmanthum*

De *A. desmanthum* já são conhecidos alguns alcaloides, Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2007) em seu trabalho de revisão, descreveram três

alcaloides indólicos, aspidoalbina, *N*-acetilaspidoalbina e des-*O*-metilaspidolimidina (figura 6).

Andrade-Neto e colaboradores (ANDRADE-NETO et al., 2007) isolaram o alcaloide indólico aspidocarpina (12), em seu trabalho de teste de inibição *in vitro* com alcaloides indólicos contra a cepa K1 de *Plasmodium falciparum*. E Reina e colaboradores (REINA et al., 2014) isolaram 15 alcaloides indólicos das folhas, casca de caule e raiz de *A. desmanthum* (figura 6), obscurinervina (19), obscurinervidina (20), dihidro-obscurinervina (21), E-akuamdina (22), pagicerina (23), aspidodasicarpina (24), espruceanumina A (25), desacetilakuamilina (26), aspidolimina (27), aspidolimidina (28), aspidocarpina (12), razinilam (29), 6 β -hidroxidihidro-obscurinervina (30), 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina (31) e 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina (32), sendo os três últimos relatados pela primeira vez na literatura.

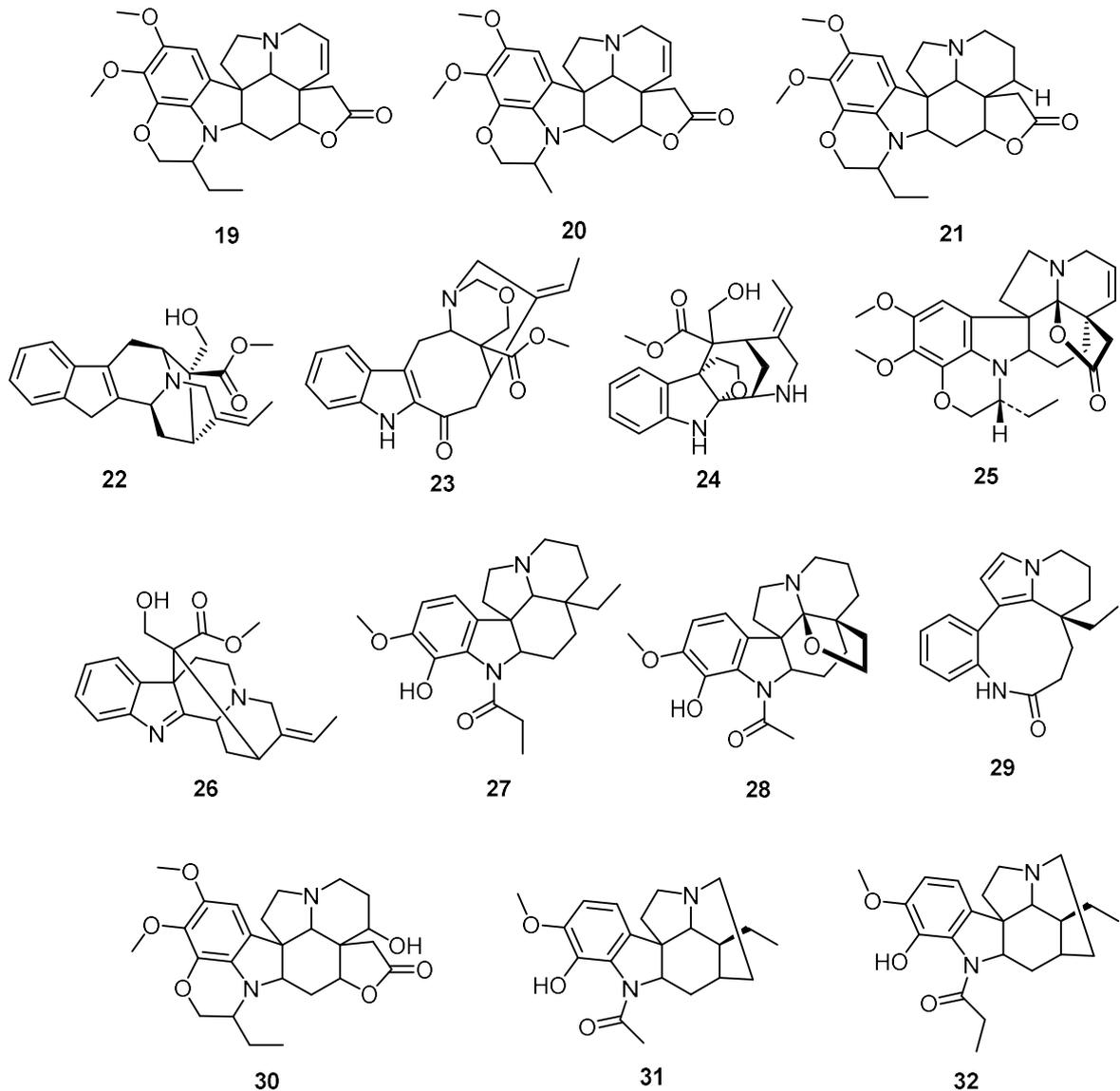


Figura 6 – Alcaloides isolados de *Aspidosperma desmanthum*

3.4. *Aspidosperma marcgravianum* Woodson

Aspidosperma marcgravianum Woodson (figura 7) é uma árvore de até 60 m de altura, da mata primária de terra firme de solo argiloso ou raramente argilo-silicoso e úmido. Possui tronco lamelado e casca escamosa com cerca de 3 mm de espessura. A inflorescência é terminal, tirsiforme e as flores são esverdeadas; e as anteras inseridas próximas à abertura da corola (ALBUQUERQUE, 1971).



Figura 7 - Árvore de *Aspidosperma marcgravianum*

Cerca de 50 alcaloides indólicos de *A. marcgravianum* já foram relatados na literatura, entre eles a reserpinina (33), reserpilina (34), aspidocarpina (12) e aspidolimidina (28) (figura 8), que são característicos do gênero. Outros alcaloides encontrados no gênero são N-acetilaspidospermidina (35), secodina (36), antirina (37), 3 α -Geissoschizol (38), razinilam (29) (figura 8) (PEREIRA et al., 2007).

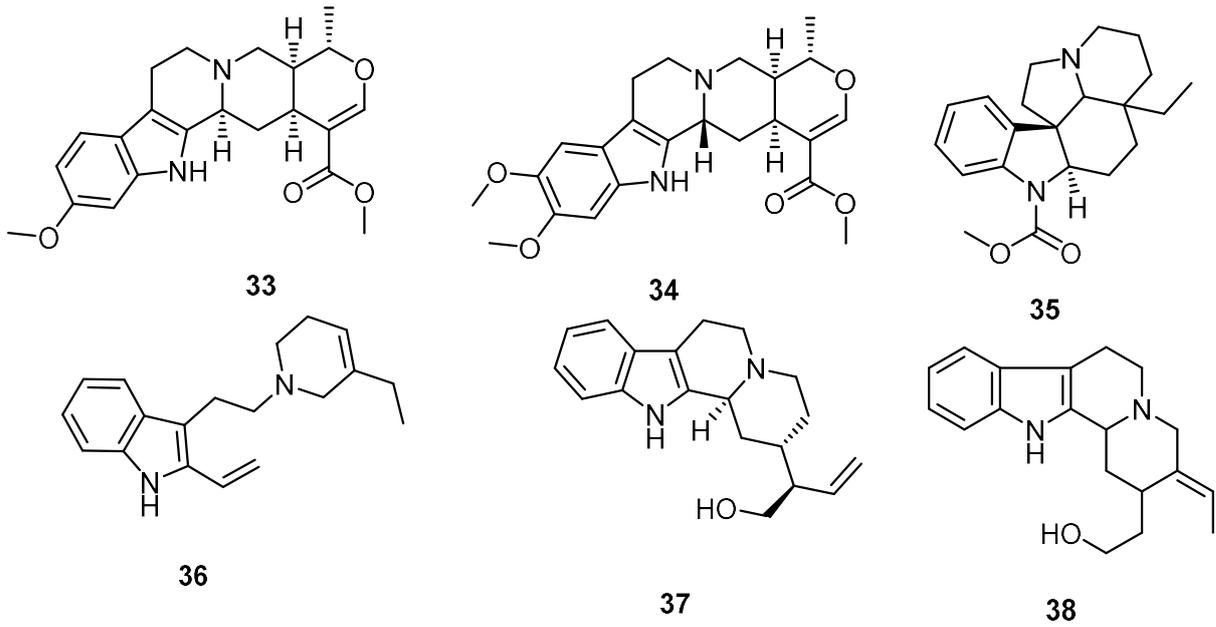


Figura 8 - Alcaloides isolados de *Aspidosperma marcgravianum*

3.5. *Aspidosperma nitidum* Benth

Aspidosperma nitidum Benth (figura 9) possui porte arbóreo, sua altura varia entre 15-25 m, com tronco canelado. Sua folha é oblonga e apresenta ápice arredondado, base acuminada e margem lisa, podendo ser ondulada ou sinuosa com curto-pecíolo. As flores possuem cálice e sépalas subiguais e a corola com comprimento dos lobos menores que o tubo. Sua inflorescência é do tipo cimera corimbiformes, e o fruto do tipo deiscente (AÑEZ, 2009).



Figura 9 - Árvore de *Aspidosperma nitidum*

Pereira e colaboradores (2007) descreveram a identificação de três alcaloides indólicos em sua revisão, o ácido harmanocarboxílico, $3\alpha,20\beta$ -10-Metoxi-18,19-diidro-corinanteol e braznitidumina (figura 10).

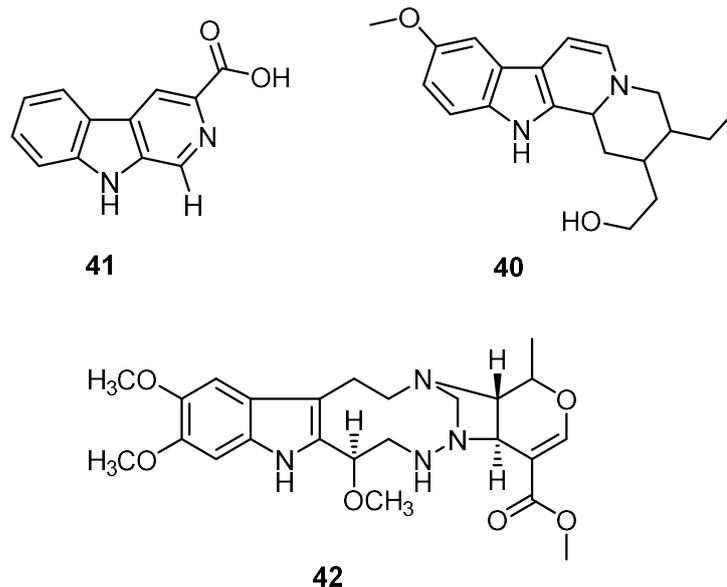


Figura 10 - Alcaloides isolados de *Aspidosperma nitidum*

3.6. ESTUDOS DE *A. desmanthum*, *A. marcgravianum* E *A. nitidum*

Andrade-Neto e colaboradores (2007) realizaram testes de inibição *in vitro* com alcaloides indólicos conhecidos por atividade antimalárica da casca de *A. desmanthum* e *A. vargasii* contra a cepa K1 de *Plasmodium falciparum*. Dos alcaloides indólicos testados, aspidocarpina e elipticina demonstraram ter inibição significativa do crescimento parasitário, com valores de IC₅₀ de 0,019 e 0,073 μ M, respectivamente.

Uma grande série de moléculas de *A. marcgravianum* foram selecionadas por Passemar e colaboradores (2011), por amostragem aleatória, para avaliar sua atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* e sua atividade antifúngica contra *Candida sp.* Entre as moléculas testadas estavam os alcaloides indólicos razinilam, diidrocorinanteol, ioimbina, 16(S)-isositsirikina e haplocidina, porém não foram ativos em nenhum dos testes (PASSEMAR et al., 2011).

Com extratos obtidos da casca do caule, folhas e ramos de *A. nitidum*, Coutinho e colaboradores (2013) realizaram ensaios contra os parasitas da malária. Os extratos de casca do caule foram ativos contra *P. falciparum*, e os extratos de folhas e galhos e o alcaloide puro braznitidumina foram inativos. Um extrato metanólico bruto foi submetido ao fracionamento ácido-base, que foram ativas em

baixas concentrações contra *P. falciparum* e em camundongos infectados e pouco eficiente ao parasita *P. berghei*. As moléculas responsáveis pela atividade antimalárica ainda não foram identificadas (COUTINHO et al., 2013).

E Reina e colaboradores (2014) realizam testes *in vitro* com os alcaloides isolados de *A. desmanthum* contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Os alcaloides indólicos aspidolimidina (28), aspidocarpina (12), razinilam (29) e 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina (31) foram os mais seletivos contra *L. infantum*; e contra *T. cruzi* apenas o razinilam (29). Juntamente com o teste atividade antiparasitária os pesquisadores realizam teste de citotoxicidade com células de ovário de hamster chinês (CHO), o composto que apresentou menor citotoxicidade foi aspidolimidina (28) com GI_{50} de 25,5 $\mu\text{g/mL}$ (REINA et al., 2014).

Em um trabalho de *screening* virtual realizado por Scotti e colaboradores (2015), para encontrar metabolitos ativos contra *T. cruzi*, foram selecionados 469 alcaloides indólicos de Apocynaceae, e os alcaloides das espécies *A. marcgravianum* e *A. excelsum* foram os mais ativos. Quignard e colaboradores (2003) também realizaram um trabalho de *screening* com 74 espécies de plantas nativas do estado do Amazonas quanto à letalidade para larvas da espécie *Artemia franciscana* na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, entre as espécies testadas estavam a *A. desmanthum*, *A. marcgravianum* e *A. nitidum*. As espécies mais ativas foram *Aspidosperma marcgravianum*, *A. nitidum*, *Croton cajucara*, *Citrus limetta*, *Geissospermum argenteum*, *Minquartia guianensis*, *Piper aduncum*, *P. amapense*, *P. capitarianum*, *P. tuberculatum* e *Protium aracouchini* (QUIGNARD et al., 2003).

Coutinho e colaboradores (2013) realizaram testes de citotoxicidade utilizando hepatoma humano e células renais de macaco normais com os extratos da casca de madeira, folhas e ramos de *A. nitidum*. Nenhuma das amostras foi citotóxica para células usadas, os valores de dose letal mínima para 50% das células (MDL_{50}) de todos os extratos e frações da casca bruta foram semelhantes ou melhores quando testados em células normais, mas os extratos obtidos da casca apresentavam baixa citotoxicidade *in vitro* (COUTINHO et al., 2013).

Veiga e colaboradores (2021) avaliaram a atividade citotoxicidade, antipromastigota e amastigota do extrato etanólico e frações pertencentes *A. nitidum*. Das frações testadas, somente a fração diclorometano apresentou atividade moderadamente contra promastigota (CI_{50} de $105,7 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$). No entanto, extrato etanólico das cascas e fração alcaloídica foram ativos contra amastigota, CI_{50} de 23,87

$\pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ e Cl_{50} de $18,5 \pm 0,94 \mu\text{g/mL}$, enquanto na fração diclorometano (Cl_{50} de $204,5 \pm 0,71 \mu\text{g/mL}$) e fração hexano (Cl_{50} de $143,0 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$) apresentaram atividade moderada. Ao relacionar a citotoxicidade das amostras a atividade anti-amastigota, observou-se que o extrato etanólico (CC_{50} de $491,8 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$; $\text{IS} = 21$) das cascas foi mais promissor que a fração alcaloídica (CC_{50} de $209,1 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$; IS de 11) (DA VEIGA et al., 2021).

Além dos trabalhos voltados para avaliar a atividade antiparasitária podem ser citados ainda o trabalho de Quignard (2004) que realizou teste de toxicidade com várias espécies de plantas Amazônicas dentre elas *A. marcgravianum* e *A. nitidum*, os testes foram realizados em camarões de salmoura. As espécies de *Aspidosperma* obtiveram as seguintes concentrações letais medianas $179 \pm 15 \text{ LC}_{50 \pm \text{SD}} (\mu\text{g/ml})$ para *A. marcgravianum* e $284 \pm 72 \text{ LC}_{50 \pm \text{SD}} (\mu\text{g/ml})$ para *Aspidosperma nitidum*.

Pereira e colaboradores (2006) que avaliaram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico do cerne de *Aspidosperma nitidum*, através dos testes de nocicepção induzida por formalina, da latência para o reflexo de retirada da cauda (“tail-flick”), de performance motora (“rota-rod”), e edema induzido pela injeção intraplantar da carragenina. O extrato etanólico apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

Martins e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antioxidante e fotoprotetora das plantas amazônicas. O extrato etanólico de *A. nitidum* exibiu atividade antioxidante média, $\text{IC}_{50} 99.14 \pm 2.3 (\mu\text{g/mL})$. No teste de fator de proteção solar (FPS) a espécie obteve o menor resultado em comparação com as outras espécies testadas. Na avaliação dos parâmetros críticos de comprimento de onda a espécie foi classificada como 4 (de acordo com a *Food and Drug Administration*), proporcionando proteção contra raios UVA e UVB.

Em sua revisão Lemma e colaboradores (2017) sistematizaram plantas com atividade antiplasmódica e as avaliaram entre muito boa, boa, moderada e inativa se o IC_{50} os valores foram $< 0,1 \mu\text{g/ml}$; $0,1-1 \mu\text{g/ml}$; $> 1-5 \mu\text{g/ml}$ e $> 5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. No trabalho foram analisadas 752 plantas pertencentes a 254 gêneros. Entre as plantas relatadas como tendo atividade antiplasmódica muito boa, estão *Aspidosperma desmanthum*, *Aspidosperma vargasi*, *Picrolemma sprucei* e *Artemisia annua*, devido aos compostos puros isolados.

Brígido e colaboradores (2020) constataram que o extrato etanólico da casca e a fração alcaloídica e fração neutra obtidos de *A. nitidum* possuem potencial

antimicrobiano contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. O extrato etanólico obtido da casca apresentou CIM de 250µg/mL frente à cepa de *Staphylococcus aureus*, sendo considerado moderadamente ativo. Já a fração alcaloídica e fração neutra apresentaram CIM de 500 µg/mL, possuindo fraca atividade antimicrobiana. Em *Escherichia coli*, todas as amostras apresentaram fraca atividade, pois apresentaram CIM de 1000 µg/mL, e atribuíram essa atividade a presença de alcaloides, característica do gênero (BRÍGIDO et al., 2020)

E recentemente Brígido e colaboradores (2021) analisaram a toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico e da fração de alcaloides obtidos da casca de *A. nitidum* em camundongos. Os resultados mostraram que tanto a dose única (2000 mg/kg, via oral) quanto as doses repetidas (1000 mg / kg por 28 dias) não causaram mortalidade ou sinais de toxicidade em camundongos.

3.7. ALCALOIDES

Em 1818 o farmacêutico K. F. W. Meissner (1792-1853), definiu alcaloides como “o componente da planta que apresenta propriedades básicas e forte efeito biológico” (FUNAYAMA; CORDELL, 2014). Atualmente, são descritos como compostos orgânicos com um ou mais átomos de nitrogênio em um sistema de anel heterocíclico, podem ser aminas primárias, secundárias, terciárias ou quaternária (DEWICK, 2009; KUKULA-KOCH; WIDELSKI, 2017).

Os alcaloides são encontrados predominantemente nas angiospermas, e com menos frequência em organismos marinhos, fungos, bactérias e animais, fazem parte do maior grupo de metabólitos secundários vegetais, com aproximadamente 27.000 alcaloides relatados (KUKULA-KOCH; WIDELSKI, 2017; ROSALES et al., 2020). Somente em 2020, o *Journal of Natural Products* reportou 316 novos alcaloides com 124 metabólitos exibindo 25 atividades biológicas diferentes (DALEY; CORDELL, 2021).

Estudos sobre alcaloides têm crescido exponencialmente por serem compostos farmacologicamente ativos (CORDELL, 1979; ANISZEWSKI, 2015). Substâncias desta classe possuem diversos e importantes efeitos fisiológicos, como anti-hipertensivos e como vasorelaxantes, usados para tratar esquizofrenia, úlceras, tumores, bem como outras doenças (SCOTTI et al., 2015). Alguns alcaloides têm grande notoriedade devido a sua aplicação farmacológica, como morfina da papoula

do ópio de *Papaver sonniferum* e quinina de *Cinchona ledgeriana* (ROSALES et al., 2020). Outros são conhecidos devido à sua toxicidade ou ao uso como drogas psicodélicas, como cocaína (KAUR et al., 2009).

Geralmente, os alcaloides são derivados de aminoácidos (figura 11), muitas vezes formados após um processo de descarboxilação, onde a estrutura do aminoácido precursor é amplamente conservada (DEY; MUKHERJEE; CHAUDHURY, 2017; ROSALES et al., 2020). Dentre os aminoácidos envolvidos na biossíntese dos alcaloides os principais são: L-ornitina, L-lisina, L-tirosina, L-histidina e L-triptofano, estes são os precursores de alcaloides do tipo pirrolidínico, piperidínico, quinolínico, imidazólico e indólico (ANISZEWSKI, 2007; DEWICK, 2009).

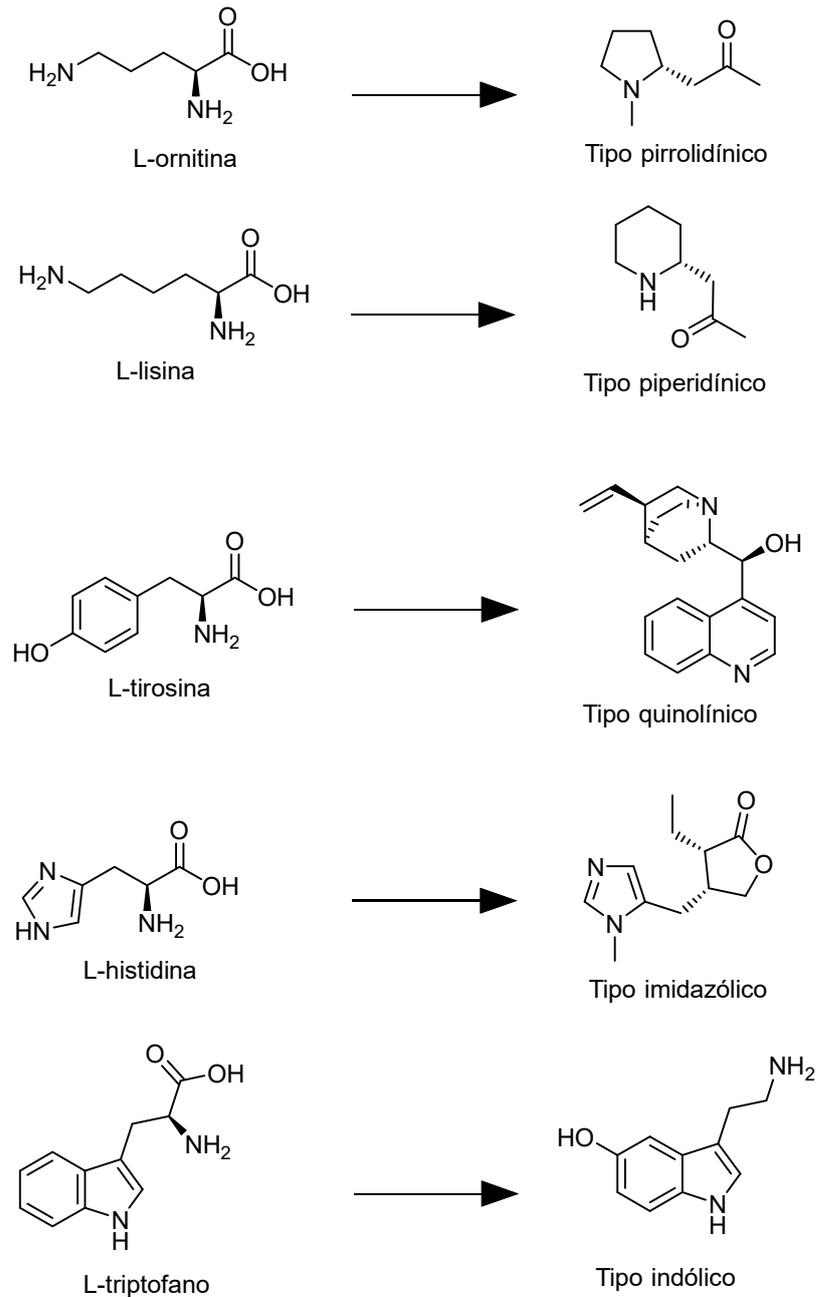


Figura 11 - Principais tipos de alcaloides e seus precursores.
(Fonte: Autora adaptado do Aniszewski T, 2007)

3.7.1. Alcaloides indólicos

Dentre os alcaloides se destaca o grupo dos alcaloides indólicos, com mais de 4.000 compostos conhecidos (SIMÕES et al., 2016). Em plantas, são encontrados principalmente nas famílias Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae, que pertencem à ordem das *Gentianales* (ANISZEWSKI, 2007). Os alcaloides indólicos são derivados

L-triptofano, um aminoácido aromático com um núcleo indol em um sistema de anéis, tendo sua origem na via do chiquimato via ácido antranílico (DEWICK, 2009).

Os alcaloides indólicos são classificados de acordo com as características da sua estrutura química em alcaloides indólicos monoterpênicos, ergóticos e alcaloides indólicos β -carbolínicos, o que está diretamente relacionada a sua biogênese (ROSALES et al., 2020). A maior parte dos alcaloides indólicos pertence ao grupo dos alcaloides indólicos monoterpênicos, esse grupo tem uma enorme diversidade estrutural, provenientes dos diversos rearranjos do esqueleto original (SIMÕES et al., 2016).

Os alcaloides indólicos monoterpênicos são formados a partir da condensação da triptamina, formada pela descarboxilação do L-triptofano, com o secoiridoide secologanina, originando a estrictosidina, molécula precursora dos alcaloides indólicos monoterpênicos (figura 12) (DEWICK, 2009).

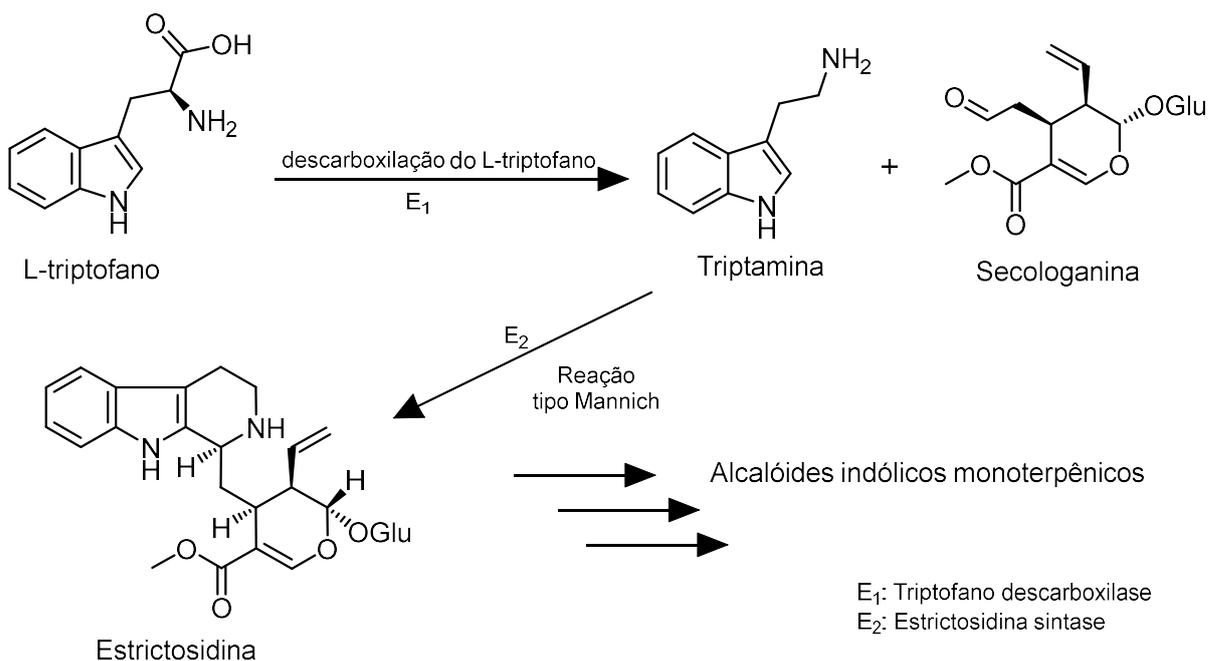


Figura 12 - Rota biossintética dos alcaloides indólicos monoterpênicos (Fonte: Dewick, 2009)

3.8. FUNDAMENTOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica de estimada importância para a determinação e a elucidação de uma estrutura molecular, dado

que a técnica se baseia na relação massa/carga (m/z) de moléculas ionizadas (WILSON; WALKER, 2010).

Em sua grande maioria, um equipamento de EM é composto por: a unidade de entrada da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massas, o detector e o sistema de dados (figura 13). A unidade de entrada da amostra gera um fluxo de moléculas, a partir da conversão da amostra em vapor, até a câmara de ionização. Na fonte de ionização, as moléculas da amostra são transformadas em íons (positivo ou negativo), os quais são acelerados por um campo eletromagnético em direção ao analisador de massas. No analisador de massas os íons da amostra são separados levando em consideração suas razões massa/carga (m/z), processo que ocorre em alto vácuo. O detector recebe os íons de acordo com a separação realizada pelo analisador, produzindo uma carga ou a corrente de íons que são enviados para um registrador, onde os dados poderão ser processados e armazenados, obtendo-se desta forma o espectro de massas (WILSON; WALKER, 2010; PAVIA et al., 2014).

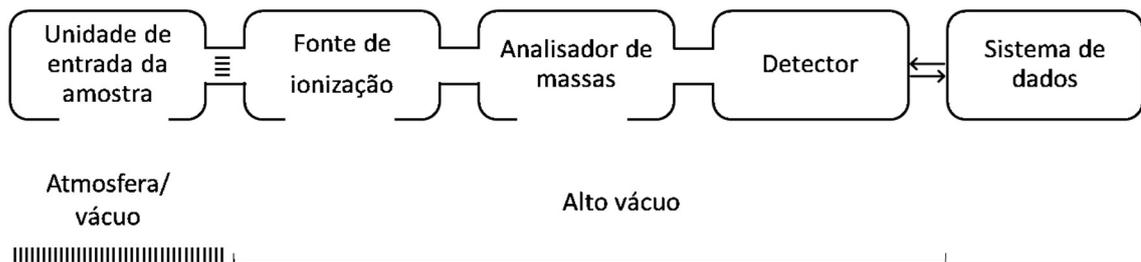


Figura 13 - Representação esquemática de um espectrômetro de massas
(Fonte: Adaptado de Pavia, 2010)

Um dos grandes avanços para a ciência foi o acoplamento da cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE), técnica de separação muito utilizada na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis, com a espectrometria de massas, permitindo a detecção e quantificação de um grande número de compostos, seja em amostras simples ou naquelas com certo grau de complexidade (LANÇAS, 2009; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) se utiliza como fase móvel um solvente que é impulsionado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna, enquanto a amostra é introduzida na fase móvel por meio de uma válvula e arrastada para a coluna, onde ocorre a separação. Uma das grandes vantagens de se utilizar LC-MS é

a sua versatilidade, ou seja, é possível intercambiar diferentes módulos, permitindo uma configuração distinta do equipamento, o que pode ser utilizado para separação, qualificação e quantificação de amostras com alto e baixo peso molecular (LANÇAS, 2009). Como biopolímeros, polímeros sintéticos, poluentes ambientais, compostos farmacêuticos e os produtos naturais (ARDREY, 2003).

3.9. REDES MOLECULARES

Uma das técnicas amplamente utilizadas na investigação de produtos naturais é a espectrometria de massa (MUKHERJEE, 2019). Em um único experimento de espectrometria de massa podem ser adquiridos milhares de espectro de massas em poucos minutos. Uma ferramenta que tem auxiliado na organização, na visualização e interpretação desses grandes conjuntos de dados são as redes moleculares (*Molecular Networking* - MN), um recurso computacional que por meio dos padrões (similaridades e diferenças espectrais) entre conjuntos amostrais, permitindo assim reconhecer classes metabólicas, substituintes e funções orgânicas em estruturas complexas de produtos naturais (PILON et al., 2021; WANG et al., 2016). Essa estratégia de desreplicação possibilita a identificar compostos conhecidos e análogos potenciais, possibilitando que o usuário direcione sua pesquisa para isolamento e identificação de moléculas desconhecidas (FOX RAMOS et al., 2017).

A *Global Natural Products Social Networking* (GNPS) é uma plataforma *online* e de acesso livre para organização e compartilhamento de dados brutos, processados ou anotados de espectrometria de massa de fragmentação (LC-MS/MS) (PILON et al., 2021; WANG et al., 2016). Para a construção da rede molecular, os dados obtidos por meio de espectrometria de massas (MS/MS) inicialmente devem ser convertidos (em formatos do tipo mzXML, mzML ou mgf) e só então carregados, após a configuração dos parâmetros de acordo com a particularidade do estudo, como o instrumento, técnica e poder de resolução. O conjunto de algoritmos do GNPS organiza cada espectro adquirido e os classifica a partir de um valor similaridade, através do valor de cosseno. Como cada substância pode ser constituída por um conjunto de espectros é necessária uma etapa de agrupamento de íons de uma mesma substância, também chamado de espectro consenso, representado por um nodo enquanto os arcos que os conectam representam os valores de similaridade entre os nodos (figura 14) (PILON et al., 2021).

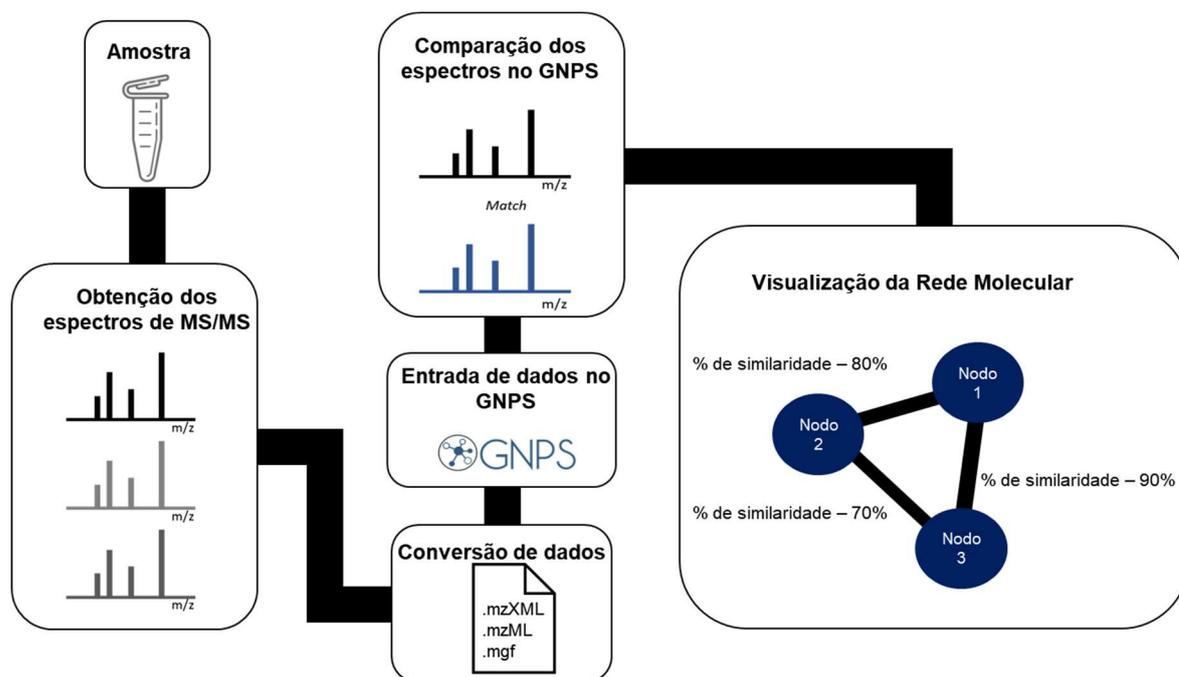
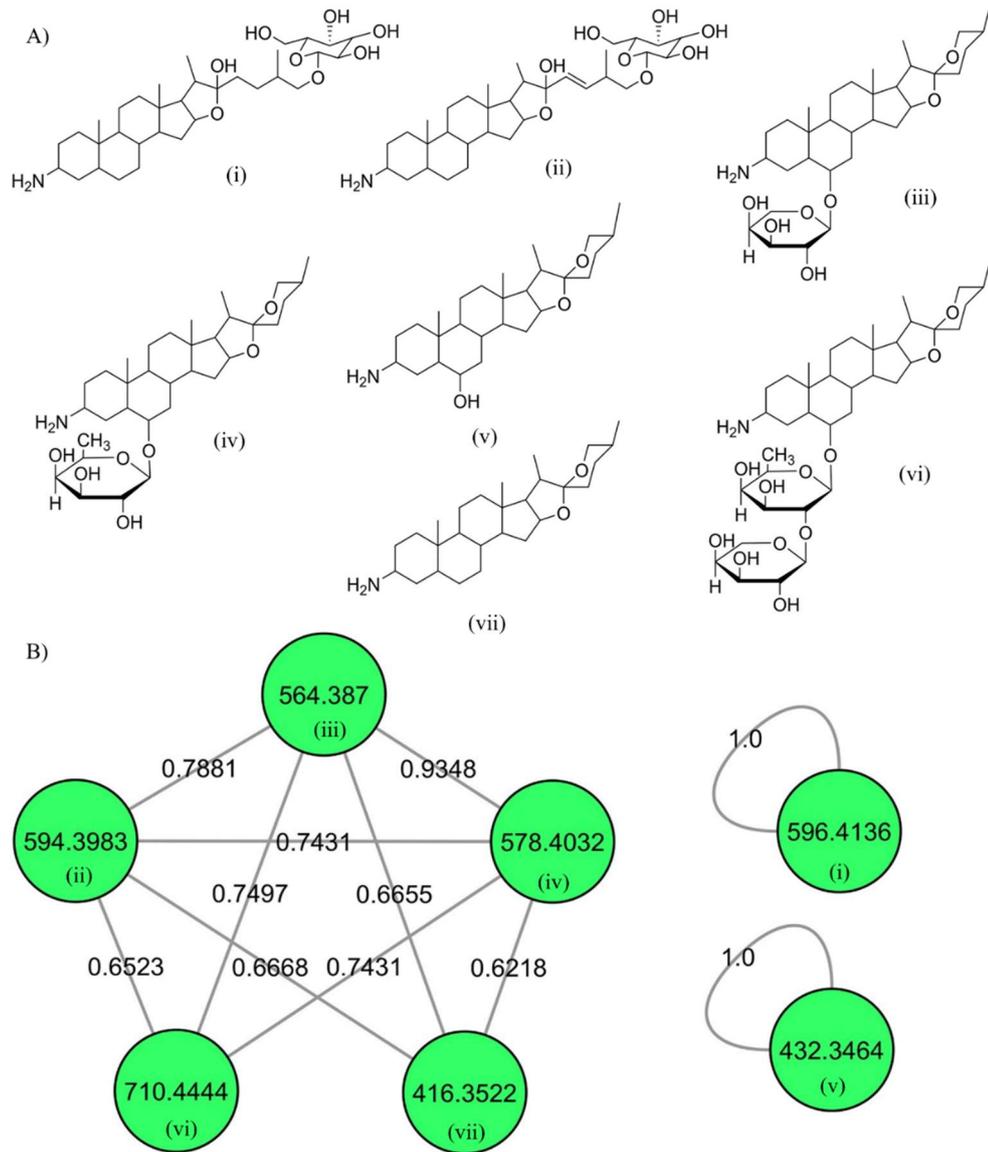


Figura 14 - Representação do processo de construção da rede molecular
(Fonte: Adaptado de Pillon, 2021)

Em um estudo sobre o perfil químico das raízes de *Solanum paniculatum* L., realizado por (GAZOLA et al., 2020) utilizado o GNPS foi possível a desrepliação de sete alcaloides esteroides (figura 15), três já relatados e quatro não relatados. Os dados da anotação da MN foram validados por meio de um estudo sistemático dos mecanismos de reação em fase gasosa de uma das moléculas identificadas.



(i) Jurubina; (v) Isojuripidina; (vii) Jurubidina; (ii-iv e vi) não reportada anteriormente.
 Figura 15 - A) Alcaloides 3-aminoespirostando anotados na fração de *S. paniculatum*. B) Rede molecular para os alcaloides esteroides de *S. paniculatum*.
 (Fonte: GAZOLLA et al., 2020)

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas cascas de *A. desmanthum* e *A. marcgravianum* na Reserva Adolpho Ducke, no km 26 da rodovia AM-010, Manaus-AM, -2°96'27.33"S - 59°92'29.51"W, a partir de espécimes previamente identificados no Projeto Flora da Reserva Ducke. As espécies foram coletadas em julho de 2019.

Já as cascas de *Aspidosperma nitidum* foram coletadas na fazenda experimental da Universidade Federal do Amazonas, localizada na AM-010, no município de Manaus, Amazonas especificamente sob latitude e longitude 2°55'00.4"S e 9°58'29.1"W, respectivamente, em novembro de 2019.

4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As cascas das espécies, após coletadas, foram secas em estufa de circulação de ar (40°C por 7 dias). O material seco foi submetido à moagem em moinho de facas, o pó vegetal resultante foi usado para obtenção dos extratos metanólicos e extratos aquosos.

4.2.1. Obtenção do extrato metanólico

O material vegetal moído foi submetido à maceração com metanol em banho de ultrassom por 100 minutos, a cada 20 minutos foi feito um descanso de 10 minutos (tabela 1). Em seguida, foi deixado em repouso por 7 dias. As misturas foram filtradas e o solvente foi eliminado utilizando-se rota-evaporador.

Tabela 1 - Massa dos extratos em metanol das cascas de espécies de *Aspidosperma*

Espécie	Massa pó vegetal (g)	Metanol (mL)
<i>Aspidosperma desmanthum</i>	100,00	400
<i>Aspidosperma marcgravianum</i>	100,00	400
<i>Aspidosperma nitidum</i>	100,00	400

4.2.2. Obtenção do extrato aquoso

Usou-se o método de decocção (FONSECA, 2015), foi preparadas misturas do material moído com água destilada (tabela 2) de cada espécie de *Aspidosperma*, que foram mantidas em aquecimento (80°C) por 10 minutos. Após resfriar, a mistura foi filtrada e a solução resultante foi posta em refrigeração até o congelamento e liofilizadas posteriormente.

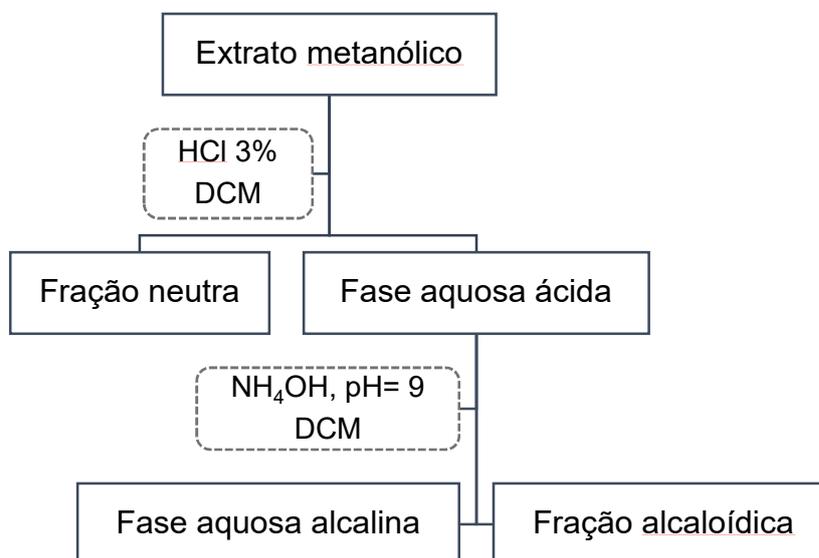
Tabela 2 - Massa dos extratos aquosos das cascas de espécies de *Aspidosperma*

Espécie	Massa pó vegetal (g)	Água destilada (mL)
<i>Aspidosperma desmanthum</i>	20,01	250
<i>Aspidosperma marcgravianum</i>	20,01	250
<i>Aspidosperma nitidum</i>	20,01	250

4.3. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA

As frações alcaloídicas das espécies de *Aspidosperma* spp. foram obtidas de acordo com Brandão (BRANDÃO et al., 2020), com adaptações. Os extratos metanólicos (100 mg) secos foram submetidos ao fracionamento ácido-base (figura 16), solubilizando-os em 10 mL de solução aquosa com ácido clorídrico (HCl) a 3%. Esta solução foi extraída em 30 mL de diclorometano (DCM), obtendo-se a fração neutra (FN) e a fase aquosa ácida. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 9, seguida de extração com 30 ml de DCM, obtendo-se a

fase aquosa alcalina e a fase orgânica (fração de alcaloides). Após a extração, a fase orgânica foi separada e posta para secar em capela de exaustão.



HCl: ácido clorídrico; DCM: diclorometano; NH₄OH: hidróxido de amônia.

Figura 16 - Esquema de fracionamento Ácido-Base dos extratos

4.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA – CCD

As amostras obtidas pelo fracionamento alcaloídico foram analisadas em cromatoplasacas pré-fabricadas de sílica gel (Merck® e Silicycle), com espessura de 0,25 mm de indicador de fluorescência F254. As placas de CCD eluídas foram reveladas na luz ultravioleta (254 e 366 nm) e por reagente Dragendorff para verificar a presença de alcaloides (WAGNER & BLADT, 1996).

4.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS)

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau HPLC) e os dados de LC-MS foram obtidos usando como analisador tipo armadilha de íons (*ion-trap*) para os extratos metanólicos e analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF) para as frações alcaloídicas.

4.5.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de baixa resolução - LC-LRMS

As amostras foram analisadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN), localizado no Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA), em parceria com prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura. Como equipamento de leitura foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, modelo Prominence UFLC, munido de uma bomba LC-20AT (binária), acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD), modelo SPDM-20A, com equipamento de injeção automática da série SIL-20A que se encontra conectado a um equipamento de espectrometria de massas da marca Bruker Daltonics, modelo Amazon Speed com analisador *ion-trap*. As análises foram desenvolvidas no modo positivo e a fonte de ionização escolhida foi *eletrospray* (ESI) e a faixa de operação definida em: 50-1000 *m/z*. A coluna cromatográfica utilizada foi Kinetex 2.6 μ m (C18, 100A, 150mm x 2.1mm), com o volume de injeção definido em 2 mL, *split* de 0,045 mL, descarte de 0,255 mL e fluxo de 0,2 mL/min.

A fase móvel fase A foi composta por uma solução aquosa de água e ácido fórmico 0,1% (H₂O + 0,1% HCOOH); e na fase móvel B usou-se acetonitrila (ACN), com gradiente linear de 0-30 min 10-35% B, 30-32 min 35-100% B, 32-34 min 100% B. Os resultados obtidos através de cromatogramas foram processados utilizando o *software DataAnalysis* (versão 4.2).

4.5.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução - LC-HRMS

As amostras foram processadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP em colaboração com a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi e do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Kyoto, Japan), acoplado a um espectrômetro de massas Bruker microTOF-QII, equipado com fonte *eletrospray* (ESI), operando no modo positivo de ionização e MS/MS automático. O espectrômetro de massas foi equipado com duas bombas analíticas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, detector UV/Vis SPD-20A, forno de coluna CTO-20A, controladora CBM-20A e coluna Phenomenex Luna PFP(2) 5 μ m, 150x2mm.

A energia do capilar ficou em 4500 V, a energia de colisão em 12 eV e do quadrupolo em 6 eV. Com a pressão do nebulizador (N₂) e secagem a 4 Bar e 8 l/min, respectivamente; a temperatura de secagem em 200°C. Os funis RF2, 2RF e hexapolo RF foram programadas para 400, 200 e 200 Vpp, respectivamente.

A fase móvel fase A foi composta por uma solução aquosa de água e ácido fórmico 0,1% (H₂O + 0,1% HCOOH); e a fase móvel B uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (ACN + 0,1% HCOOH), com gradiente linear de 0 min, 30% B, mantido até 2 min; de 2 a 40 min foram 30 a 100% de B; e mantido em 100% até 42 min. Temperatura do forno em 40°C, comprimento de onda 254 e 330 nm. A taxa de fluxo de 0,2 mL/min e volume de injeção 5 µL. Os espectros foram processados no *software Compass DataAnalysis* (versão 5.2).

4.6. CONSTRUÇÃO DA REDE MOLECULAR

Os espectros de íons obtidos pela análise por LC-HRMS/MS das frações alcaloídicas das espécies do gênero *Aspidosperma* foram submetidos a conversão para o formato mzXML utilizando o *software Compass DataAnalysis* (versão 5.2). Após convertidos os dados foram carregados na plataforma GNPS por meio do *software WinSCP* para a construção da rede molecular. A rede molecular foi construída no modo clássico no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>), onde os dados foram filtrados removendo todos os íons do fragmento MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z. Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 principais íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi ajustada para 0,2 Da e uma tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,2 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 4 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos 10 principais nós mais semelhantes de cada um. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite.

Os espectros na rede foram então pesquisados frente às bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros

de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes (WANG et al., 2016). Os dados da rede molecular foram analisados e visualizados pelo *software* Cytoscape 3.8.0.

A rede molecular criada para este trabalho está disponível no *site* do GNPS podendo ser acessada por meio do seguinte *link*: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=8cbe0c30bef141d58b663793129f5a91>.

4.7. TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os ensaios para a determinação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos, foram realizados no Laboratório de Aberturas de Amostras e Ensaios Químicos (LAEQ) na Central Analítica. Para determinação do potencial antioxidante dos extratos metanólicos foram testados a capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH) e o poder de redução do íon ferro (FRAP).

4.7.1. Teste da capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH)

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. (RUFINO et al., 2007).

Foram preparadas as soluções em metanol (grau HPLC) das amostras na concentração de 1,0 mg/mL e do padrão ácido gálico a 0,05 mg/mL. A solução metanólica de DPPH foi preparada com concentração de 100 µM. Em placas do tipo Elisa com 96 poços adicionou-se 30 µL da amostra e 270 µL da solução de DPPH. Para controle negativo usou-se 270 µL de DPPH e 30 µL MeOH; no controle positivo 30 µL ácido gálico e 270 µL DPPH e no branco 300µL de MeOH.

A microplaca foi incubada por 30 min a 25°C em ambiente escuro e posteriormente realizada a leitura da amostra em leitora de microplaca (Biotek®, Elx800) no comprimento de onda de 515 nm. Os valores de absorbância foram calculados conforme a equação 1. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$\% \text{ CI} = 100 - \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}) \times 100}{\text{Absorbância do controle}} \quad (\text{Equação 1})$$

4.7.2. Teste do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Na determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro, utilizou-se a metodologia descrita por Rufino (2006). Este método é baseado na capacidade dos antioxidantes para reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} , o ensaio FRAP mede diretamente a capacidade de redução da substância, parâmetro importante para um composto ser um bom antioxidante (FIRUZI et al., 2005).

O reagente FRAP foi preparado na proporção de 10:1:1 misturando-se 25,0 mL de tampão acetato 0,3 M, a 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM e 2,50 mL de 2,4,6-tris (2-pyridyl)-S-triazina (TPTZ) 10,0 mM. A determinação da redução dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} pelas amostras foi calculada por meio da construção da curva analítica de sulfato ferroso (2 mM), em várias concentrações (500 a 2000 μM).

As amostras foram solubilizadas em metanol (grau HPLC) nas concentrações de 1,0 mg/mL. Foi transferida uma alíquota de 90 μL de cada amostra para tubos de ensaio, acrescentou-se 270 μL de água destilada e foi misturado com 2,7 mL do reagente FRAP. As misturas foram homogeneizadas e colocadas em banho-maria a 37 °C por 30 min. Posteriormente foram resfriadas à temperatura ambiente e a absorbância das misturas foi medida a 595 nm com um espectrofotômetro UV-Visível 201/220 (Evolution™). O branco foi obtido com 270 μL de água destilada misturada a 2,7 mL de reagente FRAP. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8. TESE DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Abertura e Ensaio Químicos - LAEQ/UFAM. O teste seguiu a metodologia proposta por Ellman (1961) e Senol (2015), com adaptações, sendo realizados em microplacas de 96 poços com a adição da enzima AChE (Enzima acetilcolinesterase de *Eletrophorus electricus* tipo VI-S, pó liofilizado, Sigma-Aldrich).

Foram testados os extratos metanólicos e as frações alcaloídicas, a partir de uma solução estoque (1 mg/mL), onde 20 µL amostra foi adicionada nos poços, seguida de uma diluição em série. Após, 150 µL de tampão fosfato de sódio pH=8 (0,1 mM), 20 µL de DTNB (2,5 mM) e 20 µL da enzima acetilcolinesterase (1 U/mL) foi adicionado subsequentemente em cada poço a temperatura de 25 °C, seguida de incubação por 15 min. No fim desse período a reação foi iniciada pela adição de 10µL de iodeto de acetilcolina (0.1 M). A absorbância de cada poço foi medida em um espectrofotômetro leitor de microplacas de 96 poços a 405 nm. A reação foi monitorada por 30 min com intervalos de 5 min. Um teste branco também foi preparado, seguindo a mesma metodologia, porém suprimindo a enzima AChE, assim como um controle negativo, este sem adição das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

O percentual de inibição da enzima foi calculado de acordo com a equação abaixo (equação 2):

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(CN - B) - (A - B) \times 100}{(CN - B)} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

A: Absorbância da amostra.

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

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

A curva de inibição foi obtida a partir do percentual de inibição *versus* concentração do inibidor, utilizando o *software* Excel. E para as amostras com percentual de inibição $\geq 50\%$ foi calculado os valores da concentração inibitória mediana (C_{I50}) por meio de regressão não linear utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0, com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram expressos em micromolar (μM).

4.9. TESTE DE CITOTOXICIDADE

O teste foi realizado pelo Laboratório de Virologia e Imunologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/MCTI) em colaboração com o professor Dr. Gemilson Pontes. As amostras analisadas foram as frações alcaloídicas.

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada por meio de ensaio de MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide). As linhagens celulares HL60 (leucemia promielocítica aguda) e Vero (linhagem de células oriundas de rim) humanas (2×10^4 por poço) foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 0,2mL de meio RPMI (com 10% de FBS, penicilina-estreptomicina e fungizona) por poço, em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 24 horas. Após a formação da monocamada subconfluyente, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias (3-100 µg/mL) e incubadas novamente nas mesmas condições citadas por 24, 48 e 72 horas. PBS estéril foi usado como controle negativo e DMSO 100% como controle positivo. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL em PBS estéril) diluído em 100 µL de meio DMEM (sem vermelho de fenol para evitar erros de interpretação), seguida por uma incubação de 4 horas nas mesmas condições descritas acima. Após o período de incubação, o MTT foi removido e 50µL de tampão de lise MTT foram adicionados em cada poço com homogeneização suave para dissolver os cristais de formazan. Após a homogeneização, a placa foi incubada por 10 minutos a 37°C. As densidades ópticas das amostras foram medidas em leitor de microplaca, utilizando-se um comprimento de onda de 492 nm. A viabilidade relativa das células foi estimada por meio da equação 3:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{(\text{Absorbância da amostra tratada})}{(\text{Absorbância da amostrada não tratada})} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.10. TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste foi realizado em parceria com a Prof.a Dr.a Simone Schneider Weber (FACFAN/UFMS). Foram usadas as seguintes colônias de bactérias: *Staphylococcus*

aureus ATCC 35983, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. A concentração inibitória mínima - CIM dos extratos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*, documento M27-A3 (CLSI, 2008) e M07-A9. Ciprofloxacino (CFX) (Sigma-Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil) foi utilizado como fármaco padrão para controle de qualidade.

Os extratos metanólicos e extratos aquosos das cascas de *Aspidosperma* spp. foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) a 1 %. Após dissolvidos os extratos foram estocados em criotubos de 2 mL a -20 °C por um período de até seis meses, sem perda significativa da sua atividade.

A partir da solução estoque de cada extrato realizou-se uma série de diluições seriadas com caldo MH (Mueller Hinton). Os extratos foram distribuídos em microplacas da maior concentração para a menor, começando no sentido vertical do orifício de número dois até o orifício de número onze. Desta forma, a coluna número dois possuía a maior concentração do extrato, enquanto a coluna número onze possuía a menor. A concentração variou de 100 µg/mL a 0,097 µg/mL. Nesta fase, deixou-se vazio os orifícios das colunas número doze para o controle de crescimento e os orifícios da coluna número um para controle de esterilidade.

Um dia antes da realização do experimento, as culturas de micro-organismo foram descongeladas e semeadas em placas de MH e incubadas a 36 (±1) °C. Em seguida, 24 h após a incubação, colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 20 mL de solução salina estéril. Esta suspensão foi agitada em agitador de vortex durante 10 segundos e, utilizando espectrofotômetro, a densidade celular medida e ajustada a 1×10^6 – 5×10^6 células/mL.

Com o inóculo padronizado, cem microlitros (100 µL) da suspensão foi distribuída nas microplacas. No orifício doze adicionou-se caldo MH juntamente com a suspensão do inóculo para o controle de crescimento. No orifício um, somente duzentos microlitros (200 µL) do caldo MH foi adicionado para o controle de esterilidade. Após adição do inóculo, as placas foram incubadas por 24 h a 36(±1) °C.

Todos os testes foram realizados em duplicada para certificação dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÃO

A partir do material vegetal (cascas) das espécies de *Aspidosperma* foram obtidos extratos (tabela 3) por meio de maceração, usando como líquido extrativo metanol (extrato metanólico) e por decocção, líquido extrator água (extrato aquoso). E a partir do extrato metanólico se obteve a fração alcaloídica (tabela 3).

Os extratos foram obtidos em concentrações diferentes de massa de pó vegetal, o que implica diretamente do rendimento do extrato, contudo, pode se observar que os extratos obtidos a partir da casca de *A. marcgravianum*, tanto em metanol (EM-Am-C) quanto por decocção em água (EA-Am-C), foram os que apresentaram maior percentual de rendimento, respectivamente, de 5,1% e 20,3%.

Dentre as amostras obtidas por meio do fracionamento ácido-base quem obteve maior rendimento foi a fração alcaloídica da casca de *A. nitidum* (FA-An-C) com 80% de rendimento. E quem obteve o menor rendimento foi a fração alcaloídica da casca de *A. desmanthum* (FA-Ad-C), obteve 30% de rendimento.

Não foi possível obter o extrato aquoso da casca de *A. nitidum* (EA-An-C) devido o equipamento de liofilização estar comprometido.

Tabela 3 - Rendimento dos extratos bruto, extrato aquoso e fração alcaloídica

	Amostra	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Extrato metanólico	EM-Ad-C	4,20	4,2
	EM-Am-C	5,12	5,1
	EM-An-C	3,31	3,3
Extrato aquoso	EA-Ad-C	3,12	15,6
	EA-Am-C	4,06	20,3
	EA-An-C*	-	-
Fração alcaloídica	FA-Ad-C	0,03	30,0
	FA-Am-C	0,06	60,0
	FA-An-C	0,08	80,0

EM-Ad-C - extrato metanólico da casca da *A. desmanthum*; EM-Am-C - extrato metanólico da casca da *A. marcgravianum*; EM-An-C - extrato metanólico da casca da *A. nitidum*; EA-Ad-C - extrato aquoso da casca da *A. desmanthum*; EA-Am-C - extrato aquoso casca da *A. marcgravianum*; EA-An-C - extrato aquoso casca da *A. nitidum*; FA-Ad-C - fração alcaloídica da casca da *A. desmanthum*; FA-Am-C - fração alcaloídica da casca da *A. marcgravianum*; FA-An-C - fração alcaloídica da casca da *A. nitidum*; Asterisco (*) - extrato não foi liofilizado.

5.2. Caracterização do perfil cromatográfico das espécies de *Aspidosperma*

As amostras obtidas do fracionamento alcaloídico (FA-Ad-C, FA-Am-C e FA-An-C) foram analisadas por CCD na fase normal e na fase reversa (figura 17-18). Nos dois métodos pode se verificar a predominância de manchas azuis e marrom, quando visualizadas em UV 254nm e UV 365nm e quando foram reveladas com reagente Dragendorff observou-se manchas castanho-alaranjadas, sugestivas de alcaloides.

O sistema constituído por CHCl₃/MeOH (9:1), CCD de fase normal, apresentou melhor resolução em comparação aos demais sistemas testados. A presença de alcaloides nesse sistema foi confirmada por meio da luz UV 365nm, onde se observa a inflorescência azul, azul esverdeada e violeta e sob luz UV 254nm observando fluorescências em tons de verde e azul claro. Por meio da revelação física também pode se confirmar a presença de alcaloide indólicos, devido à ausência de manchas observadas na luz UV 365nm (HILDEBERT; BLADT, 2009).

Os resultados observados corroboram com os descritos na literatura que descreve o gênero como produtos de alcaloides (CORDELL, 1979; CORDELL;

QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; NASCIMENTO; SILVEIRA, 2008; KUKULA-KOCH; WIDELSKI, 2017).

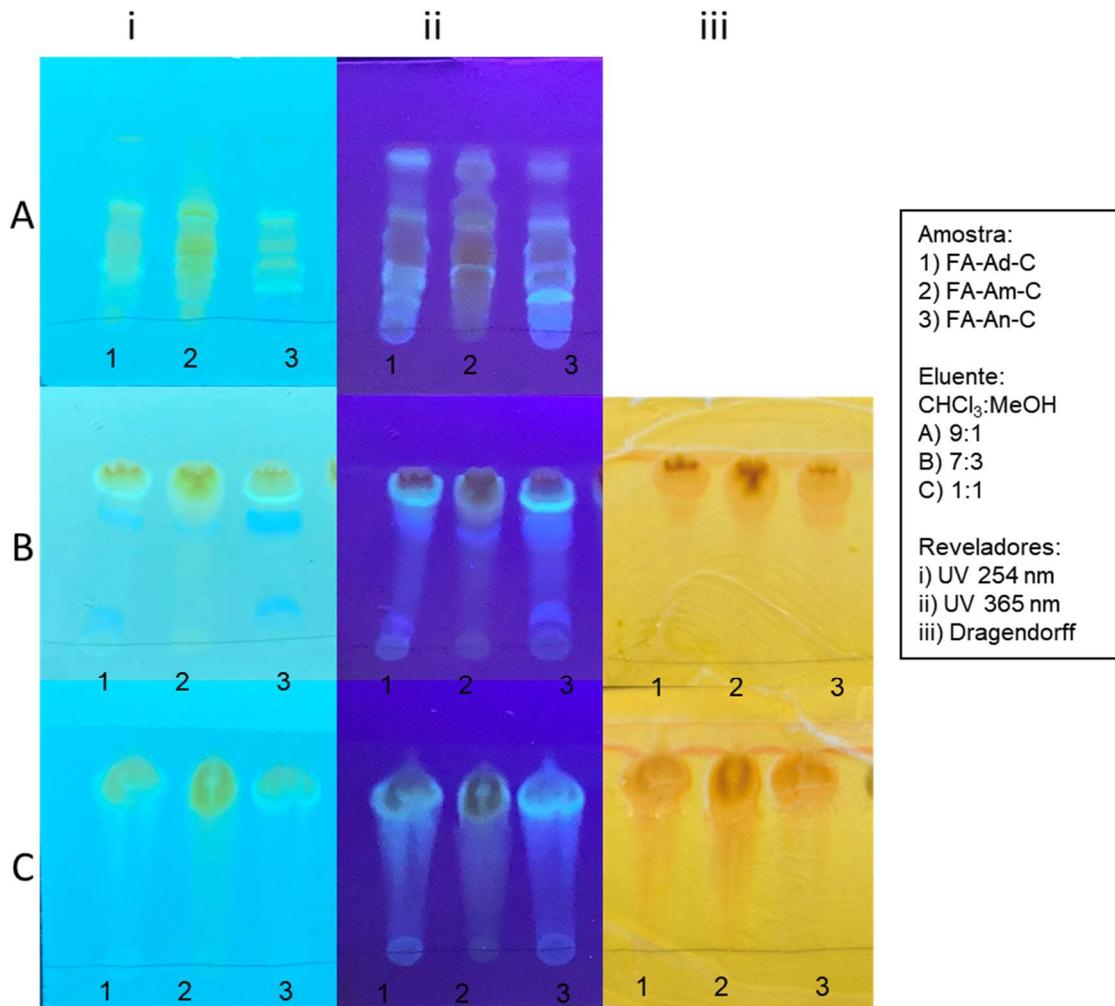


Figura 17 - Análise cromatográfica das frações alcalóidicas das amostras de *Aspidosperma* – CCD fase normal.

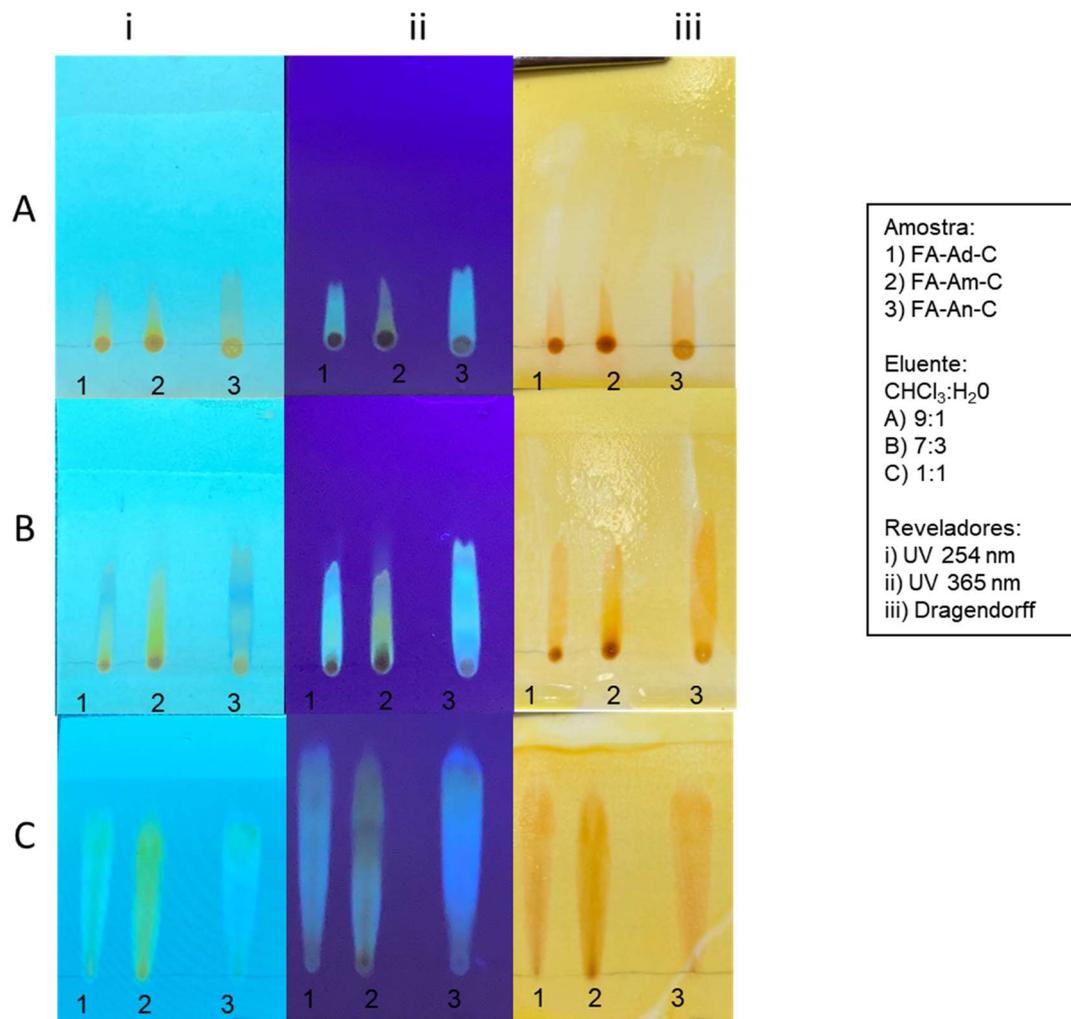


Figura 18 - Análise cromatográfica das frações alcalóidicas das amostras de *Aspidosperma* – CCD fase reversa

5.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ALCALOÍDICO POR ESPECTROMÉTRIA DE MASSAS

A caracterização do perfil de alcaloides foi determinado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) usando como analisador armadilha de íons (*ion trap*) nas amostras obtidas do extrato metanólico, e quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF) nas frações alcalóidicas. A fonte de ionização utilizada foi ESI no modo positivo (M+H)⁺.

A pesquisa objetivou a determinação do perfil alcaloídico por meio da comparação m/z obtidos com o que já foi relatado para o gênero na literatura; e pela similaridade de espectros MS/MS através da plataforma GNPS.

5.3.1. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas de baixa resolução

Na tabela abaixo (tabela 4), originada a partir dos dados espectrométricos, pode-se observar a razão massa carga, m/z (M+H)⁺ das amostras, assim como nome das possíveis estruturas com base em um estudo comparativo das massas obtidas com a dos alcaloides indólicos reportadas em espécies do gênero de *Aspidosperma*.

Tabela 4 - Dados espectrométricos obtidos pelo LC-MS/ion trap das espécies de *Aspidosperma* reportados na literatura como alcaloides indólicos

(continua)

Amostra	m/z (M+H) ⁺	Alcaloide indólico	Espécie	Ref.
		Elipticina	<i>A. dasycarpon</i> ;	<i>Pereira,</i> 2007
			<i>A. gilbertii</i> ;	
			<i>A. subincanum</i> ;	
			<i>A. ulei</i>	
EM-Am-C	247	Olivacina	<i>A. australe</i> ;	<i>Pereira,</i> 2007
			<i>A. campu-belus</i> ;	
			<i>A. dasycarpon</i> ;	
			<i>A. eburneum</i> ;	
			<i>A. gilbertii</i> ;	
			<i>A. longepetiolatum</i> ;	
			<i>A. nigricans</i> ;	
		<i>A. olivaceum</i> ;		
		<i>A. subincanum</i> ;		
		<i>A. ulei</i>		
EM-Ad-C		1,2-Diidroelipticina	<i>A. dasycarpon</i> ;	<i>Pereira,</i> 2007
EM-Am-C	249		<i>A. subincanum</i>	
EM-An-C				

(continua)

Amostra	m/z (M+H) ⁺	Alcaloide indólico	Espécie	Ref.
EM-Ad-C	265	Aparacina;	<i>Aspidosperma olivaceum</i>	Pereira, 2007
EM-Ad-C		N-methyl-		
EM-Ad-C		tetrahydrolivacine		
EM-Ad-C EM-Am-C	267	Uleina	<i>Aspidosperma olivaceum</i> ;	Chierrito 2014
			<i>A. australe</i> ;	
			<i>A. dasycarpon</i> ;	
			<i>A. eburneum</i>	
			<i>A. excelsum</i> ;	
			<i>A. neblinae</i> ;	
			<i>A. oblongum</i> ;	
			<i>A. obscurinervium</i> ;	
			<i>A. olivaceum</i>	
		Aspidospermatidina	<i>Aspidosperma olivaceum</i>	Pereira, 2007
EM-Ad-C	281	N- Metilaspidospermatidina	<i>A. quebracho-blanco</i>	Pereira, 2007
EM-Am-C				
EM-Ad-C EM-Am-C	283	Quebrachamina	<i>A. album</i> ;	J. Schmutz , 1959 Pereira, 2015
			<i>A. peroba</i> ;	
			<i>A. polyneuron</i> ;	
			<i>A. pyriformium</i> ;	
			<i>A. quebrachoblanco</i> ;	
			<i>A. sandwithianum</i>	
			<i>A. chakensis</i>	
			<i>A. neblinae</i> ;	
		Aspidopermidina	<i>A. quebracho- blanco</i> ; <i>A. pyriformium</i> ;	
			<i>A. rhombeosignatum</i>	
		Gilbertina	<i>A. gilbertii</i>	
EM-Ad-C	295	Normacusina B	<i>A. polyneuron</i> ;	Pereira, 2007
			<i>A. pruinatum</i>	
		Eburnamonina	<i>A. neblinae</i> ;	
			<i>A. quebrachoblanco</i>	

(continua)

Amostra	m/z (M+H) ⁺	Alcaloide indólico	Espécie	Ref.
		Corinanteol	<i>A. oblongum</i>	
EM-Ad-C	297	Fendleridina	<i>A. flendleri</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C			<i>A. Quebracho</i>	
EM-An-C		α-Hidroxieturnamonina	<i>blanco;</i> <i>A. neblinae</i>	
EM-Ad-C	298	Hidróxido de N,N-dimetiltetrahydroelipticínio	<i>A. gilbertii</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C				
EM-Ad-C	299	Limaspermidina	<i>A. rhombeosignatum</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C				
EM-Ad-C	313	Desoxiaspidodispermina	<i>A. dispernum</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C				
EM-An-C				
EM-Ad-C	326	Demethoxy-aspidospermine	<i>Aspidosperma olivaceum</i>	<i>Pereira, 2007</i>
		Aspidospermatina	<i>A. oblongum;</i> <i>A. quebrachoblanco</i>	
EM-Ad-C	339	Desmetoxipalosina	<i>A. discolor;</i> <i>A. exalatum;</i> <i>A. limae;</i> <i>A. rhombeosignatum</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C		Secodina	<i>A. marcgravianum</i>	
		Vincadiformina	<i>A. macrocarpon;</i> <i>A. pyriformium</i>	
EM-Ad-C	341	14,19-Diidroaspidospermatina	<i>A. quebracho-blanco</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C				
EM-Ad-C	351	Aldeído de polineuridina	<i>A. dasycarpon</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-C				
EM-Ad-C	353	Ajmalicina	<i>A. excelsum;</i> <i>A. spegazzinii</i>	<i>Pereira, 2007</i>
EM-Am-c		Polineuridina	<i>A. polyneuron</i>	

(continua)

Amostra	m/z (M+H) ⁺	Alcaloide indólico	Espécie	Ref.
EM-Ad-C	355	Aspidospermina	<i>A. cylindrocarpon</i> ;	Pereira, 2007
EM-Am-C			<i>A. sessiliflorum</i> ;	
EM-An-C			<i>A. album</i> ;	
			<i>A. australe</i> ;	
			<i>A. exalatum</i> ;	
			<i>A. peroba</i> ;	
			<i>A. polyneuron</i>	
			<i>A. pyricollum</i> ;	
			<i>A. pyrifolium</i> ;	
			<i>A. quebracho-</i> <i>blanco</i> ;	
			<i>A. quirandy</i> ;	
			<i>A.</i> <i>rhombeosignatum</i> ;	
EM-Ad-C	357	Cilindrocarina	<i>A. cylindrocarpon</i>	Pereira, 2007
EM-Am-C		Espegazinina	<i>A. chakensis</i>	
EM-An-C				
		(-)-Aspidofilina	<i>A. pyrifolium</i>	
			<i>A. discolor</i> ;	
			<i>A. excelsum</i> ;	
			<i>A. eburneum</i> ;	
EM-Ad-C	369	Ioimbina	<i>A. marcgravianum</i> ;	Pereira, 2007
EM-Am-C			<i>A. oblongum</i> ;	
EM-An-C			<i>A. peroba</i> ;	
			<i>A. polyneuron</i> ;	
			<i>A. pruinsum</i> ;	
			<i>A. pyricollum</i> ;	
		<i>A. quebracho-blanco</i>		

(continua)

Amostra	m/z (M+H) ⁺	Alcaloide indólico	Espécie	Ref.
EM-Ad-C	371	Aspidoscarpina	<i>Aspidosperma</i> <i>olivaceum</i> ;	Chierrito 2014
EM-Am-C			<i>A. album</i> ;	
EM-An-C			<i>A. formosanum</i> ;	
			<i>A. limae</i> ;	
			<i>A. marcgravianum</i> ;	
			<i>A. megalocarpon</i> ;	
			<i>A. neblinae</i> ;	
			<i>A. oblongum</i> ;	
			<i>A. obscurinervium</i> ;	
			<i>A. olivaceum</i>	
		Aspidolimina	<i>A. limae</i> ;	Pereira, 2007
			<i>A. obscurinervium</i>	
		Limaspermina	<i>A. limae</i>	
EM-Ad-C	383	3 α -Aricina	<i>A. excelsum</i> ;	Pereira, 2007
EM-Am-C			<i>A. marcgravianum</i>	
EM-Ad-C	385	Aspidolimidina	<i>A. album</i> ; <i>A. limae</i> ;	Pereira, 2007
EM-Am-C			<i>A. marcgravianum</i> ;	
			<i>A. megalocarpon</i>	
			<i>A. cylindrocarpon</i> ;	
			<i>A. neblinae</i> ;	
		Pirifolidina	<i>A. pyriferolium</i> ;	
			<i>A. refractum</i> ;	
			<i>A. quebrachoblanco</i>	
EM-Ad-C	395	Tubotaiwina	<i>A. album</i> ;	Pereira, 2007
EM-Am-C			<i>A. excelsum</i> ;	
EM-An-C			<i>A. limae</i> ;	
			<i>A. pyriferolium</i>	
EM-Ad-C	397	Refractidina	<i>A. pyriferolium</i>	Pereira, 2007
EM-Am-C				
EM-An-C				
EM-Ad-C	399	Cilindrocarpidina	<i>A. cylindrocarpon</i>	Pereira, 2007
EM-Am-C				
EM-An-C				

(concluído)

Amostra	m/z (M+H) ⁺	Alcaloide indólico	Espécie	Ref.
EM-Ad-C EM-Am-C	413	Reserpilina	<i>A. auriculatum</i> ; <i>A. discolor</i> <i>A. marcgravianum</i> <i>A. rigidum</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C EM-Am-C EM-An-C	429	Aspidolbina	<i>A. Album</i>	Hesse, (1964); <i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C EM-Am-C	439	Obscurinervina	<i>A. obscurinervium</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Am-C EM-An-C	441	(+)-Pirifolina	<i>A. cylindrocarpon</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C EM-Am-C EM-An-C	461	N-benzoilcilindrocarina	<i>A. cylindrocarpon</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C EM-Am-C	487	N- Cinamoilcilindrocarpina	<i>A. cylindrocarpon</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C EM-An-C	563	Burnamina	<i>A. cuspa</i> ; <i>A. rigidum</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C	565	Didesmetoxicarbonil- tetraidrosecamina	<i>A. excelsum</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>
EM-Ad-C	681	Tetraidro-secamina	<i>A. excelsum</i> ; <i>A. marcgravianum</i>	<i>Pereira,</i> <i>2007</i>

Com base nos dados pode-se observar a formação predominante de íons de m/z número ímpar, sugerindo a presença de dois átomos de nitrogênio em sua estrutura molecular. Além da similaridade de perfil entra as amostras, principalmente entre a *A. desmanthum* e *A. marcgravianum*, que compartilham íons com a mesma razão massa/carga (m/z).

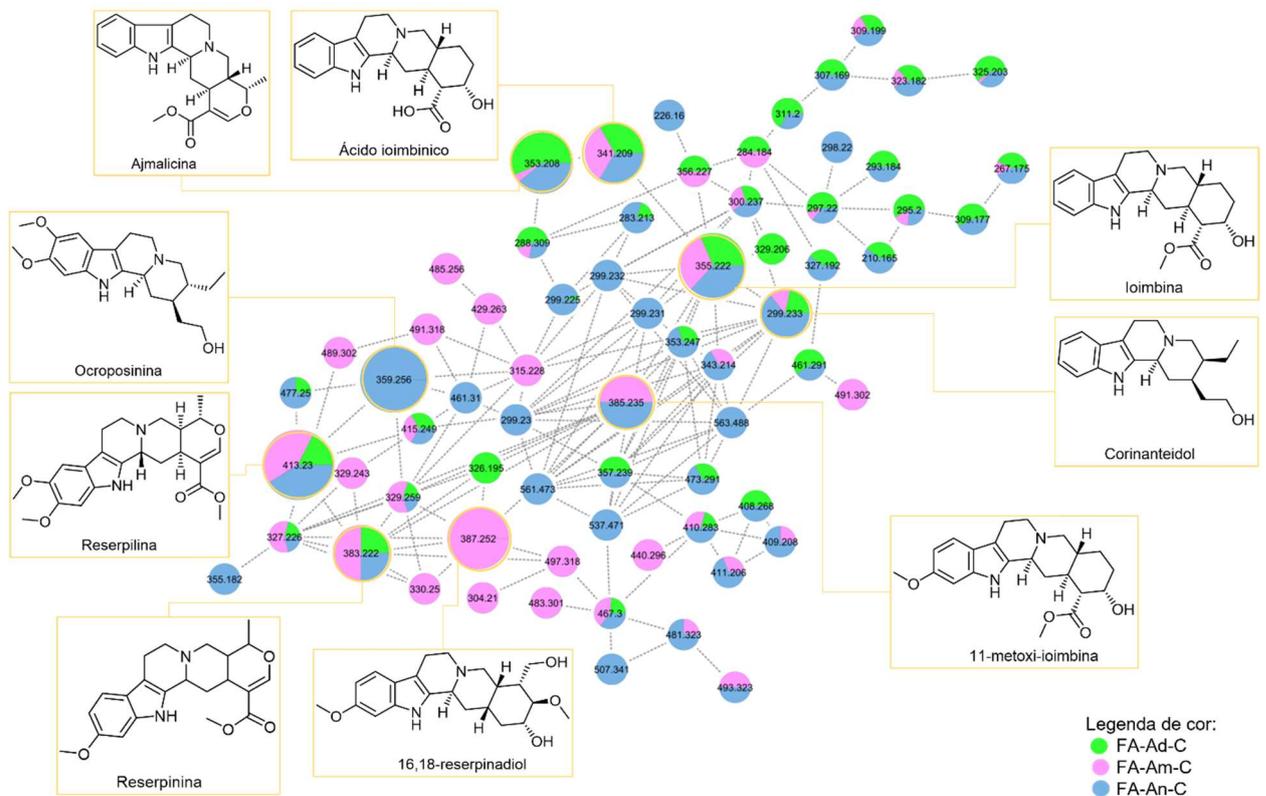
5.3.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução

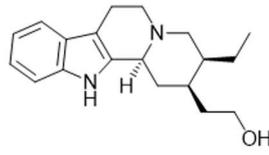
Os dados obtidos do processamento por LC-MS/MS foram convertidos para o formato mzXML e analisados pela plataforma *on-line Global Natural Products Social Networking* (GNPS), para obtenção da rede molecular no modo clássico, por meio do cálculo da similaridade espectral entre espectros de fragmentação de espectrometria de massas (WANG et al., 2016). A rede molecular identifica os compostos com base na similaridade de cosseno dos espectros de MS/MS das amostras e do banco de dados. Dentre as redes moleculares formadas, optou-se por analisar com o maior número de nós, ou seja, com o maior número de famílias espectrais.

Na rede molecular (figura 19) foram anotados 68 nós, e o programa identificou 9 compostos, sendo esses alcaloides indólicos, corinanteidol (m/z 299.23), ácido ioimbinico (341.20), ajmalicina (m/z 353.20), ioimbina (m/z 355.22), ocroposinina (m/z 359.25), reserpinina (m/z 383.22), 11-metoxi-ioimbina (m/z 385.23), 16,18-reserpinadiol (m/z 387.25) e reserpilina (m/z 413.23; figura 28). A tabela a seguir (tabela 5) e figuras de 20 a 37, exibe os dados obtido pelos espectros de MS/MS das moléculas identificadas pelo GNPS, assim como a proposta de fragmentação para cada uma das estruturas.

Tabela 5 - Substâncias identificadas através da análise da rede molecular

Amostra	Substância	m/z (M+H) ⁺	Fragmentação	Ref.
FA-Ad-C; FA-Am-C; FA-An-C	Corinanteíol	299,23	168; 156; 144	SHELLARD, 1973
FA-Ad-C; FA-Am-C; FA-An-C	Ácido ioimbínico	341,20	309; 198; 144	SUN, 2011)
FA-Ad-C; FA-Am-C; FA-An-C	Ajmalicina	353,20	323; 321; 291; 251; 183; 144	SUN, 2011
FA-Ad-C; FA-Am-C; FA-An-C	Ioimbina	355,22	329; 224; 212; 144	KUMAR, 2016
FA-An-C	Ocroposinina	359,25	204; 160	GUNATILAKA, 1989
FA-Ad-C; FA-Am-C; FA-An-C	Reserpinina	383,21	174; 159	KUMAR, 2016
FA-Am-C; FA-An-C	11-metoxi- ioimbina	385,23	174; 159	MIET, 1977
F A-Am-C	16,18- reserpinadiol	387,21	337; 256; 224; 196; 256	-
FA-Ad-C; FA-Am-C; FA-An-C	Reserpilina	413,23	222; 204	KUMAR, 2016

Figura 19 - Rede molecular obtida pela plataforma GNPS formada pelas frações alcaloídica (FA-Ad-C, FA-Am-C e FA-An-C) de *Aspidosperma* por LC-MS/MS



Corinanteidol

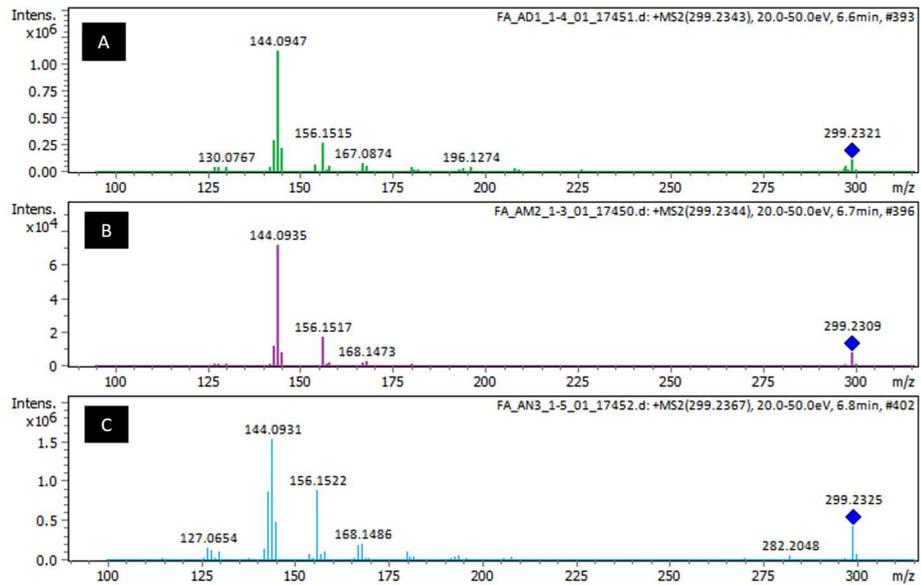


Figura 20 - Espectro de MS/MS do corinanteidol.
(A) FA-Ad-C; (B) FA-Am-C; (C) FA-An-C.

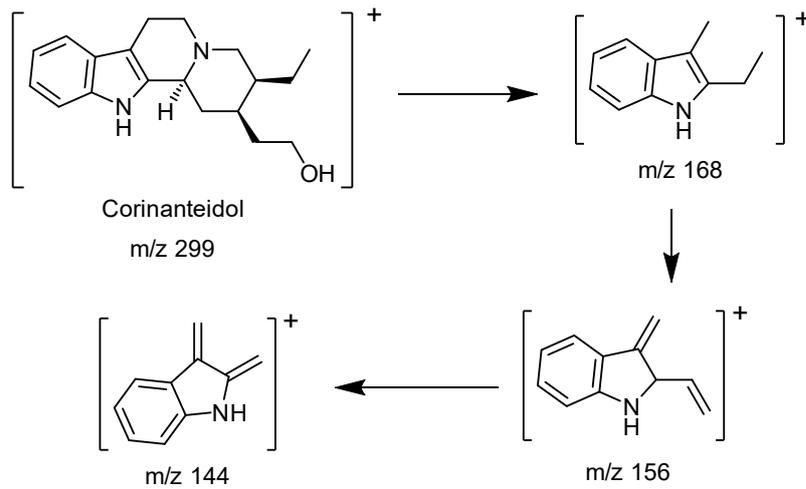
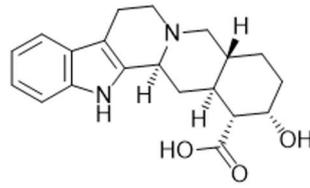


Figura 21 - Proposta fragmentação para a corinanteidol.



Ácido ioimbínico

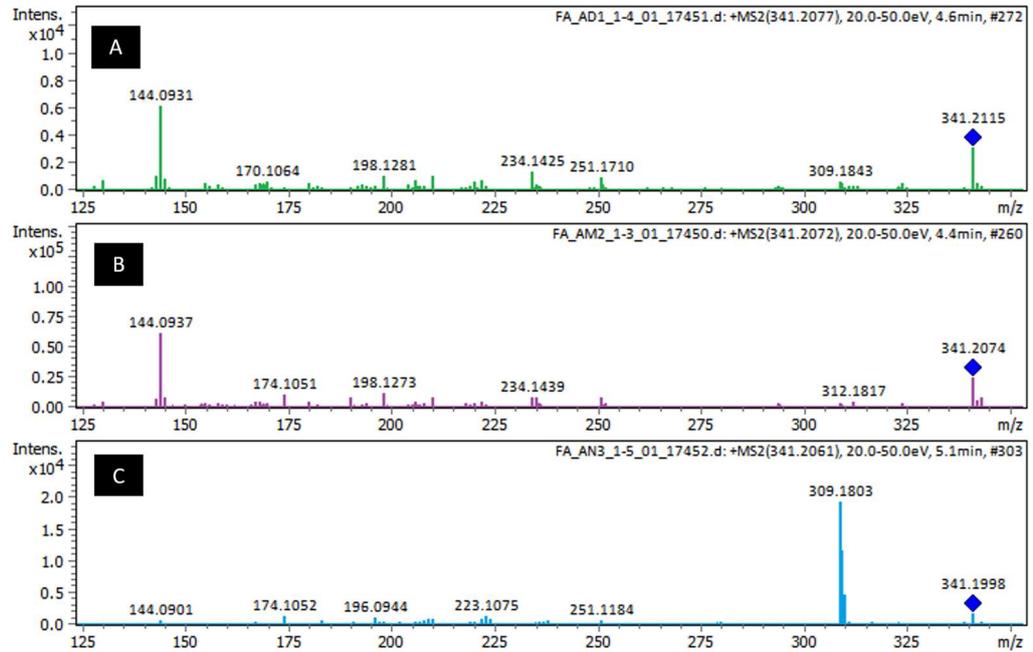


Figura 22 - Espectro de MS/MS do ácido ioimbínico.
(A) FA-Ad-C; (B) FA-Am-C; (C) FA-An-C.

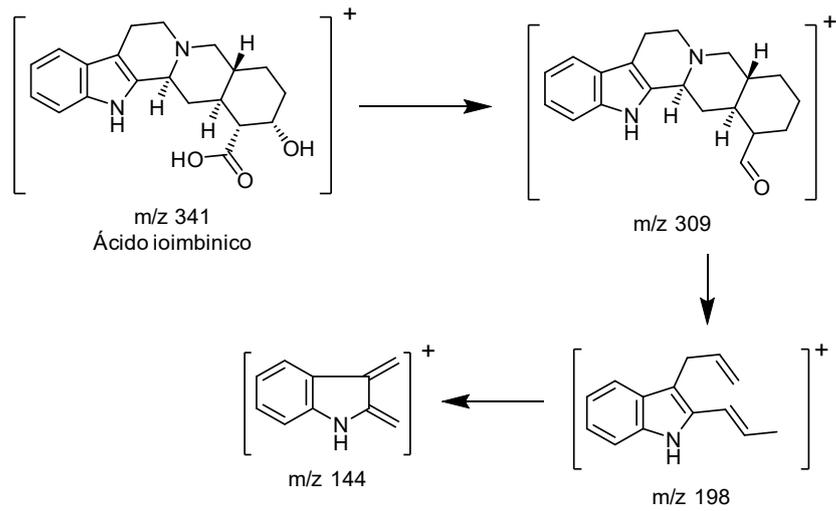


Figura 23 - Proposta fragmentação para a ácido ioimbínico.

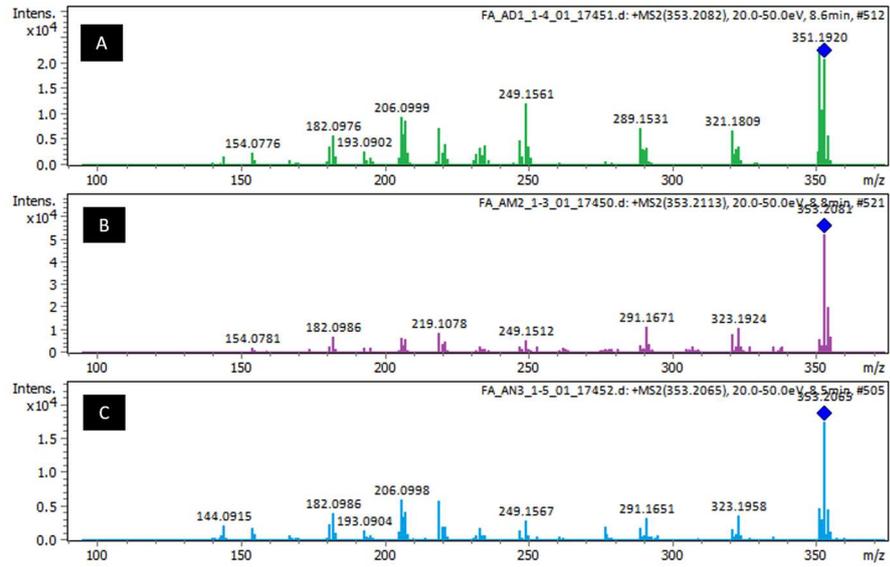
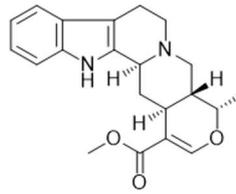


Figura 24 - Espectro de MS/MS do ajmalicina
(A) FA-Ad-C; (B) FA-Am-C; (C) FA-An-C.

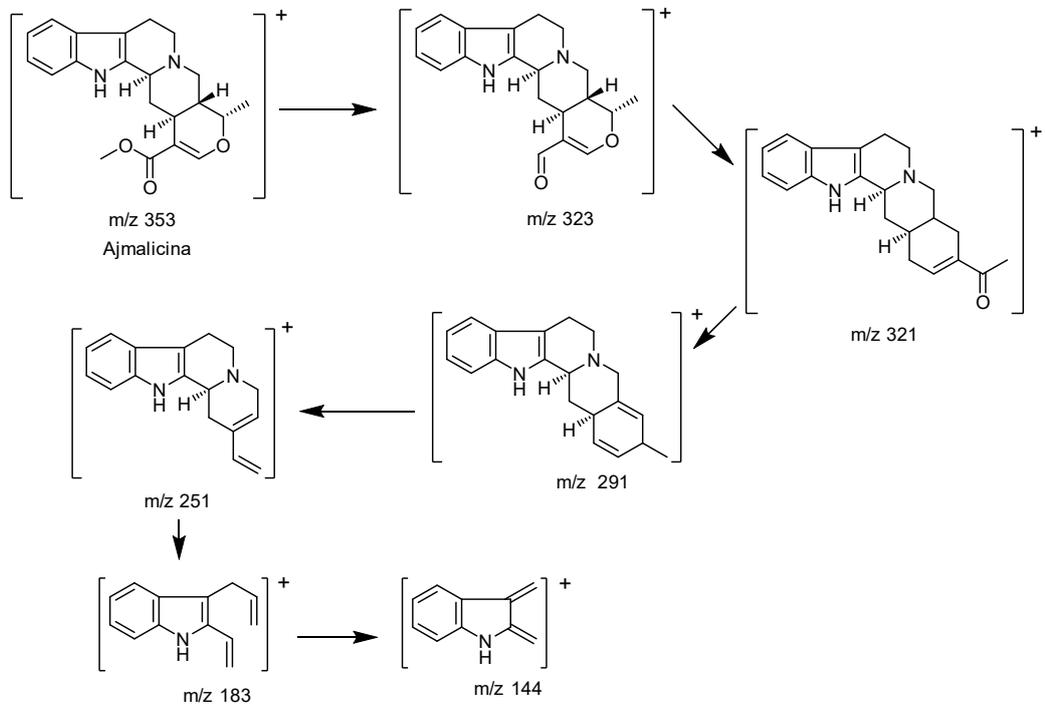


Figura 25 - Proposta de fragmentação para a ajmalicina.

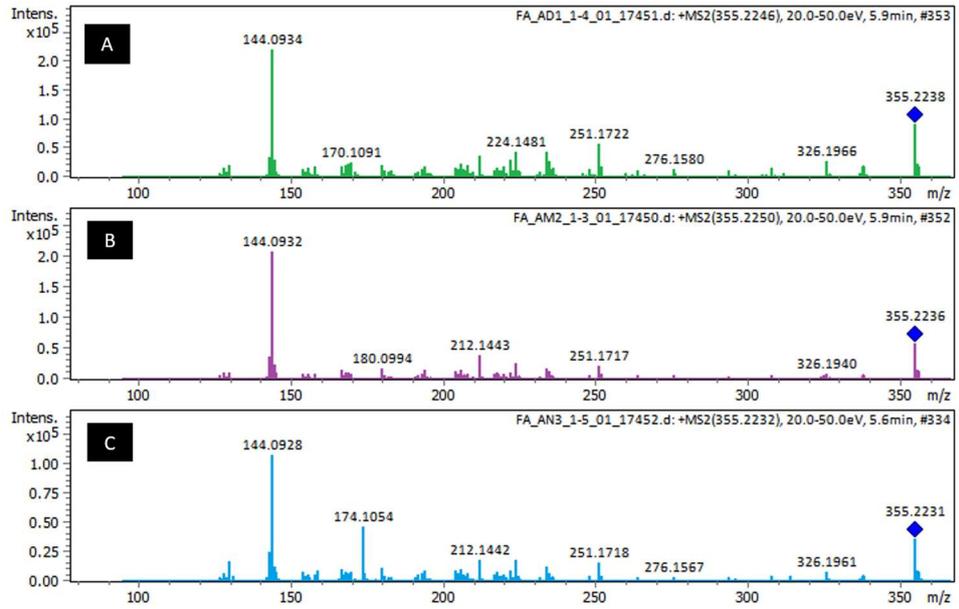
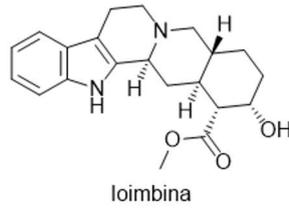


Figura 26 - Espectro de MS/MS do ioimbina.
A) FA-Ad-C; (B) FA-Am-C; (C) FA-An-C.

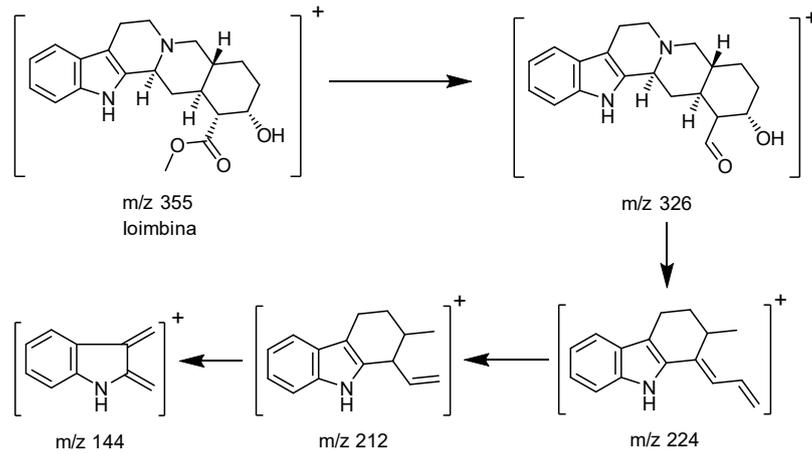


Figura 27 - Proposta de fragmentação para a ioimbina.

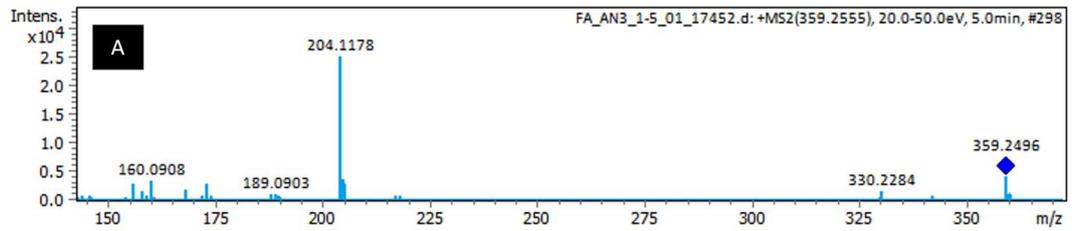
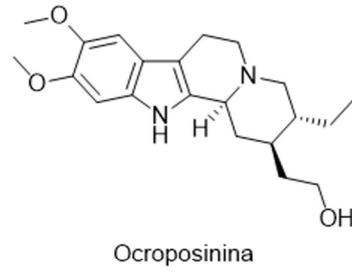


Figura 28 - Espectro de MS/MS do ocropsosinina.
(A)FA-An-C.

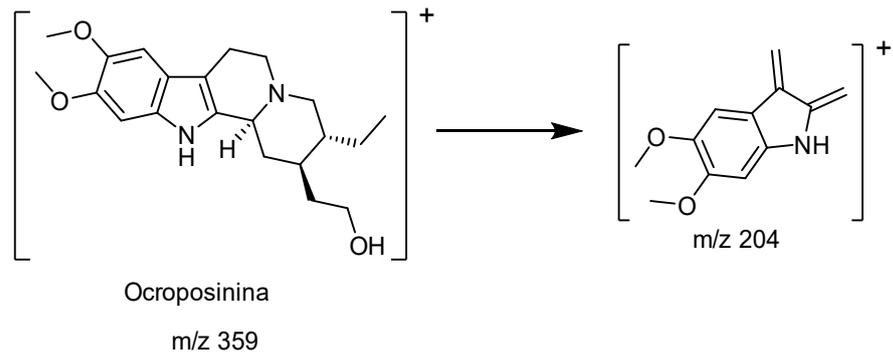
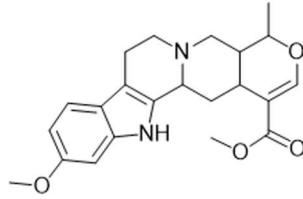


Figura 29 - Proposta de fragmentação para ocropsosinina.



Reserpina

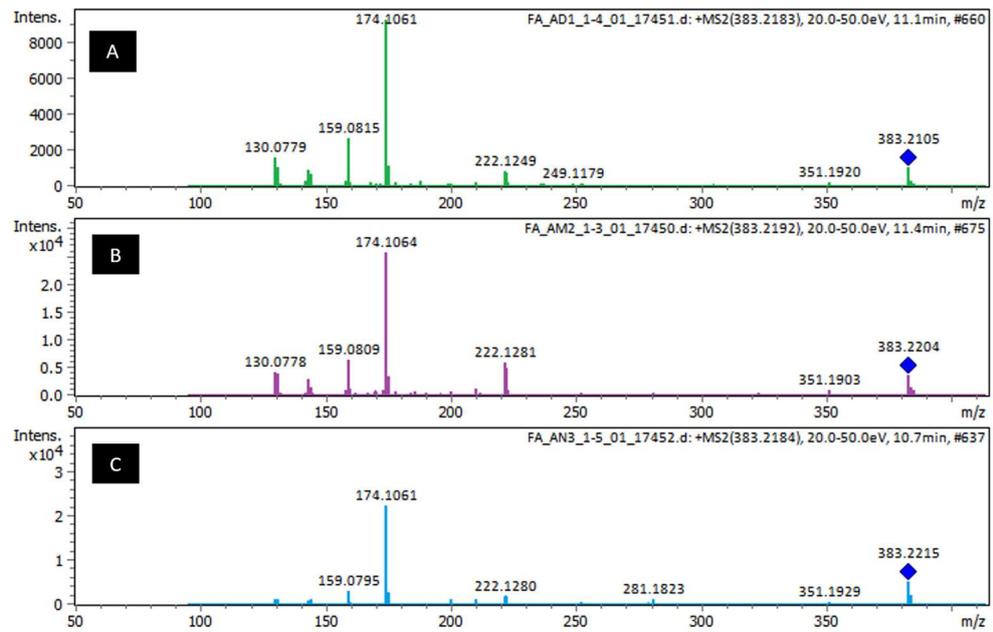


Figura 30 - Espectro de MS/MS do reserpina.
(A) FA-Ad-C; (B) FA-Am-C; (C) FA-An-C

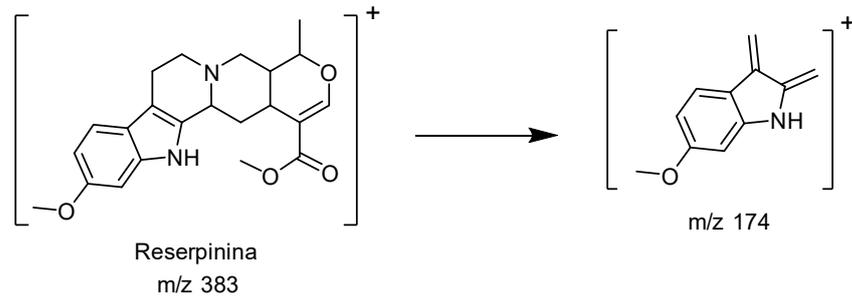


Figura 31 - Proposta de fragmentação para reserpina.

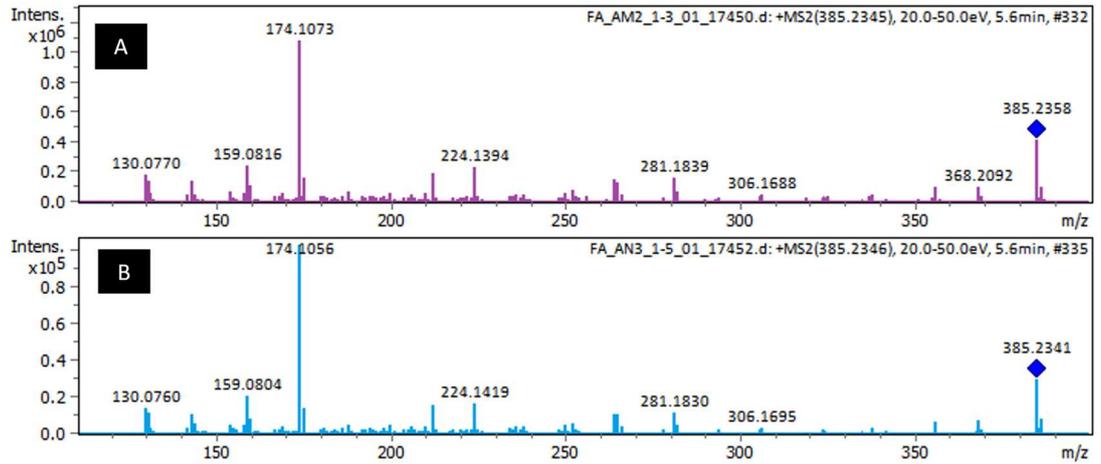
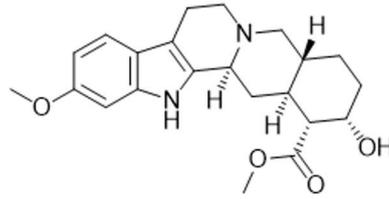


Figura 32 - Espectro de MS/MS do 11-metoxi-ioimbina.
(A) FA-Am-C; (B) FA-An-C

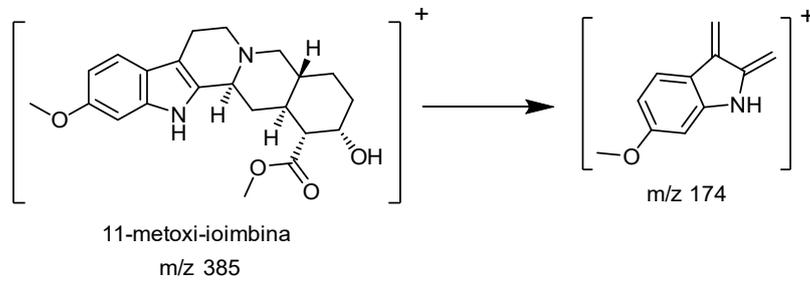
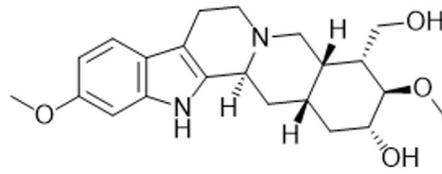


Figura 33 - Proposta de fragmentação para 11-metoxi-ioimbina.



16,18-reserpinadiol

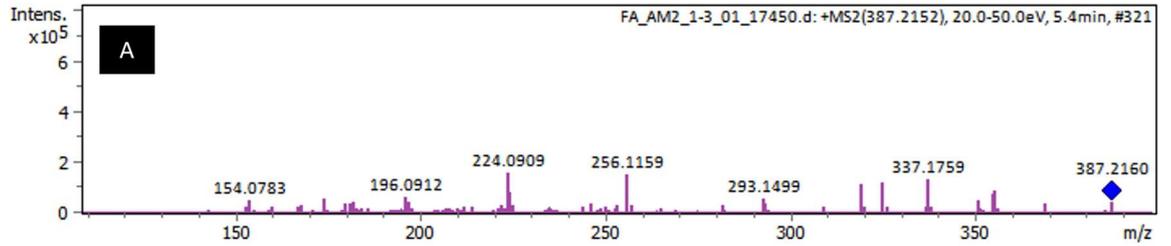


Figura 34 - Espectro de MS/MS do 16, 18-reserpinadiol.
(A) FA-Am-C

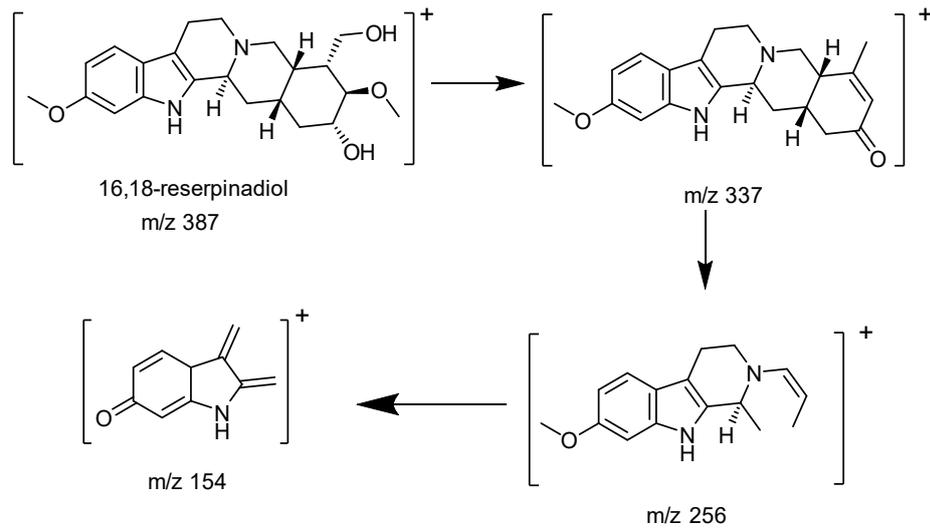
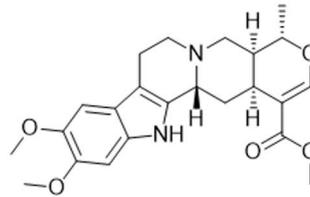


Figura 35 - Proposta de fragmentação para 16,18-reserpinadiol.



Reserpilina

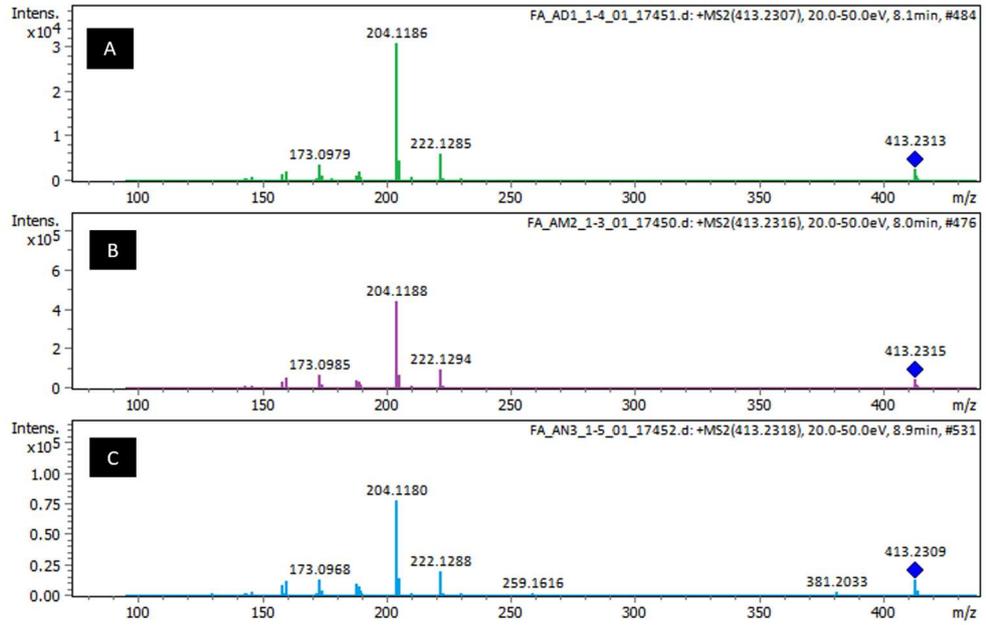


Figura 36 - Espectro de MS/MS do reserpilina
(A) FA-Ad-C; (B) FA-Am-C; (C) FA-An-C

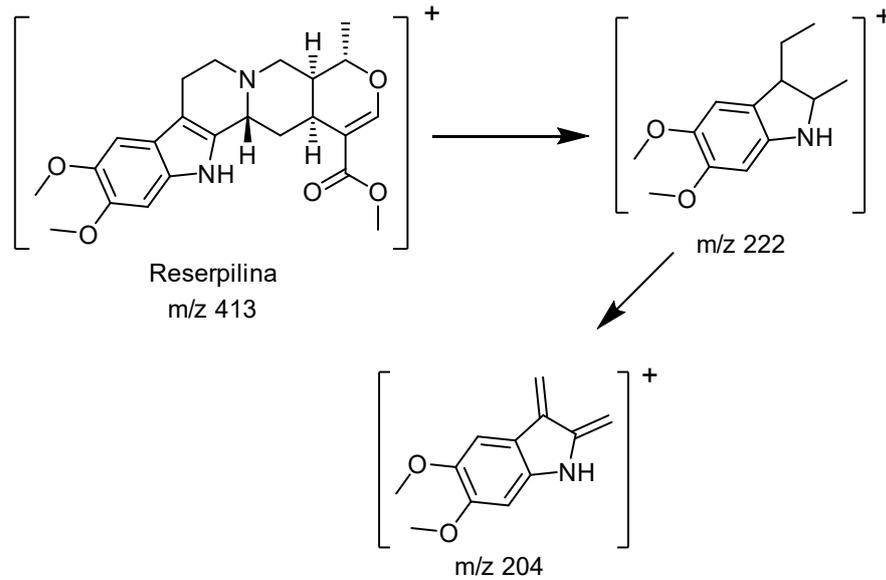


Figura 37 - Proposta de fragmentação para reserpilina.

Ao observar a rede molecular, existe a formação de alguns nós repetidos, como o nó com m/z 353, cujo dado pode estar relacionado ao modo de criação da rede molecular. A rede molecular no modo clássico não necessita de muitas etapas de pré-processamento e os espectros são agrupados pelo algoritmo *MSCluster* levando em consideração os espectros com o mesmo sinal cromatográfico, formando os espectros consenso, assim pode ocorrer a repetição de nós com o mesmo íon precursor, pois não leva em consideração os tempos de retenção agrupando isômeros e/ou isóbaros. (OLIVON et al., 2017; PILON et al., 2021). Na construção da rede molecular pode ocorrer ainda falhas no agrupamento dos nós, relacionada ao *MSCluster*, que levam a formação de múltiplos nós referentes ao mesmo composto (NOTHIAS et al., 2020).

No *cluster* observado formou-se alcaloides indólicos monoterpênicos, um dos maiores e mais diversificados grupos de alcaloides, amplamente usados na medicina como a vindolina, serpentina, vimblastina e vincristina (MISRA et al., 1999). No processo de fragmentação dessas moléculas a perda inicial do terpeno ocorre por clivagem Retro Diels-Alder, seguida da quebra do anel C, formando assim íons fragmento 144, 174 e 204 como pico base.

Na rede molecular pode-se observar a formação de dois grupos, um formado por corinanteidol, ácido ioimbinico, ioimbina e ajmalicina que possuem o fragmento 144 como pico base. E o outro grupo composto por ocroposinina, reserpina, 11-metoxi-ioimbina, 16,18-reserpina, reserpilina com íon fragmento 174 ou 204 como pico base.

Os alcaloides corinanteidol, ioimbina, ácido ioimbinico, reserpina e reserpilina foram notados pela primeira vez nas espécies *A. desmanthum* e *A. nitidum*. O alcaloide ajmalicina foi identificado pela primeira vez nas espécies de *Aspidosperma*, desse estudo. A ajmalicina já havia sido reportada no gênero nas *A. excelsum* e *A. spegazzinii* (PEREIRA et al., 2007).

Foram ainda notados alcaloides indólicos isolados de outras espécies pertencente à família Apocynaceae. O ocroposinina identificado na *A. nitidum*, foi isolado anteriormente de *Ochrosia oppositifolia* (*Neisosperma oppositifolia*) (GUNATILAKA, 1998). Nas espécies *A. marcgravianum* e *A. nitidum* foi identificado o 11-metoxi-ioimbina, reportado na literatura nas espécies de *Rauwolfia capuroni* e *R. nitida*. E o alcaloide 16,18-reserpina foi identificado na *A. marcgravianum*, reportado em *Rauwolfia serpentina* (BUCKINGHAM et al., 2010).

A. marcgravianum é uma das espécies que mais se destaca em número de alcaloides isolados, com base em outros estudos, porém as espécies *A. desmanthum* e *A. nitidum* também possuem classes importante de metabólitos, o que caracteriza essas espécies como importante fonte de compostos bioativos o que está de acordo com a característica do gênero.

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são substâncias capazes de regenerar ou prevenir um organismo dos danos causados pelos radicais livres, causadores de muitas doenças como, câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e o envelhecimento (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, na realização deste trabalho optou-se por dois métodos para avaliar o potencial antioxidante dos extratos metanólicos das *Aspidospermas* (EM-Ad-C, EM-Am-C e EM-An-C; tabela 5). O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que é baseado na capacidade do radical DPPH ser capturado por antioxidantes, ou seja, em reagir com moléculas doadores de hidrogênio. E o método FRAP (teste do poder antioxidante de redução do ferro) que mede a capacidade dos antioxidantes produzir o ferro ferroso (íon Fe^{2+}) partir da redução do ferro férrico (íon Fe^{3+}) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; MARXEN et al., 2007; MOLYNEUX, 2004; RUFINO et al., 2006).

No teste de DPPH a capacidade de sequestro de radicais livres das amostras foi calculada com base no conhecimento da curva padrão obtida a partir do ácido gálico (Figura 38). Pode-se observar que as amostras não demonstraram valores significativos de redução do radical DPPH quando comparadas ao ácido gálico, $EC_{50} > 100$ mg/L (tabela 6), ou seja, as amostras tiveram pouca atividade sequestradora.

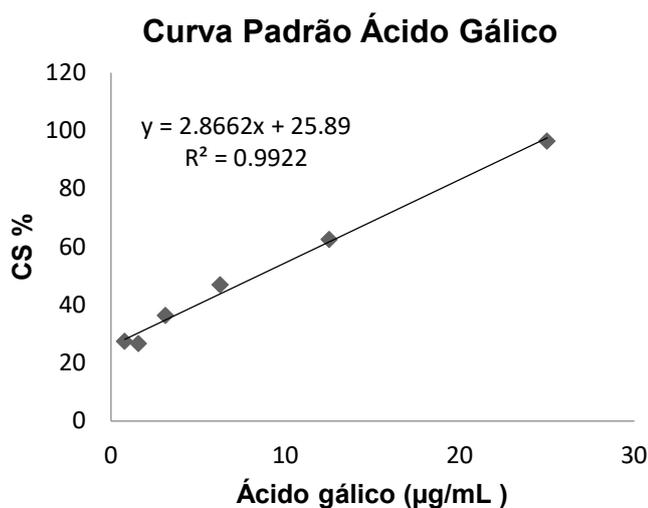


Figura 38 - Curvas de calibração do Ácido Gálico

Nas espécies do gênero *Aspidosperma*, a principal classe de metabolitos produzidos são os alcaloides indólicos monoterpênicos, e acredita-se que a síntese desses alcaloides está diretamente relacionada ao estresse oxidativo, desempenhando um papel nas respostas antioxidantes das plantas (MATSUURA; RAU; FETT-NETO, 2014). O estresse oxidativo influencia na concentração de alcaloides bioativos, e no teste do DPPH a concentração dessas moléculas é quem determina a reatividade do antioxidante. Logo, a pouca atividade antioxidante das amostras testadas pode ser explicada pela baixa concentração de moléculas com grupos hidroxilas ligadas ao núcleo aromático das substâncias presentes nas amostras (ALVES et al., 2010).

No método FRAP a capacidade de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} foi medida por meio da construção de uma curva de calibração com soluções de sulfato ferroso (Figura 39). Para a determinação da atividade antioxidante, seguiram-se os cálculos descritos por Rufino (2006), após a obtenção da curva de calibração com o padrão, que apresentou coeficiente de linearidade (R^2) de 0,9982, mostrando boa correlação linearidade para a realização da capacidade redutora das amostras.

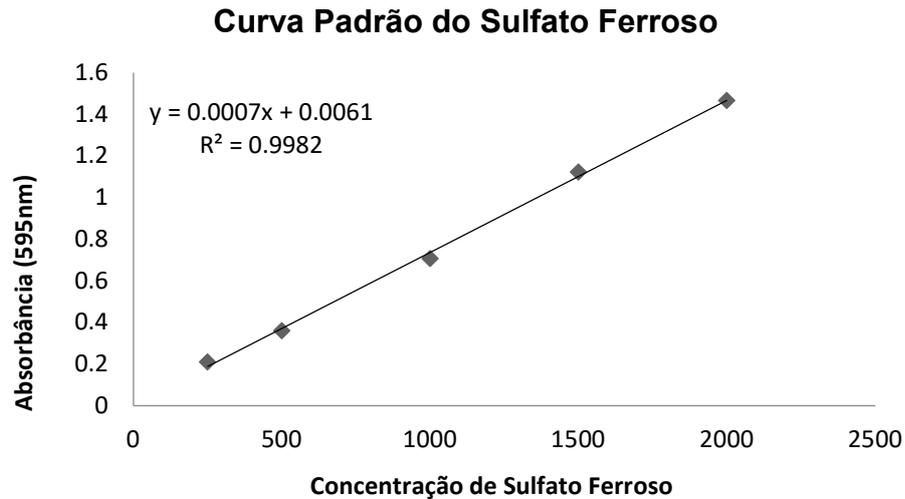


Figura 39 - Curvas de calibração do Sulfato Ferroso.

A amostra que apresentou maior atividade antioxidante foi o extrato EM-Ad-C com valor de $886,83 \pm 0,001 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$ (tabela 5), seguida da EM-Am-C e EM-An-C, $741,86 \pm 0,004$ e $699,60 \pm 0,001 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, respectivamente.

Pode-se observar que o resultado da atividade antioxidante das amostras analisadas alterou conforme a metodologia utilizada, o que salienta a importância de aplicação de metodologias diferentes na busca de moléculas bioativas. Em concordância com Alam (2013), a atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único modelo de teste antioxidante, e a comparação entre os métodos não deve ser absoluta uma vez que os modelos de teste de antioxidantes variam em diferentes aspectos. Como o caso das metodologias usada nesse trabalho, visto que o teste do DPPH avalia a presença de moléculas que possam doar átomo de hidrogênio, enquanto o método do FRAP se baseia na capacidade da amostra em reduzir íons férricos. Por isso, o resultado no potencial antioxidante das amostras testadas nesse trabalho foi discordante, apresentando bom potencial antioxidante em apenas um dos métodos utilizados (BOSCOLO et al., 2007).

Tabela 6 - Atividade antioxidante total (AAT) das *Aspidosperma*

Amostras	DPPH	FRAP
	(EC ₅₀ mg/L)	(μ M sulfato ferroso/g)
EM-Ad-C	163,26	886,83 \pm 0,001
EM-Am-C	120,315	741,86 \pm 0,004
EM-An-C	126,91	699,60 \pm 0,001
Ácido gálico	8,412	-

Valores constituem média \pm desvio-padrão de três amostras.

5.5. ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Com busca por compostos bioativos para o tratamento da doença de Alzheimer (DA) se intensificou a busca por compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por perda progressiva de memória e comprometimento cognitivo. Compostos inibitórios da AChE são o principal grupo de medicamentos indicados para tratar a doença de Alzheimer em pacientes nos estágios leve a moderada (LIN et al., 2008; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

A AChE é uma enzima cuja ação inativa a acetilcolina (ACh), neurotransmissor bastante difundido por todo o sistema nervoso por meio da hidrólise para colina. A acetilcolina é crucial para a propagação do impulso nervoso. A AChE quando bloqueada é incapaz de hidrolisar a acetilcolina e assim, este neurotransmissor tende a permanecer ativo por um período maior na fenda sináptica, fato que incrementa a transmissão colinérgica (MOTA et al., 2012; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Os testes de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, foram realizados nos extratos metanólicos e nas frações alcalóidicas das espécies de *Aspidosperma* e no controle positivo, neostigmina (tabela 7). A curva de inibição usando a neostigmina foi construída nas concentrações de 0,2 a 9,0 μ g/mL (figura 40).

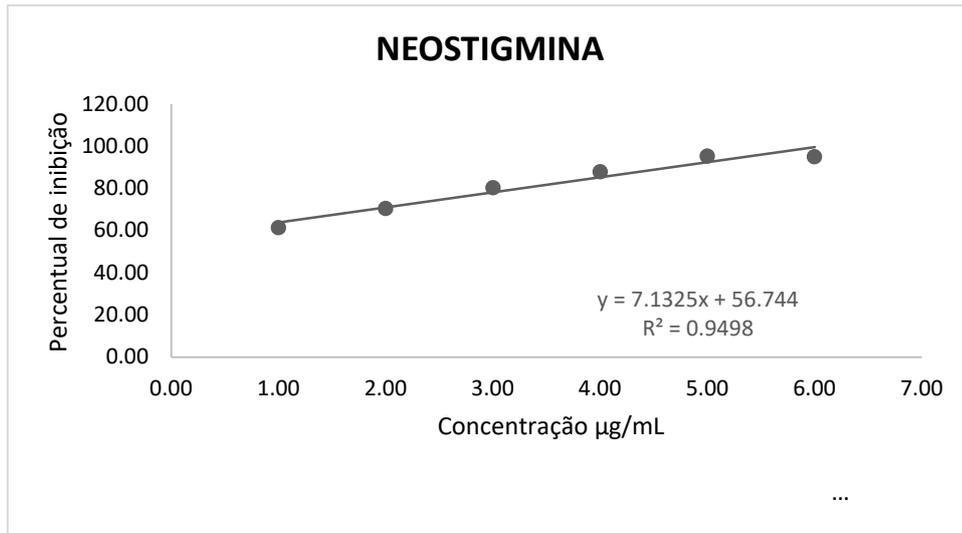


Figura 40 - Curva de inibição a partir do percentual de inibição pela concentração do controle

Dentre as amostras testadas a *A. marcgravianum* foi a espécie mais promissora, com percentual de inibição de 62,18% para EM-Am-C e 72,32% para FA-Am-C. A neostigmina foi utilizada como controle positivo e mostrou o percentual de inibição de 94,50%.

A amostra que mais se aproximou do padrão neostigmina com CI_{50} de 1,28 μ M foi o extrato EM-Am-C com CI_{50} de 3,38 μ M. O CI_{50} de 9,05 μ M foi observado para FA-Am-C e 30,31 μ M para FA-An-C.

Na literatura as espécies os alcaloides são relatados como substâncias com moderada a boa atividade inibitória da AChE, como o alcaloide uleina e seus derivados que apresentam boa atividade. O extrato da *Aspidosperma subincanum*, também possui boa atividade (PEREIRA ROCHA et al., 2018). Porém ainda são escassos os trabalhos voltados para esse gênero sobre a inibição da AChE.

Tabela 7 – Percentual de inibição e concentração inibitória da enzima acetilcolinesterase para as frações alcalóidicas e extratos de *Aspidosperma* spp.

Amostra	% de inibição	IC ₅₀ (µM)
EM-Ad-C	44,87	-
EM-Am-C	62,18	3,38
EM-An-C	29,10	-
FA-Ad-C	33,68	-
FA-Am-C	72,32	9,05
FA-An-C	61,03	30,31
Neostigmina	94,50	1,28

5.6. Avaliação da Citotoxicidade

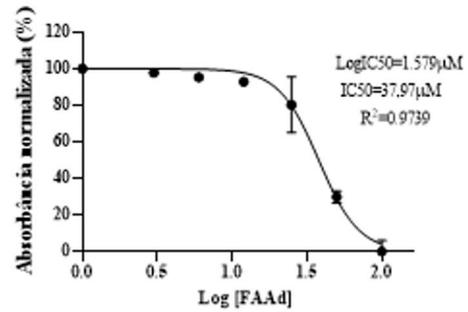
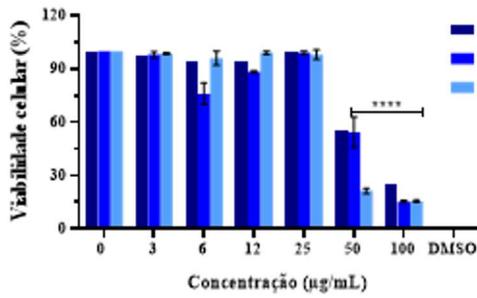
Os alcaloides além de serem reconhecidos como bons compostos bioativos e serem amplamente usados em medicamentos, também podem causar problemas graves a saúde.

Assim, a efetividade das frações alcalóidicas resultantes do fracionamento ácido-base foram avaliadas em diferentes concentrações no ensaio de viabilização celular (MTT) em células tumorais HL60 e células normais tipo Vero. O MTT (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3, 5-difenilformazan) é um sal de coloração amarela e solúvel em água a formazan, sal de coloração arroxeada e insolúvel em água (MOSMANN, 1983). O formazan produzido por suspensões celulares correlaciona-se diretamente com o número de células vivas metabolicamente ativas (BERNHARD et al., 2003).

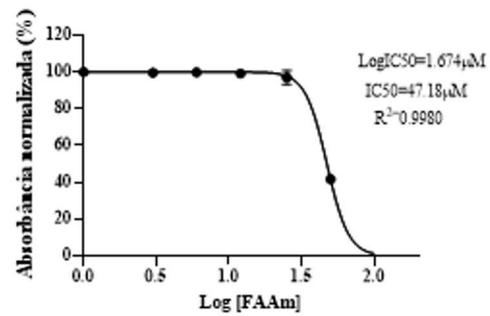
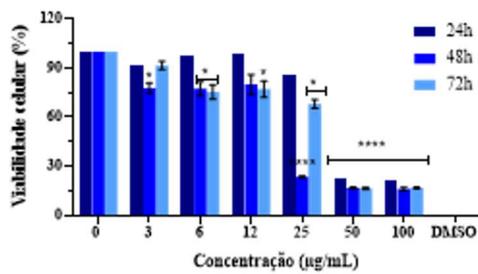
A FA-Am-C (figura 41) demonstrou maior estabilidade frente as células HL60, seguida da FA-Ad-C; e a FA-An-C não apresentou citotoxicidade. Entretanto a FA-Ad-C (tabela 8) demonstrou maior eficiência contra as linhagens de células tumorais que a FA-Am-C, com CI₅₀ 37,97 mg/mL e CI₅₀ 47,48 mg/mL, respectivamente.

Linhagem HL60

FA-Ad-C



FA-Am-C



FA-An-C

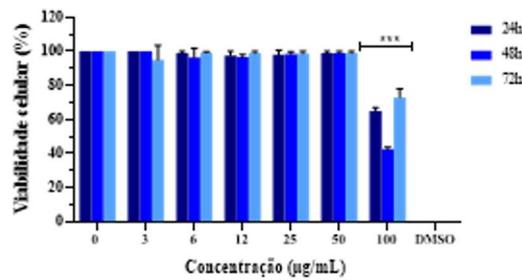


Figura 41 - Atividade citotóxica das frações alcalóidicas contra a linhagem celular HL60.

Tabela 8 - Atividade citotóxica das *Aspidosperma*

CI ₅₀ (µM)	
Leucemia promielocítica aguda humana (linhagem HL60)	
Amostra	
FA-Ad-C	37,97
FA-Am-C	47,18
FA-An-C	-

Os resultados na linhagem não cancerígena Vero (figura 42) apresentaram semelhança com o da linhagem cancerígena HL60, a FA-An-C não apresentou significativa citotoxicidade; e a FA-Am-C foi a que mostrou maior citotoxicidade. Esses resultados demonstram que as frações testadas não possuem boa seletividade e, portanto, possuem fraca atividade anticancerígena. Entretanto, ressalta-se que as frações testadas constituem uma mistura de substâncias, que por consequência influenciam no resultado. Nos alcaloides indólicos, em que as principais diferenças estruturais estão na cadeia lateral ligada ao anel indólico, pode ocorrer interferir na solubilidade e captação celular (KATO et al., 2021).

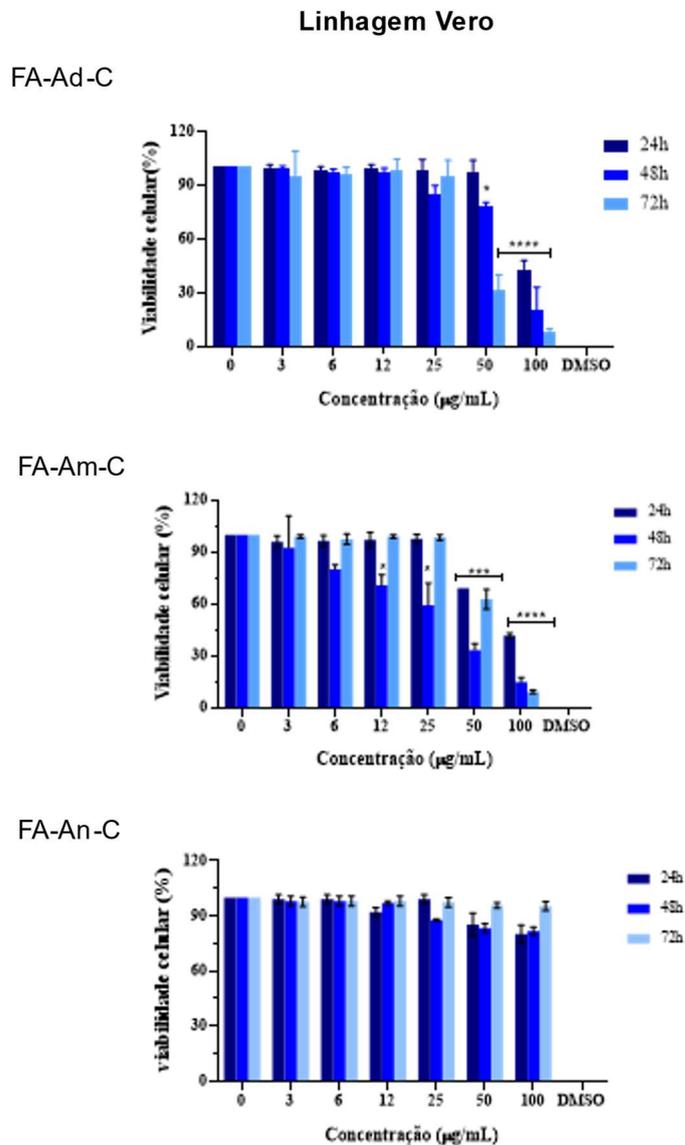


Figura 42 - Atividade citotóxica das frações alcalóidicas contra a linhagem celular Vero.

Nos testes realizados *in vivo* por BRÍGIDO (2020) da toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico e fração de alcaloides obtidos de *A. nitidum* em camundongos tanto a dose única quanto as doses repetidas não demonstraram sinais de toxicidade, sugerindo um potencial para uso seguro.

O extrato hidroetanólico *Aspidosperma excelsum* revelou baixa citotoxicidade atividade *in vitro* para células de hepatoma humano ($> 250 \mu\text{g/mL}$) e bom SI ($> 10,56$)(DO NASCIMENTO et al., 2019). Já, a *A. pyrifolium* caracterizada como uma espécie tóxica, em um dos estudos realizados com essa espécie, observou-se que ratas prenhas tiveram uma redução do peso fetal e fortes evidências de toxicidade materna, sendo letal para algumas delas, após a ingestão do extrato desta planta. Também foi verificado o extrato de *A. pyrifolium* promoveu hemólise e foi letal para o organismo *Artemia salina* (DE SOUZA LIMA; SOTO-BLANCO, 2010). O alcaloide indólicos elipticina, encontrado em *Aspidosperma*, apresenta alta citotoxicidade, tem atividade antitumoral em células HL-60 (leucemia), CCRF-CEM (leucemia), IMR-32 (neuroblastoma) e U87MG (glioblastoma), que são caracterizadas por uma alta capacidade de proliferação (KATO et al., 2021). E a aspidospermina, alcaloide isolado da *A. polyneuron*, possui tanto atividade citotóxica (começando em $75 \mu\text{M}$) quanto genotóxica (começando em $50 \mu\text{M}$) em células de hepatoma humana (HepG2) (COATTI et al., 2016).

Espécies de *Aspidosperma* são fontes de substâncias que podem ser úteis para o desenvolvimento de novos fármacos, e os testes para avaliação de citotoxicidade *in vitro* representam uma alternativa rápida, eficiente e importante para a exploração do gênero.

5.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

Uma das principais funções dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas é a proteção de microrganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (SILVA et al., 2010) e a busca por esses metabólitos tem se intensificado devido a sua importância como forma de inibir ou combater patologias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes que constantemente adquirem resistência a antibióticos industrializados (GONÇALVES et al., 2011).

As amostras obtidas pelo extrato metanólico e extrato aquoso da casca das *Aspidospermas* foram submetidas à avaliação de atividade antimicrobiana contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton. Na tabela 9, são apresentados os resultados das amostras que foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo.

Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras obtidas de *Aspidosperma* spp.

Microrganismos		CIM (µg/mL)				
		APD_ EM-Ad-C	APD_ EM-Am- C	APD_ EM-An-C	APD_ EA-Ad-C	APD_ EA-Am- C
Gram- positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 35983	25	3,12	50	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	50	12,5	50	50	50
Gram- negativa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	50	12,5	50	50	50
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	50	-	-	-

ADP = ácido dipicolínico

A determinação de atividade antimicrobiana foi de acordo com HOLETZ (2002) considerando a concentração inibitória mínima (CIM), extratos com CIM inferior a 100µg/ml, a atividade antimicrobiana foi considerada boa; de 100 a 500µg/ml a atividade antimicrobiana foi moderada; de 500 a 1000 µg/ml a atividade antimicrobiana foi fraca; mais de 1000 µg/ml o extrato foi considerado inativo.

Assim, pode-se avaliar que o extrato metabólico da *A. marcgravianum* apresentou boa atividade em todos os microrganismos testados. Esta também obteve

a melhor resposta de inibição entre os organismos testados, com CIM de 3,12 µg/mL em *S. aureus*. Nos testes em *S. epidermidis* e *E. coli* apresentou valor de CIM 12,5 µg/mL, para ambas; e foi a única amostra reativa *P. aeruginosa* com CIM de 50 µg/mL.

A amostra do extrato metanólico de *A. desmanthum* foi capaz de inibir 25 µg/mL(CIM) e o extrato metanólico de *A. nitidum* 50 µg/mL(CIM) de *S. aureus*. E ambas as amostras em *S. epidermidis* e *E. coli* obtiveram CIM de 50 µg/mL. Extratos aquosos da *A. desmanthum* e *A. nitidum* obtiveram resultados similares nos testes de gram-positiva e gram-negativa com CIM de 50 µg/mL para *S. epidermidis* e *E. coli*, portanto, apresentaram boa atividade antimicrobiana para esses microrganismos.

Os dados obtidos reafirmam os de Verpoorte (1982) onde em seu trabalho de *screening* de uma série de plantas medicinais com atividade antimicrobiana descreve as espécies de *Aspidosperma* como uma das mais ativas, *A. marcgravianum* entre as de espécies *Aspidosperma* testadas, sendo os alcaloides indólicos como, vindolina, apparicina, vindolinina, ajmalicina, reserpina, aspidospermina e tabernaemontanine responsáveis pela atividade. Assim como Brígido e colaboradores (2020) que atribuíram o potencial antimicrobiano da *A. nitidum* aos alcaloides.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do perfil alcaloidico dos extratos metanolicos e frações alcaloidicas das cascas de *Aspidosperma desmanthum*, *Aspidosperma marcgravianum* e *Aspidosperma nitidum* por meio das técnicas cromatográficas e espectrométricas evidenciam a presença de alcaloides indólicos nessas espécies. A plataforma GNPS demonstrou ser uma importante aliada na identificação de composto por meio de compartilhamento de dados, onde permitiu a identificação de nove compostos sendo cinco já isolados de *A. marcgravianum* (corinanteidol, ioimbina, ácido ioimbinico, reserpinina e reserpilina). O alcaloide ajmalicina, usado como o anti-hipertensivo, foi identificado em todas as espécies. Além de três alcaloides indólicos relatados pela primeira vez no gênero, ocroposinina 11-metoxi-ioimbina, 16,18-reserpinadiol. Os dados analisados contribuem com o estudo fitoquímicos das espécies, principalmente das *A. desmanthum* e *A. nitidum*.

Os testes de atividade antioxidante ressaltaram a importância de mais de um meio de avaliação, pois os extratos metanolicos apresentaram baixa atividade antioxidante por meio do sequestro de radical DPPH e alto potencial antioxidante pelo método da redução Fe^{3+} para Fe^{2+} . Na avaliação da atividade inibidora da AChE, as amostras apresentaram ser promissoras para futuros estudos para desenvolvimento de fármacos, o extrato EM-Am-C obteve CI_{50} de 3,38 $\mu g/mL$ e FA-Am-C o CI_{50} foi de 9,05 $\mu g/mL$. As frações usadas para avaliação de citotoxicidade por meios das linhagens HL60 e Vero obtiveram baixa seletividade, fator que pode ser visto como favorável uma vez que não descarta a possibilidade de atividade diante dos alcaloides possíveis nas espécies.

No teste de atividade antimicrobiana o extrato metanólico e extrato aquoso apresentaram boa atividade em bactérias gram-positiva e gram-negativa provavelmente devido a presença de alcaloides. As amostras EM-Ad-C, EM-An-C, EQ-Ad-C e EQ-Am-C obtiveram CIM de 50 $\mu g/ml$ para *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, o EM-Am-C obteve 12.5 para ambas. Para *Staphylococcus aureus* apenas os extratos metanolicos foram testados e os valores de CIM são 25, 3.12 e 50 $\mu g/mL$ para EM-Ad-C, EM-Am-C e EM-An-C. E o EM-Am-C foi testado em *Pseudomonas aeruginosa* obtendo CIM de 50 $\mu g/mL$.

Desta forma, os resultados gerados ressaltam a necessidade de estudos nas espécies apresentadas, visto a significância dos alcaloides identificados e dos testes

de atividade biológica. Sobretudo pesquisas dirigidas para o isolamento dos compostos bioativos a fim de realizar futuros testes biológicos *in vitro* e reavaliar as espécies.

REFERÊNCIAS

ALAM, Md. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

ALBUQUERQUE, B. W. P. de. *Contribuição ao conhecimento das Aspidosperma da Amazônia Brasileira (Apocynaceae). Aspidosperma carapanauba Pichon, A. mascgravianum Woodson e A. oblongum A. DC. Acta Amazonica sciELO*, 1971.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R. The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, v. 19, n. 8, p. 1573–1582, 1980.

ALLORGE, L.; POUPAT, C. REVISION OF THE ASPIDOSPERMA-GENUS (APOCYNACEAE) FROM GUIANAS - SYSTEMATIC PLACE AND RESTATEMENT OF THE CHEMICAL STUDIES. *Bulletin De La Societe Botanique De France-Lettres Botaniques*, v. 138, n. 4–5, p. 267–301, 1991.

ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

ANDRADE-NETO, V. F. de et al. *In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz sciELO, 2007.

AÑEZ, R. B. da S. *Análise morfoanatômica das folhas e casca de Aspidosperma nitidum Benth e Aspidosperma marcgravianum Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica*. 2009. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, 2009.

ANISZEWSKI, T. *Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. [s.l.] Elsevier, 2007.

ANISZEWSKI, T. Chapter 1 - Definition, typology, and occurrence of alkaloids. Em: ANISZEWSKI, T. (Ed.). *Alkaloids (Second Edition)*. Boston: Elsevier, 2015. p. 1–97.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ARDREY, R. E. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. [s.l.] John Wiley & Sons, v. 2, 2003.

FERREIRA, M. et al. Arpa: Biodiversidade. MMA, Brasília, DF, 2010.

BERNHARD, D. et al. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, v. 195, n. 2, p. 193–199, 2003.

BHADANE, B. S. et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 7, p. 1181–1210, jul. 2018.

BOLZANI, V. D. S. et al. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 15, n. 2, p. 187–200, 1987.

BOSCOLO, O. H. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Rev Bras Plant Med*, v. 9, n. 1, p. 8–12, 2007.

BRANDÃO, D. L. do N. et al. Anti-malarial activity and toxicity of *Aspidosperma nitidum* Benth: a plant used in traditional medicine in the Brazilian Amazon. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 10, p. e5059108817–e5059108817, 2020.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRÍGIDO, H. P. C. et al. Atividade antimicrobiana de *Aspidosperma nitidum* benth (apocynaceae). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 12, n. 10, p. 4123– 4123, 2020.

BRÍGIDO, H. P. C. et al. Evaluation of acute and subacute toxicity of ethanolic extract and fraction of alkaloids from bark of *Aspidosperma nitidum* in mice. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 18283, 2021.

BUCKINGHAM, J. et al. *Dictionary of Alkaloids with CD-ROM*. [s.l.] CRC press, 2010.

CECHINEL FILHO, V. et al. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Química Nova*, v. 26, n. 2, p. 230–241, mar. 2003.

CASTELLO, A.C.D.; PEREIRA, A.S.S.; SIMÕES, A.O.; KOCH,

I. *Aspidosperma* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de

Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21887>>. Acesso em: 27 abr. 2021

COATTI, G. C. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from *Aspidosperma polyneuron* in HepG2 cells. *Cytotechnology*, v. 68, n. 4, p. 1161–1170, 2016.

CORDELL, G. A. Chapter 3 The *Aspidosperma* Alkaloids. Em: *Alkaloids: Chemistry and Physiology*. [s.l.] Academic Press, 1979. 17p. 199–384.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. Lou; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 3, p. 183–205, 1 maio 2001.

COUTINHO, J. P. et al. *Aspidosperma (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: Aspidosperma nitidum (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DALEY, S.; CORDELL, G. A. *Alkaloids in Contemporary Drug Discovery to Meet Global Disease Needs Molecules*, 2021.

- DE ALMEIDA, V. L. et al. Aspidosperma species: A review of their chemistry and biological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 231, p. 125–140, 1 mar. 2019.
- DE PAULA, R. C. et al. In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*, v. 232, p. 155–164, mar. 2019.
- DA VEIGA, Andreza do Socorro Silva et al. Atividade leishmanicida de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. *Arg. Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. e50210212646-e50210212646, 2021.
- DE PAULA, R. C.; DOLABELA, M. F.; DE OLIVEIRA, A. B. *Aspidosperma* species as sources of antimalarials. Part III. A review of traditional use and antimalarial activity. *Planta Medica*, v. 80, n. 5, p. 378–386, 3 mar. 2014.
- DE SOUZA LIMA, M. C. J.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. *Toxicon*, v. 55, n. 2, p. 320–324, 2010.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3rd. John Wiley & Sons, 2009.
- DEY, A.; MUKHERJEE, A.; CHAUDHURY, M. Alkaloids From Apocynaceae: Origin, Pharmacotherapeutic Properties, and Structure-Activity Studies. Em: *Studies in Natural Products Chemistry*. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. 52p. 373–488.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002.
- DO NASCIMENTO, M. S. et al. In vitro antiplasmodial activity and identification, using tandem LC-MS, of alkaloids from *Aspidosperma excelsum*, a plant used to treat malaria in Amazonia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 228, p. 99–109, 2019.

EVANS SCHULTES, R. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of the northwest amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 1, n. 2, p. 165–192, 1979.

FLORA DO BRASIL 2020. *Apocynaceae*. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB48>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

FRAUSIN, G. et al. An ethnobotanical study of anti-malarial plants among indigenous people on the upper Negro River in the Brazilian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 174, p. 238–252, 2015.

FUNAYAMA, S.; CORDELL, G. A. *Alkaloids: a treasury of poisons and medicines*. Elsevier, 2014.

FURTADO, F. F. et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of the ethanolic extract from the stem bark of *Aspidosperma tomentosum* Mart. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 7, n. 10, p. 118–124, 1 out. 2017.

GAZOLA, M. C. et al. Characterization of 3-aminospirostane alkaloids from roots of *Solanum paniculatum* L. with hepatoprotective activity. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 34, n. S3, p. e8705, 1 set. 2020.

GONÇALVES, D. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, p. 197–202, 2011.

GUNATILAKA, A. A. L. et al. Neisosposinine: A new oxindole alkaloid from *Neisosperma oppositifolia* [Apocynaceae]. *Heterocycles*, v. 28, n. 2, p. 999–1005, 1989.

GUNATILAKA, A. A. L. Alkaloids from Sri Lankan flora. *Chemistry and Biology*, 1998.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. Martin. Indole alkaloids from the bark of *Aspidosperma vargasii* and *A. desmanthum*. *Quimica Nova*, v. 33, n. 2, p. 284–287, 2010.

HENRIQUE, Marycleuma Campos; NUNOMURA, Sergio Massayoshi; POHLIT, Adrian Martin. Indolealkaloids from the bark of *Aspidosperma vargasii* and *A. desmanthum*. Volume 33, Número 2, Pags. 284-287, 2010.

HILDEBERT, W.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas*. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2009.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

KATO, N. N. et al. Application of the metabolomics approach to the discovery of active compounds from Brazilian trees against resistant human melanoma cells. *Phytochemical Analysis*, v. 32, n. 6, p. 992–1002, 2021.

KAUR, K. et al. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 9, p. 3229–3256, 2009.

KUKULA-KOCH, W. A.; WIDELSKI, J. Chapter 9 - Alkaloids. Em: BADAL, S.; DELGODA, R. B. T.-P. (Ed.). Boston: Academic Press, 2017. p. 163–198.

KUMAR, S. et al. Structural characterization of monoterpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Rauwolfia* species by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical analysis*, v. 6, n. 6, p. 363–373, 2016.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEMMA, M. T. et al. Medicinal plants for in vitro antiplasmodial activities: A systematic review of literature. *Parasitology international*, v. 66, n. 6, p. 713–720, 2017.

LIN, H. Q. et al. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. *Chemico-Biological Interactions*, v. 175, n. 1, p. 352–354, 2008.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Instituto Plantarum, 2000.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429–438, 2002.

MARTINS, F. J. et al. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 161, p. 34–39, 2016.

MATSUURA, H. N.; RAU, M. R.; FETT-NETO, A. G. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. *Biotechnology Letters*, v. 36, n. 2, p. 191–200, 2014.

MIET, C.; CROQUELOIS, G.; POISSON, J. Structure de deux methoxy-yohimbines, isolees de *Rauwolfia capuroni*. *Phytochemistry*, v. 16, n. 6, p. 803–805, 1977.

MISRA, N. et al. Recent advances in biosynthesis of alkaloids. 1999.

MOROKAWA, R.; SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S. Apocynaceae s. str. do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguesia*, v. 64, n. 1, p. 179–199, jan. 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, p. 624–628, 2012.

MUKHERJEE, P. K. Chapter 11 - LC-MS: A Rapid Technique for Understanding the Plant Metabolite Analysis. Em: MUKHERJEE, P. K. B. T.-Q. C. AND E. OF H. D. (Ed.). Elsevier, 2019. p. 459–479.

NASCIMENTO, P. C. do; SILVEIRA, E. R. Indolic alkaloids of *Aspidosperma nitidum*. Em: 31 Annual meeting of the Brazilian Chemical Society From oil to biomass: solutions for a better world?. Brazil. *Anais*. Brazil: 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

NOTHIAS, L.-F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 173, p. 424–434, 2015.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Potential of medicinal plants as source of new antimalarials: Species indicated in Brazilian ethnomedical bibliography. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 5, p. 23–31, 1 abr. 2003.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. da S. de. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v. 6, n. 1, p. 20–25, 2016.

OLIVEIRA, V. B. et al. *Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero Aspidosperma (Apocynaceae): Uma revisão*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, 2009.

OLIVON, F. et al. MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 15, p. 7836–7840, 1 ago. 2017.

PASSEMAR, C. et al. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. *Phytomedicine*, v. 18, n. 13, p. 1118–1125, 15 out. 2011.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 13, n. 4, p. 263–269, 2012.

PAVIA, D. L. et al. *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning, 2014.

PEREIRA, A. S. de S.; SIMOES, A. O.; SANTOS, J. U. Taxonomy of *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae, Rauvolfioideae) in the State of Para, Northern Brazil. *BIOTA NEOTROPICA*, v. 16, n. 2, 2016.

PEREIRA, M. D. M. et al. *Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero Aspidosperma (Apocynaceae)* *Química Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 2007.

PEREIRA, M. M. et al. NMR structural analysis of braznitidumine: a new indole alkaloid with 1,2,9-triazabicyclo[7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 7, p. 1274–1280, 2006.

PEREIRA ROCHA, Marina et al. Biological activities of extracts from *Aspidosperma subincanum* Mart. and in silico prediction for inhibition of acetylcholinesterase. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 10, p. 2021-2033, 2018.

PILON, A. C. et al. REDES MOLECULARES: UMA ANÁLISE SOBRE ANOTAÇÕES E DESCOBERTA DE NOVOS ATIVOS. *Química Nova*, v. 44, p. 1168–1179, 2021.

POHLIT, A. et al. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery of New Antimalarial Drug Leads. *Molecules*, v. 18, n. 8, p. 9219–9240, 2013.

QUIGNARD, E. L. J. et al. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. *Acta Amazonica*, v. 33, p. 93–104, 2003.

QUIGNARD, E. L. J. et al. Median lethal concentrations of amazonian plant extracts in the brine shrimp assay. *Pharmaceutical Biology*, v. 42, n. 3, p. 253–257, 2004.

RAPINI, A. Sistemática: Estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. *Instituto de Biociências, São Paulo, SP, USP*, 2000.

REINA, M. et al. Antiparasitic indole alkaloids from *Aspidosperma desmanthum* and *A. spruceanum* from the Peruvian Amazonia. *Natural Product Communications*, v. 9, n. 8, p. 1075–1080, 2014.

ROSALES, P. F. et al. *Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities* FitoterapiaElsevier B.V., 1 jun. 2020.

SCOTTI, M. et al. Virtual Screening of Alkaloids from Apocynaceae with Potential Antitrypanosomal Activity. *Current Bioinformatics*, v. 10, n. 5, p. 509–519, 13 nov. 2015.

SHELLARD, E. J.; HOUGHTON, P. J. *Mitragyna* species of Asia. xXIV. the isolation of dihydrocorynantheol and corynantheidol from the leaves of *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth from Sri Lanka (Ceylon). *Plant Med*, 1973.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

SUFFREDINI, I. B. et al. *Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of Tabernaemontana angulata stem organic extract* Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticasscielo, , 2002. .

SUN, J.; BAKER, A.; CHEN, P. Profiling the indole alkaloids in yohimbe bark with ultra-performance liquid chromatography coupled with ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 25, n. 18, p. 2591–2602, 2011.

VEIGA, J. B.; SCUDELLER, V. V. Etnobotânica e medicina popular no tratamento de malária e males associados na comunidade ribeirinha Julião–baixo Rio Negro (Amazônia Central). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, p. 737-747, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519–528, 2005.

VERPOORTE, R.; RUIGROK, C. L. M.; SVENDSEN, A. B. Medicinal Plants of Surinam. II. Antimicrobial Active Alkaloids from *Aspidosperma Marcgravianum*. *Planta Med.*, v. 46, n. 3, p. 149–152, 1982.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WILSON, K.; WALKER, J. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. [s.l.] Cambridge university press, 2010.

XU, Z.; CHANG, L. Apocynaceae. Em: *Identification and Control of Common Weeds: Volume 3*. 1. ed. [s.l.] Springer, 2017. p. 87–97.

YUDHARAJ, P. et al. IMPORTANCE AND USES OF MEDICINAL PLANTS – AN OVERVIEW. *International Journal of Preclinical & Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 2, p. 67–73, 2016.