



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* E
CITOTOXICIDADE DE *Geissospermum argenteum* WOODSON E *G.*
urceolatum A. H. GENTRY

MARLENE RODRIGUES MARCELINO CAMARGO

MANAUS

2021

MARLENE RODRIGUES MARCELINO CAMARGO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO* E
CITOTOXICIDADE DE *Geissospermum argenteum* WOODSON E *G. urceolatum* A. H.
GENTRY

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (área de concentração Biotecnologia para a Saúde).

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Coorientador: Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

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

C172c Camargo, Marlene Rodrigues Marcelino
"Composição química, atividade antiplasmodica in vitro e citotoxicidade de *Geissospermum argenteum* Woodson e *G. urceolatum* A. H. Gentry" / Marlene Rodrigues Marcelino Camargo . 2021
245 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Alcaloides. 2. 12-Cinamoiloxi-11-metoxiaspidospermidina. 3. Flavopereirina. 4. Malária. 5. *Plasmodium falciparum*. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Marlene Rodrigues Marcelino Camargo

**Composição química, atividade antiplasmodica *in vitro* e citotoxicidade de
Geissospermum argenteum Woodson e *G. urceolatum* A. H. Gentry**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração saúde. Aprovada em 17 dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit – Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza (Membro)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Cecília Verónica Nunez (Membro)
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profa. Dra. Márcia Rúbia Silva Melo (Membro)
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (Membro)
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo, Calvino, às nossas filhas, Mariana e Ana Beatriz, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando em todos os momentos. E aos meus pais (*in memoriam*) que sempre desejaram o melhor para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida e pela oportunidade concedida.

Ao meu esposo por toda paciência e carinho e às minhas adoráveis filhas, Mariana e Ana Beatriz por entenderem e aceitarem minha ausência e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, Luzia e Miguel (*in memorian*), pois graças a eles me tornei o que sou, aos meus irmãos e todos os demais familiares.

Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit pelos ensinamentos, orientação e amizade que muito contribuíram para a minha formação.

Ao Dr. Felipe Moura por suas aulas e momentos de orientação tão importantes para este trabalho.

A todos os mestres do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por compartilharem seu saber e à Universidade Federal do Amazonas por esta oportunidade.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por permitir a realização deste trabalho.

À Dra. Stephanie pelas aulas sobre malária, treinamento de ensaios *in vivo*, enfim por contribuir com seu tempo e conhecimento.

Ao Msc. Jander Torres (*in memorian*), diretor do Laboratório Distrital Leste, por todo apoio recebido e à Secretaria Municipal de Saúde de Manaus, local onde desempenho minha atividade profissional.

A todos os integrantes da Central Analítica e Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN), por todas as análises realizadas Dra. Sabrina Kelly Moraes, Dra. Zelina E. Torres e especialmente ao Msc. Magno Perea.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima (BIOPHAR/UFAM) e à bolsista Larissa Borges pelo auxílio nas análises e testes citotóxicos.

Aos amigos do LAPAAM que estiveram comigo nesta jornada, durante a qual recebi todo apoio que precisava, principalmente nos momentos mais difíceis: Bruna Oliveira, Edizon Lopes, Diana Sangama, Lais Garcia, Abraão Alexandre, Tiago Barbosa, Paula Suellen Paz, Berna Almeida, Rita Cynara, Mestre Djalma, Henrique, Andreia Montóia, Ronei, Claudia, Henrique, Renan. Obrigada por momentos que guardarei sempre na memória e no coração.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEAM, pelos recursos financeiros.

*O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.
Mas, o que seria o oceano se não infinitas gotas?*

Isaac Newton

RESUMO

Este trabalho descreve a composição química e da atividade antiplasmodica *in vitro* de extratos e substâncias isoladas de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Apocynaceae Jussieu). Cascas, folhas e lenho de ambas as espécies foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus – AM. Através do planejamento experimental de misturas tipo simplex-centroide foram preparados extratos de cascas, folhas e galhos de *G. argenteum* com três componentes (acetona, metanol e água) para um estudo quimiométrico, no qual os dados de *m/z* obtidos por espectrometria de massas (EM) e ionização por *electrospray* (IES) foram tratados e interpretados através do software *Chemoface*. Os mesmos extratos foram testados para atividade antiplasmodica *in vitro* frente à cepa K1 de *Plasmodium falciparum*, sendo a triagem feita em duas concentrações (5,0 e 50 µg/mL) e a determinação da concentração inibitória de 50%, (CI₅₀) nas concentrações de 100 a 0,13 µg/mL. Foram fracionados o extrato metanólico (mais ativo) e o aquoso (relevância medicinal) de cascas. Através de maceração foram preparados extratos metanólicos com hidróxido de amônio a 3% de *G. argenteum* e *G. urceolatum*, os quais foram submetidos à partição ácido-base obtendo-se frações alcaloídicas que foram fracionadas em colunas cromatográficas (CC) utilizando sílica normal, impregnada, além de RP18. Também foram utilizadas a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para isolamento das substâncias. As substâncias foram identificadas através de ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) e EM. A toxicidade foi avaliada frente à linhagem MRC-5 de fibroblastos humanos normais, através do teste de alamar blue. Foram isolados três alcaloides de *G. argenteum* (GA): flavopereirina, panarina e velosimina e quatro alcaloides de *G. urceolatum* (GU): aspidoscarpina, flavopereirina, geissolosimina e a 12-cinamoiloxi-11-metoxiaspidospermidina (inérita), além do triterpeno, lupeol. Todos os extratos da casca de *G. argenteum* foram ativos contra *P. falciparum* (CI₅₀ = 0,20 a 10,0 µg/mL). Os alcaloides isolados: aspidoscarpina, flavopereirina (GU/GA), geissolosimina, velosimina e o novo alcaloide foram ativos contra *P. falciparum* (CI₅₀ = 2,59; 1,25/2,55; 0,38; 3,59 e 0,48 µM respectivamente). Dos alcaloides ativos acima que foram avaliados para citotoxicidade, todos apresentaram índices de seletividade antiplasmodica: citotoxicidade satisfatórias (IS: 20 - 61).

Palavras-chave: Alcaloides. 12-Cinamoiloxi-11-metoxiaspidospermidina. Flavopereirina. Malária. *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

This work describes the chemical composition and *in vitro* antiplasmodial activity of extracts and compounds isolated from *Geissospermum argenteum* Woodson and *G. urceolatum* A. H. Gentry (Apocynaceae Jussieu). Bark, leaves and branches of both species were collected at the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus – AM. Through the experimental planning of simplex-centroid mixtures, extracts of bark, leaves and branches of *G. argenteum* were prepared with three components (acetone, methanol and water) for a chemometric study, in which the *m/z* data were obtained by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry (MS) and were treated and interpreted using the Chemoface software. The same extracts were screened in two concentrations (5,0 and 50 µg/mL) for *in vitro* antiplasmodial activity against the K1 strain of *Plasmodium falciparum* and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) were determined at concentrations from 100 to 0, 13 µg/mL. The bark methanol extract was selected for fractionation, as it was the most active, as was the aqueous bark extract due to its medicinal relevance. Through maceration, 3% ammonium hydroxide methanol extracts were prepared from the bark of *G. argenteum* and *G. urceolatum*. The dry extracts were subjected to acid-base partitioning and the resulting alkaloid fractions that were fractionated using normal-phase, impregnated and RP-18 column chromatographies (CC). Preparative thin layer chromatography (PTLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) were also used to isolate the compounds. The identification of substances was performed by 1D and 2D nuclear magnetic resonance (NMR) and MS. Cytotoxicity was evaluated against the normal human fibroblast MRC-5 lineage using the alamar blue test. Three alkaloids from *G. argenteum* (GA) were isolated: flavopereirine, panarine, velosimine and four alkaloids from *G. urceolatum* (GU): aspidoscarpine, flavopereirine, geissolosimine and the new compound, 12-cinnamoyloxy-11-methoxyaspidospermidine, in addition to the triterpene lupeol. All *G. argenteum* bark extracts were active against *P. falciparum* (IC₅₀ = 0.20 to 10.0 µg/mL). The isolated alkaloids aspidocarpine, flavopereirine (GU/GA), geissolosimine, vellosimine and the new alkaloid were active against *P. falciparum* (IC₅₀ = 2.59, 1.25/2.55, 0.38, 3.59 and 0.48 µM, respectively). Among the active alkaloids above that were evaluated for cytotoxicity all presented satisfactory antiplasmodial: cytotoxicity selectivity indices (SI - 20-61).

key words: Alkaloids. 12-Cinnamoyloxy-11-methoxyaspidospermidine. Flavopereirine. Malaria. *Plasmodium falciparum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.....	25
Figura 2: Taxa de incidência de casos de malária por país (casos/1000 habitantes) em 2018.	26
Figura 3: Casos confirmados de malária por 1000 habitantes em 2019.	27
Figura 4: Áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA/2018).	29
Figura 5: Antimaláricos naturais obtidos de plantas	31
Figura 6: Antimaláricos sintéticos, análogos da quinina (1).	31
Figura 7: Antimaláricos semissintéticos derivados de artemisinina (2).....	32
Figura 8: Estrutura química da lumefantrina (13), amodiaquina (14) e tafenoquina (15).....	33
Figura 9: Rota biossintética da strictosidina	39
Figura 10: Biotransformações na cadeia terpenoídica que levam às principais classes de alcaloides indólicos monotерpenoídicos de <i>Aspidosperma</i>	40
Figura 11: Sistema de numeração baseado na biossíntese (-)- β -ioimbina (22).....	40
Figura 12: Biossíntese de alcaloides β -carbólicos em sistemas biológicos.....	41
Figura 13: Localização de <i>Geissospermum</i> spp. (endêmicas apenas em países da América do Sul).	43
Figura 14: Substâncias avaliadas em ensaios antitumorais	58
Figura 15: Planejamento experimental com três componentes (simplex-centroide).....	71
Figura 16: Cromatograma de CLAE-FR da fração C1Gu-8.....	83
Figura 17: Cromatograma de CLAE-FR da fração C1Gu-9.....	84
Figura 18: Cromatograma de CLAE semi-preparativa da fração FD3Gu.....	86
Figura 19: Gráfico de <i>score</i> ACP (A) e <i>biplot</i> (B) para dados de extratos de folhas de <i>G. argenteum</i>	93
Figura 20: AAH ou dendrograma de extratos de folhas de <i>G. argenteum</i>	94
Figura 21: Gráfico de <i>score</i> de ACP (A) e <i>biplot</i> (B) para dados de extratos do lenho do galho de <i>G. argenteum</i>	95
Figura 22: AAH (dendrograma) de extratos do lenho do galho de <i>G. argenteum</i>	95
Figura 23: Gráfico de <i>score</i> de ACP para dados de extratos de cascas de <i>G. argenteum</i>	96
Figura 24: Ampliação do gráfico <i>biplot</i> para extratos de casca de <i>G. argenteum</i>	97

Figura 25: AAH (dendrograma) extratos de cascas de <i>G. argenteum</i>	97
Figura 26: Estrutura molecular da substância A, alcaloide panarina (64).....	99
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da substância A (panarina, 64).....	99
Figura 28: Ampliação da região de δ 3,50 a δ 5,50 do espectro de RMN de ^1H da substância A (panarina, 64).....	103
Figura 29: Ampliação da região de δ 1,5 a 3,5 do espectro de RMN de ^1H da substância A (panarina, 64).....	104
Figura 30: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC da substância A (64)	105
Figura 31: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) e NOESY (verde) da substância A (64).....	106
Figura 32:Estrutura molecular da substância B, alcaloide velosimina (31).	110
Figura 33: Alguns acoplamentos de COSY da substância B (31).....	111
Figura 34: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) e NOESY (verde) da substância B (31).....	111
Figura 35: Estrutura molecular da substância C, alcaloide flavopereirina (28).	113
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H e ampliação da região de aromáticos da substância C (28)	113
Figura 37: Algumas correlações observadas no HMBC do substituinte da substância C (28). ..	116
Figura 38: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) da substância C (28).	117
Figura 39: Espectros de RMN (300/75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) de ^1H das substâncias C e C'.....	118
Figura 40: Alguns acoplamentos de COSY observados para a substância E (65).	122
Figura 41: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos observados no COSY (azul e verde) dos anéis A, B, C, D e E da substância E (65).....	122
Figura 42: Correlações de HMBC do anel A da substância E (65).	123
Figura 43: Algumas correlações observadas no HMBC da junção dos anéis C e D da substância E (65).	123
Figura 44: Algumas correlações observadas no HMBC do substituinte da substância E (65) ...	124
Figura 45: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) observadas nos espectros da substância E (65).	125
Figura 46: Proposta de estrutura para a substância E 65	126
Figura 47: Estrutura molecular da substância G, alcaloide geissolosimina (33).....	130

Figura 48: Espectro de RMN de ^1H (300/75 MHz) e ampliação de alguns hidrogênios da substância G (33), DMSO- d_6	136
Figura 49: Disposição dos anéis da parte I da substância G (33).	137
Figura 50: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) e NOESY (verde) na parte I da estrutura da substância G (33).	138
Figura 51: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC da substância G (33).	139
Figura 52: Alguns acoplamentos de COSY (azul), HMBC (vermelho) na parte II da estrutura da substância G (33).	140
Figura 53: Alguns acoplamentos de NOESY (verde) observados na estrutura da substância G (33).	141
Figura 54: Estrutura molecular da substância F, alcaloide aspidoscarpina (41).	142
Figura 55: Espectro de ^1H da substância F (41)	146
Figura 56: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC da substância F (41).	147
Figura 57: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) para a substância F (41).	148
Figura 58: Estrutura molecular da substância D, lupeol (57).	149
Figura 59: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC (vermelho) e acoplamentos do espectro de COSY (azul) e NOESY (verde) da substância D (57)	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das misturas extratoras em termos de proporção e rendimento das extrações de <i>G. argenteum</i> .	73
Tabela 2: Rendimento das infusões (chás) de <i>G. argenteum</i>	74
Tabela 3: Frações obtidas da CC impregnada com AcONa aplicada à FDGu I (1,45 g) obtida do extrato de casca de <i>G. urceolatum</i> .	82
Tabela 4: Dados de RMN 1D e 2D da substância A - panarina (64) (300/75 MHz; ppm; CDCl ₃).	100
Tabela 5: Dados de RMN de ¹³ C (δ _C) e ¹ H (δ _H) da substância A e comparação com a literatura para a panarina (64). Dados de RMN (observado): 300 MHz/75 MHz.	102
Tabela 6: Dados de RMN 1D e 2D da substância B (31) (300/75 MHz; ppm; DMSO- <i>d</i> ₆).	107
Tabela 7: Dados de RMN de ¹³ C (δ _C) e ¹ H (δ _H) para a substância B (31) e comparação com a literatura. Dados de RMN (observado): 300 MHz/75 MHz, ppm, DMSO- <i>d</i> ₆ .	109
Tabela 8: Dados de RMN 1D e 2D da substância C (28) (300/75 MHz; ppm; DMSO- <i>d</i> ₆).	114
Tabela 9: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância C (300/75 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) e comparação com a literatura (28) (C5Ga-2B).	115
Tabela 10: Dados de RMN 1D e 2D da substância C' (28) (300/75 MHz; ppm; DMSO- <i>d</i> ₆).	119
Tabela 11: Comparação com a literatura (STEELE <i>et al</i> , 2002, DMSO- <i>d</i> ₆ , 500/125 MHz) para a substância C' (28).	120
Tabela 12: Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) observados para o alcaloide (65) em CDCl ₃ .	127
Tabela 13: Dados de RMN 1D e 2D da substância G (33) (C1Gu-13D) em DMSO- <i>d</i> ₆ , 300/75 MHz; ppm.	131
Tabela 14: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H e comparação com a literatura para da substância G (33) (C1Gu-13D) em DMSO- <i>d</i> ₆ .	134
Tabela 15: Dados de RMN 1D/2D da substância F (C1Gu-9A, 41), 300/75 MHz; ppm; (CD ₃ OD).	143
Tabela 16: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância F (300/75 MHz) e comparação com a literatura (CDCl ₃) para a aspidoscarpina (41).	145

Tabela 17: Dados de RMN 1D e 2D da substância D (57), (C1Gu-3B) 300/75 MHz; ppm; CDCl ₃	150
Tabela 18: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância D (300/75 MHz) e comparação com a literatura para a substância lupeol (57).	153
Tabela 19: Rendimentos e atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> dos extratos de <i>G. argenteum</i>	157
Tabela 20: Rendimentos e atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> dos extratos aquosos de <i>G. argenteum</i>	158
Tabela 21: Atividade antiplasmódica contra <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) e citotóxica de alcaloides isolados de <i>G. argenteum</i>	159
Tabela 22: Atividade antiplasmódica contra <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) e citotóxica de substâncias isoladas de <i>G. urceolatum</i>	161

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Partição líquido-líquido do extrato metanólico de cascas <i>G. argenteum</i> (EMeGa I).	75
Fluxograma 2: Extração aquosa e fracionamento do extrato aquoso de <i>G. argenteum</i>	77
Fluxograma 3: Fracionamento da fração DCM II de <i>G. argenteum</i>	78
Fluxograma 4: Fracionamento da fração C4Ga-12.	79
Fluxograma 5: Partição líquido-líquido do extrato metanólico de <i>G. urceolatum</i>	81
Fluxograma 6: Fracionamento por CC da fração FDGu I de <i>G. urceolatum</i>	85
Fluxograma 7: Partição líquido-líquido da fração FDGu II.	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alcaloides isolados em <i>Geissospermum</i> spp. e atividade antimalárica.....	47
Quadro 2: Outras substâncias isoladas de <i>Geissospermum</i> spp.	53
Quadro 3: Atividade biológica de <i>Geissospermum</i> spp.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

1 D	Unidimensional
2 D	Bidimensional
AAH	Análise de agrupamentos hierárquicos
AcOEt	Acetato de etila
AcONa	Acetato de sódio
ACP	Análise de componentes principais
ATF	Ácido trifluoroacético
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCFN	Cromatografia em coluna fase normal
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> – Correlação homonuclear (¹ H- ¹ H)
CTA	Conhecimento tradicional associado
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> – Melhoria sem distorção por transferência de polarização
DMEM	<i>Dulbecco Modification of Minimum Essential Media</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
G6PD	Glicose - 6 - fosfato desidrogenase
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> – Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HNP	Hemácias não parasitadas

HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> – Correlação heteronuclear de quantum-simples
Hz	Hertz
IES	Ionização por <i>eletrospray</i>
IPA	Incidência parasitária anual
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Juss.	Jussieu
K1	Cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> cloroquina resistente
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MeOH	Metanol
MRC-5	Estirpe celular do Conselho de Investigação Médica 5
MS	Ministério da Saúde
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
TCA	Terapia combinada à base de artemisinina
TDR	Teste de diagnóstico rápido
UFAM	Universidade Federal da Amazônia
UV	Ultravioleta
WCSP	<i>World Checklist of Selected Plant Families</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA	21
2.1.1	Agentes etiológicos da malária: <i>Plasmodium</i> spp.	21
2.1.2	Vetores da malária humana: <i>Anopheles</i> spp.	23
2.1.3	Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.	24
2.1.4	Malária no mundo e no Brasil	25
2.1.5	Tratamento da malária	29
2.1.6	Resistência aos antimaláricos	34
2.2	FAMÍLIA APOCYNACEAE JUSS.	36
2.2.1	Alcaloides	37
2.2.2	Triterpenos	41
2.3	ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO <i>Geissospermum</i> ALLEMÃO (1845: 73)	42
2.3.1	Aspectos químicos de <i>Geissospermum</i> spp.	44
2.3.2	Etnobotânica e etnofarmacologia de extratos e alcaloides de <i>Geissospermum</i> spp.	54
2.3.2.1	Atividade antimalárica de extratos e alcaloides de <i>Geissospermum</i> spp.	56
2.3.2.2	Atividade citotóxica e anticâncer de extratos e alcaloides de <i>Geissospermum</i> spp.	57
2.3.2.3	Outras atividades farmacológicas de alcaloides encontrados em <i>Geissospermum</i> spp.	60
2.4	<i>Geissospermum argenteum</i> Woodson (1939: 207)	61
2.5	<i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (1984: 1078)	61
2.6	QUIMIOMETRIA	61
3	OBJETIVOS	63
3.1	OBJETIVO GERAL	63
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1	MATERIAIS	64
4.1.1	Equipamentos	64
4.1.2	Solventes e reveladores	65

4.2	ASSUNTOS REGULATÓRIOS/CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO	65
4.3	MÉTODOS	66
4.3.1	Análises cromatográficas	67
4.3.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	67
4.3.1.2	Cromatografia em coluna (CC)	68
4.3.1.3	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-P)	68
4.3.1.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	68
4.3.2	Métodos espectrométricos	68
4.3.2.1	Espectrometria de massas (EM)	68
4.3.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	69
4.4	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	69
4.4.1	<i>Geissospermum argenteum</i> Woodson	69
4.4.2	<i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry	70
4.5	SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL	70
4.6	EXTRAÇÃO DE <i>G. argenteum</i> Woodson	70
4.6.1	Planejamento experimental simplex-centroide da extração em escala analítica	70
4.6.2	Extração em maior escala de <i>G. argenteum</i> Woodson	74
4.6.2.1	Extração aquosa de <i>G. argenteum</i> Woodson	74
4.6.2.2	Extração metanólica	74
4.7	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE <i>G. argenteum</i>	75
4.7.1	Fracionamento cromatográfico do extrato aquoso	75
4.7.2	Fracionamento cromatográfico da fração FDGa II	78
4.8	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE <i>G. urceolatum</i> A. H. GENTRY	80
4.8.1	Extração metanólica de <i>G. urceolatum</i>	80
4.8.2	Fracionamento de extratos de <i>G. urceolatum</i>	80
4.8.2.1	Fracionamento cromatográfico de <i>G. urceolatum</i>	81
4.9	ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM) E QUIMIOMETRIA DE EXTRATOS DE <i>G. argenteum</i>	87
4.10	ENSAIOS BIOLÓGICOS	88
4.10.1	Microteste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	88
4.10.2	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	90

4.10.3	Índice de seletividade (IS)	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DE <i>G. argenteum</i>	92
5.2	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>G. argenteum</i> e <i>G. urceolatum</i>	98
5.2.1	Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>G. argenteum</i>	98
5.2.1.1	Elucidação estrutural da substância A, C3Ga-2 (64)	98
5.2.1.2	Elucidação estrutural da substância B, C4Ga-3B (31)	106
5.2.1.3	Elucidação estrutural da Substância C, C5Ga-2B (28)	112
5.2.2	Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>G. urceolatum</i>	117
5.2.2.1	Elucidação estrutural da substância C', FD3Gu-A (28)	117
5.2.2.2	Determinação estrutural da substância E, C1Gu-8C (65)	121
5.2.2.3	Elucidação estrutural da substância G, C1Gu-13D (33)	130
5.2.2.4	Elucidação estrutural da substância F, C1Gu-9A (41)	141
5.2.2.5	Elucidação estrutural da substância D, C1Gu-3B (57)	148
5.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS	155
5.3.1	Ensaio antiplasmódico <i>in vitro</i> para extratos de <i>G. argenteum</i> e <i>G. urceolatum</i>	156
5.3.2	Atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> e citotoxicidade de substâncias isoladas de <i>G. argenteum</i> e <i>G. urceolatum</i>	158
6	CONCLUSÃO	162
	REFERÊNCIAS	163
	ANEXOS	188

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa febril e aguda, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 que é transmitida ao homem através de vetores do gênero *Anopheles* Meigen, 1818 e que ainda atinge o mundo de forma preocupante, principalmente países de regiões tropical e subtropical. No contexto das endemias mundiais, se posiciona como uma das doenças infecto-parasitárias com maiores taxas de morbidade e mortalidade. Mesmo com os programas governamentais para controle e redução desta endemia, 229 milhões de casos de malária foram reportados em 2019, com 409000 mortes, sendo que 67% delas são de crianças menores de 5 anos. Nesse período, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) no mundo ocorreu um aumento do número de casos clínicos de malária, porém houve redução no número de mortes, exceto nas Américas (OMS, 2020).

O uso de espécies vegetais no tratamento das doenças e seus sintomas acompanha o ser humano no transcorrer de sua história. Assim o conhecimento sobre as propriedades terapêuticas das plantas evoluiu juntamente com a evolução do ser humano. Mesmo com os avanços tecnológicos observados na área da saúde, o uso de plantas medicinais continua sendo muito difundido uma vez que as propriedades terapêuticas de muitas espécies vegetais puderam ser comprovadas através de estudos científicos. Aliar o conhecimento popular ao científico em busca de novos princípios ativos é um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002)

Estudos apontam que fontes naturais são ricas em princípios ativos em razão de sua grande diversidade e por isso têm sido utilizadas como recurso terapêutico por populações nativas e urbanas. Tais conhecimentos, também chamados etnoconhecimentos, têm contribuído para direcionar estudos fitoquímicos e farmacológicos que buscam isolar novos princípios ativos com base na chamada medicina popular, os quais podem dar origem a novos fármacos (BRANDÃO *et al.*, 2008).

Ao citar a importância das plantas como fonte de princípios ativos para a síntese de novos fármacos não se pode deixar de ressaltar que os medicamentos utilizados no tratamento da malária surgiram a partir de substâncias isoladas de plantas, como quinina, obtida da *Cinchona officinalis*

L. e artemisinina, isolada da *Artemisia annua* L., que deram origem aos antimaláricos quinolínicos e derivados da artemisinina (KLAYMAN, 1985; VALE *et al.*, 2005). Nesse contexto o Brasil ocupa uma posição de destaque por ser considerado um dos países com maior diversidade do mundo, possuindo cerca de 20% da flora mundial (BRANDÃO *et al.*, 2013) e em meio a esta diversidade há centenas de plantas utilizadas popularmente para o tratamento da malária e outras doenças febris (BRANDÃO *et al.*, 1992; MILLIKEN, 1997). No entanto grande parte delas ainda não foi investigada quanto ao seu potencial antimalárico.

Considerando a biodiversidade disponível na região, o uso de plantas na medicina tradicional e a necessidade da descoberta de novos princípios ativos, pesquisas com espécies já citadas em relatos etnobotânicos são importantes (POHLIT *et al.*, 2013; MARIATH *et al.*, 2009).

O gênero *Geissospermum* Allemão foi objeto de uma revisão publicada em 2013 (CAMARGO *et al.*, 2013) sobre a sua composição química e o uso tradicional das espécies que o compõem. Através desta revisão foi possível verificar que o uso de espécies deste gênero na terapêutica da malária é relevante. A espécie *G. argenteum* Woodson foi estudada no mestrado (CAMARGO, 2012) durante o qual extratos de cascas, folhas e galhos foram testados quanto a sua atividade antimalárica e antimicrobiana. Nesse estudo foram obtidos extratos e frações ativas em ambos os ensaios biológicos. Trabalhos realizados por outros grupos de pesquisa identificaram o uso tradicional como antimalárico das cascas de *G. argenteum* entre remanescentes de quilombos no município de Oriximiná-PA (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Extratos e substâncias obtidas de cascas de *G. urceolatum* A. H. Gentry, uma espécie sem relatos sobre o seu uso como antimalárico na literatura científica, também foram avaliados quanto à atividade antiplasmodica obtendo como resultado extratos, frações e substâncias ativas (OLIVEIRA, 2018).

Assim o presente estudo buscou novas substâncias com potencial antimalárico a partir de duas espécies do gênero *Geissospermum*, contribuindo para o conhecimento fitoquímico de ambas as espécies, bem como do seu potencial farmacológico. Este trabalho foi desenvolvido utilizando planejamento de misturas, instrumentação analítica, quimiometria, técnicas cromatográficas para isolamento de substâncias, sendo o processo bioguiado por ensaios biológicos *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária sempre foi, desde a antiguidade, um dos principais problemas de saúde da humanidade, sendo também conhecida por maleita, paludismo e impaludismo. O nome malária teve origem em “mal’aria” pois consideravam que a doença era causada por gases nocivos que emanavam dos pântanos. O termo foi utilizado no século XIV pelos italianos significando “ar ruim” (RICH & XU, 2011). Nesta doença a humanidade enfrenta dois inimigos aliados a milênios: um protozoário e um mosquito. A febre intermitente, característica da malária, permitiu identificar sua presença em documentos chineses (cerca de 2.700 a.C.), em papiros egípcios (1.570 a.C.), além de textos hindus do século sexto a.C. (CAMARGO, 2003; FRANÇA *et al.*, 2008; COX, 2010).

2.1.1 Agentes etiológicos da malária: *Plasmodium* spp.

O conhecimento sobre o agente etiológico da malária teve início em 1880 quando Charles Louis Alphonse Laveran descobriu parasitos no sangue de pacientes com malária. Em seus estudos examinou sangue de 200 pacientes e em 148 observou pequenas estruturas pigmentadas, em todos os casos de malária. Também verificou que o quinino removia essas formas do sangue. Em 1897 Ronald Ross elucidou o ciclo de transmissão entre mosquitos e aves infectadas com *Plasmodium relictum* Grassi & Feletti, 1891 e no ano seguinte os malariologistas italianos Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camilo Golgi e Ettore Marchiafava, demonstraram que a malária humana também era transmitida por mosquitos, os anofelinos. A fase hepática do ciclo do *Plasmodium* foi descoberta em 1948 por Henry Shortt e Cyril Garnham e os hipnozoítos (formas exoeritrocíticos dormentes) foram descobertos por Wojciech Krotoski juntamente com a equipe de Garnham em 1982 (FRANÇA *et al.*, 2008; COX, 2010).

O cultivo contínuo do *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 *in vitro*, desenvolvido por William Trager e J. B. Jensen (1976) foi um dos avanços mais importantes na pesquisa envolvendo malária, pois através desta técnica pesquisadores teriam disponibilidade de parasitos para seus estudos, o que permitiria testar novas drogas, isolar componentes dos parasitos,

identificar vias bioquímicas, além de reduzir o uso de animais de laboratório (TRAGER & JENSEN, 1976; COX, 2010).

Após anos de pesquisa concluiu-se que a malária é uma doença infecciosa, causada por um hematozoário unicelular, que pertence à ordem Coccidida, subordem Haemosporididea, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*, o qual é transmitido para humanos pela fêmea de mosquito do gênero *Anopheles*.

A malária em humanos é causada pelas seguintes espécies de protozoários: *P. falciparum*, *P. knowlesi* Sinton & Mulligan 1933 (LEE *et al.*, 2009), *P. malariae* Feletti & Grassi 1889, *P. ovale* Stephens 1922, para o qual foi verificada a possibilidade de duas espécies e foi então denominada *P. ovale curtisi* (homenagem a Christopher Curtis), tipo clássico, *P. ovale wallikeri* (homenagem a David Walliker), tipo variante, (SUTHERLAND *et al.*, 2010) e *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti 1890. No entanto, outras espécies são consideradas potencialmente infecciosas para o homem: o *P. brasilianum* Gonder & Von Berenberg 1908 (LAL *et al.*, 1988), o *P. cynomolgi* Mayer 1907 (TA *et al.*, 2014) e o *P. inui* Halberstaedter & Von Prowazek 1907 (COATNEY *et al.*, 1966).

No Rio de Janeiro entre 1964 e 1966 durante estudo sobre anofelinos foi registrada uma infecção em humano, cujo agente etiológico apresentou características de *P. simium* o qual pode ser facilmente confundido com *P. vivax* (DEANE *et al.*, 1966). Também no Rio de Janeiro ocorreram casos de malária inicialmente diagnosticada por microscopia ótica como malária causada por *P. vivax* e que análises através de técnicas moleculares mostrou tratar-se de *P. simium* (BRASIL *et al.*, 2017).

No Brasil as espécies de maior ocorrência são: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* sendo *P. vivax* a mais predominante (SUTHERLAND *et al.*, 2010; TA *et al.*, 2014). A distribuição de *P. vivax* é predominante nas Américas, sendo no Brasil o agente de 87% dos casos notificados. No sudeste asiático *P. vivax* é responsável por 53% dos casos de malária e 47% dos casos na Índia. Esta espécie tem uma característica importante que é a formação dos hipnozoítos, nas células hepáticas, responsáveis pelos casos de recidivas (BRASIL, 2020a ; OMS, 2020a).

P. falciparum é o agente etiológico dos casos mais graves e da maioria de mortes, sendo prevalente na África (99,7% dos casos), mas também está presente no sudeste asiático (50%), na região do Mediterrâneo oriental (71%) e Pacífico ocidental (65%) (OMS, 2020a). No Brasil as infecções por *P. falciparum* corresponderam a 11,9% dos casos registrados (BRASIL, 2020a).

P. malariae é pouco frequente no Brasil, sendo responsável por menos de 1% dos casos e causa uma malária branda (BRASIL, 2020a). *P. knowlesi* é morfológicamente semelhante ao *P. malariae* e para determinar a distribuição geográfica de *P. knowlesi* na população humana na Malásia, foi realizado estudo em que o DNA deste parasito foi detectado em 27,7% das amostras da região de Sarawak, 83,7% em Sabah e 100% em Pahang. Apenas o DNA de *P. knowlesi* foi detectado em esfregaços de sangue de quatro casos fatais. (COX-SINGH *et al.*, 2008; COX-SINGH *et al.*, 2010).

P. ovale ocorre na África Subsaariana, Oriente Médio, Índia, no sudeste asiático (Filipinas, Indonésia, Mianmar, Tailândia e Vietnã) e não foi relatado na América do Sul. Apresenta taxa de infecção muito baixa, sendo semelhante morfológicamente ao *P. vivax*, pois também forma hipnozoítos no fígado. Na malária por *P. ovale* ocorre sintomatologia branda com episódios febris apenas em alta parasitemia (ANTINORI *et al.*, 2012).

2.1.2 Vetores da malária humana: *Anopheles* spp.

O vetor da malária humana é um inseto conhecido por carapanã, mosquito-prego, muriçoca e pernilongo. Apresenta ampla distribuição mundial, ocorrendo em todas as regiões temperadas e tropicais, porém são mais diversos em ambientes florestais tropicais. Este inseto pertence à ordem Diptera, família Culicidae Meigen 1818, subfamília Anophelinae Grassi 1900, gênero *Anopheles* Meigen 1818, o qual é classificado nos seguintes subgêneros: *Anopheles* (190 espécies), *Baimaia* (1 espécie), *Cellia* (225 espécies), *Christya* (2 espécies), *Kerteszia* (12 espécies), *Lophopodomyia* (6 espécies), e *Nyssorhynchus* (40 espécies) e *Stethomyia* (5 espécies) (HARBACH, 2020).

No Brasil, as espécies mais importantes na transmissão da malária são: *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926; *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Lynch Arribalzaga, 1878 e *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis* Curry, 1932 (SINKA *et al.*, 2012). Dentre as diversas espécies deste vetor o *Anopheles darlingi* é um dos mais importantes, principalmente na Amazônia. Esta espécie foi descrita por Root em 1926 e seu nome foi dado em homenagem ao Dr. Samuel Taylor Darlingi (1872-1925). O *A. darlingi* apresenta alta eficiência na transmissão da malária mesmo com taxa de infecção natural e densidade populacional relativamente baixas, pois esta

espécie tem habilidade em adaptar-se a ambientes modificados pelo ser humano, além de apresentar elevada suscetibilidade à infecção pelo *Plasmodium* (HIWAT & BRETAS, 2011).

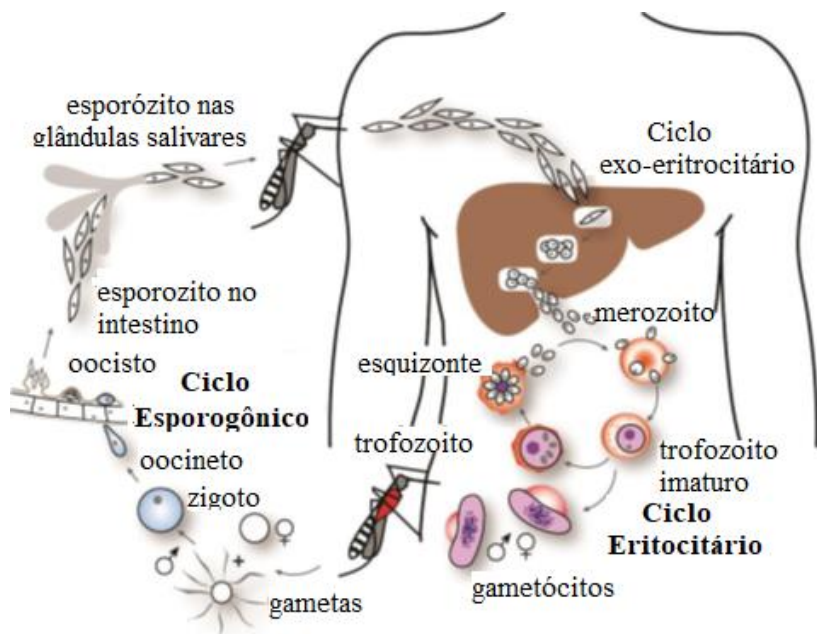
2.1.3 Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

O ciclo de vida de *Plasmodium* spp. é bastante complexo alternando entre a fêmea anofelina e o hospedeiro vertebrado (Figura 1). O ciclo tem início quando os esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado pela fêmea do mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Estes esporozoítos podem permanecer na derme por até 3 h. Uma parte deles chega à corrente sanguínea, enquanto os que permanecem na derme são destruídos e drenados pelos vasos linfáticos. Da corrente sanguínea os esporozoítos chegam ao fígado (fase exo-eritrocítica), atravessando a barreira sinusoidal formada por células endoteliais e células de Kupffer. Ao longo de dois a dez dias os esporozoítos se desenvolvem assexuadamente liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea. O desenvolvimento do parasito nas células do fígado leva em torno de uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax*, e cerca de duas semanas para *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* um estágio dormente (hipnozoíto) pode persistir no fígado e causar recaídas com o parasito invadindo a corrente sanguínea após semanas, ou mesmo anos. Os merozoítos livres na circulação hepática invadem os eritrócitos onde ocorre uma multiplicação assexuada (esquizogonia eritrocítica), na qual os merozoítos evoluem para trofozoítos em estágio de anel que, por sua vez, se desenvolvem em esquizontes, que se rompem liberando novos merozoítos que invadem outros eritrócitos dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária (48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e 72 horas nas infecções por *P. malariae*). Durante os ciclos de esquizogonia na corrente sanguínea cerca de 1% dos parasitos passam por uma mudança em seu desenvolvimento, iniciando o desenvolvimento sexual, diferenciando-se em gametócitos masculinos e femininos, que são dimórficos. Estes estágios sexuais são determinantes na transmissão da malária (DELVES *et al.*, 2012; COWMAN *et al.*, 2016, BRASIL, 2020a).

Durante o repasto sanguíneo o mosquito ingere os gametócitos machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos), iniciando o ciclo esporogônico. No estômago do mosquito os microgametas penetram nos macrogametas formando os zigotos que se diferenciam em formas alongados, móveis e invasivas, formas chamadas de oocinetos, nos quais ocorre a meiose. Estes invadem a parede do intestino médio do mosquito onde se transformam em oocistos, que sofrem

endomitose, produzindo milhares de esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo do parasito (DELVES *et al.*, 2012).

Figura 1: Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.



Fonte: Adaptado de Cowman *et al.* (2012).

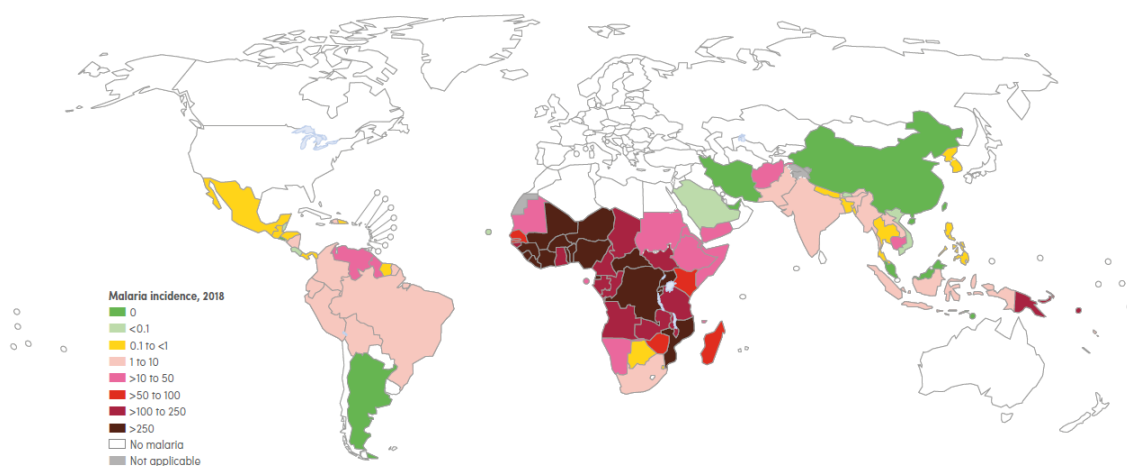
2.1.4 Malária no mundo e no Brasil

Em 2020 o mundo foi surpreendido por uma pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 que causa a Síndrome Respiratória Aguda Grave (COVID-19). Em abril de 2020 a pandemia já havia se espalhado pelos países endêmicos para malária. A pandemia e medidas restritivas aplicadas para o seu controle acabaram por causar interrupções em serviços essenciais para o controle da malária, sendo exigido um esforço para minimizar o impacto negativo desta pandemia em pessoas afetadas pela malária. Nesse sentido foram desenvolvidas algumas ações pela OMS, tais como: publicação de orientação técnica de como manter com segurança os serviços de controle da malária no contexto da pandemia; reduzir a pressão para alterar a produção de teste rápido para malária para o SARS-CoV-2; solucionar problemas na produção de medicamentos

contra malária; atuar para evitar problemas no envio de produtos para malária; mobilizar recursos para equipamentos de proteção individual (EPIs) e outros materiais relacionados à malária, além de rastrear interrupções nos programas de malária e orientar respostas (OMS, 2020b).

A malária ocorre de forma geral em locais onde o ambiente permite a multiplicação do parasito no vetor, ficando restrita às áreas tropicais e subtropicais e altitudes inferiores a 1.500 m. A taxa de incidência da malária é mais elevada principalmente em países da África como é possível observar na Figura 2 (OMS, 2020a). De acordo com a OMS em 2019 foram registrados 229 milhões de casos, em 87 países endêmicos para malária. A África apresentou 215 milhões de casos em 2019, representando 94% do total de casos (OMS, 2020b). Em 2020 ocorreram 241 milhões de casos, correspondendo a um aumento de 12% em relação ao ano anterior (OMS, 2021).

Figura 2: Taxa de incidência de casos de malária por país (casos/1000 habitantes) em 2018.

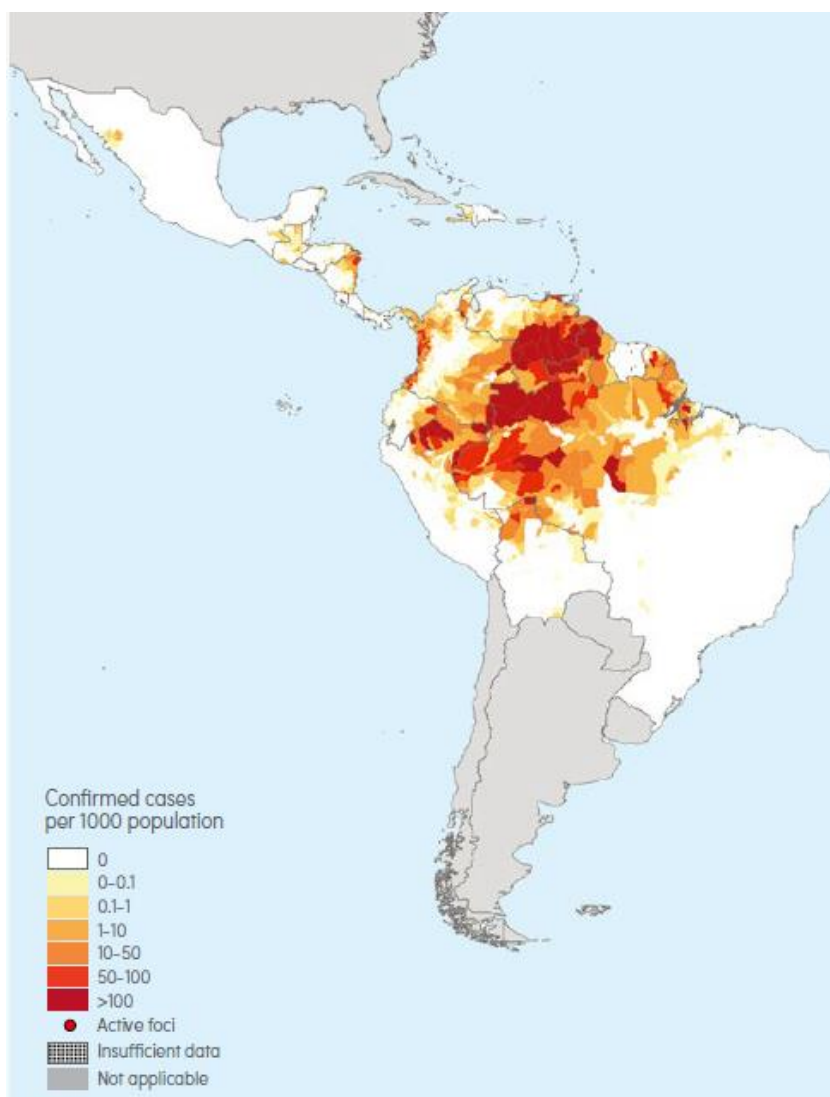


Fonte: OMS, 2020a

A mortalidade global por malária foi reduzida em 60% no período de 2000 a 2019. Para 2019 foram estimadas 409 mil mortes no mundo (OMS, 2020b) enquanto em 2018 foram 411 mil e 435 mil mortes em 2017 (OMS, 2020a). No entanto em 2020 ocorreu um aumento no número de mortes atingindo 627 mil no mundo, o que pode estar associado aos impactos causados pela pandemia COVID-19 (OMS, 2022). No continente africano ocorreram 95% dos casos e 96% das mortes contabilizadas no mundo. As crianças menores de 5 anos são mais vulneráveis e em 2020 o número de mortes ocorridas na África nessa faixa etária correspondeu a 80% do total de mortes registradas no continente (OMS, 2022).

Nas Américas os casos de malária foram reduzidos em 40% entre 2000 e 2019, sendo que Paraguai (2018) e Argentina (2019) (Figura 3) receberam a certificação de países livres da malária, a qual é concedida quando um país demonstra que interrompeu a transmissão autóctone da doença por pelo menos três anos consecutivos. No entanto a redução no número de casos de malária na Américas sofreu o impacto negativo da Venezuela que de 35.500 casos no ano 2000 passou para 467.000 em 2019 (OMS, 2020b).

Figura 3: Casos confirmados de malária por 1000 habitantes em 2019.



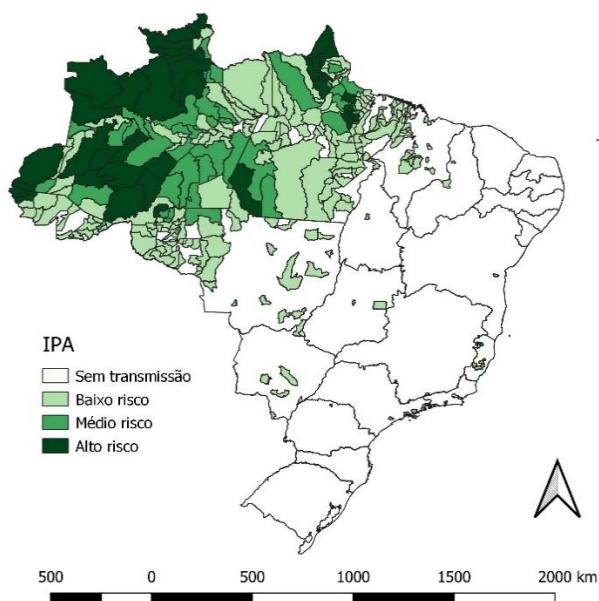
Fonte: OMS, 2020b

No Brasil 99% da transmissão concentra-se na região denominada Amazônia Legal formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 4). A região extra-amazônica é responsável por apenas 1% dos casos, sendo que a maioria destes é importada de outros estados ou países endêmicos. No entanto estes poucos casos não devem ser desconsiderados pois na existência do vetor pode ocorrer aumento da transmissão (Brasil, 2020a). A classificação do risco de transmissão pode ser observada na Figura 4 (BRASIL, 2020b) e foi baseada no número de casos notificados em 2018.

Em 2019 foram notificados na Região Amazônica 156.918 casos da malária, com predomínio de *P. vivax* (89,2%), enquanto os casos de *P. falciparum* corresponderam à 10,8% do total. Na região Extra-amazônica ocorreram 534 casos, com 152 atribuídos ao *P. falciparum* e 384 casos causados por parasitos não *P. falciparum*. No ano de 2020 foram notificados 132.772 casos, com 112.659 casos causados por *P. vivax* (84,9%) e 18.404 casos atribuídos ao *P. falciparum* (13,9%) na Amazônia. Na região extra-amazônica foram registrados 245 casos de janeiro a setembro de 2020, sendo 76,73% atribuídos a não *falciparum* e 23,27% causados por *P. falciparum* e malária mista (BRASIL, 2020b). No Brasil, de 2019 a 2020, ocorreu uma redução de cerca de 15,4% nos casos de malária. No Brasil o número de mortes é baixo, sendo que em 2018 foram registradas 56 e em 2019, o número de mortes foi de 37 (BRASIL, 2021).

O controle da malária tem como objetivo final interromper a transmissão para que se chegue à eliminação da doença, nesse sentido a Estratégia Técnica Global para a Malária da OMS propôs a redução de cerca de 90% dos casos até 2030 e eliminação em 35 países, estabelecendo os pilares para atingir as metas propostas: acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento; acelerar os projetos para a eliminação; realizar vigilância em malária como intervenção essencial (OMS, 2020a).

Figura 4: Áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA/2018).



Fonte: Sinan e Sivep-Malária - SVS/MS (BRASIL, 2020b).

Classificação do IPA: sem transmissão: 0 casos autóctones; baixo risco: $IPA < 10$ casos/1.000 habitantes.; médio risco: $10 < IPA < 50$ casos/1.000 habitantes.; alto risco: $IPA \leq 50$ casos/1.000 habitantes.

2.1.5 Tratamento da malária

A malária apresenta em seu quadro clínico uma crise aguda caracterizada por febre, sudorese e calafrios, que pode durar de 6 a 12 h, mas nem sempre esse padrão é observado. As crises podem ser acompanhadas de cefaleia, náuseas, vômitos, mialgia, fraqueza, diarreia entre outros sintomas. O quadro clínico do paciente pode variar dependendo da espécie infectante, do nível da parasitemia e do estado imunológico do paciente, além do que os sinais e sintomas não são específicos. Assim, o tratamento é baseado no diagnóstico laboratorial, que pode ser feito por microscopia (gota espessa: primeira escolha; esfregaço delgado), teste de diagnóstico rápido, (detecção de componentes antigênicos no sangue) e técnicas moleculares. A profilaxia e o tratamento são as melhores alternativas para o controle da malária, principalmente nas Américas, uma vez que as vacinas ainda não estão disponíveis para *P. vivax*, parasito responsável pelo maior número de casos no continente (OMS, 2019; BRASIL, 2020a).

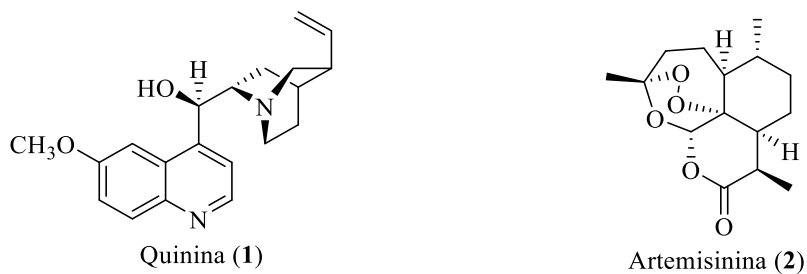
O programa de implementação de vacinas da malária coordenado pela OMS aprovou em 2021 a vacina para a prevenção da malária, porém ela não abrange todos os agentes causadores desta doença. A vacina contra a malária chamada RTS, S/AS01, resultado de cerca de 30 anos de pesquisa, atua contra o *P. falciparum*, causador da malária grave sendo prevalente na África. A aprovação da vacina foi resultante de um programa desenvolvido na África, abrangendo Gana, Malaui e Quênia, onde cerca de 800.000 crianças foram vacinadas em 2019 e continua em andamento. A vacina está sendo inicialmente utilizada para a prevenção da malária causada por *P. falciparum*, em crianças a partir de 5 meses de idade, em esquema vacinal de 4 doses, abrangendo regiões da África com transmissão moderada a alta da malária (HOGAN *et al.*, 2020).

No Brasil o tratamento da malária é feito por medicamentos distribuídos gratuitamente em todo território nacional pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os esquemas de medicação recomendados são de maneira geral: para *P. vivax*, cloroquina e primaquina; para *P. falciparum*, TCAs (artemeter+ lumefantrina ou artesunato+mefloquina) e primaquina; para malária mista (*P. vivax* + *P. falciparum*), TCAs + primaquina (7 dias). Gestantes e crianças têm protocolos de tratamento específicos (BRASIL, 2020a).

As drogas utilizadas no tratamento visam atingir o parasito em pontos considerados chaves do ciclo biológico que são: interrupção da esquizogonia sanguínea (fase associada à patogenia e manifestações clínicas; destruição das formas dormentes (hipnozoítos) no fígado; interrupção da transmissão impedindo o desenvolvimento das formas sexuadas, os gametócitos (BRASIL, 2020a).

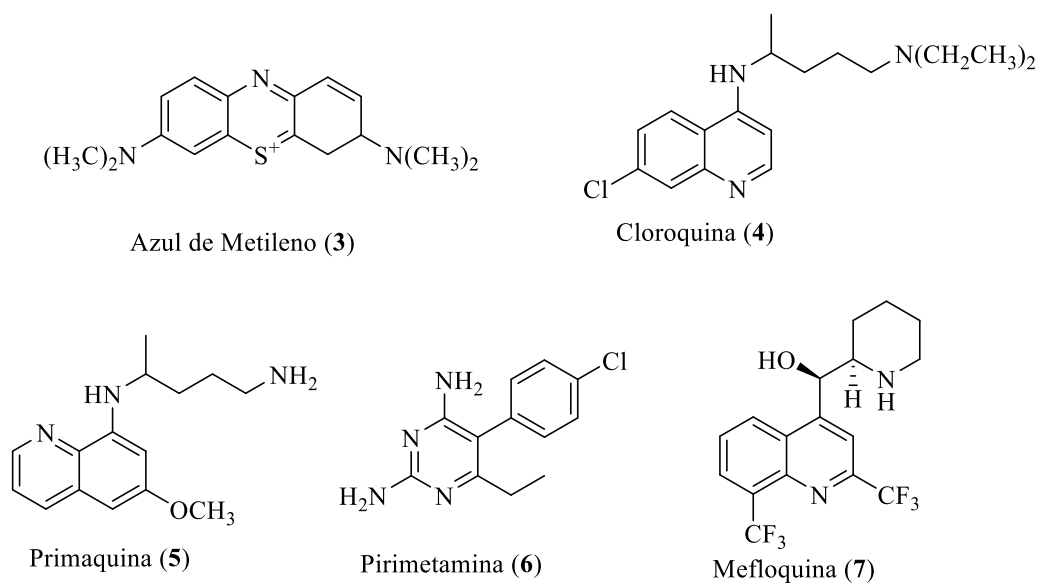
O tratamento da malária surgiu a partir dos conhecimentos de povos tradicionais sobre as propriedades terapêuticas de plantas, pois indígenas da América do Sul (Peru) usavam a casca de *Cinchona officinalis* para tratamento da malária, mas somente em 1820 os químicos franceses Pierre J. Pelletier e Joseph B. Caventou isolaram a quinina (**1**, Figura 5) a partir das cascas desta planta. A quinina é um alcaloide indólico monoterpênico do grupo das aminoquinolinas, sendo ativo contra as formas eritrocíticas, evitando que trofozoítos jovens se convertam em esquizontes. Após esta descoberta o seu uso estendeu-se para a Europa, América do Norte e Ásia e permaneceu como principal antimalárico até os anos 1920 quando os sintéticos começaram a ser introduzidos (ACHAN *et al.*, 2011; VALE *et al.*, 2005; FRANÇA *et al.*, 2008).

Figura 5: Antimaláricos naturais obtidos de plantas



A quinina (1) serviu como base estrutural para o desenvolvimento de inúmeros fármacos sintéticos (Figura 6) com mecanismo de ação antiplasmódica semelhante à própria quinina, porém com menor toxicidade. Desses análogos sintéticos, a cloroquina (4) se destaca por ser uma das substâncias antimaláricas mais utilizadas em regiões endêmicas, além de ter sido o preferido até o surgimento de resistência (FRANÇA *et al.*, 2008).

Figura 6: Antimaláricos sintéticos, análogos da quinina (1).

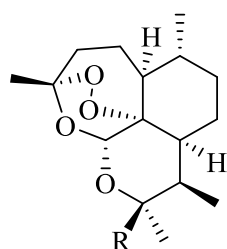


Em 1971, foi isolado por um grupo de pesquisadores chineses liderados por Tu Youyou, o sesquiterpeno artemisinina (2, Figura 5) que é uma substância ativa da planta *Artemisia annua* L. (qinghao), de uso milenar na China (cerca de 2.000 anos) para o tratamento de febres. A artemisinina (2) apresenta ação rápida pois inibe os estágios iniciais do desenvolvimento parasitário, isto é estágio de anel e trofozoíto jovem, pois tem meia-vida curta. Para melhorar a

eficiência e solubilidade foram desenvolvidos os derivados semissintéticos de artemisinina (8-12, Figura 7) com propriedades esquizotícas sanguíneas (KLAYMAN, 1985; MILLER & SU, 2011).

A artemisinina e seus derivados (Figura 7) constituem a classe mais importante de antimaláricos disponíveis porque são eficazes contra parasitos resistentes. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente compreendido. Alguns estudos sugeriram que seu alvo pode ser a enzima Ca^{2+} PfATP6 (malaria ATPase dependente de cálcio) (RIDLEY, 2003; KRISHNA *et al.*, 2004). Estudos continuam sendo realizados para elucidar a ação das artemisininas. Entre eles o realizado por Wang e colaboradores (2015) que utilizaram análise proteômica para identificar tal mecanismo. Para isso foi projetado e sintetizado quimicamente um análogo de artemisinina com um marcador acoplado com biotina permitindo que os alvos sejam identificados. Nesse estudo foi possível identificar 124 alvos proteicos, envolvidos em processos biológicos essenciais do parasita, tais como: metabolismo de ácidos carboxílicos, aminas biogênicas, nucleosídeos, síntese de ribonucleosídeos. Também foi demonstrado que a diidroartemisinina causa a morte do plasmódio promovendo danos às proteínas e comprometendo a função proteossômica do parasita (BRIDGFORD *et al.*, 2018).

Figura 7: Antimaláricos semissintéticos derivados de artemisinina (2)

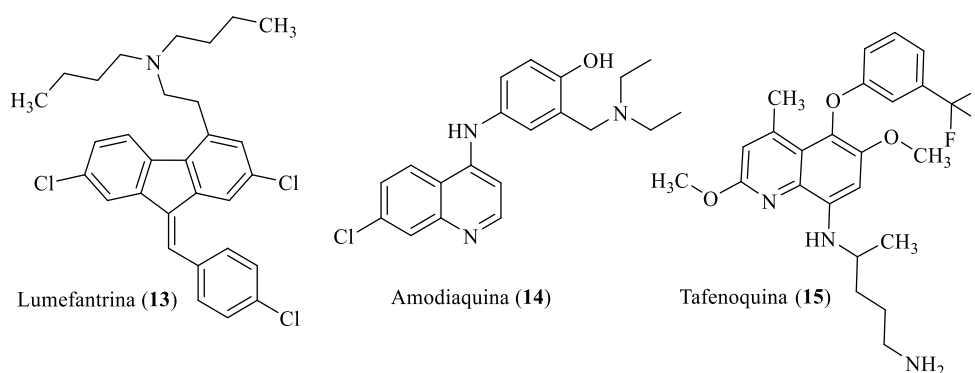


- (8) R= $\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$; Artesunato de sódio
- (9) R= OCH_3 ; Artemeter
- (10) R= OH ; Diidroartemisinina
- (11) R= OCH_2CH_3 ; Arte-éter
- (12) R= $p\text{-CH}_3\text{O-F-CO}_2^-$; ácido artelínico

A artemisinina (2) e seus derivados são, em geral, seguros e bem tolerados. Os dados de toxicidades em células e animais de laboratório provavelmente sejam em decorrência de doses altas e não foram registrados em seres humanos. Por outro lado, a segurança no tratamento de malária na gravidez é uma preocupação, uma vez que foi possível verificar a perda de embriões em ratos, coelhos e macacos. Em seres humanos foi verificada a redução da eritropoiese após uso de artemisinina, portanto as drogas à base de artemisinina não são recomendadas durante o primeiro trimestre de gravidez (CUI & SU, 2009).

Em 2006 a OMS definiu as terapias combinadas à base (de derivados) de artemisinina (2) ou TCAs para tratamento de malária causada por *P. falciparum* como tratamento de primeira linha, pois estas associações tornam o tratamento mais eficaz, e isso ocorreu em um contexto de reconhecimento global da epidemia (BALKAN & CORTY, 2011). As TCAs são a combinação de um fármaco de meia-vida curta, em geral um derivado semissintético da artemisinina (2, Figura 7) com um de meia-vida longa, como mefloquina (7, Figura 6), lumefantrina (13, Figura 8), amodiaquina (14, Figura 8), os quais promovem a redução de gametócitos sanguíneos e estão disponíveis como: artesunato-mefloquina; arteméter-lumefantrina; diidroartemisinina-piperaquina; artesunato-amodiaquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina, entre outros (GOLENSER *et al.*, 2006).

Figura 8: Estrutura química da lumefantrina (13), amodiaquina (14) e tafenoquina (15)



No Brasil o tratamento da malária é feito por medicamentos distribuídos gratuitamente em todo o território nacional pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os esquemas de medicação recomendados são de maneira geral: para *P. vivax*, cloroquina (4) e primaquina (5); para *P. falciparum*, TCAs (artemeter (9) + lumefantrina (13) ou artesunato (8) + mefloquina (7) e primaquina (5); para malária mista (*P. vivax* + *P. falciparum*), TCAs + primaquina (7 dias). Gestantes e crianças têm protocolos de tratamento específicos (BRASIL, 2020a).

As drogas utilizadas no tratamento visam atingir o parasito em pontos considerados chaves do ciclo biológico que são: interrupção da esquizogonia sanguínea (fase associada à patogenia e manifestações clínicas; destruição das formas dormentes (hipnozoítos) no fígado; interrupção da transmissão impedindo o desenvolvimento das formas sexuadas, os gametócitos (BRASIL, 2020a).

Estudos recentes apontam a tafenoquina (15, Figura 8), uma 8-aminoquinolina, como uma droga eficaz no tratamento de recidivas em malária causada por *P. vivax*. A prevenção das recaídas

ocorre através da eliminação dos hipnozoítos do fígado. No protocolo de tratamento de malária por *P. vivax* a primaquina (5, Figura 6) é utilizada com essa finalidade, porém é um tratamento longo, durando 7 dias (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). A vantagem no uso da tafenoquina (15) está na duração do tratamento, uma vez que ela é administrada em dose única, tratamento denominado cura radical (LACERDA *et al.*, 2019; CHATURAKA *et al.*, 2020). A tafenoquina (15) demonstrou ter ação no bloqueio de transmissão *in vitro*, além de retardar a formação de esporozoítos em *P. vivax* (BIAMONTE *et al.*, 2013).

A tafenoquina (15) assim como a primaquina (5, Figura 6) apresenta uma importante desvantagem uma vez que causam anemia hemolítica em pacientes com deficiência na produção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Esta anomalia genética recessiva é ligada ao cromossomo X, sendo muito comum em regiões tropicais, com a frequência do gene variando de 3 a 30%. Em geral a hemólise pode ocorrer após o uso de drogas oxidativas como primaquina (5, Figura 6) e tafenoquina (15), ambas usadas no tratamento de malária causada por *P. vivax*. Assim estes medicamentos não devem ser administrados em pacientes com deficiência da G6PD devido ao risco hemolítico (BAIRD, 2015; VIZZI *et al.*, 2016). Gestantes, puérperas até um mês de lactação e crianças menores de 6 meses não podem usar primaquina (5, Figura 6) e tafenoquina (15). Neste caso o tratamento para infecções por *P. vivax* ou *P. ovale* é realizado com cloroquina por três dias e cloroquina profilática (5mg/kg/dose/semana) para a prevenção de recaídas (BRASIL, 2020a).

2.1.6 Resistência aos antimaláricos

Alguns desafios impedem que os países consigam atingir a eliminação da malária, como: falta de financiamento, alterações climáticas e surgimento de cepas resistentes de *Plasmodium* spp. a vários medicamentos utilizados no tratamento (OMS, 2020a).

A resistência se dá, principalmente, por mutações genéticas no protozoário, que pode estar relacionada ao uso indevido dos fármacos, às características próprias das drogas (como meia-vida longa que pode ocasionar doses subterapêuticas), aos fatores do hospedeiro (imunidade), aos fatores do parasito, aos vetores ou fatores ambientais, sendo que os dois últimos podem influenciar na disseminação de parasitos resistentes. Assim a resistência do parasito apresenta diferenças dependendo do local e dos fatores já descritos (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A disseminação de cepas resistentes pode estar associada ao aumento de morbidade e mortalidade nas regiões endêmicas. O primeiro registro de resistência ocorreu em 1910 com a quinina (1), componente dos remédios preparados a partir da casca de jesuíta (*Cinchona* spp.) desde 1632 e introduzida como fármaco purificado a partir de 1820; para a cloroquina (4) introduzida em 1945 foi descrita a resistência em 1957. Para a mefloquina (7) utilizada a partir de 1977 a resistência foi relatada em 1982. (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A eficácia clínica da TCA artesunato (8) + mefloquina (7) foi avaliada no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum*, no Rio Juruá (Cruzeiro do Sul, no Acre). No estudo 154 pacientes foram acompanhados por 42 dias e tiveram resposta clínica e parasitológica adequada, ou seja, não foram encontradas evidências de resistência nas populações locais de *P. falciparum* para mefloquina (7), analisada respectivamente a partir da amplificação do gene *pfmdrI* ou artesunato (8) através da mutação no gene *Kelch13* (LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2016).

Em outro estudo realizado em 7 regiões da Amazônia brasileira (Anajás, Belém e Itaituba, no Pará; Macapá e Oiapoque, no Amapá; Porto Velho, em Rondônia e Rio Branco, no Acre) foi verificado que os parasitas de *P. falciparum* encontrados nessas regiões não apresentaram mutações no gene *Kelch13*, recomendado pela OMS como marcador molecular para detectar resistência aos TCAs (CHAPADENSE *et al.*, 2019).

Na região norte Brasil também foi realizado um estudo para monitorar a eficácia dos medicamentos cloroquina (4) - primaquina (5) utilizados no tratamento da malária não complicada causada por *Plasmodium vivax*, o qual concluiu que o *P. vivax* apresenta resistência e que a administração concomitante de cloroquina (4) e primaquina (5) pode ter subestimado as taxas de resistência da cloroquina (4) (LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2019).

Até mesmo para a mais recente e potente classe de antimalárico, os derivados da artemisinina (2), foram descritos casos de resistência na fronteira do Camboja e Tailândia (NOEDL *et al.*, 2008; OMS, 2020a). Foram identificadas mutações em *PfKelch13* como marcadores de resistência parcial a derivados da artemisinina. Tais mutações foram identificadas na Grande Mekong e na Guiana, Papua Nova Guiné e Ruanda. Também foi confirmada a resistência a derivados de artemisinina no Camboja, Laos e Vietnã. Na região africana as taxas de eficácia das TCAs são maiores que 98%. Com exceção da Somália e Sudão, onde as taxas de falha de tratamento foram altas (OMS, 2020a), de um modo geral, na região africana as taxas de eficácia das TCAs são maiores que 98%.

A OMS introduziu as TCAs para enfrentar a resistência aos antimaláricos, as quais foram implantadas em todas as regiões com malária. Mesmo que a resistência aos antimaláricos não seja um fenômeno generalizado, os casos detectados merecem atenção e mais estudos de monitoramento das drogas devem ser realizados (OMS, 2020a).

2.2 FAMÍLIA APOCYNACEAE JUSS.

A família Apocynaceae descrita por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem das Gentianales, sendo uma das famílias com maior número de espécies dentre as Angiospermas (RAPINI, 2000; FORZZA, 2010; THE PLANT LIST, 2020). Esta família apresenta uma distribuição predominantemente pantropical, mas com representantes em áreas temperadas, sendo composta por mais de 5.000 (ENDRESS & BRUYNS, 2004; THE PLANT LIST, 2020) espécies de ervas, subarbustos, arbustos, árvores ou lianas (JUDD *et al.*, 2009), distribuídas em 410 gêneros conforme The Plant List (2020). No Brasil, espécies da família Apocynaceae ocorrem em diferentes formações, como florestas pluviais da Amazônia, Mata Atlântica e de tabuleiro, restinga, cerrado e caatinga (QUINET & ANDREATA, 2005).

Entre as espécies desta família existem plantas cultivadas como ornamentais, árvores fornecedoras de madeira de boa qualidade e espécies utilizadas com propriedades medicinais, devido à presença de alcaloides e glicosídeos em sua composição (RIBEIRO *et al.*, 1999). Em geral espécies desta família apresentam látex branco ou de coloração diferenciada, além de grande quantidade de metabólitos secundários, o que faz da família uma importante fonte de substâncias bioativas e entre esses metabólitos os alcaloides têm importante papel (SOUZA & LORENZI, 2008). Considerando que os metabólitos secundários apresentam diversas propriedades biológicas, podendo atuar como antibióticos, antifúngicos, antivirais, na proteção das plantas contra patógenos, além de desempenharem papel antigerminativo ou mesmo tóxico para outras espécies vegetais (FUMAGALI *et al.*, 2008). Estudos voltados para explorar o potencial terapêutico de espécies desta família são importantes e necessários.

2.2.1 Alcaloides

Entre os metabólitos produzidos por espécies desta família destacam-se os alcaloides. Esse nome tem origem no árabe e significa “álcali”, nome popular da planta da qual foi obtida a soda (mistura de alcalis), *Salsola soda* L. (CROTEAU *et al.*, 2000; LUNA, 2008). O termo alcaloide foi proposto pelo farmacêutico Carl Meissner no século XIX, na Alemanha.

Os alcaloides compreendem um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, de caráter básico ou não, que contêm (ao menos) um átomo de nitrogênio, em geral em uma estrutura heterocíclica e podem apresentar importante atividade farmacológica ou toxicológica (CROTEAU *et al.*, 2000). Podem ser classificadas como alcaloides verdadeiros as substâncias com nitrogênio em anéis heterocíclicos e como os proto-alcaloides as que possuem o nitrogênio num substituinte de anel ou numa cadeia lateral acíclica. Estas substâncias compreendem diversos tipos de esqueleto químico e sua origem biogenética é normalmente a partir de aminoácidos de onde obtém o nitrogênio. Há também os alcaloides que têm origem em esqueletos terpenoides e esteroides (DEWICK, 2009).

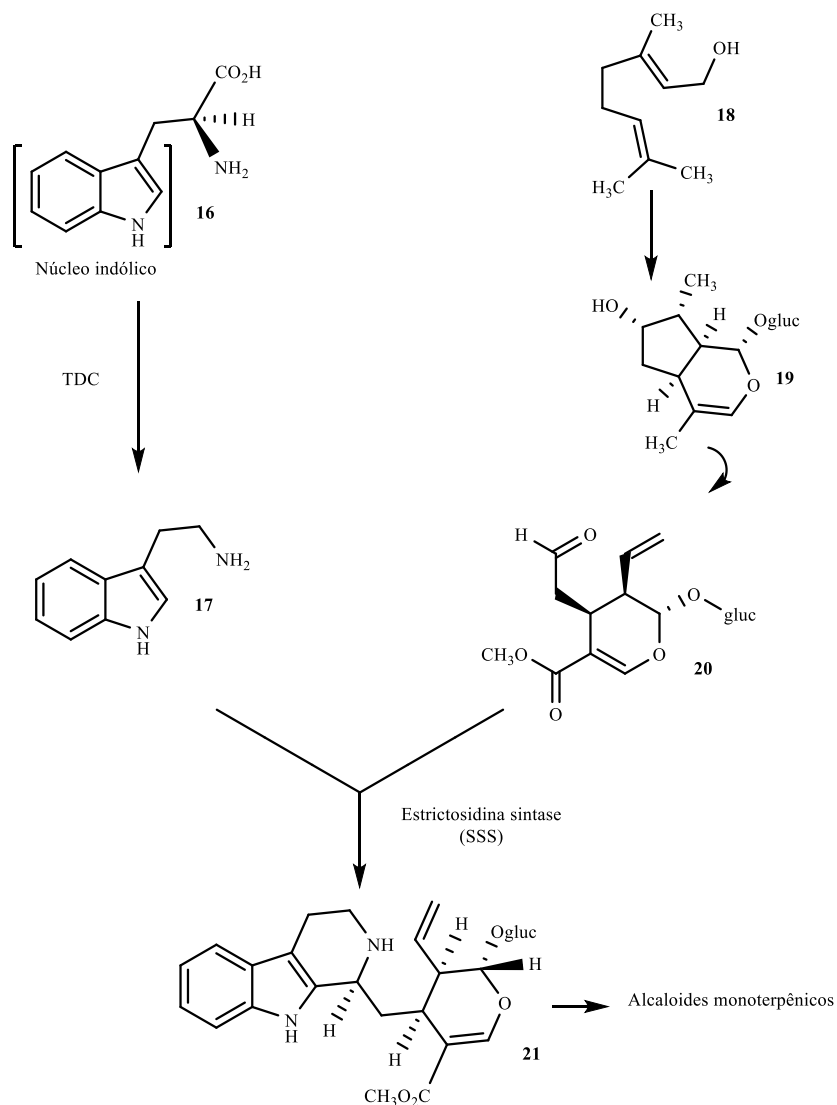
O papel dos alcaloides nas plantas ainda não está totalmente elucidado, porém sabe-se que desempenham importante função nas relações interespecíficas, como predação e defesa e nas intraespecíficas, como sinalizadores. Também atuam na homeostasia dos indivíduos que os produzem como a serotonina (MANN *et al.*, 1993). Os alcaloides em geral apresentam um impacto na economia, medicina e em outros setores da sociedade, pois tem aplicações diversas, desde veneno, medicamentos (*e.g.* a quinina, **1**), poções utilizadas em rituais até drogas ilícitas (*e.g.* a cocaína) (SIMÕES *et al.*, 2017), por isso muitos estudos são realizados para investigar novos alcaloides e suas propriedades.

Entre as diversas classes dessas substâncias, os alcaloides indólicos constituem um extenso grupo de substâncias derivadas do triptofano que contém um núcleo indólico (Figura 9). Os alcaloides indólicos somam mais de 4.000 estruturas registradas na literatura, as quais estão distribuídas em três subgrupos denominados: alcaloides indólicos monoterpênicos, alcaloides indólicos hemiterpênicos e alcaloides indólicos β -carbolínicos (SIMÕES *et al.*, 2017).

Na família Apocynaceae, onde encontra-se o gênero *Geissospermum* Allemão, que tem como uma de suas características a presença marcante de alcaloides, principalmente os indólicos. Os alcaloides indólicos monoterpênicos são o maior subgrupo, sendo encontrados em cerca de 8

famílias, principalmente em plantas pertencentes a três famílias da ordem Gentianales: Apocynaceae, Loganiaceae R.Br. ex Mart. e Rubiaceae Juss. (DEWICK, 2009). Estes alcaloides são sintetizados a partir do triptofano (**16**) que perde a carboxila através da ação da enzima triptofano descarboxilase (TDC) originando a triptamina (**17**), precursor comum a maioria dos alcaloides indólicos. A porção terpênica desses alcaloides tem origem no *seco*-iridoide secologanina (**20**), resultado da hidroxilação do geraniol (**18**) pela enzima geraniol-10-hidroxilase (G10H) e ciclizações posteriores para formar o iridoide loganina (**19**). A reação entre essas duas substâncias é catalisada pela enzima strictosidina sintase (SSS), formando o glucoalcaloide 3 (α) (S) strictosidina (**21**), o precursor dos alcaloides indoloterpênicos, pois a partir dela diferentes rotas metabólicas podem originar diversos grupos e subgrupos de alcaloides (Figura 9) (CROTEAU *et al.*, 2000).

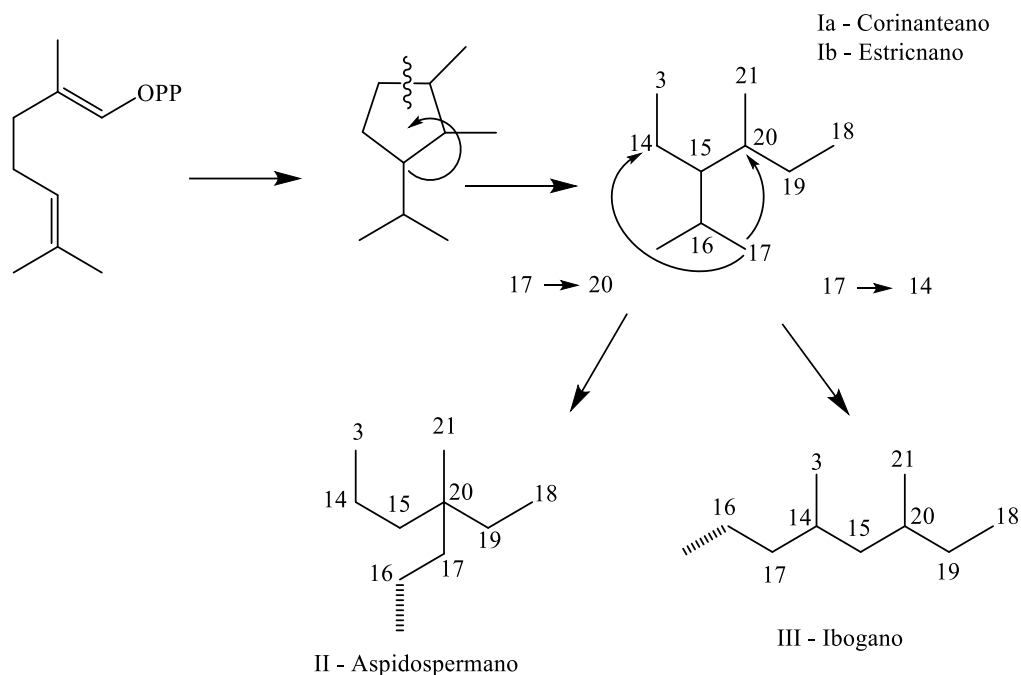
Figura 9: Rota biossintética da estrictosidina



Fonte: Croteau *et al.* (2000).

Rearranjos na porção terpenoídica da estrictosidina levam à formação das seguintes subclasses: classe I – alcaloides em que a unidade monoterpênica não sofreu rearranjos, correspondendo aos esqueletos corinanteano (a) ou estricnano (b); classe II – alcaloides com rearranjo nos carbonos $\text{C-17} \rightarrow \text{C-20}$ da unidade monoterpênica (resultando no esqueleto monoterpenoide dos alcaloides do tipo aspidospermano); classe III – alcaloides com rearranjo nos carbonos $\text{C-17} \rightarrow \text{C-14}$ da unidade monoterpenoídica (levando ao esqueleto monoterpenoide dos alcaloides do tipo ibogano), apresentados na Figura 10 (DEWICK, 2009).

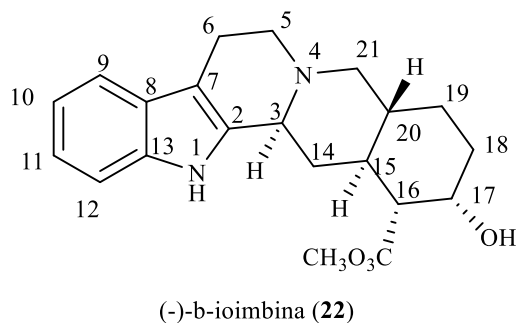
Figura 10: Biotransformações na cadeia terpenoídica que levam às principais classes de alcaloides indólicos monotерpenoídicos de *Aspidosperma*.



Fonte: Kompis *et al.* (1971) *apud* Ghazali (2012)

Um sistema de numeração para os esqueletos foi proposto baseado na molécula ioimbina (22, Figura 111), onde em geral, o número de cada átomo no esqueleto depende de sua origem biogenética (LE MEN; TAYLOR, 1965).

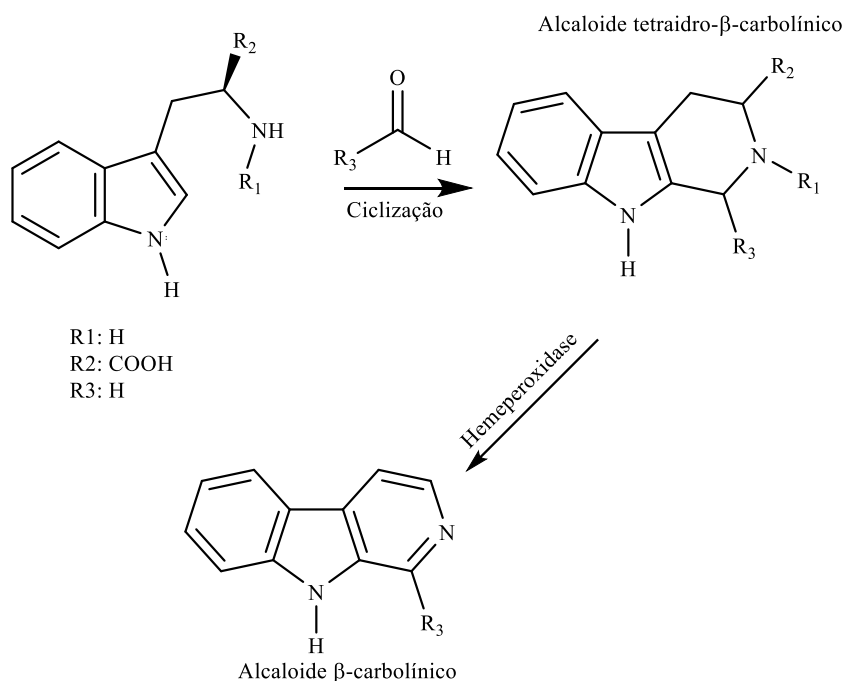
Figura 11: Sistema de numeração baseado na biossíntese (-)- β -ioimbina (22)



Entre os alcaloides indólicos ainda temos os β carbolínicos os quais são formados pela reação da cadeia lateral etilamina da triptamina com um aldeído ou cetoácido de acordo com a

complexidade do substrato conforme a Figura 12. Eles possuem um esqueleto de 9H-pirido[3,4-b]indol, sendo que as substâncias com o anel piridínico totalmente insaturado são chamadas β -carbolinas (Herraiz & Galesteo, 2014).

Figura 12: Biossíntese de alcaloides β -carbolínicos em sistemas biológicos.



Fonte: Herraiz & Galesteo (2014).

A família Apocynaceae apresenta, além dos alcaloides β -carbolínicos, uma rica variedade de esqueletos de alcaloides indoloterpênicos, derivados dos básicos acima citados. Os derivados corinanteanos e aspidospermanos são os mais frequentemente registrados no gênero *Geissospermum*, e estão representados nos alcaloides isolados no presente estudo.

2.2.2 Triterpenos

Os terpenóides são os metabólitos secundários que formam o maior grupo de produtos naturais, sendo classificados de conforme o número de unidades de isoprenos (C_5) de sua estrutura: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}).

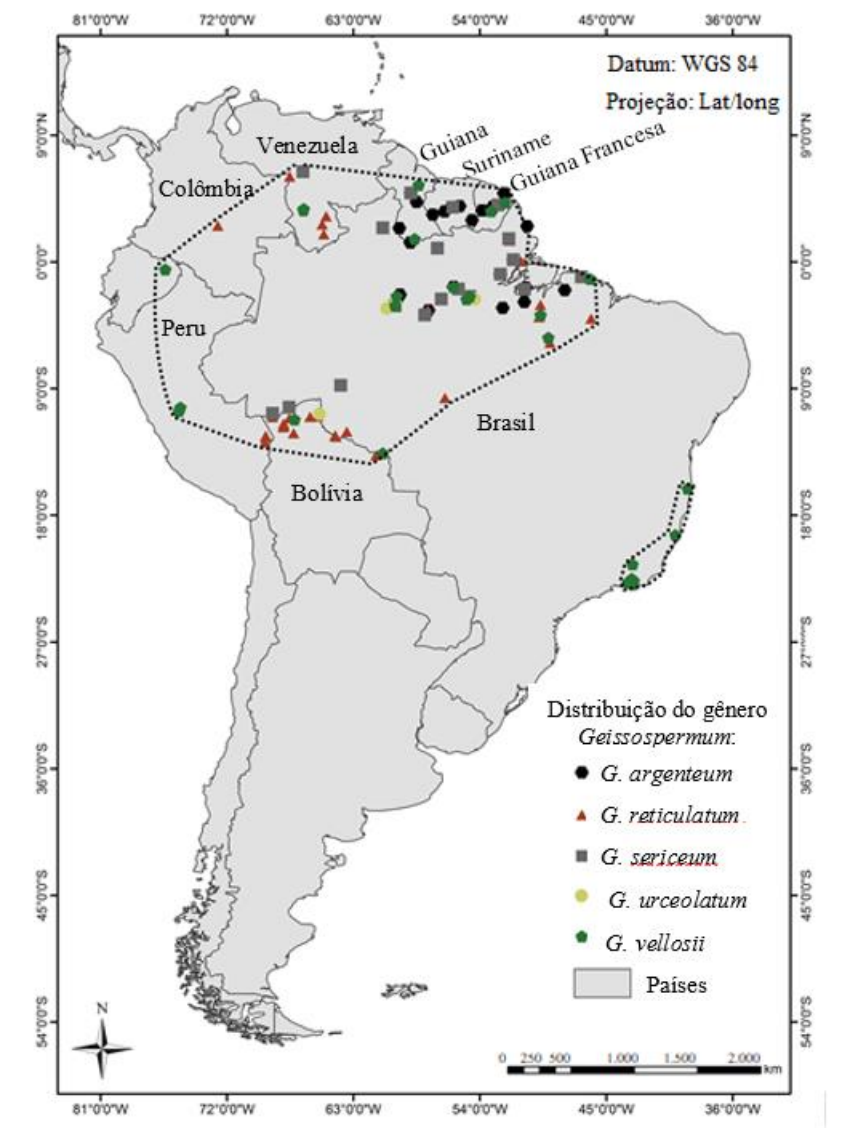
Os triterpenos constituem uma ampla classe de produtos naturais estruturalmente diversa, derivada de um precursor acíclico de 30 carbonos, exemplificado através do lupeol (Figura 58 e 59) descrito na seção 5.2.2.5. A função dos triterpenos está associada à defesa contra patógenos, predadores, competidores entre outras. Também são componentes estruturais de membranas celulares, estabilizando as bicamadas de fosfolipídeos das membranas (GERSHENZON & DUDAREVA, 2007)

Os triterpenos (C30) e politerpenos parecem ser produzidos no citosol e retículo endoplasmático, sendo que a via clássica do acetato/mevalonato parece ser a mais provável na formação do precursor fundamental, o isopentenil difosfato – IPF, ou seja, são formadas pela condensação de moléculas de IPF através de enzimas prenilttransferases (CROTEAU *et al.*, 2000; DEWICK, 2009).

2.3 ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO *Geissospermum* ALLEMÃO (1845: 73)

O gênero *Geissospermum* Allemão (1845: 73) é composto por espécies nativas e ocorrem no norte da América do Sul, em países como Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, França além-mar (Guiana Francesa), além do Brasil (WCSP, 2019). No Brasil espécies deste gênero são encontradas nas matas de terra firme e em floresta ombrófila (pluvial). na Amazônia, principalmente no Amazonas, Pará e no Acre. A presença de espécies de *Geissospermum* foi confirmada no Brasil, na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica e nos seguintes estados/regiões: Norte (Acre, Amapá; Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima); Nordeste (Bahia, Maranhão); Centro-oeste (Distrito Federal); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro). A maioria de suas espécies ocorre na floresta amazônica, com apenas uma, *G. vellosii* Allemão (1845: 73), ocorrendo também no Cerrado (no Brasil Central) e Mata Atlântica (FORZZA, 2010; BARBOSA *et al.*, 2019, BARBOSA & SIMÕES, 2020). Na Figura 13 é possível observar a localização geográfica das espécies de *Geissospermum* Allemão (BARBOSA *et al.*, 2019).

Figura 13: Localização de *Geissospermum* spp. (endêmicas apenas em países da América do Sul).



Fonte: Barbosa *et al.* (2019)

Este gênero apresenta árvores, raramente arbustos, com folhas alternadas laterais, cartáceas, tronco fenestrado e ou acanalado e látex escasso ou ausente e pode estar presente nos frutos e nas extremidades dos ramos. As inflorescências são tirsoídes com flores pequenas com corolas tubulares (BARBOSA *et al.*, 2019). As árvores deste gênero apresentam madeira pesada, albúrne amarelado, diferenciado do cerne mais escuro; textura fina; cheiro indistinto; gosto amargo e a grã, que se refere à orientação dos elementos do lenho em relação ao eixo da árvore, pode variar de regular a irregular (RIBEIRO *et al.*, 1999; LORENZI, 2002; FORZZA, 2010).

Este gênero compreende as espécies: *G. argenteum* Woodson, *G. fuscum* Markgr. *G. reticulatum* A. H., *G. sericeum* Miers, *G. urceolatum* A. H. Gentry e *G. laeve* (Vell.) Miers que de acordo com WCSP (2019) apresenta como sinonímia *G. vellosii* Allemão. Outras espécies foram classificadas como *Geissospermum*, mas posteriormente foram designadas *Aspidosperma* (WCSP, 2019).

Segundo Barbosa *et al.* (2019) *Geissospermum* spp. apresentam semelhanças morfológicas que podem dificultar a identificação delas, sendo que na maior parte dos casos amostras com órgãos reprodutivos são imprescindíveis para a diferenciação das espécies, porém isto nem sempre ocorre nas coletas de campo. Para contribuir no processo de identificação das espécies deste gênero foi proposto um método de comparação, através de matriz binária de caracteres, juntamente com métodos de agrupamento para obtenção de fenogramas e de uma chave de identificação dicotômica, utilizando formato de células epidérmicas, persistência dos tricomas, disposição dos braquiesclereídeos, contorno e vascularização do pecíolo. O conjunto de dados analisados foram obtidos de tecidos de órgãos vegetativos processados através de técnicas de anatomia vegetal. Cinco espécies, *G. argenteum*, *G. laeve*, *G. reticulatum*, *G. sericeum*, e *G. urceolatum*, foram comparadas através deste método, que permitiu distingui-las e afirmar que a mais distinta delas é *G. urceolatum*, pois não foi agrupada na análise fenética (sistema de classificação biológica baseado nas semelhanças e diferenças morfológicas e fisiológicas entre organismos, não considerando as relações filogenéticas) em decorrência de possuir características únicas no táxon, como folhas com margem sinuosa e tubo da corola urceolada (BARBOSA *et al.*, 2019).

2.3.1 Aspectos químicos de *Geissospermum* spp.

No final do século XIX surgiram os primeiros estudos sobre espécies deste gênero. A primeira espécie a ser estudada quimicamente foi *G. vellosii*, conhecida como pau pereira, da qual diversos alcaloides foram isolados (ALMEIDA *et al.*, 2009).

No Quadro 1 estão descritos os alcaloides já isolados de *Geissospermum* spp., bem como a atividade antiplasmódica expressa como concentração que inibe 50% do crescimento parasitário (CI₅₀), de acordo com trabalhos anteriores da literatura. A atividade antiplasmódica desses alcaloides é apresentada em mais detalhe na seção 2.3.2.1.

Puisieux *et al.* (1959) aponta que o alcaloide geissospermina (Quadro 1) foi isolado pela primeira vez em 1877 por O. Hesse, sendo um dos mais importantes no gênero. A hidrólise deste alcaloide resultou nos seguintes produtos: geissosquizina (24), apogeissosquizina (25) e geissosquizolina (26) também descritos no Quadro 1 (RAPOPORT *et al.*, 1958).

No Brasil o primeiro alcaloide deste gênero foi obtido na forma de mistura a partir de paupereira (*G. vellosii*), pelo farmacêutico Ezequiel C. dos Santos e foi chamado de pereirina (2, Quadro 1), porém este trabalho não foi reconhecido em obras provenientes da Europa (ALMEIDA *et al.*, 2009). A estrutura química do alcaloide 27 foi determinada por Bertho & Koll (1961). A flavopereirina (28, Quadro 1) foi isolada e teve sua estrutura elucidada no final da década de 1950 (BEJAR *et al.*, 1957; HUGHES; RAPOPORT, 1958). Ban & Seo (1961) relataram métodos para síntese dos derivados β -carbolínicos, incluindo a flavopereirina (28), que também foi sintetizada por Wenkert & Kilzer (1962).

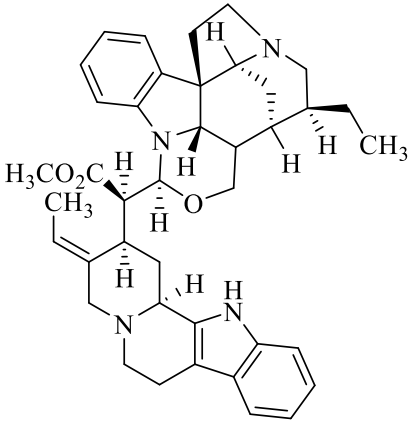
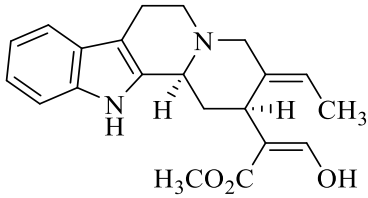
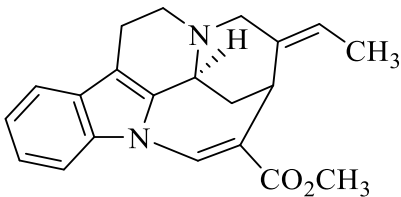
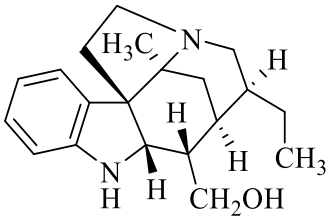
Rapoport & Moore (1962) isolaram três alcaloides (Quadro 1) de *G. vellosii*: velosimina (31), velosiminol (32) e geissolosimina (33). Moore & Rapoport (1973) relataram o isolamento de geissovelina (34). Os alcaloides 23, 26, 32 e 33, além de geissosquizona (35, Quadro 1) foram isolados de extrato metanólico de casca de *G. vellosii* e caracterizados através de técnicas cromatográficas, e espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (MBEUNKUI *et al.*, 2012b). Werner *et al.* (2009) isolou a 12-metoxi-1-metilaspidospermidina (36). Ishiyama *et al.* (2005) relataram o isolamento de pausperadina A (37, Quadro 1).

Paccioni & Husson (1978) realizaram estudos com cascas e folhas de *G. argenteum* coletadas na Guiana Francesa, isolando e identificando quatro alcaloides: (-)-desmetoxiaspidospermina (38), (-)-aspidospermina (39), (+)-desmetilaspidospermina (40) e (+)-aspidoscarpina (41, Quadro 1). Brito & Brito (1993) apontaram o alcaloide flavopereirina (28) como o composto ativo de *G. vellosii*. Steele *et al.* (2002) isolaram, além das substâncias 26 e 28, os alcaloides 4-*N*-óxido-geissosquizolina (42) e 1,2-diidrogeissosquizolina (43) de *G. sericeum* (Roraima). Os alcaloides 44 a 50 foram isolados por Reina *et al.* (2012) de *G. reticulatum* (Quadro 1).

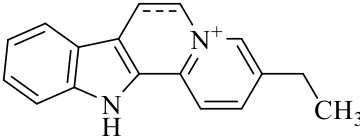
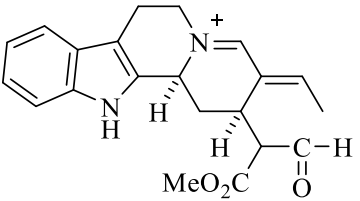
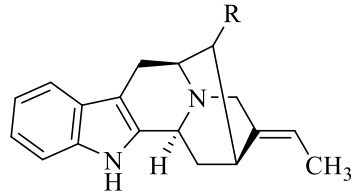
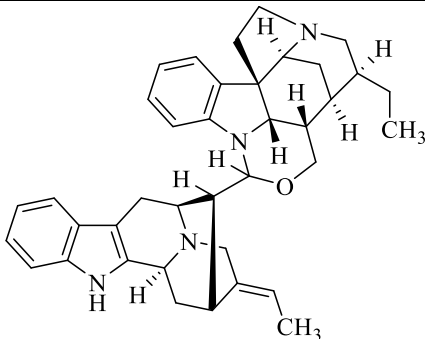
Kan Fan & Husson (1980) desenvolveram um estudo para demonstrar a formação biomimética da 5,6-diidroflavopereirina (29) a partir da 4,21-deidrogeissosquizina (30) com alto rendimento. Também foi demonstrado que a flavopereirina (28) pode ser biogeneticamente relacionada à 4, 21-deidrogeissosquizina (30).

Gordillo-Román *et al.* (2013) estabeleceram a configuração absoluta de (+) - 2*R*, 7*R*, 15*R*, 17*S*, 19*S*-10-desmetoxi-12-hidroxi-17,19-epoxigessivelina (**44**, Quadro 1), um alcaloide do tipo aspidospermatan isolado de *G. reticulatum*, através do dicroísmo circular vibracional (DCV) e da geissosreticulatina (**51**, Quadro 1). Os novos alcaloides, geissolaevina (**52**), *O*-metilgeissolaevina (**53**), 3',4',5',6'-tetradiidrogeissospermina (**54**) e leuconolam (**55**) foram isolados pela primeira vez da casca de *G. laeve* por Ramos *et al.* (2017, Quadro 1). Oliveira (2018) isolou das cascas de *G. urceolatum* os alcaloides 4-*N*-metil-acuamicina (**56**) e aspidoscarpina (**41**). No Quadro 1 foram descritos os alcaloides isolados de *Geissospermum* spp., bem como os ensaios antiplasmódicos já realizados para substâncias e seus valores de CI₅₀.

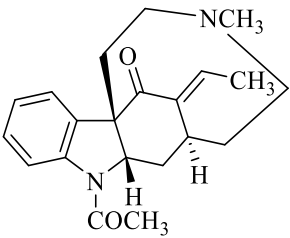
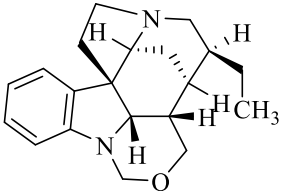
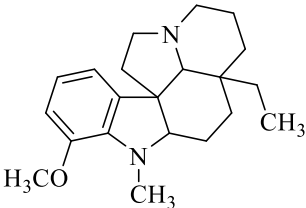
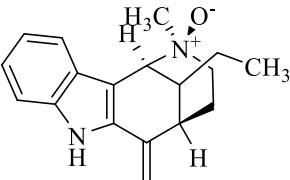
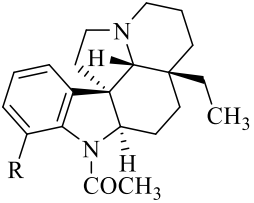
Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária.

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
 geissospermina (23)	<i>G. vellosii</i> (cascas) <i>G. laeve</i> (cascas)	Rapoport <i>et al.</i> (1958) Mbeunkui <i>et al.</i> (2012b)	CI₅₀ = 5,02 µM Mbeunkui <i>et al.</i> (2012a)
 geissosquizina (24)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Rapoport <i>et al.</i> (1958)	NT
 apogeissosquizina (25)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Rapoport <i>et al.</i> (1958)	NT
 pereirina (27)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Bertho & Koll, 1961	NT

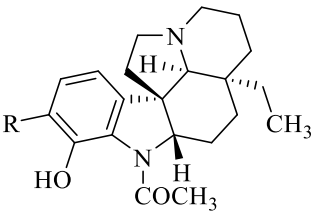
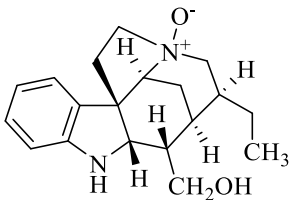
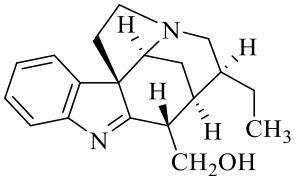
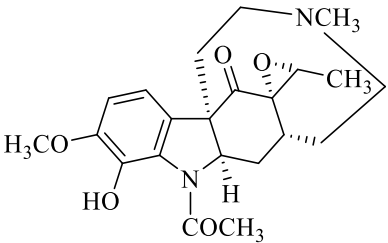
Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
 flavopereirina (28) 5,6-diidroflavopereirina (29)  4,21-deidrogeissosquizina (30)	<i>G. vellosii</i> <i>G. reticulatum</i> (cascas/folhas)	BEJAR <i>et al.</i> (1957) Steele <i>et al.</i> (2002) Reina <i>et al.</i> (2012) Kan Fan & Husson (1980)	CI₅₀ = 11,53 μM Steele <i>et al.</i> (2002) (28) (29) e (30) NT
 velosimina (R= COH) (31) velosiminol (R= CH₂OH) (32)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Rapoport & Moore (1962) (31) e (32) Mbeunkui <i>et al.</i> (2012b) (32)	NT (31) CI₅₀ = 157 μM Mbeunkui <i>et al.</i> (2012a) (32)
 geissolosimina (33)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Rapoport & Moore (1962) Mbeunkui <i>et al.</i> (2012b) Ramos <i>et al.</i> (2017)	CI₅₀ = 0,96 μM Mbeunkui <i>et al.</i> (2012a) CI₅₀ = 1,9 μM Ramos <i>et al.</i>, (2017)

Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
 geissovelina (34)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Moore & Rapoport (1973)	NT
 geissosquizona (35)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Mbeunkui <i>et al.</i> (2012b)	CI ₅₀ = 10,29 μM Mbeunkui <i>et al.</i> (2012a)
 12-metoxi-1-metilaspidospermidina (36)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Werner <i>et al.</i> (2009)	NT
 pausperadina A (37)	<i>G. vellosii</i> (cascas)	Ishiyama <i>et al.</i> (2005)	NT
 (-)-desmetoxiaspidospermina (R= H) (38) aspidospermina (R= OCH₃) (39)	<i>G. argenteum</i> (cascas e folhas) (38) e (39) <i>G. vellosii</i> (cascas) (39)	Paccioni & Husson (1978) (38) e (39) Dias (2012) (39)	NT

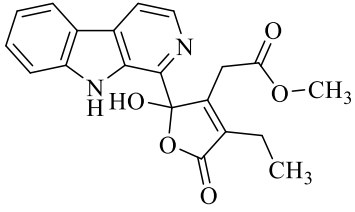
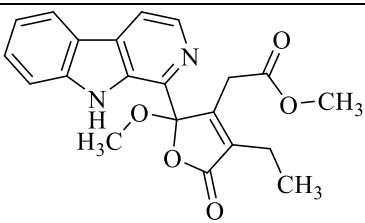
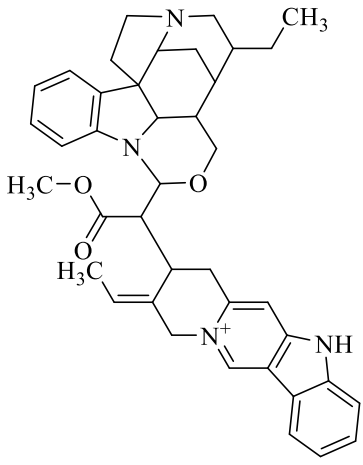
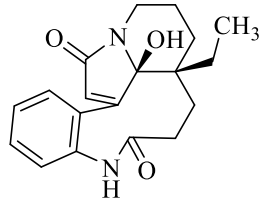
Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
 (+)-desmetilaspidospermina (R= H) (40) aspidoscarpina (R= OCH₃) (41)	<i>G. argenteum</i> (cascas e folhas) (40) e (41) <i>G. urceolatum</i> (cascas) (41)	Paccioni & Husson (1978) (40) e (41) Oliveira (2018) (41)	NT (40) CI₅₀ = 6,5 µM Oliveira (2018) (41)
 4N-oxido-geissosquizolina (42)	<i>G. sericeum</i> (cascas)	Steele <i>et al.</i> (2002)	CI₅₀ > 40 µM Steele <i>et al.</i> (2002)
 1,2- diidrogeissosquizolina (43)	<i>G. sericeum</i> (cascas)	Steele <i>et al.</i> (2002)	CI₅₀ = 27,26 µM Steele <i>et al.</i> (2002)
 10-dimetoxi-12-hidroxi-17,19-epoxigeissovelina (44)	<i>G. reticulatum</i> (cascas e folhas)	Gordillo-Román <i>et al.</i> (2013) Reina <i>et al.</i> (2012)	NT

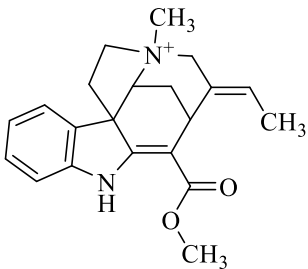
Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
derivado da geissovelina (45)	<i>G. reticulatum</i> (cascas e folhas)	Gordillo-Román <i>et al.</i> (2013) Reina <i>et al.</i> (2012)	NT
derivado da geissovelina (46)	<i>G. reticulatum</i> (cascas e folhas)	Gordillo-Román <i>et al.</i> (2013) Reina <i>et al.</i> (2012)	NT
Derivados de geissospermidina: (R= CH₃, R₁=R₂=H) (47) (R= CH₃, R₁=H, R₂=OCH₃) (48) (R= CH₂CH₂CH₃, R₁=R₂=H) (49) (R= CH₃, R₁=OCH₃, R₂=H) (50)	<i>G. reticulatum</i> (cascas e folhas)	Reina <i>et al.</i> (2012) Gordillo-Román <i>et al.</i> (2013)	NT
geissosreticulatina (51)	<i>G. reticulatum</i> (cascas e folhas)	Reina <i>et al.</i> (2012)	NT

Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
 geissolaevina (52)	<i>G. laeve</i> (cascas)	Ramos <i>et al.</i> (2017)	CI ₅₀ = 74,2 µM Ramos <i>et al.</i> (2017)
 <i>O</i>-metilgeissolaevine (53)	<i>G. laeve</i> (cascas)	Ramos <i>et al.</i> (2017)	CI ₅₀ = 56,0 µM Ramos <i>et al.</i> (2017)
 3',4',5',6'-tetradiidrogeissospermina (54)	<i>G. laeve</i> (cascas)	Ramos <i>et al.</i> (2017)	CI ₅₀ = 2,9 µM Ramos <i>et al.</i> (2017)
 leuconolam (55)	<i>G. laeve</i> (cascas)	Ramos <i>et al.</i> (2017)	CI ₅₀ > 100 µM Ramos <i>et al.</i> (2017)

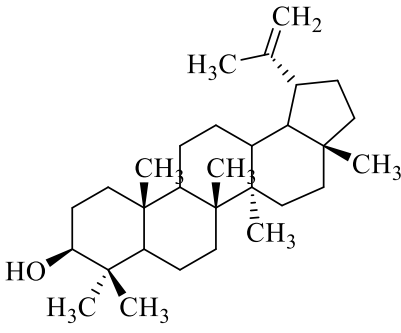
Quadro 1: Alcaloides isolados em *Geissospermum* spp. e atividade antimalária (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmódica
 4-N-metil-acuamicina (56)	<i>G. urceolatum</i> (cascas)	Oliveira. (2018)	CI ₅₀ = 80,4 µM Oliveira. (2018)

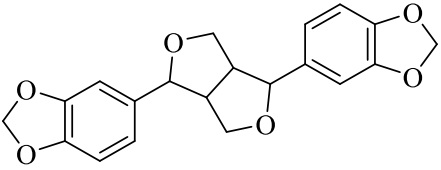
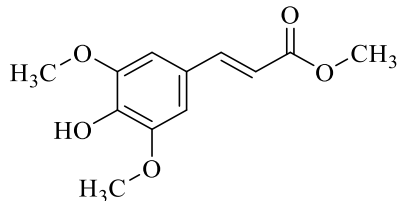
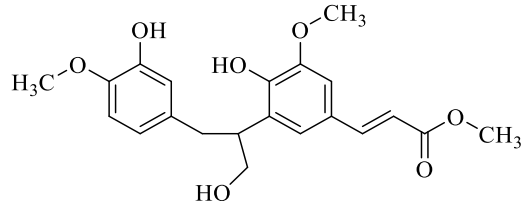
NT: não testado

Além de alcaloides outras substâncias já foram isoladas de *Geissospermum* spp. Dias (2012) realizou estudos com cascas de *G. vellosii*, isolando um triterpeno, o lupeol (**57**) e uma lignana, a sesamina (**58**). Oliveira (2018) isolou de cascas de *G. urceolatum* um fenil propanoide, o sinapato de metila (**59**) e a substância lignoídica 3- [4-hidroxi-3-[2-hidroxi-1- [3-[(3-hidroxi-4-metoxifenil) metil] etil] -5-metoxifenil-2-propenoato de metila (**60**) (Quadro 2). Dessas substâncias apenas o sinapato de metila foi testado para atividade antiplasmódica.

Quadro 2: Outras substâncias isoladas de *Geissospermum* spp.

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmódica
 Lupeol (57)	<i>G. vellosii</i> Cascas	Dias (2012)	NT

Quadro 2: Outras substâncias isoladas de *Geissospermum* spp. (continuação).

Estrutura/nome da substância	Espécie e parte da planta	Isolamento	Atividade antiplasmodica
 Sesamina (58)	<i>G. vellosii</i> Casca	Dias (2012)	NT
 sinapato de metila (59)	<i>G. urceolatum</i> (casca)	Oliveira (2018)	CI ₅₀ = 102,8 µM Oliveira (2018)
 Dímero de fenilpropanoides 60	<i>G. urceolatum</i> (casca)	Oliveira (2018)	Oliveira (2018) NT

NT: não testado

2.3.2 Etnobotânica e etnofarmacologia de extratos e alcaloides de *Geissospermum* spp.

Geissospermum spp. recebem nomes populares diversos, de acordo com a região, tais como: pau-pereira, quinarana, quina-quina, acari, acariquara, acariquara branca, entre outros (LORENZI, 2002).

O gênero *Geissospermum* começou a ser explorado quimicamente no final do século XIX, apenas no Brasil, mas por pesquisadores europeus. A primeira espécie do gênero a ser investigada foi *G. vellosii* Allemão conhecida popularmente como pau-pereira. Esta última foi considerada por Gustavo Peckolt (1861-1923) uma das dez plantas medicinais brasileiras mais importantes. É utilizada no tratamento de febres, falta de apetite, má digestão, tontura, prisão de ventre e malária, sendo que a sua ação curativa era associada ao seu gosto amargo (SANTOS *et al.*, 1998).

Existe variação a qualidade e falsificação de pau-pereira. No Rio de Janeiro foi realizado um estudo comparando 15 amostras de pau-pereira (*G. vellosii*) obtidas em feiras livres, lojas de ervas e sites da internet para verificar a ocorrência de falsificações. As comparações foram baseadas em análises anatômicas e no conteúdo total de alcaloides, principalmente no rastreamento da flavopereirina (28), sendo que dessas amostras, seis foram consideradas falsas (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Giorgetti e colaboradores (2011) realizaram um estudo sobre plantas nativas do Brasil do século XVI ao XIX associadas à possível ação no sistema nervoso central (SNC) e um dos trabalhos relacionados aponta inibição da captura de serotonina por alcaloides de *G. laeve* (BARROS *et al.*, 2006).

Estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos têm apontado muitas atividades biológicas para espécies desse gênero as quais estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3: Atividade biológica de *Geissospermum* spp.

Espécie	Atividade biológica	Fonte
<i>G. argenteum</i>	Antimicrobiana, antifúngica (<i>in vitro</i>), antiplasmódica (<i>in vitro</i>)	Correia <i>et al.</i> , 2008; Camargo, 2012
	Aumento do inotropismo cardíaco	Morais, 2012
<i>G. sericeum</i>	Malária e abortivo Antileishmania	Milliken, 1997 Silva e Silva, 2016
<i>G. urceolatum</i>	Efeitos sobre pressão arterial	Martins, 2010
	Atividade antiplasmódica	Oliveira, 2018
<i>G. vellosii</i>	Atividade anticolinesterásica (nome citado: <i>G. laeve</i> (sinonímia))	Lima <i>et al.</i> , 2009
	Problemas hepáticos, febre, desordens estomacais, constipação, falta de apetite indigestão, estimulante sexual, malária e tratamento da dor, bloqueador neuromuscular, agente anticolinesterásico, antinociceptivo, hipotensivo, antileishmania e antiinflamatório.	Brito; Brito, 1993; Muñoz <i>et al.</i> , 2000; Jácome <i>et al.</i> , 2003; Werner <i>et al.</i> , 2009; Lima <i>et al.</i> , 2016; Silva e Silva, 2016.

2.3.2.1 Atividade antimalárica de extratos e alcaloides de *Geissospermum* spp.

Em estudo sobre plantas antimaláricas utilizadas em Roraima Milliken (1997) relatou o uso de *G. sericeum* Benth. e Hook., que é comum em florestas de algumas localidades desse estado. Um dos mais relevantes usos de espécies de *Geissospermum* encontrado na literatura foi no tratamento da malária. Brandão *et al.* (1992) realizaram levantamento de plantas usadas como antimaláricas na Amazônia e entre elas foi coletada *G. sericeum* Benth. e Hook., cujo extrato de cascas, preparados através de decocção, não foi ativo em testes *in vivo* contra *P. berghei* em roedores na dose de 1 g/kg de peso do animal.

Steele *et al.* (2002) realizaram testes antiplasmódicos *in vitro* com extratos hidroalcoólicos (MeOH: H₂O; 9:1) obtidos da casca de *G. sericeum* e com substâncias isoladas. Os resultados obtidos foram: 1) para extrato bruto, CI₅₀ de $1,78 \pm 0,047$ µg/mL (ativo), testado somente na cepa K1 de *P. falciparum*; 2) para geissosquizolina (26, Quadro 1) e 4-*N*-óxido geissosquizolina (42), CI₅₀ > 40 µM (inativo), 3) para as cepas K1 e T9-96 de *P. falciparum*; para 1,2-diidrogeissosquizolina (43) CI₅₀ de $27,26 \pm 10,9$ µM frente à cepa K1 de *P. falciparum* (inativa) e $35,37 \pm 2,36$ µM frente à cepa T9-96 de *P. falciparum* (inativa); 4) para flavopereirina (28) foi obtido CI₅₀ = $11,53 \pm 0,54$ µM frente à cepa K1 de *P. falciparum* (moderadamente ativa) e $1,83 \pm 0,10$ µM frente à cepa T9-96 de *P. falciparum* (ativa).

Um estudo etnofarmacológico sobre a atividade antimalárica envolvendo trinta espécies de plantas tradicionais foi realizado entre os índios Chacobo (Bolívia). Nesta pesquisa a atividade antimalárica foi testada *in vitro* e *in vivo*. Entre as plantas testadas *G. laeve* apresentou boa atividade antimalárica, com CI₅₀ = 3,1 µg/mL frente à cepa F32 (sensível à cloroquina) de *P. falciparum* e 2 µg/mL para a cepa Indo de *P. falciparum* (resistente à cloroquina) porém nos testes *in vivo* contra *P. berghei* em roedores foi inativo (MUÑOZ *et al.*, 2000).

Estudo etnofarmacológico foi realizado na Guiana Francesa, nordeste da América do Sul, o qual apontou o uso frequente de preparações tradicionais obtidas de 34 espécies vegetais utilizadas no tratamento da malária, entre elas, *Geissospermum sericeum* e *G. laeve*, que foram citadas como plantas usadas na prevenção da malária, sendo preparadas utilizando a parte interna das cascas através de maceração etanólica (VIGNERON *et al.*, 2005). Também na Guiana Francesa, foi realizado um estudo envolvendo preparações tradicionais utilizadas no tratamento da malária. Neste estudo extratos de cascas de *G. argenteum* preparados através de maceração etanólica foram

testados *in vivo* em roedores, na dose de 324 mg/kg de peso do animal, administradas via oral, onde verificou-se uma inibição de 44,3% frente a *P. yoelli* (BERTANI *et al.*, 2005).

Camargo (2012) realizou testes antiplasmódicos *in vitro* utilizando a cepa K1 de *P. falciparum*, de extratos e frações obtidas de cascas, folhas e galhos de *G. argenteum* coletadas em Roraima. Nesse estudo foram encontrados extratos e frações ativos. O extrato metanólico de folhas apresentou $CI_{50} = 6,9 \mu\text{g/mL}$, de galhos a $CI_{50} = 6,6 \mu\text{g/mL}$ e de cascas = $4,6 \mu\text{g/mL}$. A fração clorofórmica de cascas apresentou $CI_{50} = 2,0 \mu\text{g/mL}$. Neste estudo não foi realizada avaliação da atividade antiplasmódica de substâncias químicas isoladas, seja *in vivo* ou *in vitro*.

Oliveira (2018) realizou estudo biomonitorado para atividade antiplasmódica (Cepa K1) com extratos, frações e substâncias isoladas de *G. urceolatum*, obtendo extratos e frações ativos, além da substância aspidoscarpina (**41**) que apresentou $CI_{50} = 2,42 \mu\text{g/mL}$.

2.3.2.2 Atividade citotóxica e anticâncer de extratos e alcaloides de *Geissospermum* spp.

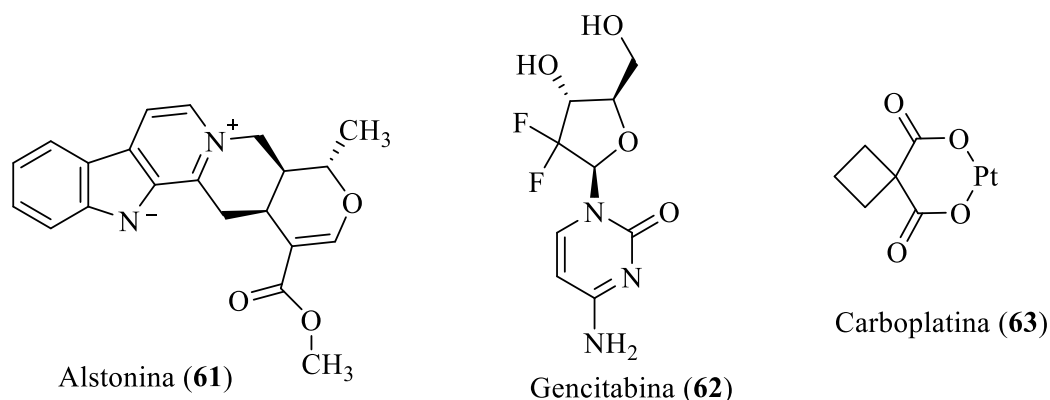
Uma fórmula composta de extrato de casca de pau-pereira (*G. vellosii*) e extrato de *Rauwolfia vomitoria* Afzel (Apocynaceae) foi desenvolvida para a prevenção e tratamento do câncer de próstata. Este fitoterápico contém a flavopereirina (**28**) de pau-pereira e o alcalóide alstonina (**61**) de *R. vomitoria*. Esses alcalóides apresentam diferentes mecanismos de ação na prevenção e controle do câncer. O mecanismo de ação dessa formulação natural é baseado na indução da apoptose (morte celular programada). Em doses de formulação adequadas, o mecanismo é seletivo para células neoplásicas. Este medicamento parece reduzir os níveis de PSA (antígeno específico da próstata), um importante marcador metabólico para esse tipo de câncer, além de atenuar os sintomas, como a hiperplasia prostática benigna (HALL & BELJANSKI, 2005).

Um estudo avaliou o potencial do extrato de pau-pereira contra o câncer pancreático *in vitro* e *in vivo* de forma isolada e em combinação com o quimioterápico gencitabina (**62**, Figura 14). Extrato de pau-pereira induziu apoptose dose/tempo dependente em todas as linhagens celulares de câncer pancreático testadas. A combinação do extrato com o quimioterápico produziu efeito sinérgico na inibição do crescimento celular (*in vitro*). Nos ensaios *in vivo* os camundongos com tumores foram tratados com extrato de pau pereira e/ou gencitabina (**62**, Figura 14). O tratamento somente com extrato inibiu o tumor em 70-72%, enquanto a gencitabina sozinha apresentou efeitos

inibitórios no tratamento, mas não ocorreu inibição em maior carga tumoral por período mais longo, nem em metástases no modelo animal (YU *et al.*, 2013).

O pau-pereira de *G. vellosii* Allemão) tem sido utilizado em preparações por pacientes oncológicos, assim foi realizado estudo para investigar os efeitos anticâncer do extrato rico em alcaloides β -carbolínicos de pau-pereira isoladamente no câncer de ovário em modelo pré-clínico. A combinação do extrato com o quimioterápico carboplatina (**63**, Figura 14) foi avaliada em ratos com câncer de ovário disseminado. O extrato inibiu seletivamente o crescimento de células tumorais de ovário e induziu a apoptose (dose e tempo dependente). Nos ensaios *in vivo* o extrato suprimiu o crescimento do tumor em 79% e reduziu a ascite em 55%. O extrato combinado com carboplatina inibiu o tumor em 97% e da ascite em 100% (YU & CHEN, 2014).

Figura 14: Substâncias avaliadas em ensaios antitumorais



Extratos de casca de *G. vellosii* (pau-pereira) ricos em alcaloides β -carbolínicos tem atividades anticâncer significativas em modelos pré-clínicos. Por isso, foram testados pré-clinicamente os efeitos *in vitro* e *in vivo* de um extrato de pau-pereira frente a uma linhagem celular de câncer de próstata humano, LNCaP. Quando o extrato de pau-pereira foi adicionado às células LNCaP cultivadas *in vitro*, suprimiu significativamente o crescimento celular do tumor em comparação com os controles (tumores em camundongos tratados com veículo), sendo que na dose de 500 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 90% do crescimento celular. Em ensaios *in vivo* a curva dose-resposta apresentou forma de U onde a dose mais alta (50 mg/kg/d) foi menos eficaz na indução da apoptose de células tumorais e na redução do volume tumoral, sendo que as doses de 10 e 20 mg/kg/peso reduziram o volume tumoral em 80 e 75%, respectivamente (BEMIS *et al.*, 2009).

Extratos de *G. vellosii* foram avaliados *in vitro* e *in vivo* frente a linhagem de células do câncer de próstata humano (LNCaP) e promoveram inibição de crescimento desta linhagem celular em cultura, além de induzir a apoptose (CHANG *et al.*, 2014). Em ensaios com linhagens celulares de câncer de pâncreas humano, pau-pereira inibiu a proliferação de células tumorais com CI_{50} variando de 125 a 325 $\mu\text{g/mL}$. Ensaios *in vivo* utilizando camundongos revelaram que extratos de pau-pereira, em dose de 20 mg/kg, 5×/semana, administrados através de gavagem, promoveram inibição de tumorigenicidade e de crescimento do tumor pancreático em dose e via que podem ser aplicadas em ensaios clínicos. Também não foram observados efeitos tóxicos. A inibição de tumorigenicidade pode indicar possível efeito preventivo de câncer (DONG *et al.*, 2018).

Dong *et al.* (2020) realizaram estudo onde extrato de pau pereira foi aplicado em células epiteliais de hiperplasia benigna de próstata (HBP) e em miofibroblastos de próstata (WPMY-1), sendo realizados testes de viabilidade, apoptose, além do perfil de expressão gênica. Nesse estudo verificou-se que o extrato induziu a apoptose em células humanas de HBP-1 pela regulação positiva de genes pró-apoptóticos e inibiu a sinalização de NF κ B (fator nuclear kappa B) associado à inflamação, assim este extrato pode ser um promissor fitoterápico para hiperplasia benigna de próstata.

Uma formulação de origem vegetal chamada de PB-100, composta por dois princípios ativos principais, flavopereirina (28) e diidroflavopereirina (29), foi testada em dezesseis linhagens de células tumorais e cinco linhagens de células normais e foi verificado que na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu inibição de 80 a 98% do crescimento destas células, ou seja PB-100 apresentou atividade anticancerígena *in vitro*. Observou-se que a inibição foi seletiva uma vez que 95% das células normais permaneceram viáveis. Ainda neste estudo estas substâncias foram sintetizadas e testadas, e na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ inibiram 95% do crescimento de células do glioblastoma humano, além apresentarem seletividade para células tumorais, uma vez que não afetaram a linhagem de células normais utilizadas como controle (BELJANSKI, 2000).

A flavopereirina (28) foi testada em células mamárias cancerosas onde foi verificada a inibição da síntese de DNA nestas células (BELJANSKI & BELJANSKI, 1982). Também foi realizado estudo para avaliar o potencial terapêutico da flavopereirina (28) em células de câncer colo retal (CCR) *in vitro* e *in vivo*, onde foi observado que esta substância reduziu a viabilidade celular, causando apoptose, além de reprimir o crescimento do xenoinxerto de células de CCR *in vivo* com regulação positiva de P53 e P21 (proteínas supressoras tumorais) (LI *et al.*, 2019).

2.3.2.3 Outras atividades farmacológicas de alcaloides encontrados em *Geissospermum* spp.

A geissospermina (**23**) é considerada uma das principais substâncias do gênero *Geissospermum*. Essa substância foi estudada para determinar sua ação sobre o sistema nervoso, sistema cardiovascular, glândulas genitais e endócrinas, musculatura lisa, secreções urinárias e biliares em camundongos e ratos. Foi verificado que a geissospermina tem ação sedativa, reduzindo motilidade, tonicidade muscular, equilíbrio reflexo, temperatura e metabolismo basal (AUROUSSEAU, 1961a). A ação da geissospermina também foi avaliada em coelhos, sendo observada atividade depressora do sistema nervoso central e autônomo, redução da magnitude das contrações cardíacas e o tônus da musculatura lisa do duodeno (AUROUSSEAU, 1961b).

Quatro alcaloides indólicos isolados de *G. vellosii*, a geissosquizolina (**26**), a geissosquizona (**35**), a geissospermina (**23**) e a 3', 4', 5', 6'-tetraidrogeissospermina (**54**), foram avaliados quanto à atividade anticolinesterásica. A geissospermina inibiu apenas a butiricolinesterase (BChE), enquanto os demais alcaloides foram inibidores não-seletivos, pois inibiram a acetilcolinesterase (AChE) e butiricolinesterase (BChE). Quanto aos testes de viabilidade celular apenas a geissosquizolina não foi citotóxica, sendo avaliada em colinesterases humanas apresentando $CI_{50} = 10,21 \pm 0,01$ mM, enquanto hAChE apresentou $CI_{50} = 20,40 \pm 0,93$ mM. Estudos de *docking* molecular apontaram interações da geissosquizolina com o sítio ativo e com o sítio aniônico periférico de hAChE e hBChE, indicando um perfil de inibição de duplo sítio. Também foi verificado que esta substância apresentou uma importante ação anti-inflamatória. Estas ações indicam que o alcaloide geissosquizolina tem um caráter neuro protetor e sua capacidade inibitória de hAChE e hBChE o tornam um potencial agente terapêutico para Doença de Alzheimer (LIMA *et al.*, 2020).

Também foi desenvolvida uma composição farmacêutica contendo como único princípio ativo a flavopereirina (**28**) para o tratamento de infecções virais, inclusive as causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A composição apresentou-se como um sólido contendo de 250 a 500 mg do princípio ativo flavopereirina (BELJANSKI, 1994; BELJANSKI, 2005).

2.4 *Geissospermum argenteum* Woodson (1939: 207)

G. argenteum Woodson é nativa, distribuindo-se pela região Norte, principalmente nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e nas Guianas (FORZZA, 2010; BARBOSA *et al.*, 2019). Segundo Ribeiro *et al.* (1999) esta espécie compreende árvores de dossel que podem ter entre 15 e 22 m de altura, com folhas discolors, ovais ou elípticas e reticulação inconspícua encoberta por pelos prateados e dourados, com a base da folha assimétrica. O período de floração ocorre de julho a novembro, enquanto a frutificação de dezembro a fevereiro. *G. argenteum* é morfologicamente semelhante *G. sericeum*, entretanto apresenta diferenças tais como: lâminas foliares discolors (*G. argenteum*) e concolores (*G. sericeum*) e fruto elipsoide, mas redondo no ápice (*G. argenteum*) enquanto em *G. sericeum* ele é ovoide e agudo no ápice. No Brasil é conhecida popularmente como: quinarana, uma das quinas falsas (RIBEIRO *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2019).

2.5 *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (1984: 1078)

Esta espécie também já foi chamada de pau-pereira, porém na região norte é conhecida como acariquara branca. É uma árvore cuja distribuição foi descrita no Brasil, principalmente nos estados do Amazonas e Pará e na Bolívia. Esta espécie compreende árvores de 15 a 18 m de altura, com ramos castanhos, ligeiramente sulcados, lâminas foliares elípticas com folhas concolores (coloração uniforme), flores urceoladas e frutos elipsoides. Foi observado que o período de floração ocorre de junho a setembro, enquanto a frutificação se dá janeiro a março (BARBOSA *et al.*, 2019). Possui látex branco, pilosidade nos ramos e ocorre em floresta ombrófila (BARBOSA & SIMÕES, 2020). Assim como outras espécies do gênero apresenta gosto amargo, sendo por isso utilizada para doenças do fígado, malária entre outras doenças (MUÑOZ *et al.*, 2000).

2.6 QUIMIOMETRIA

A quimiometria foi assim denominada por Svante Wold em 1972 e pode ser definida como a utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos de forma a obter maior quantidade de informações e resultados analíticos, sendo que seus principais

objetivos são classificar e agrupar amostras (ESBENSEN & GELADI, 1990; WINNING *et al.*, 2008).

Para Ferreira (2015) a quimiometria pode ser definida como uma ciência interdisciplinar, uma área da química que utiliza métodos das áreas de matemática, estatística e lógica para planejar e/ou selecionar experimentos, assim como extrair o máximo de informação química através da análise dos dados. Os objetivos da quimiometria são realizar otimização de experimentos, calibração, classificação de dados, resolução de curvas e análises exploratórias. A quimiometria foi dividida de acordo com sua aplicação em: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada e métodos de inteligência artificial (BARROS NETO *et al.*, 2006).

O uso da análise de dados multivariados tem se difundido tanto na química quanto em outras áreas científicas. Tais análises em química são utilizadas para planejar, selecionar procedimentos, extrair informações químicas a partir das análises dos dados, bem como realizar a aquisição de conhecimentos sobre os sistemas estudados. A utilização da análise multivariada visa reduzir a representação dimensional dos dados colocando-os numa estrutura que facilite a visualização de todo o conjunto de dados (BARROS NETO *et al.*, 2006). As técnicas de análise multivariada mais utilizadas são: análises de agrupamento hierárquico (AAH) ou dendrograma e análise de componentes principais (ACP) (PANERO *et al.*, 2009).

Os métodos de reconhecimento de padrões, como AAH e ACP permitem agrupar objetos de uma mesma categoria conforme a similaridade existente entre eles, sendo um dos mais utilizados em química, onde a estrutura dos dados une as amostras por suas associações, apresentando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados. Através do agrupamento hierárquico de dados multidimensionais é possível verificar as similaridades através da distância euclidiana (BARROS NETO *et al.*, 2006; CORREIA & FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015).

O reconhecimento de padrões e a análise de agrupamentos hierárquicos são realizados através de softwares. Assim foi desenvolvido um software para realizar a análise multivariada com interface gráfica voltado para pesquisadores, professores e estudantes com interesse em quimiometria chamado *Chemoface*, o qual possui módulos capazes de resolver problemas relacionados com planejamento experimental, reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada (BARROS NETO *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos sobre a composição química de *Geissospermum argenteum* Woodson e *G. urceolatum* A. H. Gentry e avaliar o potencial antiplasmódico e a citotoxicidade em células normais dos seus extratos e das substâncias isoladas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de extratos e substâncias isoladas contra *Plasmodium falciparum* (cepa K1);
- Avaliar a citotoxicidade (viabilidade celular) *in vitro* frente a fibroblastos humanos (MRC-5) de substâncias isoladas;
- Analisar os extratos biologicamente ativos por CL-EM e CLAE;
- Realizar análises quimiométricas multivariadas (AAH e ACP) dos conjuntos de dados obtidos por IES-EM(AR) dos extratos de *G. argenteum*;
- Isolar substâncias químicas ativas presentes nos extratos de *G. argenteum* e *G. urceolatum*, ativos *in vitro* contra *P. falciparum*;
- Elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos (RMN 1D/2D e EM(AR)/EM);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM), no laboratório de cultura de plasmódio (Laboratório de Malária e Dengue) e com apoio da Central Analítica do Laboratório de Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN), todos no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) experimentos foram realizados no Laboratório de Cromatografia Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica Multidisciplinar (CAM) e no laboratório de cultura de células tumorais e sadias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) coordenado pela Dra. Marne Carvalho de Vasconcelos.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica marca Ohaus, modelo AY220;
- Balança analítica marca Shimadzu, modelo AY220;
- Banho de ultrassom marca Unique, modelo USC-1800 A;
- Banho-Maria marca Nova Ética;
- Capela de fluxo laminar marca Esco;
- Centrífuga marca Quimis;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE): Marca Shimadzu, modelo LC-6AD;
- Estufa para cultura marca Eletrolab, modelo EL 101/3;
- Estufa de secagem e esterilização marca Famem, modelo 320-SE;
- Lâmpada UV marca Chromato-Vue Carbinet, modelo CC-10 (ondas longas 365 nm e ondas curtas 254 nm);
- Liofilizador marca Terroni, modelo LS30000;
- Manta aquecedora marca Fisatom, modelo 752 A;
- Microscópio óptico binocular marca Zeiss, modelo Primo Star;
- Microscópio óptico marca Zeiss, modelo Axio Scope A1;
- Modelo molecular poliédrico HGS, Mauruzen Co. Ltd;

- Moinho de 4 facas marca Marconi, modelo MA 340;
- Rotaevaporador marca Fisatom, modelo 804.

- CA-LTQPN

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) (300 MHz) marca Bruker módulo Fourier 300, de 7.0 Tesla, sonda 5mm DUL ^{13}C - ^1H /DZ-GRD Z 111650/0082;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (CL-EM). CLAE, marca Shimadzu modelo LC-20AD, EM marca Bruker Daltonics, modelo AMAZON SPEED com analisador do tipo *ion trap* e fonte e de ionização por *electrospray* IES;
- Espectrômetro de massas marca Bruker Daltonics, modelo MicroTOF-QII;

- LABCHEM-CA

- Espectrômetro de massas marca Bruker Daltonics, modelo LCQ Fleet® com analisador *ion trap* e IES.

4.1.2 Solventes e reveladores

Todos os procedimentos foram realizados utilizando solventes grau P.A., os quais foram submetidos à destilação prévia e os utilizados na cromatografia líquida e espectrometria de massas foram grau CLAE da marca Tedia. Na ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizados solventes deuterados da marca Merck. As placas de CCD foram iluminadas com luz ultravioleta - UV (254 e 365 nm) e reveladas com reagente Dragendorff e anisaldeído/ Δ .

4.2 ASSUNTOS REGULATÓRIOS/CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

O presente estudo foi inscrito no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob nº 68390-1 (*G. argenteum*) e nº 45103-2 (*G. urceolatum*).

O conhecimento tradicional acumulado por povos indígenas, comunidades, entre outros, durante a sua existência, o qual foi transmitido através das gerações passou a ser reconhecido através da lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, conhecida como a Lei da Biodiversidade, e

regulamentada pelo Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. A nova legislação regulamenta o acesso ao patrimônio genético (PG), ao conhecimento tradicional associado (CTA) e à repartição de benefícios no Brasil para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.

Em respeito e consideração ao acima exposto foi necessário estabelecer contato com as associações de remanescentes de quilombos do Rio Trombetas (Associação Remanescentes de Quilombo, Município de Oriximiná/PA) através de seus representantes, cujo resultado foi a assinatura do termo de anuência necessária para a realização deste estudo pelos representantes da Associação de Comunidades Remanescentes de Quilombos do Município de Oriximiná (ARQMO), o qual também visa assegurar as futuras pesquisas do LAPAAM/INPA envolvendo o CTA das Comunidades Tradicionais Quilombolas da bacia do Rio Trombetas, uma vez que estas são reconhecidas como detentoras de conhecimento tradicional associado (CTA) identificável sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de malária (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O presente trabalho está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) que é uma plataforma eletrônica de cadastramento obrigatório de todas as pesquisas, experimentais ou teóricas, realizadas com patrimônio genético brasileiro, sendo que este se refere a todo uso ou informação que tem origem em espécies biológicas, sejam elas animais, plantas, micro-organismos, bem como as substâncias derivadas destas espécies. Este sistema tem por objetivos regular: a exploração comercial e a pesquisa acadêmica ou empresarial sobre o patrimônio genético brasileiro; a concessão de patentes envolvendo substâncias obtidas da flora e fauna e o envio destas para o exterior. O processo de regularização de 2000 a 2015 está cadastrado no SisGen sob o código A16AC9C e o estudo da atividade antimalárica de espécies com CTA dos remanescentes de quilombos de Oriximiná está cadastrado com o número A11C513 (BRASIL, 2020c).

4.3 MÉTODOS

Neste trabalho foi realizado estudo de duas espécies de Apocynaceae: *Geissospermum argenteum* Woodson e *G. urceolatum* A. H. Gentry. Para ambas as espécies foi realizado um estudo sobre a composição química e atividade antimalárica e citotóxica. Somente para *G. argenteum* foi realizada uma análise quimiométrica de extratos de folhas, galhos (lenho) e cascas (sete diferentes

extrações para cada parte da planta). Para a espécie *G. urceolatum* o estudo quimiométrico foi realizado na tese de doutorado apresentada por Bruna de Oliveira em 2018. Dessa forma, o presente trabalho continuou, complementou e ampliou a informação sobre a composição química e a atividade biológica, com isolamento de outras substâncias, além daquelas isoladas anteriormente.

4.3.1 Análises cromatográficas

4.3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises químicas iniciais dos extratos foram realizadas empregando-se cromatoplasmas com suporte de alumínio com camadas de sílica gel e espessura de 0,25 mm com indicador de fluorescência F₂₅₄ da marca Merck. As amostras foram eluídas com solventes escolhidos em diferentes proporções de acordo com a polaridade das amostras.

Para a CCD os extratos foram pesados e dissolvidos a uma concentração de 1 mg/mL em MeOH. Aproximadamente 10 µL da solução foi aplicada em placa de sílica gel 60 F₂₅₄, a qual foi eluída utilizando-se diversos sistemas de fases móveis buscando definir o melhor sistema para obter o perfil químico dos extratos. Os melhores resultados foram obtidos com misturas de: acetato de etila: água: ácido fórmico: ácido acético (6,7:1,8:0,75:0,75). As placas de CCD eluídas foram iluminadas com UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. Finalmente, as placas foram reveladas com anisaldeído para obter uma visão geral do perfil cromatográfico da amostra e reagente Dragendorff, para verificar a presença de alcaloides.

Para preparar o reagente *p*-anisaldeído/ácido sulfúrico misturaram-se na seguinte ordem: 0,5 mL de *p*-anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e por último 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, o reagente foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (2-8°C) (WAGNER *et al.*, 1984).

O reagente de Dragendorff foi preparado de acordo com Wagner *et al.* (1984). Solução A: 0,850 g de subnitrito de bismuto, 10,0 mL de ácido acético e 40,0 mL de água destilada. Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio em 20,0 mL de água destilada. As soluções foram combinadas, na proporção de 1:1, resultando numa solução estoque. Para pulverização nas placas cromatográficas diluiu-se 2,0 mL de solução estoque com 4,0 mL de ácido acético glacial e 20,0 mL de água destilada.

4.3.1.2 Cromatografia em coluna (CC)

O fracionamento dos extratos em coluna cromatográfica foi realizado utilizando-se as seguintes fases estacionárias: sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) Merck; RP18 (40 – 63 µm) Merck; sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) Merck, impregnada com acetato de sódio.

4.3.1.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-P)

As placas de CCD-P foram preparadas com sílica gel (15 g para cada placa) com indicador de fluorescência (F₂₅₄) (Merck). A sílica foi suspensa em água destilada até a formação de um gel viscoso uniforme (com auxílio de ultrassom) e aplicadas manualmente em placas de 20 × 20 cm. Em seguida, foi colocada na posição horizontal para secar à temperatura ambiente por 24 h. Antes da sua utilização as placas foram ativadas na estufa a 90 °C por aproximadamente 12 h. Também foram utilizadas placas da Merck TLC sílica gel 60 (glass plates 20 × 20 cm).

4.3.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas no LAPAAM-INPA e no LABCEM-CAM-UFAM, seguida de análise em coluna semi-preparativa, em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Shimadzu, modelo LC-6AD, com detector ultravioleta (UV) SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µL).

4.3.2 Métodos espectrométricos

4.3.2.1 Espectrometria de massas (EM)

As análises foram realizadas no LABCEM-CAM-UFAM, sendo que os espectros foram obtidos em equipamento do tipo *ion-trap*, modelo LCQ Fleet® (Thermo Scientific), com fonte de ionização por IES, voltagem e a temperatura do capilar em IES: 20,0 V e 200 °C, respectivamente. Voltagem do *spray*: 5,0 kV, sendo este operado em modo positivo e dissociação por colisão

induzida (DCI) de 25-28%. Gás nebulizador e gás de secagem: nitrogênio. No analisador utilizou-se o gás hélio como gás de fragmentação.

As análises dos espectros de massas das substâncias obtidas foram realizadas no CA-LTQPN-INPA no equipamento Marca Bruker Daltonics, modelo MicroTOF-QII, operando com fonte de IES em modo negativo e positivo. As amostras foram analisadas por infusão direta e por CL/EM.

4.3.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas na CA-LTQPN-INPA INPA, em um espectrômetro da marca Bruker modelo Fourier 300 (7,05 T), operando na frequência de 300 MHz (RMN ^1H) e 75 MHz (RMN ^{13}C). Foram obtidos espectros de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT 135) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY e J_{RES}). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS/Sigma-Aldrich) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em (Hz). Foi utilizado o programa TopSpin 4.0.9 para a manipulação e visualização dos espectros de RMN. As amostras foram dissolvidas em solventes deuterados: dimetilsulfóxido - d_6 - $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, clorofórmio - d (CDCl_3) e metanol- d_4 (CD_3OD).

4.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

4.4.1 *Geissospermum argenteum* Woodson

A coleta foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada na periferia da zona urbana de Manaus. Através do mapa de trilhas disponível no Herbário do INPA foi selecionada a árvore de *G. argenteum* de número 2105, na qual foi realizada a coleta, estando localizada no marco M582 (coordenadas: 02°55'40" S e 59°58'41" W e 85 m de altitude). Esse espécime foi identificado no Projeto Flora da Reserva Ducke (RIBEIRO *et al.*, 1999), sendo que a exsicata se encontra depositada no Herbário do INPA sob número 180466. O material vegetal (cascas, folhas e lenho de galhos) foi coletado em 31 de agosto de 2016.

4.4.2 *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry

O material vegetal (cascas e folhas) de *G. urceolatum* A. H. Gentry foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke em 28 de setembro de 2014 por Bruna de Oliveira. O indivíduo selecionado para a coleta foi identificado pelo número 3069, o qual está localizado no marco M581 (coordenadas: 02°55'57" S e 59°58'16" W e 62 m de altitude) do mapa de trilhas da Reserva Ducke (RIBEIRO *et al.*, 1999) e cuja exsicata está depositada no Herbário do INPA sob o número 181857.

4.5 SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL

As amostras de ambas as espécies foram processadas no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM/INPA). O material vegetal foi selecionado e as partes da planta foram colocadas separadamente em estufa com circulação de ar a 40 °C para secagem até peso constante. Após a secagem o material vegetal foi cortado em partes menores e em seguida triturado em moinho elétrico de quatro facas. As serragens obtidas foram armazenadas em sacos de papel e plástico, identificadas, pesadas e mantidas sob refrigeração até a extração.

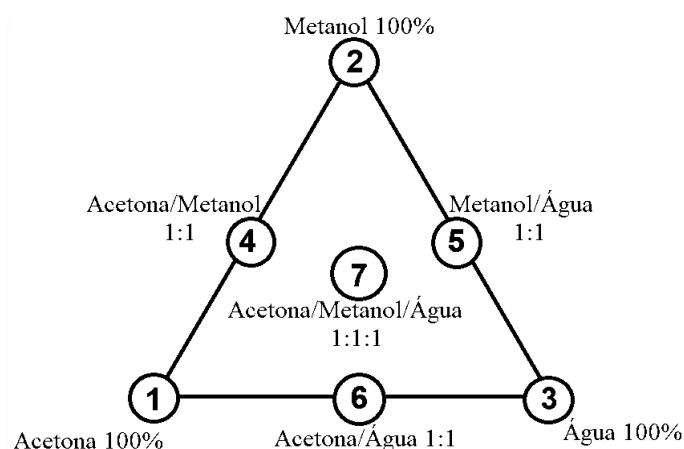
4.6 EXTRAÇÃO DE *G. argenteum* Woodson

4.6.1 Planejamento experimental simplex-centroide da extração em escala analítica

Inicialmente os extratos foram preparados através de um planejamento experimental denominado simplex-centroide com três componentes (três solventes): acetona, metanol e água, os quais foram selecionados utilizando como critério o princípio da seletividade de Snyder, onde a acetona é um solvente aprótico e metanol e água são solventes próticos, porém os álcoois são fortes doadores e aceptores de prótons, enquanto a água é um solvente caracterizado por ser forte doador de próton (SNYDER, 1974). Neste tipo de experimento os solventes foram utilizados de forma pura e em misturas binárias e ternárias. Assim, um experimento com três componentes é representado por um triângulo equilátero onde os vértices correspondem ao solvente puro, os pontos centrais das arestas indicam as misturas binárias, isto é, contém dois componentes em proporções iguais e o ponto central do triângulo corresponde à mistura dos três solventes

selecionados, totalizando o número máximo de sete (7) extrações (Figura 15). A soma da proporção de cada solvente é sempre igual a 1 (um), sendo que a proporção de cada solvente corresponde a uma variável do sistema (SCHEFFE, 1963).

Figura 15: Planejamento experimental com três componentes (simplex-centroide).



Através deste planejamento experimental foram preparados 7 (sete) extratos para cada parte da planta (cascas, folhas e lenho de galhos) para os quais foi calculado rendimento (%) apresentado na Tabela 1. Estes extratos também foram utilizados para a realização de ensaios biológicos (atividade antiplasmodica *in vitro*) descritos na seção 4.10.1 e para o estudo quimiométrico no qual os dados foram processados através da análise dos componentes principais (ACP) e análises de agrupamento hierárquico (AAH), os quais estão descritos na seção 2.6.

Vinte e um (21) extratos foram preparados pesando-se (em balança analítica) 1 g de material vegetal seco e triturado e adicionando-se 50 mL do solvente extrator de acordo com as composições do planejamento simplex-centroide (MeOH, acetona e H₂O). Os erlenmeyers contendo as amostras foram colocados em agitador o qual foi mantido em agitação por 6 h e seguido de maceração estática a temperatura ambiente por 48 h. Em seguida os extratos orgânicos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador e armazenados em frascos previamente pesados. Os frascos foram submetidos à evaporação em manta aquecedora (banho de areia) até a evaporação completa dos solventes e atingir peso constante. As amostras secas foram pesadas e armazenadas em freezer para posterior análise. Os extratos aquosos foram colocados em frascos previamente pesados e submetidos à liofilização. Após a liofilização os frascos foram novamente pesados para cálculo da

massa e congelados. Os extratos foram nomeados utilizando as iniciais E (extrato), *Ga* (*Geissospermum argenteum*), F (folhas), G (lenho de galhos), C (casca) seguidos do número que identifica o solvente ou sistema de solventes (1 – 100% MeOH; 2 – 100% acetona; 3 – 100% H₂O; 4 – MeOH e acetona 1:1; 5 – MeOH e H₂O 1:1; 6 – acetona e H₂O 1:1; 7 – MeOH, acetona e H₂O 1:1:1), sendo que os dados da preparação destes extratos estão descritos na Tabela 1. O rendimento dos extratos foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(100 \times \text{massa do extrato seco})}{\text{massa de material vegetal extraído}}$$

Tabela 1: Composição das misturas extratoras em termos de proporção e rendimento das extrações de *G. argenteum*.

Código	Solvente (% v/v)				Rendimento (%)		
Extrato	Parte	MeOH	Acetona	H ₂ O	Cascas	Folhas	Galhos
EGaF1	Folha	100	0	0	-	5,87	-
EGaF2		0	100	0	-	15,6	-
EGaF3		0	0	100	-	10,5	-
EGaF4		50,0	50,0	0	-	11,6	-
EGaF5		50,0	0	50,0	-	24,4	-
EGaF6		0	50,0	50,0	-	25,4	-
EGaF7		33,3	33,3	33,3	-	25,5	-
EGaG1	Galhos (Lenho)	100	0	0	-	-	3,48
EGaG2		0	100	0	-	-	13,4
EGaG3		0	0	100	-	-	6,47
EGaG4		50,0	50,0	0	-	-	10,2
EGaG5		50,0	0	50,0	-	-	15,9
EGaG6		0	50,0	50,0	-	-	15,1
EGaG7		33,3	33,3	33,3	-	-	15,2
EGaC1	Casca	100	0	0	1,20	-	-
EGaC2		0	100	0	5,40	-	-
EGaC3		0	0	100	2,50	-	-
EGaC4		50,0	50,0	0	4,00	-	-
EGaC5		50	0	50,0	7,00	-	-
EGaC6		0	50,0	50,0	6,80	-	-
EGaC7		33,3	33,3	33,3	6,90	-	-

Estes extratos foram utilizados para análises quimiométricas e ensaios biológicos antiplasmódicos, descritos mais abaixo na seção 4.10.1.

4.6.2 Extração em maior escala de *G. argenteum* Woodson

4.6.2.1 Extração aquosa de *G. argenteum* Woodson

Considerando o uso popular da espécie foi realizada extração aquosa de cascas, galhos e folhas pelo método de infusão, utilizando 10 g de material vegetal e 500 mL de água destilada. Após 15 minutos as infusões foram filtradas, congeladas e liofilizadas. Os extratos aquosos obtidos (Tabela 2) foram pesados para cálculo do rendimento e testados para a atividade antiplasmodica.

Tabela 2: Rendimento das infusões (chás) de *G. argenteum*

Código material vegetal	Parte	Massa material	Rendimento do extrato	
		vegetal (g)	Massa (g)	Teor (%)
EGaC	Cascas	10,0	0,64	6,40
EGaF	Folhas	10,0	2,51	25,1
EGaG	Galhos (lenho)	10,0	1,48	14,8

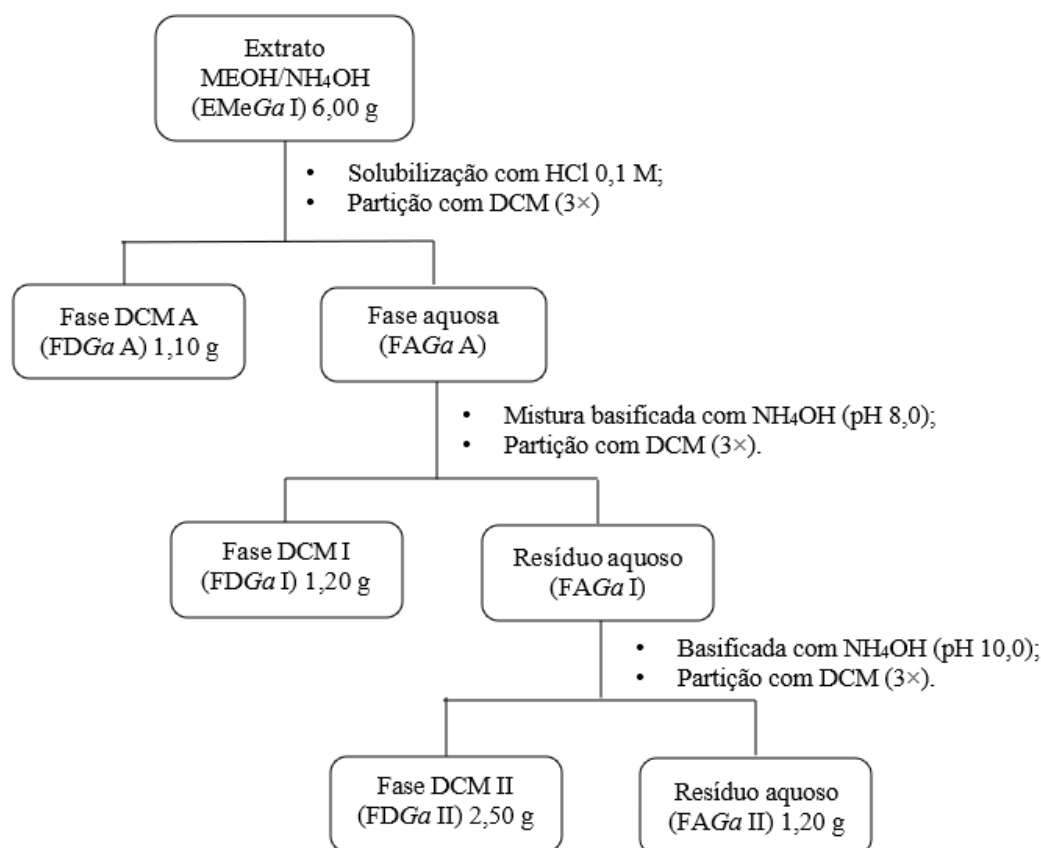
4.6.2.2 Extração metanólica

Considerando informações prévias obtidas através do referencial bibliográfico e as análises em CCD dos extratos produzidos em escala analítica, os quais foram positivos para alcaloides (Dragendorff), optou-se por realizar a extração descrita por Ramos *et al.* (2017) otimizada por Oliveira (2018) para direcionar o isolamento principalmente de alcaloides, na qual a serragem obtida de cascas (900 g) foi extraída com MeOH e solução de amônia (NH₄OH) a 3% (2.000 mL). O extrato foi preparado colocando-se a mistura por 60 minutos em banho de ultrassom seguido de maceração por três dias. Após esse período fez-se a filtração, concentração em rotaevaporador, e evaporação até peso constante em banho de areia e armazenamento em freezer. O mesmo material vegetal foi extraído por três vezes utilizando-se esse mesmo processo. Nesta extração obteve-se rendimento de 55,0 g de extrato bruto (EMeGa I) o que representa 6,1% baseando-se na massa de material vegetal extraído.

O extrato metanólico básico (EMeGa I) de casca de *G. argenteum* (6,00 g) foi particionado (Fluxograma 1) conforme procedimento descrito em Ramos *et al.* (2017), onde o extrato foi

dissolvido em ácido clorídrico 0,1 M (150 mL) e particionado com DCM (150 mL). A fração aquosa ácida foi basificada com hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 8 e extraída com DCM (3 × 150 mL), resultando em uma fração alcaloídica (FDGa I) e resíduo aquoso (FAGa I). Esse último foi basificado até pH 10 e particionado com DCM (3 × 150 mL), obtendo-se a segunda fração alcaloídica (FDGa II) e o resíduo aquoso (FAGa II).

Fluxograma 1: Partição líquido-líquido do extrato metanólico de cascas *G. argenteum* (EMeGa I).



4.7 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE *G. argenteum*

4.7.1 Fracionamento cromatográfico do extrato aquoso

A técnica de extração em fase sólida (EFS) foi introduzida para suprir as deficiências da extração líquido-líquido e tornou-se uma técnica muito empregada no preparo de amostras, sendo os seus principais objetivos: remoção de interferentes, extrair, concentrar e isolar analitos (JARDIM,

2010). De forma geral os procedimentos deste tipo de extração envolvem as seguintes etapas: ativação da fase estacionária para deixar os sítios ativos disponíveis, condicionamento da fase estacionária com solvente adequado com a finalidade de ajustar o solvente de eluição ao solvente da amostra, aplicação da amostra, limpeza da coluna para retirada dos interferentes, eluição da amostra e coleta do material de interesse (QUEIROZ *et al.*, 2001).

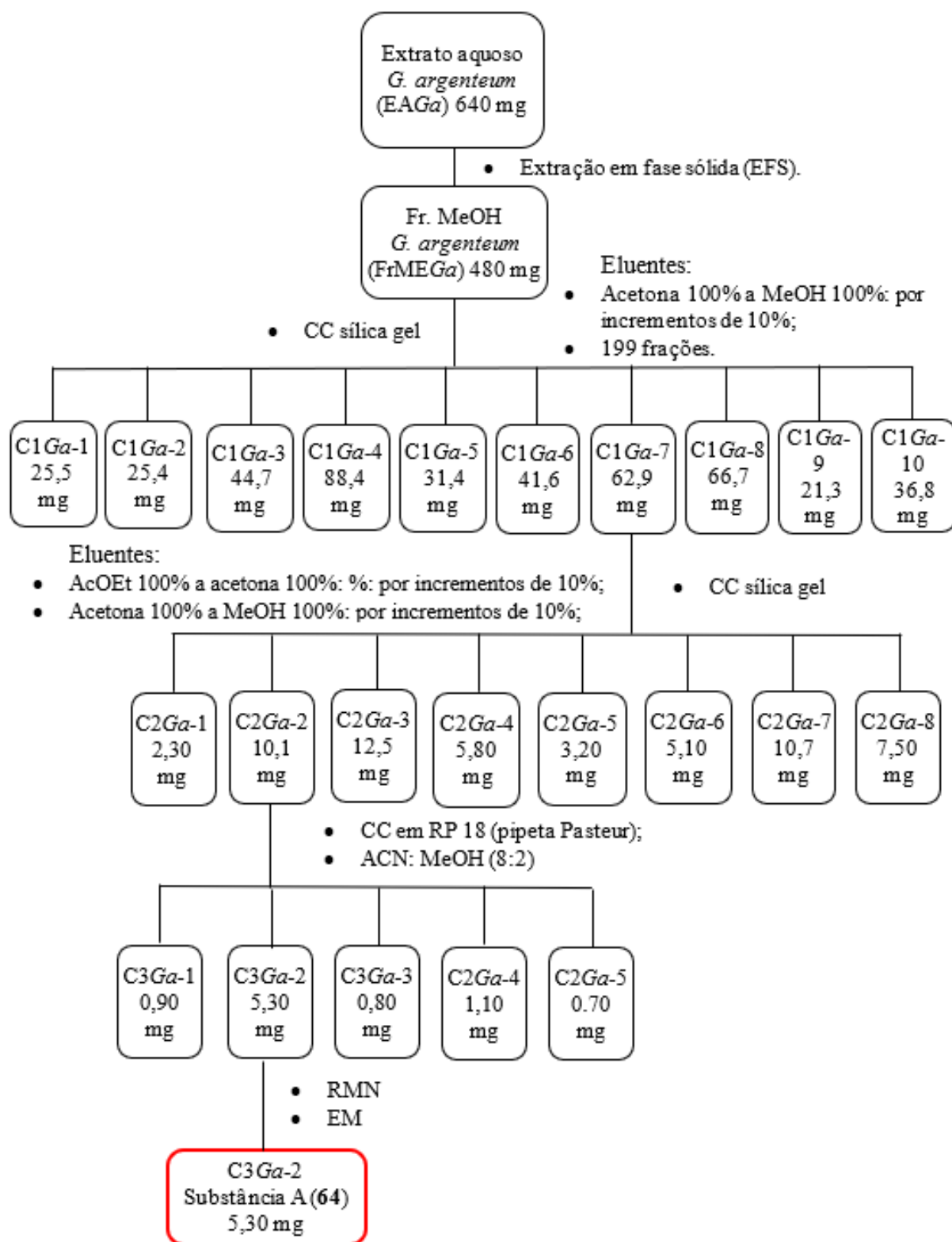
Uma alíquota de 640 mg de extrato aquoso seco (seção 4.6.2.1) obtido de cascas foi submetida previamente a EFS utilizando a sílica RP18 (40 – 63 μ m) da Merck como fase estacionária na proporção de 10 g de sílica para 1 g de amostra. A ativação da fase estacionária foi feita com MeOH (3 $\times$ 50 mL), seguida de condicionamento com água (3 $\times$ 50 mL) para posterior aplicação da amostra (700 mg dissolvida em água). A água também foi utilizada na remoção dos interferentes (3 $\times$ 50 mL) e a eluição foi realizada com MeOH (350 mL), obtendo-se 480 mg de fração metanólica seca após evaporação total dos solventes (Fluxograma 2).

A fração metanólica seca (480 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 2,0 \times 17$ cm), com sílica gel (0,063 – 0,200 mm) que foi previamente ativada em estufa a 100°C por 24 h. e empacotada com AcOEt. A amostra (480 mg) foi aplicada na coluna e eluída com gradiente de solventes de polaridade crescente (volume de 100 a 150 mL para cada aumento de polaridade), iniciando-se com AcOEt 100%, seguido de incrementos de 10% de acetona até acetona 100%, posteriormente acetona/MeOH (de 9:1 a 1:9 por incrementos de 10%), MeOH 100% e depois MeOH/H₂O (de 9:1 a 1:9 por incrementos de 10%) e H₂O 100%. Foram obtidas 199 subfrações com volume de 20 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas em 10 frações (Fluxograma 2).

A fração reunida 7 gerada no procedimento acima (62,9 mg) foi submetida à uma coluna ($\Phi \times h = 1,5 \times 12$ cm) também com sílica gel (0,063 – 0,200 mm) empacotada com AcOEt e eluída com um sistema gradiente iniciando com AcOEt 100%, AcOEt/acetona (de 9:1 a 1:9 por incrementos de 10%), acetona 100%, acetona/MeOH (de 9:1 a 1:9 por incrementos de 10%), MeOH 100% e MeOH/H₂O (de 9:1 a 1:9 por incrementos de 10%) (Fluxograma 2). As 32 subfrações com volume aproximado de 20 mL foram reunidas em 8 frações de acordo com o perfil apresentado em CCD.

A fração reunida 2 (C2Ga-2, 10,1 mg) foi eluída em uma coluna de sílica gel RP18 (40-63 μ m) Merck empacotada em uma pipeta de Pasteur e eluída com MeOH/ACN (8:2, 30 mL) (Fluxograma 2). Foram coletadas seis subfrações de 5 mL, sendo que as subfrações 2, 3 e 4, positivas para alcaloides (revelação com reagente de Dragendorff), após análise por CCD, foram reunidas (5,3 mg) e denominadas C1Ga-3, a qual foi analisada por RMN e EM, confirmando a substância A (**64**) de *G. argenteum*, cuja elucidação está descrita na seção 5.2.1.1.

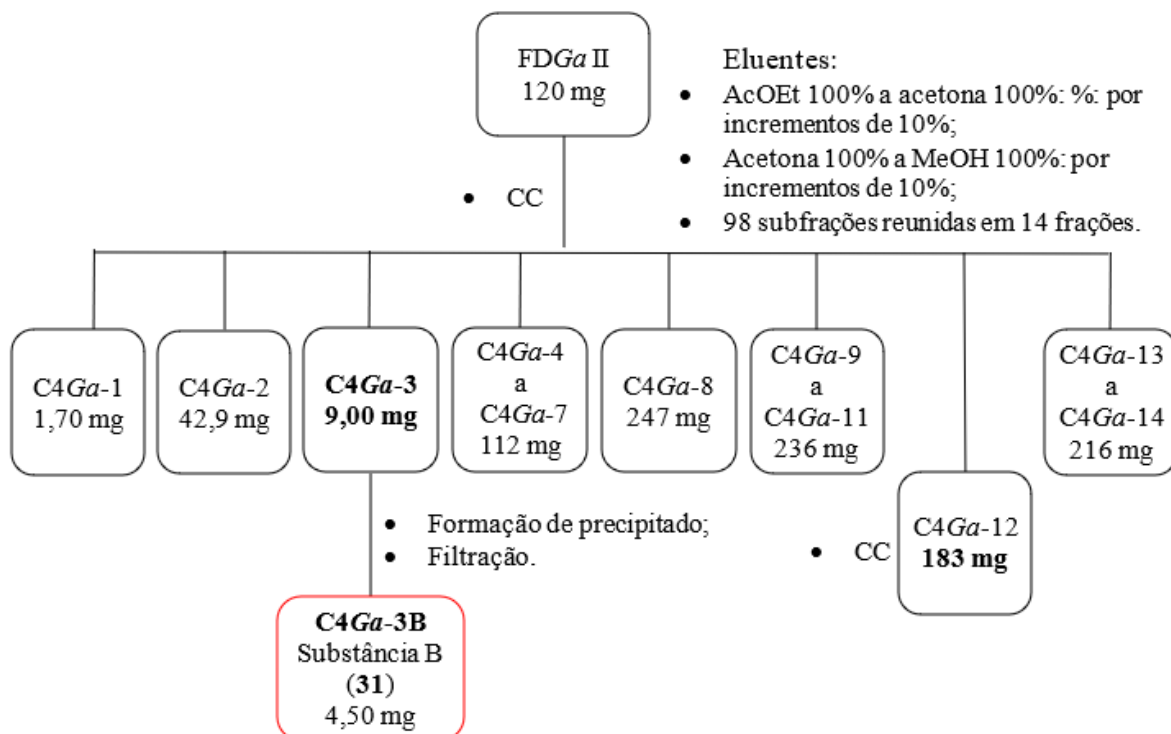
Fluxograma 2: Extração aquosa e fracionamento do extrato aquoso de *G. argenteum*.



4.7.2 Fracionamento cromatográfico da fração FDGa II

A fase DCM básica II - FDGa II (120 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 2,5 \times 27$ cm) com sílica gel (0,063 – 0,200 mm) utilizando como eluentes AcOEt, acetona e MeOH (Fluxograma 3). A coluna foi eluída com um sistema gradiente iniciando-se com AcOEt 100%, AcOEt/acetona (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), acetona 100%, acetona/MeOH (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), MeOH 100% e MeOH/H₂O (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9). Esta coluna resultou em 98 subfrações com volume de aproximadamente 30 mL. Estas frações foram reunidas conforme seu perfil cromatográfico em 14 subfrações. Na subfração reunida C4Ga-3 (9,0 mg) formou-se um precipitado que foi filtrado e seco (4,5 mg) e posteriormente analisado por RMN (Fluxograma 3) e EMAR, confirmando a substância B (31), descrita na seção 5.2.1.2.

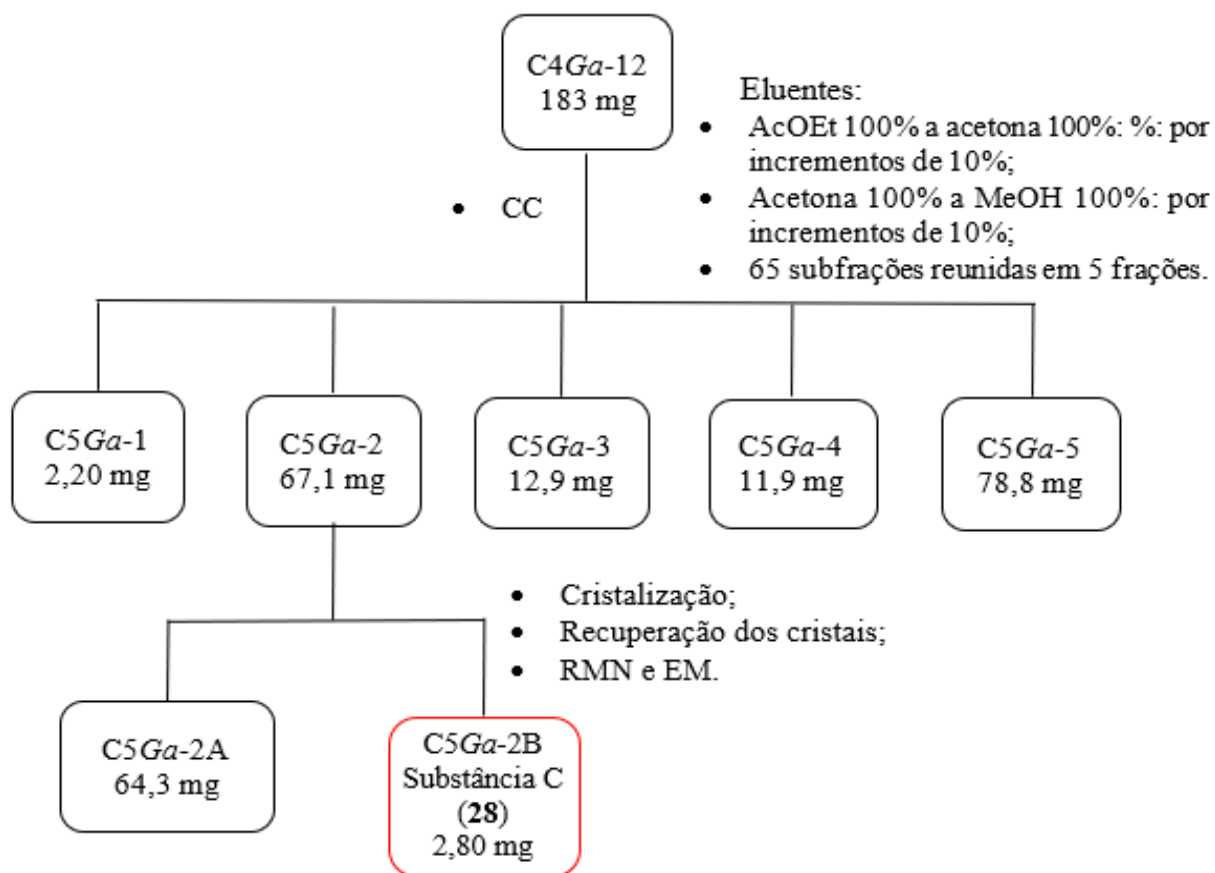
Fluxograma 3: Fracionamento da fração DCM II de *G. argenteum*.



Desta coluna foi selecionada a fração C4Ga-12 (183 mg) para mais uma separação em coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 2,0 \times 15$ cm) com sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm), empacotada

com hexano/AcOEt (1:1) e eluída com AcOEt 100%, AcOEt/acetona (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), acetona 100%, acetona/MeOH (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), MeOH 100% e MeOH/H₂O (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9). Nesta coluna foram obtidas 65 subfrações com volume de 15 mL, as quais foram reunidas em 5 frações conforme os perfis cromatográficos em CCD (Fluxograma 4). Durante a evaporação da fração reunida C5Ga-2 houve a formação de cristais, os quais foram submetidos a um processo de decantação e submetidos à CCD, a qual foi revelada por Dragendorff e posteriormente analisada por RMN e EM (C5Ga-2B – 2,80 mg), confirmando a substância C (**28**) descrita na seção 5.2.1.3.

Fluxograma 4: Fracionamento da fração C4Ga-12 de *G. argenteum*.



4.8 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE *G. urceolatum* A. H. GENTRY

Cascas de *G. urceolatum* foram submetidas apenas à extração metanólica seguida de partição inicial, utilizando o mesmo método utilizado para *G. argenteum* para posterior fracionamento cromatográfico.

4.8.1 Extração metanólica de *G. urceolatum*

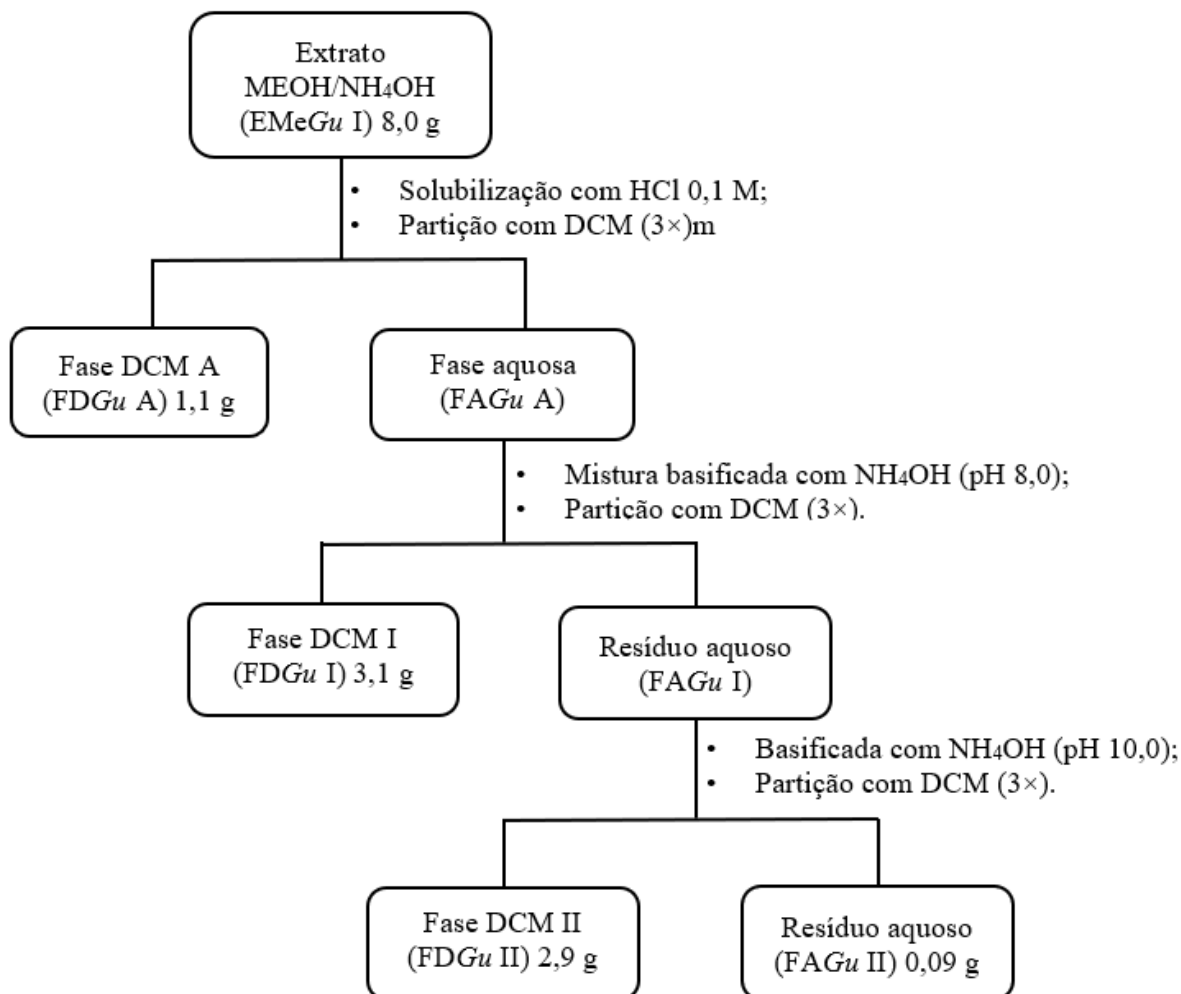
O estudo quimiométrico desta espécie foi realizado por Oliveira (2018) e não foi repetido no presente estudo. No trabalho de Oliveira (2018) verificou-se que a extração de cascas utilizando o solvente MeOH/ NH₄OH (1%) através de maceração por sete dias à temperatura ambiente foi a mais indicada pelo estudo quimiométrico e por ter apresentado melhor atividade antiplasmódica *in vitro* (CI₅₀ = 9,7 µg/mL no primeiro experimento e CI₅₀ = 5,15 µg/mL no segundo experimento) em ensaios realizados por Oliveira (2018).

Para *G. urceolatum* realizou-se o mesmo procedimento extrativo utilizado por Ramos *et al.* (2017) e otimizado por Oliveira (2018) e já utilizado em *G. argenteum* no presente estudo (Seção 4.6.2.2). Na extração de cascas de *G. urceolatum* foram obtidos 22,2 g de extrato bruto (EMeGu I) com rendimento de 5,31%.

4.8.2 Fracionamento de extratos de *G. urceolatum*

Uma alíquota do extrato metanólico básico (EMeGu I) de casca de *G. urceolatum* foi particionada segundo Ramos *et al.* (2017), onde o extrato foi dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 M (150 mL) e particionado com em DCM (150 mL). A fração aquosa ácida foi basificada com solução de amônia (NH₄OH) até pH 8 e extraída com DCM (3 × 150 mL), resultando em uma fase alcaloídica (FDGu I) e um resíduo aquoso (FAGu I). O processo foi repetido basificando até pH 10 (com NH₄OH), obtendo-se a fase alcaloídica II (FDGu II) e o resíduo aquoso II (FAGu II) (Fluxograma 5).

Fluxograma 5: Partição líquido-líquido do extrato metanólico de *G. urceolatum*.



4.8.2.1 Fracionamento cromatográfico de *G. urceolatum*

Posteriormente, uma alíquota de 1,45 g da fração alcaloídica FDGu I (3,10 g) foi fracionada em uma coluna cromatográfica (Φ : 2,5 cm, altura: 18,0 cm) empacotada com sílica gel 60 impregnada com AcONa (acetato de sódio) a 10% (Fluxograma 6). No preparo da sílica impregnada foram utilizados 200 g de sílica gel 60 e 20 g de AcONa o qual foi diluído em 50 mL de água. O AcONa diluído foi misturado à sílica gel 60, homogeneizado e colocado em estufa a 100°C para secar. Esta coluna foi eluída com um gradiente de polaridade crescente: hexano 100%, hexano/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), AcOEt 100%, AcOEt/acetona (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), acetona 100%, acetona/MeOH (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7,

2:8 e 1:9), MeOH 100% e MeOH/H₂O (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9), conforme apresentado no Fluxograma 6.

Nesta coluna foram obtidas 78 subfrações, as quais foram reunidas em 21 frações de acordo com o perfil apresentado em CCD.

Tabela 3: Frações obtidas da CC impregnada com AcONa aplicada à FDGu I (1,45 g) obtida do extrato de casca de *G. urceolatum*.

Frações	Dragendorff	Massa (mg)	Frações	Dragendorff	Massa (mg)
C1Gu-1	–	11,0	C1Gu-12	+	19,8
C1Gu-2	–	19,9	C1Gu-13	+	19,1
C1Gu-3 (substância D)	–	15,8	C1Gu-14	+	13,8
C1Gu-4	–	13,9	C1Gu-15	+	12,6
C1Gu-5	–	74,4	C1Gu-16	+	44,2
C1Gu-6	+	20,1	C1Gu-17	+	15,4
C1Gu-7	+	21,0	C1Gu-18	–	22,7
C1Gu-8	+	17,9	C1Gu-19	–	33,6
C1Gu-9	+	31,9	C1Gu-20	–	204,6
C1Gu-10	+	32,7	C1Gu-21	–	490,7
C1Gu-11	+	17,2			

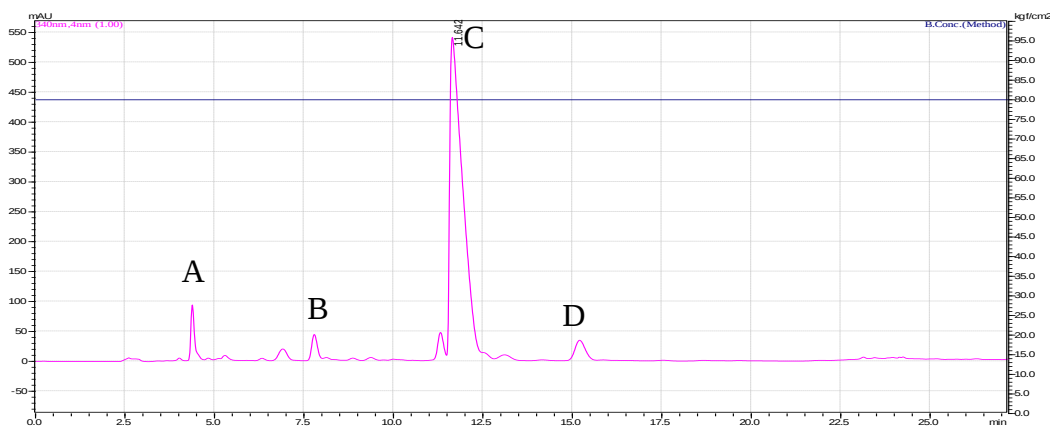
Frações positivas para alcaloides: +; Frações negativas para alcaloides: -

Na fração C1Gu-3 (15,8 mg) formou-se um precipitado branco que foi filtrado, seco e submetido à análise por RMN e EM, confirmando a substância D (57, C1Gu-3B; 3,30 mg) conforme apresentado nos resultados e discussão na seção 5.2.2.5.

A fração C1Gu-8 (17,9 mg) apresentou apenas uma mancha de coloração alaranjada em CCD, após ser revelada por Dragendorff. Foi preparada uma solução na concentração de 1 mg/mL utilizando MeOH como solvente, a qual foi filtrada em membrana microporosa e submetida à análise em CLAE, com coluna Shim-pack PREP-ODS (H) (diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 25 cm), variando os solventes e gradientes para definir um método de separação. O método selecionado para o isolamento foi: isocrático com ATF (ácido trifluoroacético) 0,1% aquoso na bomba A e na bomba B, MeOH:H₂O 4:1; de 0 a 15 min e fluxo de 0,8 mL/min e

comprimento de onda de 340 nm. No cromatograma gerado foram observados 4 picos (A-D, Figura 18). No isolamento foi utilizado o CLAE em modo semi-preparativo, coluna Shim-pack PREP-ODS (H) (diâmetro interno de 20 mm, comprimento de 25 cm) sendo 17,0 mg de amostra dissolvidas em MeOH (2 mL). Neste fracionamento cromatográfico foram coletadas 4 subfrações (A-D), em frasco separados, que após de evaporação total foram analisadas através de CCD, observando-se que a subfração C, com tempo de retenção (t_R) = 11,642 min) apresentou maior pureza e massa (3,50 mg) e foi denominada C1Gu-8C. Após análises dos espectros de RMN e EM, foi confirmado que a fração C1Gu-8C era a substância E (65) conforme apresentado nos resultados e discussão na seção 5.2.2.2 (Fluxograma 6).

Figura 16: Cromatograma de CLAE-FR da fração C1Gu-8

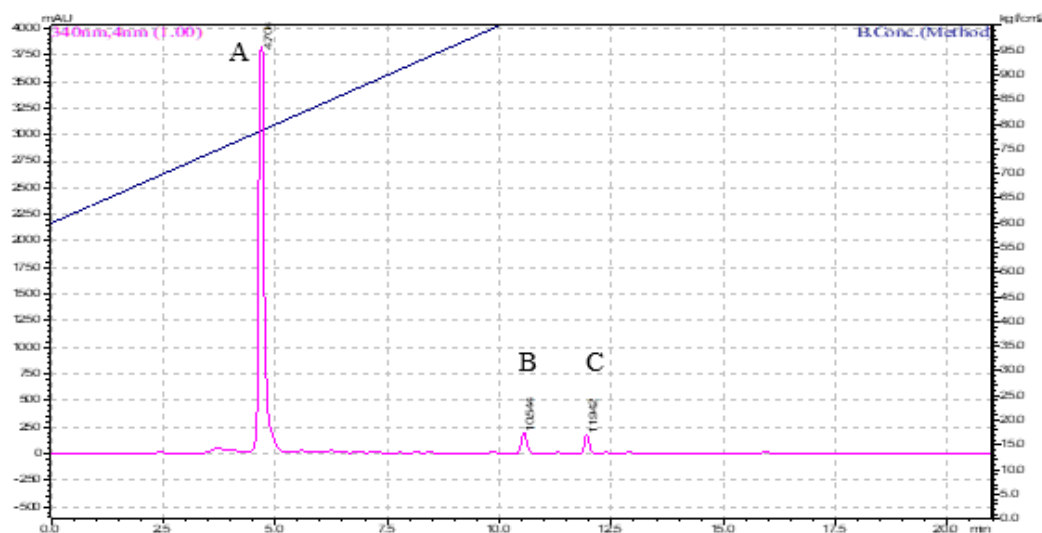


Tempo de retenção (t_R): pico A, t_R : 4,4 min; pico B, t_R : 7,9 min; pico C, t_R : 11,6 min; pico D, t_R : 15,3 min.

A fração C1Gu-9 (31,9 mg) também apresentou um perfil em CCD com poucas impurezas e foi realizada análise em CLAE-FR com coluna Shim-pack PREP-ODS (H) (diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 25 cm) para a definição do método de separação. Após essa análise selecionou-se o seguinte método: gradiente com ATF (ácido trifluoroacético) aquoso a 0,2% na bomba A e MeOH/CH₃CN (2:3) na bomba B; sendo 0 a 10 min, 5% a 60% de B; 10 a 20 min, 60% de B; de 20 a 21 min, 60 a 100% de B; de 21 a 30 min 100% de B e fluxo de 0,8 mL/min. Para realizar o isolamento foi utilizada a coluna semi-preparativa Shim-pack PREP-ODS (H) (diâmetro interno de 20 mm e comprimento de 25 cm) e 30,0 mg de amostra dissolvida em MeOH. Neste fracionamento cromatográfico foram obtidas 3 subfrações de x mL (Figura 19), a primeira subfração corresponde ao pico A (t_R de 4,8 min), que foi denominada C1Gu-9A (3,70 mg) e foi

analisada por RMN e EM e confirmada a substância F conforme apresentado nos resultados e discussão na seção 5.2.2.4. (41).

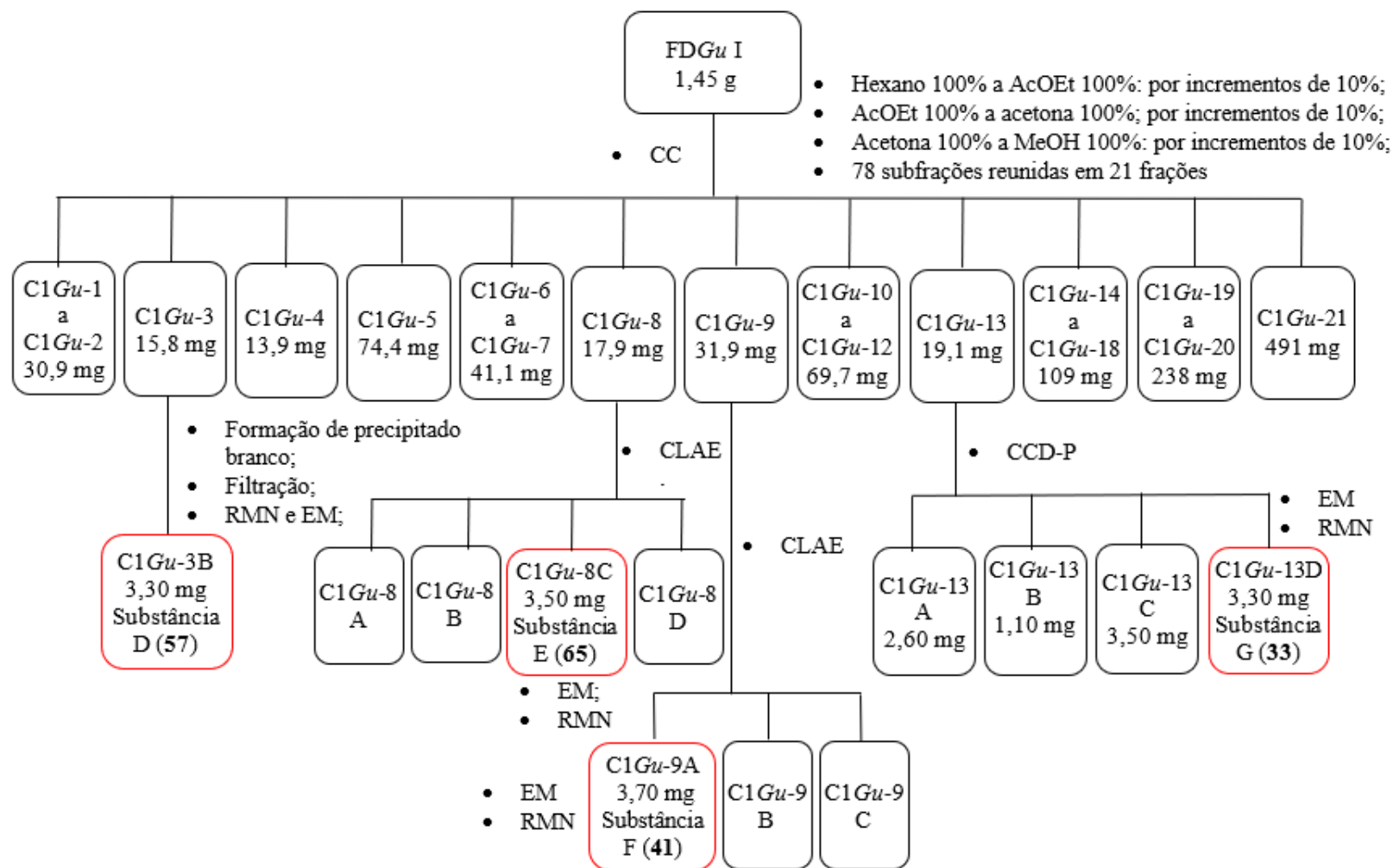
Figura 17: Cromatograma de CLAE-FR da fração C1Gu-9



Tempo de retenção (t_R): pico A, t_R : 4,70 min; pico B, t_R : 10,54 min; pico C, t_R : 11,94 min.

A fração C1Gu-13 (19,1 mg, Tabela 3), por apresentar boa separação em CCD, foi submetida à CCD-P. A fração foi dividida em 2 alíquotas e aplicada em 2 cromatoplasas, as quais foram eluídas com o seguinte sistema: MeOH/acetona/ CHCl_3 (80:10:10) em um volume de 250 mL. As frações foram raspadas das cromatoplasas utilizando uma espátula com o auxílio de iluminação por uma lâmpada de UV e o material raspado foi recolhido em frascos individualizados para cada fração. Foi adicionado MeOH para cada frasco para extrair as substâncias da sílica. O material foi filtrado, seco e analisado por CCD. Na primeira cromatoplasa foram obtidas 4 frações, C1Gu-13A (1,50 mg), C1Gu-13B (0,70 mg), C1Gu-13C (2,30 mg) e C1Gu-13D (2,00 mg) e na segunda C1Gu-13A (1,10 mg), C1Gu-13B (0,40 mg), C1Gu-13C (1,20 mg) e C1Gu-13D (1,30 mg). As frações que apresentaram o mesmo RF em CCD foram reunidas, sendo que fração C1Gu-13D (3,30 mg) foi analisada por RMN e EM, confirmando a substância G (33), conforme apresentado nos resultados e discussão na seção 5.2.2.3.

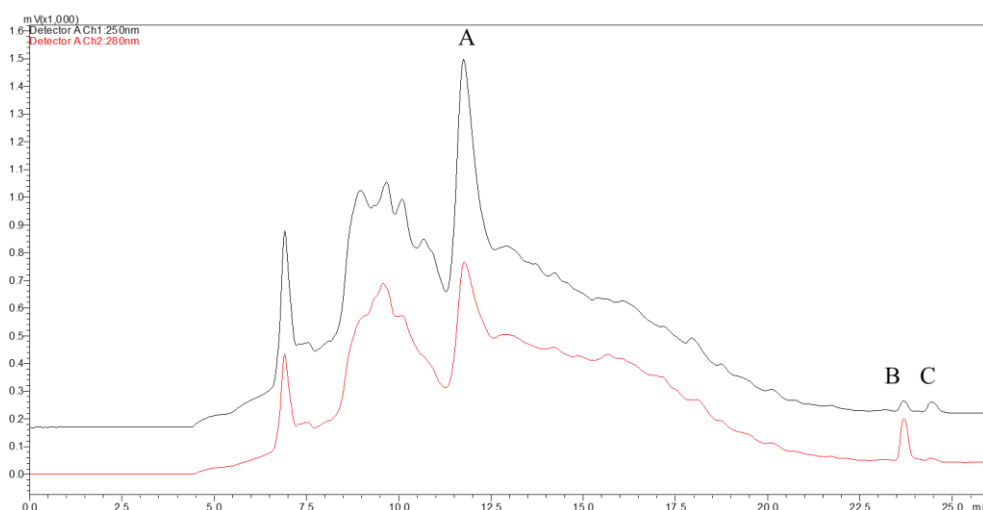
Fluxograma 6: Fracionamento por CC da fração FDGu I de *G. urceolatum*.



A fração FDGu II (2,90 g, Fluxograma 5) foi submetida a uma partição líquido-líquido, dissolvendo-se a amostra em MeOH/H₂O (7:3) e particionando com solventes de grau crescente de polaridade (hexano, diclorometano, seguido de AcOEt) conforme Fluxograma 7. Deste procedimento, após a evaporação total dos solventes resultaram as frações hexânica (FHGu, 157 mg); diclorometânica (FD3Gu; 1,60 g) e de AcOEt (FAGu; 100 mg) e resíduo hidroalcólico (RHAGu; 667 mg). O perfil cromatográfico das frações foi analisado através de CCD.

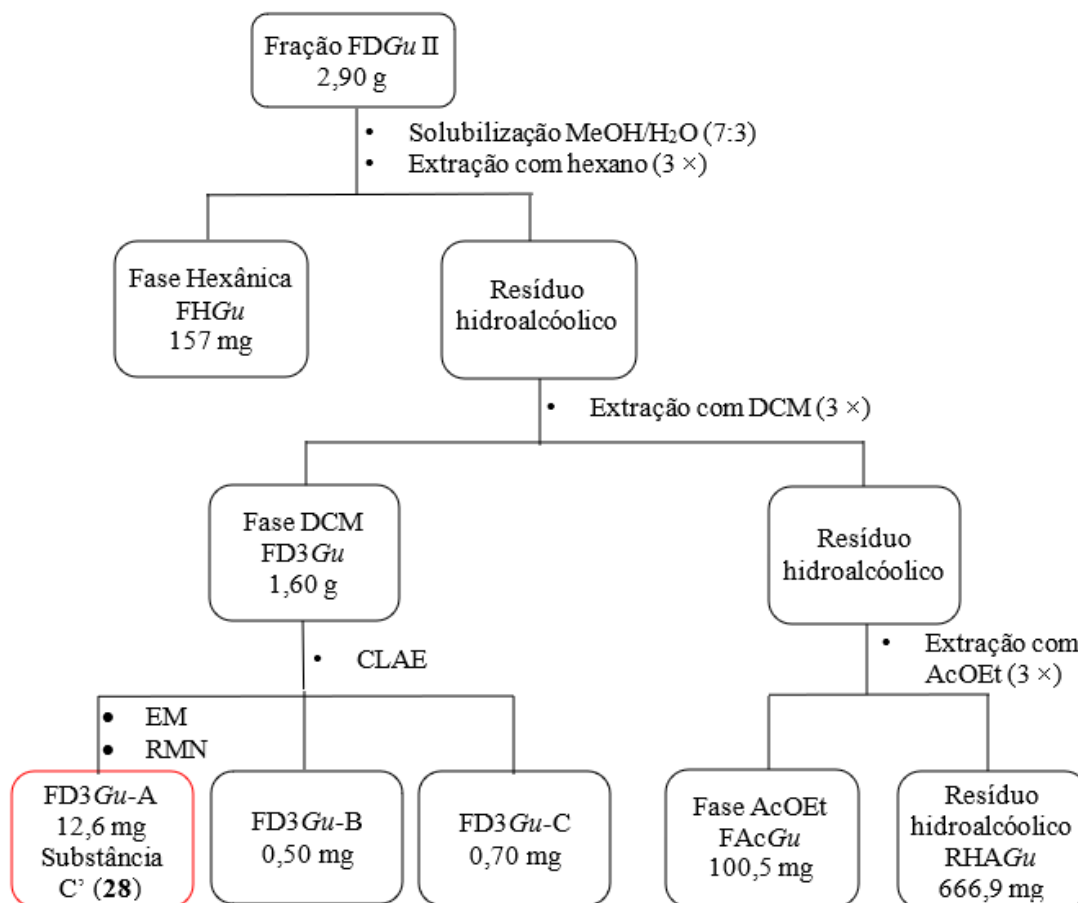
A fração FD3Gu foi submetida à CLAE (Sistema Accela HPLC - Thermo Scientific) exploratória em coluna analítica, Luna 5U C18, 150 × 4,6 mm, Phenomenex, com gradiente de MeOH de 40 a 100% (bomba B), ao longo de 25 min e comprimento de onda de 250 a 280 nm para definição do método de isolamento. Na bomba A foi utilizada uma solução de ácido fórmico a 1,0%. A fração foi dissolvida em DMSO (50 mg/300 µL) e injetada em coluna semi-preparativa Luna 5U C18, 250 × 10 mm, Phenomenex, com fluxo de 8 mL/min (Figura 18). Foram realizadas 4 injeções/corridas e coletadas 3 subfrações: A (FD3Gu-A; 12,6 mg), B (FD3Gu-B; 0,50 mg) e C (FD3Gu-C; 0,70 mg) as quais foram secas e analisadas através de CCD. A fração FD3Gu-A (12,6 mg), positiva para alcaloide (reagente de Dragendorff), foi analisada por RMN e EM, confirmando a substância C' (**28**).

Figura 18: Cromatograma de CLAE semi-preparativa da fração FD3Gu.



Tempo de retenção (t_R): pico A, t_R : 11,5 min; pico B, t_R : 23,8 min; pico C, t_R : 24,5 min

Fluxograma 7: Partição líquido-líquido da fração FDGu II.



4.9 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM) E QUIMIOMETRIA DE EXTRATOS DE *G. argenteum*

Amostras (1,00 mg) dos 21 extratos de *G. argenteum* preparados segundo o planejamento experimental centroide-simplex (seção 4.6.1) foram pesadas e dissolvidas em 1 mL de metanol grau CLAE. As soluções de amostra resultantes foram filtradas em membranas microporosas (0,20 µm). Dos filtrados, 30 µL foram diluídos em 970 µL de metanol e analisados através de inserção direta em espectrômetro de massas com analisador íon *trap* e fonte de IES. A calibração do detector de massas foi feita com formiato de sódio. As amostras foram injetadas e os perfis obtidos indicaram os íons (*m/z*) presentes em cada amostra. Íons com intensidade abaixo de 5% em relação ao íon principal (base) foram desconsiderados (SCHIOZER *et al.*, 2012).

Os dados obtidos na espectrometria de massas para cada amostra (Anexo 1) foram submetidos a uma análise multivariada através do software *Chemoface* versão 1.5 (NUNES *et al.*, 2012). Através dessas análises foi possível tentar estabelecer padrões de associação entre os objetos do estudo, neste caso, intensidades dos íons, m/z de cada espectro de massa e a variável solventes (partes extraídas analisadas separadamente).

Para realizar as análises multivariadas foi construída uma matriz de dados contendo os valores dos íons obtidos dos 21 extratos. Após a construção da matriz as ACP e AAH foram realizadas análises utilizando o software *Chemoface*, e os resultados foram avaliados com intuito de estabelecer uma correlação entre as variáveis já citadas e a atividade biológica.

4.10 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.10.1 Microteste de suscetibilidade *in vitro*

A cultura *in vitro* de *P. falciparum*, assim como os ensaios de atividade antimalárica *in vitro*, foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* (Laboratório de Malária e Dengue/COSAS) do INPA. O método de cultivo utilizado foi descrito por Trager & Jensen (1976) com adaptações (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007) e está baseado no desenvolvimento *in vitro* dos estágios eritrocitários deste parasita. Os extratos e substâncias foram testados frente à cepa K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC do *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center*, Manassas, Virginia), resistente à cloroquina e pirimetamina, cultivada em eritrócitos humanos do tipo A+ à temperatura de 37 °C, em frascos de poliestireno de 50 mL, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e N₂ balanceado).

O ensaio antimalárico foi realizado de acordo com o método descrito por Rieckmann *et al.* (1978), com adaptações descritas por Andrade-Neto *et al.* (2007), em condições semelhantes à cultura do parasita. Para avaliação da atividade antiplasmódica, as amostras foram submetidas à triagem em duas concentrações: 50 e 5,0 µg/mL. As amostras que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia acima de 80% na maior concentração foram consideradas potencialmente ativas (ROCHA E SILVA *et al.*, 2012) e avaliadas em sete concentrações, de 100 a 1,56 µg/mL (diluição 1:2) ou de 100 a 0,13 µg/mL (diluição 1:3) para determinação da CI₅₀.

As amostras (extratos e frações) foram dissolvidas inicialmente em dimetilssulfóxido (DMSO), em soluções estoques na concentração de 10 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) para obtenção das concentrações para teste. O antimalárico padrão difosfato de cloroquina (Sigma) foi utilizado como controle e avaliado em sete concentrações, 2,5 a $3,4 \times 10^{-3}$ µg/mL. As amostras foram testadas em triplicata no processo de triagem e duplicata para cálculo de CI_{50} , em microplaca de 96 poços, sendo que para a realização dos testes os parasitos foram sincronizados (estágio de anel) utilizando solução de *D*-sorbitol (LAMBROS & VANDERBERG, 1979). Para o cálculo de CI_{50} foram realizados 2 experimentos independentes (em dias diferentes).

As soluções das amostras previamente diluídos (20 µL) foram colocadas nas placas de teste e acrescidas da suspensão de hemácias com parasitemia inicial de 1% (estágio de anel), resultando em um volume final de 200 µL em cada poço e incubadas em estufa 37°C por 48 h. Poços contendo suspensão de hemácias e DMSO com concentração final de 1% correspondem ao controle de crescimento do parasito. Após o período de incubação, com o auxílio de uma pipeta foram preparadas as extensões sanguíneas (esfregaços) de cada poço (4 em cada lâmina). As lâminas foram coradas em Panótico® (Laborclin) e a parasitemia foi determinada através da contagem de parasitos no esfregaço em microscópio óptico com objetiva de 100 × (imersão). A parasitemia do conteúdo de cada poço foi expressa como porcentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos, utilizando a equação:

$$\text{Parasitemia \%} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de parasitas} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ total de hemácias}}$$

A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada através da comparação com os controles de crescimento (controle 1: meio RPMI + suspensão de hemácias e controle 2: meio RPMI + DMSO + suspensão de hemácias, sendo a concentração no poço 1%) e calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia do teste}) \times 100}{\text{parasitemia do controle}}$$

A classificação da atividade através da CI_{50} para substâncias puras seguiu os seguintes critérios:

- $CI_{50} > 20,0 \mu M$ = inativo
- $20,0 \geq CI_{50} > 5,0 \mu M$ = atividade moderada
- $5,0 \geq CI_{50} > 0,1 \mu M$ = ativo
- $CI_{50} \leq 0,1 \mu M$ = muito ativo

A CI_{50} de cada extrato foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0, onde o efeito antiparasitário das amostras foi medido em relação ao controle livre de drogas, em um intervalo de confiança de 95% (IC 95).

4.10.2 Citotoxicidade *in vitro*

Um importante critério na pesquisa de substâncias ativas com potencial terapêutico para malária e outras doenças é determinar quaisquer efeitos tóxicos destas substâncias para as células normais. A citotoxicidade foi avaliada utilizando a linhagem celular MRC-5 (Estirpe celular do Conselho de Investigação Médica 5), linhagem não neoplásica de fibroblastos humanos, cultivada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco Modification of Minimum Essential Media*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

A viabilidade celular foi avaliada através do teste do Alamar Blue, um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox que é reduzido em células em estado de proliferação. A forma reduzida é rósea fluorescente indicando células viáveis, enquanto a forma oxidada é azul não fluorescente e indica células não viáveis. O ensaio foi realizado conforme método descrita por Ahmed *et al.* (1994), com o intuito de analisar a viabilidade celular das células da linhagem MRC-5 na presença de diferentes concentrações das substâncias testadas.

Neste ensaio as células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço, em estufa a 37°C, a uma atmosfera de 5% de CO_2 . As amostras solubilizadas em DMSO e diluídas em sete concentrações de 100 a 1,56 $\mu g/mL$ (diluição 1:2) foram adicionadas nas placas e incubadas nas mesmas condições por mais 48 h. Após o período de incubação adicionaram-se 10 μL da solução de uso de Alamar Blue, preparada a 0,4% em meio de cultura e

aguardou-se mais 3 h para metabolização celular. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das amostras (0,2%).

A fluorescência foi medida usando um leitor de placas de Elisa (Beckman e Coulter®) na faixa de 540 nm (filtro de excitação) e 585 nm (filtro de emissão). O sinal de fluorescência gerado a partir do ensaio foi proporcional ao número de células vivas na amostra, sendo os dados analisados em relação ao controle com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (AHMED *et al.*, 1994).

4.10.3 Índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade corresponde à razão entre as atividades citotóxicas e antiparasitárias de cada extrato, ou seja, é a relação entre a CC₅₀ e a CI₅₀. Este valor é utilizado para estimar o grau de segurança para a utilização de uma amostra em testes *in vitro*, ou seja, mede o quanto o composto é ativo sem causar danos à viabilidade celular (ONDO *et al.*, 2012). Na determinação de IS utilizou-se a expressão adaptada de Reimão (2009) que leva em consideração a relação entre citotoxicidade (viabilidade celular no presente caso) e a inibição do crescimento do parasito, sendo calculada da seguinte forma:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ (fibroblastos humanos)}}{CI_{50} \text{ (} P. \text{falciparum)}}$$

O resultado indica quantas vezes a droga é menos tóxica para a célula em relação ao parasita, assim quanto maior a razão mais seletiva é a droga sobre o parasito e menor o efeito dela sobre a célula hospedeira. De acordo com este índice a seletividade é classificada em não citotóxico (IS > 20); citotoxicidade moderada (10 ≤ IS ≤ 20); citotóxico (IS < 10) (ONDO *et al.*; 2012; CHIERRITO *et al.*, 2014). Assim substâncias com índice de seletividade maior que 10 podem ser consideradas para estudos *in vitro*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fluxo do trabalho envolveu inicialmente a preparação de extratos de *G. argenteum* utilizando o planejamento simplex-centroide. Os extratos preparados apresentaram percentuais de rendimento que variaram entre 1,2% e 26%. Os extratos de casca apresentaram em geral menores rendimentos (1,2 – 7,0%) enquanto os de folhas eram em geral maiores (5,9-26%), conforme dados já apresentados na seção 4.6.1 (Tabela 1). Na sequência, foi feita a avaliação dos extratos de *G. argenteum* para atividade contra *P. falciparum in vitro* onde alguns extratos das cascas apresentaram as maiores atividades antiplasmódicas (Tabela 19, seção 5.3.1). A análise dos extratos de *G. argenteum* utilizando EM-IES gerou um perfil químico (m/z e intensidade dos sinais) de cada extrato e o conjunto desses dados (Anexo 1) foi submetido à análise quimiométrica onde os principais agrupamentos de íons presentes foram identificados (seção 5.1). Esse processo permitiu uma correlação qualitativa entre íons (m/z) presentes em extratos ativos que foi relevante para a seleção dos extratos para fracionamento químico e isolamento de substâncias de *G. argenteum*.

Conforme informado nas seções 4.3.2.1 e 4.9, um estudo quimiométrico de *G. urceolatum* com isolamento de substâncias com atividade antiplasmódica foi realizado por Oliveira (2018) e no presente trabalho, foi realizado nova extração e isolamento de substâncias a partir das cascas, resultando no isolamento de 5 (cinco) substâncias cujas estruturas foram elucidadas (seção 5.2.2).

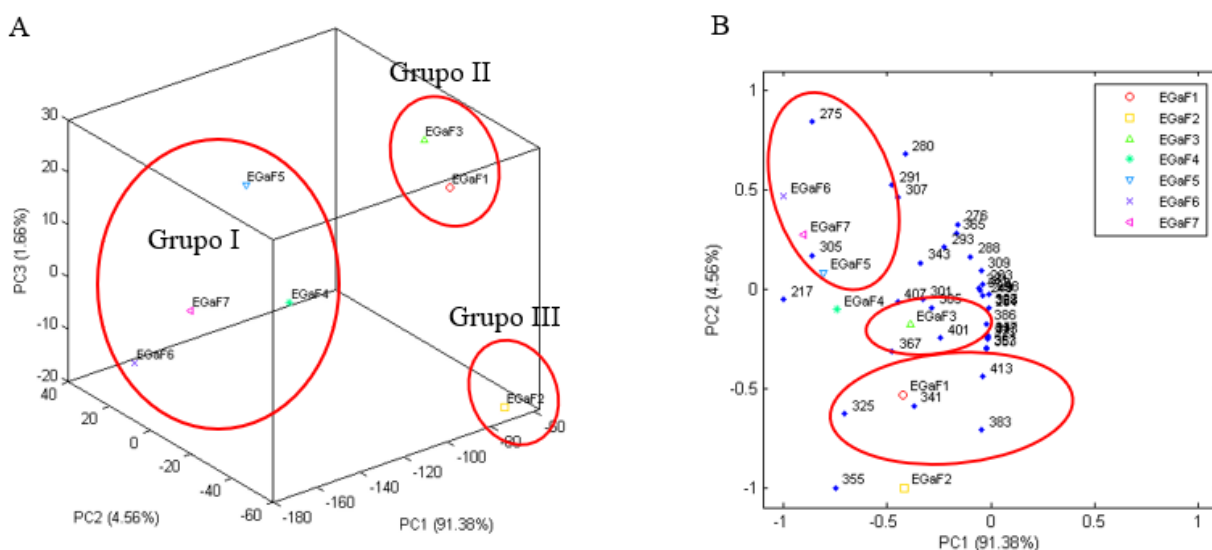
O alvo principal deste trabalho foi a prospecção de substâncias novas e conhecidas de *G. argenteum* (Tabela 21) e *G. urceolatum* (Tabela 22) apresentando inibição relevante do crescimento *in vitro* do parasito causador da malária humana, *Plasmodium falciparum* (seção 5.3.2). Também, a viabilidade de fibroblastos humanos frente às substâncias isoladas foi avaliada como parâmetro de citotoxicidade e seletividade das substâncias isoladas.

5.1 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DE *G. argenteum*

Na análise dos extratos através de espectroscopia de massas (IES-EM) foram observados os íons presentes em cada extrato (m/z), também foi verificado que alguns íons se apresentaram estavam presentes em vários extratos (Anexo 1). Em seguida, procurou-se estabelecer uma relação dos componentes químicos principais presentes e a atividade antiplasmódica dos extratos.

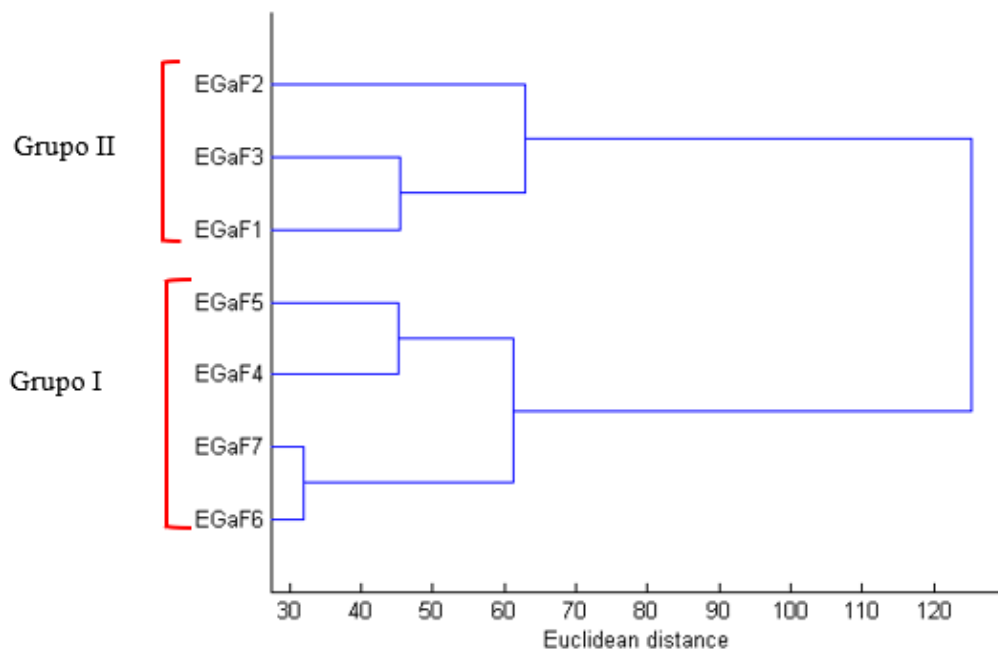
No gráfico de ACP (A) dos extratos de folhas (Figura 19A) foram observados: grupo I (EGaF4, EGaF5, EGaF6 e EGaF7), grupo II (EGaF1 e EGaF3) e o EGaF2 ficou isolado no grupo III. O grupo II compreende extratos metanólico e aquoso das folhas, ambos ativos contra *P. falciparum* conforme descrito na Tabela 19(seção 5.3.1). No grupo I todos os extratos foram ativos, sendo que o mais ativo foi o extrato de acetona e MeOH (1:1), EGaF4 (CI₅₀ = 4,2 µg/mL). O grupo III (EGaF2) foi o único extrato de folhas parcialmente ativo (PA). Na Figura 19B os íons (*m/z*, modo positivo) foram plotados relacionando-os com os extratos e o extrato EGaF1 foi correlacionado aos íons em *m/z* 325, 341, 383 e 413 por PC2. O extrato EGaF3 foi correlacionado aos íons em *m/z* 367 e 401 por PC2 e o extrato EGaF4 foi correlacionado aos íons em *m/z* 301, 385 e 407. Os íons em *m/z* 275 e 305 por PC1 foram associados aos extratos EGaF5, EGaF6 e EGaF7.

Figura 19: Gráfico de score ACP (A) e biplot (B) para dados de extratos de folhas de *G. argenteum*.



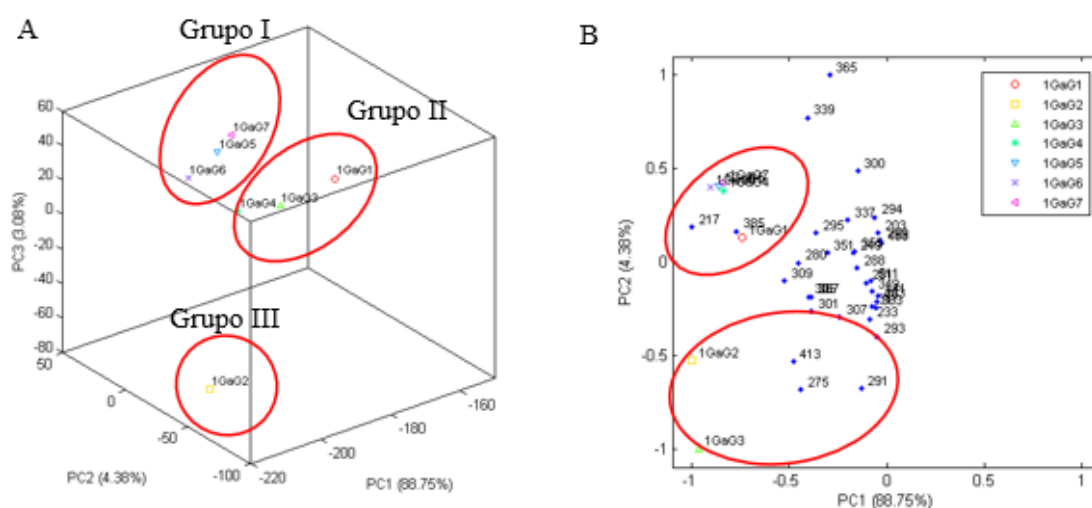
Na Figura 20 foi possível observar que no valor de distância Euclidiana de 60 os extratos foram classificados em 2 grupos principais, I e II, sendo que o extrato EGaF2 apresentou maior similaridade com o grupo II, conforme mostra o dendrograma de AAH, cujos extratos foram obtidos através de extração com um único solvente. Todos os extratos do grupo I foram obtidos com mistura de solventes.

Figura 20: AAH ou dendrograma de extratos de folhas de *G. argenteum*.



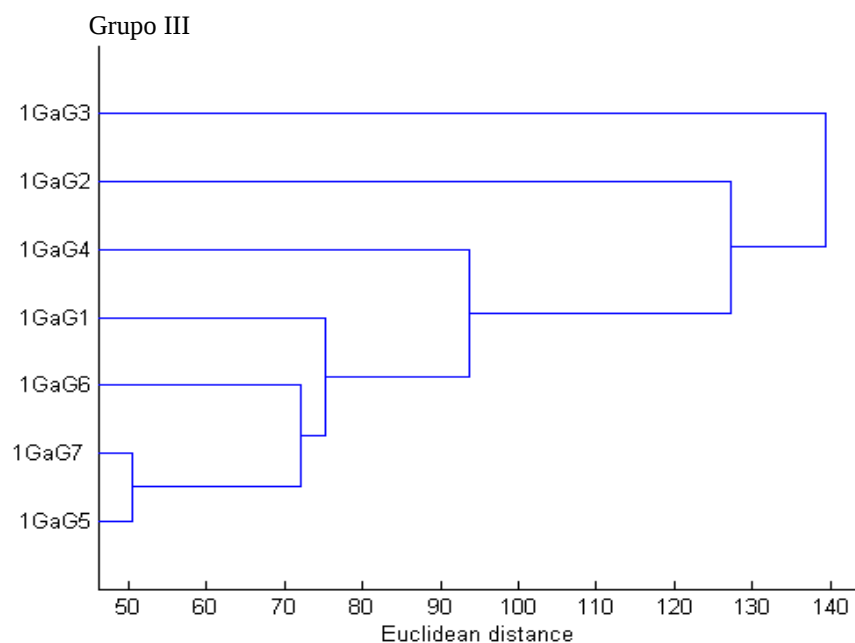
Na Figura 211A (score de ACP) foi possível observar os dados obtidos para extratos de lenho de galho os quais foram colocados em três agrupamentos principais: grupo I (EGaG5, EGaG6, EGaG7). O grupo II tem os extratos EGaG1, EGaG3 e EGaG4 e no grupo III apenas consta o extrato EGaG2 (acetona). O grupo II teve dois extratos com atividade antiplasmodica, EGaG1 ($CI_{50} = 7,7 \mu\text{g/mL}$) e EGaG3 ($CI_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 19, seção 5.3.1). No grupo I todos os extratos foram parcialmente ativos com $CI_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$ ou $CI_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$. Analisando a Figura 21B observa-se que os extratos EGaG1, EGaG4, EGaG5, EGaG6 e EGaG7 foram associados aos íons em m/z 217 e 385. Os extratos EGaG2 e EGaG3 puderam ser associados aos íons em m/z 275, 291 e 413.

Figura 21: Gráfico de score de ACP (A) e *biplot* (B) para dados de extratos do lenho do galho de *G. argenteum*.



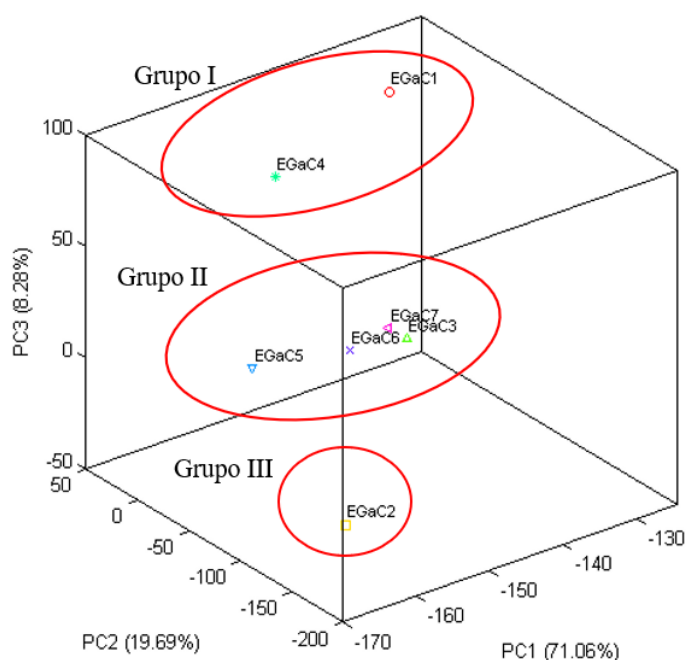
No dendrograma (Figura 222) gerado a partir das análises dos extratos obtidos do lenho do galho não observamos os mesmos grupos.

Figura 22: AAH (dendrograma) de extratos do lenho do galho de *G. argenteum*



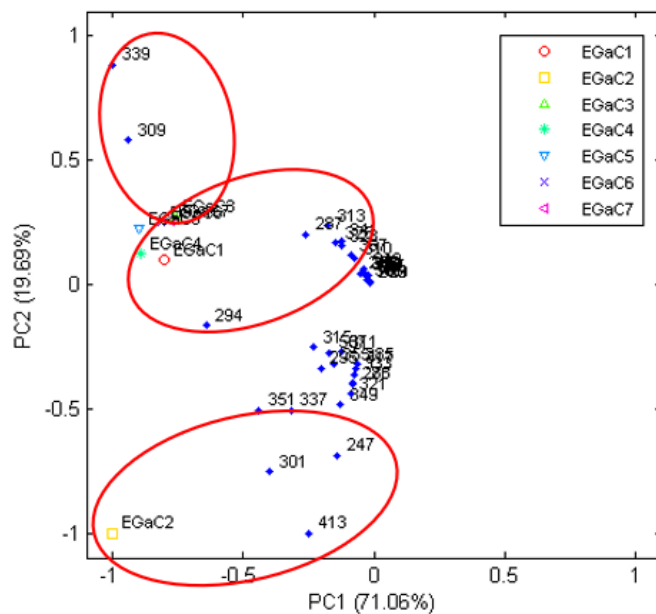
A análise de ACP dos extratos de casca (Figura 23) resultou em três grupos sendo que o grupo I é formado pelos extratos EGaC1 e EGaC4, o grupo II pelos extratos EGaC3, EGaC5, EGaC6 e EGaC7 e no grupo III foi relacionado o extrato EGaC2. No grupo I os dois extratos, EGaC1 (MeOH) e EGaC4 (MeOH e acetona 1:1), foram muito ativos contra *P. falciparum* com $CI_{50} = 0,2$ e $0,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 19, seção 5.3.1). Os extratos dos grupos II e III foram ativos com CI_{50} variando de $3,3 \mu\text{g/mL}$ (MeOH e água 1:1) a $10 \mu\text{g/mL}$ (acetona).

Figura 23: Gráfico de score de ACP para dados de extratos de cascas de *G. argenteum*.



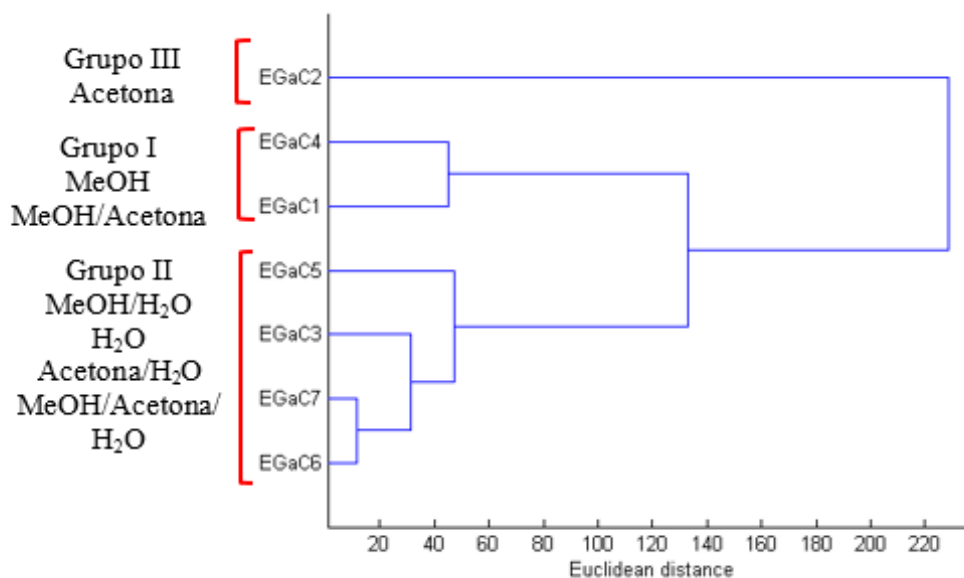
O gráfico do tipo *biplot* (Figura 24) para extratos de casca possibilitou a visualização de alguns m/z de íons associados aos grupos de extratos. Foi possível relacionar os íons em m/z 287, 294 e 313 aos extratos EGaC1 (MeOH) e EGaC4 (MeOH e acetona 1:1), os quais foram os mais ativos ($CI_{50} = 0,20$ e $0,25 \mu\text{g/mL}$ de todos os extratos contra *P. falciparum in vitro* (Tabela 19, seção 5.3.1). Os extratos EGaC3, EGaC5, EGaC6 e EGaC7 foram relacionados aos íons em m/z 287, 309, 313 e 339 e apresentaram atividade contra *P. falciparum in vitro* ($CI_{50} = 3,3$ a $5,2 \mu\text{g/mL}$). O extrato EGaC2, único do grupo III, foi associada aos íons em m/z 247, 301 e 413 por PC2 e foi ativo contra *P. falciparum in vitro* ($CI_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$).

Figura 24: Ampliação do gráfico *biplot* para extratos de casca de *G. argenteum*.



A análise hierárquica dos agrupamentos (AAH) para extratos de cascas (Figura 25) confirmou a análise feita por ACP (Figura 23) onde as amostras foram colocadas em 3 grupos baseando-se na similaridade e intensidade relativa dos seus íons constituintes.

Figura 25: AAH (dendrograma) extratos de cascas de *G. argenteum*.



A extração em abordagem simplex-centroide, avaliação da atividade antiplasmódica dos extratos e a quimiometria aplicada aos extratos possibilitou associar a atividade antiplasmódica ao

perfil de íons (m/z) dos extratos. Como será mostrado na parte da elucidação estrutural, o trabalho de extração, fracionamento e isolamento levou ao isolamento das substâncias C (**28**) e B (**31**) (cuja elucidação estrutural é descrita nas seções 5.2.1.3 e 5.2.1.2, respectivamente) ativas contra *P. falciparum in vitro*, cujos íons correspondentes m/z 247 e 294, respectivamente detectados nos extratos ativos das cascas de *G. argenteum*.

5.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *G. argenteum* e *G. urceolatum*

As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas utilizando métodos espectrométricas, tais como RMN de ^1H e ^{13}C , mono e bidimensionais, EM e CL-EM, testes qualitativos com reagentes de Dragendorff (alcaloides) e simulação das moléculas em modelo molecular poliédrico HGS, além de comparação dos dados obtidos com a literatura.

Os extratos, frações e substâncias obtidos nesta pesquisa foram submetidos a ensaios antiplasmódicos e para citotoxicidade.

5.2.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *G. argenteum*

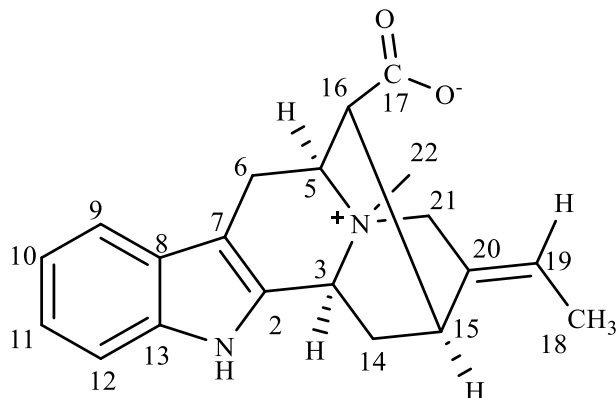
Nesta investigação fitoquímica foram isoladas três substâncias (C3Ga-2, C4Ga-3B e C5Ga-2B, alcaloides) de *G. argenteum*. Dentre esses alcaloides dois foram isolados de outras espécies do gênero e um ainda não havia sido citado no gênero *Geissospermum*.

5.2.1.1 Elucidação estrutural da substância A, C3Ga-2 (**64**)

A substância A (**64**) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela clara. No espectro de massas foi observado o pico do íon molecular com m/z 323,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Anexo 2). Após análise dos seus dados de RMN 1D e (^1H e ^{13}C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY E NOESY) apresentados nos anexos 6 a 10 e comparação com os dados da literatura, a substância A foi identificada como o alcaloide panarina (**64**, Figura 26). Os seus dados de RMN estão resumidos na tabela 4 e a comparação de seus dados com os dados da literatura para panarina estão apresentados

na tabela 5. O que segue é uma discussão das principais características dos espectros e correlações de sinais observados nos espectros de RMN.

Figura 26: Estrutura molecular da substância A, alcaloide panarina (**64**).



No espectro de RMN de ^1H (Anexo 3) foi observado um sinal em δ 8,56, característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de indol. Na Figura 27 pode se observar quatro sinais na região de aromáticos (anel A do grupo indólico) sendo dois dubletos, um em δ_{H} 7,49 (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-9) e o outro em δ_{H} 7,39 (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-12) e dois duplo duplo dubletos: um em δ_{H} 7,09 (*ddd*, $J = 8,0$; 8,0; 1,0 Hz, H-10) e um em δ_{H} 7,19 (*ddd*, $J = 8,0$; 8,0; 1,0 Hz, H-11).

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da substância A (panarina, **64**).

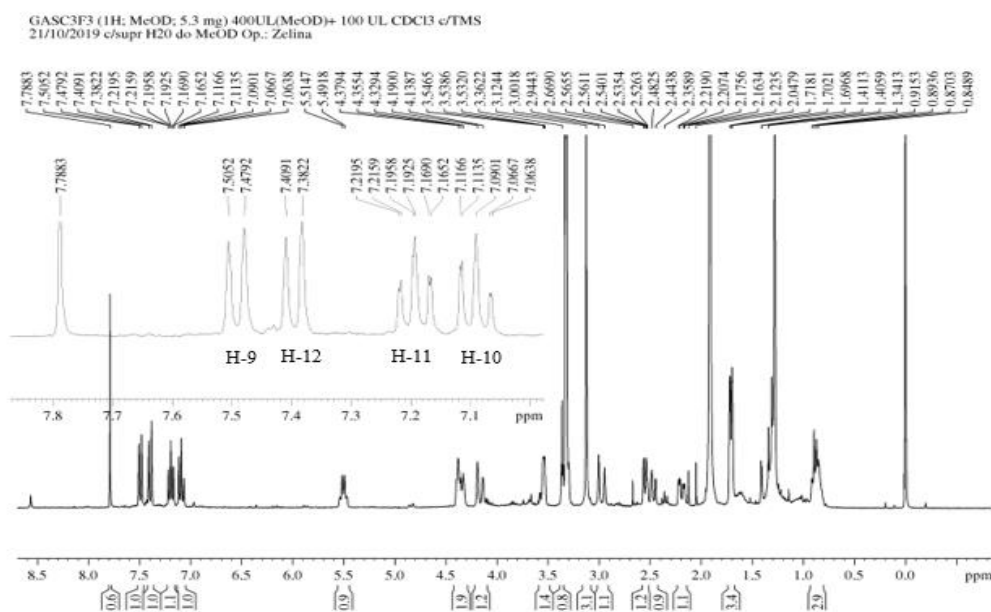


Tabela 4: Dados de RMN 1D e 2D da substância A - panarina (**64**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃).

RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais			
C	Obs.	DEPT	¹ H (δ _H)	HMBC	COSY	NOESY
C-2	132,2	C	-	4,84; 3,34; 2,98; 2,48; 2,19	-	-
C-3	61,6	CH	4,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,7 Hz)	4,37; 4,16; 3,54; 3,12	2,48	4,37; 3,12; 2,48
C-5	66,0	CH	4,37(<i>m</i>)	2,55; 3,34	2,55; 3,34	4,16; 3,12; 2,55
C-6	25,0	CH ₂	α 2,98 (<i>d</i> , <i>J</i> = 16,8 Hz)	2,55	2,98; 4,35	
			β 3,34 (<i>m</i>)		3,34	
C-7	101,6	C	-	7,49; 4,84; 4,37; 3,34; 2,98	-	-
C-8	127,1	C	-	7,09; 7,39		
C-9	119,1	CH	7,49 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,19	7,09; 7,39	
C-10	120,7	CH	7,09 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 8,0; 1,0 Hz)	7,39	7,19; 7,49	
C-11	123,5	CH	7,19 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 8,0; 1,0 Hz)	7,49		
C-12	112,5	CH	7,39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,09	7,19	
C-13	138,4	C	-	7,19; 7,49	-	-
C-14	33,0	CH ₂	α 2,19 (<i>ddl</i> , <i>J</i> = 13,0; 4,3 Hz)	3,54; 2,55	2,19; 4,84	4,84
			β 2,48 (<i>m*</i> , <i>J</i> = 10,6; 1,3 Hz)		2,48; 3,54	4,84
C-15	29,5	CH	3,54 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,6; 1,3 Hz)	2,19; 2,55; 5,50	2,19	1,70; 2,55
C-16	50,2	CH	2,55 (<i>m*</i> , <i>J</i> = 7,7; 1,4 Hz)	3,34; 3,54; 4,37	3,54; 4,37; 4,84	3,54

Dados de RMN 1D e 2D da substância A – panarina (**64**) (300/75 MHz; ppm; CDCl₃) (continuação da Tabela 4).

RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais			
Posição	Obs.	DEPT	¹ H (δ _H)	HMBC	COSY	NOESY
C-17	175,2	C	-	2,55; 4,37	-	-
C-18	13,1	CH ₃	1,70 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 6,4; 1,6 Hz)	5,50	4,35; 5,50	3,54; 5,50
C-19	121,2	CH	5,50 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)	1,70; 4,16	1,70; 4,35	1,70; 4,16
C-20	128,7	C	-	1,70; 2,19; 2,55; 4,16	-	-
C-21	65,7	CH ₂	4,35 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 15,4 Hz)	3,12; 3,54; 5,50	1,70; 4,35	3,12; 5,50
			4,16 (<i>m</i>)		1,70; 4,16; 5,50	4,84
N-Me	47,9	CH ₃	3,12 (<i>s</i>)			4,16; 4,37; 4,84

*m** - multipeto parcialmente interpretável (HOYE *et al.*, 1994)

dl: dubleto largo; *ddl*: duplo duleto largo, *ql*: quarteto largo, *****: duplo dubleto de difícil interpretação; *m** - multipeto parcialmente interpretável.

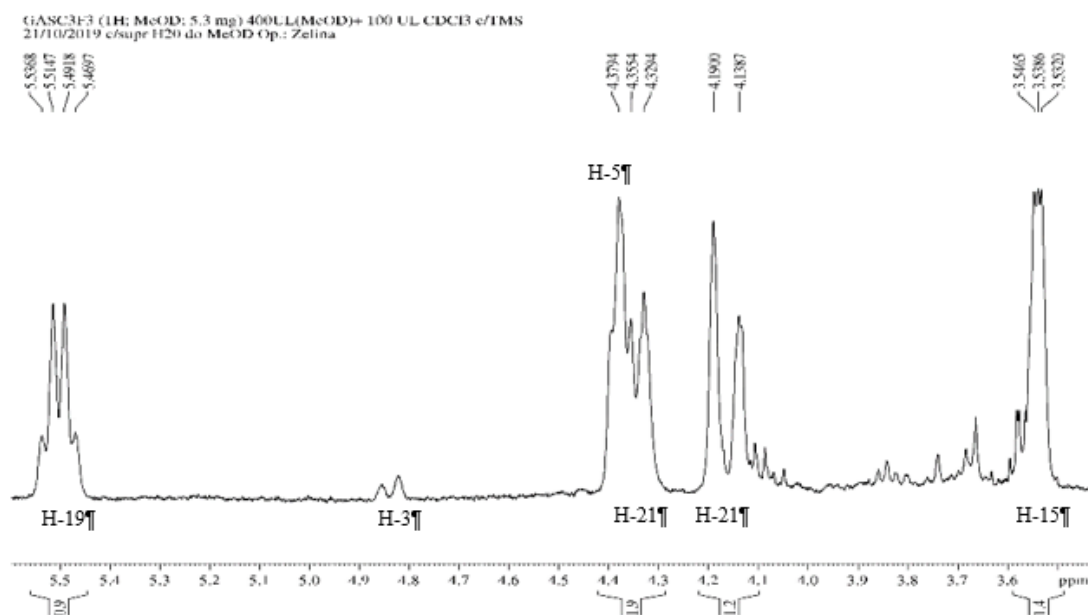
Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C (δ_{C}) e ^1H (δ_{H}) da substância A e comparação com a literatura para a panarina (**64**). Dados de RMN (observado): 300 MHz/75 MHz.

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
Posição	Observado	Lit **	Observado	Lit***
C-2	132,2 (C)	139,2	-	-
C-3	61,6 (CH)	62,8	4,84 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz)	4,85 (<i>d</i> , $J = 10,5$ Hz)
C-5	66,0 (CH)	66,9	4,37 (<i>m</i>)	4,35 (<i>dd</i> ****, $J = 7,5; 5$ Hz)
C-6	25,0 (CH_2)	26,1	α 2,98 (<i>d</i> , $J = 16,8$ Hz)	2,97 (<i>dl</i> , $J = 17,5$ Hz)
			β 3,34 (<i>m</i>)	3,35 (<i>dd</i> , $J = 17,5$ Hz)
C-7	101,6 (C)	105,5	-	-
C-8	127,1 (C)	128,3	-	-
C-9	119,1 (CH)	121,1	7,49 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	7,50 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
C-10	120,7 (CH)	122,6	7,09 (<i>ddd</i> , $J = 8,0; 8,0; 1,0$ Hz)	7,08 (<i>ddd</i> , $J = 8,0; 8,0; 1,0$ Hz)
C-11	123,5 (CH)	125,4	7,19 (<i>ddd</i> , $J = 8,0; 8,0; 1,0$ Hz)	7,18 (<i>ddd</i> , $J = 8,0; 8,0; 1,0$ Hz)
C-12	112,5 (CH)	114,5	7,39 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	7,37 (<i>ddd</i> , $J = 7,0$ Hz))
C-13	138,4 (C)	134,2	-	-
C-14	33,0 (CH_2)	33,7	α 2,19 (<i>ddl</i> , $J = 13,0; 4,3$ Hz)	2,20 (<i>ddl</i> , $J = 13,0; 5,0$ Hz)
			β 2,48 (<i>m*</i> , $J = 10,6; 1,3$ Hz)	2,48 (<i>ddd</i> , $J = 13,0; 10,5; 1,5$ Hz)
C-15	29,5 (CH)	30,9	3,54 (<i>dd</i> , $J = 10,6; 1,3$ Hz)	3,55 (<i>m</i>)
C-16	50,2 (CH)	51,7	2,55 (<i>m*</i> , $J = 7,7; 1,4$ Hz)	2,62 (<i>dd</i> , $J = 7,5; 2,0$ Hz)
C-17	175,2 (C)	179,8		
C-18	13,1 (CH_3)	14,5	1,70 (<i>dl</i> , $J = 6,4; 1,6$ Hz)	1,70 (<i>dl</i> , $J = 7,0$ Hz)
C-19	121,2 (CH)	123,4	5,50 (<i>q</i> , $J = 6,4$ Hz)	5,52 (<i>ql</i> , $J = 7,0$ Hz)
C-20	128,7 (C)	129,3		
C-21	65,7 (CH_2)	67,3	4,35 (<i>dl</i> , $J = 15,4$ Hz)	4,35 (<i>dl</i> , $J = 15,5$ Hz)
			4,16 (<i>m</i>)	4,21 (<i>dl</i> , $J = 15,5$ Hz)
N-Me	47,9 (CH_3)	49,8	3,12 (<i>s</i>)	3,13 (<i>s</i>)

Dados da literatura: ** Quetin-Leclercq *et al.* (1988) em D_2O , 400 MHz/100 MHz; *** Achenbach *et al.* (1991) em CD_3OD , 400 MHz/100 MHz; *dl*: dubleto largo; *ddl*: duplo dubleto largo, *ql*: quarteto largo, ****: duplo dubleto de difícil interpretação; *m** - multipeto parcialmente interpretável.

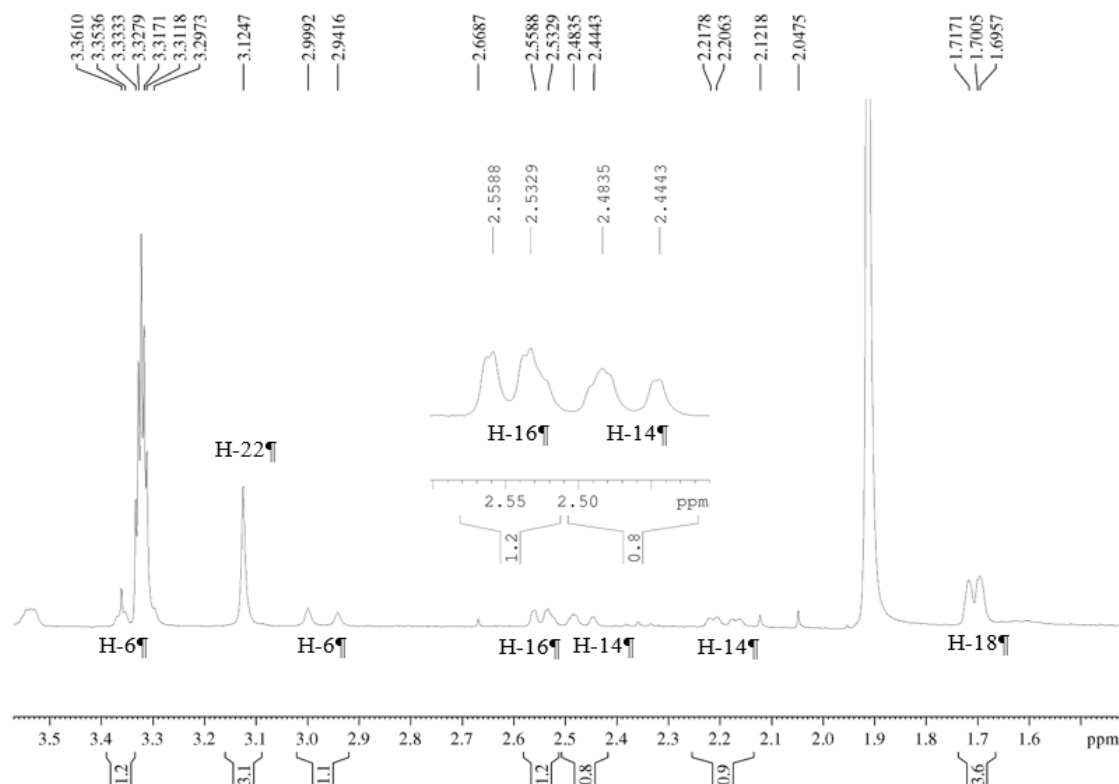
O espectro de ^1H também apresentou um sinal em δ_{H} 5,5 (q , $J = 6,4$ Hz) característico de hidrogênio vinílico, H-19 (Figura 28) com acoplamento vinil-alílico com os hidrogênios da metila (H-18). Levando em consideração os dados de HSQC, ainda foram observados mais quatro hidrogênios metínicos no espectro de RMN de ^1H : H-5 (δ_{H} 4,38, m); H-15 (δ_{H} 3,54, m); H-16 (δ_{H} 2,55) além do H-3 (δ_{H} 4,84) que se apresentou com baixa intensidade devido à supressão da água do solvente (metanol deuterado) (Figura 28).

Figura 28: Ampliação da região de δ 3,50 a δ 5,50 do espectro de RMN de ^1H da substância A (panarina, **64**).



O espectro de RMN de ^1H da substância A também apresentou dois sinais, um com δ_{H} 1,70 (d , $J = 6,4$ Hz) correspondendo ao H-18 e outro com δ_{H} 3,12 (s , H-22), sendo que ambos integraram para 3 H, característicos de hidrogênios metílicos (Figura 29). O sinal com δ_{H} 1,70 se refere a uma metila de acoplamento vinil-alílico com H-17. O sinal com δ 3,12 apresenta tal deslocamento característico de metilas ligadas a um heteroátomo (Figura 29). Estes mesmos sinais foram identificados na literatura (ACHENBACH *et al.*, 1991) em estudo realizado com extrato metanólico de cascas de *Stemmademia mínima* A. Gentry espécie da família Apocynaceae coletadas no Panamá.

Figura 29: Ampliação da região de δ 1,5 a 3,5 do espectro de RMN de ^1H da substância A (panarina, **64**).



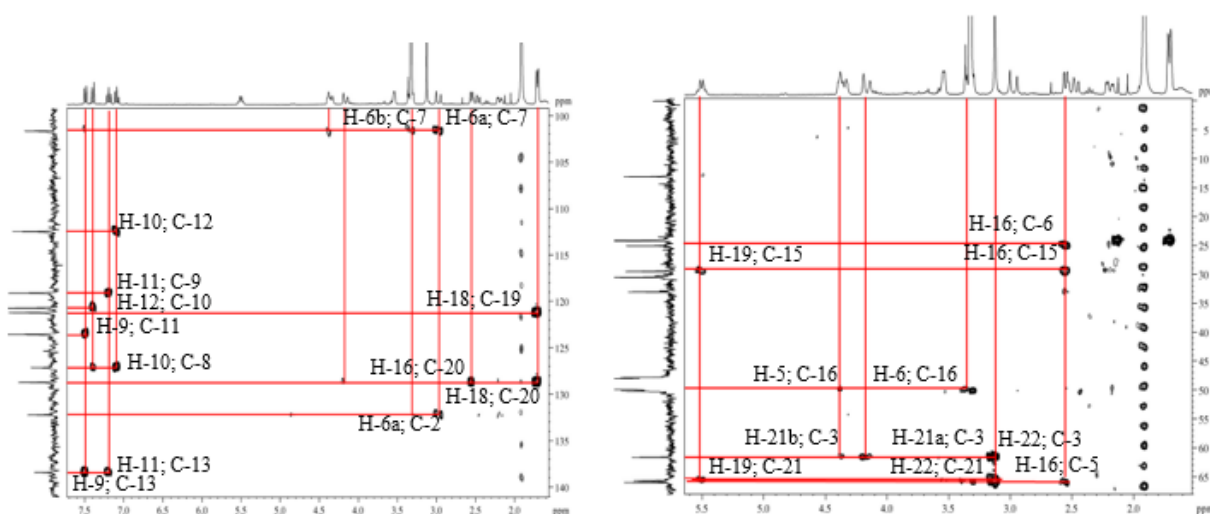
O espectro de RMN de ^{13}C da substância A (Anexo 4) apresenta 20 sinais de carbono, os quais estão descritos na Tabela 4. No espectro de DEPT 135 (Anexo 5) foram observados nove carbonos (CH) metínicos, três (CH_2) metilênicos (C-6; C-14; C-21), dois carbonos (CH_3) metílicos (C-18; Me-N). Também foi observada a presença de seis carbonos (C) quaternários após comparar o espectro de RMN de ^{13}C e o DEPT 135. A análise dos espectros de RMN de ^1H e mapa de correlação HSQC (Anexos 3 e 5, respectivamente) revelaram as correlações de todos os hidrogênios e carbonos em 1J as quais estão descritas na tabela 4.

No espectro de HMBC (Figura 30) foram observadas correlações na região de aromáticos do anel A entre o sinal do H-9 (*d*, δ_{H} 7,49) com C-11 e C-13. O hidrogênio H-11 (*ddd*, δ_{H} 7,19) correlacionando com C-9 e C-13, H-10 (*ddd*, δ_{H} 7,09) com o carbono C-12. No anel C foi observada uma correlação entre H-6a (*d*, δ_{H} 2,98) e b (*m*, δ_{H} 3,34) com C-2, H-5 (*m*, δ_{H} 4,35) e H-16 (*dd*, δ_{H} 2,55) com C-17 do ácido carboxílico. O hidrogênio H-16 (*dd*, δ_{H} 2,55) também apresenta correlação com o C-14 e C-15 do anel D. No anel D os hidrogênios H-14a (*ddl*, δ_{H} 2,19) e H-14b

(*dd*, δ_H 2,48) correlacionam-se com o C-2 do anel C. Os hidrogênios H-18 (*dd*, δ_H 1,70) e H-19 (*q*, δ_H 5,50) do grupo olefínico apresentam correlação com o carbono quaternário C-20, sendo que o H-19 também se correlaciona com o carbono da metila (C-18).

No anel C destaca-se a presença de uma metila (C-22) ligada a um nitrogênio (N) tornando-o quaternário. Os dados de RMN indicam que esta substância possui um anel formado pela ligação dos carbonos C-5, C-16 e C-15 o qual denominamos anel E.

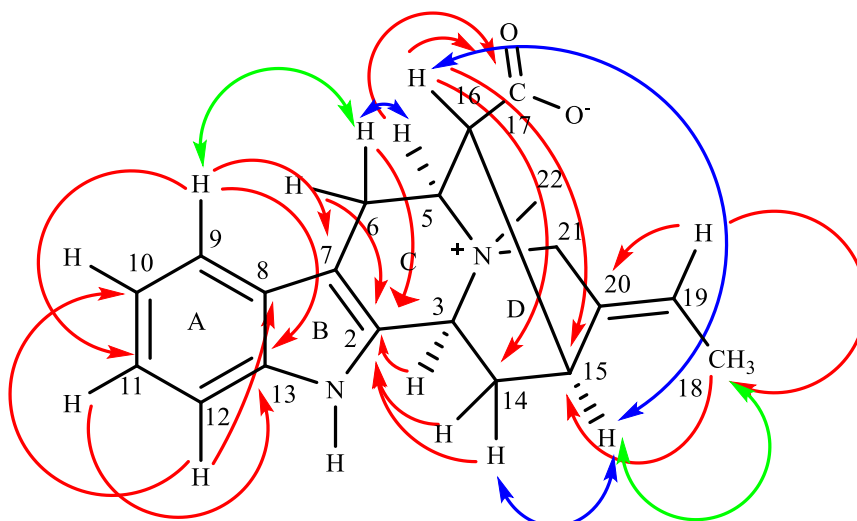
Figura 30: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC da substância A (**64**)



Na Figura 31 foram demonstradas algumas correlações observadas nos espectros de HMBC, COSY e NOESY dos anéis A, B, C, D e E. Os acoplamentos, demais correlações e dados de RMN de 1D e 2D estão descritos na tabela 4 e apresentados nos anexos 2 a 10.

A análise dos espectros de RMN, do espectro de massas com ionização por *eletrospray* e a comparação com dados da literatura (Tabela 5) possibilitaram a identificação da substância A como panarina (**64**), com massa de 323,12 e fórmula molecular $C_{20}H_{23}N_2O_2$, sendo que a estereoquímica dos centros estereogênicos apresentadas na estrutura acima são as mesmas utilizadas no site de busca Pubchem (PUBCHEM, 2021). Este alcaloide recebeu este nome por ter sido isolado do curare venezuelano preparado pelos índios *Panare* (QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1988; ACHENBACH *et al.*, 1991).

Figura 31: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) e NOESY (verde) da substância A (**64**).



5.2.1.2 Elucidação estrutural da substância B, C4Ga-3B (**31**)

A substância B (**31**) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela clara, sendo positiva para alcaloide utilizando o reagente de Dragendorff. A amostra apresentou pureza qualitativa através de análise por CCD por isso foi submetida às análises de EM, RMN 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), cujos dados foram descritos na Tabela 6 e apresentados nos anexos 11 a 18 e a comparação com os dados da literatura para velosimina estão apresentados na tabela 7. O espectro de massas mostrou o pico do íon molecular com m/z 293,09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Anexo 11). O que segue é uma discussão das principais características dos espectros e correlações de sinais observados nos espectros de RMN.

Tabela 6: Dados de RMN 1D e 2D da substância B (**31**) (300/75 MHz; ppm; DMSO-*d*6).

RMN de ^{13}C (δ_{C})				Bidimensionais		
Posição	Obs.	DEPT	δ_{H}	HMBC	COSY	NOESY
C-2	139,6	C	-	1,70; 1,97; 2,90; 2,45; 4,12; 10,86	-	-
C-3	50,0	CH	4,12 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	3,20; 3,42	1,70; 1,97	10,86; 1,97
C-5	50,3	CH	3,42 (<i>m</i>)	4,12; 2,45; 2,90; 3,45; 9,55;	2,42	
C-6	27,3	CH ₂	α 2,45 (<i>m</i>)	2,42	2,42	7,35
			β 2,90 (<i>m</i>)		2,42	2,42
C-7	102,6	C	-	2,42; 2,45; 2,90; 3,42; 7,35; 10,86	-	-
C-8	127,5	C	-	6,93; 7,28; 10,86	-	-
C-9	118,0	CH	7,35 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,01	6,93	2,45
C-10	118,8	CH	6,93 (<i>tap</i> , $J = 7,0$; 1,2 Hz)	7,28; 7,01	7,01; 7,35	
C-11	120,9	CH	7,01 (<i>tap</i> , $J = 7,0$; 1,2 Hz)	7,35	6,93; 7,28	
C-12	111,5	CH	7,28 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	6,93; 7,01	7,01	10,86
C-13	136,6	C	-	10,86; 7,35; 7,01	-	-
C-14	33,2	CH ₂	α 1,70 (<i>m</i>)	2,42	4,12; 3,20; 1,97	1,97
			β 1,97 (<i>m</i>)		4,12; 1,70	1,70; 4,12
C-15	26,8	CH	3,20 (<i>m</i>)	1,70; 2,42; 5,23	1,70; 2,42	1,55; 2,42; 9,57
C-16	54,9	CH	2,42 (<i>m</i>)	2,45; 2,90; 3,45; 9,55	2,45; 2,90; 3,42; 9,57	2,90; 3,20; 9,55
C-17	204,1	CH	9,55 (<i>sl</i>)	2,42; 3,42	2,42	1,55; 2,42; 3,20

Dados de RMN 1D e 2D da substância B (**31**) (300/75 MHz; ppm; DMSO-*d*₆) (continuação da Tabela 6).

RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais			
Posição	Obs.	DEPT	δ _H	HMBC	COSY	NOESY
C-18	12,8	CH ₃	1,55 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	5,23	5,23	2,42; 3,20; 5,23; 9,55
C-19	115,7	CH	5,23 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	1,55	1,55	1,55
C-20	136,4	C		1,55; 1,70; 2,42; 3,45	-	-
C-21	55,6	CH ₂	3,45 (<i>m</i>)	5,23		
NH			10,86 (<i>s</i>)			4,12; 7,28

Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C (δ_{C}) e ^1H (δ_{H}) para a substância B (**31**) e comparação com a literatura. Dados de RMN (observado): 300 MHz/75 MHz, ppm, DMSO- d_6 .

Posição	RMN de ^{13}C (δ_{C})		RMN de ^1H (δ_{H})	
	Obs. (DMSO d_6)	Literatura*	Obs. (DMSO d_6)	Literatura*
C-2	139,6 (C)	139,39	-	-
C-3	50,0 (CH)	49,45	4,12 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	4,09 (<i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)
C-5	50,3 (CH)	51,80	3,42 (<i>m</i>)	
C-6	27,3 (CH ₂)	28,87	α 2,45 (<i>m</i>) β 2,90 (<i>m</i>)	
C-7	102,6 (C)	102,49	-	-
C-8	127,5 (C)	127,44	-	-
C-9	118,8 (CH)	118,64	6,93 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz)	6,93 (<i>t</i> , $J = 6,9$ Hz)
C-10	118,0 (CH)	117,89	7,35 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,36 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-11	120,9 (CH)	120,76	7,01 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz)	7,01 (<i>t</i> , $J = 6,0$ Hz)
C-12	111,5 (CH)	111,43	7,28 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,28 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz)
C-13	136,6 (C)	136,51	-	-
	33,0 (CH ₂)	33,21	α 1,70 (<i>m</i>) β 1,97 (<i>m</i>)	
C-15	26,8 (CH)	27,25	3,20 (<i>m</i>)	
C-16	54,9 (CH)	52,75	2,42 (<i>m</i>)	
C-17	204,1 (COH)	173,86 (CO ₂ Me)	9,55 (<i>s</i>)	
C-18	12,8 (CH ₃)	12,86	1,55 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	1,54 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz)
C-19	115,7 (CH)	115,77	5,23 (<i>q</i> , $J = 6,8$ Hz)	5,24 (<i>q</i> , $J = 7,8$ Hz)
C-20	136,4 (C)	136,01	-	-
C-21	55,6 (CH ₂)	55,59	3,45 (<i>m</i>)	
NH			10,86 (<i>s</i>)	10,71 (<i>s</i>)

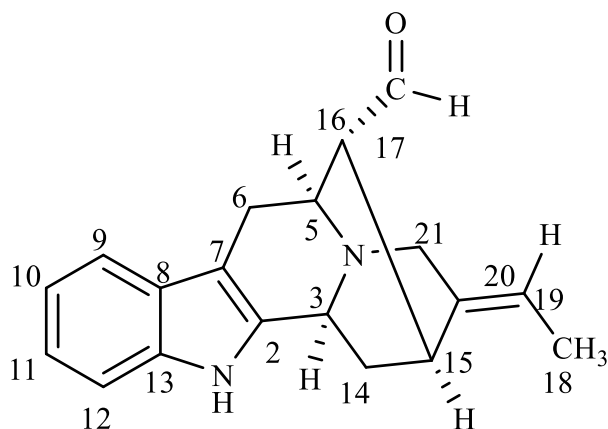
Dados de RMN 1D e 2D da substância B (**31**) (300/75 MHz; DMSO- d_6).

Dados da literatura para derivado da velosimina: * Yu *et al.*, (2003) (RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 300/75,5 MHz; CDCl₃).

A análise do espectro de hidrogênio (Anexo 12) evidenciou um perfil semelhante ao espectro de hidrogênio (Anexo 3) da substância A (C3Ga-2) (**64**), discutido anteriormente, sendo que ambas apresentaram a característica de anel benzeno 1,2-dissubstituído comumente identificados em diversos alcaloides monoindólicos (Tabela 6).

Ao comparar os dois espectros de hidrogênio foi observado que a substância B (**31**) não possui o singlete em δ_H 3,12, confirmando que essa estrutura não apresenta a metila ligada ao nitrogênio 4, como a substância A (**64**, Figura 32).

Figura 32: Estrutura molecular da substância B, alcaloide velosimina (**31**).

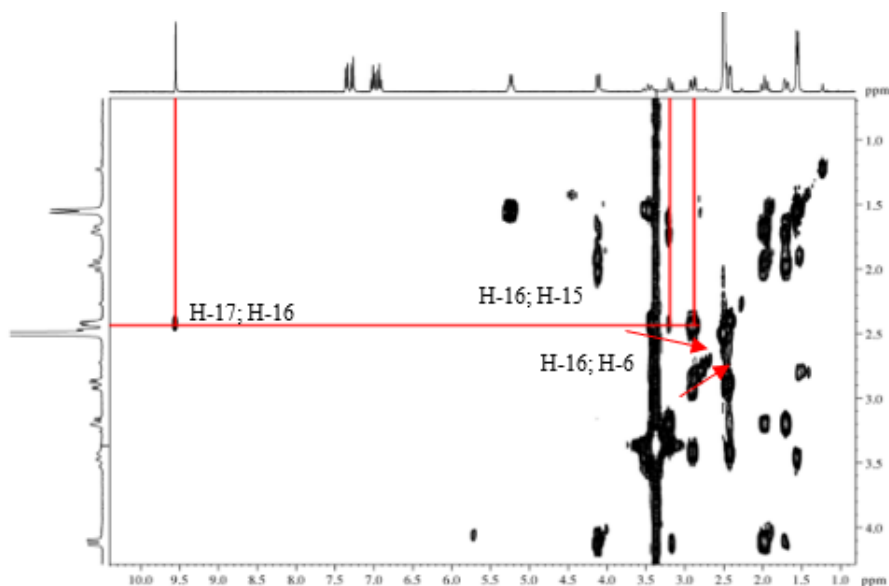


O espectro de 1H da substância B também apresentou um singlete em δ_H 9,55, sendo que para confirmar a presença desse hidrogênio foram analisados os espectros bidimensionais. Ao realizar uma análise no espectro de HSQC (Anexo 13) foi observado que esse hidrogênio apresentou ligação do tipo J^I ao carbono com deslocamento químico em δ_C 204,1, o que é característico de grupos aldeído.

No espectro do HMBC (Anexo 14) foi observada uma correlação entre o H-16 (*m*, δ_H 2,42) com C-17 (δ_C 204,1). O hidrogênio H-16 (*m*, δ_H 2,42) também apresenta correlação com o C-14 e C-15 do anel D. O hidrogênio H-17 (*s*, δ_H 9,55) apresentou correlação com o C-15 (δ_C 26,8) e C-16 (δ_C 54,9).

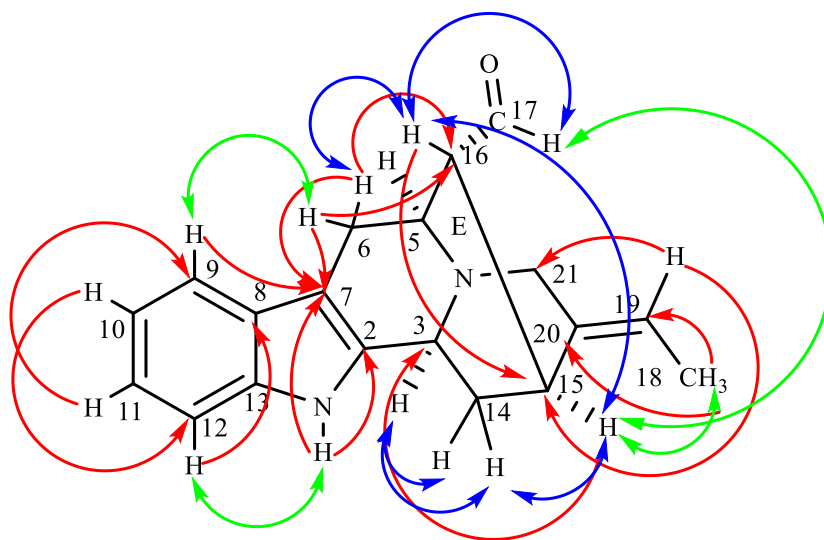
No espectro de COSY (Figura 33, Figura 34 e Anexo 17) foram observados alguns acoplamentos importantes na identificação da substância B, tais como: H-5 (*m*, δ_H 3,42) com H-16 (δ_H 2,42) e deste com os hidrogênios H-17 (*sl*, δ_H 9,55) e H-15 (*m*, δ_H 3,20). O hidrogênio H-15 (*m*, δ_H 3,20) apresentou acoplamento com H-14 (*m*, δ_H 1,70) e este apresentou acoplamento com H-3 (*d*, δ_H 4,12).

Figura 33: Alguns acoplamentos de COSY da substância B (**31**).



No espectro de NOESY o H-17 (*sl*, δ_H 9,55) mostrou acoplamento com o H-15 (*m*, δ_H 3,20), corroborando a determinação do grupo carboxaldeído como cabeça de ponte do bi ciclo (Figura 34). Assim os dados de RMN demonstraram que esta substância possui um anel (E) formado pela ligação dos carbonos C-5, C-16 e C-15 demonstrado na Figura 34. Os dados dos espectros 1D e 2D foram descritos na tabela 6.

Figura 34: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) e NOESY (verde) da substância B (**31**).



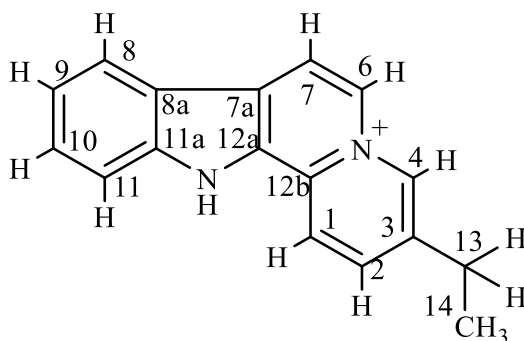
Os dados obtidos nas análises dos espectros de RMN 1D e 2D, espectro de massas e a comparação com os dados encontrados na literatura (Tabela 7) para esta substância possibilitaram a identificação da substância B como velosimina (**31**), cuja fórmula química é $C_{19}H_{20}N_2O$.

A Velosimina (**31**) foi isolada pela primeira vez por Rapoport e Moore (1962) de *G. vellosii*, porém não apresentou dados completos para os espectros de RMN, destacando o hidrogênio do aldeído alifático em δ_H 9,58 (s, H-17), um quarteto (q) em δ_H 5,57 (H-19) e uma metila em δ_H 1,72 (d, H-18). Assim os dados da literatura descritos na tabela 7 foram obtidos de um derivado da velosimina denominado (+)-metil-3-etilideno-1,3,4,7,12,12b-hexaidro-2H,6H-2,6-metano-indol[2,3- α] quinolisina-13-carboxilato, obtido de uma reação de oxidação de aldeído para um éster no C-17, ocorrendo alteração no deslocamento deste carbono de δ_C 204,1 para δ_C 173,86 (YU *et al.*, 2003). A estereoquímica dos centros estereogênicos apresentadas na estrutura acima são as mesmas utilizadas no site de busca Pubchem (PUBCHEM, 2021).

5.2.1.3 Elucidação estrutural da Substância C, C5Ga-2B (**28**)

A substância C (**28**) apresentou-se sob a forma de cristais alaranjados (Fluxograma 4). No espectro de massas da substância C (Anexo 19) observou-se o pico do íon $[M+H]^+$ correspondente a 248,82 e um pico base em 233,82, onde foi observada a perda de 15 unidades de massa atômica, característico de um grupo metílico. Após análise dos seus dados de RMN 1D (1H e ^{13}C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY E NOESY) apresentados nos Anexos 20 a 25 e comparação com os dados da literatura, a substância C foi identificada como o alcaloide flavopereirina (**28**, Figura 35). Os seus dados de RMN estão resumidos na Tabela 8 e a comparação de seus dados com os dados da literatura para flavopereirina (**28**) estão apresentados na Tabela 9. Segue-se uma discussão das principais características dos espectros e correlações de sinais observados nos espectros de RMN

Figura 35: Estrutura molecular da substância C, alcaloide flavopereirina (**28**).



O espectro de RMN de ^1H apresenta nove sinais na região de aromáticos com deslocamento químico entre δ_{H} 7,47 e δ_{H} 9,33, apresentou também um sinal (*q*) em δ_{H} 2,93 (2 H) e um tripleto em δ_{H} 1,33 (3 H).

No anel A foram observados quatro sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos sendo um duplo dubleto em δ_{H} 8,44 (*dd*, $J = 7,0; 0,8$ Hz) e um dubleto largo em δ_{H} 7,87 (*dl*, $J = 8,3$ Hz), H-8 e H-11 respectivamente, um duplo duplo dubleto, δ_{H} 7,47 (*ddd*, $J = 8,0; 7,0; 0,8$ Hz), H-9 e um duplo duplo dubleto atribuído ao H-10 com δ_{H} 7,73 (*ddd*, $J = 8,3; 7,0; 1,1$ Hz). Essas multiplicidades se deram devido aos acoplamentos observados no espectro de COSY, os quais estão inseridos na Tabela 8 e demonstrados na Figura 36 e no anexo 20. O anel C apresentou dois sinais na região de aromáticos, referentes a dubletos em H-6 δ_{H} 8,99 (*d*, $J = 7,0$ Hz) e H-7, δ_{H} 8,81 (*d*, $J = 7,0$ Hz). Outros três sinais de hidrogênios foram observados no anel D, em δ_{H} 8,90 (*d*, $J = 8,8$ Hz), H-1, 8,42 (*d*, $J = 8,8$ Hz), H-2 e em δ_{H} 9,33 (singlete largo), H-4 (Figura 36).

Figura 36: Espectro de RMN de ^1H e ampliação da região de aromáticos da substância C (**28**)

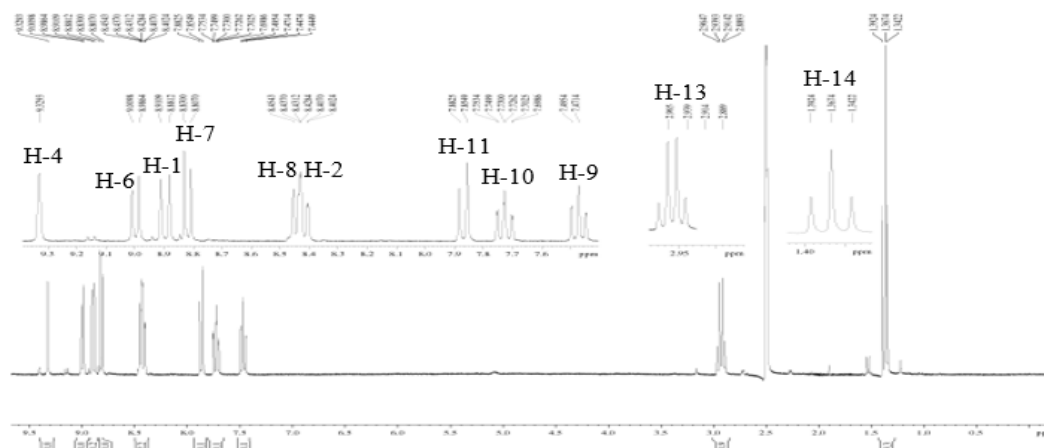


Tabela 8: Dados de RMN 1D e 2D da substância C (**28**) (300/75 MHz; ppm; DMSO-*d*₆).

Unidimensionais				Bidimensionais	
Posição	¹³ C (δ _C)	DEPT	¹ H (δ _H)/HSQC	HMBC	COSY
C-1	121,6	CH	8,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)		8,42; 9,33*
C-2	137,7	CH	8,42 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	2,93; 9,33	2,93; 8,90; 9,33*
C-3	138,2	C	-	1,37; 2,93; 8,90; 9,33	-
C-4	134,8	CH	9,33 (<i>sl</i>)	2,93; 8,42; 8,99	2,93; 8,42; 8,90
C-6	127,5	CH	8,99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	8,81; 9,33	8,81
C-7	117,3	CH	8,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	8,99	8,99
C-7a	131,5	C	-	8,99	-
C-8	122,6	CH	8,44 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,73	7,47; 7,73
C-8a	121,2	C	-	7,47; 7,87; 8,81	-
C-9	122,1	CH	7,47 (<i>tap</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	7,87; 8,44	7,73; 8,44
C-10	129,8	CH	7,73 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	8,44	7,47; 7,87; 8,44
C-11	113,4	CH	7,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,3 Hz)	7,47	7,73
C-11a	141,8	C	-	7,73; 8,44	-
C-12a	123,1	C	-	8,42; 8,99	-
C-12b	131,3	C	-	8,42; 8,81; 8,90; 9,33	-
C-13	25,8	CH ₂	2,93 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	1,37; 8,42; 9,33	1,37; 8,42; 9,33
C-14	14,6	CH ₃	1,37 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	2,93	2,93
NH	-				

sl: singleto largo

tap: tripleto aparente

*Correlações de Noesy observadas no Cosy.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância C (300/75 MHz; DMSO- d_6) e comparação com a literatura (**28**) (C5Ga-2B).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Observado	Lit **	Observado	Lit*
C-1	121,6		8,90 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	8,93 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz)
C-2	137,7		8,42 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	8,32 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz)
C-3	138,2		-	-
C-4	134,8		9,33 (<i>sl</i>)	9,30 (<i>s</i>)
C-6	127,5		8,99 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	9,02 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz)
C-7	117,3		8,81 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	8,75 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz)
C-7a	131,5		-	
C-8	122,6		8,44 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	8,40 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
C-8a	121,2		-	
C-9	122,1		7,47 (<i>tap</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,40 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
C-10	129,8		7,73 (<i>dd</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,67 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
C-11	113,4		7,87 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	7,86 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
C-11a	141,8		-	-
C-12a	123,1		-	-
C-12b	131,3		-	-
C-13	25,8		2,93 (<i>q</i> , $J = 7,5$ Hz)	2,93 (<i>q</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-14	14,6		1,37 (<i>t</i> , $J = 7,5$)	1,37 (<i>t</i> , $J = 7,5$)

Dados da literatura: * Steele *et al.* (2002) em DMSO- d_6 , 500/125 MHz.

**Dados não encontrados na literatura

sl: singlete largo; *tap*: tripleto aparente.

No anel D foi observada uma ramificação a partir do C-3, referente a um grupo etílico no qual os hidrogênios do C-13 apresentaram deslocamento químico em δ_H 2,93 (*q*; $J = 7,5$ Hz) os quais apresentaram correlação pelo espectro de COSY com um tripleto em δ_H 1,37 ($J = 7,5$ Hz) (Figura 38).

O espectro de ^{13}C apresentou 17 linhas espectrais. Utilizando-se dos dados espectrais de DEPT 135 e HSQC, foi possível afirmar que essa substância apresentou um sinal de metila (CH_3), um sinal de metileno (CH_2), nove de metinos (CH) e seis de carbonos quaternários (C) (Anexos 21, 22 e 23).

No espectro do HMBC (Figura 37 e 38) da substância C (**28**) foram observadas as correlações na região de aromáticos do anel A entre o sinal do H-8 (δ_H 8,44 *dd*) com C-10 e C-11a. O H-9 (δ_H 7,47 *ddd*) correlacionando com C-11. O H-10 (δ_H 7,73 *ddd*), com o carbono C-11a. No anel C foi observado correlação entre H-7 (δ_H 8,81 *d*), com C-8a e C-12a. O H-6 (δ_H 8,99 *d*) com C-12b e C-7a. No anel D o H-1 (δ_H 8,90 *d*) correlaciona-se com C-12a e C-3; o H-4 (δ_H 9,33 *sl*) com C-6. Os hidrogênios H-13 (δ_H 2,93 *q*) apresentaram correlação com C-2 e C-3. Algumas correlações de HMBC e COSY dos anéis A, B, C e D também estão apresentadas na figura 38. As demais correlações e os demais dados de RMN de 1D e 2D estão apresentadas na tabela 9 e anexos 20 a 25. Os dados obtidos foram comparados com os dados da literatura descritos na tabela 9, confirmando a estrutura da flavopereirina (**28**, Figura 35 e 38).

Figura 37: Algumas correlações observadas no HMBC do substituinte da substância C (**28**).

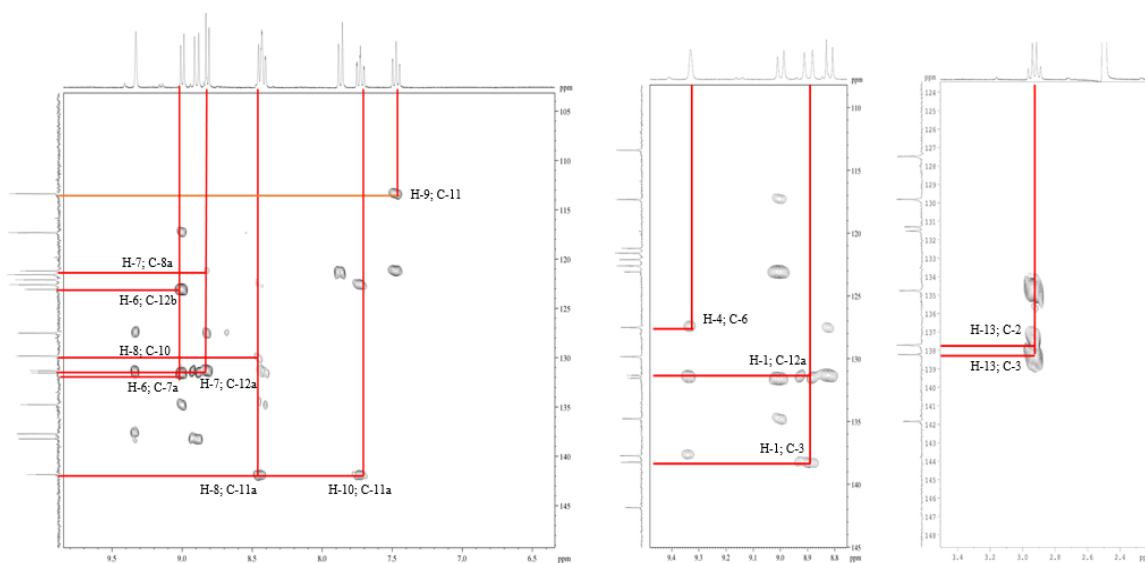
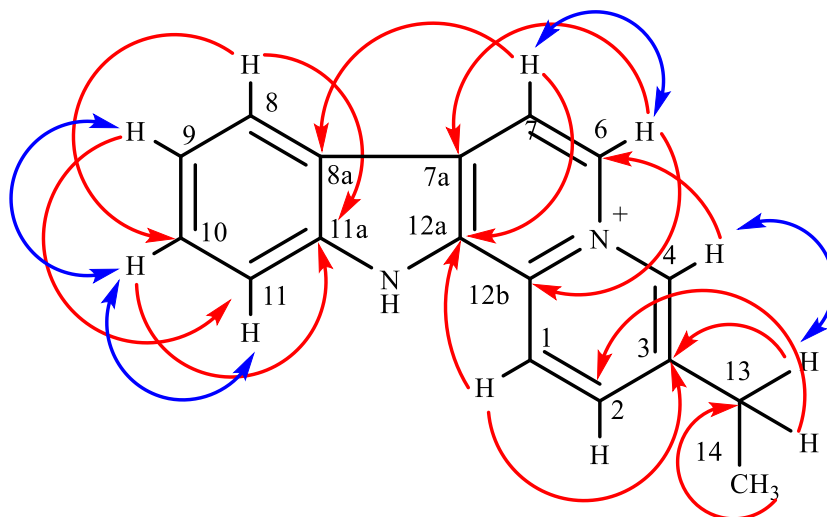


Figura 38: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) da substância C (**28**).



Os dados obtidos nas análises dos espectros de RMN 1D e 2D, espectro de massas e a comparação com os dados encontrados na literatura (STEELE *et al.*, 2002) para esta substância possibilitaram a identificação da substância C como flavopereirina (**28**) com fórmula química C₁₉H₂₀N₂O.

5.2.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *G. urceolatum*

Desta espécie vegetal foram isoladas cinco substâncias (C1Gu-8C, C1Gu-9A, C1Gu-13D e FDGu-A, alcaloides, C1Gu-3B, triterpeno), sendo feita uma proposta de elucidação estrutural para cada uma. Destas substâncias somente a C1Gu-8C (62) não foi encontrada na literatura.

5.2.2.1 Elucidação estrutural da substância C', FD3Gu-A (**28**)

A substância C' foi isolada em HPLC como um sólido amorfo de cor castanho e revelou-se positiva para alcaloides em teste com o reagente de Dragendorff. No espectro de massas (Anexo 26) foi observado um pico base de m/z 248,73.

A análise dos espectros de EM, RMN 1D (¹H e ¹³C) e 2D (HSQC, HMBC e COSY) apresentados nos Anexos 27 a 31 indicou semelhança entre a amostra FD3Gu-A (substância C')

obtida de *G. urceolatum* e a amostra C5Ga-2B (substância C) obtida de *G. Argenteum*, e descrita na seção 5.2.1.3. Na Figura 39 é possível observar os espectros de RMN 1D das substâncias isoladas de ambas as espécies de *Geissospermum*.

Os dados obtidos das análises de RMN (300/75 MHz; DMSO- d_6) 1D e 2D foram descritos na tabela 10 e a comparação com a literatura na tabela 11. Os espectros foram apresentados nos anexos 27 a 31. As análises de todos os espectros obtidos, seguida de comparação com a literatura (STEELE *et al*, 2002) possibilitaram a identificação da substância C' como flavopereirina (**28**) com fórmula química $C_{19}H_{20}N_2O$, já descrita na seção 5.2.1.3.

Figura 39: Espectros de RMN (300/75 MHz; DMSO- d_6) de 1H das substâncias C e C'.

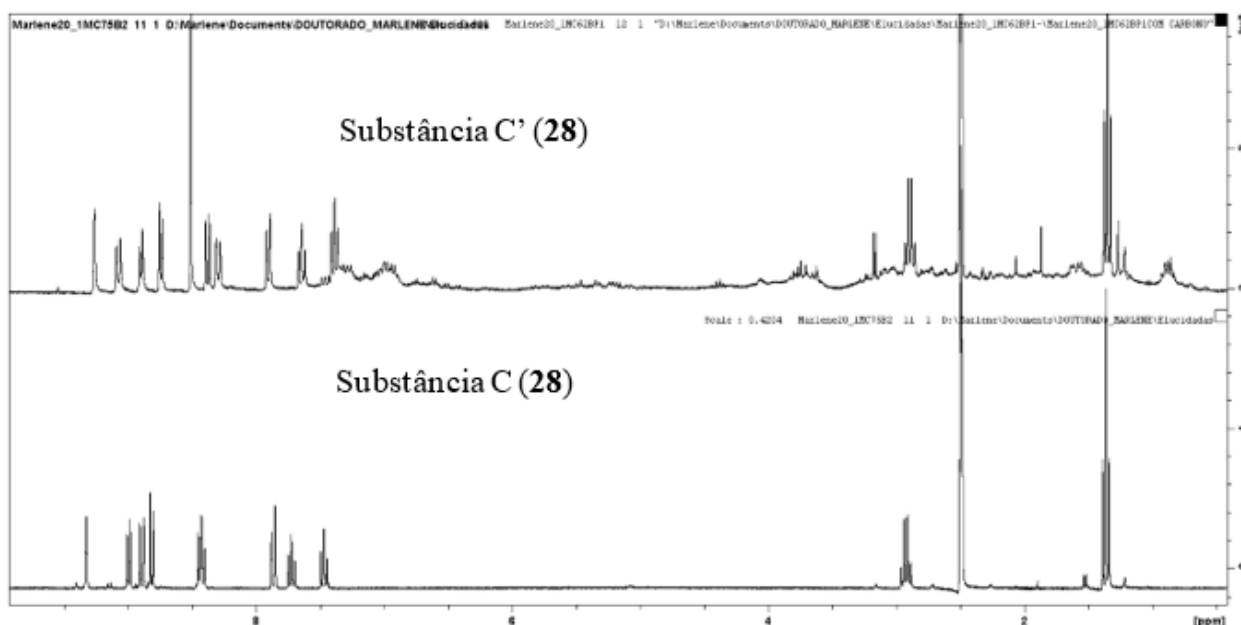


Tabela 10: Dados de RMN 1D e 2D da substância C' (28) (300/75 MHz; ppm; DMSO-*d*₆).

Unidimensionais				Bidimensionais	
C	¹³ C (δ _C)	DEPT	¹ H (δ _H)	HMBC	COSY
C-1	122,0	CH	9,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	7,65	8,30
C-2	136,9	CH	8,30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	1,37; 2,90; 9,26	9,08; 9,26
C-3	137,7	C	-	1,37; 2,90; 9,08; 9,26	-
C-4	134,3	CH	9,26 (<i>sl</i>)	2,90; 8,30; 8,90	2,90; 8,90
C-6	126,0	CH	8,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	8,75; 9,26	8,75
C-7	117,3	CH	8,75 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	8,90	8,90
C-7a	133,1	C	-	8,75	-
C-8	122,3	CH	8,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,65	7,39; 7,65
C-8a	121,5	C	-	7,39; 7,91	-
C-9	121,2	CH	7,39 (<i>tap</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	7,39; 7,91; 8,75	7,64; 8,40
C-10	129,0	CH	7,64 (<i>tap</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	7,91; 8,40	7,91
C-11	114,5	CH	7,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,3 Hz)	7,39; 7,64	7,64
C-11a	144,1	C	-	7,64; 8,40	-
C-12a	122,9	C	-	8,40; 8,90	-
C-12b	132,0	C	-	8,40; 8,90	-
C-13	25,7	CH ₂	2,90 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	1,37; 9,26	1,37; 9,26
C-14	14,6	CH ₃	1,37 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	2,90	2,90
NH	-				

tap: tripleto aparente; *sl*: singlete largo

Tabela 11: Comparação com a literatura (STEELE *et al*, 2002, DMSO- d_6 , 500/125 MHz) para a substância C' (**28**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})		
Posição	Obs. (S- C')	Obs. (S-C)	Obs. (S- C')	Obs. (S-C)	Lit**
C-1	122,0	121,6	9,08 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	8,90 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	8,93 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz)
C-2	136,9	137,7	8,30 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	8,42 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	8,32 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz)
C-3	137,7	138,2	-	-	
C-4	134,3	134,8	9,26 (<i>sl</i>)	9,33 (<i>sl</i>)	9,30 (<i>s</i>)
C-6	126,0	127,5	8,90 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	8,99 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	9,02 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz)
C-7	117,3	117,3	8,75 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	8,81 (<i>d</i> , $J = 7,0$ Hz)	8,75 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz)
C-7a	133,1	131,5	-	-	
C-8	122,3	122,6	8,40 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	8,44 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	8,40 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
C-8a	121,5	121,2	-	-	
C-9	121,2	122,1	7,39 (<i>tap</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,47 (<i>tap</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,40 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
C-10	129,0	129,8	7,64 (<i>tap</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,73 (<i>dd</i> , $J = 7,6$ Hz)	7,67 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
C-11	114,5	113,4	7,91 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	7,87 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	7,86 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
C-11a	144,1	141,8	-	-	
C-12a	122,9	123,1	-	-	
C-12b	132,0	131,3	-	-	
C-13	25,7	25,8	2,90 (<i>q</i> , $J = 7,6$ Hz)	2,93 (<i>q</i> , $J = 7,5$ Hz)	2,93 (<i>q</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-14	14,6	14,6	1,37 (<i>t</i> , $J = 7,6$ Hz)	1,37 (<i>t</i> , $J = 7,5$)	1,37 (<i>t</i> , $J = 7,5$)

5.2.2.2 Determinação estrutural da substância E, C1Gu-8C (65)

A substância E (65) foi isolada como um sólido amorfo de cor marrom e revelou-se positiva para alcaloides em teste com o reagente de Dragendorff. No espectro de massas foi observado um pico base de m/z 459,2667 com t_R de 7,1 min (EMAR), cuja fórmula sugerida pelo software do equipamento é $[M+H]^+ C_{29}H_{35}N_2O_3^+$, com variação de erro de $\Delta = 5.1$ (Anexo 32).

No espectro de RMN de 1H (Anexo 33) foram observados sete sinais na região de aromáticos: δ_H 8,37 (d , $J = 8,1$ Hz; H -9), δ_H 7,40 (m ; H - 9'), δ_H 7,34 (ddd , $J = 6,6$; 2,2; 1,8; H - 7'), dois sinais sobrepostos com δ_H 7,15 (m ; H - 8'e H - 6'), um sinal em δ_H 7,12 (dd , $J = 7,5$; 1,8; H - 5') e δ_H 6,93 (d , $J = 8,1$ Hz; H - 10). O espectro de hidrogênio apresentou também dois sinais característicos de hidrogênios olefínicos com δ_H 7,81 (d , $J = 15,3$ Hz) e δ_H 6,99 ($J = 15,0$ Hz). Também foi observado um singlete com δ_H 4,05 com integral para 3H, sendo característicos de hidrogênios de metoxila, bem como um triplete com δ_H 0,74, $J = 7,4$ Hz (Tabela 12).

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 34) apresentou vinte e nove linhas espectrais de carbono descritos na tabela 12. Após análise do mapa de correlação HSQC (Anexo 35) foi possível observar onze linhas espectrais de carbonos metínicos (CH), oito de metilênicos (CH₂), oito de carbonos quaternários (C) e dois metílicos (CH₃).

As correlações observadas em HSQC (Anexo 35), HMBC (Anexo 36) e COSY (Anexo 37) também estão descritas na tabela 12.

No espectro de COSY o hidrogênio com δ_H 5,39 (H-2) mostrou acoplamento com os hidrogênios geminais H-16 (δ_H 2,22; 1,55). O hidrogênio a H-5 (δ_H 4,04) do C-5 mostrou acoplamento com os hidrogênios geminais H-6 (δ_H 2,60; δ_H 1,89) do C-6. O hidrogênio b (δ_H 2,89) do C-5 apresentou acoplamento com um dos hidrogênios geminais (δ_H 1,89) do C-6. O hidrogênio δ_H 3,88 (H-3) está acoplando com os hidrogênios geminais (δ_H 2,27; 1,89) do C-14. Os hidrogênios da metila, H-18 (δ_H 0,74) apresentaram acoplamento com os hidrogênios geminais H-19 (δ_H 1,58; 1,07). Estes acoplamentos foram demonstrados nas Figuras 40 e 41. Também foi observado um acoplamento espacial (Noesy) entre o hidrogênio do nitrogênio (δ_H 11,67) e H-21 (δ_H 3,29) (Figura 41; anexo 37).

Figura 40: Alguns acoplamentos de COSY observados para a substância E (65).

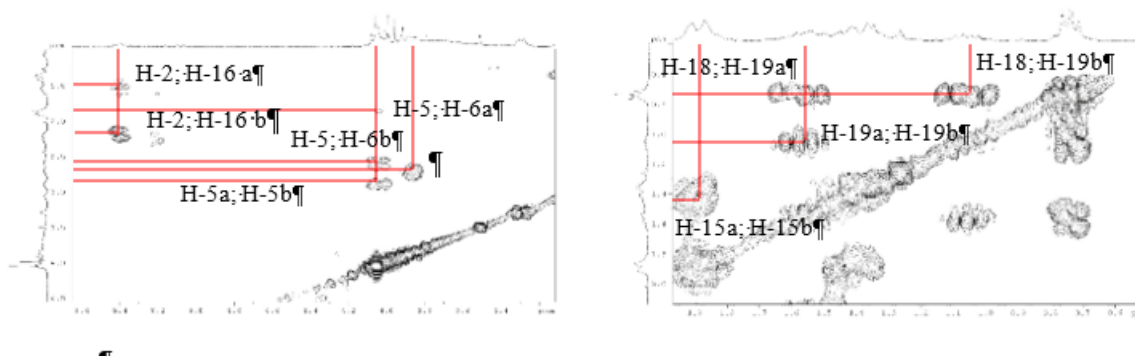
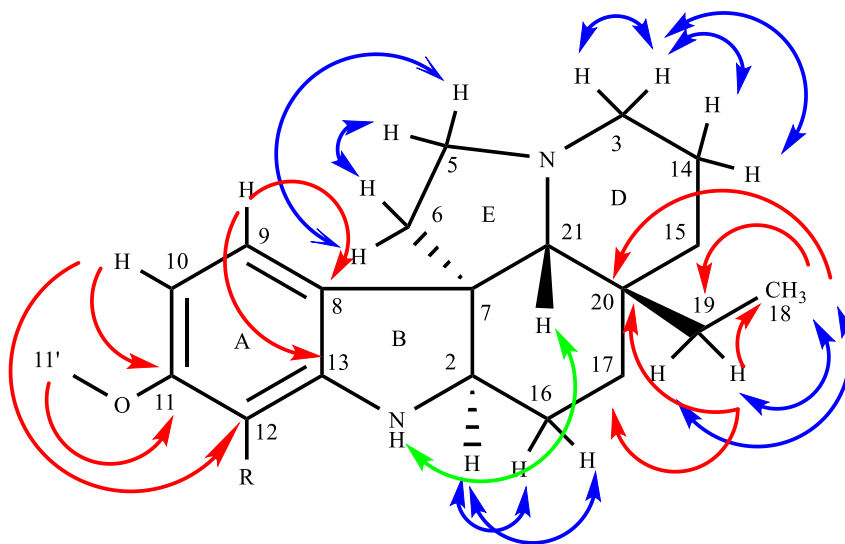
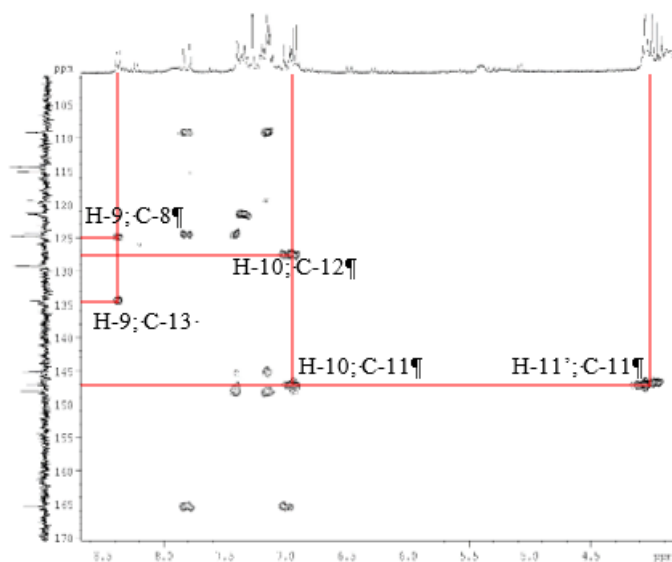


Figura 41: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos observados no COSY (azul e verde) dos anéis A, B, C, D e E da substância E (65).



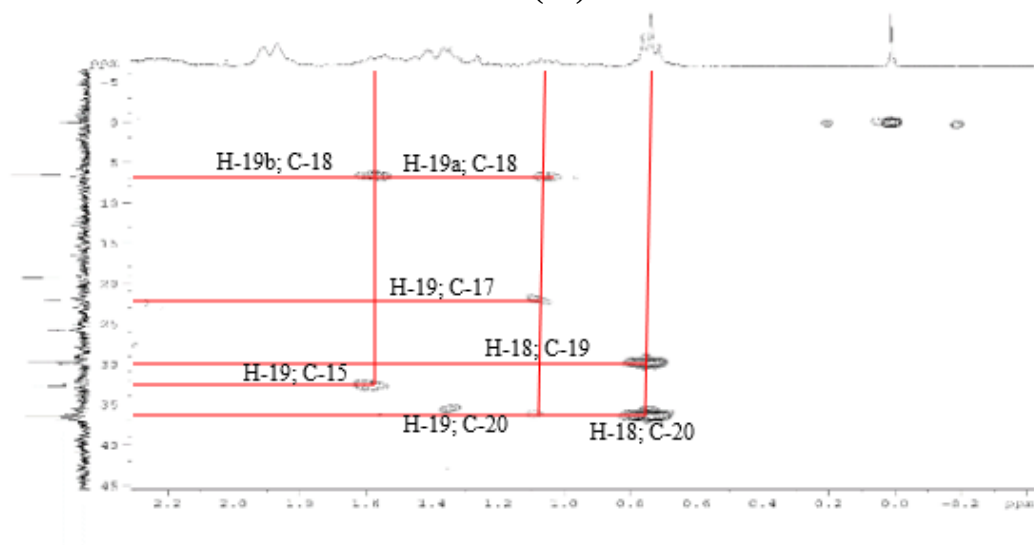
Através do espectro de HMBC do anel A foi possível observar correlações H -9 (δ_H 8,37) com carbonos nas posições C-8 e C-13 (δ_C 129,2; 134,4) respectivamente. O hidrogênio com δ_H 6,93 (H-10) apresentou correlação com carbono δ_C 147,0 e δ_C 127,5 referente aos carbonos C-11 e C-12. O hidrogênio com δ_H 4,05 (H-11') referente a uma metoxila correlaciona-se com o C-11 (δ_C 147,0) (Figura 42).

Figura 42: Correlações de HMBC do anel A da substância E (65).



Na junção dos anéis C e D o sinal em δ_H 0,74 (H-18) apresentou correlação no espectro de HMBC com os carbonos δ_C 29,8 e δ_C 36,4, C-19 e C-20, respectivamente. Os hidrogênios geminais, δ_H 1,58 e δ_H 1,07 (H-19) apresentaram correlações com os carbonos δ_C 6,7 (C-18), δ_C 22,0 (C-17) e δ_C 36,4 (C-20) (Figura 43).

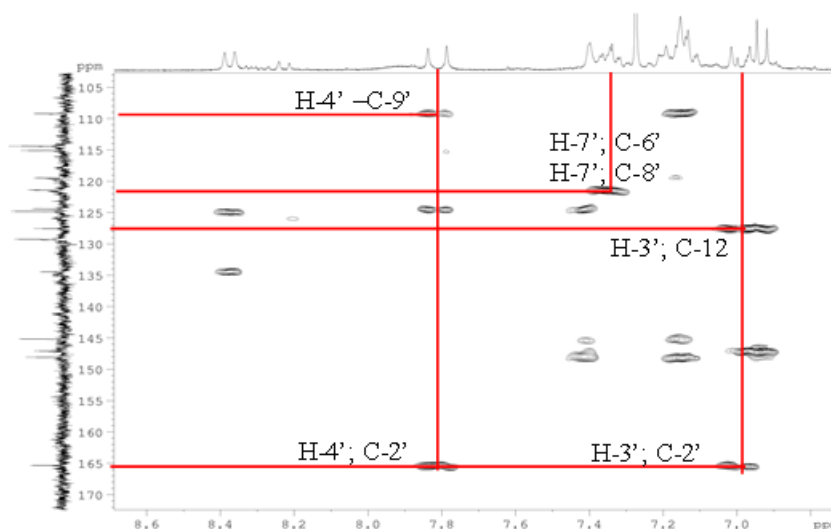
Figura 43: Algumas correlações observadas no HMBC da junção dos anéis C e D da substância E (65).



Pelos dados obtidos nos espectros foi observado que parte da estrutura proposta tem semelhança com aspidoscarpina (**41**), sendo que nesta o carbono na posição 12 (C-12) apresenta uma hidroxila (OH), entretanto a estrutura proposta apresenta um substituinte que possui hidrogênios aromáticos e olefínicos.

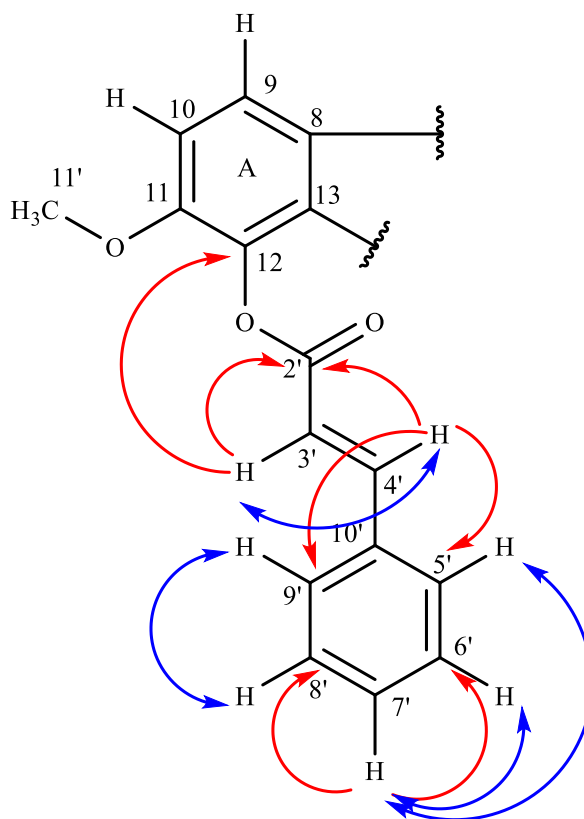
No mapa de correlações HMBC observou-se que o H-3' (δ_H 6,99) possui correlação do tipo 4J com C-12 (δ_C 127,5) do anel A e com o C-2' (δ_C 165,3). O hidrogênio olefínico na posição 4' (δ_H 7,81) correlaciona-se (3J) com os carbonos C-2' (δ_C 165,3), C-5' (δ_C 124,4) e C-9' (δ_C 109,1). Também destacamos a correlação do hidrogênio H-7' (δ_H 7,34) com os carbonos C-6' (δ_C 121,4) e C-8' (δ_C 121,3), ambas do tipo 2J (Figura 44).

Figura 44: Algumas correlações observadas no HMBC do substituinte da substância E (**65**)



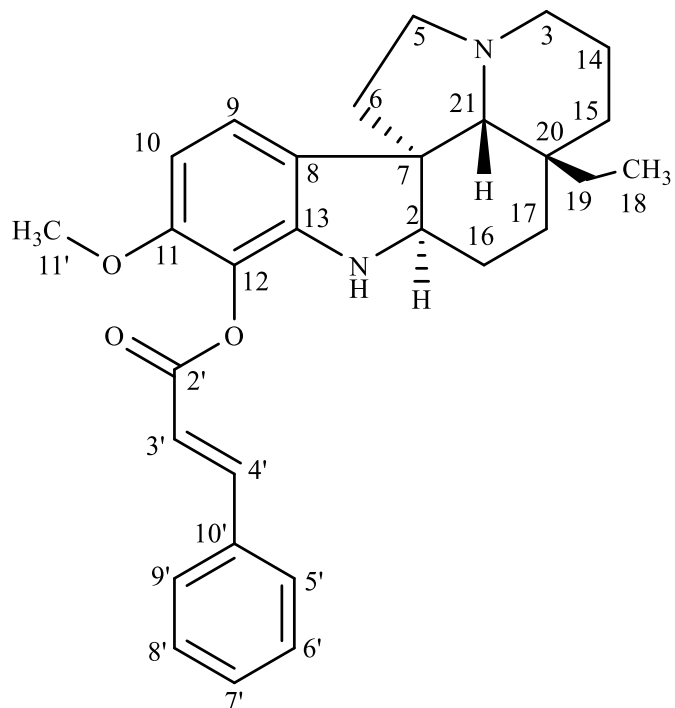
Na análise do espectro de COSY do substituinte correlacionado ao C-12 foram verificados os seguintes acoplamentos: H-3' (δ_H 6,99) e H-4' (δ_H 7,81); H-7' (*ddd*, δ_H 7,34) e H-6' e H-5'; H-8' (δ_H 7,15) e H-9' (δ_H 7,40) (Figura 45). Os hidrogênios H-6', H-8' e H-9' apresentaram-se na forma de multipletos e utilizando o método de Hoyer *et al.* (1994), foi possível encontrar os seus respectivos J (H-6', J = 6,6; 1,8 Hz; H-8', J = 8,0 Hz; H-9', J = 8,2; 2,2 Hz).

Figura 45: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) observadas nos espectros da substância E (**65**).



Através do conjunto dos dados das correlações e acoplamentos obtidos foi possível obter uma proposta viável para uma estrutura contendo como substituinte na posição do 12 (anel A) um derivado do ácido cinâmico, contudo não foram encontrados dados na literatura para estabelecer uma comparação com a estrutura proposta (Figura 46) cuja massa é 458,2569 e fórmula $C_{29}H_{35}N_2O_3$ sendo todos os dados descritos na tabela 12.

Figura 46: Proposta de estrutura para a substância E 65.



12-cinamoiloxy-11-metoxiaspidospermidina

Não foi possível adquirir dados de rotação óptica para esta substância até o presente momento. A estereoquímica dos centros estereogênicos apresentadas em parte da estrutura acima são as mesmas da (+)-aspidospermidina sintetizada por Iyegar *et al.*, (2000).

Tabela 12: Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) observados para o alcaloide (**65**) em CDCl_3 .

RMN de ^{13}C (δ_{C})			Bidimensionais		
Posição	Obs.		^1H (δ_{H})	HMBC	COSY
C-2	63,5	CH	5,39 (<i>dd</i> , $J = 6,0$; 5,3 Hz)	6,94 (F)	1,55; 2,22
C-3	53,2	CH_2	2,71(<i>m</i>)		
			3,88 (<i>m</i>)		1,89; 2,27
C-5	51,3	CH_2	2,89 (<i>m</i>)		1,89
			4,04 (<i>ddd</i> , $J = 13,3$; 10,5; 10,0)		1,89; 2,60
C-6	36,8	CH_2	1,89 (<i>dl</i> , $J = 13,0$ Hz)		4,04
			2,60 (<i>m</i>)		4,04
C-7	51,5	C			
C-8	124,7	C		8,37; 7,34	
C-9	119,4	CH	8,37 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	7,12; 7,15	7,34
C-10	114,3	CH	6,93 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)		7,15 (N)
C-11	147,0	C		4,05; 6,93	
C-12	127,5	C		6,93; 6,99	
C-13	134,4	C		8,37	
C-14	19,3	CH_2	1,89 (<i>m</i>)		2,89
			2,27 (<i>m</i>)		

Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) observados para o alcaloide (**65**) em CDCl_3 (continuação da Tabela 12).

RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais		
Posição	Obs.		¹ H (δ _H)	HMBC	COSY
C-15	32,7	CH ₂	1,89 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 13,0 Hz) *	1,58	
			1,44 (<i>m</i>)		
C-16	25,7	CH ₂	1,55 (<i>m</i>)		5,39
			2,22 (<i>m</i>)		
C-17	22,0	CH ₂	1,41 (<i>m</i>)	1,07	
			2,46 (<i>m</i>)		
C-18	6,7	CH ₃	0,74 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)	1,58; 1,07	1,58; 1,07
C-19	29,8	CH ₂	1,07 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,3; 7,4 Hz)	0,74	0,74; 1,58
			1,58 (<i>m</i>)		0,74; 1,07
C-20	36,4	C		0,74; 1,07; 1,58	
C-21	71,9	CH	3,29 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 8,9 Hz) *	1,07	
C-2'	165,3	C		6,99; 7,81	
C-3'	115,0	CH	6,99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,0 Hz)	7,81	7,81
C-4'	145,1	CH	7,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,0 Hz)	7,15; 7,40	6,99
C-5'	124,4	CH	7,12 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,8 Hz)	7,40; 7,81	
C-6'	121,4	CH	7,15 (<i>m</i> , 8,0; 1,8 Hz) **	7,34	6,93
C-7'	129,2	CH	7,34 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 6,6; 2,2; 1,8 Hz)		8,37; 7,15; 7,12

Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) observados para o alcaloide (**65**) em CDCl_3 (continuação da Tabela 12).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			Bidimensionais		
Posição	Obs.		^1H (δ_{H})	HMBC	COSY
C-8'	121,3	CH	7,15 (<i>m</i> , $J = 8,0$ Hz) **	7,34	6,93
C-9'	109,1	CH	7,40 (<i>m</i> , $J = 7,0$; $1,8$ Hz) **	7,15; 7,81	
C-10'	148,0	C		7,15; 7,40	
C-11'	56,5	CH_3	4,05 (<i>s</i>)		
NH			11,67		3,29

5.2.2.3 Elucidação estrutural da substância G, C1Gu-13D (33)

A substância G (33), positiva para alcaloide, apresentou um pico base de m/z 288,68 e o íon molecular $572,12 + 2H$ no espectro de massas (Anexo 38). Mbeunkui e colaboradores (2012b) obteve resultado semelhante em análise de MS de alta resolução, onde descreveu um pico de m/z 287,1825 ($M+2H$)²⁺.

A partir análise dos seus dados de RMN 1D (¹H e ¹³C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY E NOESY) apresentados na Tabela 13 e nos Anexos 39 a 44, do espectro de massas com ionização por *eletrospray* (Anexo 38) e comparação com os dados da literatura (MBEUNKUI *et al.*, 2012b) descritos na tabela 14 foi confirmada a estrutura do alcaloide G como geissolosimina (33, Figura 47), com fórmula molecular C₃₈H₄₄N₄O. O que segue é uma discussão das principais características dos espectros e correlações de sinais observados nos espectros de RMN. A estereoquímica dos centros estereogênicos apresentadas na estrutura (Figura 47) são as mesmas utilizadas por Mbeunkui *et al.* (2012a).

Figura 47: Estrutura molecular da substância G, alcaloide geissolosimina (33).

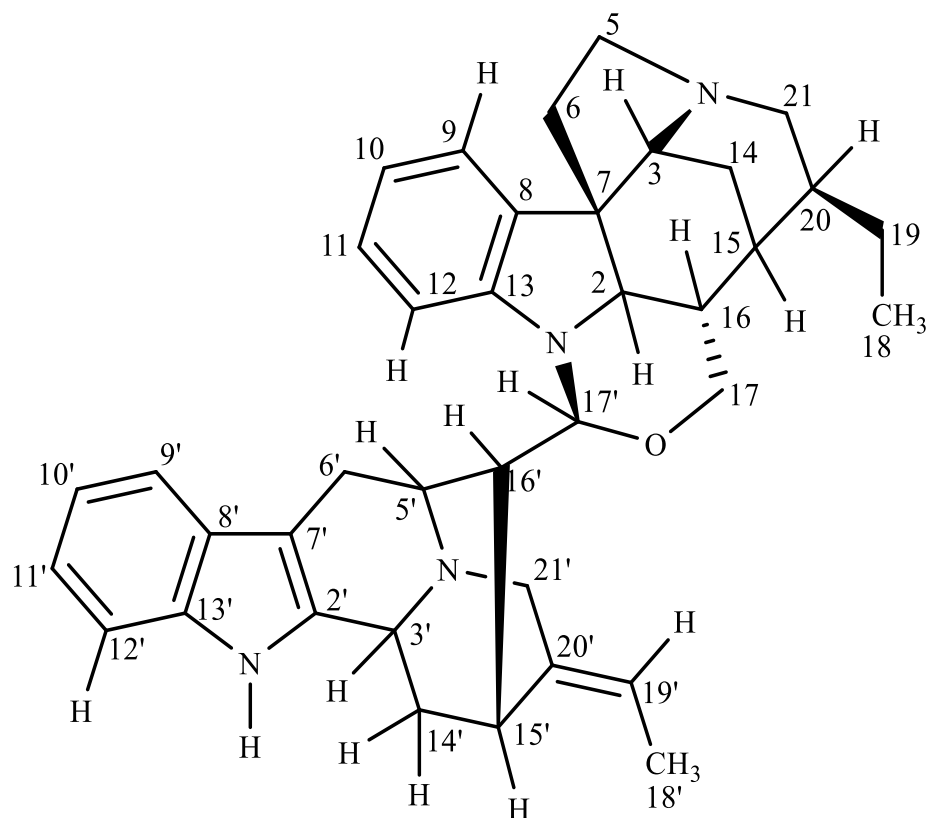


Tabela 13: Dados de RMN 1D e 2D da substância G (33) (C1Gu-13D) em DMSO-*d*₆, 300/75 MHz; ppm.

RMN de ¹³ C (δ _C)				Bidimensionais		
Posição	¹³ C (δ _C)	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY	NOESY
C-2	66,9	CH	3,65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,22 Hz)	3,16; 5,07	1,88	1,98
C-3	64,5	CH	3,08 (<i>m</i>)		1,28; 1,53	7,12
C-5	54,5	CH ₂	3,05 (<i>m</i>) 2,75 (<i>m</i>)		2,30	
C-6	47,4	CH ₂	2,30 (<i>m</i>) 2,06 (<i>m</i>)			
C-7	51,8	C	-			
C-8	135,3	C	-	6,45; 6,64		
C-9	123,0	CH	7,12 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	7,06	6,64	3,08
C-10	118,1	CH	6,64 (<i>tap</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	6,45	7,06; 7,12	6,45
C-11	128,4	CH	7,06 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 1,2 Hz)	7,12	6,45; 6,64	3,65
C-12	105,2	CH	6,45 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,64	7,06	5,07; 7,06
C-13	150,6	C	-	7,06; 7,12		
C-14	25,1	CH ₂	1,53 (<i>m</i>) 1,28 (<i>m</i>)		3,08 3,08	
C-15	29,6	CH	1,22 (<i>m</i>)			1,38; 1,88
C-16	36,4	CH	1,88 (<i>m</i>)		3,16	0,94; 1,22
C-17	64,3	CH ₂	3,16 (<i>m</i>)		1,88	
C-18	11,9	CH ₃	0,67 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)		0,94, 1,38	
C-19	24,4	CH ₂	0,94 (<i>m</i>)	0,67	0,67	1,88

Dados de RMN 1D e 2D da substância G (**33**) (C1Gu-13D) em DMSO-*d*₆, 300/75 MHz; ppm (continuação da Tabela 13).

RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais			
Posição	¹³ C (δ _C)	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY	NOESY
C-20	41,8	CH	1,38 (<i>m</i>)	0,67	0,94	
C-21	54,0	CH ₂	2,66 (<i>m</i>)		1,38	
C-2'	140,1	C	-	4,07; 10,87		
C-3'	50,2	CH	4,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,2 Hz)		1,62; 1,99	10,87
C-5'	53,9	CH	2,66 (<i>m</i>)		2,42	5,07
C-6'	26,6	CH ₂	2,42 (<i>d</i> , <i>J</i> = 13,9 Hz) 2,63 (<i>m</i>)		2,66	
C-7'	103,1	C	-	10,87		
C-8'	127,6	C	-	6,94; 7,28; 10,87		
C-9'	117,3	CH	7,26 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,98	6,94; 6,98	
C-10'	118,9	CH	6,94 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,2 Hz)	7,28	7,26	
C-11'	120,7	CH	6,98 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,8; 1,5 Hz)	7,26	7,28	
C-12'	111,6	CH	7,28 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,9 Hz)		6,94; 6,98	10,87
C-13'	136,6	C	-	6,98; 7,26; 7,28; 10,87		
C-14'	33,8	CH ₂	1,62 (<i>m</i>) 1,99 (<i>m</i>)		4,07	1,98; 1,99; 2,96 1,62; 1,64; 2,96
C-15'	27,4	CH	2,96 (<i>sl</i>)	5,43	1,64; 1,98	1,62; 1,64; 1,99
C-16'	45,3	CH	1,98 (<i>m</i>)		1,62; 2,96; 4,07; 5,07	1,62; 3,65
C-17'	83,5	CH	5,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	3,16; 3,65	1,98	2,66; 6,45
C-18'	13,3	CH ₃	1,64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)		3,50; 5,43	2,96; 4,07

Dados de RMN 1D e 2D da substância G (**33**) (C1Gu-13D) em DMSO-*d*₆, 300/75 MHz; ppm (continuação da Tabela 13).

RMN de ¹³ C (δ _c)			Bidimensionais			
C	¹³ C (δ _c)	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY	NOESY
C-19'	115,9	CH	5,43 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	1,64	1,64; 3,50	
C-20'	137,3	C	-	1,62		
C-21'	56,0	CH ₂	3,50 (<i>m</i>)		5,43	1,62
NH'	0		10,87		4,07; 7,28	

Tabela 14: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H e comparação com a literatura para da substância G (33) (C1Gu-13D) em DMSO- d_6 .

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
Posição	Obs. (DMSO- d_6 .)	Literatura* CD $_3$ OD	Obs. (DMSO- d_6 .)	Literatura* (CD $_3$ OD)
C-2	66,9 (CH)	68,3	3,65 (<i>d</i> , $J = 9,22$ Hz)	3,77 (<i>d</i> , 9,5 Hz)
C-3	64,5 (CH)	65,2	3,08 (<i>m</i>)	3,26 (<i>m</i>)
C-5	54,5 (CH $_2$)	55,1	3,05 (<i>m</i>); 2,75 (<i>m</i>)	3,21 (<i>d</i> , $J = 11,0$ Hz); 2,94 (<i>t</i> , 11,0)
C-6	47,4 (CH $_2$)	47,4	2,06 (<i>m</i>) 2,30 (<i>m</i>);	2,23 (<i>t</i> , $J = 11,6$ Hz) 2,48 (<i>m</i>)
C-7	51,8 (C)	52,9	-	-
C-8	135,3 (C)	135,3	-	-
C-9	123,0 (CH)	123,8	7,12 (<i>dl</i> , $J = 7,2$ Hz)	7,12 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
C-10	118,1 (CH)	119,8	6,64 (<i>tap</i> , $J = 7,2$ Hz)	6,71 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-11	128,4 (CH)	129,7	7,06 (<i>dd</i> , $J = 8,0$; 1,2 Hz)	7,09 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-12	105,2 (CH)	106,8	6,45 (<i>dl</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,49 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
C-13	150,6 (C)	152,0	-	-
C-14	25,1 (CH $_2$)	25,9	1,28 (<i>m</i>) 1,53 (<i>m</i>)	1,45 (<i>dt</i> , $J = 13,8$; 3,0 Hz) 1,66 (<i>d</i> , $J = 6,9$ Hz);
C-15	29,6 (CH)	31,2	1,22 (<i>m</i>)	1,29 (<i>m</i>)
C-16	36,4 (CH)	37,7	1,88 (<i>m</i>)	1,98 (<i>m</i>)
C-17	64,3 (CH $_2$)	65,6	3,16 (<i>m</i>)	3,15 (<i>dd</i> , $J = 11,4$ Hz)
C-18	11,9 (CH $_3$)	11,9	0,67 (<i>t</i> , $J = 7,3$ Hz)	0,71 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-19	24,4 (CH $_2$)	25,5	0,94 (<i>m</i>)	0,96 (<i>m</i>)
C-20	41,8 (CH)	43,0	1,38 (<i>m</i>)	1,51 (<i>m</i>)
C-21	54,0 (CH $_2$)	55,0	2,66 (<i>m</i>)	1,75
C-2'	140,1 (C)	139,5	-	-
C-3'	50,2 (CH)	52,1	4,07 (<i>d</i> , $J = 9,2$ Hz)	4,19 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz)
C-5'	53,9 (CH)	55,8	2,66 (<i>m</i>)	2,85 (<i>m</i>)
C-6'	26,6 (CH)	27,4	2,42 (<i>d</i> , $J = 13,9$ Hz) 2,63 (<i>m</i>)	2,65 (<i>d</i> , $J = 15,0$ Hz) 2,84 (<i>m</i>)
C-7'	103,1 (C)	104,5	-	-

Dados de RMN de ^{13}C e ^1H e comparação com a literatura para da substância G (33) (C1Gu-13D) em DMSO- d_6 (continuação da Tabela 14).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
Posição	Obs. (DMSO- d_6)	Literatura* CD $_3$ OD	Obs. (DMSO- d_6)	Literatura* (CD $_3$ OD)
C-8'	127,6 (C)	128,7	-	-
C-9'	117,3 (CH)	118,3	7,26 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	7,34 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz)
C-10'	118,9 (CH)	120,1	6,94 (<i>dd</i> , $J = 7,0$; 1,2 Hz)	7,06 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-11'	120,7 (CH)	122,3	6,98 (<i>dd</i> , $J = 7,8$; 1,5 Hz)	6,99 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)
C-12'	111,6 (CH)	112,3	7,28 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz)	7,32 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
C-13'	136,6 (C)	138,5	-	-
C-14'	33,8 (CH $_2$)	34,4	1,62 (<i>m</i>)	1,79 (<i>m</i>)
			1,99 (<i>m</i>)	2,13 (<i>m</i>)
C-15'	27,4 (CH)	28,4	2,96 (<i>sl</i>)	3,12 (<i>bs</i>)
C-16'	45,3 (CH)	46,3	1,98 (<i>m</i>)	2,11 (<i>m</i>)
C-17'	83,5 (CH)	84,6	5,07 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	5,16 (<i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
C-18'	13,3 (CH $_3$)	13,4	1,64 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	1,69 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)
C-19'	115,9 (CH)	118,8	5,43 (<i>q</i> , $J = 6,5$ Hz)	5,54 (<i>q</i> , $J = 6,5$ Hz)
C-20'	137,3 (C)	136,3	-	-
C-21'	56,0 (CH $_2$)	56,8	3,50 (<i>m</i>)	3,59 (<i>m</i>)

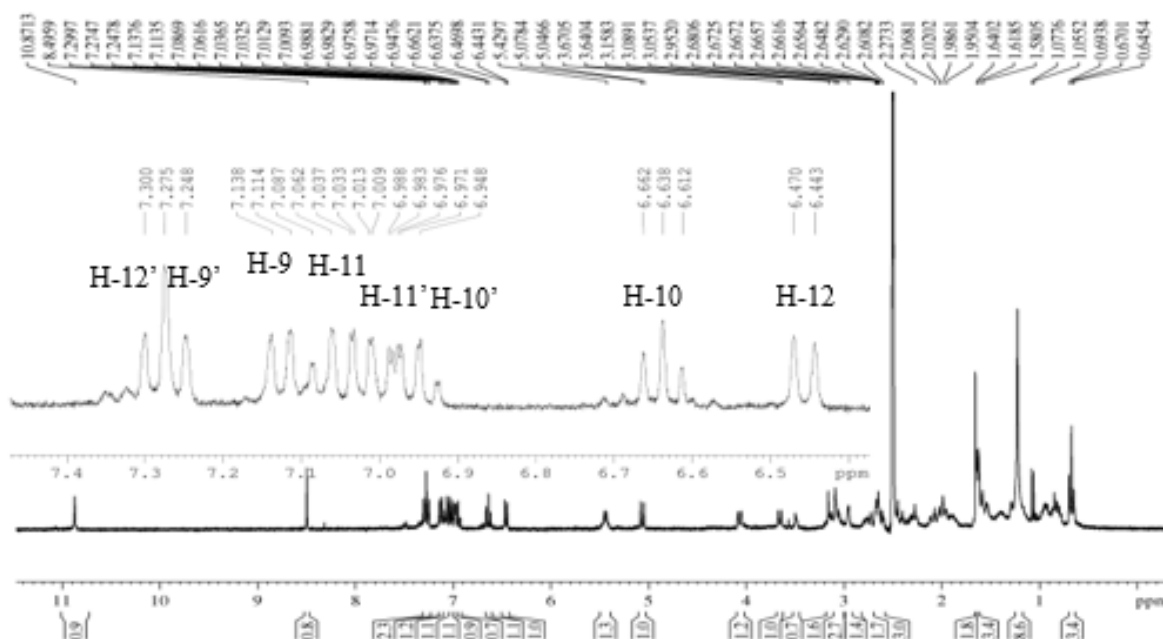
Dados da literatura: * Mbeunkui *et al.* (2012b) em CD $_3$ OD, 600 MHz/150 MHz

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 39) foram observados dois grupos de quatro sinais na região de aromáticos, porém não foram observadas correlações entre os dois grupos. No entanto os hidrogênios de cada grupo apresentam correlações entre si, podendo-se concluir que estes grupos pertencem a estruturas diferentes, as quais foram denominadas I e II.

No espectro de ^1H (Figura 48) foram observados os hidrogênios com os seguintes deslocamentos no anel A da estrutura I: δ_{H} 7,12 (*d*, $J = 7,5$ Hz; H -9), δ_{H} 7,06 (*ddd*; $J = 7,7$; 1,2; Hz, H-11), δ_{H} 6,64 (*dd*, $J = 7,0$; 1,2 Hz, H - 10'), δ_{H} 6,45 (*d*; $J = 8,0$ Hz, H - 12), enquanto o outro grupo foi atribuído ao anel A': δ_{H} 7,28 (*d*, $J = 7,9$ Hz; H -12'), δ_{H} 7,26 (*d*; $J = 8,0$ Hz; H-9'), δ_{H} 6,98 (*dd*, $J = 7,8$; 1,5 Hz, H - 11'), δ_{H} 6,94 (*dd*; $J = 7,0$; 1,2 Hz, H - 12). Também foi observado

um sinal de hidrogênio olefínico com δ_H 5,43 (q, $J = 6,5$ Hz; H-19') e um duplete com δ_H 5,07 (d, $J = 9,0$ Hz; H -17').

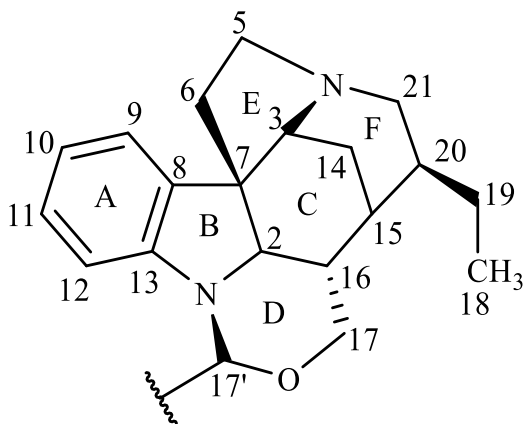
Figura 48: Espectro de RMN de 1H (300/75 MHz) e ampliação de alguns hidrogênios da substância G (**33**), DMSO- d_6 .



O espectro de RMN de ^{13}C (anexo 40) apresentou trinta e oito linhas espectrais de carbono descritas na tabela 13. Após análise do mapa de correlação HSQC (anexo 41) foi possível observar dezenove linhas espectrais de carbonos metínicos (CH), nove de metilênicos (CH₂), oito de carbonos quaternários (C) e dois metílicos (CH₃). Os dados observados no espectro de HSQC (Anexo 41) e as correlações obtidas no HMBC (Anexo 42) e os acoplamentos em COSY (Anexo 43) e NOESY (Anexo 44) foram descritos na tabela 13.

Na parte I da substância obtivemos uma estrutura com seis anéis A, B, C, D, E e F, da classe dos alcaloides indolínicos (Figura 49).

Figura 49: Disposição dos anéis da parte I da substância G (**33**).

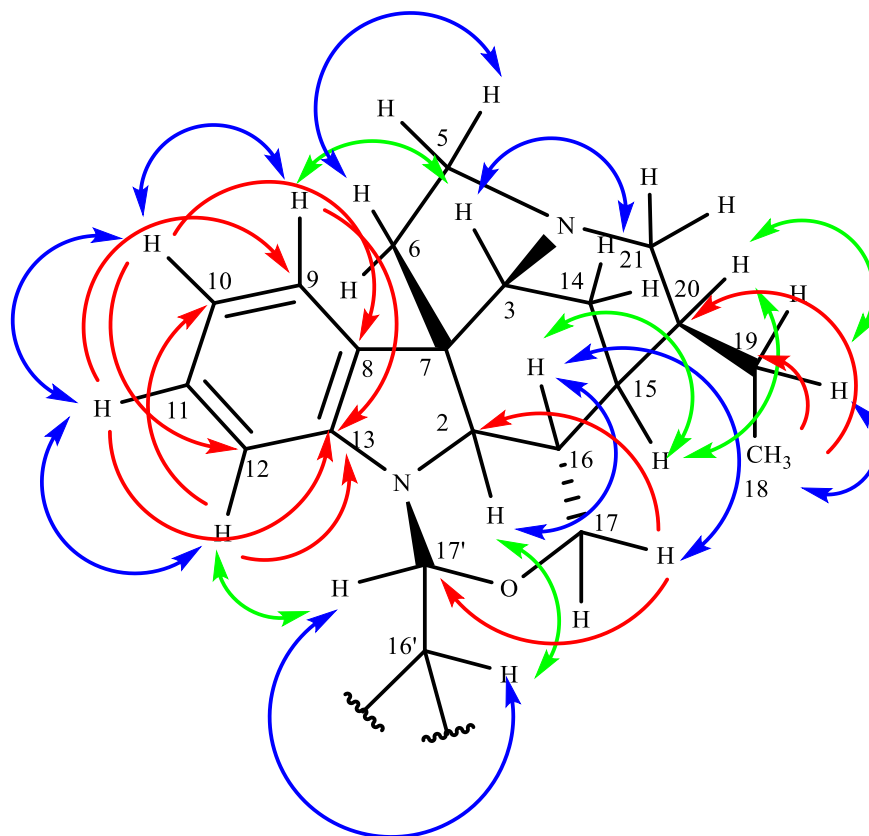


A configuração dos carbonos e hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos na parte I da estrutura foi baseada na análise dos espectros de HMBC, COSY e NOESY (Figura 50) as quais estão descritas na tabela 13 e apresentados nos anexos 42 a 44 respectivamente.

O espectro de COSY mostrou o acoplamento do hidrogênio δ_H 5,07 (H-17') com o hidrogênio adjacente H-16' (δ_H 1,98) (Figura 50), definindo a posição onde as estruturas se unem por uma ligação covalente carbono-carbono (C-17' da parte I e C-16' da parte II) e o que possibilitou inferir que esta substância apresenta a estrutura de um alcaloide bisindólico, possuindo duas unidades de alcaloide indol monoméricas como seus constituintes obrigatórios (RAHMAN *et al.*, 2016).

Através do espectro de HMBC foi possível observar as correlações dos hidrogênios aromáticos H-11 (δ_H 7,06) com carbonos nas posições C-9 (δ_C 123,0) e C-13 (δ_C 150,6). O hidrogênio com δ_H 7,12 (H-9) apresentou correlação com os carbonos C-11 e C-13, com δ_C 128,4 e δ_C 150,6, respectivamente. O hidrogênio com δ_H 6,64 (H-10) correlacionou-se com os carbonos C-8 (δ_C 135,3) e C-12 (δ_C 105,6) e o H-12 (δ_H 6,45) com C-8 (δ_C 135,3) e C-10 (δ_C 118,1). Também foram observadas as correlações do hidrogênio H-2 (δ_H 3,65) com o carbono C-17' (δ_C 83,5) e do H-17 (δ_H 3,16) com os carbonos C-2 (δ_C 66,9) e C-17' (δ_C 83,5). Os hidrogênios da metila com δ_H 0,67 (H-18) apresentaram correlação com os carbonos C-19 (δ_C 24,4) e C-20 (δ_C 41,8) (Figura 50).

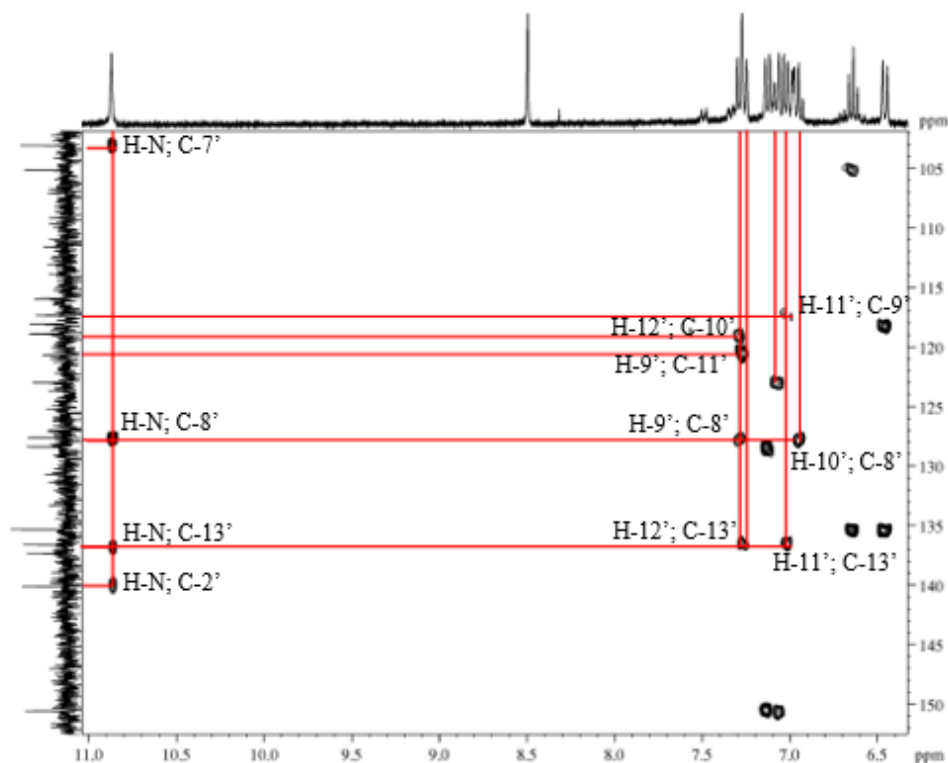
Figura 50: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) e NOESY (verde) na parte I da estrutura da substância G (**33**).



Através do espectro de HMBC da parte II foi possível observar as correlações dos hidrogênios aromáticos H -11' (δ_H 6,98) com os carbonos nas posições C-9' (δ_C 117,3) e C-13' (δ_C 136,6). O hidrogênio com δ_H 7,28 (H-12') apresentou correlação com os carbonos C-10' e C-13', com δ_C 118,9 e δ_C 136,6, respectivamente. O hidrogênio com δ_H 6,94 (H-10') correlacionou-se com o carbono C-8' (δ_C 127,6) e o H-12' (δ_H 7,28) com C-8' (δ_C 127,6) e C-13' (δ_C 136,6). Também foram observadas as correlações do hidrogênio ligado ao nitrogênio (δ_H 10,97) com os carbonos C-2' (δ_C 140,1), C-7' (δ_C 103,1), C-8' (δ_C 127,6) e C-13' (δ_C 136,6) (Figura 51). Também foi observada a correlação dos hidrogênios da metila com δ_H 1,64 (H-18') com o carbono C-19' (δ_C 115,9) e do H-14' (δ_H 1,62) com o carbono quaternário C-20' (δ_C 137,3).

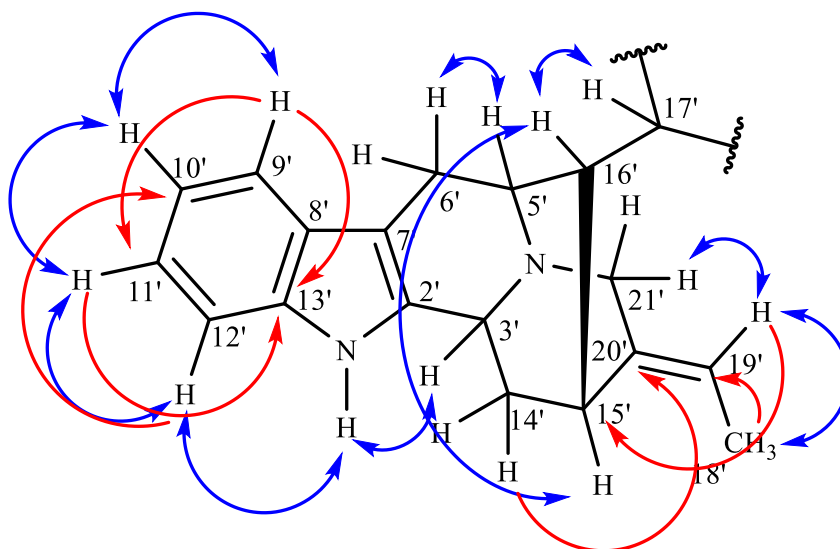
A parte II da substância G, foi identificada a partir das análises dos espectros 1D e 2D concluindo que esta é formada por cinco anéis denominados A', B', C', D' e E', a qual pertence à classe dos alcaloides indólicos (Figura 52).

Figura 51: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC da substância G (**33**).



No espectro de COSY da região de aromáticos foi observado acoplamento do hidrogênio H-9' (*d*, δ_H 7,26) com os hidrogênios H-10' (*dd*, δ_H 6,94), H-11' (*dd*, δ_H 6,98). O H-10' (*dd*, δ_H 6,94) por sua vez com H-11' (*dd*, δ_H 6,98) e com H-12' (*d*, δ_H 7,28). Na ligação entre as duas partes da estrutura o H-17' (*d*, δ_H 5,07) acoplou com o H-16' (*m*, δ_H 1,98) do anel E'. Na olefina foram observados os seguintes acoplamentos no espectro de COSY: H-19' (*q*, δ_H 5,43) com os hidrogênios H-18' (*d*, δ_H 1,64) e H-21' (*d*, δ_H 3,50). O hidrogênio ligado ao nitrogênio (*s*, δ_H 10,87) apresentou acoplamento com os hidrogênios H-3' (*d*, δ_H 4,07) e H-12' (*d*, δ_H 7,28) (Figura 52). No espectro de COSY também foi observado o acoplamento do hidrogênio H-17' (*q*, δ_H 5,07) com o hidrogênio H-16' (*m*, δ_H 1,98) (Figura 52).

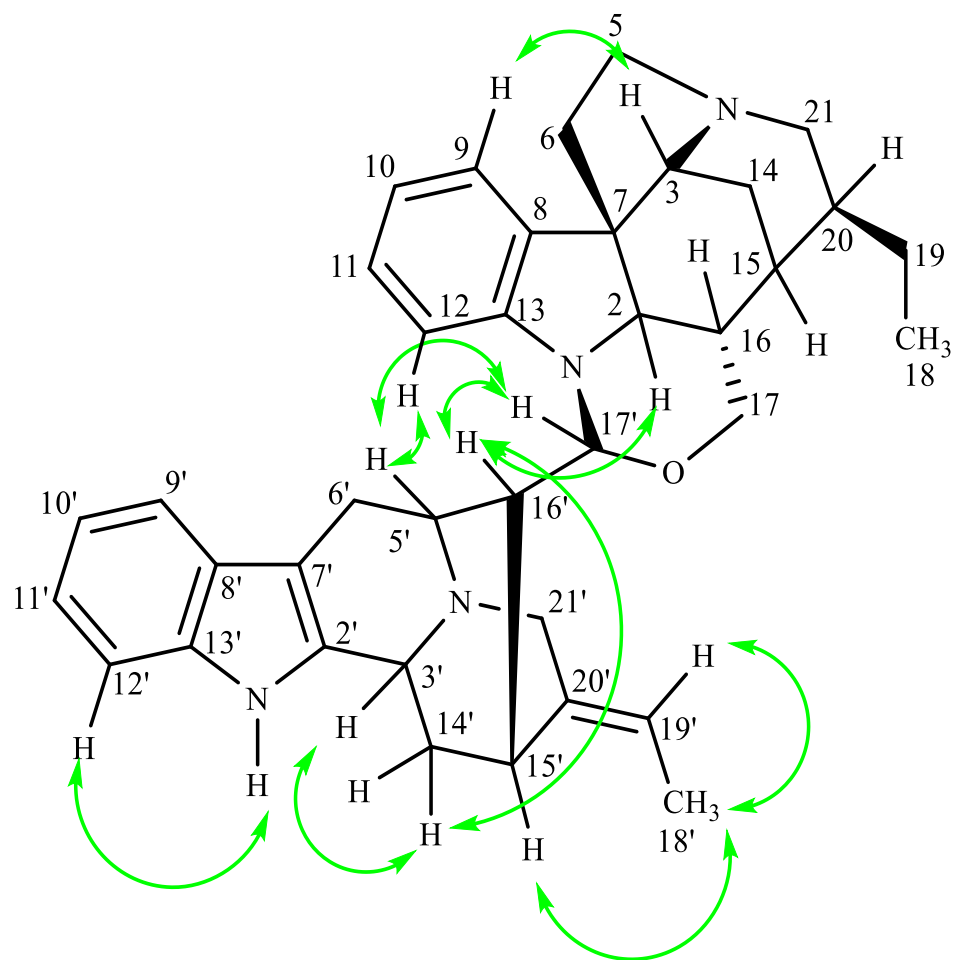
Figura 52: Alguns acoplamentos de COSY (azul), HMBC (vermelho) na parte II da estrutura da substância G (**33**).



Analisando o espectro de NOESY alguns acoplamentos foram importantes para a identificação da substância G (**33**), tais como: H-16' (*m*, δ_H 1,98) com H-2 (*m*, δ_H 3,65) e H-5' (*m*, δ_H 2,66) acoplando com H-17' (*d*, δ_H 5,07) e com H-12 (*d*, δ_H 6,45) do anel aromático da parte I (Figura 53). Os demais acoplamentos foram descritos na tabela 13.

Este alcaloide foi isolado de *Geissospermum vellosii* por Rapoport e Moore (1962) que apontaram algumas características da molécula, como um dubleto em δ_H 5,21 situado entre um oxigênio e um nitrogênio (H-17'), um quarteto (H-19') em δ_H 5,43 (olefínico), além de um dubleto em δ_H 1,71 (H-18'). Dados completos de RMN de ^{13}C e 1H foram descritos pela primeira vez por Mbeunkui *et al.* (2012b) em estudos realizados com extratos obtidos casca de *G. vellosii*.

Figura 53: Alguns acoplamentos de NOESY (verde) observados na estrutura da substância G (33).



5.2.2.4 Elucidação estrutural da substância F, C1Gu-9A (41)

A substância F apresentou-se positiva para alcaloide (Dragendorff). No espectro de massas apresentou um íon aduto em m/z 371,18 $[M+H]^+$ com t_R de 10,0 a 10,7 min (Anexo 45). A substância também foi submetida à fragmentação apresentando picos com os seguintes valores de m/z : 358,20; 329,19 $[(M+H) - C_2H_2O]$; 284,16 $[(M+H) - CH_3CH_2NH_2]$; 190,16; 164,20 e 124,22 (Anexo 45), o que está de acordo com a proposta de fragmentação descrita por Oliveira (2008).

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 15) e apresentados nos Anexos 46 a 49, do espectro de massas com ionização por *eletrospray* e a comparação com dados da literatura descritos na Tabela 16 (HENRIQUE *et al.*, 2010) foi confirmada a estrutura do alcaloide F como aspidoscarpina (**41**), com fórmula $C_{22}H_{30}N_2O_3$ (Figura 54). O que segue é uma discussão das principais características dos espectros e correlações de sinais observados nos espectros de RMN.

Figura 54: Estrutura molecular da substância F, alcaloide aspidoscarpina (**41**).

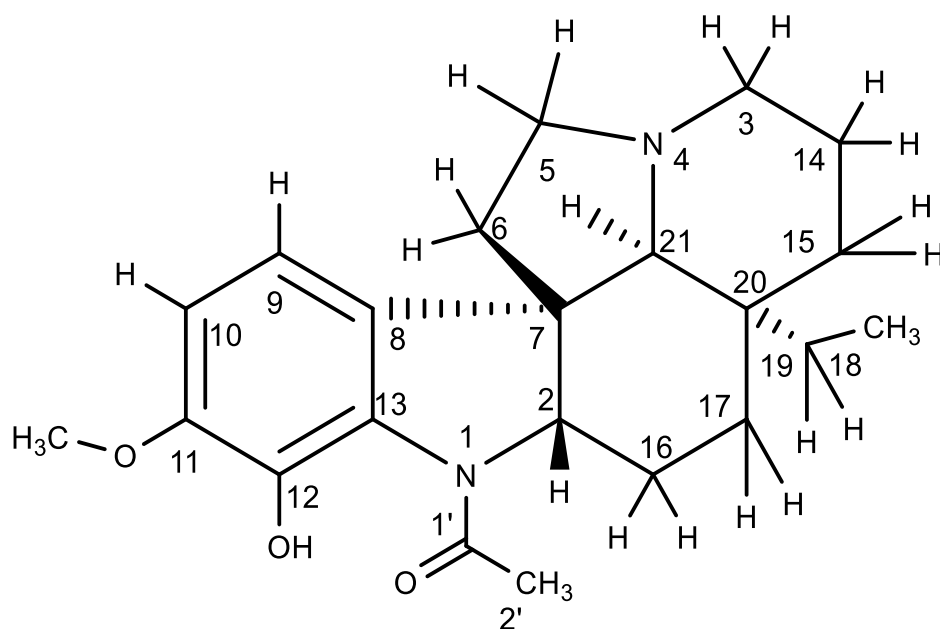


Tabela 15: Dados de RMN 1D/2D da substância F (C1Gu-9A, **41**), 300/75 MHz; ppm; (CD₃OD).

RMN de ¹³ C (δ _c)			Bidimensionais		
C	OBS.	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY
2	68,5	CH	4,34 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,0; 6,2)		1,51; 2,12
3	52,5	CH ₂	3,21 (<i>m</i>)		1,90; 3,70
			3,70 (<i>m</i>)		3,21
			2,98 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 14,2; 7,3; 7,0 Hz)		3,64
5	53,8	CH ₂	3,64 (<i>m</i>)		2,43; 2,98
6	38,2	CH ₂	1,94 (<i>m</i>)	4,34	6,88
			2,43 (<i>m</i>)		3,64
7	51,9	C	-	6,88	-
8	138,4	C	-	6,86	-
9	112,1	CH	6,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)		1,94
10	114,1	CH	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)		
11	151,3	C	-	3,83; 6,86; 6,88	-
12	131,0	C	-	4,34; 6,86	-
13	128,1	C	-	4,34; 6,88	-
14	20,6	CH ₂	1,90 (<i>m</i>)		1,50; 3,21; 3,73
15	33,4	CH ₂	1,50 (<i>m</i>)	1,45	1,83; 1,90
			1,83 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 15,0 Hz)		1,50
16	25,5	CH ₂	1,51		4,34
			2,12 (<i>m</i>)		1,82; 4,34
17	22,8	CH ₂	1,45 (<i>m</i>)	1,08	
			1,82 (<i>m</i>)		2,12
18	6,85	CH ₃	0,73 (<i>t</i> ; <i>J</i> = 7,3)	1,08; 1,45	
19	30,6	CH ₂	1,08 (<i>m</i>)	0,73	
			1,45 (<i>m</i>)		

Dados de RMN 1D/2D da substância F (C1Gu-9A, **41**), 300/75 MHz; ppm; (CD₃OD)
(continuação da Tabela 15).

RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais		
C	OBS.	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY
20	37,0	C	-	0,73; 1,08; 1,45	-
21	72,0	CH	3,73 (<i>m</i>)		1,90
1''	171,6	C	-	2,38	-
2'	22,8	CH ₃	2,38 (<i>s</i>)		
MeO	57,1	CH ₃	3,83 (<i>s</i>)		

Tabela 16: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância F (300/75 MHz) e comparação com a literatura (CDCl_3) para a aspidoscarpina (**41**).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Obs. (CD_3OD)	Lit.* (CDCl_3)	Obs (CD_3OD)	Lit.* (CDCl_3)
2	68,5 (CH)	70,5	4,34 (<i>dd</i> , $J = 11,0$; 6,2)	4,36 (<i>dd</i> , $J = 11,0$; 6,0)
3	52,5 (CH_2)	53,9	3,21 (<i>m</i>)	1,93-2,08 (<i>m</i>)
			3,70 (<i>m</i>)	3,04 (<i>d</i> , $J = 11,0$)
5	53,8 (CH_2)	52,7	2,98 (<i>ddd</i> , $J = 14,2$; 7,3; 7,0 Hz)	2,26 (<i>m</i>)
			3,64 (<i>m</i>)	3,12 (<i>ddd</i> , $J = 9,0$; 9,0; 2,0)
6	38,2 (CH_2)	39,6	1,94 (<i>m</i>)	1,46-1,68 (<i>m</i>)
			2,43 (<i>m</i>)	1,93-2,08 (<i>m</i>)
7	51,9 (C)	52,4	-	-
8	138,4(C)	137,8	-	-
9	112,1 (CH)	112,6	6,88 (<i>d</i> , $J = 8,2$)	6,61 (<i>d</i> , $J = 8,0$)
10	114,1 (CH)	110,3	6,86 (<i>d</i> , $J = 8,2$)	6,69 (<i>d</i> , $J = 8,0$)
11	151,3 (C)	149,6	-	-
12	131,0 (C)	133,3	-	-
13	128,1 (C)	127,7	-	-
14	20,6 (CH_2)	23,2	1,90 (<i>m</i>)	1,93-2,08 (<i>m</i>)
				1,14 (<i>d</i> , $J = 13,5$)
15	33,4 (CH_2)	34,3	1,50 (<i>m</i>)	1,09 (<i>dd</i> , $J = 13,5$; 4,5)
			1,83 (<i>dl</i> , $J = 15,0$ Hz)	1,46-1,68 (<i>m</i>)
16	25,5 (CH_2)	25,4	1,51 (<i>m</i>)	1,82-1,89 (<i>m</i>)
			2,12 (<i>m</i>)	1,46-1,68 (<i>m</i>)
17	22,8 (CH_2)	21,8	1,45 (<i>m</i>)	1,46-1,68 (<i>m</i>)
			1,82 (<i>m</i>)	1,71 (<i>dd</i> , $J = 13,0$; 3,5)
18	6,8 (CH_3)	7,0	0,73 (<i>t</i> ; $J = 7,3$)	0,64 (<i>t</i> ; $J = 7,5$)

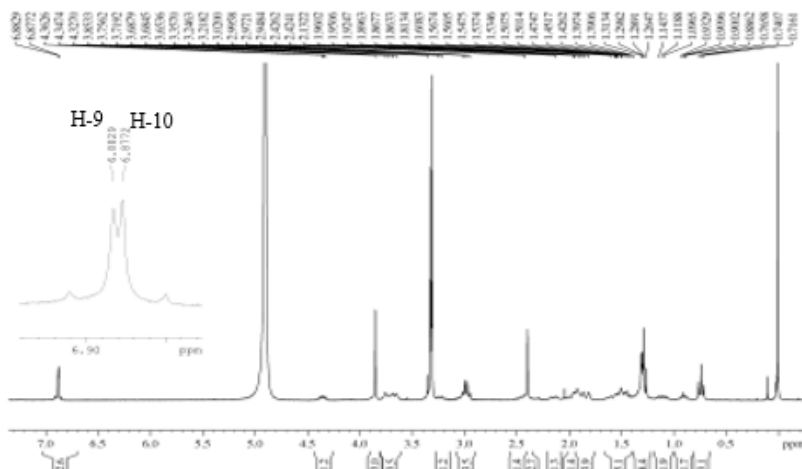
Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância F (300/75 MHz) e comparação com a literatura para a substância aspidoscarpina (**41**) (continuação da Tabela 16).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})	
C	Obs. (CD_3OD)	Lit. (CDCl_3)	Obs (CD_3OD)	Lit. (CDCl_3)
19	30,6 (CH_2)	30,3	1,08 (m) 1,45 (m)	0,86 (dq; $J = 14,0; 7,0$) 1,38 (dq; $J = 14,0; 7,0$)
20	37,0 (C)	35,7	-	-
21	72,0 (CH)	70,9	3,73 (m)	2,23 (s)
1'	171,6 (C)	169,5	-	-
2'	22,8 (CH_3)	22,9	2,38 (s)	2,32 (s)
MeO	57,1 (CH_3)	53,7	3,83 (s)	3,87 (s)
OH				10,95

*Henrique *et al.*, 2010.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 46) foram observados dois hidrogênios na região de aromáticos com δ_{H} 6,88 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-9) δ_{H} 6,86 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-10), que acoplam entre si (Figura 55). No mesmo espectro foi observado um singlete em δ_{H} 3,83 com integral para três hidrogênios.

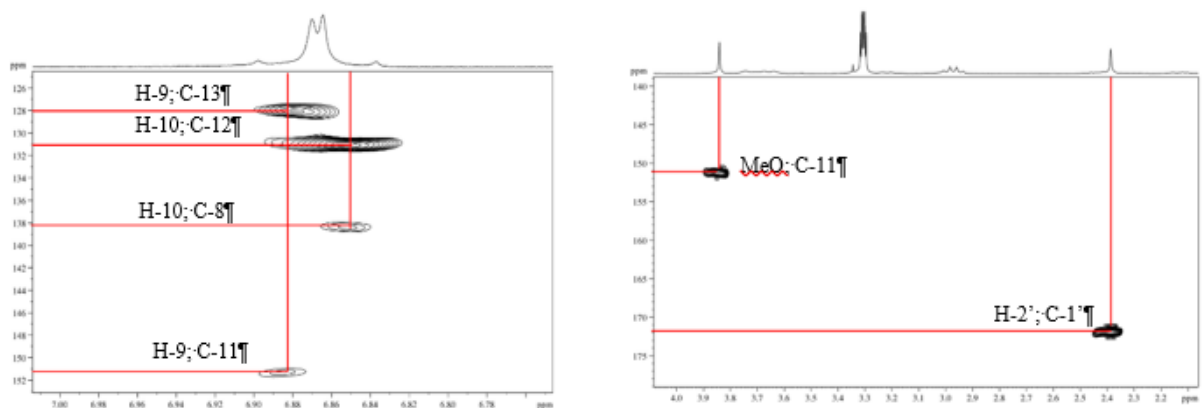
Figura 55: Espectro de ^1H da substância F (**41**)



A presença de uma etila foi caracterizada através de um tripleto em δ_H 0,74 (3H, *t*, $J = 7,3$ Hz), além dos hidrogênios com δ_H 1,10 e δ_H 1,45 (ambos *m*). Também foi observada um sinal (*s*) integrando para três hidrogênios em δ_H 2,39, característico de uma metila ligada a um carbono carbonílico. A atribuição dos hidrogênios metilênicos e metínicos foi feita através do espectro de HSQC (Anexo 47) os quais estão descritos na tabela 15.

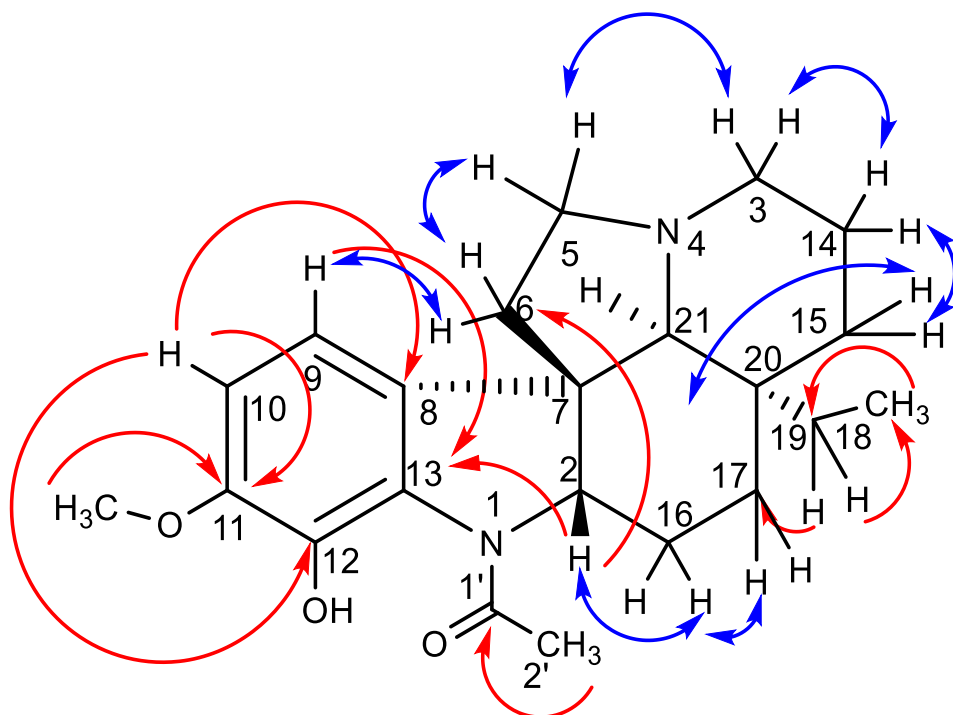
No espectro de HMBC foi possível observar as seguintes correlações: H -9 (δ_H 6,88) com os carbonos nas posições C-7 (δ_C 51,9), C-11 (δ_C 151,3) e C-13 (δ_C 128,1). O hidrogênio com δ_H 6,86 (H-10) apresentou correlação com os carbonos C-8 e C-12, com δ_C 138,4 e δ_C 131,0, respectivamente. Os hidrogênios com δ_H 3,83 (MeO) correlacionaram-se apenas com o carbono C-11 (δ_C 151,3) enquanto o H-2 (δ_H 4,34) apresentou correlação com C-6 (δ_C 38,), C-12 (δ_C 131,0) e C-13 (δ_C 128,1). Também foram observadas as correlações dos hidrogênios metílicos H-2' (δ_H 2,38) com o carbono C-1' (δ_C 171,6). A metila em δ_H 0,73 (H-18) apresentou correlação com os carbonos C-19 (δ_C 30,6) e C-20 (δ_C 37,0) e os hidrogênios H-19 (δ_H 1,08 e 1,45) com os carbonos C-18 (δ_C 6,85) e C-20 (δ_C 37,0) (Figura 56 e 57; anexo 48).

Figura 56: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC da substância F (41).



Através da análise do espectro de COSY foi possível destacar alguns acoplamentos, como: H-2 (δ_H 4,36) com os hidrogênios H-16 (δ_H 1,51; 2,12); entre H-16 (δ_H 2,12) e H-17 (δ_H 1,82); H-6 (δ_H 2,12) com H-9 (δ_H 6,88). Também foram observados os acoplamentos entre o H-14 (δ_H 1,90) e H-15 (δ_H 1,50) e H-21 (δ_H 3,73m) (Figura 57; anexo 49).

Figura 57: Algumas correlações de HMBC (vermelho) e acoplamentos de COSY (azul) para a substância F (**41**)



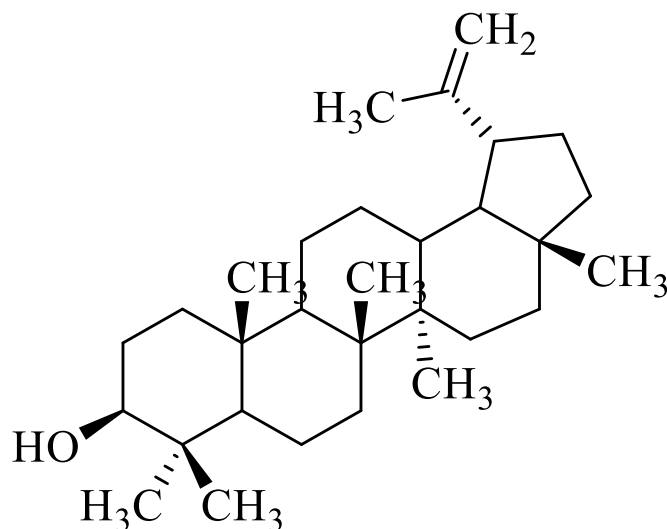
5.2.2.5 Elucidação estrutural da substância D, C1Gu-3B (**57**)

A substância D (**57**) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca, não revelada pelo reagente de Dragendorff, evidenciando não se tratar de um alcaloide, como as demais substâncias relatadas neste trabalho.

No espectro de massas apresentou um pico base de m/z em 409,65 [$M+H-18$] com t_R de 3,7 a 4,1 min, devido à provável perda de uma molécula de água, além de um pico em 425,58 (Anexo 50).

A partir análise dos seus dados de RMN 1D (1H e ^{13}C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY E NOESY) apresentados na Tabela 17 e nos Anexos 51 a 57, do espectro de massas (Anexo 50) e comparação com dados da literatura descritos na Tabela 18 (OGBOLI *et al.*, 2014; MACIEL E SILVA *et al.*, 2017) a substância D (**57**) foi identificada como o triterpeno penta cíclico lupeol (Lup-20(29)-en-3 β -ol), cuja fórmula molecular é C₃₀H₄₉O (Figura 58). Segue-se uma discussão das principais características dos espectros e correlações de sinais observados nos espectros de RMN.

Figura 58: Estrutura molecular da substância D, lupeol (57).



No espectro de RMN de ^1H (Anexo 51) foram observados sete singletos na faixa de δ_{H} 0,70 a 1,70, com integral para 3 hidrogênios cada. Apresentou também hidrogênios (H-29) vinílicos terminais com δ_{H} 4,58 (*dd*, $J = 2,3; 1,3$ Hz) e 4,69 (*d*, $J = 2,2$ Hz) e um hidrogênio com δ_{H} 3,19 (*dd*, $J = 11,0; 5,5$ Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado (carbinólico).

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 52) apresentou 30 linhas espectrais de carbono os quais foram descritos na tabela 17. Após análise do mapa de correlação HSQC (Anexo 54) e DEPT 135 (Anexo 53) foi possível observar seis linhas espectrais de carbonos metínicos (CH), onze de metilênicos (CH_2), seis de carbonos quaternários (C) e sete metílicos (CH_3). Entre os carbonos metilênicos foi observado um carbono com δ_{C} 109,34 (C-29), característico de CH_2 terminal e um carbono δ_{C} 151,02 (C-20) característico de dupla exocíclica.

O espectro de carbono apresentou uma linha spectral em 79,01 (C-3) característico de carbono hidroxilado, sendo que o mesmo no HSQC (Anexo 54) apresentou correlação com o hidrogênio em 3,19 (H-3), caracterizando um hidrogênio carbinólico.

Tabela 17: Dados de RMN 1D e 2D da substância D (57), (C1Gu-3B) 300/75 MHz; ppm; CDCl₃.

RMN de ¹³ C (δ _C)/DEPT			Bidimensionais			
Posição	Obs.	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY	NOESY
C-1	38,69	CH ₂	0,88 (<i>ddap</i> , <i>J</i> = 9,0; 4,8 Hz)	0,84		
C-2	27,41	CH ₂	1,60 (<i>m</i>) 1,54 (<i>m</i>)			3,19
C-3	79,01	CH	3,19 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,0; 5,5 Hz)	0,77; 0,98; 1,60	1,60	0,68; 0,98; 1,60
C-4	38,86	C		0,77; 0,98		
C-5	55,27	CH	0,68 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz)	0,77; 0,84; 0,98; 1,39; 1,52	1,39; 1,52	
C-6	18,31	CH ₂	1,39 (<i>m</i>) 1,52 (<i>m</i>)	0,68	0,68	
C-7	34,26	CH ₂	1,40 (<i>m</i>)	0,88; 1,04	1,60	
C-8	40,81	C		0,94; 1,04; 1,14; 1,40		
C-9	50,41	CH	1,27 (<i>m</i>)	0,84; 1,04; 1,40 (H-7)		
C-10	37,16	C		0,84; 1,27		
C-11	20,91	CH ₂	1,24 (<i>m</i>)			0,84
C-12	25,11	CH ₂	1,68 (<i>m</i>)		0,94	1,04
C-13	38,03	CH	1,07 (<i>m</i>)	0,94	1,36	

Dados de RMN 1D e 2D da substância D (57), (C1Gu-3B) 300/75 MHz; ppm; CDCl₃ (continuação da Tabela 17).

RMN de ¹³ C (δ _C)/DEPT			Bidimensionais			
C	Obs.	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY	NOESY
C-14	42,82	C	-	0,94; 1,04; 1,36; 1,60	-	-
C-15	27,43	CH ₂	1,60 (<i>m</i>)	0,94		
C-16	35,57	CH ₂	1,40 (<i>m</i>)	0,79	0,68; 1,90	
C-17	43,00	C	-	0,79; 1,36; 1,40 (H-16)	-	-
C-18	48,28	CH	1,36 (<i>m</i>)	0,79; 1,91; 2,39	2,39	0,94; 2,39
C-19	47,99	CH	2,39 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 11,0; 11,0; 5,5 Hz)	1,36; 1,69; 1,91; 4,58; 4,69	1,36; 1,40	0,79; 1,69; 4,58; 4,69
C-20	151,02	C	-	1,36; 1,69; 2,39	-	-
C-21	29,72	CH ₂	1,26 (<i>m</i>)		1,91	
			1,91 (<i>m</i>)	1,20; 2,39	1,26; 1,39	
C-22	40,00	CH ₂	1,20 (<i>m</i>)		1,39	
			1,39 (<i>m</i>)	0,79	1,20; 1,91	
C-23	27,99	CH ₃	0,98 (<i>s</i>)	0,77		
C-24	15,38	CH ₃	0,77 (<i>s</i>)	0,98; 3,19		3,19
C-25	16,13	CH ₃	0,84 (<i>s</i>)	0,88; 1,27		1,24
C-26	15,97	CH ₃	1,04 (<i>s</i>)	1,40 (H-7)	1,68	1,68
C-27	14,54	CH ₃	0,94 (<i>s</i>)			1,36

Dados de RMN 1D e 2D da substância D (57), (C1Gu-3B) 300/75 MHz; ppm; CDCl₃ (continuação da Tabela 17).

RMN de ¹³ C (δ _C)/DEPT			Bidimensionais			
C	Obs.	DEPT	¹ H (δ _H /HSQC)	HMBC	COSY	NOESY
C-28	18,00	CH ₃	0,79 (s)	1,20; 1,40 (H-16)		2,39
C-29	109,34	CH ₂	4,58 (dd, <i>J</i> = 2,3; 1,3 Hz)	1,69; 2,39	1,69; 4,69	
			4,69 (d, <i>J</i> = 2,2 Hz)		1,69; 4,58	2,39
C-30	19,31	CH ₂	1,69 (d, <i>J</i> = 1,3 Hz)	2,39; 4,58; 4,69	4,58	2,39; 4,58

Tabela 18: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância D (300/75 MHz) e comparação com a literatura para a substância lupeol (57).

RMN de ^{13}C (δ_{C})				RMN de ^1H (δ_{H})	
Posição	Obs. (CDCl_3)	DEPT	Lit.*	Obs. (CDCl_3)	Lit.
C-1	38,69	CH_2	38,7	0,88 (<i>ddap</i> , $J = 9,0$; 4,8 Hz)	
				1,60 (<i>m</i>)	
C-2	27,41	CH_2	27,4	1,54 (<i>m</i>)	
C-3	79,01	CH	79,0	3,19 (<i>dd</i> , $J = 11,0$; 5,5 Hz)	3,21 (<i>dd</i> , $J = 6,0$; 2,0 Hz)
C-4	38,86	C	38,9		
C-5	55,27	CH	55,3	0,68 (<i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	
				1,39 (<i>m</i>)	
C-6	18,31	CH_2	18,3	1,52 (<i>m</i>)	
C-7	34,26	CH_2	34,3	1,40 (<i>m</i>)	
C-8	40,81	C	40,8		
C-9	50,41	CH	50,4	1,27 (<i>m</i>)	
C-10	37,16	C	37,2		
C-11	20,91	CH_2	20,9	1,24 (<i>m</i>)	
C-12	25,11	CH_2	25,1	1,68 (<i>m</i>)	
C-13	38,03	CH	38,5	1,07 (<i>m</i>)	
C-14	42,82	C	42,8	-	
C-15	27,43	CH_2	27,4	1,60 (<i>m</i>)	
C-16	35,57	CH_2	35,6	1,40 (<i>m</i>)	
C-17	43,00	C	43,0	-	
C-18	48,28	CH	48,3	1,36 (<i>m</i>)	
C-19	47,99	CH	48,0	2,39 (<i>ddd</i> , $J = 11,0$; 11,0; 5,5 Hz)	
C-20	151,02	C	151,0	-	

Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância D (300/75 MHz) e comparação com a literatura para a substância lupeol (**57**) (continuação da Tabela 18).

RMN de ^{13}C (δ_{C})				RMN de ^1H (δ_{H})	
Posição	Obs. (CDCl ₃)	DEPT	Lit.*	Obs. (CDCl ₃)	Lit.**
C-21	29,72	CH ₂	29,8	1,26 (m) 1,91 (m)	
C-22	40,00	CH ₂	40,0	1,22 (m) 1,39 (m)	
C-23	27,99	CH ₃	28,0	0,98 (s)	0,97 (s)
C-24	15,38	CH ₃	15,4	0,77 (s)	0,76 (s)
C-25	16,13	CH ₃	16,1	0,84 (s)	0,83 (s)
C-26	15,97	CH ₃	16,0	1,04 (s)	1,00 (s)
C-27	14,54	CH ₃	14,5	0,94 (s)	0,95 (s)
C-28	18,00	CH ₃	18,0	0,79 (s)	0,79 (s)
C-29	109,34	CH ₂	109,3	4,58 (dd, $J = 2,3; 1,3$ Hz) 4,69 (d, $J = 2,2$ Hz)	4,57 (s) 4,68 (s)
C-30	19,31	CH ₂	19,3	1,69 (d, $J = 1,3$ Hz)	1,68 (s)

Comparação com a literatura: * Ogbole *et al.* (2014), CDCl₃, 400 Mhz.

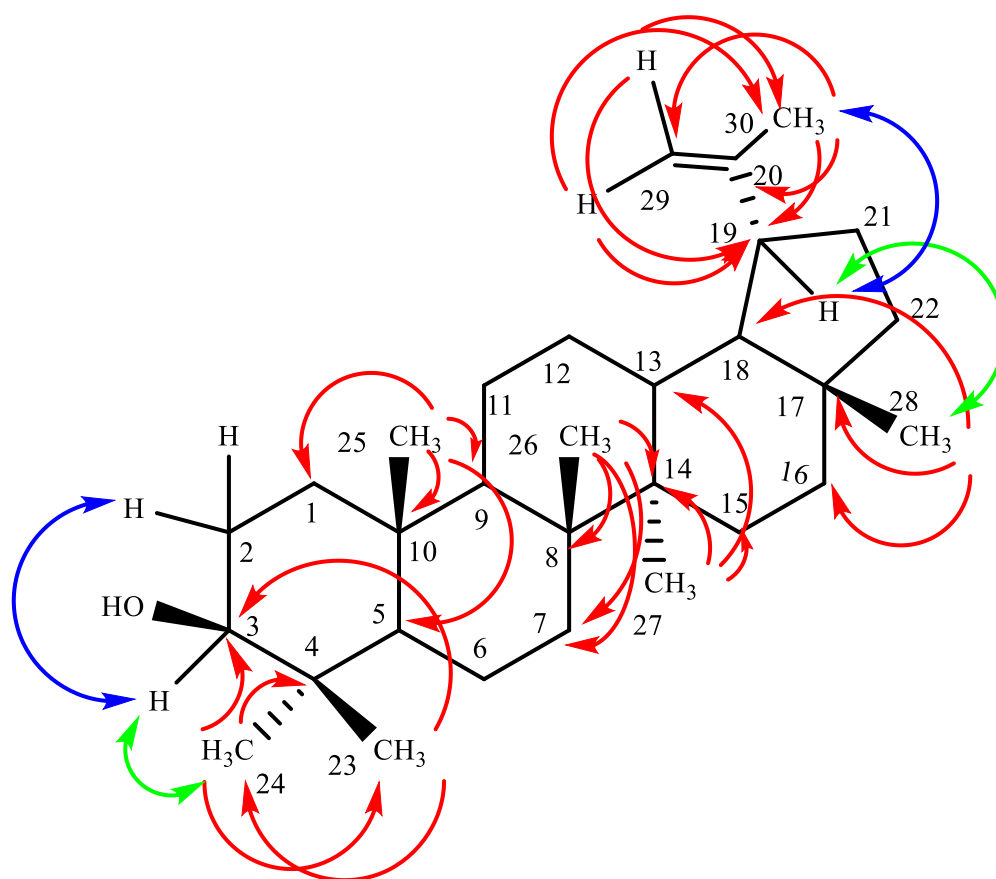
** Maciel e Silva *et al.* (2017), CDCl₃, 200 Mhz.

No espectro do HMBC (Figura 59; anexo 55) foram observadas as correlações entre os hidrogênios metílicos H-23 (s, δ_{H} 0,98) com C-3 e C-24; o H-24 (s, δ_{H} 0,77) correlacionando-se com os carbonos C-3, C-4 e C-23; o H-25 (s, δ_{H} 0,84) com os carbonos C-1, C-5, C-9 e C-10; o H-26 (s, δ_{H} 1,04) com os carbonos C-7, C-8, C-9 e C-14; o H-27 (s, δ_{H} 0,94) com C-13, C-14 e C-15; o H-28 (s, δ_{H} 0,79) com C-16, C-17, C-18 e C-22; o H-30 (s, δ_{H} 1,69) com C-19, C-20 e C-29. Também foram observadas as correlações dos hidrogênios metilênicos H-29 (dd, δ_{H} 4,58; d, δ_{H} 4,69) com os carbonos C-19 e C-30.

Entre os acoplamentos observados no espectro de COSY (Azul) o hidrogênio H-3 (dd, δ_{H} 3,19) apresentou acoplamento com H-2 (m, δ_{H} 1,60) enquanto o hidrogênio H-19 (ddd, δ_{H} 2,39)

com os hidrogênios metílicos H-30 (*s*, δ_H 1,69). No espectro de NOESY (Verde) foram observados os acoplamentos entre H-3 (*dd*, δ_H 3,19) e H-24 (*s*, δ_H 0,77) e entre H-19 (*ddd*, δ_H 2,39) e H-28 (*s*, δ_H 0,79) (Figura 59). As demais correlações e acoplamentos foram descritos na tabela 17 e apresentados nos anexos 54 a 57.

Figura 59: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC (vermelho) e acoplamentos do espectro de COSY (azul) e NOESY (verde) da substância D (57)



5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os extratos e substâncias de *G. argenteum* e *G. urceolatum* foram avaliados frente à cepa K1 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*, cujos dados foram descritos nas tabelas 19 a 22. Também foram apresentados os resultados da citotoxicidade *in vitro* frente à linhagem normal de fibroblastos humanos (MRC-5), bem como os dados de índice de seletividade (IS).

5.3.1 Ensaio antiplasmódico *in vitro* para extratos de *G. argenteum* e *G. urceolatum*

Os vinte e um extratos de *G. argenteum* preparados de acordo com o planejamento experimental centroide-simplex foram testados contra a cepa K1, cloroquina-resistente, de *Plasmodium falciparum*. Foram realizados testes para triagem nas concentrações 50 µg/mL e 5 µg/mL, onde foram consideradas ativas as amostras com percentual de inibição superior a 80% na concentração 50 µg/mL e inativas as amostras com percentual inferior a 80% (ROCHA E SILVA *et al.*, 2012). Como todas as amostras foram ativas na triagem, novos testes foram realizados para determinação da CI_{50} (concentração inibitória a 50%) para todos os extratos utilizando diluições seriadas 100 a 1,56 µg/mL (diluição 1:2) ou de 100 a 0,13 µg/mL (diluição 1:3). Os resultados apresentados na Tabela 19 foram analisados utilizando os critérios de classificação da atividade antiplasmódica para extratos brutos, conforme Krettli *et al* (2009).

Os extratos descritos na Tabela 19 apresentaram percentuais de rendimento variando entre 1,18% e 25,5%, sendo que as folhas apresentaram os maiores rendimentos enquanto cascas os menores. Nestas análises obtivemos seis extratos parcialmente ativos, sendo cinco nos extratos de galhos (lenho) e um extrato de folhas; treze extratos ativos, sendo dois obtidos de galhos, seis de folhas e cinco de cascas. Entre os extratos de cascas também obtivemos dois muito ativos, metanólico com $CI_{50} = 0,2$ µg/mL e metanol/acetona, com $CI_{50} = 0,3$ µg/mL. Estes resultados confirmam os dados de testes antiplasmódicos obtidos para extratos de *G. argenteum* (cascas, $CI_{50} = 4,6$ µg/mL) coletadas em Roraima (CAMARGO, 2012) e extratos desta mesma espécie foram testados *in vivo* com 44,3% de inibição na dose de 324 mg/kg (BERTANI *et al.*, 2005). Extratos e frações alcaloídicas obtidas de cascas de *G. vellosii* foram ativos ($CI_{50} = 2,22$ µg/mL $\pm$ 0,23) em testes frente a cepa D10, cloroquina-sensível, de *Plasmodium falciparum* (MBEUNKUI *et al.*, 2012a).

Considerando os resultados dos ensaios *in vitro* dos extratos de *G. argenteum* selecionou-se para extração em maior escala o extrato metanólico, por ser o mais ativo e o extrato aquoso considerando a etnobotânica (Seção 4.6.2.1). O extrato metanólico foi preparado conforme metodologia para isolamento de alcaloides (Seção 4.6.2.2).

Tabela 19: Rendimentos e atividade antiplasmodica *in vitro* dos extratos de *G. argenteum*.

Parte	Código do extrato	Solvente	Rend. (%)	Triagem (%)		CI ₅₀		Classificação da atividade
				50 µg/mL	5,0 µg/mL	CI ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança	
Folhas	EGaF1	MeOH	15,6	90	29	9,3	5,4 a 16	A
	EGaF2	Acetona	5,87	88	6,0	16	13 a 21	PA
	EGaF3	H ₂ O	10,5	97	57	7,5	6,3 a 8,8	A
	EGaF4	MeOH:Acetona	11,6	89	35	4,2	3,0 a 5,9	A
	EGaF5	MeOH:H ₂ O	24,4	92	45	6,2	5,2 a 7,3	A
	EGaF6	Acetona:H ₂ O	25,4	93	33	10	9,0 a 11	A
	EGaF7	MeOH:H ₂ O:Acetona	25,5	92	45	8,1	6,5 a 10	A
Galhos	EGaG1	MeOH	13,4	91	14	7,7	5,4 a 11	A
	EGaG2	Acetona	3,47	91	14	25	19 a 32	PA
	EGaG3	H ₂ O	6,47	80	17	10	8,4 a 13	A
	EGaG4	MeOH:Acetona	10,2	91	6	17	9,9 a 30	PA
	EGaG5	MeOH:H ₂ O	15,1	92	51	12	9,7 a 15	PA
	EGaG6	Acetona:H ₂ O	15,9	93	38	15	11 a 23	PA
	EGaG7	MeOH:H ₂ O:Acetona	15,2	91	28	15	11 a 22	PA
Casca	EGaC1	MeOH	5,36	98	92	0,20*	0,18 a 0,22	MA
	EGaC2	Acetona	1,18	96	86	10	8,5 a 12	A
	EGaC3	H ₂ O	2,48	98	52	5,2	3,3 a 8,3	A
	EGaC4	MeOH:Acetona	4,03	98	92	0,25*	0,18 a 0,33	MA
	EGaC5	MeOH:H ₂ O	6,80	98	47	3,3	2,1 a 5,2	A
	EGaC6	Acetona:H ₂ O	7,01	99	63	3,9	2,7 a 5,6	A
	EGaC7	MeOH:H ₂ O:Acetona	6,88	98	39	5,0	4,0 a 6,4	A

CI₅₀ > 25 µg/mL - I (inativo); 25 µg/mL ≥ CI₅₀ > 10 µg/mL - PA (parcialmente ativo);

10 µg/mL ≥ CI₅₀ > 1,0 µg/mL - A (ativo); CI₅₀ ≤ 1,0 µg/mL = MA (muito ativo).

Abreviaturas usadas na tabela: Rend.: rendimento; IC: Intervalo de confiança;

* Amostras preparadas em diluição 1/3.

Entre os extratos aquosos preparados, através de infusão, folhas e cascas de *G. argenteum* apresentaram atividade antiplasmódica semelhante com $CI_{50} = 6,0$ e $6,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, portanto ativas (A). O extrato aquoso de galhos (lenho) apresentou $CI_{50} = 28,0 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 20). Havendo como referência o uso tradicional de *G. argenteum* por remanescentes de quilombos em Oriximiná-PA (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e a atividade antiplasmódica observada no presente trabalho para os extratos aquosos das cascas e isolamento das substâncias com atividades *in vitro* contra *P. falciparum* das cascas são relevantes contribuições para a etnofarmacologia dessa espécie.

Tabela 20: Rendimentos e atividade antiplasmódica *in vitro* dos extratos aquosos de *G. argenteum*

Código	Parte	Material vegetal (g)	Rendimento (%)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
E22	Cascas	10 g	6,40	6,40 (A)
E23	Folhas	10 g	25,1	6,00 (A)
E24	Galhos	10 g	14,8	28,0 (I)

$CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$ - I (inativo); $25 \mu\text{g/mL} \geq CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ - PA (parcialmente ativo);

$10 \mu\text{g/mL} \geq CI_{50} > 1,0 \mu\text{g/mL}$ - A (ativo); $CI_{50} \leq 1,0 \mu\text{g/mL}$ = MA (muito ativo) (KRETTLI *et al.*, 2009).

Extratos e frações obtidas de cascas de *G. urceolatum* foram testados anteriormente por Oliveira (2018) sendo os extratos considerados ativos com $CI_{50} = 7,43 \mu\text{g/mL}$ (1º experimento) e $CI_{50} = 8,95 \mu\text{g/mL}$ (2º experimento). A fração diclorometano (DCM) foi considerada muito ativa ($CI_{50} = 0,08 \mu\text{g/mL}$).

5.3.2 Atividade antiplasmódica *in vitro* e citotoxicidade de substâncias isoladas de *G. argenteum* e *G. urceolatum*

As substâncias obtidas do extrato aquoso e metanólico de *G. argenteum* também foram testadas frente ao *P. falciparum* e para citotoxicidade, cujos resultados foram descritos na tabela 21 e 22. Para classificar as substâncias quanto ao CI_{50} foi utilizado o seguinte critério: $CI_{50} > 20 \mu\text{M}$ = inativo; $20,0 > CI_{50} > 5,0 \mu\text{M}$ = atividade moderada; $5,0 > CI_{50} > 0,1 \mu\text{M}$ = ativo e $CI_{50} < 0,1 \mu\text{M}$ = muito ativo (ROCHA E SILVA, 2014).

Tabela 21: Atividade antiplasmodica contra *Plasmodium falciparum* (Pf) e citotóxica de alcaloides isolados de *G. argenteum*.

Subs	Nº	Nome	CI ₅₀ e IC 95% Pf e MRC-5				IS
			µg/mL	µM	Atividade	MRC-5 (µM)	
A	(64)	Panarina	10,5	32,5	I	75,5	2,32
			(4,05 – 21,7)	(12,5 – 67,2)		(60,0 – 84,2)	
B	(31)	Velosimina	1,05	3,59	A	77,3	21,5
			(0,63 – 1,63)	(2,16 – 5,58)		(62,05 – 96,4)	
C	(28)	Flavopereirina	0,63	2,55	A	49,7	19,5
			(0,31 – 0,82)	(1,25 – 3,32)		(35,8 – 68,9)	
Controle		Cloroquina	0,24	0,75	A	NT	-
		difosfato	(0,20 – 0,28)	(0,63 – 0,88)			

I – Inativo; AM – Atividade Moderada; A – Ativo; MA – Muito Ativo; NT – Não testado

A substância panarina foi (64) não apresentou atividade nos testes *in vitro* (CI₅₀ = 32,5 µM). As duas outras substâncias isoladas de *G. argenteum*, velosimina (31) e flavopereirina (28) foram consideradas ativas com CI₅₀ = 3,59 µM e CI₅₀ = 2,55 µM, respectivamente. Velosimina (31) e flavopereirina (28) já foram isoladas de outras espécies de *Geissospermum*, mas apenas a flavopereirina já havia sido testada para a atividade antiplasmodica, com CI₅₀ = 11,5 µM (cepa K1) e CI₅₀ = 1,83 ± 0,10 µM frente à cepa T9-96 de *P. falciparum* (STEELE *et al.*, 2002). Relatos anteriores apontam o uso da flavopereirina em formulações para tratamento de câncer (BELJANSKI & BELJANSKI, 1982; BELJANSKI, 1994; BELJANSKI, 2000; BELJANSKI, 2005; HALL & BELJANSKI, 2005), além de ter sido ativa, com CI₅₀ = 0,93 µM em teste *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (SILVA E SILVA *et al.*, 2019). Para velosimina (31) não foram encontrados dados anteriores para atividade antiplasmodica (Tabela 21). Velosimina apresentou baixa citotoxicidade (IS = 21,5) e flavopereirina apresentou seletividade semelhante com índice de seletividade 19,5, sendo que para Ondo *et al.* (2012) substâncias com IS maior que 10 são consideradas interessantes para estudos *in vitro*.

Da espécie *G. urceolatum* foram isoladas cinco substâncias, quatro alcaloides e um triterpeno, as quais foram testadas para a atividade antiplasmodica (*P. falciparum*, cepa K1) e

citotóxica (MRC-5), cujos resultados foram descritos na tabela 22. Também foi calculado o índice de seletividade (IS) para essas substâncias.

A substância D, lupeol (**57**), apresentou $CI_{50} = 62,4 \mu M$ (Tabela 22), portanto inativa, porém esta substância já havia sido testada para atividade antiplasmodica, inclusive foram realizadas reações de semi síntese para melhorar a atividade contra *Plasmodium* spp. Os derivados do lupeol foram testados contra a cepa cloroquina-resistente W2 e um dos seis derivados teve um aumento moderado da atividade antiplasmodial com $CI_{50} = 62,4 \pm 1,92 \mu M$ (BORGATI *et al.*, 2017). Derivados do lupeol apresentaram outras atividades biológicas: atividade antiviral (OGBOLE *et al.*, 2014), propriedades analgésicas (BULUS *et al.*, 2015), atividade anticâncer (MACIEL E SILVA *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2020) e atividade antitripanossômica (MACHADO *et al.*, 2018).

A aspidoscarpina (**41**) apresentou $CI_{50} = 2,59 \mu M$ (Tabela 22), semelhante ao resultado obtido por Oliveira (2018), $CI_{50} = 2,42 \mu M$. Ela também foi isolada de *Aspidosperma olivaceum* e testada frente à cepa cloroquina-resistente W2, utilizando o método da hipoxantina 3H tendo como resultado $CI_{50} = 5,40 \pm 2,50 \mu g/mL$ e método HRPII (Anticorpos monoclonais específicos para proteína rica em histidina) com $CI_{50} = 4,40 \pm 0,80 \mu g/mL$, além da avaliação de sua citotoxicidade em hepatócitos humanos (HepG2) cuja DLM_{50} (dose letal mínima para 50% das células) foi $301 \pm 24,0 \mu g/mL$ e Índice de seletividade (IS) igual a 56,0 sendo considerada a mais promissora pois no referido estudo apresentou baixa toxicidade (CHIERRITO *et al.*, 2014).

A substância G, geissolosimina (**33**) também foi ativa com $CI_{50} = 0,38 \mu M$ (Tabela 22), resultado semelhante ao obtido em ensaio *in vitro* frente a cepa D10, cloroquina sensível, de *P. falciparum*, com $CI_{50} = 0,96 \mu M \pm 0,08$ (MBEUNKUI *et al.*, 2012a) e contra a cepa FcB1, cloroquina-resistente, de *P. falciparum*, com $CI_{50} = 1,90 \mu M \pm 1,40$ utilizando substância obtida de cascas de *G. laeve* (RAMOS *et al.*, 2017).

A flavopereirina (**28**), substância C', obtida de *G. urceolatum* apresentou melhor atividade ($CI_{50} = 1,25 \mu M$) (Tabela 22) que a isolada de *G. argenteum* ($CI_{50} = 2,55 \mu M$) (Tabela 21) e que ao obtido por Steele *et al.* (2002) em testes com substância isolada de *G. vellosii* ($CI_{50} = 11,53 \mu M$, cepa K1).

Entre todas as substâncias testadas a com menor CI_{50} *in vitro* foi a substância geissolosimina (**33**) com $CI_{50} = 0,38 \mu M$ (Tabela 22).

Tabela 22: Atividade antiplasmódica contra *Plasmodium falciparum* (Pf) e citotóxica de substâncias isoladas de *G. urceolatum*.

Subs.	Nº	Nome	CI ₅₀ e IC 95% <i>P</i> f e MRC-5				IS
			µg/mL	µM	Atividade MRC-5 (µM)		
D	(57)	Lupeol	26,6 (19,3 – 36,6)	62,4 (45,3 – 85.8)	I	NT	-
E	(65)	C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₃	0,22 (0,08 – 0,44)	0,48 (0,17 – 0,96)	A	NT	-
F	(41)	Aspidoscarpina	0,96 (0,34 – 1,75)	2,59 (0,92 – 4,73)	A	NT	-
G	(33)	Geissolosimina	0,22 (0,26 – 0,42)	0,38 (0,45 – 0,73)	A	23,0 (19,4 – 27,2)	60,5
C'	(28)	Flavopereirina	0,30 (0,18 – 0,52)	1,25 (0,77 – 1,98)	A	67,8 (38,4 – 119)	54,3
Controle		Cloroquina	0,24	0,75	A	NT	-
		difosfato	(0,20 – 0,28)	(0,63 – 0,88)			

I – Inativo; AM – Atividade Moderada; A – Ativo; MA – Muito Ativo; NT – Não testado

Este estudo demonstrou o potencial biológico destas espécies vegetais pois apresentaram boa atividade antimalárica, o que justifica o seu uso por comunidades tradicionais. Além disso algumas substâncias testadas apresentaram baixa citotoxicidade frente à linhagem celular avaliada, como a flavopereirina (IS = 54,3) e geissolosimina (IS = 60,5).

6 CONCLUSÃO

Este estudo orientado inicialmente por variação das condições de extração, atividade antiplasmodica e quimiometria (presença de $m/z \times$ atividade antiplasmodica *in vitro*) possibilitou selecionar extratos ativos de *G. argenteum* Woodson e *G. urceolatum* A. H. Gentry contra *P. falciparum* cepa K1 para estudo fitoquímico. O estudo quimiométrico possibilitou a caracterização de íons detectados nos extratos ativos de cascas de *G. argenteum* e consequentemente o isolamento dessas substâncias.

De *G. argenteum* Woodson foram isolados três alcaloides do extrato ativo de cascas: panarina (64), velosimina (31) e flavopereirina (28), sendo que estes foram descritos pela primeira vez para a espécie e a panarina (64) para o gênero.

De *G. urceolatum* H. Gentry foram isolados quatro alcaloides: aspidoscarpina (41), geissolosimina (33), flavopereirina (28), a qual também foi isolada de *G. argenteum*, um alcaloide ainda não relatado na literatura (substância E - C1Gu-8C) (65), além do triterpeno lupeol (57), substância presente em diversos gêneros de plantas.

Quanto a atividade antiplasmodica frente a *Plasmodium falciparum* cepa K1, todos os alcaloides isolados de *G. urceolatum* foram ativos, sendo a geissolosimina (33) o mais ativo ($CI_{50} = 0,38 \mu M$) e com baixa citotoxicidade ($IS = 60,5$). O alcaloide (65) ainda não reportado na literatura também foi um dos mais ativos ($CI_{50} = 0,48 \mu M$). Dos alcaloides isolados de *G. argenteum* a panarina não foi ativa. O alcaloide isolado de ambas as espécies, a flavopereirina, apresentou atividade antiplasmodica e baixa toxicidade.

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química de *G. argenteum* e *G. urceolatum* e de sua atividade biológica justificando o seu uso em comunidades tradicionais.

REFERÊNCIAS

- ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P. J.; D’ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v.10, n. 144, p. 1475-2875, 2011. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>
- ACHENBACH, H.; LOWEL, M.; WAIBEL, R.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P. 16-*epi*-panarine, a new betaine-type alkaloid from *Stemmadenia minina et al.* (1991). **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 473-476, 1991. <https://doi.org/10.1021/np50074a019>
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p.211-224, 1994. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; DOS SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. Pereirina: o primeiro alcalóide isolado no Brasil? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600026>
- ALMEIDA, M. R.; SILVA, A. E. S.; BRAGA, A. O.; BRAGA, J. M. A.; TAMAIO, N.; PINTO, A. C. Anatomical description, alkaloid content and quality control of the bark of Pau-pereira (*Geissospermum laeve*, Apocynaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.10, p.1866-1872, 2012. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1173>
- ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C.; SILVA, E. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C.; SILVA, L. F.; COSTA, M. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 102, p. 359–365, 2007. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1173>

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n.1, 2012. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2012.013>

AUROSSEAU, M. M. Etude pharmacodynamique du géissospermine alcaloïde principal de la *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 19, n. 2, p. 104-116, 1961a.

AUROSSEAU, M.M. Etude pharmacodynamique de la geissospermine alcaloïde principal du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 19, n. 3, p. 175-189, 1961b.

BAIRD, K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malária. **Pathology Global Health**, v. 109, p. 93-106, 2015. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000016>

BALKAN, S.; CORTY, J. F. Malaria: Introducing ACT from Asia to Africa. In: Jean-Hervé Bradol, Claudine Vidal, editors. Medical Innovations in Humanitarian Situations. The Work of Médecins Sans Frontières. Médecins Sans Frontières, p. 155-177, 2011.

BAN, Y.; SEO, M. The synthesis of B-carboline derivatives –I. A synthesis of some 12H-indolo[2,3-a] pyridocolinum salts, including flavopereirine. **Tetrahedron**, v. 16, p. 5-10, 1961.

BARBOSA, C. V. O.; PEREIRA, S. S.; VIANA, P. L.; SIMÕES, A. O. A taxonomic revision of *Geissospermum* (Apocynaceae, rauvolfioid). **Phytotaxa**, v. 420, n. 2, p. 157-178, 2019. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.420.2.3>

BARBOSA, C. V. O.; SIMÕES, A. O. *Geissospermum* in: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4605>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

BARROS, J. S.; OLIVEIRA, S. S.; NEVES, S. M. B.; TANAE, M. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; LANDMAN, M. T. R. L. A captação de serotonina por alcaloides de *Geissospermum laeve* Vell. Baill. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Salvador, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, n. 29, p. 1401-1406, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600042>

BEJAR, O.; GOUTAREL, R.; JANOT, M. M.; LE HIR, A. Constitution de la flavopereirine, alcaloide du *Geissospermum leave* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Académie des Sciences**, p. 2066-2068, 1957.

BELJANSKI, M.; BELJANSKI, M. S. Selective inhibition of *in vitro* synthesis of cancer DNA by alkaloids of β -carboline class. **Pathobiology**, v. 50, n. 2, p. 79-87, 1982. <https://doi.org/10.1159/000163131>

BELJANSKI, M. **Flavopereirine-based pharmaceutical composition for treating HIV infection**. WO/1994/002146, Feb 3, 1994.

BELJANSKI, M. The anticancer agent PB-100, selectively active on malignant cells, inhibits multiplication of sixteen malignant cells lines, even multidrug resistant. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n. 1, p. 29-33, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000100005>

BELJANSKI, M. **Flavopereirine-based pharmaceutical composition and use thereof for treating HIV**. Canadian Patent. CA 2120001C (PCT/ FR1993/000761), Feb 8, 2005.

BEMIS, D. L.; CAPODICE, J. L.; DESAI, M.; KATZ, A. E.; BUTTYAN, R. β -carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree pao pereira suppresses prostate cancer cells. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, v. 7, n. 2, p. 59-65, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19476740>

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRE, Ph.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 45-54, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.020>

BERTHO, A. & KOLL, M. Alkaloide der Pereiro-Rinde, VI. Die konstitution von Pereirin. **Chemische Berichte**, v. 94, p. 2737-2746, 1961.

BIAMONTE, M. A.; WANNER, LE ROCH, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2829-2843, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.067>

BORGATI, T. F.; PEREIRA, G. R.; BRANDÃO, G. C.; SANTOS, J. O.; FERNANDES, D. A. M.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; SOARES, L. F.; LOPES, J. C. D.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Synthesis by click reactions and antiplasmodial activity of lupeol 1,2,3-triazole derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.28, n. 10, p. 1850-1856, 2017. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170013>

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S.; ROCHA, E. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 175-182, 1992. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90018-M](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90018-M)

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F.; SANTOS, A. C.; MONTE-MOR, R. L. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and Official Pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p.141-148, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.004>

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; PEREIRA, F. L.; VASCONCELOS, A. S.; FAGG, C. W. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environmental Monitoring and Assessment**. 185 (8), p.7013 -7023, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3081-y>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Guia de tratamento da malária no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. – 2.ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2020a. 75p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil_2ed.pdf. Acesso em: 30 out. 2020a.

_____. Ministério da Saúde. SIVEP-Malária: **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica: notificação de casos.** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/m/malaria>. Acesso em: 30 out. 2020b.

_____. Ministério da Saúde. DATASUS TABNET. **Óbitos segundo Região Causa Malária** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 15 jan. 2021c.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. **Manual do Sisgen (2017).** Disponível em: https://sisgen.gov.br/download/Manual_SisGen.pdf. Acesso em: 20 dez. 2020d.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; BIANCO JÚNIOR, C.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; ALVARENGA, D. A. M.; SANTELLI, A. C. F. S.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; ABREU, F. V. S.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; MUTIS, M. C. S.; PISSINATTI, A.; OLIVEIRA, R. L.; BRITO, C. F. A.; CRUZ, M. F. F.; CULLETON, R.; RIBEIRO, C. T. D. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet.** p. 1-9, ago. 2017. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9)

BRIDGFORD, J. L.; XIE, S. C.; COBBOLD, S. A.; PASAJE, C. F. A.; HERRMANN, S.; YANG, T.; GILLETT, D. L.; DICK, L. R.; RALPH, C. D.; SPILLMAN, N. J.; TILLEY, L. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. **Nature Communications**, n. 9, v. 3801, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06221-1>

BRITO, A. R. M.; BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, maio, 1993. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90050-F](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90050-F)

BULUS, A.; BEN, A. C.; FLORENCE, D. T.; OLUWAKANYINSOLA, A. S.; OGBAJI, J. I. Isolation and analgesic property of lupeol from *Diospyros mespiliformis* stem bark. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 9, n. 30, p. 813-819, 2015. <https://doi.org/10.5897/JMPR2015.5877>

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e Cultura**. 3, 55 (I), p. 26-29, 2003.

CAMARGO, M. R. M. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minquartia guianensis* Aubl. coletadas em Roraima**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) -Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais Boa Vista, 2012.

CAMARGO, M. R. M.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; CARNEIRO, A. L. B.; VITAL, M. J. S.; POHLIT, A. M. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, p. 73-160, 2013. <https://doi.org/10.5935/1808-9569.20130002>.

CHANG, C.; ZHAO, W.; XIE, B.; DENG, Y.; HAN, T.; CUI, Y.; DAI, Y.; ZHANG, Z.; GAO, J.; GUO, H.; YAN, J. Pao Pereira extract suppresses castration-resistant prostate cancer cell growth, survival and invasion through inhibition of NF- κ B signaling. **Integrative Cancer Therapies**, v. 13, n. 3, p. 249–258. 2014. <https://doi.org/10.1177/1534735413510557>

CHAPADENSE, F.; MACHADO, R. L. D.; VENTURA, A. M. R. S.; ÁREAS, A.; MACHADO, R. B.; VIANA, G. R.; ZALIS, M. G.; CASTRO, A. M.; CRAVO, P. *Plasmodium falciparum* malarial parasites from Brazil lack artemisinin resistance-associated mutations in the *Kelch13* gene. **Journal of Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 52, p. 1-4, 2019. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0225-2018>

CHATURAKA, R.; SENAKA, R.; DEEPIKA, F. Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malária. **Cochrane Database of Systematic**. 2020. <https://doi.org/10.1002%2F14651858.CD010458.pub3>

CHIERRITO, T. P. C.; AGUIAR, A. C. C.; ANDRADE, I. M.; CERAVOLO, I. P.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of índole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malaria Journal**. v. 13, n. 142, p.1-10, 2014. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-142>

COATNEY, G. R.; CHIN, W.; CONTACOS, P. G.; KING, H. K. *Plasmodium inui*, a quartan-type malaria parasite of old-world monkeys transmissible to man. **The Journal of Parasitology**. v. 52, n. 4, p. 660-663, 1966.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200042>

CORREIA, A. F. SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C.T., KANKAZI, L. I. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacology Sciences**, v.12, n.6, p.369-380, 2008.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **The Journal of Cell Biology**, v. 198, p. 961-971, 2012. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206112>

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610-624, 2016.

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**. 3, 5, 2010. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K. S.; SHASUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATMAN, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 165-171, 2008. <https://doi.org/10.1086/524888>

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S.B.; DIVIS, P.C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG K, T.; ADEM, P.; ZAKI, S.R.; B, SINGH.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. **Malaria Journal**, v. 9, n.10, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-10>

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites) in **Biochemistry and molecular biology of plants**. Buchanan, B., Gruissem, W.; Jones, R. Eds. American Society of Plant Physiologists, 24, p.1250-1319, 2000.

CUI, L.; SU, X. Discovery mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 8, p. 999-1013, 2009. <https://doi.org/10.1586/eri.09.68>

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; FERREIRA NETO, J. Studies on transmission of simian malária and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bull World Health Organ**, v. 35, p. 805-808, 1966.

DELVES, M.; PLOUFFE, D.; SCHEURER, C.; MEISTER, S.; WITTLIN, S.; WINZELER, E. A.; SINDEN, R. E.; LEROY, D. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. **PLOS Medicine**, v.9, n. 2, p. 1-14, 2012 <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001169>

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Product: a biosynthetic approach**. 3nd, 2009.

DIAS, J. F. G. **Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae).** 135 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba/PR, 2012.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gentianales medicinais. In: DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. (Orgs.). **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** São Paulo: UNESP, 2002. 602 p.

DONG, R.; CHEN, P.; CHEN, Q. Extract of the medicinal plant Pao Pereira inhibits pancreatic cancer stem-like cell *in vitro* and *in vivo*. **Integrative Cancer Therapies**, v. 17, n. 4, p. 1204-1215, 2018. <https://doi.org/10.1177/1534735418786027>

DONG, Y.; LIU, J.; XUE, Z.; SUN, J.; HUANG, Z.; JING, Y.; HAN, B.; SHEN, B.; YAN, J.; HUANG, R. Pao Pereira extract suppresses benign prostatic hyperplasia by inhibiting inflammation-associated NFκB signaling. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. v. 20, n. 150, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02943-2>

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae. *The Botanical Review*, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000. ENDRESS, M.E. Apocynaceae: Brown and now. **Telopea**, v. 10, n. 2, p. 525-541, 2004. <https://doi.org/10.1007/BF02857781>

ESBENSEN, K. & GELADI, P. The start and early history of chemometrics: Selected interviews. Part 2. **Journal of Chemometrics**, v. 4, n. 6, p. 389-412, 1990. <https://doi.org/10.1002/cem.1180040604>

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações.** Campinas: Unicamp, 2015. <https://doi.org/10.7476/9788526814714>

FORZZA, R. C. (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil.** Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, v.1

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEIROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>

GHAZALI, N. A. B. O. **Chemical constituents of *Kopsia singaporensis* Ridl.** 110 f. Dissertation (Master of Science) - University of Malaya, Department of Chemistry, 2012.

GIORGETTI, M.; ROSSI, L.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - a study of historical sources from the 16th to 19th century. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 537-555, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000044>

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, jul. 2007. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>

GOLENSER, J.; WAKNINE, J.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N.; GRAU, G. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal of Parasitology**, v. 36, p. 1427-41, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.07.011>

GORDILLO-ROMÁN, B; REINA, M; RUIZ-MESIA, L; RUIZ-MESIA, W; JOSEPH-NATHAN, P. Absolute configuration of indoline alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 13, p. 1693-1696. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.01.055>

HALL, J. L.; BELJANSKI, S. P. **Flavopereirine and alstonine combinations in the treatment and prevention of prostate cancer.** PCT Int. Appl. WO2005112964 (A1), 2005.

HARBACH, R. **Mosquito Taxonomic Inventory (MTI)**. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/2020>. Acesso em: 30 set. 2020.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**. v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200010>

HERRAIZ, T; GALISTEO, J. Naturally occurring tetrahydro- β -carboline alkaloids derived from tryptophan are oxidized to bioactive β -carboline alkaloids by heme peroxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, n. 1, p. 42-47, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.047>

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 177, p. 1-13, 2011. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>

HOGAN, A. B.; WINSKILL, P.; GHANI, A. C. Estimated impact of RTS,S/AS01 malaria vaccine allocation strategies in sub-Saharan Africa: a modelling study. **PLOS Medicine**, v. 17, n.11, p. 1-19, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003377>

HOYE, T. R., HANSON, P. R., VYVYAN, J. R. A Practical Guide to First-Order Multiplet Analysis in ^1H NMR Spectroscopy. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 59, p. 4096-4103, 1994. <https://doi.org/10.1021/jo00094a018>

HUGHES, N. A.; RAPOPORT, H. Flavopereirine, an alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n.7, p. 1604-1609, 1958. <https://doi.org/10.1021/ja01540a024>

ISHIYAMA, H.; MATSUMOTO, M.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. **Heterocycles**, v. 66, n. 1, p. 651-658, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200623203>

IYEGAR, R.; SCHILDKERT, K.; AUBÉ, J. Regiocontrol in an intramolecular Schmidt Reaction: Total synthesis of (+)-aspidospermidine. **Organic Letters**. V. 2, n. 11, p. 1625-1627, 2000. <https://doi.org/10.1021/ol005913c>.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, p. 39-41, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300015>

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**. v.2, n.1, 13-25, 2010.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Tradução André Olmos Simões et al. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

KAN FAN, C.; HUSSON, H. P. Biomimetic formation of 5,6-dihydroflavopereirine from 4, 21-dehidrogeissoschizine. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 4265-4266, 1980. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)92879-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92879-X)

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**. v. 228, n. 4703, p. 1049–1055, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.3887571>

KOMPIS, I.; HESSE, M.; SCHMID, H. An approach to the biogenetic classification of indole alkaloids. **Lloydia**. v. 34, n. 3, p. 269-291. 1971.

KRETTLI, A.; ADEBAYO, J.; KRETTLI, L. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 261-270, 2009. <https://doi.org/10.2174/138945009787581203>

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A. C.; HAYNES, R. K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4-5, p. 233-44, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.07.001>

LACERDA, M.V.G.; A., KRUDSOOD, S.; LON, C.; SAUNDERS, D.L.; MOHAMMED, R.; YILMA, D.; PEREIRA, D. B.; ESPINO, F.E.J.; MIA, R.Z; CHUQUIYAURI, R.; VAL, F.; CASAPÍA, M.; MONTEIRO, W.M.; BRITO, M.A.M.; COSTA, M.R.F.; BUATHONG, N.; NOEDL, H.; DIRO, E.; GETIE, S.; WUBIE, K.M.; ABDISSA, A.; ZEYNUDIN, A.; ABEBE, C.; TADA, M.S.; BRAND, F.; BECK, H.P.; ANGUS, B.; DUPARC, S.; KLEIM, J.P.; KELLAM, L.M.; ROUSELL, V.M.; JONES, S.W.; HARDAKER, E.; MOHAMED, K.; CLOVER, D.D.; FLETCHER, K.; BRETON, J.J.; UGWUEGBULAM, C.O.; GREEN, J.A.; KOH, G.C.K.W. Single-Dose tafenoquine to prevent relapse of *Plasmodium vivax* malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 3, p. 215-228, fev. 2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710775>

LADEIA-ANDRADE, S.; MELO, G. N. P.; SOUZA-LIMA, R. C.; SALLA, L. C.; BASTOS, M. S.; RODRIGUES, P. T.; LUZ, F. C. O.; FERREIRA, M. U. No clinical or molecular evidence of *Plasmodium falciparum* resistance to artesunate-mefloquine in Northwestern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 148-154, 2016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0017>

LADEIA-ANDRADE, S.; MENEZES, M. J.; SOUZA, T. N.; SILVINO, A. C. R.; CARVALHO JR, J. F.; SALLA, L. C.; NERY, O. A.; MELLO, G. N. P.; CORDER, R. M.; RODRIGUES, P. T.; FERREIRA, M. U. Monitoring the efficacy of chloroquine-primaquine therapy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malária in the transmission hot spot of Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.1128/AAC.01965-18>

LAL, A. A. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malária parasites? **Journal of Biological Chemistry**, 263, p. 5495-5498, 1988.

LAL, A. A.; CRUZ, V. F.; COLLINS, W. E.; CAMPBELL, G. H.; PROCELL, P. M.; MCCUTCHAN, T. F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal

reservoirs for human malária parasites? **Journal of Biological Chemistry**, 263, p. 5495-5498, 1988.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. **The Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p.418-420, 1979.

LEE, K.S., COX-SINGH J., SINGH B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. **Malaria Journal**, v. 21, 10 p., 2009. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-73>

LE MEN, J.; TAYLOR, W. I. A uniform numbering system for indole alkaloids. **Experientia**, v. 21, n. 9, p. 508-510, 1965. <https://doi.org/10.1007/BF02138961>

LI, J.; HUANG, Y.; KUO, Y.; CHENG, C.; KUAN, F.; CHANG, S; LEE, Y.; CHIN, C.; SHI, C. Flavopereirine suppresses the growth of colorectal cancer cells through P53 signaling dependence. **Cancers**, v. 11, n. 1034, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11071034>

LIMA, J. A.; COSTA, R. S.; EPIFÂNIO, R. A.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; PINTO, A. C. *Geissospermum vellosii* stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, p. 508-513, 2009.

LIMA, J. A.; COSTA, T. W. R.; SILVA, L. L.; MIRANDA, A. L. P.; PINTO, A. C. Anticociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, n. 1, p. 237-248, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.01.024>

LIMA, J. A.; COSTA, T. W. R.; FONSECA, A. C.C.; AMARAL, R. F.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; SANTOS-FILHO, O. A.; MIRANDA, A. L. P.; FERREIRA NETO, D. C.; LIMA, F. R. S.; HAMERSKIE, L.; TINOCO, L. W. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, antiinflammatory effects and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**. v. 104, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. v. 2.

LUNA, F. J. *Alographia dos álcalis...* De Frei Conceição Veloso: um manual de química industrial para produção de potassa no Brasil colonial. **Química Nova**. v. 31, n. 8, p. 2214-2220, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800051>

MACHADO, V. R, JACQUES, A. V.; MARCELI, N. S.; BIAVATTI, M. W.; SANTOS-SILVA. Anti-leukemic activity of semisynthetic derivatives of lupeol. **Natural Product Research**. p.1-8, 2020. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1737051>

MACHADO, V. R.; SANDJO, L. P.; PINHEIRO, G. L.; MORAES, M. H.; STEINDEL, M.; PIZZOLATI, M. G.; BIAVATTI, M. W. Synthesis of lupeol derivatives and their antileishmanial and antitrypanosomal activities. **Natural Product Research**. v. 32, n. 3, p. 275-281, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1353982>

MACIEL E SILVA, A. T.; MAGALHÃES, C. G.; DUARTE, L. P.; MUSSEL, W. N.; RUIZ, A. L. T. G.; SHIOZAWA, L.; CARVALHO, J. E.; TRINDADE, I. C.; VIEIRA FILHO, S. A. Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000300251>

MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBORNE, J. B. **Natural Products: their chemistry and biological significance**. Essex: Addison Wesley Longman Limited, p. 389-395, 1993.

MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, L. C. F.; TOMAZ, A. C. A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 158-192, jan./mar., 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100026>

MARTINS, S. S. O. **Efeito dos alcaloides de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Acariquara-Branca) na pressão arterial e a contração do músculo liso de ratos.** 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2010.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. *In vitro* antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 471-477, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.036>

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LILA, M. A. Isolation, and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 885-886, p. 83-89, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.018>.

MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, v. 51, p. 212-237, 1997. <https://doi.org/10.1007/BF02862091>

MILLER, L. H.; SU, X. Artemisinin: discovery from the chinese herbal garden. **Cell**. v. 146, p. 855-858, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.024>

MOORE, R. E.; RAPOPORT, H. Geissosvelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal of the Organic Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 215-230, 1973.

MORAIS, J. A. **Estudo das ações cardiovasculares da fração alcaloídica obtida da espécie nativa amazônica *Geissospermum argenteum* Woodson.** 95 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus/AM, 2012]

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A. DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of

the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p.127-137, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00148-8)

NOEDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B.L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M.M.; Evidence of Artemisinin-resistant Malaria in Western Cambodia. **The New England Journal of Medicine**. v. 359, n. 24, p. 2619-20, 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805011>

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO A. C. M.; BASTOS S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 23, p. 2003-2010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>

OGBOLE, O.; ADENIJI, J.; AJIYEGBA, E.; KAMDEM, R.; CHOUDHARY, M. Anthraquinones and triterpenoids from *Senna siamea* (Fabaceae) Lam inhibit poliovirus activity. **African Journal of Microbiology Research**. v. 8, n. 31, p. 2955-2963, 2014. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6911>

OLIVEIRA, W. B. **Alcaloides indólicos de *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae)**. 104 f Tese (Doutorado) - da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes/RJ, 2008.

OLIVEIRA, B. **Composição química e atividade antimalárica de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Apocynaceae)**. 170 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus/AM, 2018.

OLIVEIRA, D. R.; KRETTLI A. U.; AGUIAR A. C. C.; LEITÃO G. G.; VIEIRA M. N.; MARTINS K. S.; LEITÃO S. G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 424-434, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.035>

OMS. Organização Mundial da Saúde. **World Malaria Report 2019 (WHO)**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>. Acesso em: 02 jun. 2020a.

_____. Organização Mundial da Saúde. **World Malaria Report 2020 (WHO)**. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020b>. Acesso em: 20 dez. 2020.

_____. Organização Mundial da Saúde. **World Malaria Report 2021 (WHO)**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>. Acesso em: 20 dez. 2021.

ONDO, J. P.; LEKANA-DOUKI, J. B.; BONGUI, J.B.; ZANG EDOU, E. S.; ZATRA, R; TOURE-NDUO, F. S.; ELOMRI, A.; LEBIBI, J.; SEGUIN, E. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts and fractions of *Vitex madiensis*, medicinal plant of Gabon. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n.3, p. 316-321, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02922.x>

PACCIONI, J. P.; HUSSON, H. P. Alkaloids of *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). **Phytochemistry**, v. 17, n. 12, p. 2146-2147, 1978.

PANERO, F. S.; VIEIRA, M. F. P.; CRUZ, A. M. F.; MOURA, M. F. V.; SILVA, H. E. B. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702009000300004>

POHLIT, A. M.; LIMA, R. B. S.; FRAUSIN, G.; SILVA, L. F. R.; LOPES, S. C. P.; MORAES, C. B.; COSTA, F. T. M. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery of New Antimalarial Drug Leads. **Molecules**, v.18, n. 8, p. 9219-9240, 2013. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules18089219>

PUBCHEM. NIH. National Library of Medicine. Aspidospermidine, (+)-. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6857472>>. Acesso em: 02 out. 2021.

PUISIUEX, F.; LE HIR, A.; GOUTAREL, R.; JANOT, M. M.; LEMEN, J. Alkaloids of *Geissospermum laeve*. III. Geissoschizoline, apogeissoschizine and geissospermine. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 17, p. 626-633, 1959.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 68-76, São Paulo, jan/fev. 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100013>

QUETIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L.; DUPONT, L.; BISSET, N. G. Isolation and purification of panarine, a alkaloid from a venezuelan curare. **Phytochemistry**. v. 27, n.12, p. 4002-4004, 1988. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83075-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83075-9)

QUINET, C.G.P.; ANDREATA, R.H.P. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de Apocynaceae Adans. na reserva Rio das Pedras, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, **Pesquisa Botânica**, v.56: p.13-74, 2005.

RAHMAN, T.; TIRUVEEDHULA, V. V. N.; COOK, J. M. Synthesis of bisindole alkaloids from the Apocynaceae which contain a Macroline or Sarpagine unit: a review. **Molecules**, v. 21, n. 1525, p. 1-40, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21111525>

RAMOS, A. E. F.; ALCOVER, C.; EVANNO, L.; MACIUK, A.; LITAUDON, M.; DUPLAIS, C.; BERNADAT, G.; GALLARD, J. F.; JULLIAN, J.C.; MOURAY, E.; GRELLIER, P.; LOISEAU, P. M.; POMEL, S.; POUPON, E.; C HAMPY, P.; BENIDDIR, M. A. Revisiting previously investigated plants: a molecular networking- based study of *Geissospermum laeve*. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1007-1014, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01013>

RAPINI, A. **Sistemática: estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da cadeia de espinhaço Minas Gerais**; 2000. 283 f. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, USP, 2000.

RAPOPORT, H.; ONAK, T. P.; HUGHES, N. A.; REINECKE, M. G. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 1601-1604, 1958. <https://doi.org/10.1021/ja01540a023>

RAPOPORT, H.; MOORE, R. E. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and structure determinations of vellosimine, vellosiminol and geissolosimine. **Journal of the Organic Chemistry**, v. 27, p. 2981-2985, 1962. <https://doi.org/10.1021/jo01056a004>

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade antileishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria do Estado de São Paulo, Programa de Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2009.

REINA, M.; RUIZ-MESIA, W.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.; RUIZ-MESIA, L.; GONZÁLEZ COLOMA, A.; MARTÍNEZ-DIAZ, R. Indole alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 928-934, 2012. <https://doi.org/10.1021/np300067m>

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M. D.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, DIFID, 798 p., 1999.

RICH, S. M.; XU, G. Resolving the phylogeny of malaria parasites. **PNAS**, V. 108, N. 32, P. 12973-12974, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110141108>

RIDLEY, R. G. To kill a parasite. **Nature**, v. 424, n. 21, p. 887-889, 2003. <https://doi.org/10.1038/424887a>

RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J.; MREMA, J. E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique. **The Lancet**, v. 1, n. 8054, p. 22-23, 1978. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90365-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90365-3)

ROCHA E SILVA, L. F.; MAGALHÃES, P. M.; COSTA, M. R. F.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M.; HIDALGO, A. F.; POHLIT, A. M.; VIEIRA, P. P. R. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* Welch field isolates to infusions prepared from *Artemisia annua* L. cultivated in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 107, n.7, p. 859-866, nov. 2012. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000700004>

ROCHA E SILVA, L. F. Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: estudos *in vitro*, *in vivo* e de mecanismo de ação. Tese (Doutorado) - UFAM/PMPB, Manaus, 165 f, 2014.

SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil imperial. **Química Nova**, v. 21, p. 666-670, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500023>

SCHEFFE, H. The simplex-centroid design for experiments with mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B**, v. 25, n. 2, p. 235--263, 1963.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F.; CHAVES, F. C. M.; POPPI, R. J.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 409-414, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012000300006>

SILVA E SILVA, J. V. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividade antileishmania de espécies *Geissospermum* (Apocynaceae)**. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém/PA, 2016.

SILVA E SILVA, J. V.; BRIGIDO, H. P. C.; ALBUQUERQUE, K. C. O.; CARVALHO, J. M.; REIS, J. F.; FARIA, L. V.; COELHO-FERREIRA, M. R.; SILVEIRA, F. T.; CARNEIRO, A. S.; PERCÁRIO, S.; MARINHO, A. M. R.; DOLABELA, M. F. Flavopereirine - an alkaloid derived from *Geissospermum vellosii* - presents leishmanicidal activity *in vitro*. **Molecules**, v. 24, p. 785-798, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24040785>

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed., Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2017. 821p.

SINKA, M. E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; RUBIO-PALIS, Y.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; COETZEE, M.; MBOGO, C. M.; HEMINGWAY, J.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETTING, P. W.; KABARIA, C.W.; BURKOT, T.R.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites Vectors**, v. 5, n. 69, p. 1-11, 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>

SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography A**. v., 92, n. 2, p., 223-230, 1974. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85732-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85732-5)

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

STEELE, J. C. P.; VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; SIMMONDS, M. S. J.; WARHURST, D. C. Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 85-88, 2002. <https://doi.org/10.1021/np0101705>

SUTHERLAND, C.; TANOMSING, N.; NOLDER, D.; OGUIKE, M.; JENNISON, C.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; DO ROSÁRIO, V. E.; AREZ, A. P.; PINTO, J.; MICHON, P.; ESCALANTE, A.; NOSTEN, F.; BURKE, M.; LEE, R.; BLAZE, M.; OTTO, T. D.; BARNWELL, J.; PAIN, A.; WILLIAMS, J.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; SNOUNOU, G.; LOCKHART, P. J.; CHIODINI, P. L.; IMWONG, M.; POLLEY, S. D. Two non-recombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n.10, p. 1544-1550, 2010. <https://doi.org/10.1086/652240>

TA, T. H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A.; ISMAIL, N.; RUBIO, J. M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 68-74, 2014. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-68>

THE PLANT LIST. **Apocynaceae**. Disponível em: <<http://www.Theplantlistorg/1.1/browse/A/Apocynaceae/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p. 673-675, 1976. <https://doi.org/10.1126/science.781840>

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, v. 099, p. 57-69, 2005.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 98, p. 351-360, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.049>

VIZZI, E.; BASTIDAS, G.; HIDALGO, M.; COLMAN, L.; PÉREZ, H. A. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A202A/376G variant. **Malaria Journal**, v. 15, n. 19, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1069-5>

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1984, 320 p.

WCSP. **World Checklist of Selected Plant Families**. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://wcsp.science.kew.org/qsearch.do>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

WANG, J.; ZHANG, C.; CHIA, W. N.; LOH, C. C. Y.; LI, Z.; LEE, Y. M.; HE, Y.; YUAN, L.; LI, T. K.; LIU, M.; LIEW, C. X.; LEE, Y. Q.; ZHANG, J.; LU, N.; LIM, C. T.; HUA, Z.; LIU, B.; SHEN, H.; TAN, K. S. W.; LIN, Q. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in

Plasmodium falciparum. **Nature Communications**, n. 6, v. 10111, p. 1-11, 2015.

<https://doi.org/10.1038/ncomms10111>

WENKERT, E.; KILZER, J. A flavopereirine synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, p. 2283-2284, 1962. <https://doi.org/10.1021/jo01053a552>

WERNER, J. A. T.; OLIVEIRA, S. M.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; DIAS, J. F.G.; LORDELLO, A. L. L.; MIGUEL, O. G.; ROYES, L. F.; FERREIRA, F.; SANTOS, A. R. S. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 163–169, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.026>

WINNING, H.; LARSEN, F. H.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance**, v.190, p. 26-32, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.jmr.2007.10.005>

WONGSRICHANALAI, C. I; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 2. p. 209-218, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00239-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00239-6)

YU, J.; CHEN, Q. The plant extract of *pao pereira* potentiates carboplatin effects against ovarian cancer, **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 1, p. 36-43, 2014.

<https://doi.org/10.3109/13880209.2013.808232>

YU, J.; DRISKO, J.; CHEN, Q. Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. **Oncology Reports**, v. 30, p. 149-156, 2013. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2461>

YU, J.; WANG, T.; LIU, X.; DESCHAMPS, J.; FLIPPEN-ANDERSO, J.; LIAO, X.; COOK, J. M. General approach for the synthesis of sarpagine indole alkaloids. Enantiospecific total synthesis of (+)-vellosimine, (+)-normacusine B, (-)-alkaloid Q₃, (-)-panarine, (+)-*N*_a-methylvellosimine and

(+)-*N*_α-methyl-16-epipericyclivine. **Journal of Organic Chemistry**. v. 68, n. 20, p. 7565-7581, 2003. <https://doi.org/10.1021/jo030006h>

ANEXOS

Anexo 1: Construção da matriz de dados a partir dos espectros de massas dos extratos.

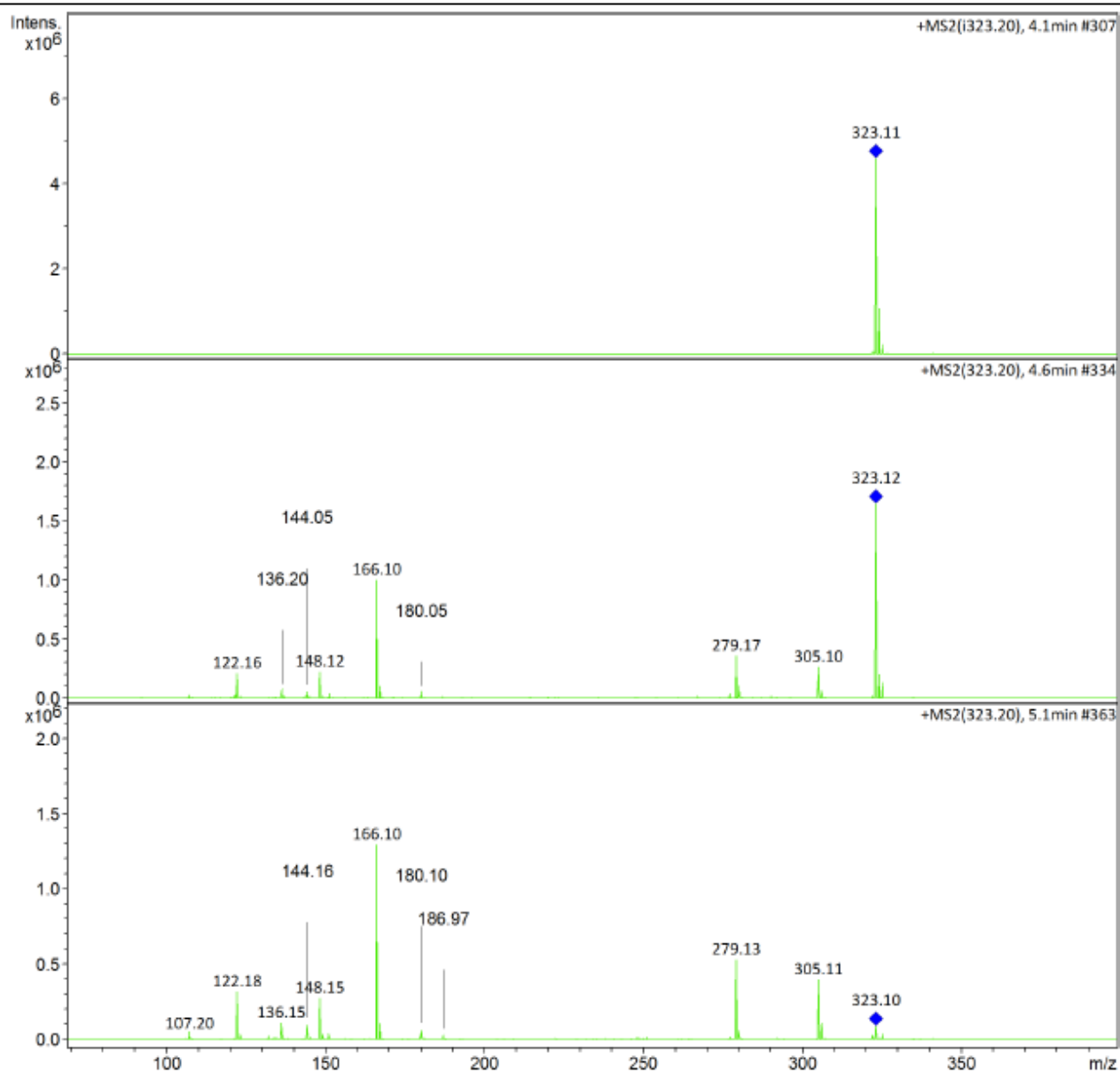
m/z	EGa C1	EGa C2	EGa C3	EGa C4	EGa C5	EGa C6	EGa C7	m/z	EGa F1	EGa F2	EGa F3	EGa F4	EGa F5	EGa F6	EGa F7	m/z	1Ga G1	1Ga G2	1Ga G3	1Ga G4	1Ga G5	1Ga G6	1Ga G7
247	0	65,62	0	0	0	0	0	217	37,75	27,04	22,38	58,24	56,51	68,21	66,19	203	0	0	0	0	0	29,64	0
275	0	38,06	0	0	0	0	0	233	0	0	5,61	0	0	0	0	217	100	100	100	79,25	100	100	100
280	9,99	0	0	0	0	0	0	249	0	0	0	12,38	0	0	0	233	0	0	33,48	0	0	0	23,71
287	72,26	0	0	50,41	9,74	6,72	7,95	275	9,14	10,29	26,74	38,32	48,42	76,25	60,99	249	20,21	0	27,51	0	21,79	24,17	23,49
288	0	38,03	0	0	0	0	0	276	0	0	0	0	14,06	16,93	13,3	275	39,57	60,71	73,77	27,25	33,15	31,67	27,45
294	100	59,69	12,79	100	33,09	21,51	21,6	280	0	0	10,29	12,57	28,91	40,03	30,63	280	29,64	40,04	56,07	27,87	55,02	49,11	47,35
295	17,85	45,28	12,67	0	12,1	10	10,2	281	0	0	5,51	0	15,01	0	0	281	0	0	27,02	0	23,36	0	21,43
299	14,4	0	6,37	10,1	0	0	0	283	0	0	0	0	12,13	0	0	288	0	0	31,28	0	22,52	24,05	23,18
301	8,73	95,26	14,65	24,05	27,87	16,87	18,89	284	7,31	0	0	0	0	0	0	291	17,22	27,03	39,64	0	0	0	0
302	0	0	6,14	6,91	9,99	0	0	288	0	0	0	11,56	0	16,24	0	293	0	0	30,49	0	0	0	0
309	53,72	47,09	85,35	69,17	97,13	91,26	82,92	291	10,11	0	10,12	23,4	32,18	37,89	34,27	294	0	0	0	0	21,58	0	22,34
310	0	0	0	0	15,97	12,28	13,99	293	7	0	5,74	10,66	13,23	18,13	15,97	295	17,59	29,49	39,16	39,49	41,39	39,23	38,74
311	11,12	31,41	11,33	11,51	0	0	0	301	7,17	16,48	0	16,64	17,19	27,98	19,97	299	0	0	0	22,17	0	0	0
313	9,28	0	29,39	13,82	15,24	18,37	16,34	305	21,53	22,35	16,36	51	53,69	60,1	57,61	300	17,03	0	0	24,19	24,23	39,23	0
315	24,44	38,25	6,5	24,97	12,21	8,12	7,73	307	11,63	0	8,01	23,01	27,7	35,34	32,84	301	23,18	47,34	52,24	27,31	36,4	40,49	29,13
317	0	32,16	0	0	0	0	0	309	0	0	0	0	0	0	12,97	305	26,62	40,76	55,12	43,47	33,36	36,49	33,07
321	0	41,89	0	0	0	0	0	313	0	0	7,22	0	11,8	0	0	307	20,22	29,17	38,9	25,96	21,33	25,7	0
323	9,17	0	13,05	11,29	16,5	10,37	10,9	323	0	9,26	0	0	0	0	0	309	31,55	75,29	50,16	55,1	41,82	49,31	46,81
325	16,88	0	13,32	15,58	15,94	10,31	11,23	325	38,24	29,04	23,64	40,82	42,03	40,32	39,6	317	0	0	27,39	23,64	0	0	0
327	0	0	0	0	0	6,88	6,63	326	0	0	5,88	0	0	0	0	337	19	35,44	0	0	25,42	32,05	23,59
329	0	0	7,75	0	9,55	0	0	327	6,79	0	0	0	0	0	0	339	33,71	48,33	0	40,77	52,83	50,97	52,51
333	0	34,61	0	0	0	0	0	341	15,17	27,62	12,33	19,86	21,8	20,76	20,18	349	23,67	28,84	0	0	0	0	0
337	11,9	69,15	18,64	14,73	18,11	17,96	16,08	343	13,41	0	23,35	17,29	18,69	22,72	21,86	351	24,18	33,86	29,36	39,3	25,57	30,52	23,62
339	62,28	30,72	100	73,64	100	100	100	353	0	11,77	0	0	0	0	0	355	18,19	0	25,68	21,28	0	22,93	24,52
340	9,7	0	0	0	13,24	0	0	355	35,63	43,38	37,74	37,83	45,5	40,63	40,44	365	29,74	0	0	49,44	43,91	36,81	48,32
341	0	0	16,28	8,75	15,9	15,14	16,26	356	0	0	5,92	0	0	0	0	367	30,1	53,49	43,02	34,45	28,35	35	33,62
343	0	0	6,78	0	0	7,67	8,31	357	0	9,06	0	0	0	0	0	383	0	35,56	0	0	0	0	0
349	0	49,73	0	0	0	6,96	6,58	365	0	0	0	14,09	0	17,16	16,08	385	66,37	88,01	69,79	100	62,5	68,53	67,27
351	29,63	78,43	16,46	32,11	28,91	24,92	23,55	367	16,46	22,34	13,4	28,65	27	29,99	28,55	413	27,66	63,39	72,69	29,59	43,01	46,54	33,77
355	10,65	38,84	9,8	9,15	0	6,81	5,87	368	6,86	0	0	0	0	0	0	441	0	26,5	0	0	0	0	0
367	0	0	11,62	10,97	10,9	8,82	8,31	371	0	9,71	0	0	0	0	0	463	0	30,62	0	0	0	0	0
385	0	30,55	0	0	0	0	0	383	0	27,53	0	0	0	0	0	468	0	0	0	19,98	0	0	0
413	0	100	0	0	12,25	6,73	0	385	100	100	100	100	100	100	100	511	0	29,84	0	20,89	0	0	0

Anexo 2: Espectro de MS da substância A (64).

Analysis Info		Acquisition Date 11/19/2019 3:53:15 PM	
Analysis Name	D:\Data\2019\Adrian\Alunos\Marlene\MS\19-11-2019\ID_ESI+_GASC3F3.d	Operator	BDAL@DE
Method	DEF_MS.M	Instrument	amaZon speed
Sample Name	ID_ESI+_GASC3F3		
Comment	Fluxo = 280uL/h diluicao = 100 uL amostra retirada do tubo de RMN, seca e ressuspensa em 1mL de MeOH		

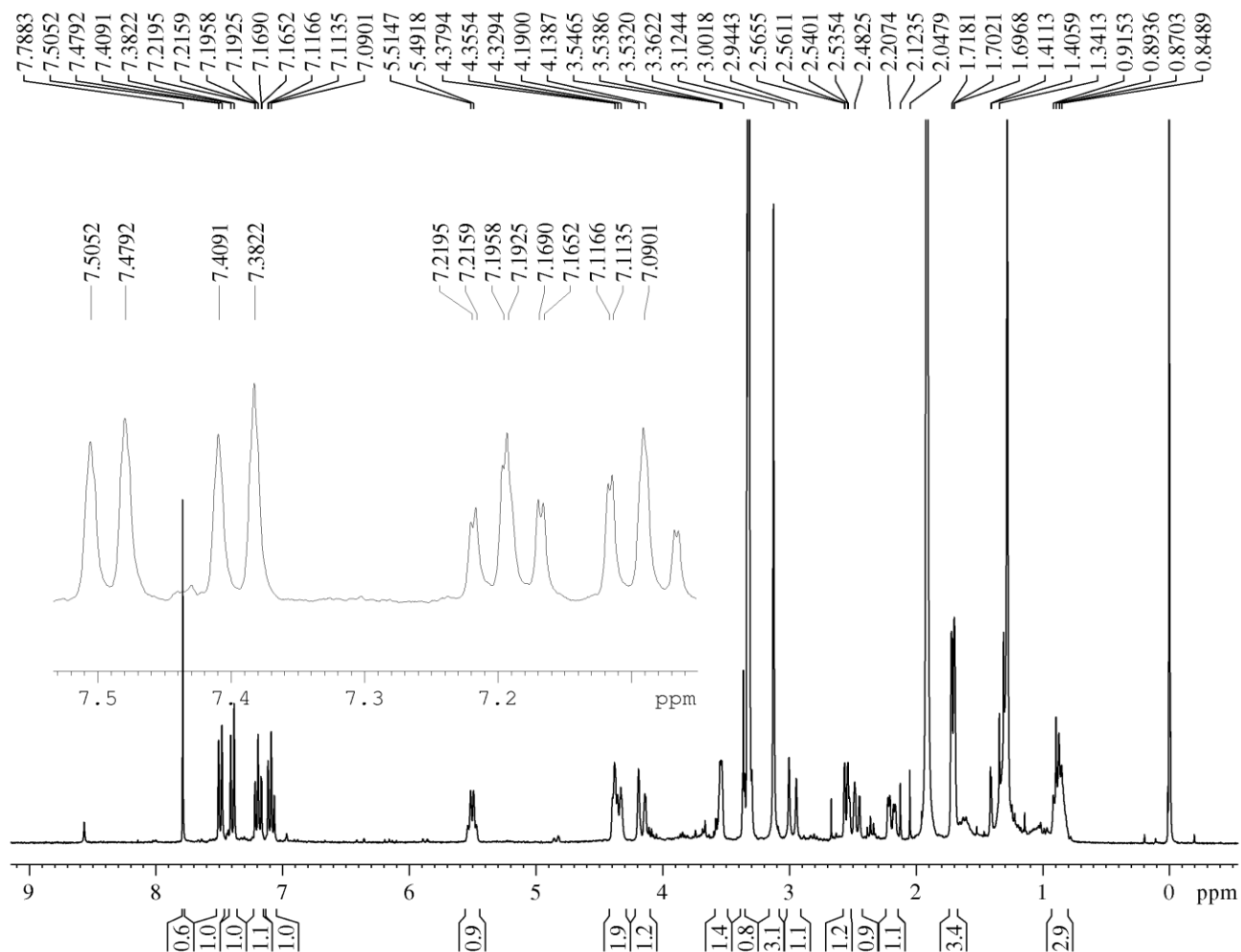
Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	100 m/z	Scan End	2800 m/z
Accumulation Time	288 μ s	RF Level	100 %	Trap Drive	76.8
SPS Target Mass	1000 m/z	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



Anexo 3: Espectro de RMN de ^1H (300/75 MHz) da substância A (**64**) em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$.

GASC3F3 (1H; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDCl_3 c/TMS
21/10/2019 c/supr H2O do MeOD Op.: Zelina



Current Data Parameters
NAME Marlene19_GASC3F3_noesy
EXPNO 11
PROCNO 1

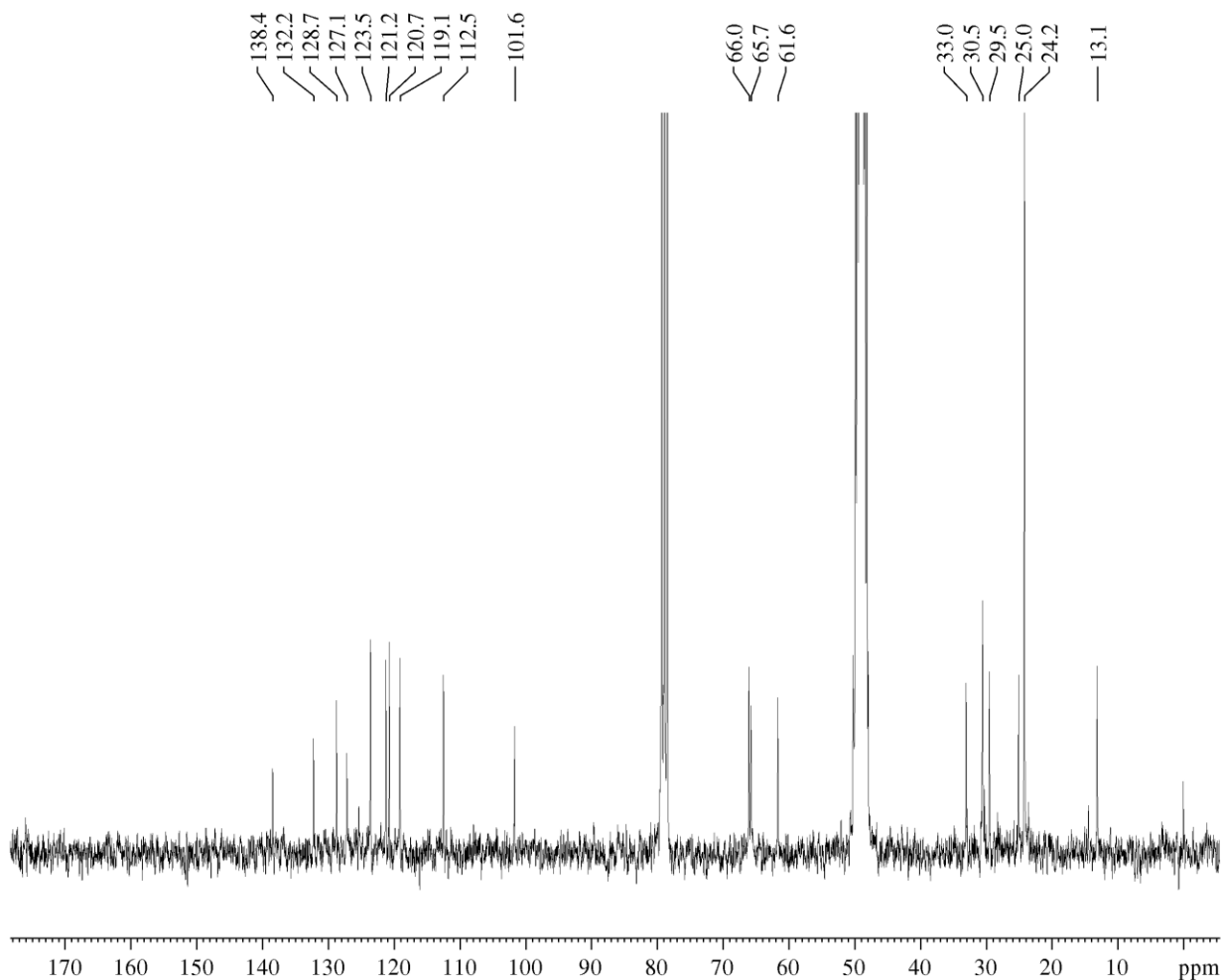
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20191021
Time 9.51
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpcpr
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 64
DS 4
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 44.5217
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 292.0 K
D1 2.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
P41 2000000.00 usec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2014689 MHz
NUC1 ^1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W
PLW9 0.00004670 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.1999985 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 4: Espectro de RMN de ^{13}C (300/75 MHz) da substância A (**64**) em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$.

GASC3F3 (13C; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDCl_3 c/TMS
08/11/2019 Op.: Magno



Current Data Parameters
NAME Marlene19_GASC3F3_noesy
EXPNO 21
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20191111
Time 1.06
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 57530
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 292.3 K
D1 0.30000001 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.02336821 sec
L4 20
L5 8
P32 90.00 usec
TD0 1

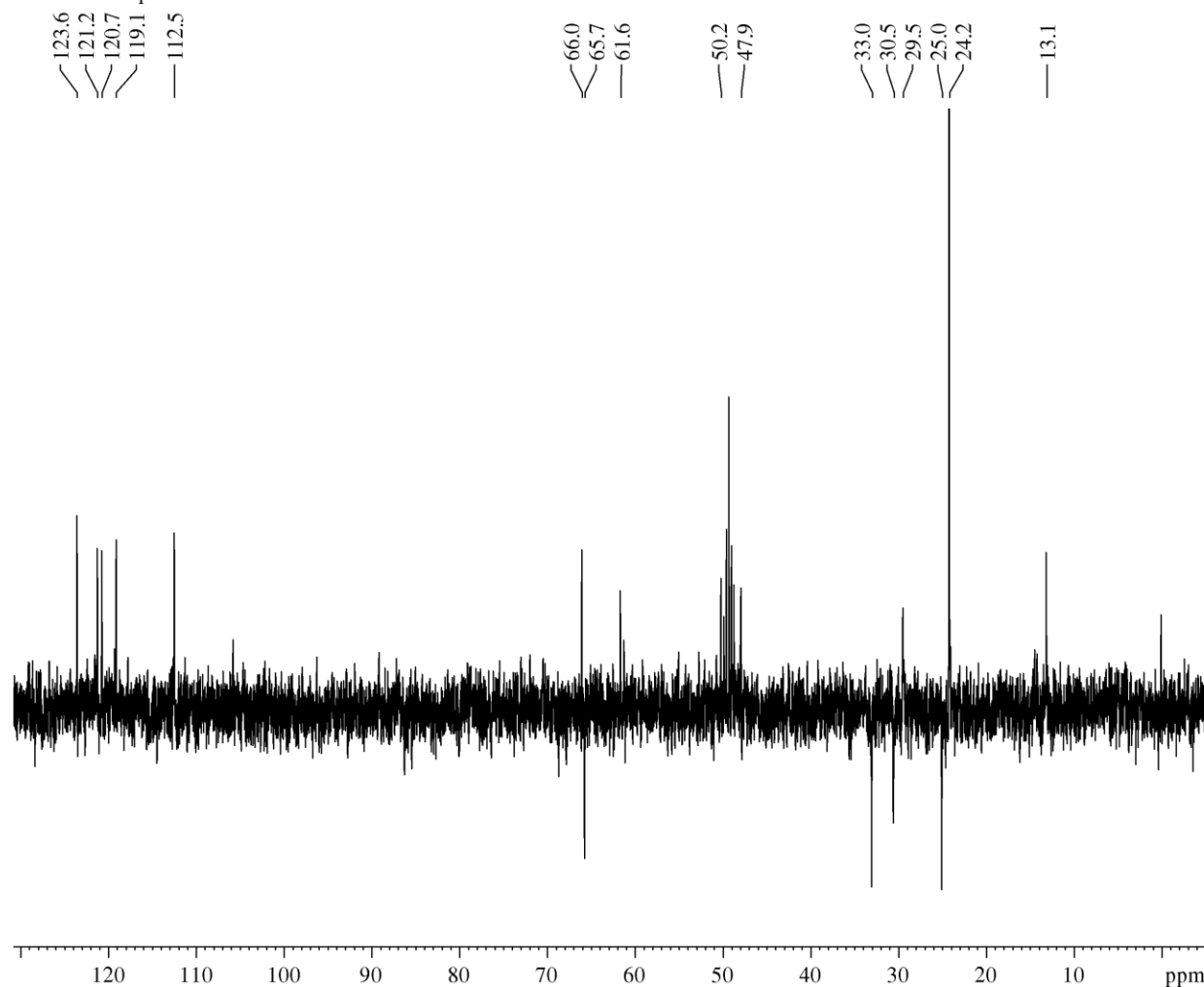
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4852669 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 3.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 5: Espectro de DEPT 135 (300/75 MHz) da substância A (**64**) em CD₃OD/CDCl₃.

GASC3F3 (Dept 135; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDC13 c/TMS
23/10/2019 Op.: Zelina



Current Data Parameters
NAME Marlene19_GASC3F3_noesy
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20191023
Time 15.19
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 2048
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 292.8 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

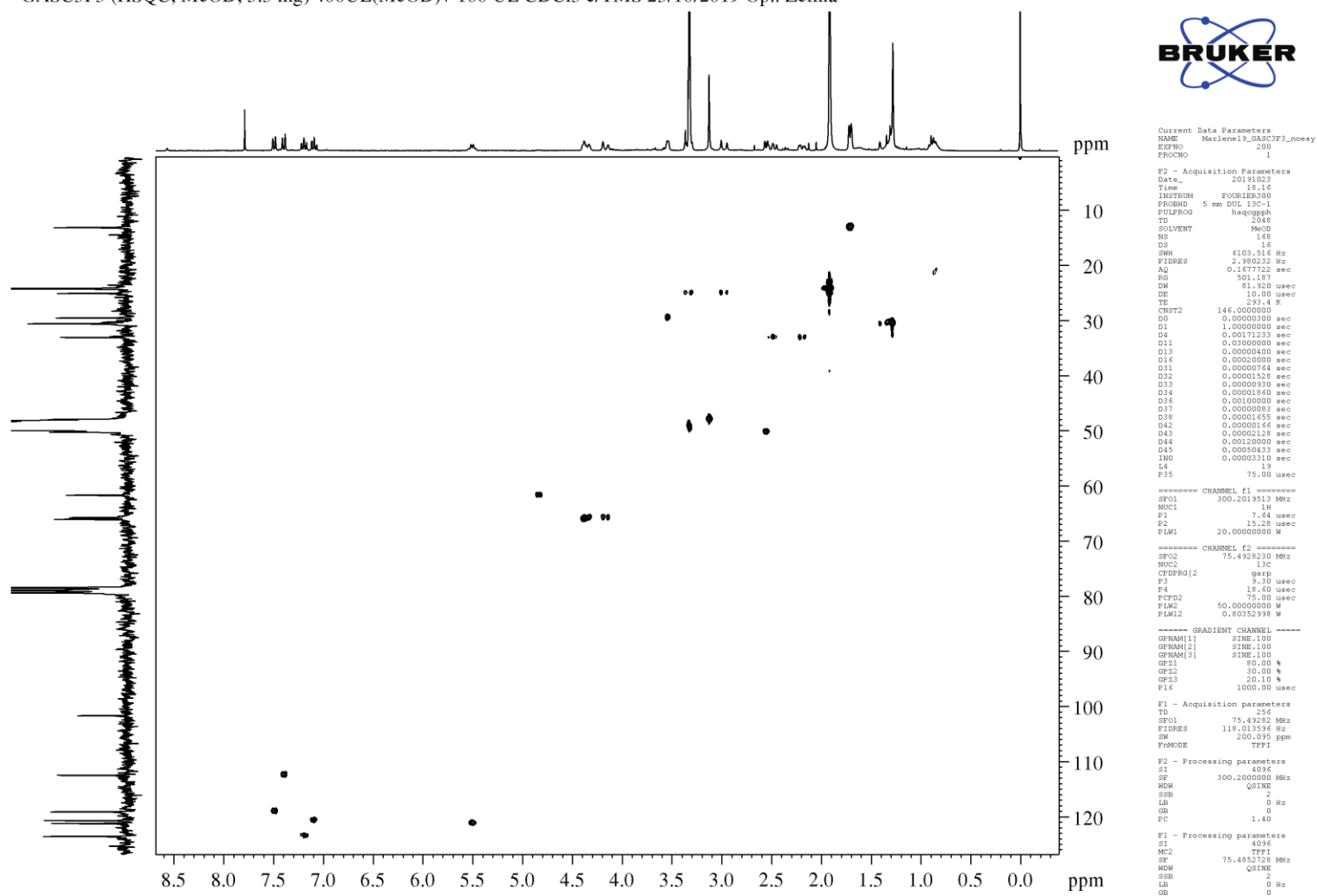
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4852669 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

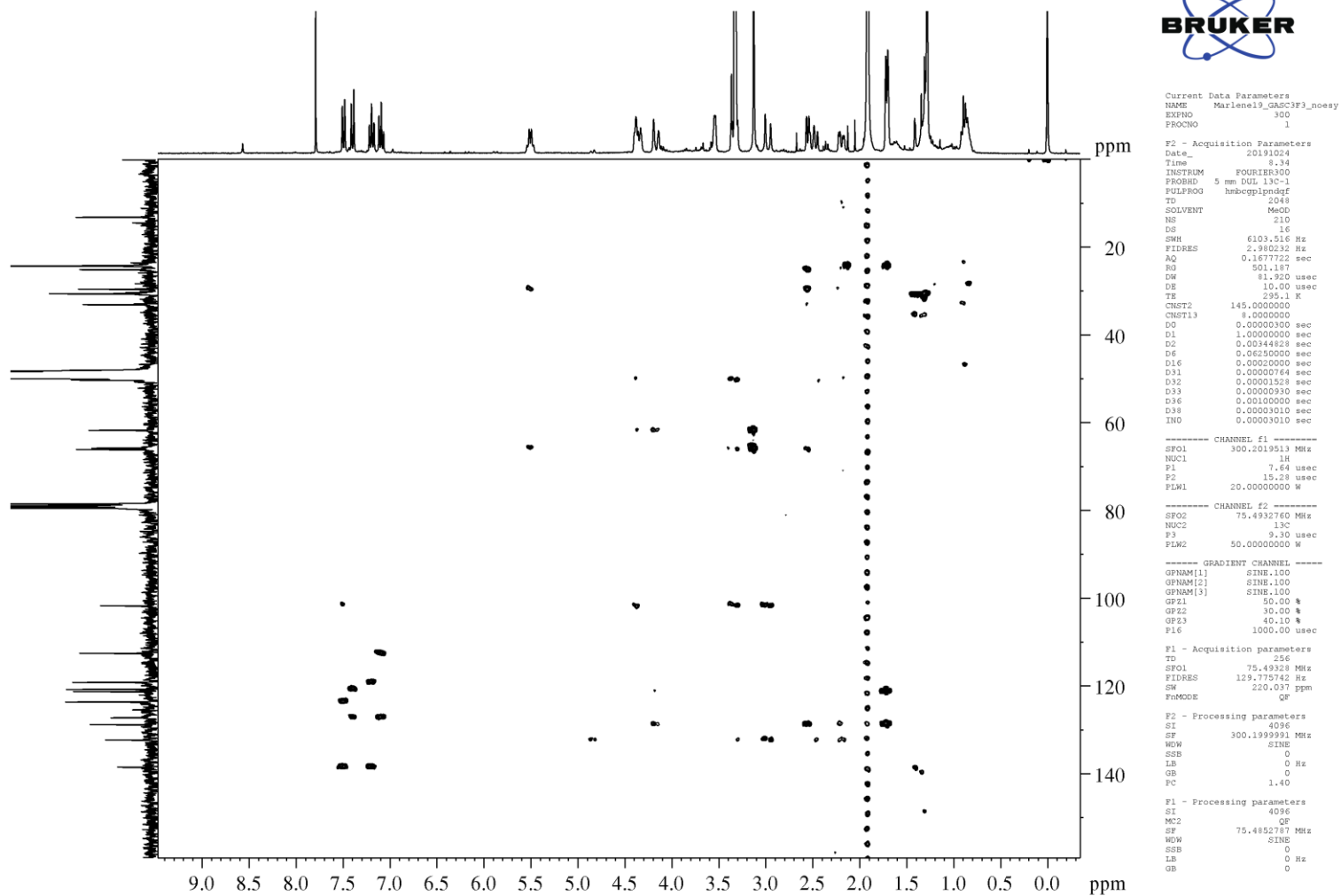
Anexo 6: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância A (**64**) em CD₃OD/CDCl₃.

GASC3F3 (HSQC; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDC13 c/TMS 23/10/2019 Op.: Zelina



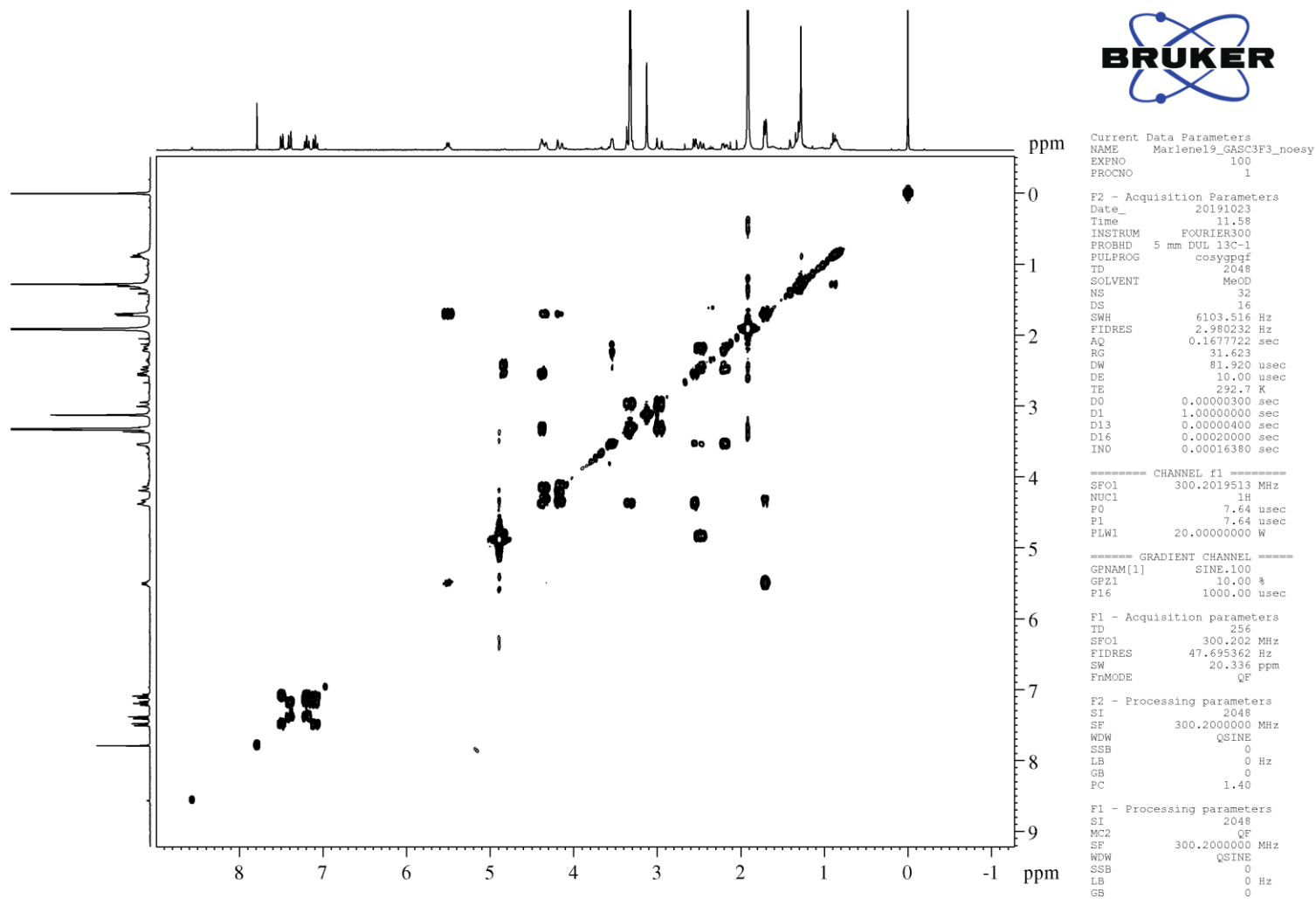
Anexo 7: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância A (**64**) em CD₃OD/CDCl₃.

GASC3F3 (HMBC; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDCl₃ c/TMS
23/10/2019 Op.: Zelina



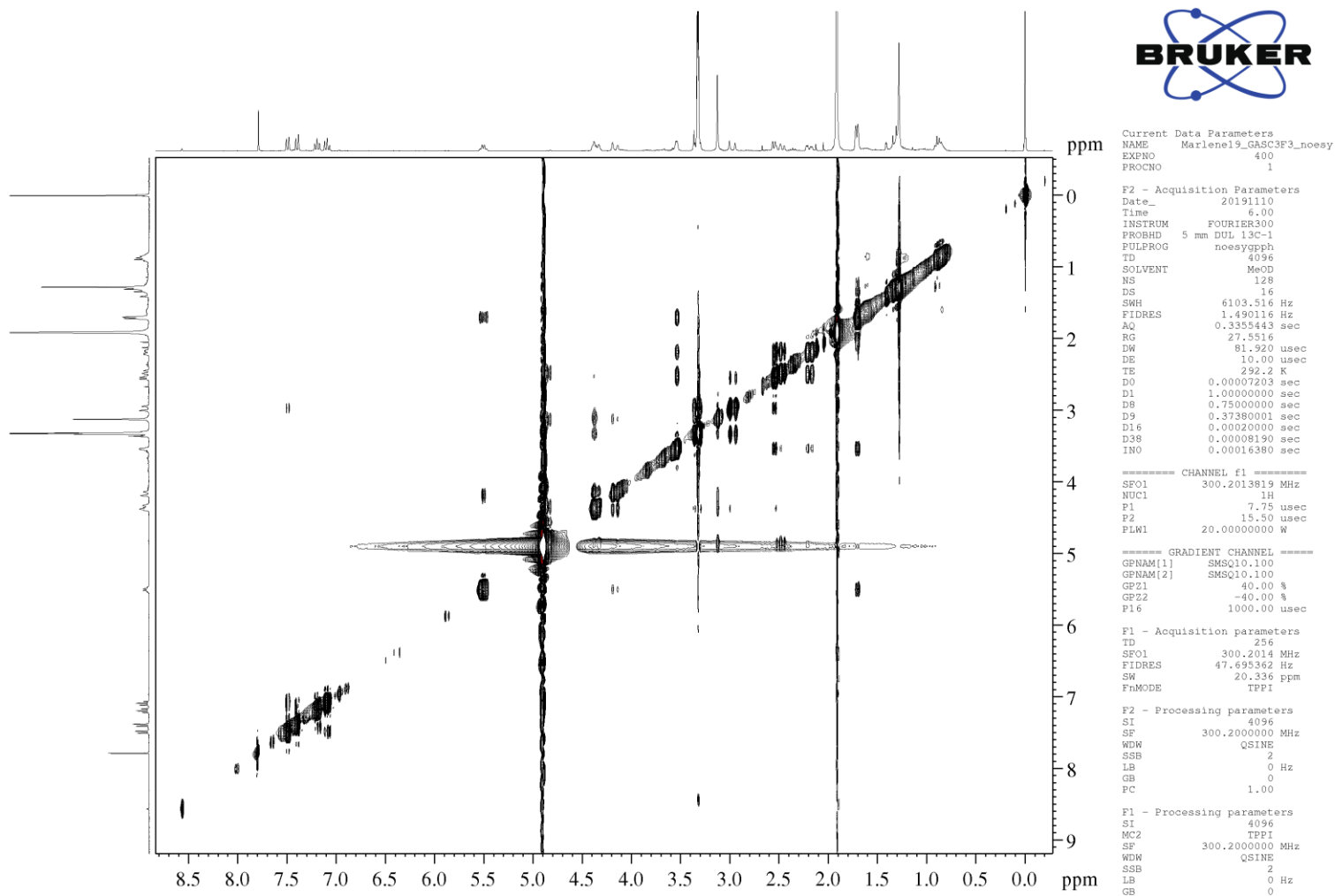
Anexo 8: Espectro de COSY (300/75 MHz) da substância A (**64**) em CD₃OD/CDCl₃.

GASC3F3 (COSY; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDCl₃ c/TMS 23/10/2019 Op.: Zelina



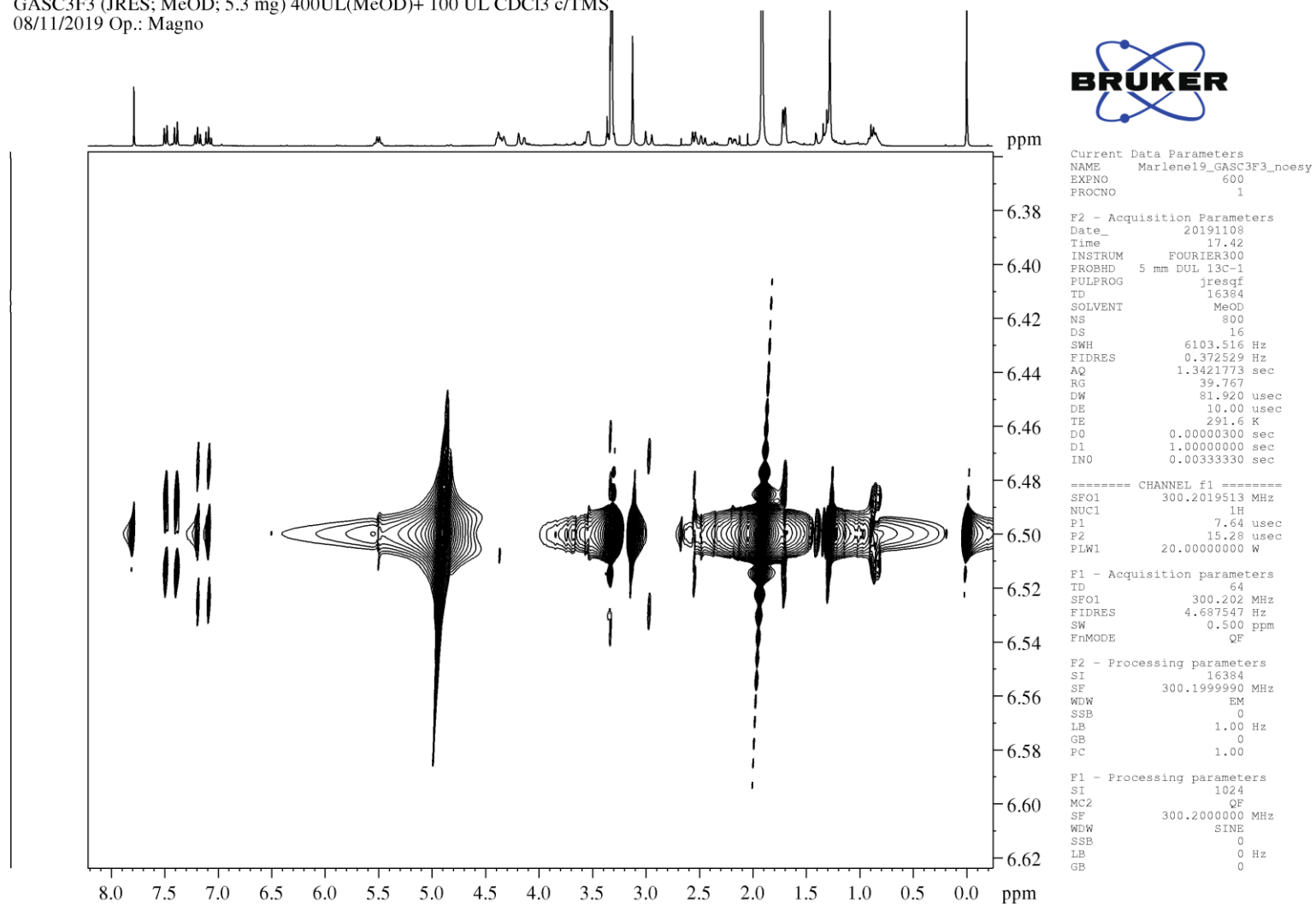
Anexo 9: Espectro de NOESY (300/75 MHz) da substância A (**64**) em CD₃OD/CDCl₃.

GASC3F3 (NOESY; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDCl₃ c/TMS 08/11/2019 Op.: Magno

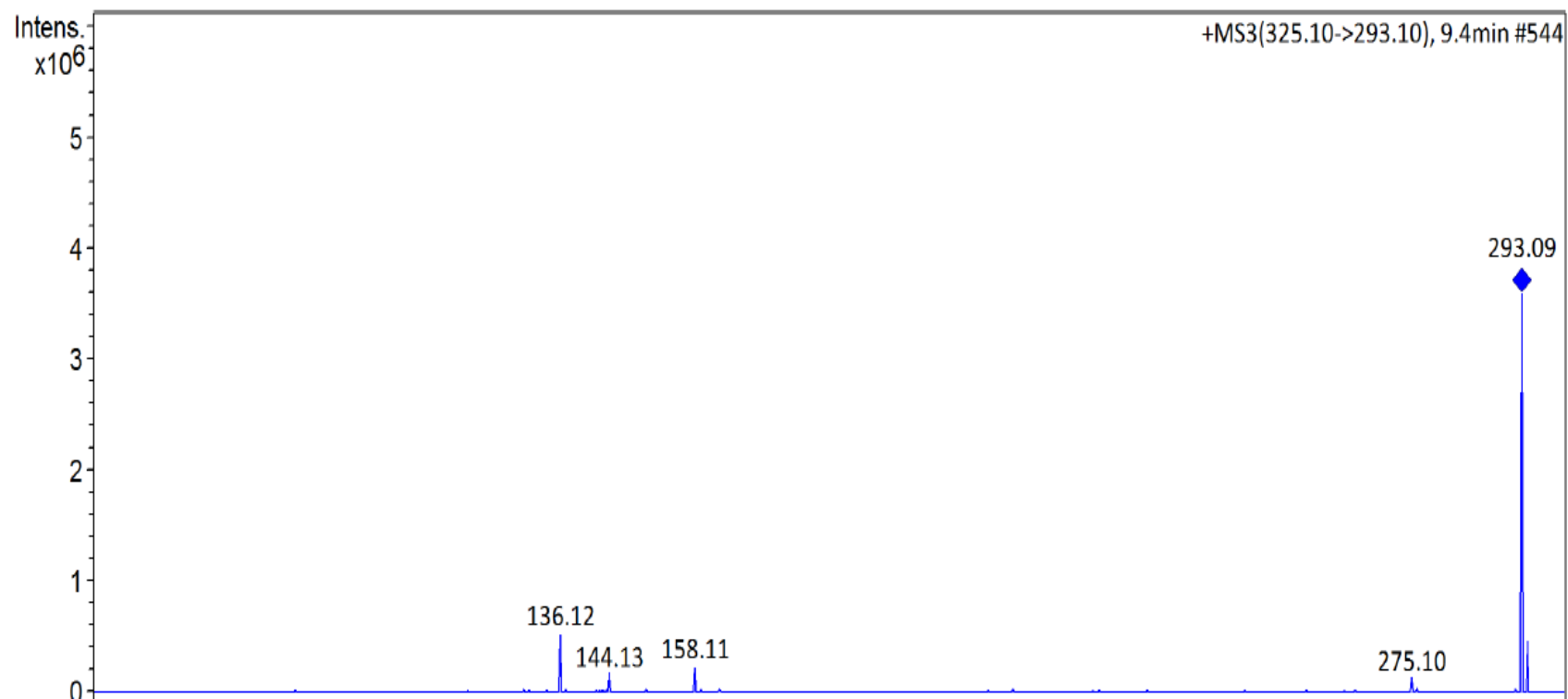


Anexo 10: Espectro de JRES (300/75 MHz) da substância A (**64**) em CD₃OD/CDCl₃.

GASC3F3 (JRES; MeOD; 5.3 mg) 400UL(MeOD)+ 100 UL CDC13 c/TMS
08/11/2019 Op.: Magno

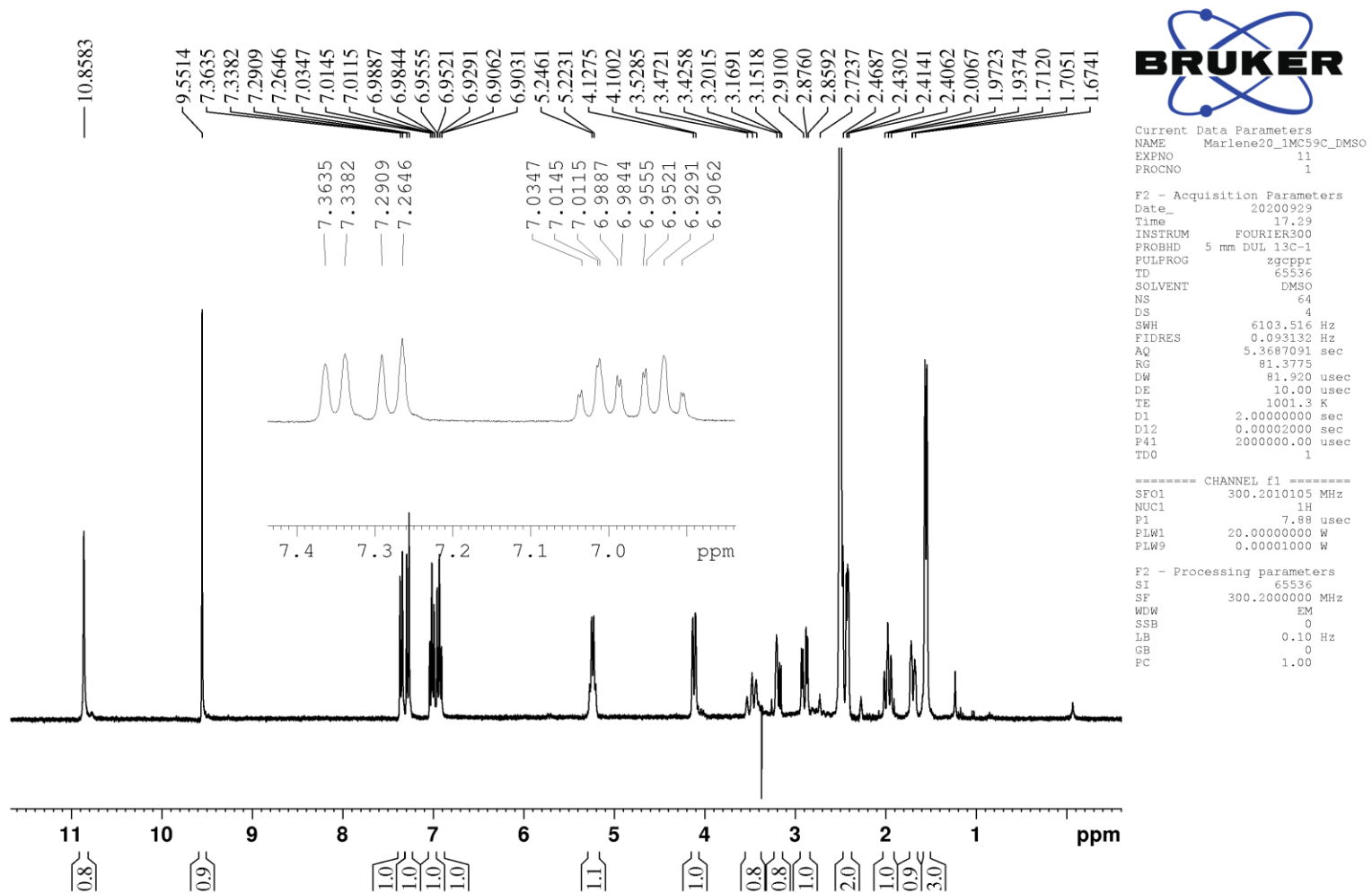


Anexo 11: Espectro de MS da substância B (31).



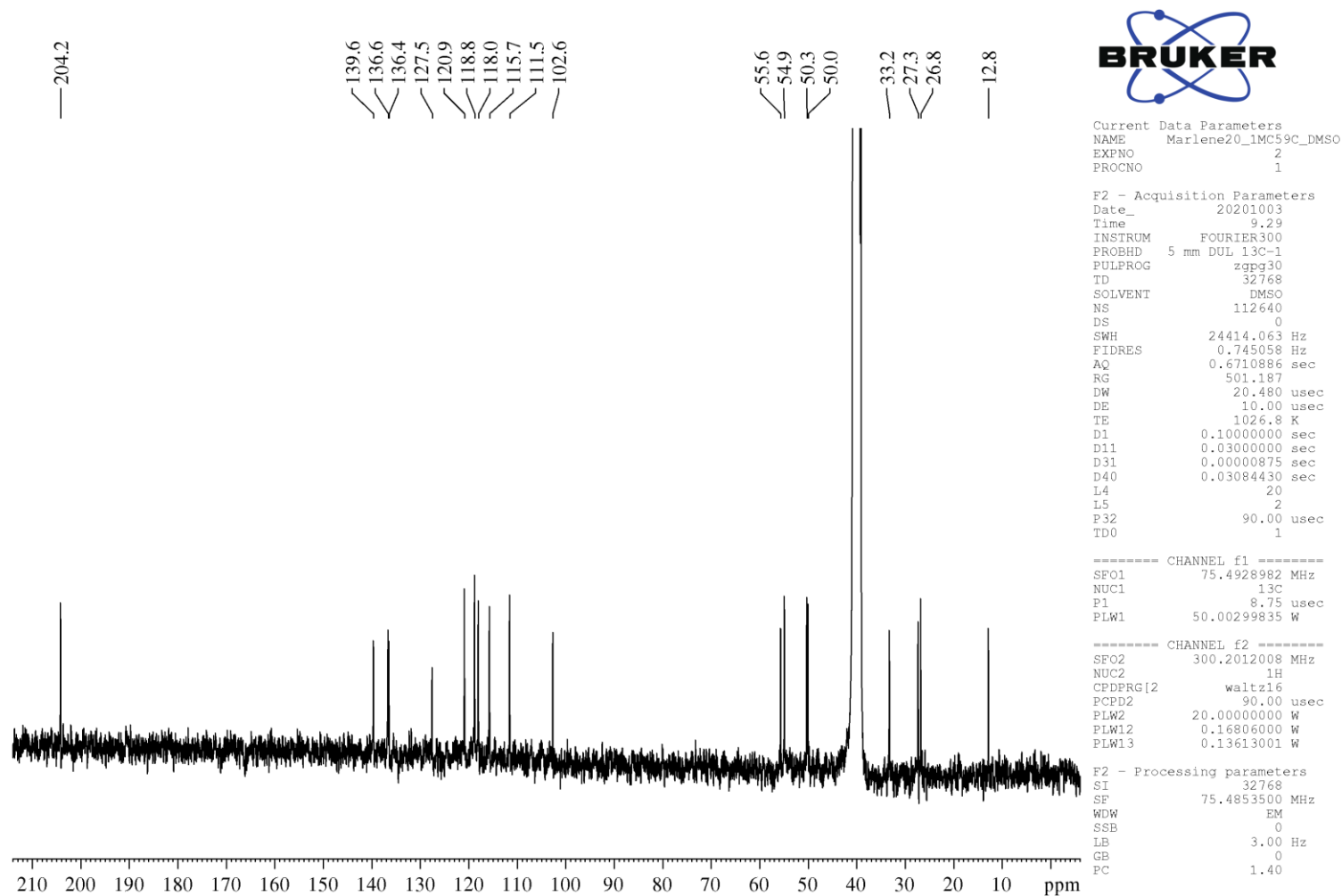
Anexo 12: Espectro de RMN de ^1H (300/75 MHz) da substância B (**31**) em $\text{DMSO}-d_6$.

Marlene20_1MC59 (1H SUP; DMSO; 1.8mg) 29/09/2020
Op.: Magno



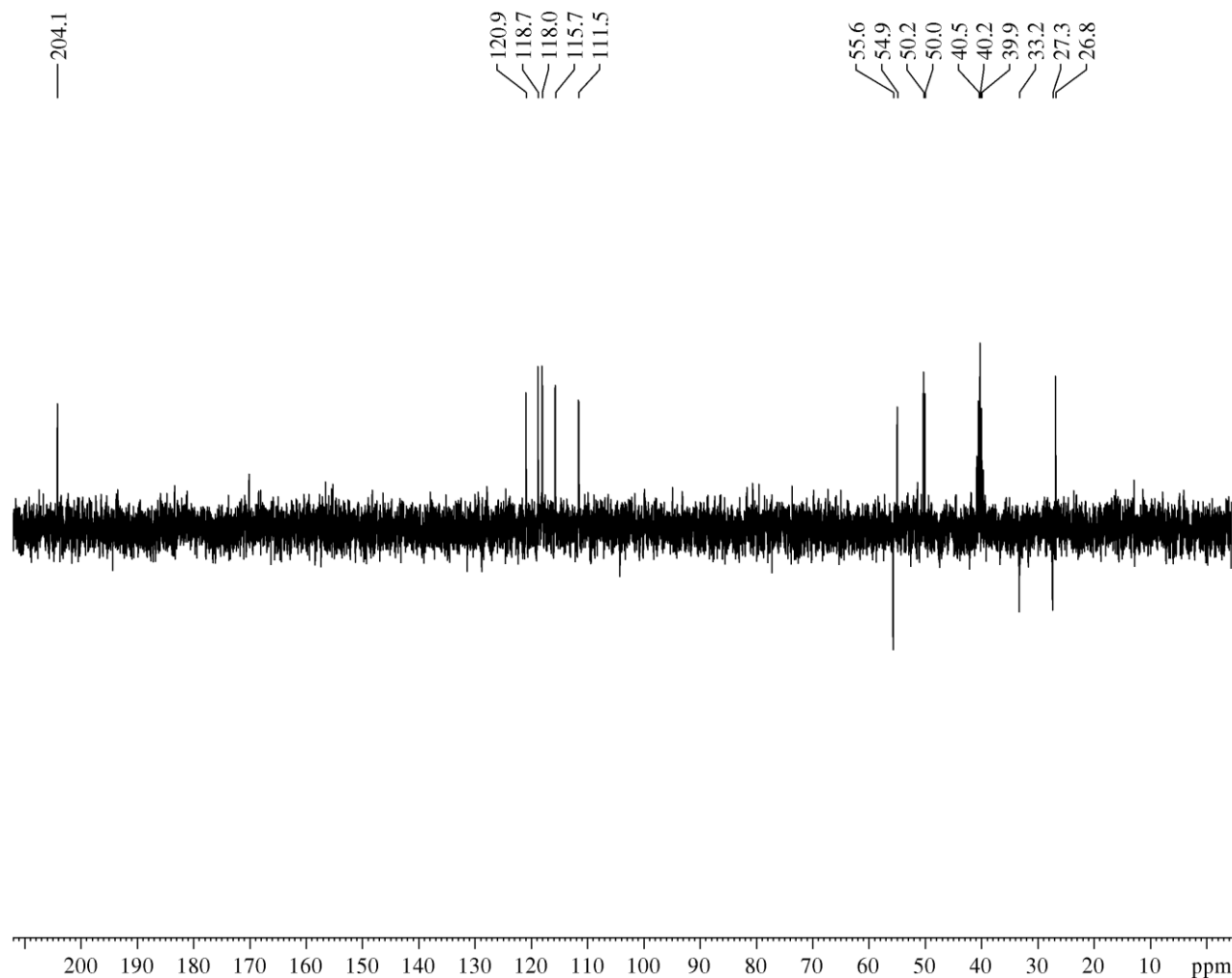
Anexo 13: Espectro de RMN de ^{13}C (300/75 MHz) da substância B (31) em DMSO- d_6 .

1MC59 (13C; DMSO- d_6 ; 1,8mg) 03/10/2020 Op.: Sabrina



Anexo 14: Espectro de DEPT 135 (300/75 MHz) da substância B (**31**) em DMSO-*d*₆.

1MC59 (DEPT 135; DMSO-*d*₆; 1,8mg) 02/10/2020 Op.: Sabrina



Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC59C_DMSO
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20201003
Time 6.04
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 5120
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1026.8 K
CNST2 145.0000000
D1 1.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928978 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

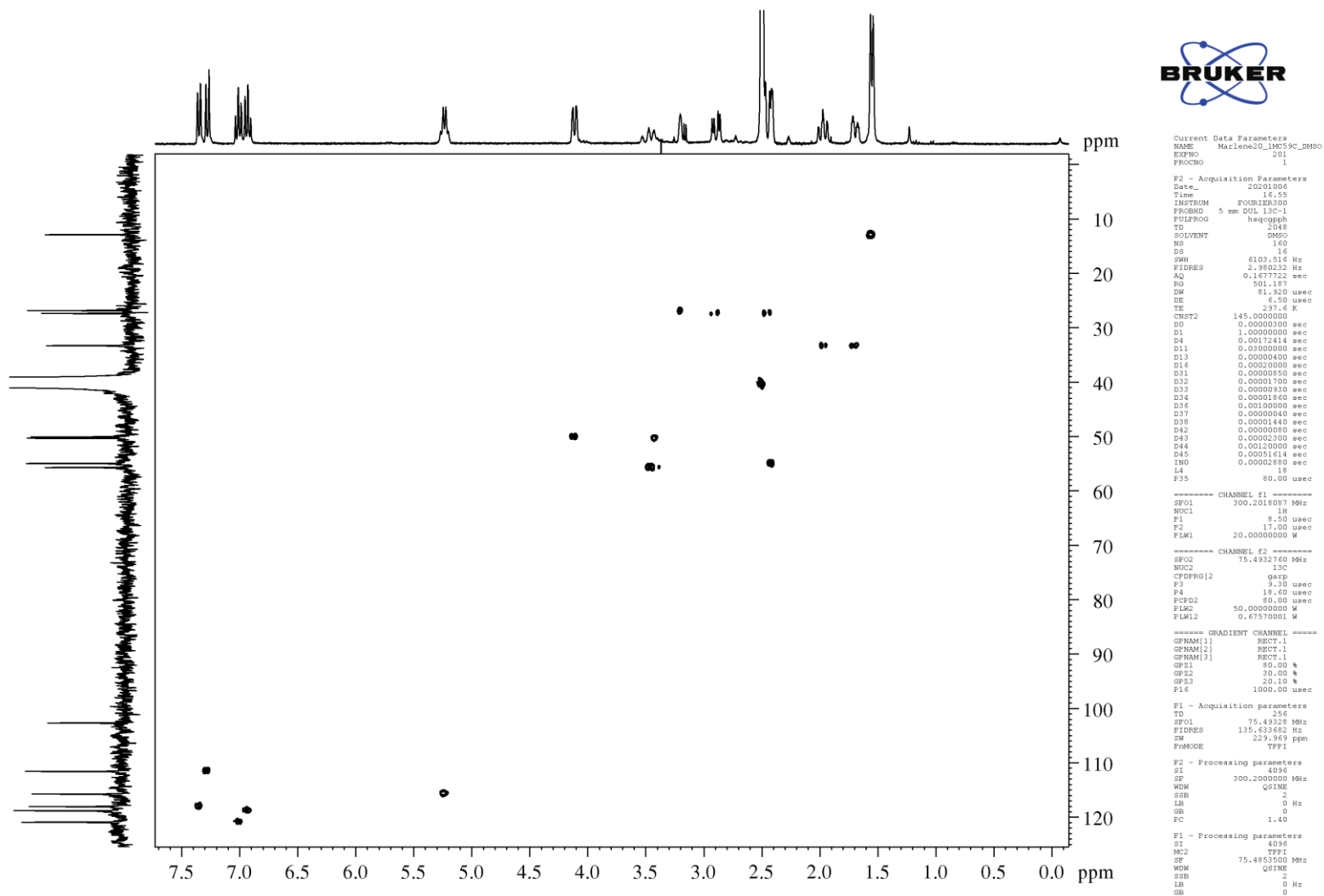
===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 15: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância B (**31**) em DMSO-*d*₆.

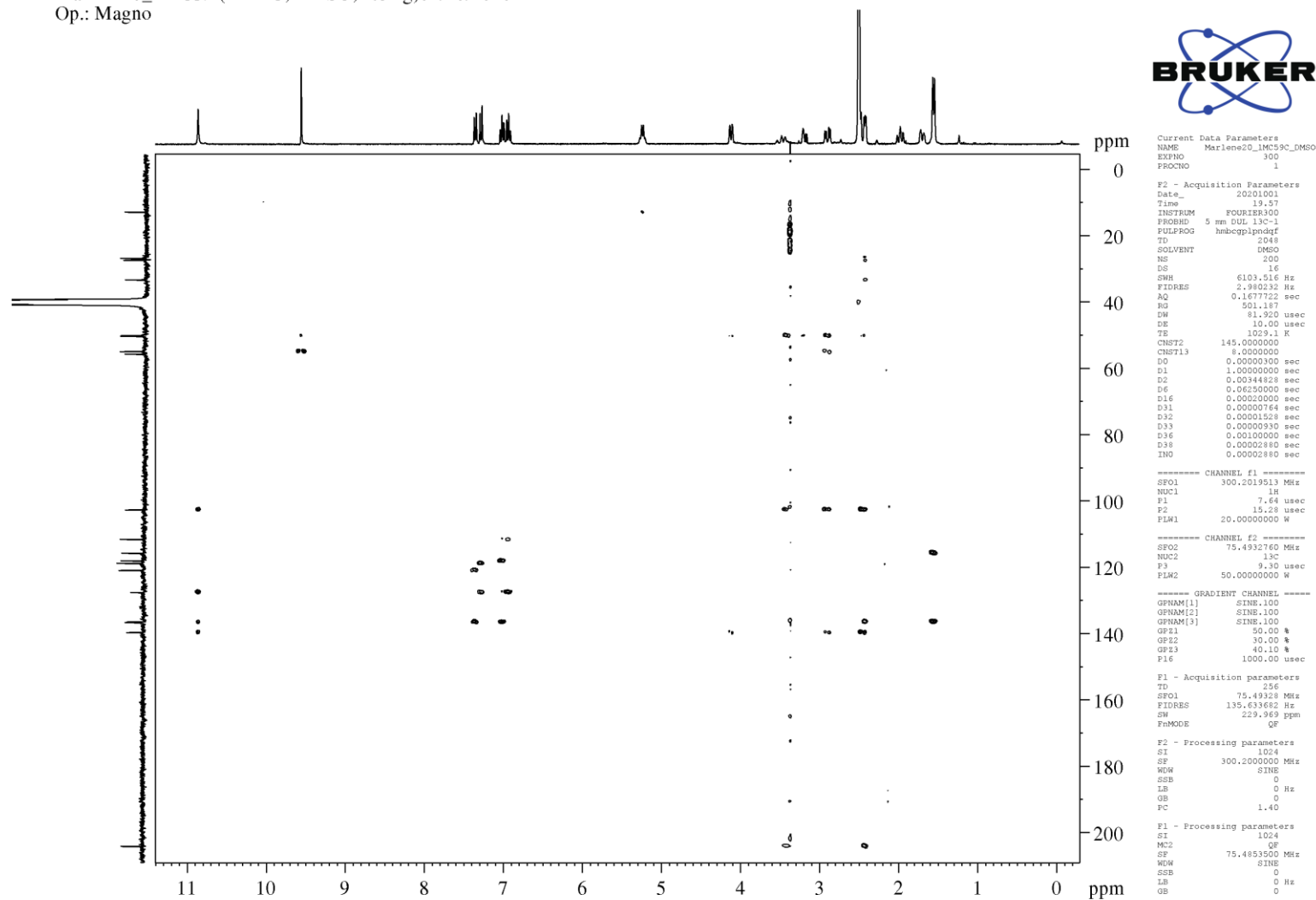
1MC59 (HSQC; DMSO-*d*₆; 1,8mg) 06/10/2020

Op.: Magno



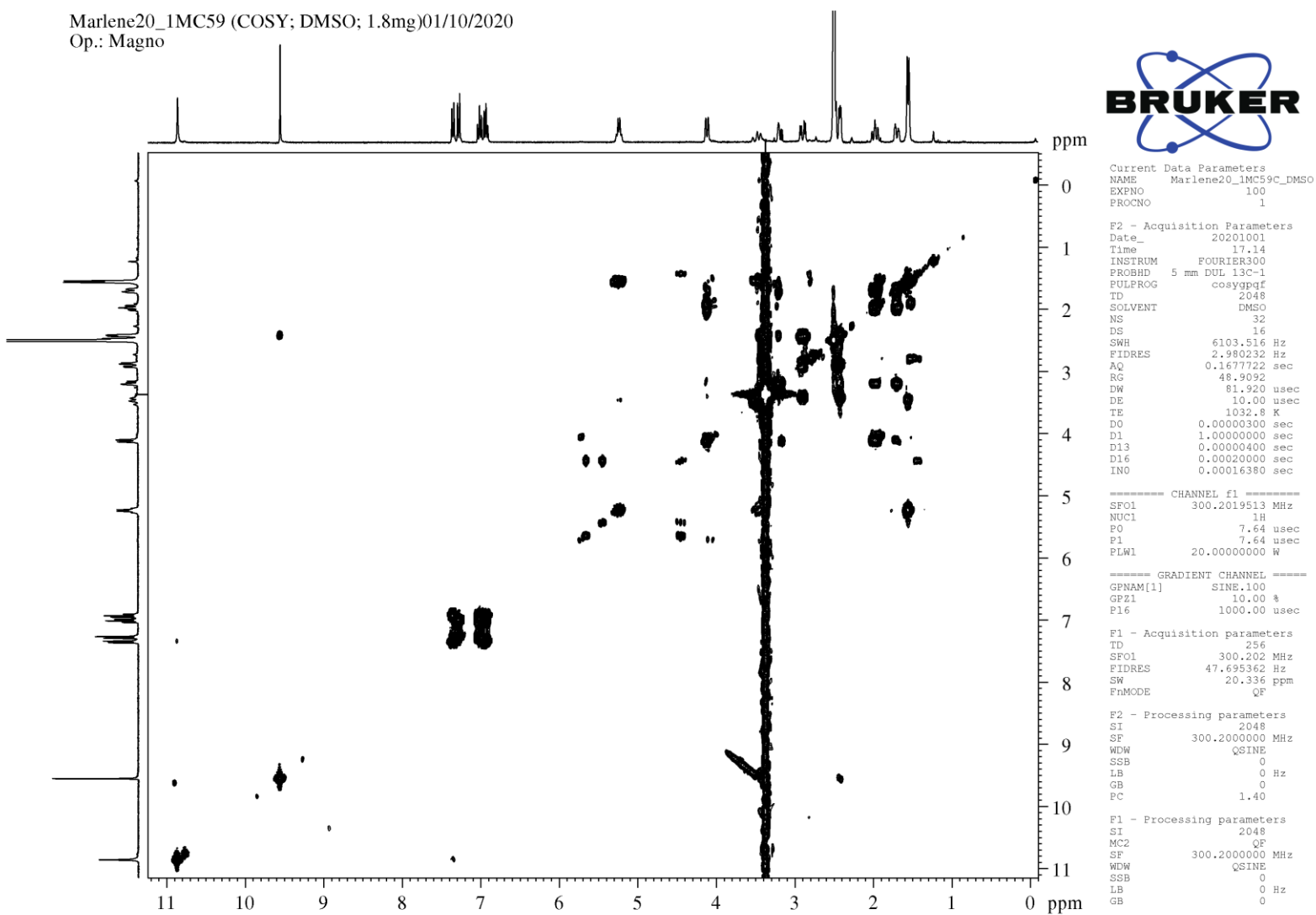
Anexo 16: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância B (31) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC59 (HMBC; DMSO; 1.8mg)01/10/2020
Op.: Magno



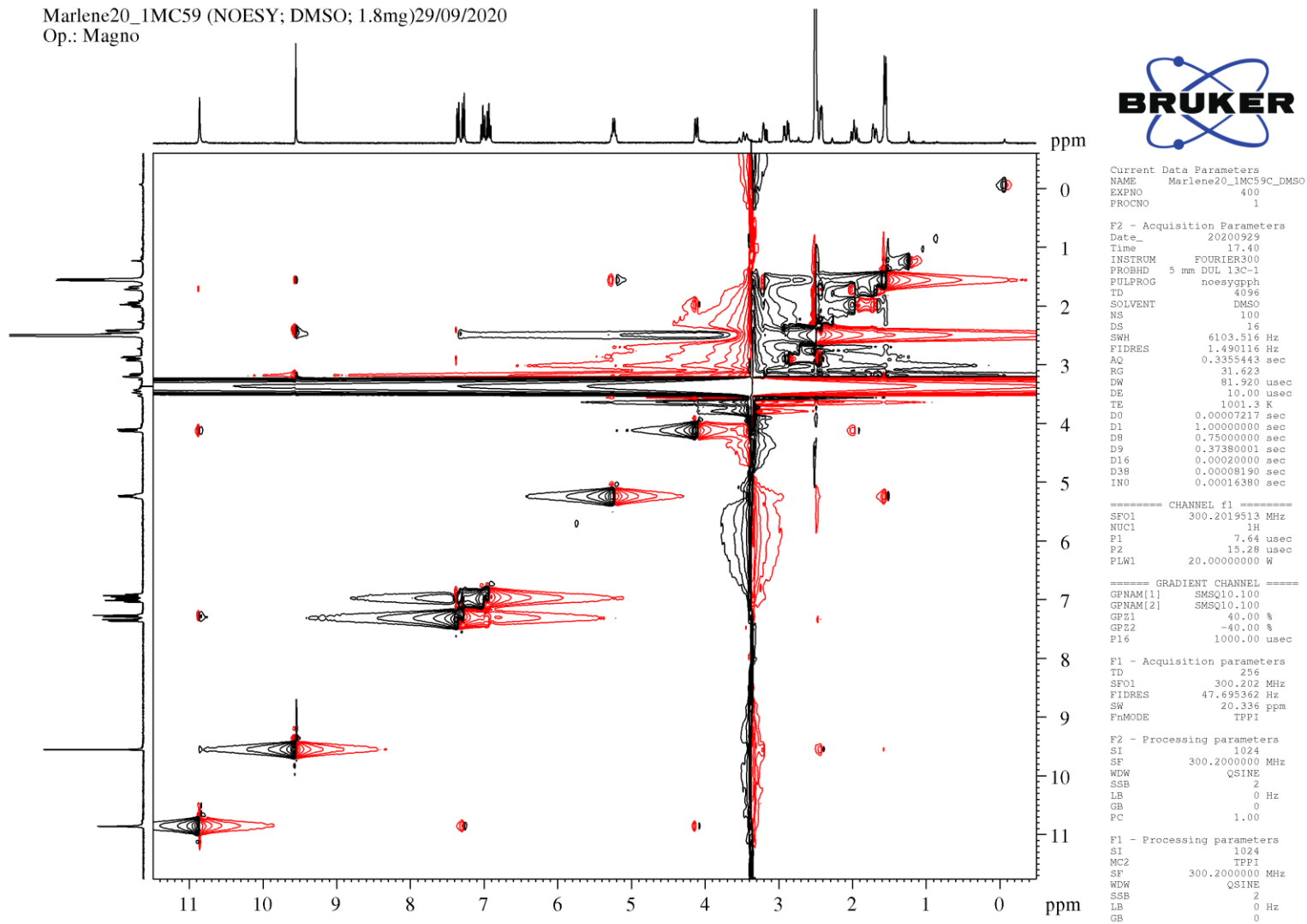
Anexo 17: Espectro de COSY (300/75 MHz) da substância B (**31**) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC59 (COSY; DMSO; 1.8mg)01/10/2020
Op.: Magno

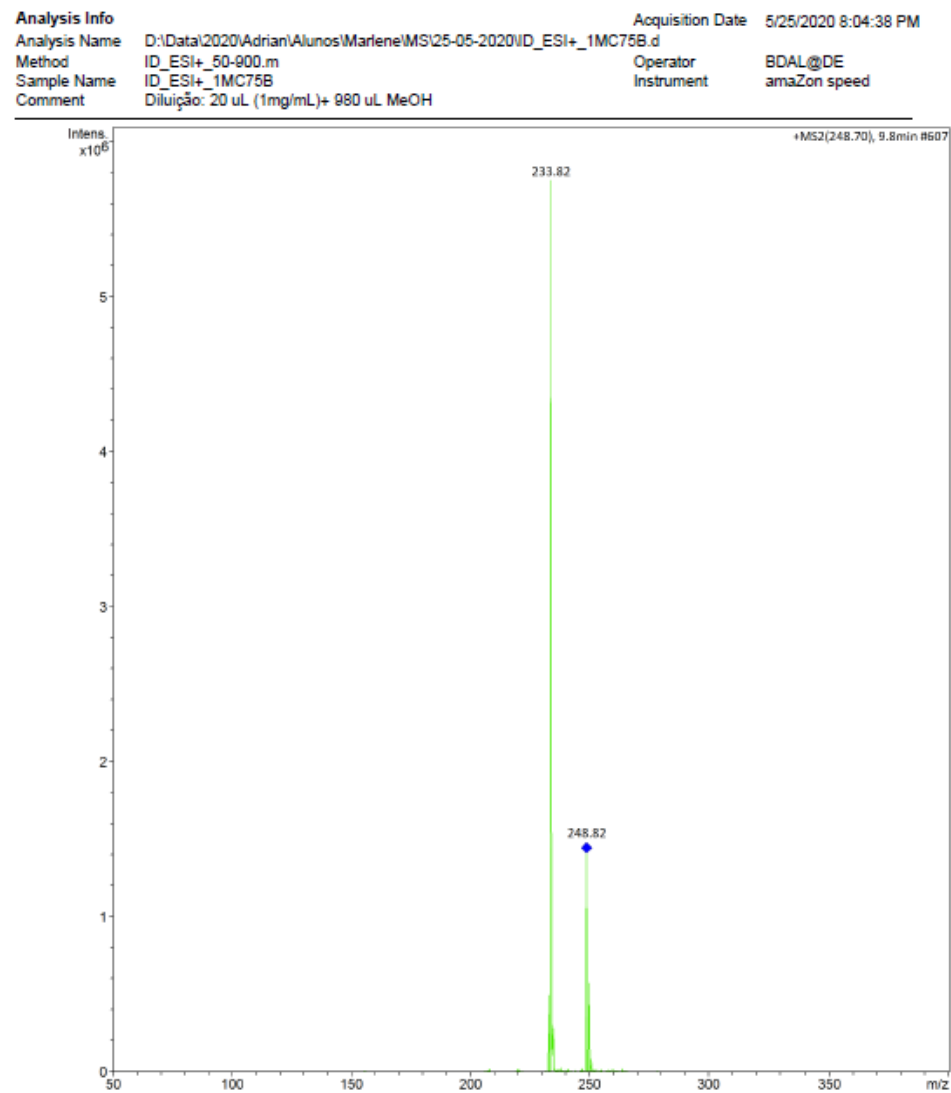


Anexo 18: Espectro de NOESY (300/75 MHz) da substância B (**31**) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC59 (NOESY; DMSO; 1.8mg)29/09/2020
Op.: Magno

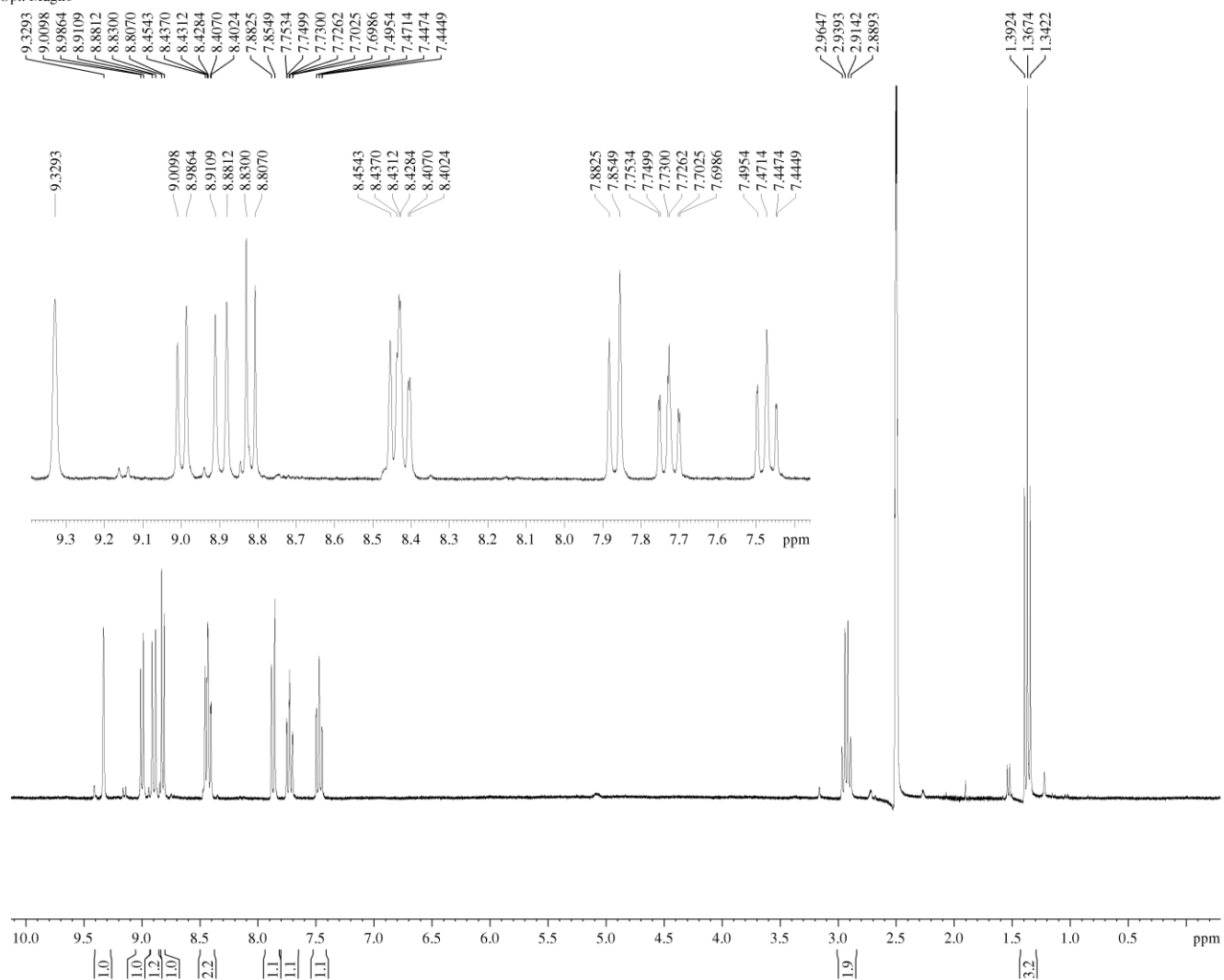


Anexo 19: Espectro de MS da substância C (28).



Anexo 20: Espectro de RMN de ^1H (300/75 MHz) da substância C (**28**) em $\text{DMSO}-d_6$.

Marlene20_1MC75B2 (1H sup; DMSO; 2.5 mg) 20/05/2020
Op.: Magno



Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC75B2
EXPNO 11
PROCNO 1

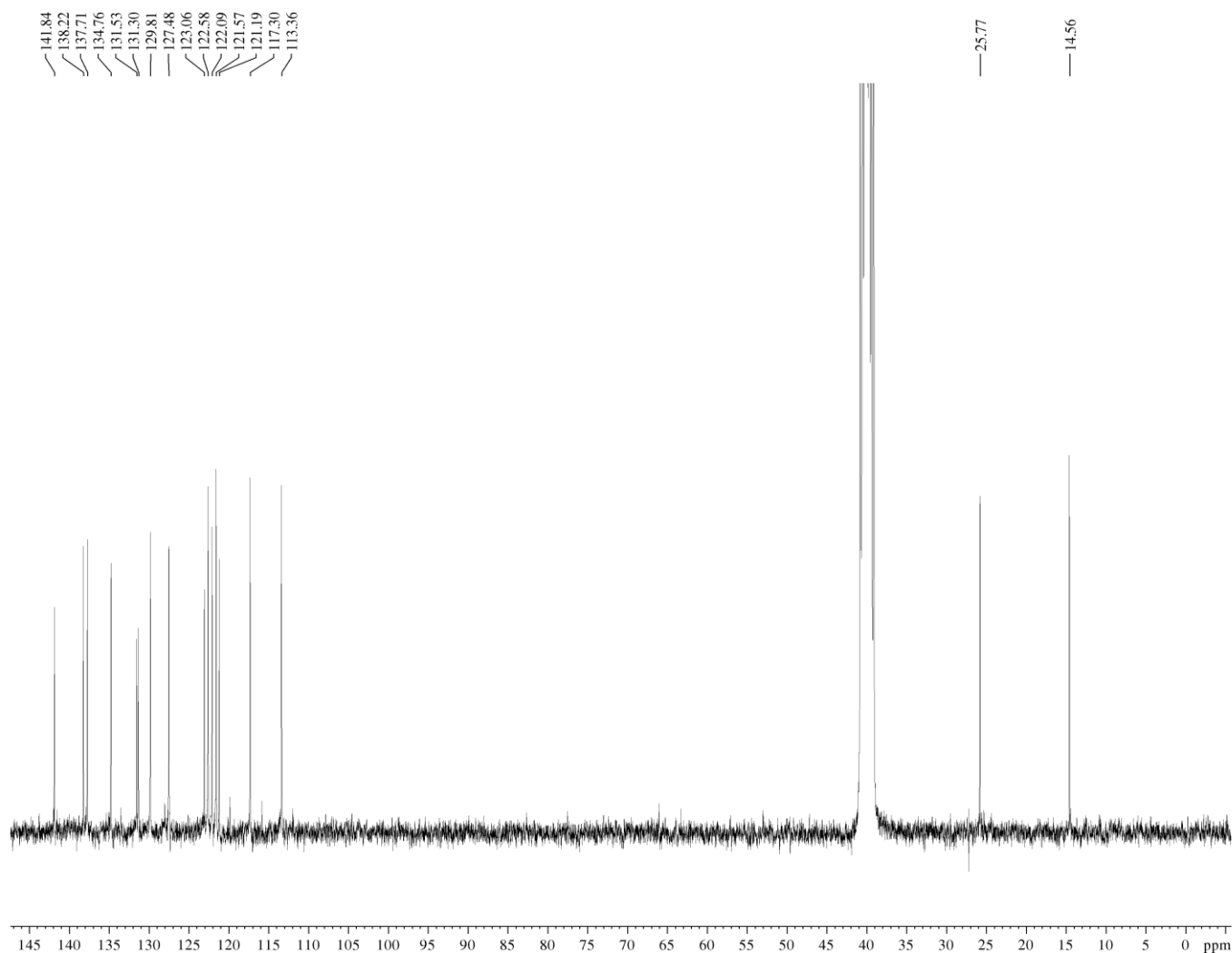
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200520
Time 10.12
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpgpr
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 4
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 251.189
DW 81.920 use
DE 10.00 use
TE 293.6 K
D1 2.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
P41 2000000.00 use
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 300.2010132 MHz
NUC1 1H
P1 7.88 use
PLW1 20.00000000 W
PLW9 0.00001000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 21: Espectro de RMN de ^{13}C (300/75 MHz) da substância C (28) em DMSO- d_6 .

Marlene20_1MC75B2 (13C; DMSO; 2.5 mg)
20/05/2020 Op.: Magno



Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC75B2
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200522
Time 17.29
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 163840
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 use
DE 10.00 use
TE 293.0 K
D1 0.30000001 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.02336821 sec
L4 20
L5 8
F32 90.00 use
TD0 1

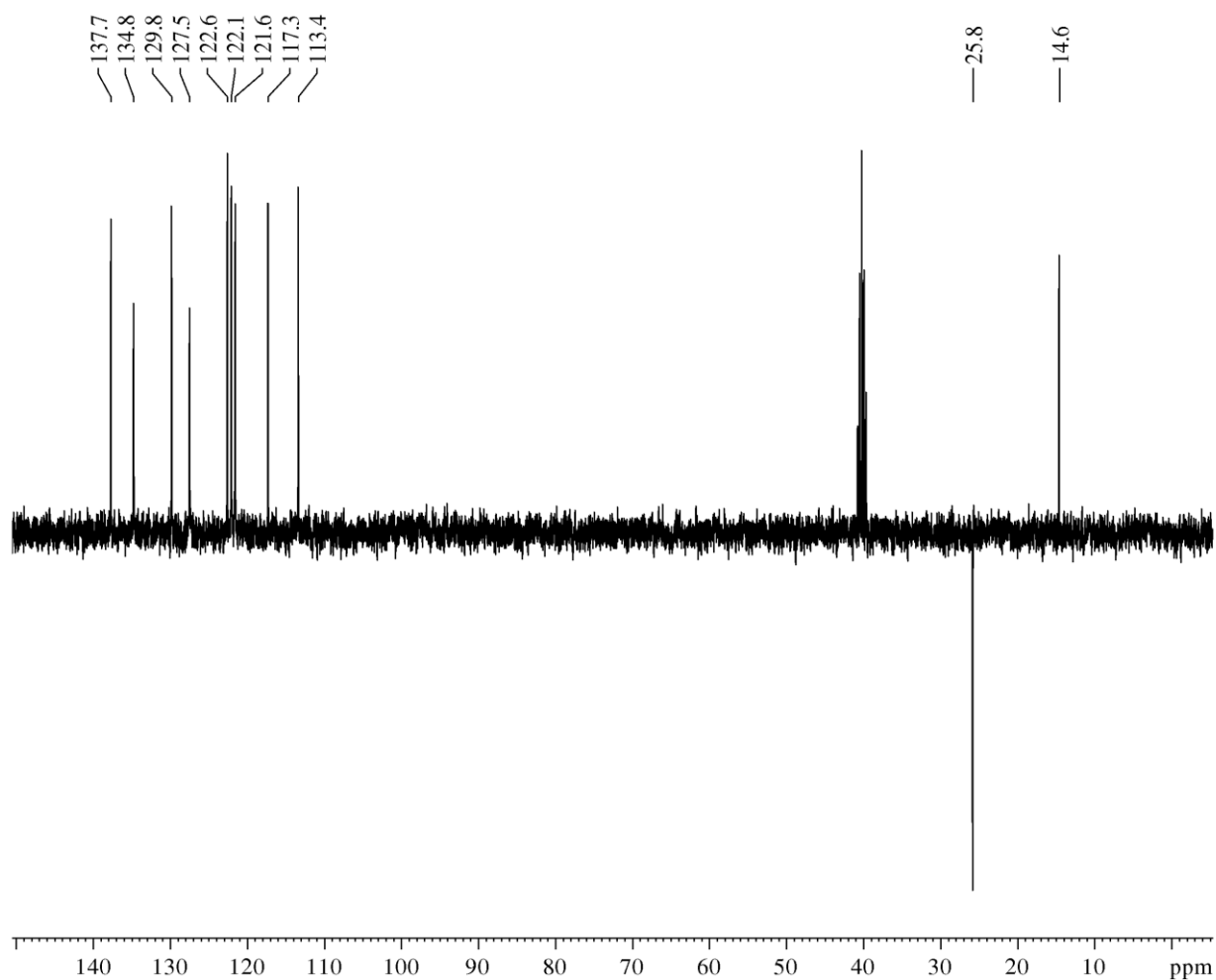
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 use
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 use
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 22: Espectro de DEPT 135 (300/75 MHz) da substância C, flavopereirina (**28**) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC75B2 (dept135; DMSO; 2.5 mg) 20/05/2020
Op.: Magno



Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC75B2
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200524
Time 14.38
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 12000
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 293.7 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

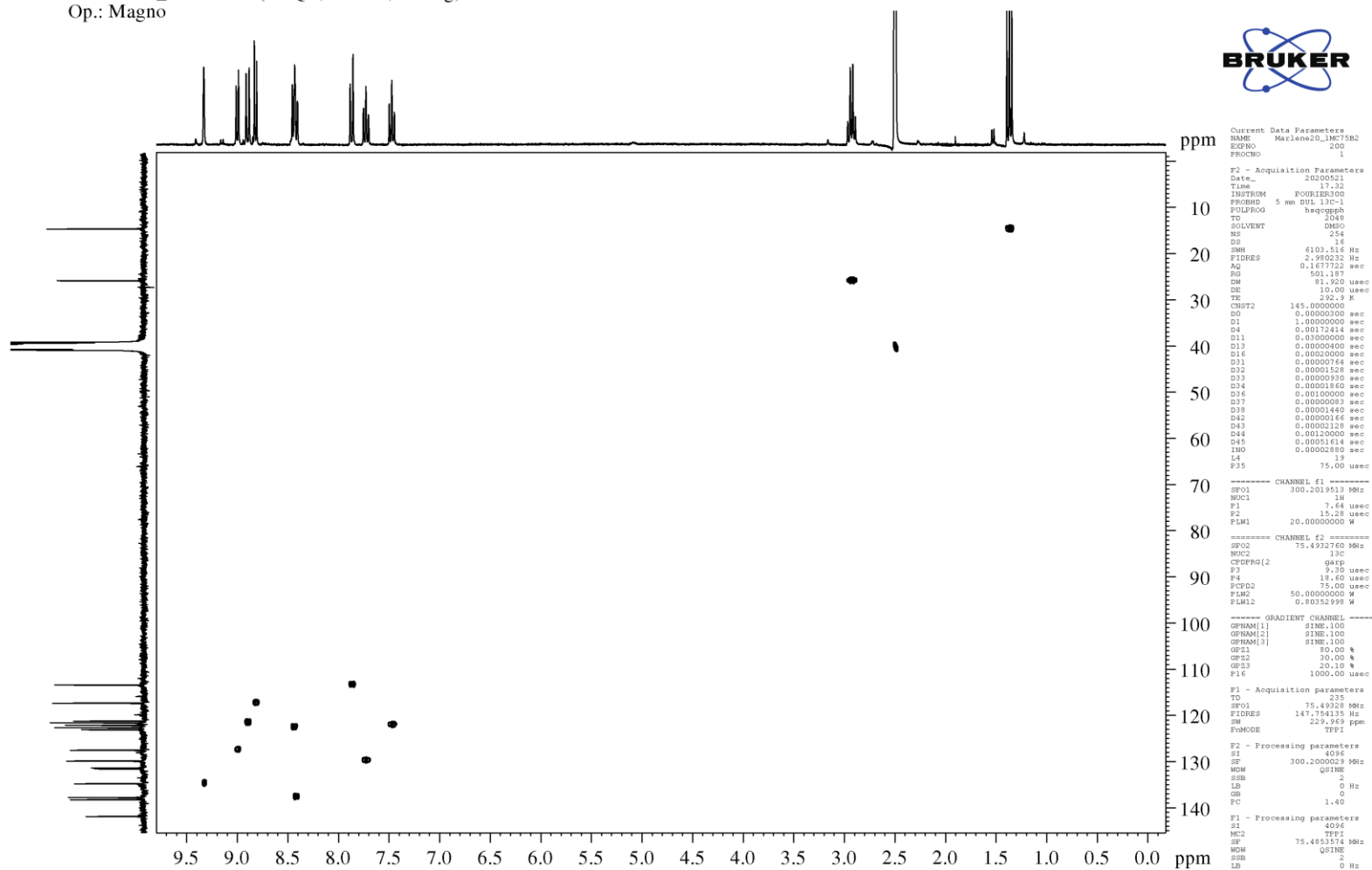
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

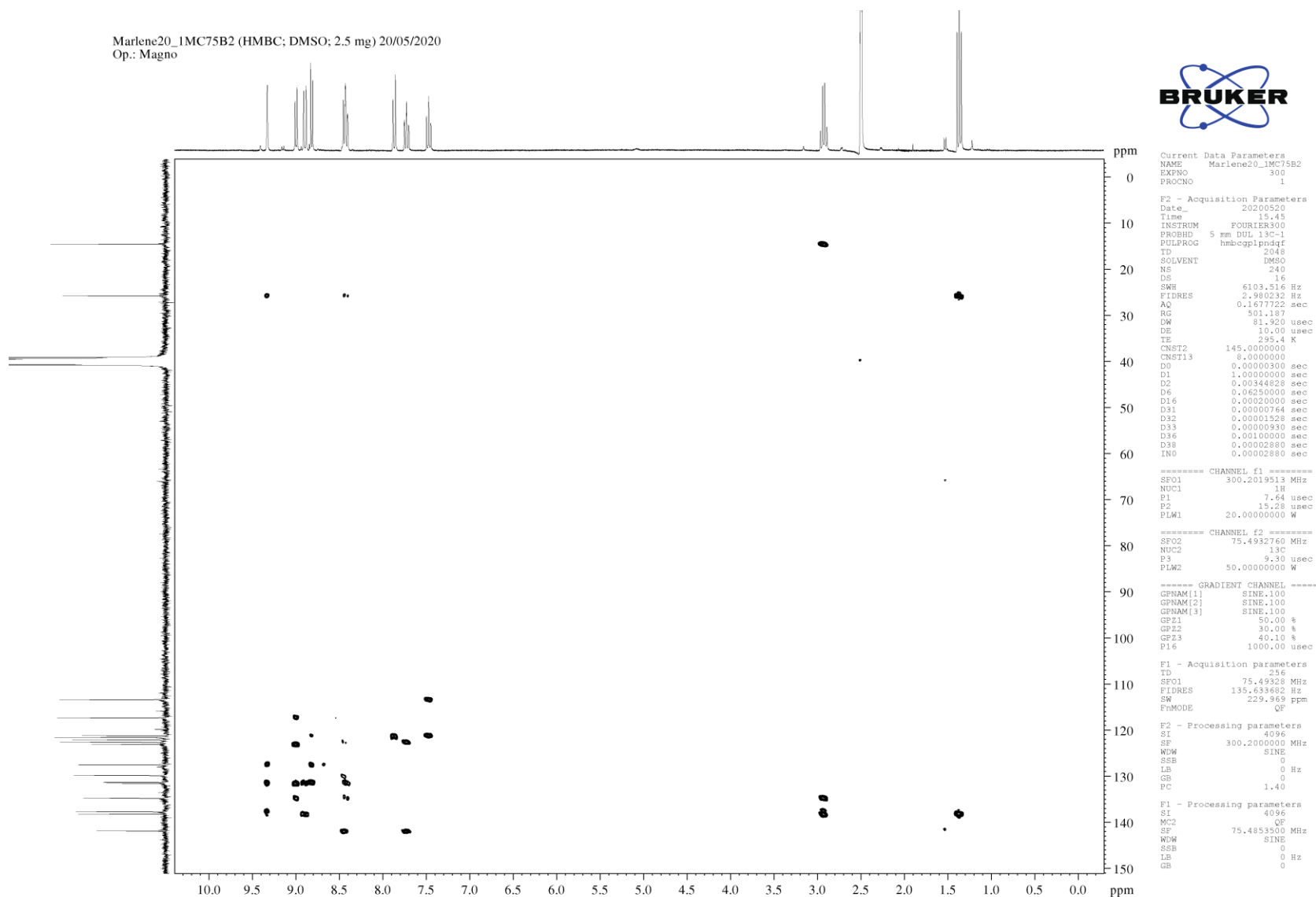
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 23: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância C (**28**) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC75B2 (HSQC; DMSO; 2.5 mg)20/05/2020
Op.: Magno

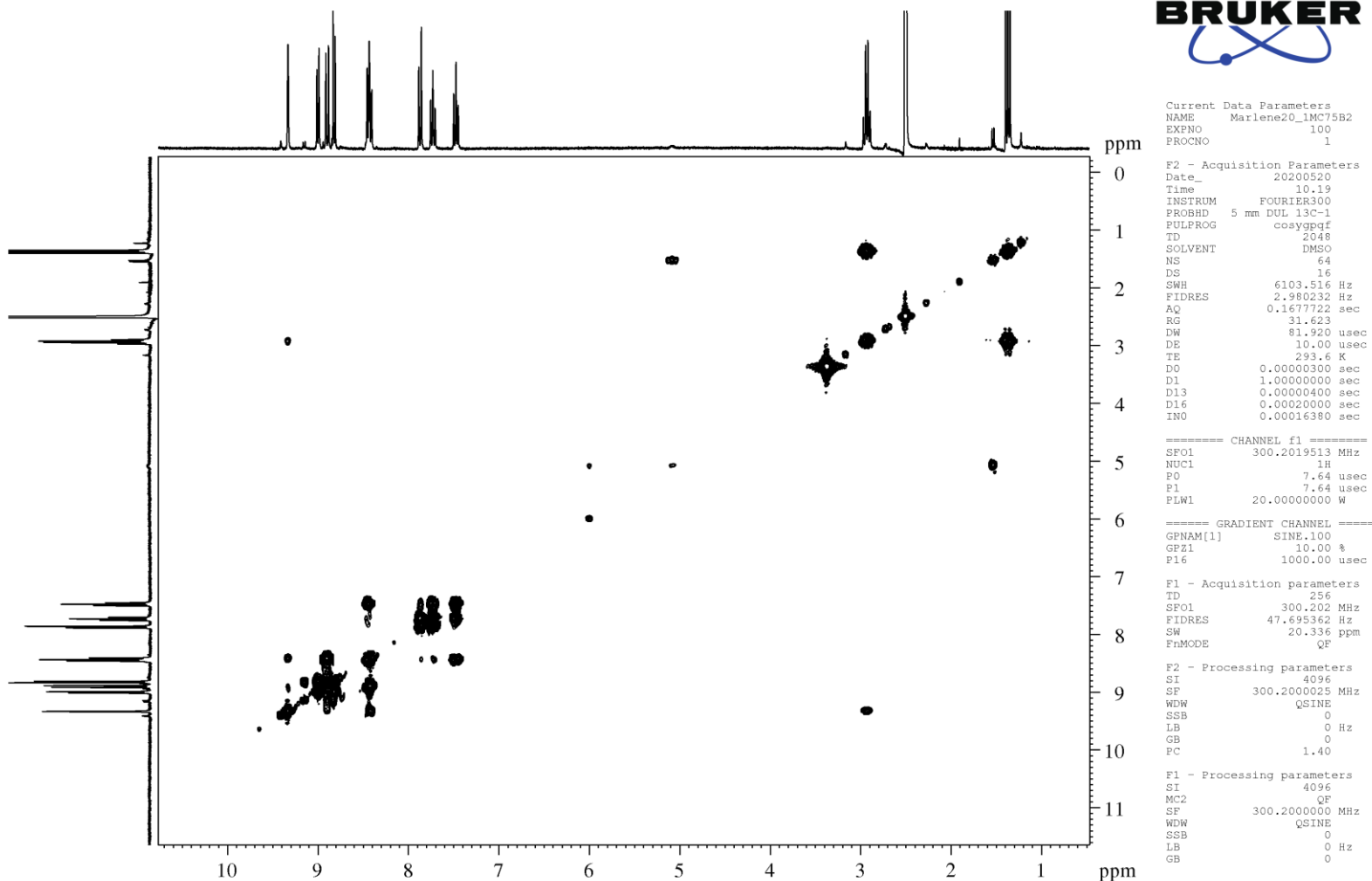


Anexo 24: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância C, flavopereirina (**28**) em DMSO-*d*₆.

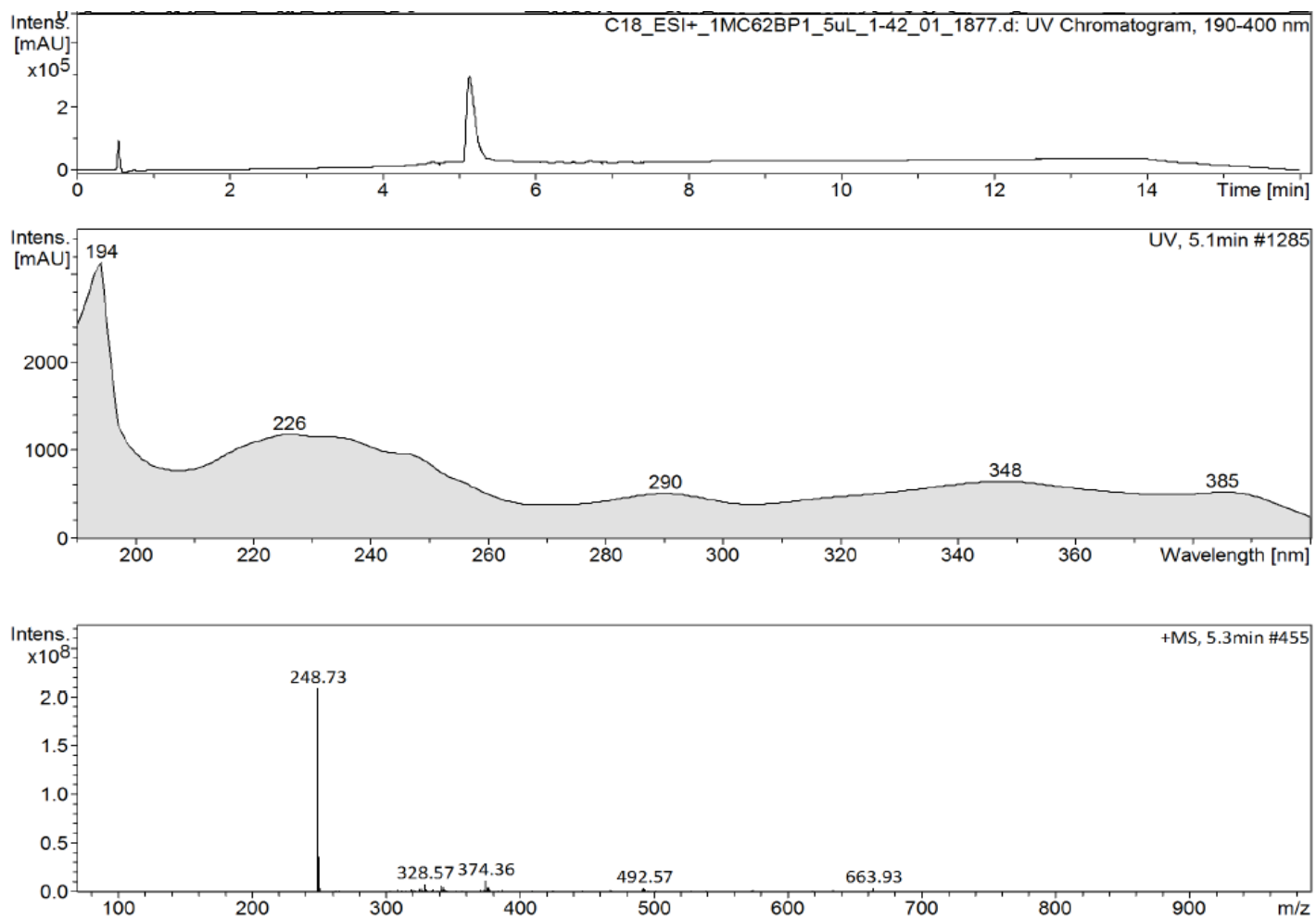


Anexo 25: Espectro de correlação ^1H - ^1H - COSY (300/75 MHz) da substância C (flavopereirina, **28**) em DMSO- d_6 .

Marlene20_1MC75B2 (COSY; DMSO; 2.5 mg) 20/05/2020
Op.: Magno

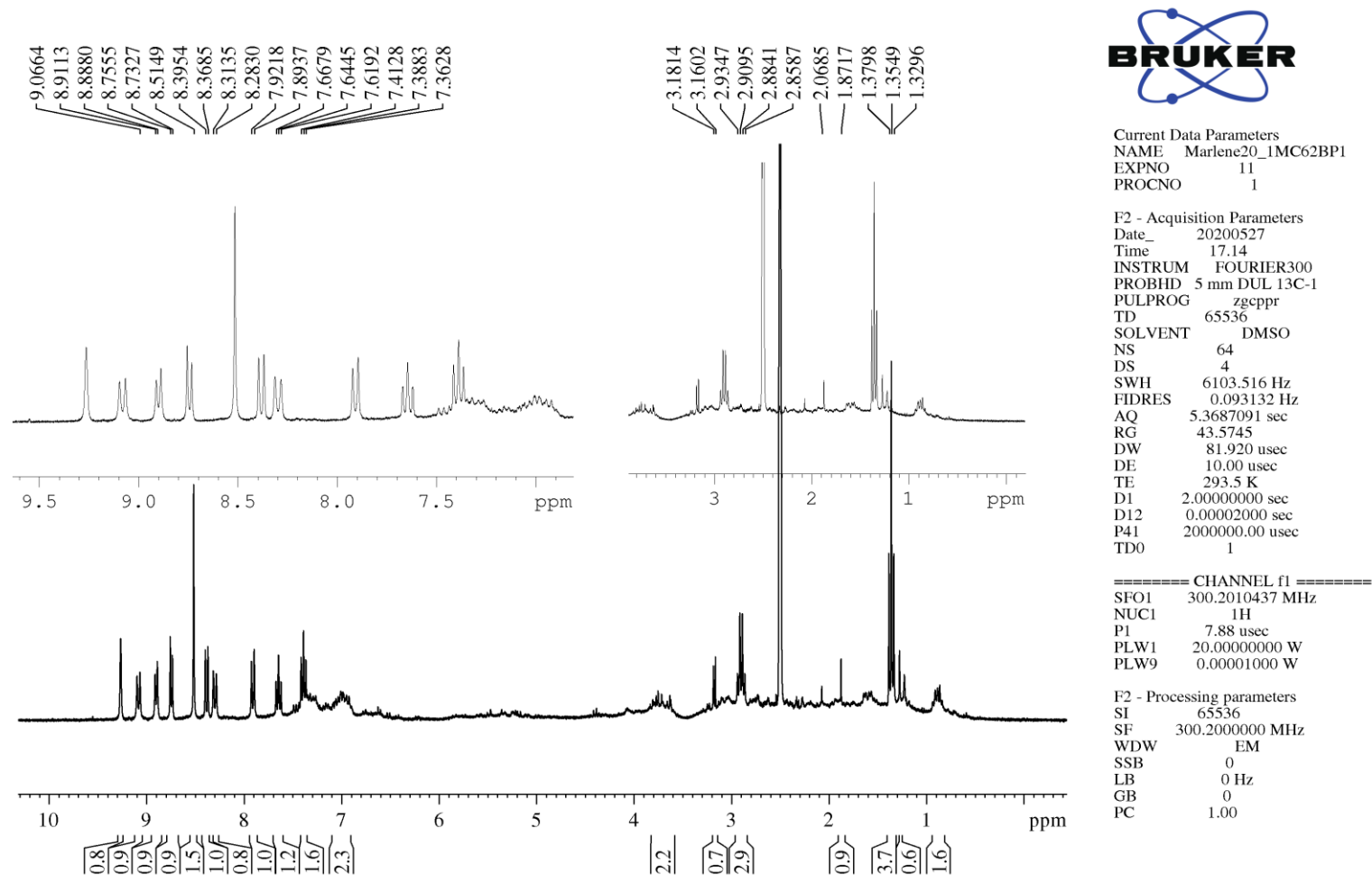


Anexo 26: Cromatograma CL/MS da substância C' (28).



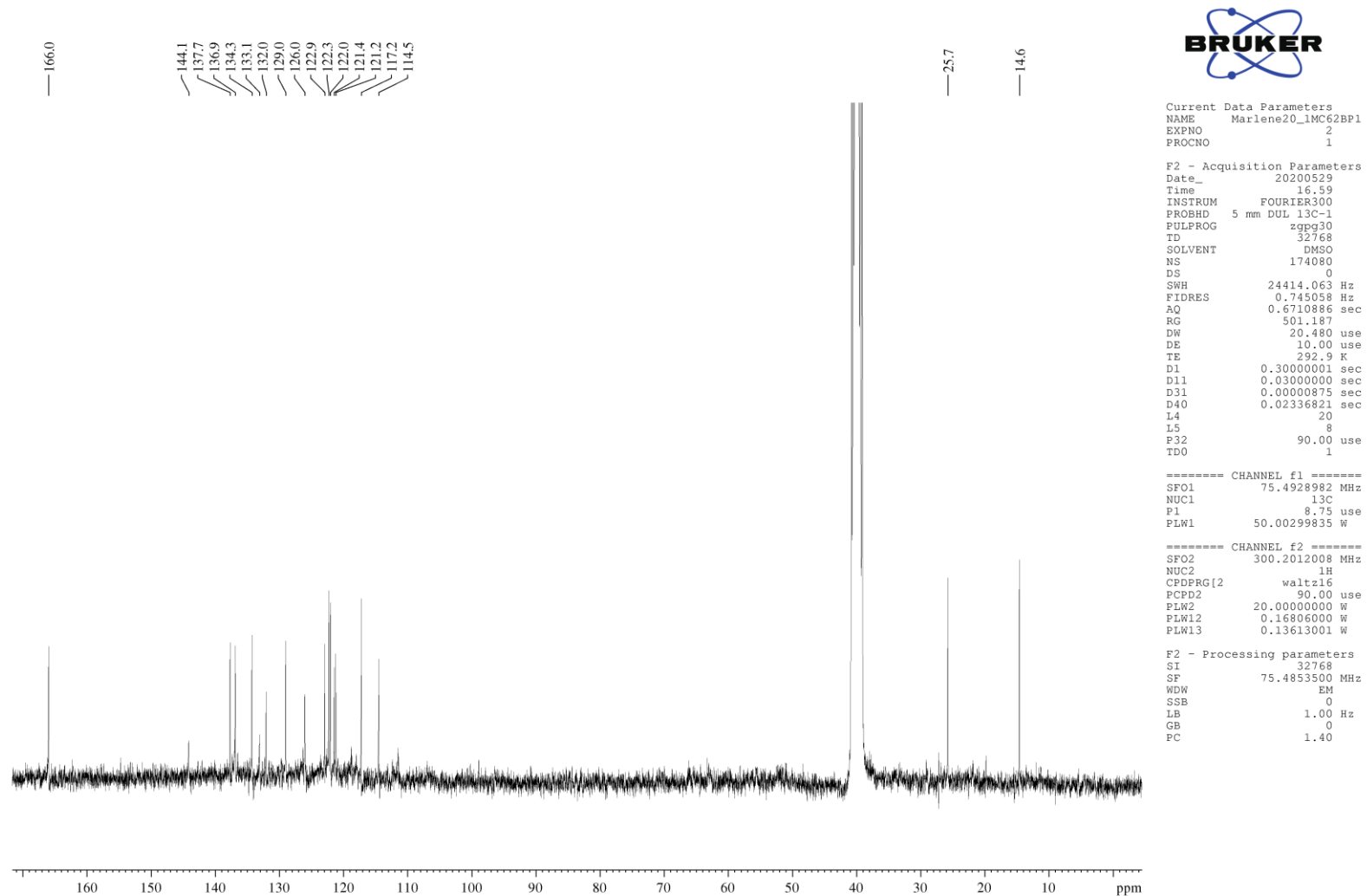
Anexo 27: Espectro de RMN de ^1H (300/75 MHz) da substância C' (**28**) em DMSO- d_6 .

Marlene20_1MC62BP1 (1H SUP; DMSO; 5mg) 27/05/2020
Op.: Magno



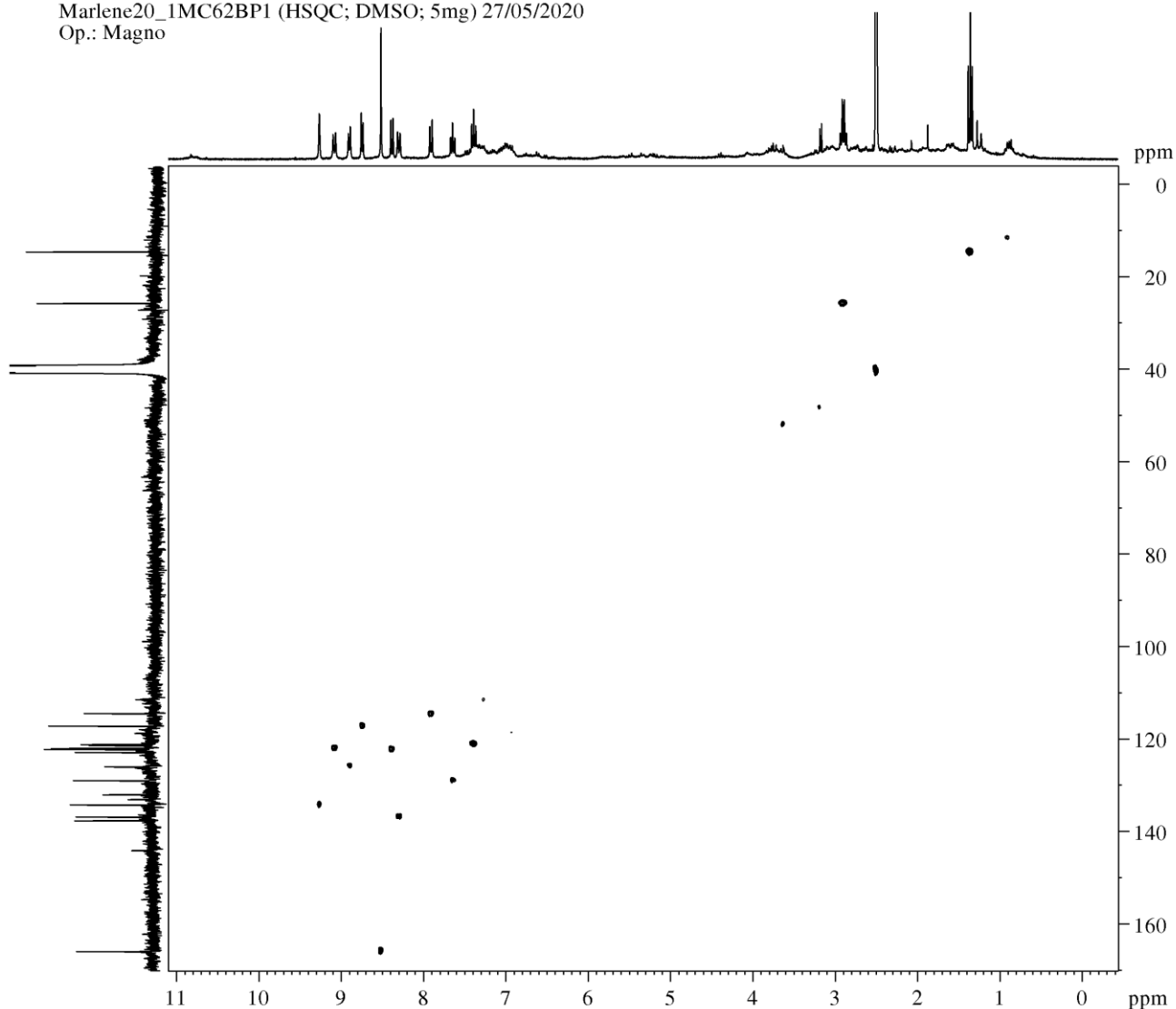
Anexo 28 Espectro de RMN de ^{13}C (300/75 MHz) da substância C' (28) em DMSO- d_6 .

Marlene20_1MC62BP1 (13C; DMSO; 5mg) 29/05/2020
Op.: Magno



Anexo 29: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância C' (28) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC62BP1 (HSQC; DMSO; 5mg) 27/05/2020
Op.: Magno



```
Current Data Parameters
NAME      Marlene20_1MC62BP1
EXPNO     200
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20200527
Time      22.48
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgpg30ph
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         200
DS         16
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     2.390232 Hz
AQ         0.1877752 sec
RG         501.187
SW         81.900 usec
DE         10.00 usec
TE         299.2 K
CNET2     145.0000000
D0         0.00000300 sec
D1         1.00000000 sec
D4         0.00172414 sec
D11        0.03000000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
D31        0.00000744 sec
D32        0.00001528 sec
D33        0.00000930 sec
D34        0.00001860 sec
D36        0.00100000 sec
D37        0.00000083 sec
D38        0.00001440 sec
D42        0.00000166 sec
D43        0.00002128 sec
D44        0.00120000 sec
D45        0.00051614 sec
INO        0.00002880 sec
L4         19
P35        75.00 usec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1      13C
P1         7.64 usec
F2         15.28 usec
PLM1      20.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2      75.4932760 MHz
NUC2      13C
PCPDPRG2  gpgp
P3         9.30 usec
P4         19.60 usec
PCPD2     75.00 usec
PLM2      50.00000000 W
PLM12     0.60350996 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]  SINE.100
GPNAM[2]  SINE.100
GPNAM[3]  SINE.100
GE21      30.00 %
GE22      20.10 %
P16        1000.00 usec

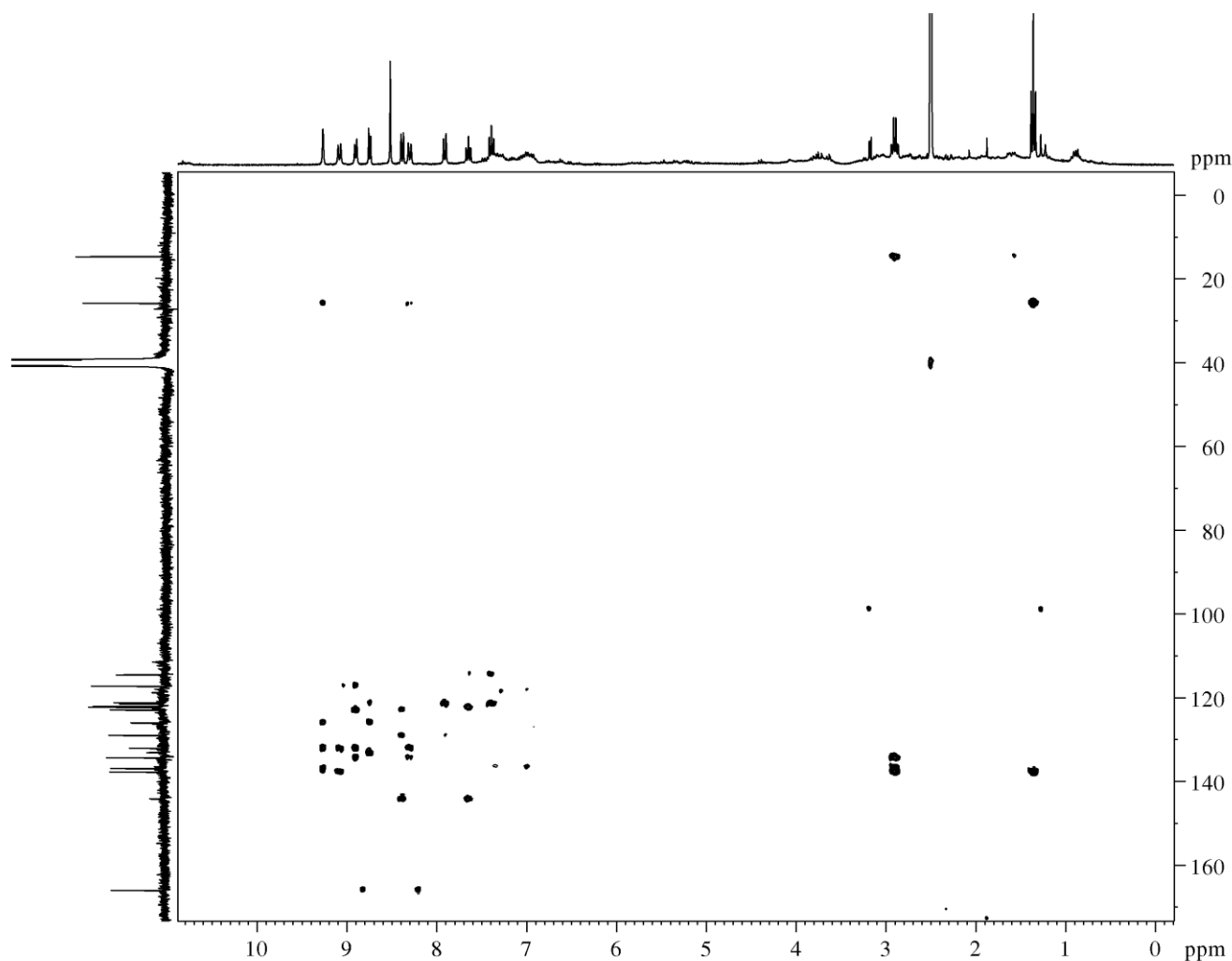
F1 - Acquisition parameters
TD         224
SFO1      75.49328 MHz
FIDRES     148.385559 Hz
SW         229.969 ppm
F2MODE     TFFI

F2 - Processing parameters
SI         4096
SF         300.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         4096
SF         75.4851500 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
```

Anexo 30: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância C' (28) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC62BP1 (HMBC; DMSO; 5mg)28/05/2020
Op.: Magno



```
Current Data Parameters
NAME      Marlene20_1MC62BP1
EXPNO     300
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20200528
Time      17:07
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   hmcgplpndf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         240
DS         16
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     2.980232 Hz
AQ         0.1677722 sec
RG         501.187
DM         81.920 usec
DE         10.00 usec
TE         292.8 K
CNST2     145.0000000
CNST13    9.0000000
DO         0.00000300 sec
D1         1.00000000 sec
D2         0.00344828 sec
D6         0.06250000 sec
D16        0.00020000 sec
D31        0.00000764 sec
D32        0.00001528 sec
D33        0.00000930 sec
D36        0.00100000 sec
D38        0.00002880 sec
INO        0.00002880 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1       1H
P1         7.64 usec
F2         15.28 usec
PLW1      20.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2      75.4932760 MHz
NUC2       13C
P3         9.30 usec
PLW2      50.00000000 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]   SINE.100
GPNAM[2]   SINE.100
GPNAM[3]   SINE.100
GP21       50.00 %
GP22       30.00 %
GP23       40.10 %
P16        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         244
SFO1       75.49328 MHz
FIDRES     142.904184 Hz
SW         229.969 ppm
FMODE      QF

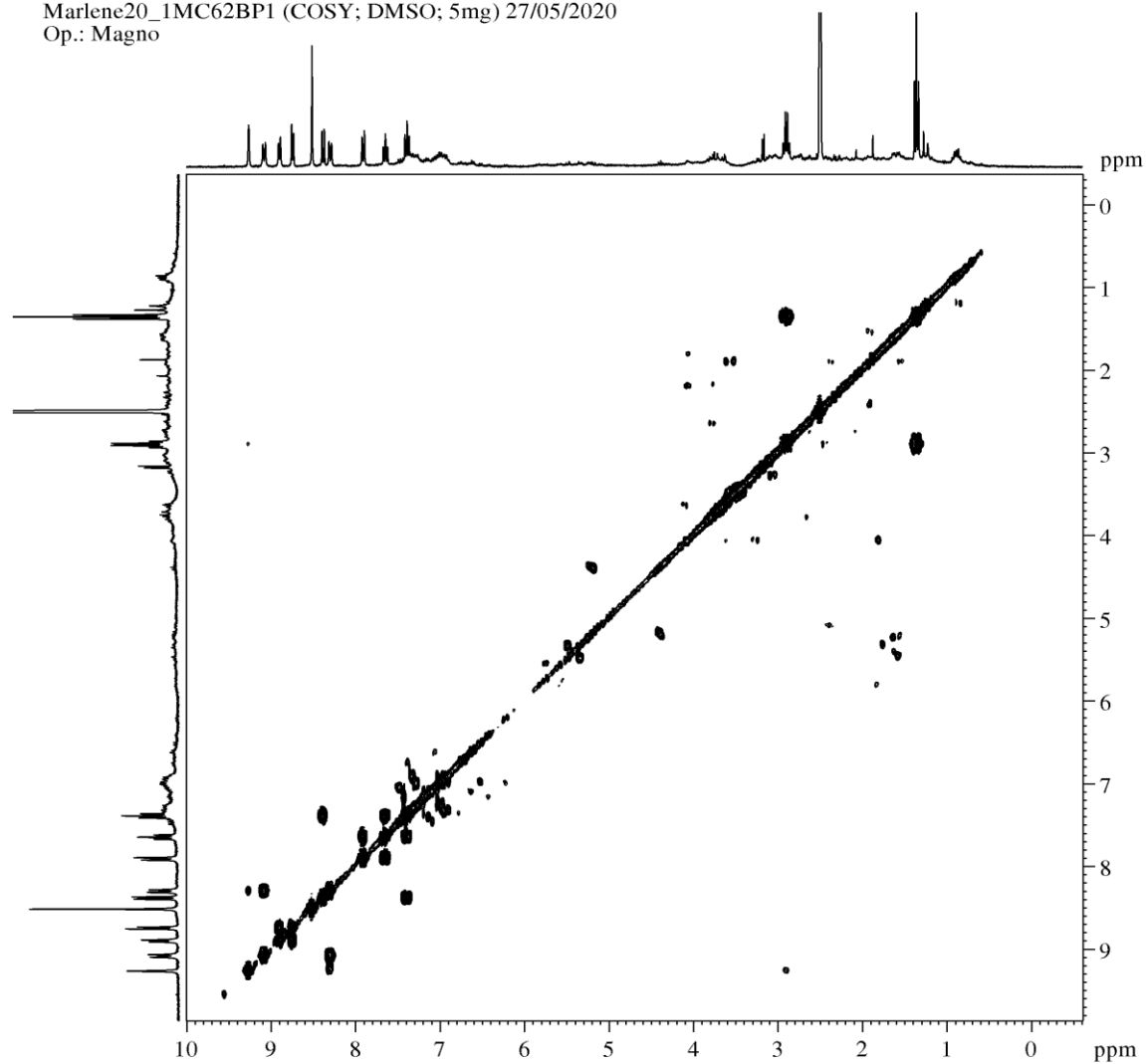
F2 - Processing parameters
SI          4096
SF         300.2000000 MHz
WDW         SINE
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.40

F1 - Processing parameters
SI          4096
MC2         QF
SF         75.4853500 MHz
WDW         SINE
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
```

Anexo 31: Espectro de correlação ^1H - ^1H - COSY (300/75 MHz) da substância C' (**28**) em DMSO- d_6 .

Marlene20_1MC62BP1 (COSY; DMSO; 5mg) 27/05/2020

Op.: Magno



```
Current Data Parameters
NAME      Marlene20_1MC62BP1
EXPNO     100
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20200527
Time      17.22
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   cosygpcqf
TD        2048
SOLVENT   DMSO
NS         64
DS         16
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     2.980232 Hz
AQ         0.1677722 sec
RG         31.623
DW         81.920 usec
DE         10.00 usec
TE         293.4 K
D0         0.00000300 sec
D1         1.00000000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00016380 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1       1H
P0         7.64 usec
P1         7.64 usec
PLW1      20.00000000 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]   SINE.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1       300.202 MHz
FIDRES     47.695362 Hz
SW         20.336 ppm
FnMODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         4096
SF         300.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.40

F1 - Processing parameters
SI         4096
MC2        QF
SF         300.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
```

Anexo 32: Espectro de massas (EMAR) da substância E (65).

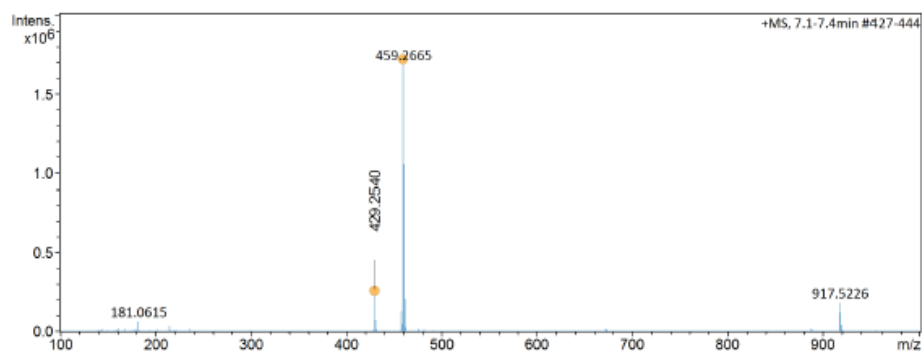
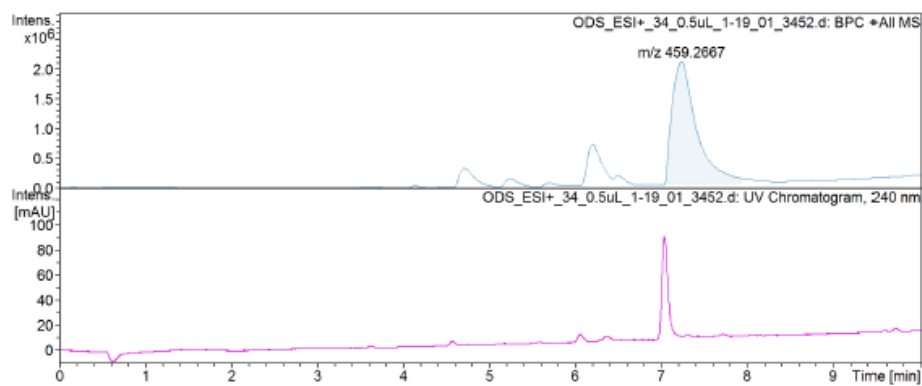
Analysis Name D:\Data\Usuarios\2019\Adrian\alunos\Diana\Data\LC_MS\21-02-2019\ODS_ESI+_34_0.5uL_1-19_01_3452.d

Method LC_MS_TuneLow_ESI+_noFocus_100-1000_18min.m Operator BDAL@DE

Sample Name ODS_ESI+_34_0.5uL Instrument micrOTOF-Q

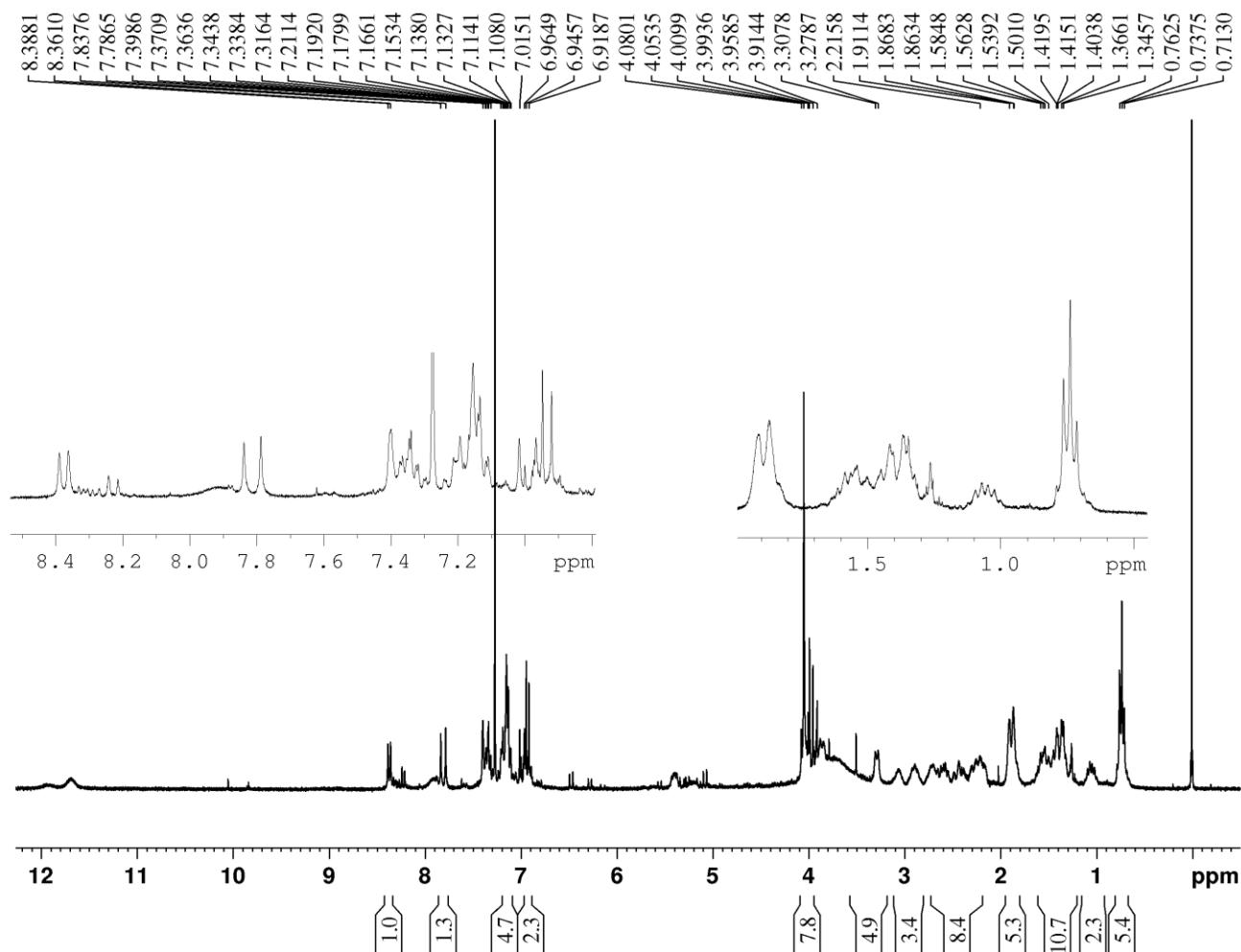
Comment ODS 50x2.0
 Flow=0,25 mL/min[SSplit]; F=35C;P=2190psi; C=0.8mg/mL(MeOH:H2O); Inj=0,5uL;
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(MeOH+0.1%HCOOH)
 0-10min_20-100%
 10-12min_100%
 12-14min_100-20%
 14-18min_20%
 injetor:MeOH
 Calib.:HCOONa 10mM_end

Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma
429.2540	1	M+H	C28H33N2O2	429.2537	-0.8	3.6
459.2665	1	M+H	C29H35N2O3	459.2642	-5.1	152.8



Anexo 33: Espectro de ^1H (300/75 MHz) da substância E (65) em CDCl_3 .

Marlene20_1MC39I(1H; CDCl_3 ; 3.5 mg) 09/04/2020
Op.: Magno



Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC39I-HPLC
EXPNO 11
PROCNO 1

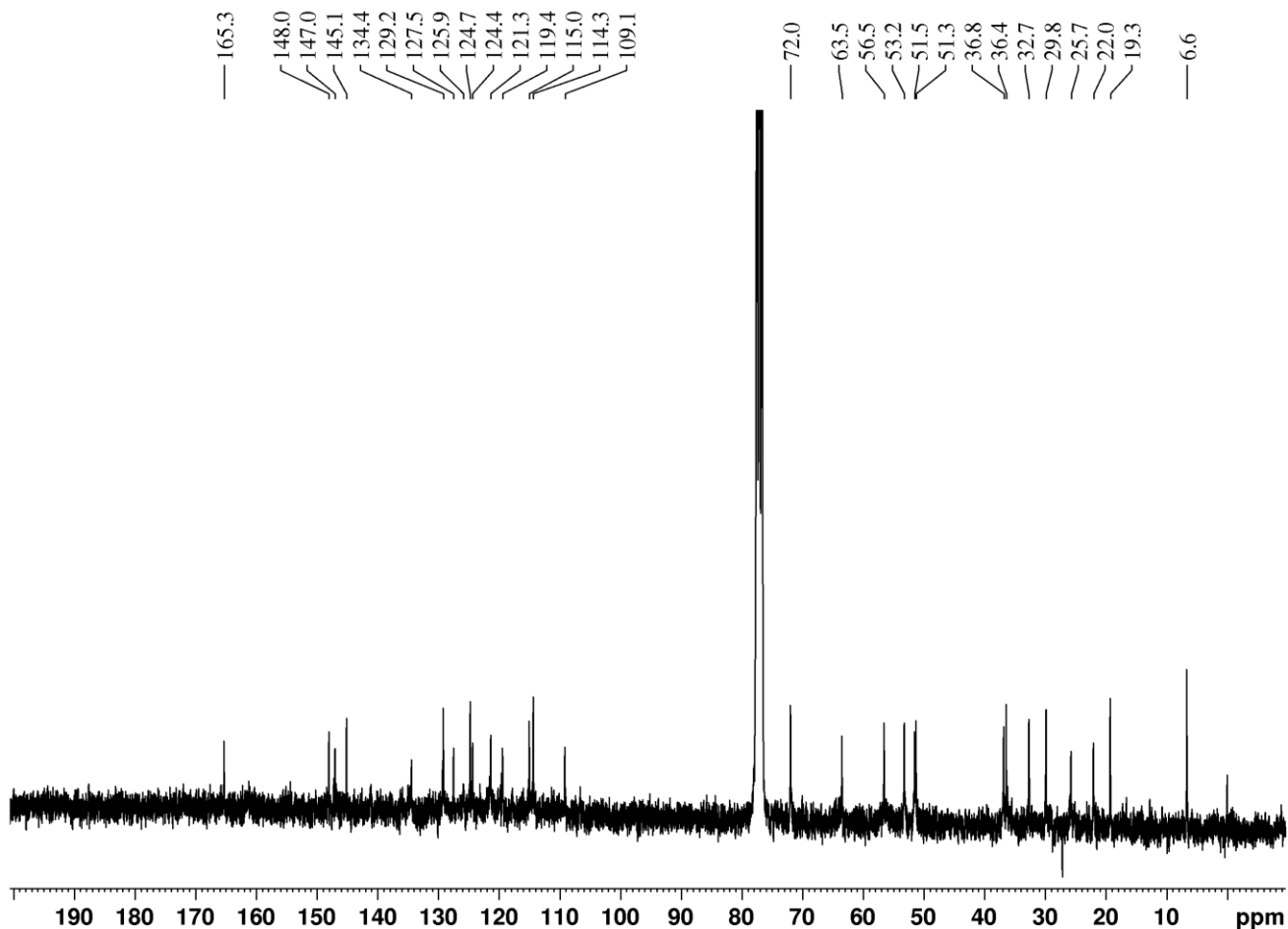
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200409
Time_ 17.18
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 32
DS 2
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 31.623
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 293.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 ^1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 34: Espectro de ^{13}C (300/75 MHz) da substância E (65) em CDCl_3 .

Marlene20_1MC39I(13C; CDCl_3 ; 3.5 mg) 09/04/2020
Op.: Magno



Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC39I-HPLC
EXFNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200412
Time 8.05
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 122880
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 18.00 usec
TE 293.0 K
D1 0.20000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.02710625 sec
L4 20
L5 5
P32 90.00 usec
TDO 1

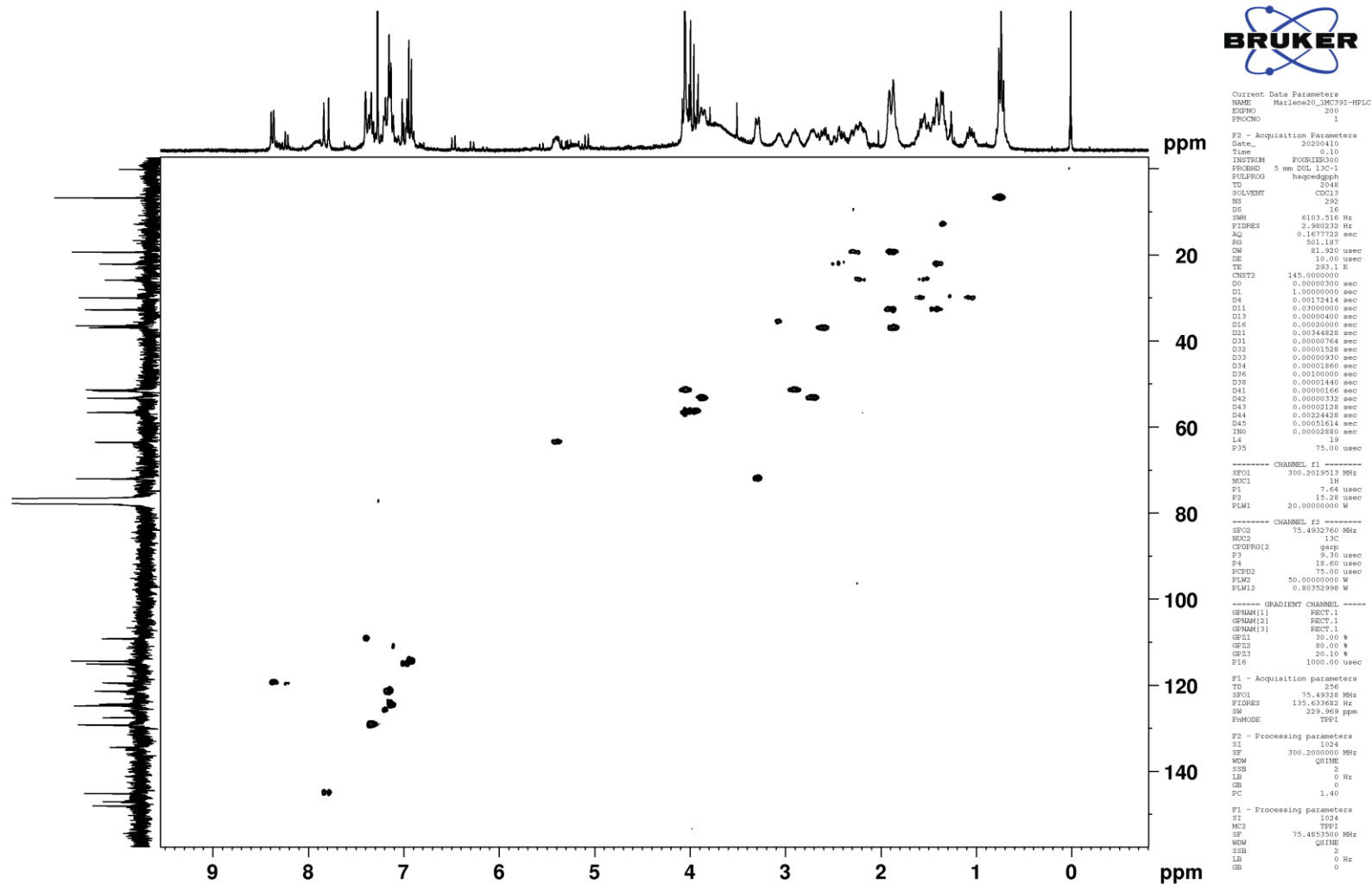
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

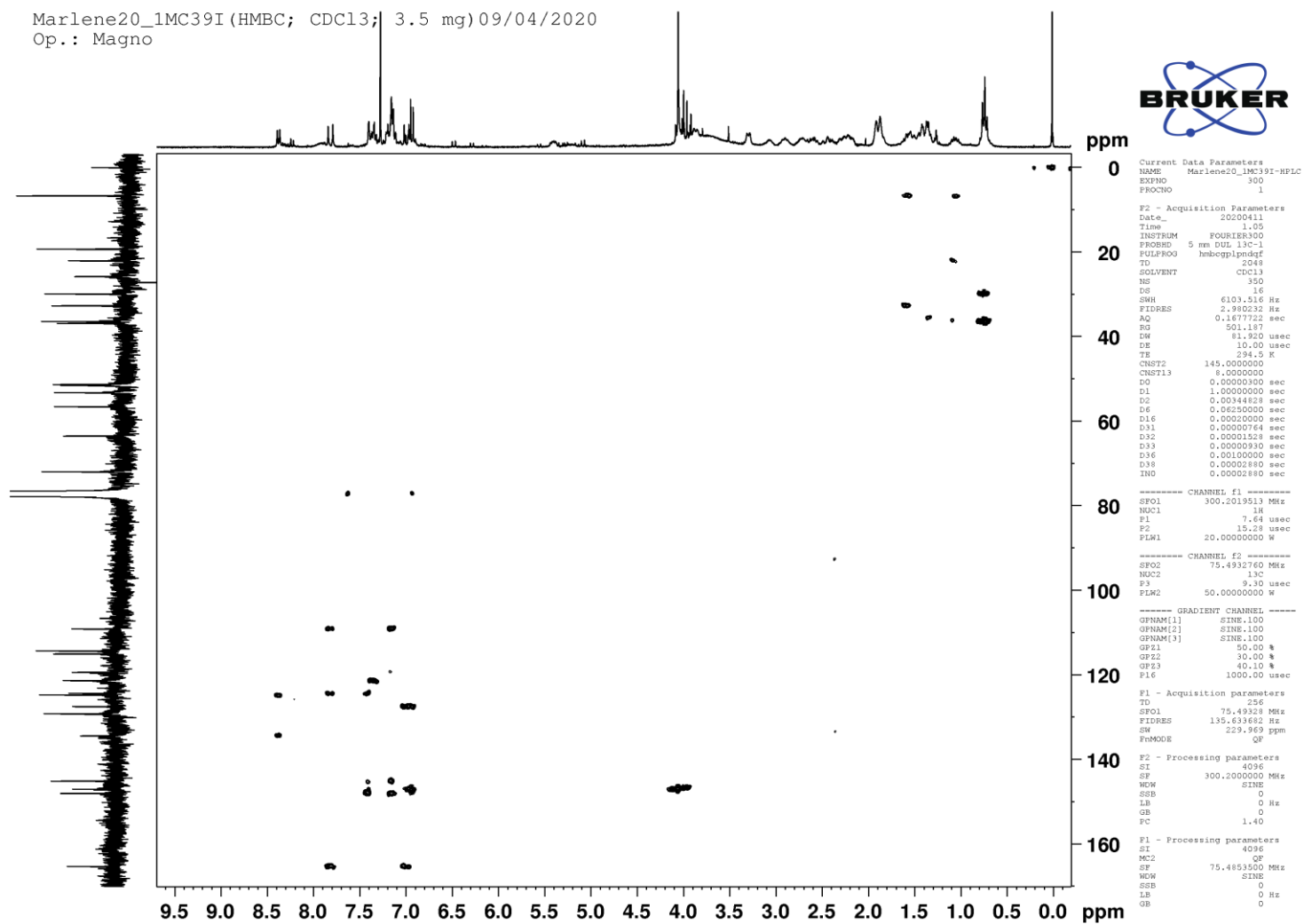
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 35: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância E (65) em CDCl₃.

Marlene20_1MC39I(HSCQED; CDCl₃; 3.5 mg) 09/04/2020
Op.: Magno

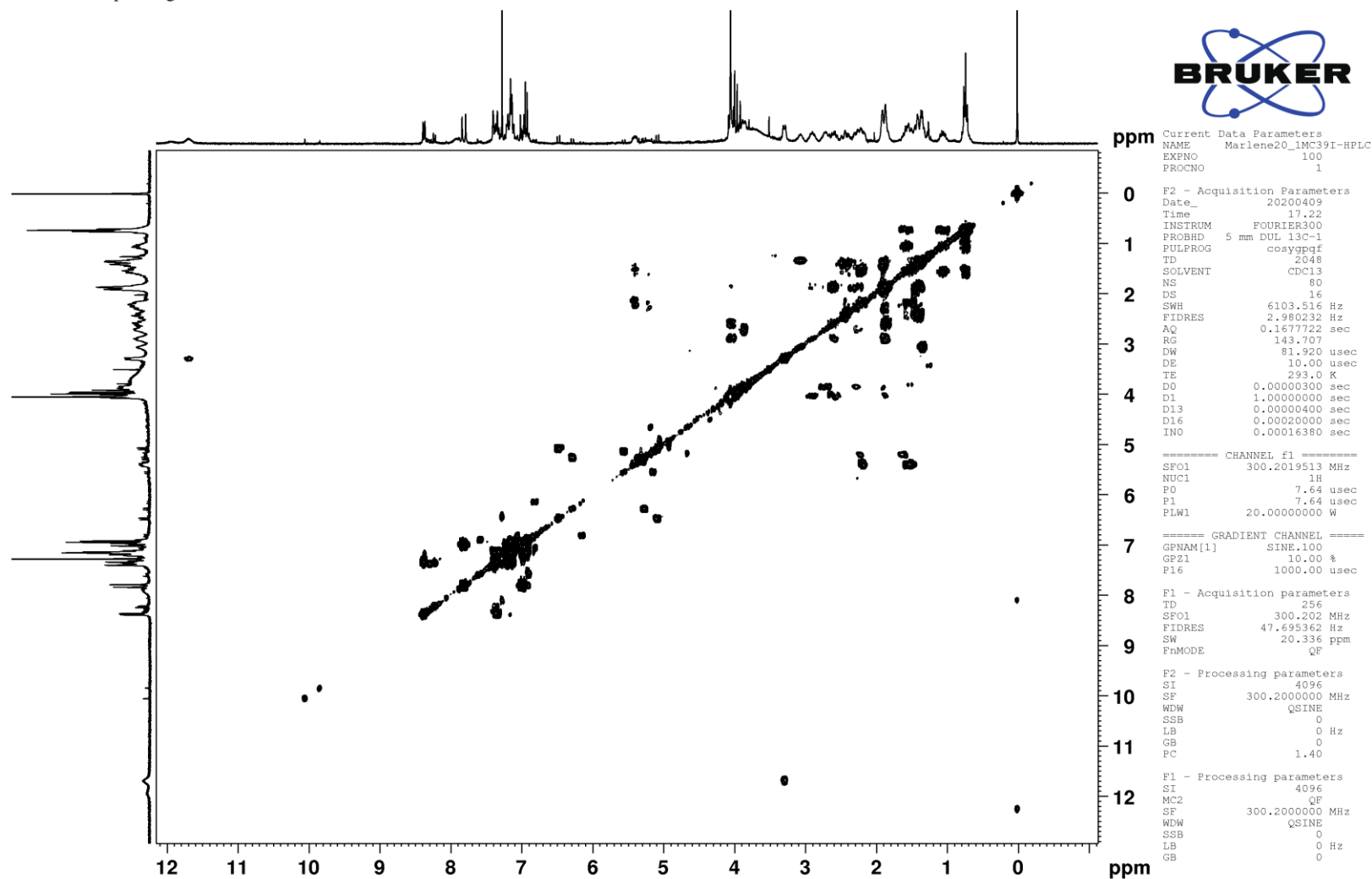


Anexo 36: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância E (65) em CDCl₃.



Anexo 37: Espectro de COSY (300/75 MHz) da substância E (65) em CDCl₃.

Marlene20_1MC39I(COSY; CDCl₃; 3.5 mg) 09/04/2020
Op.: Magno



Anexo 38: Espectro de massas da substância G (33).

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\2020\Adrian\Alunos\Marlene\LC-MS\05-08-2020\C18_ESI+_1MC40AP4_1uL_1-2_01_1944.d

Acquisition Date 8/5/2020 4:12:57 PM

Method 1944.m

Sample Name C18_ESI+_1MC40AP4_1uL

Instrument amaZon speed

Comment XR-ODS 2X5

A(H₂O:0.1%AcFormico)/B(MeOH)

Fluxo:0.3 mL/minSplit0,045 mL(MS)/0,255mL(desc);P:2591psi

V.inj:1uL;C=1mg/mL(MeOH);Forno:35C

Inj=MeOH

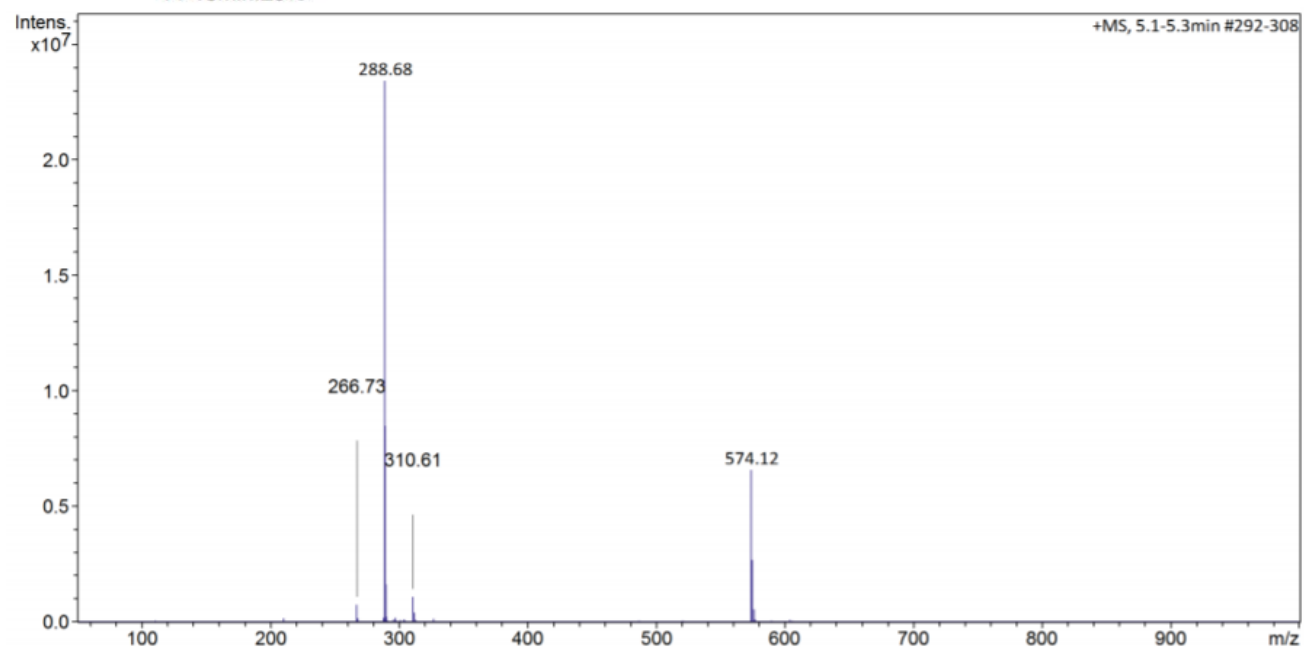
0-10min: 20-60%

10-12min: 60-100%

12-13min:100%

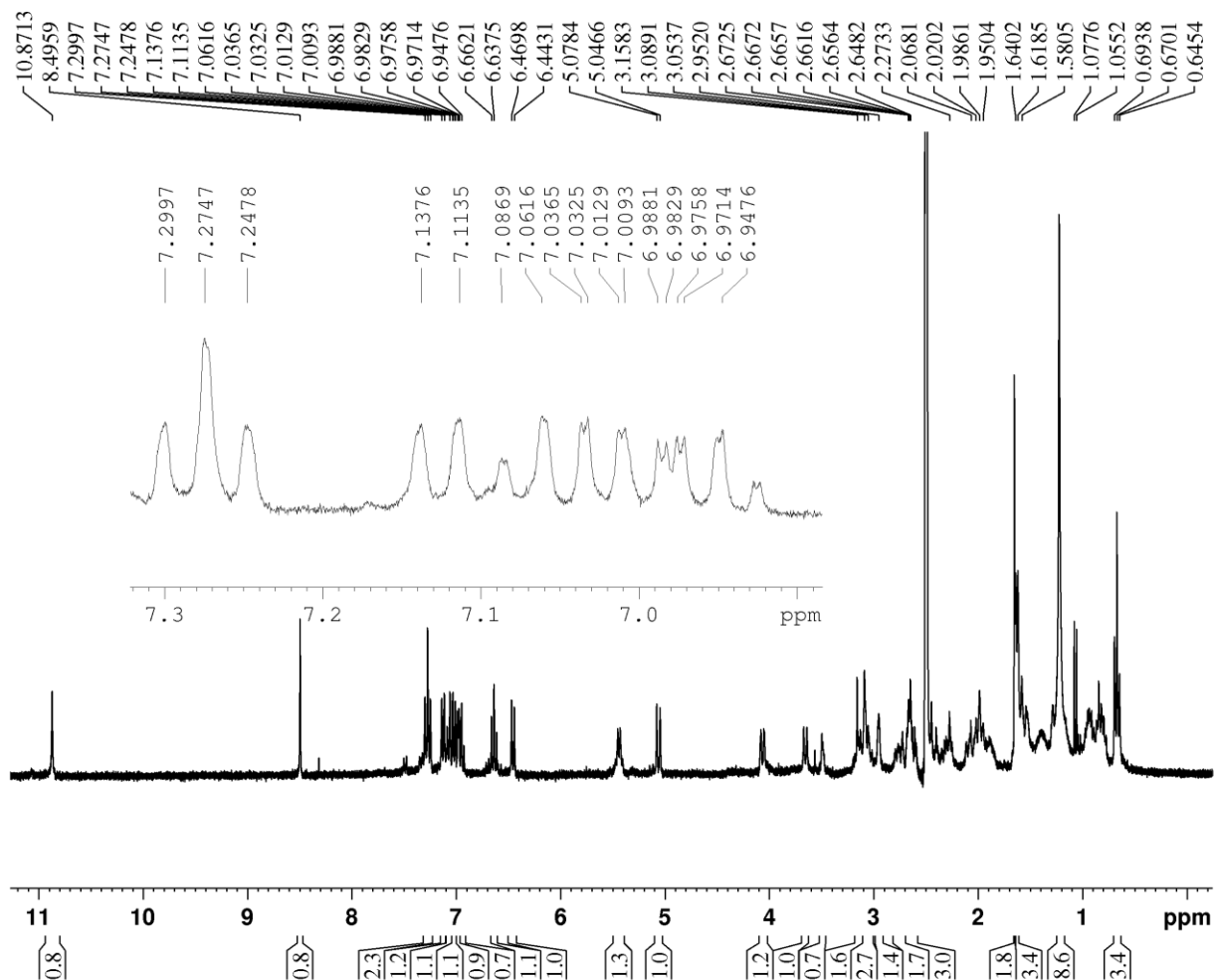
13-14min:100-20%

14-15min:20%



Anexo 39: Espectro de RMN ^1H (MH300/75 MH) da substância G (**33**) em $\text{DMSO}-d_6$.

Marlene20_1MC40AP4 (1H SUP; DMSO; 2mg)
26/06/2020 Op.: Magno



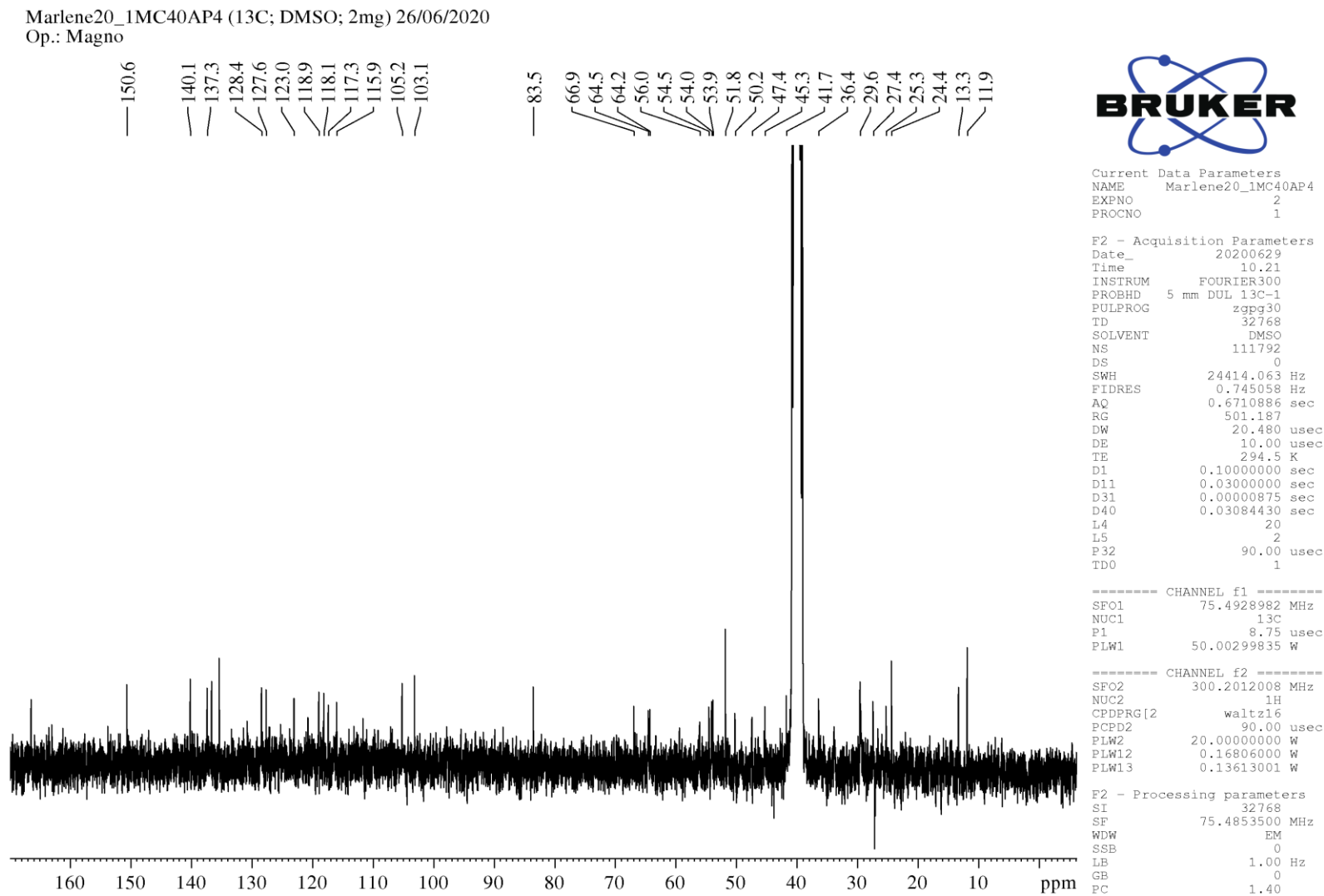
Current Data Parameters
NAME Marlene20_1MC40AP4
EXPNO 11
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200626
Time 16.25
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpgpr
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 4
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 73.1429
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 293.3 K
D1 2.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
P41 2000000.00 usec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 300.2010181 MHz
NUC1 1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W
PLW9 0.00001000 W

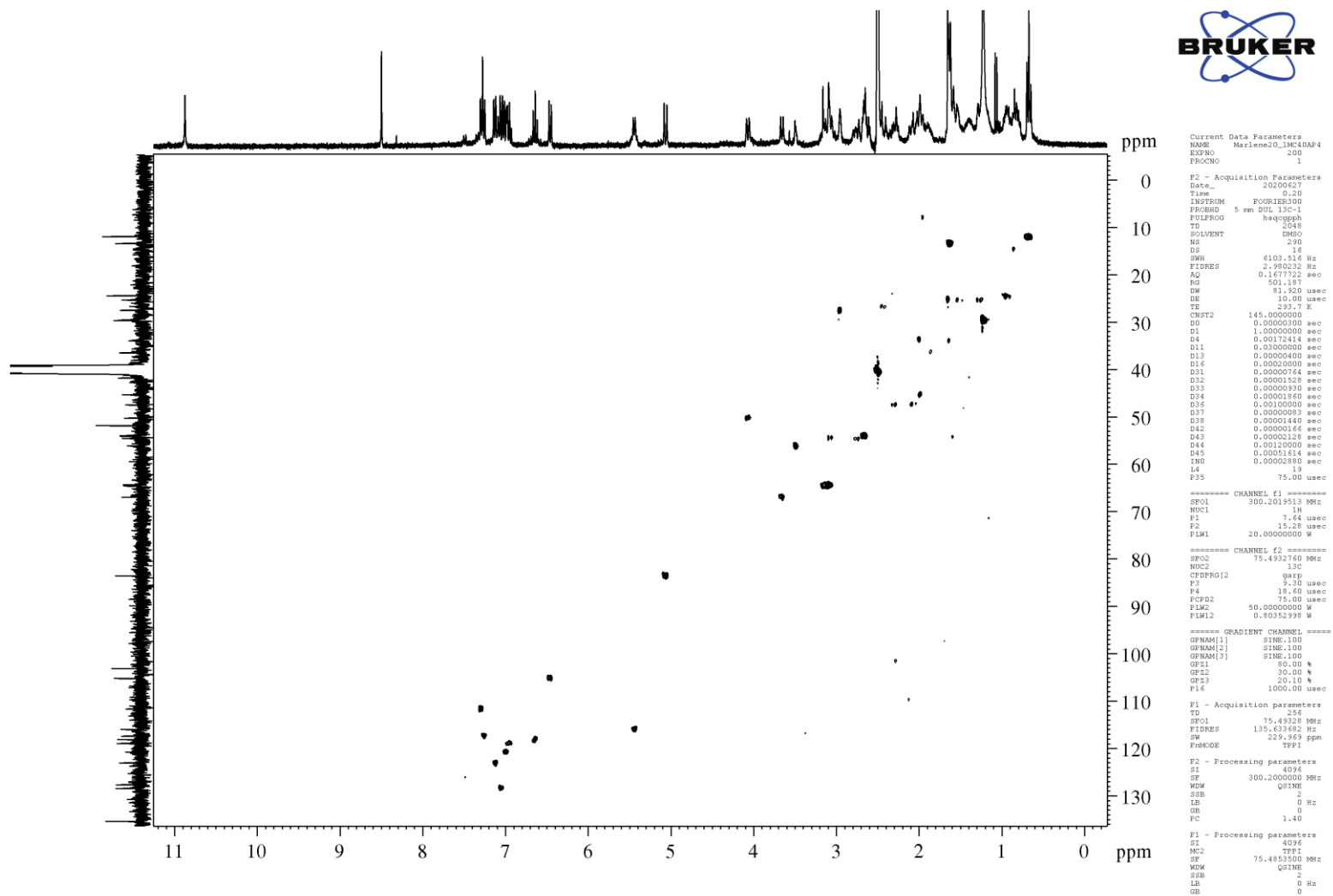
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 40: Espectro de RMN de ^{13}C (300/75 MHz) da substância G (33) em DMSO- d_6 .



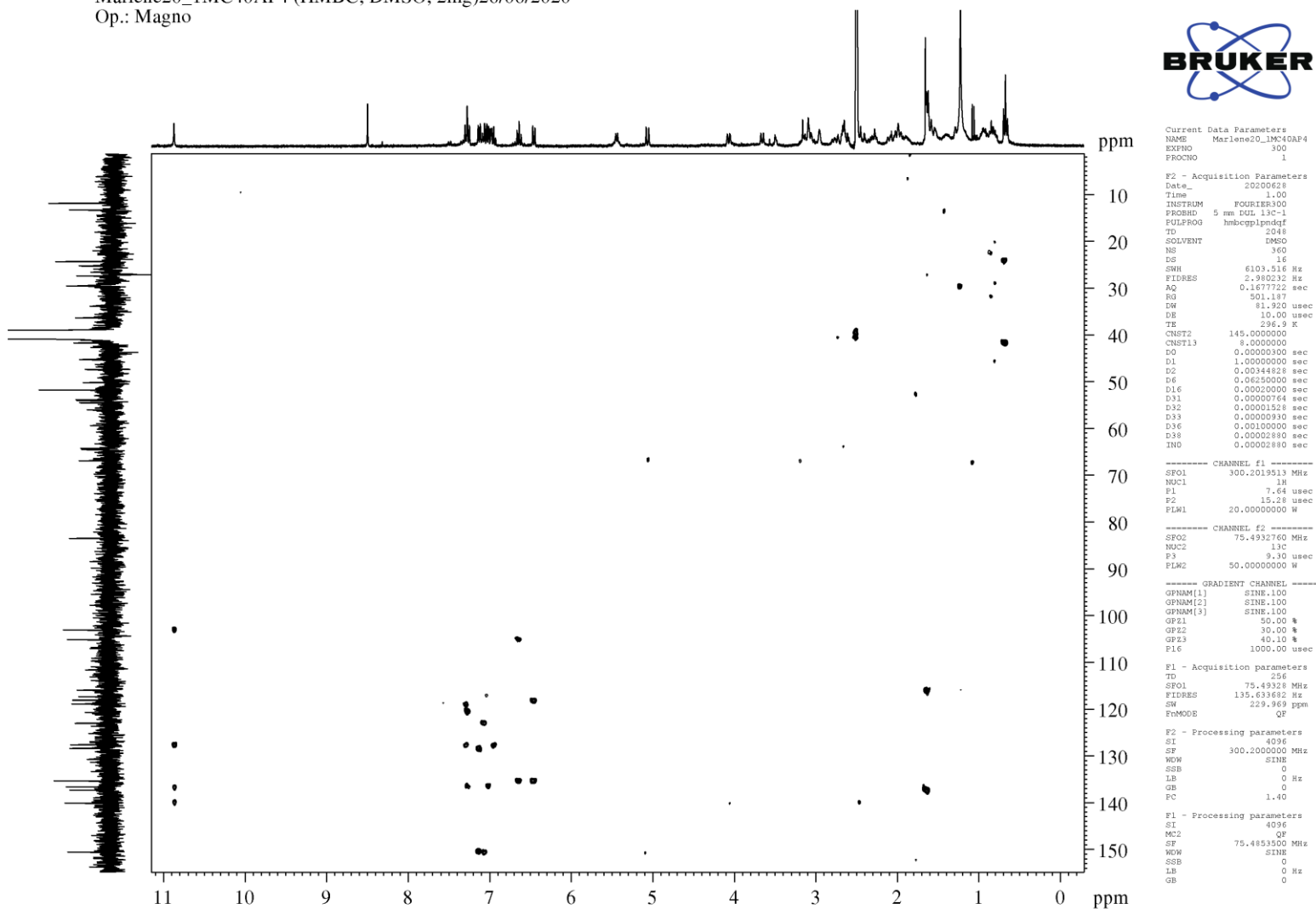
Anexo 41: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância G (**33**) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC40AP4 (HSQC; DMSO; 2mg)
26/06/2020 Op.: Magno



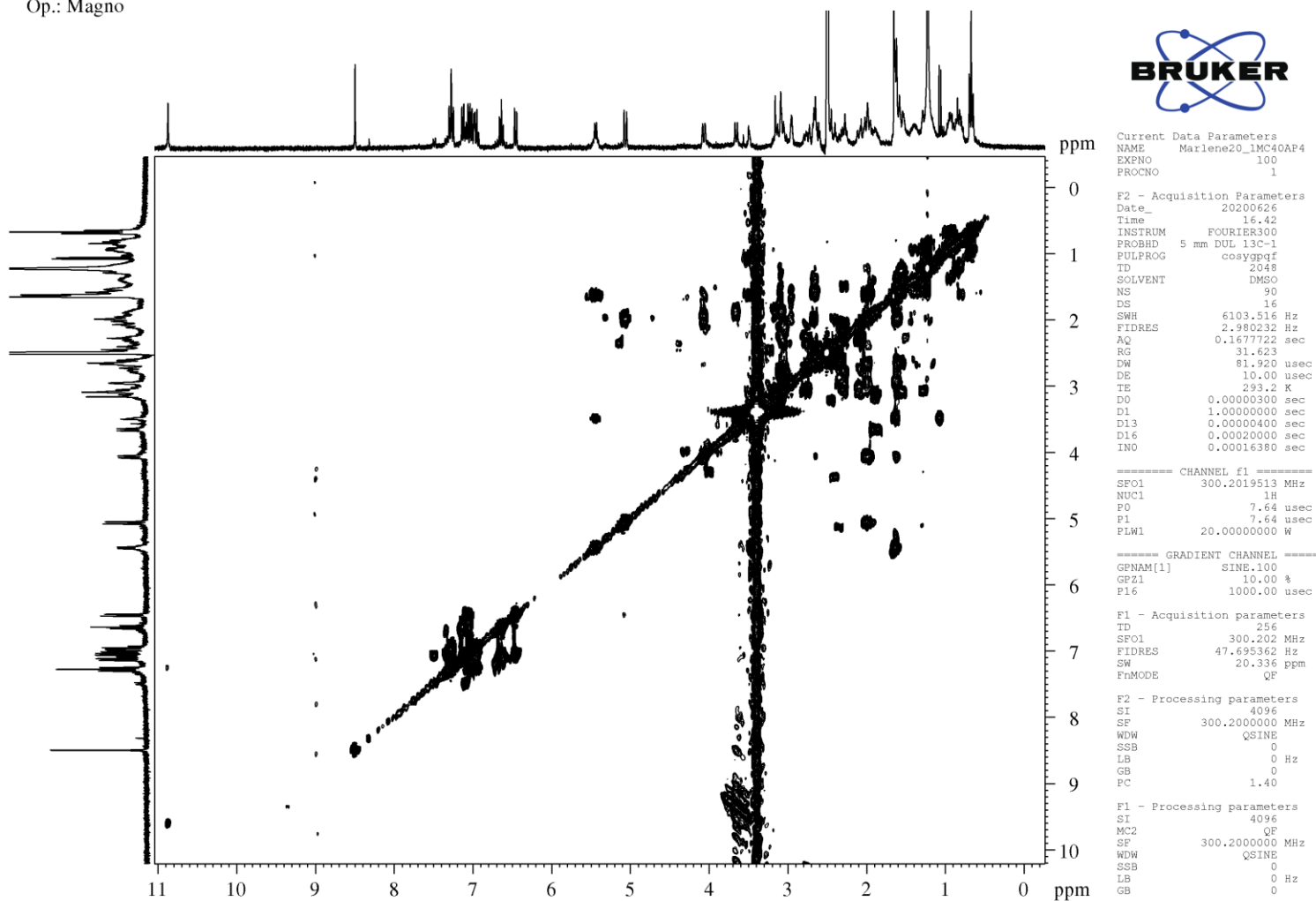
Anexo 42: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância G (33) em DMSO-*d*₆.

Marlene20_1MC40AP4 (HMBC; DMSO; 2mg)26/06/2020
Op.: Magno



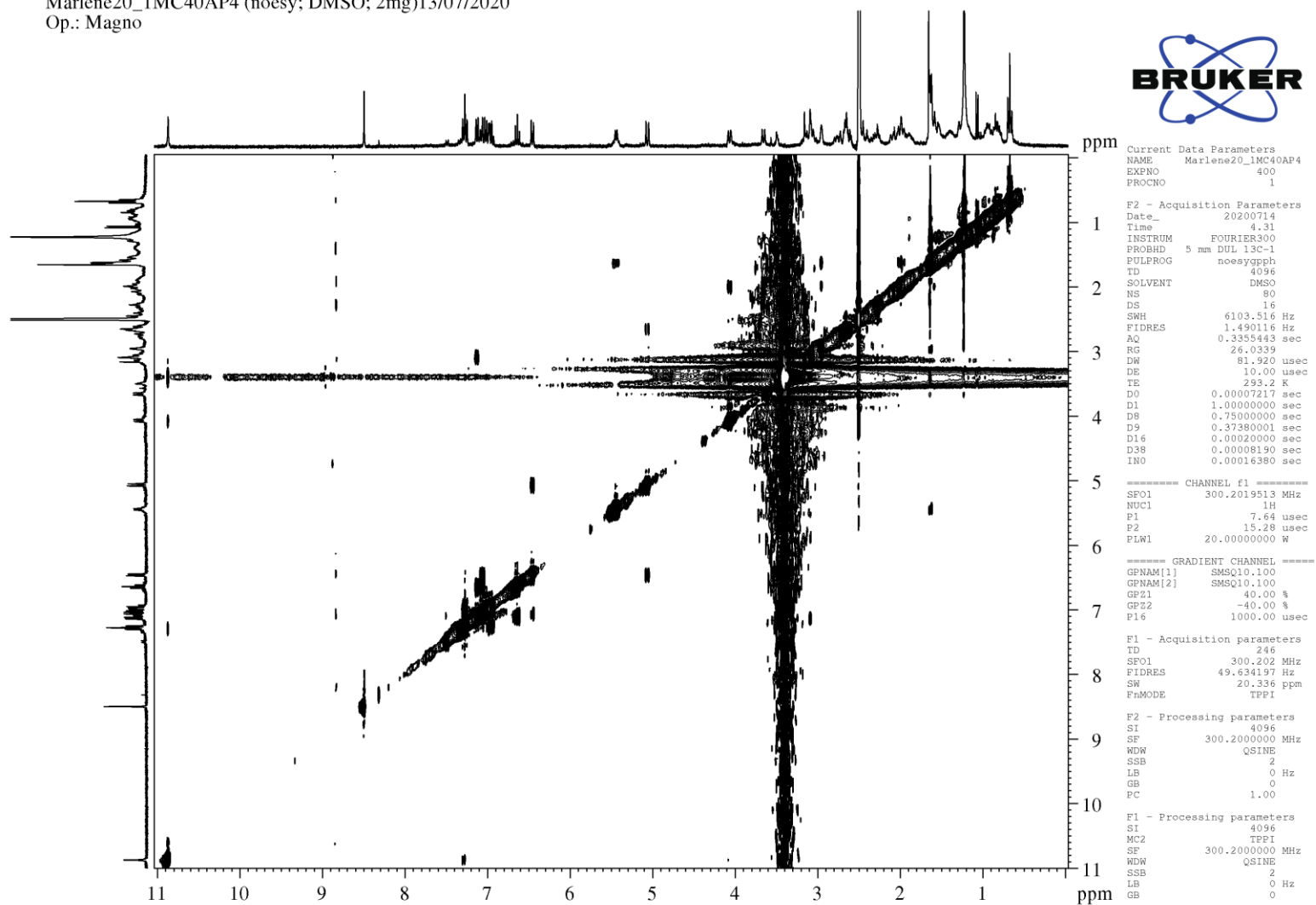
Anexo 43: Espectro de COSY (300/75 MHz) da substância G (33) em DMSO- d_6 .

Marlene20_1MC40AP4 (COSY; DMSO; 2mg) 26/06/2020
Op.: Magno

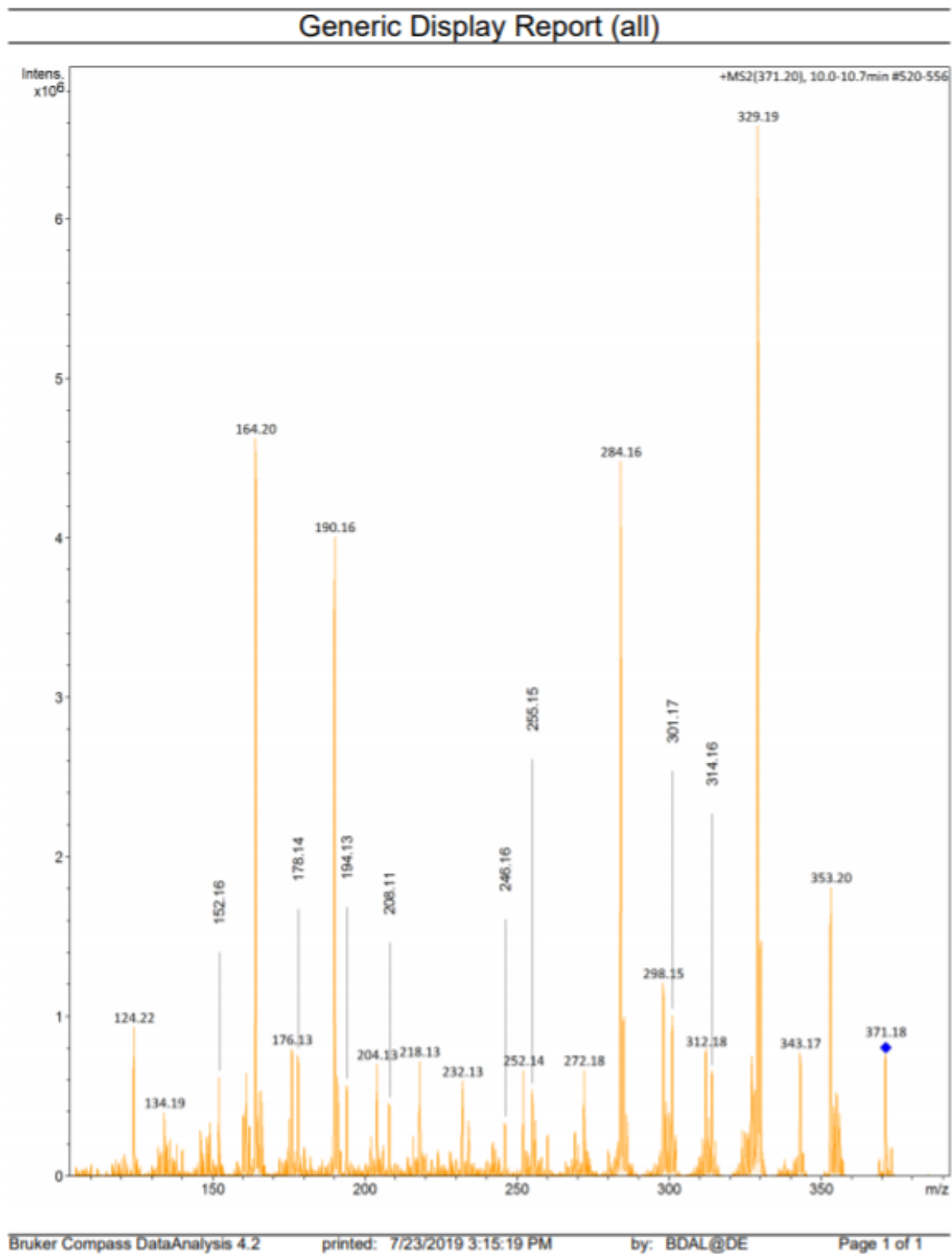


Anexo 44: Espectro de NOESY (300/75 MHz) da substância G (33)) em DMSO- d_6 .

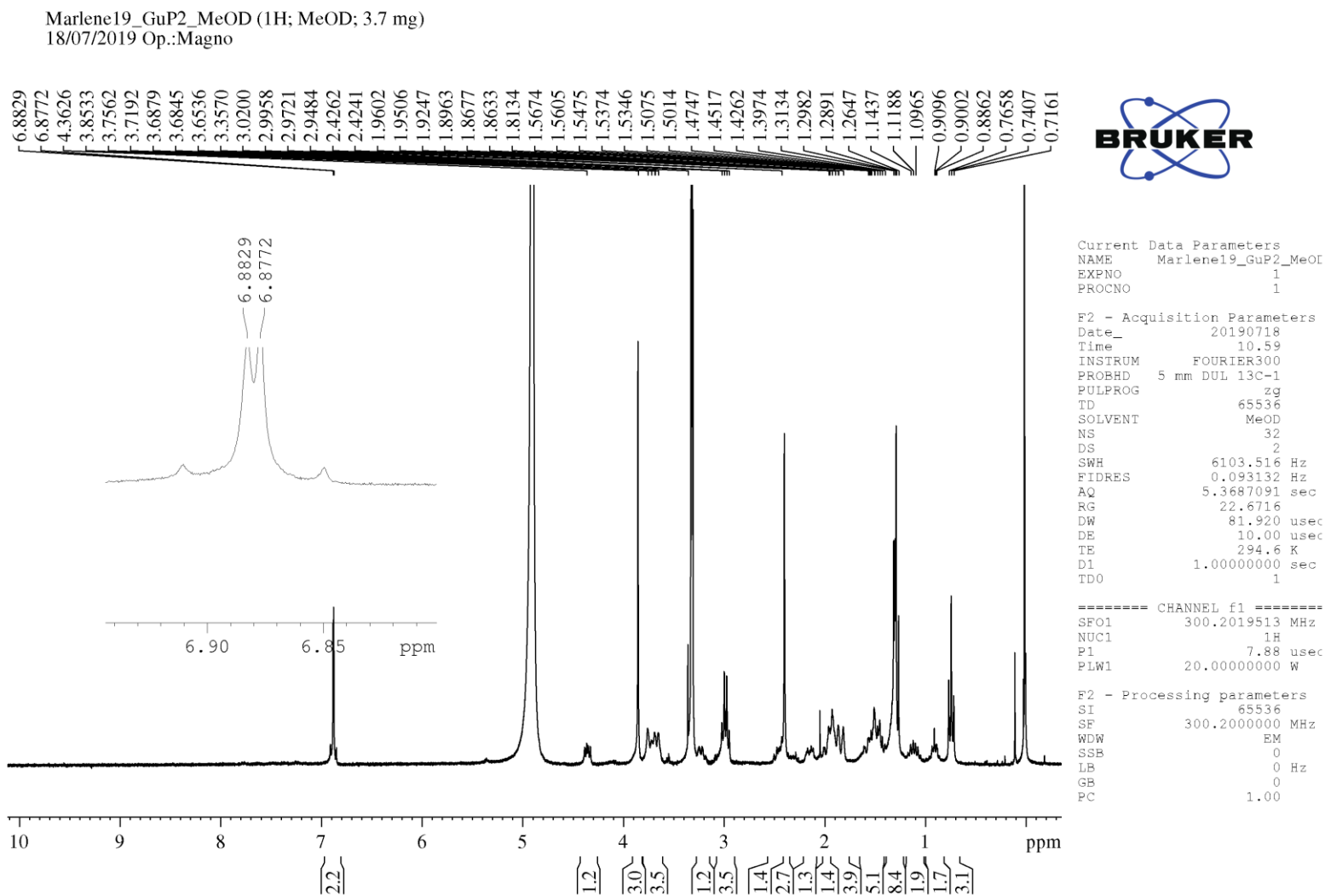
Marlene20_1MC40AP4 (noesy; DMSO; 2mg)13/07/2020
Op.: Magno



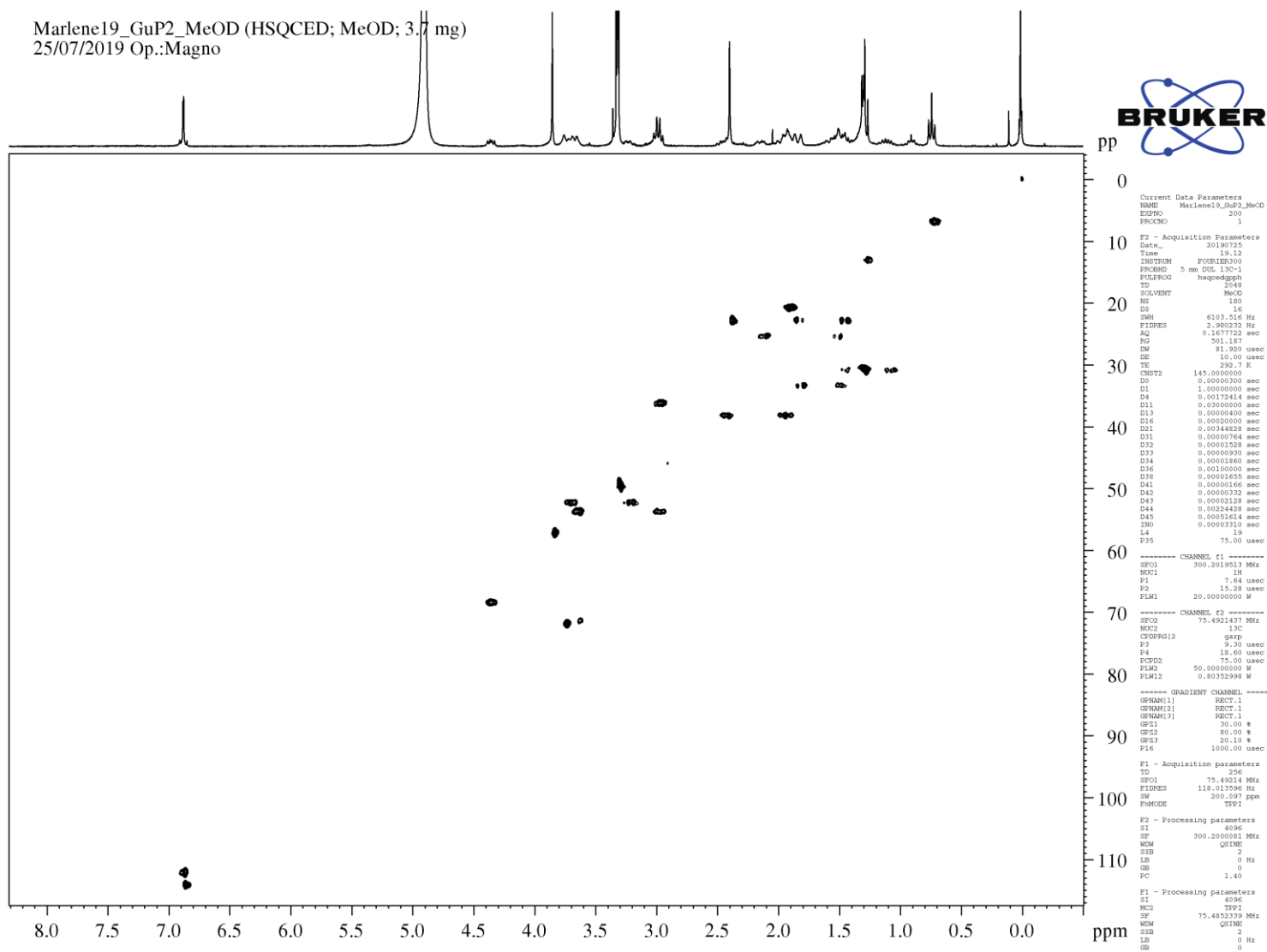
Anexo 45: Espectro de MS e fragmentação da substância F (41).



Anexo 46: Espectro de RMN de ^1H (300/75 MHz) da substância F (41) em CD_3OD .

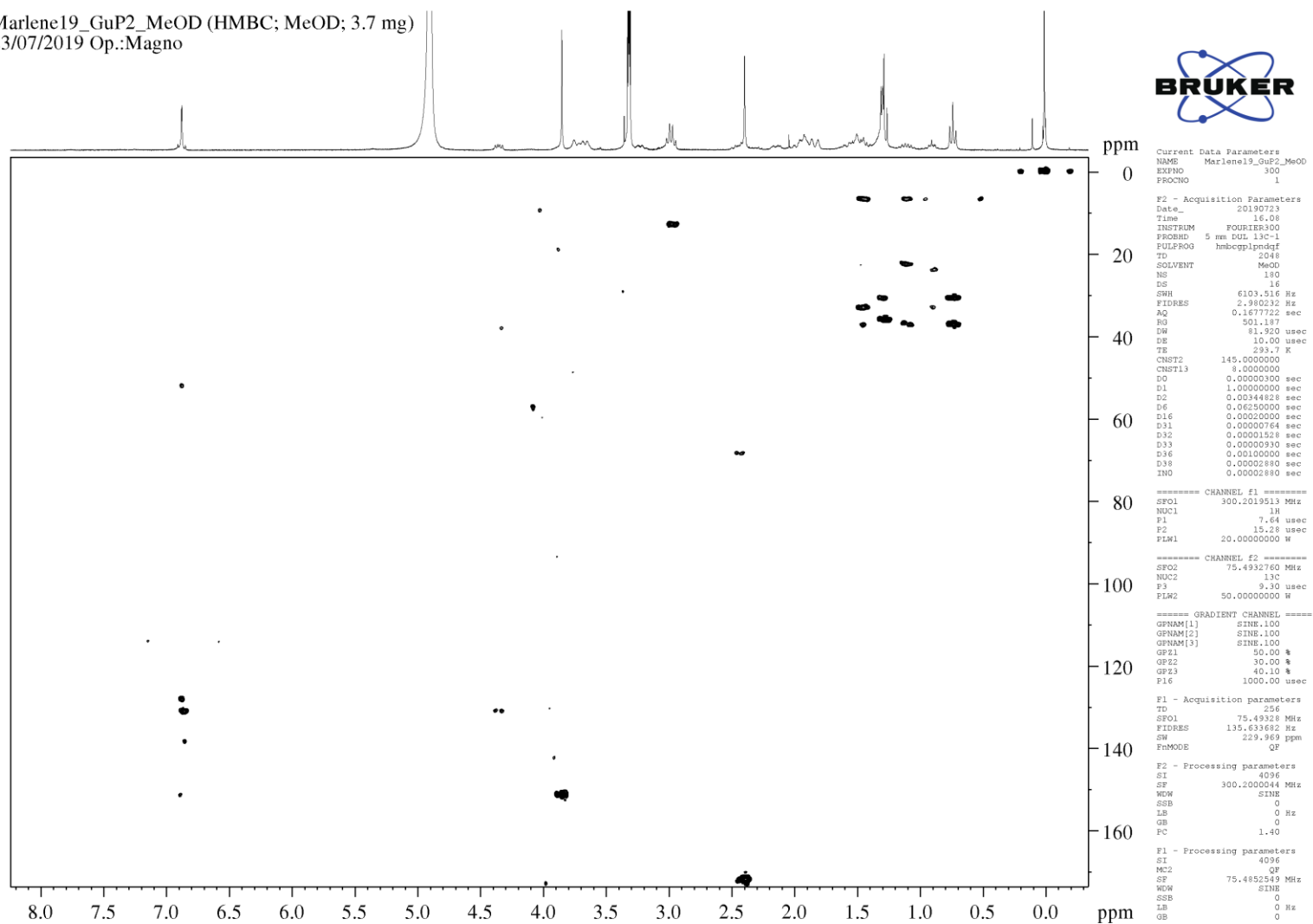


Anexo 47: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância F (41) em CD₃OD.



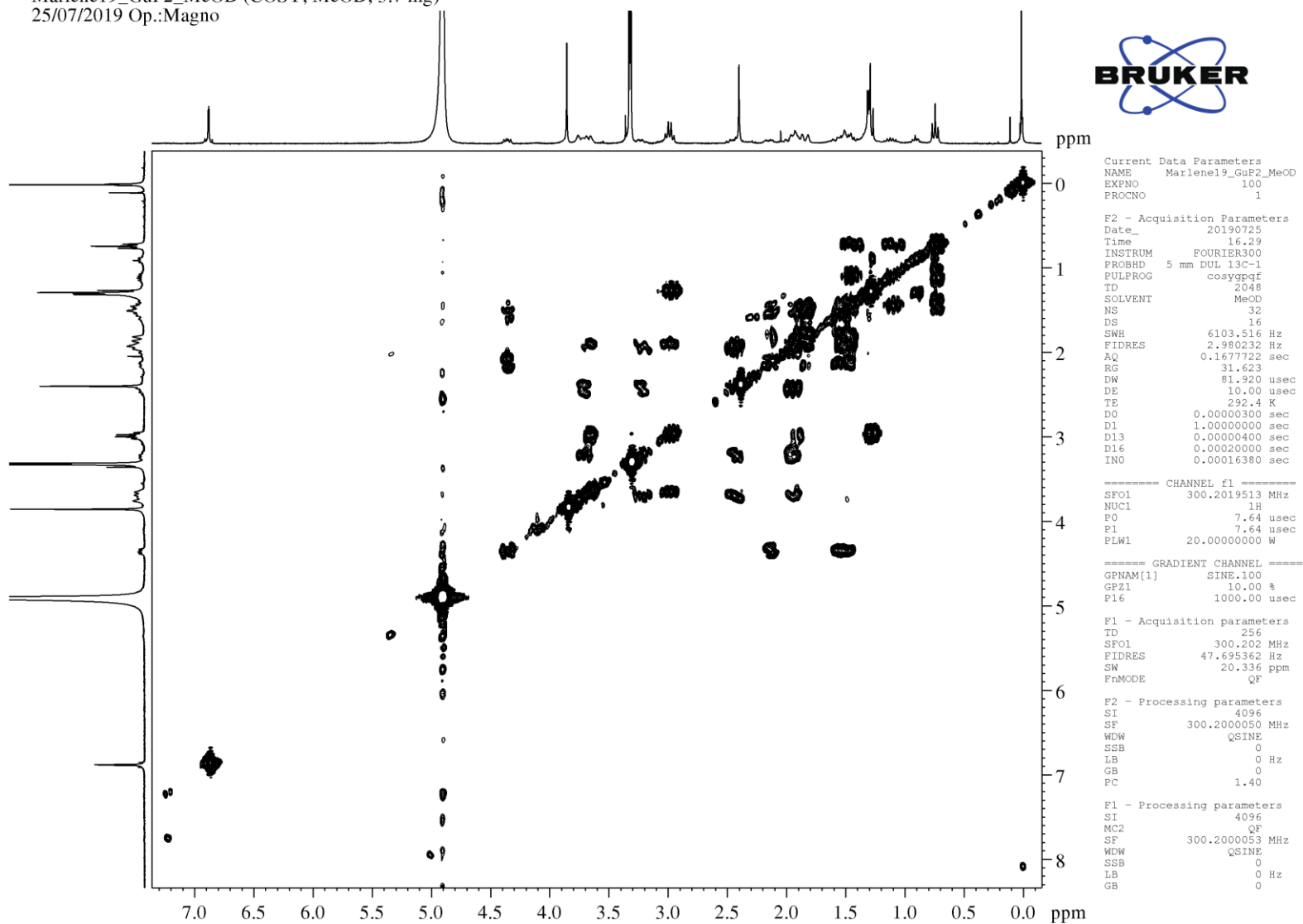
Anexo 48: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância F (41) em CD₃OD.

Marlene19_GuP2_MeOD (HMBC; MeOD; 3.7 mg)
23/07/2019 Op.:Magno

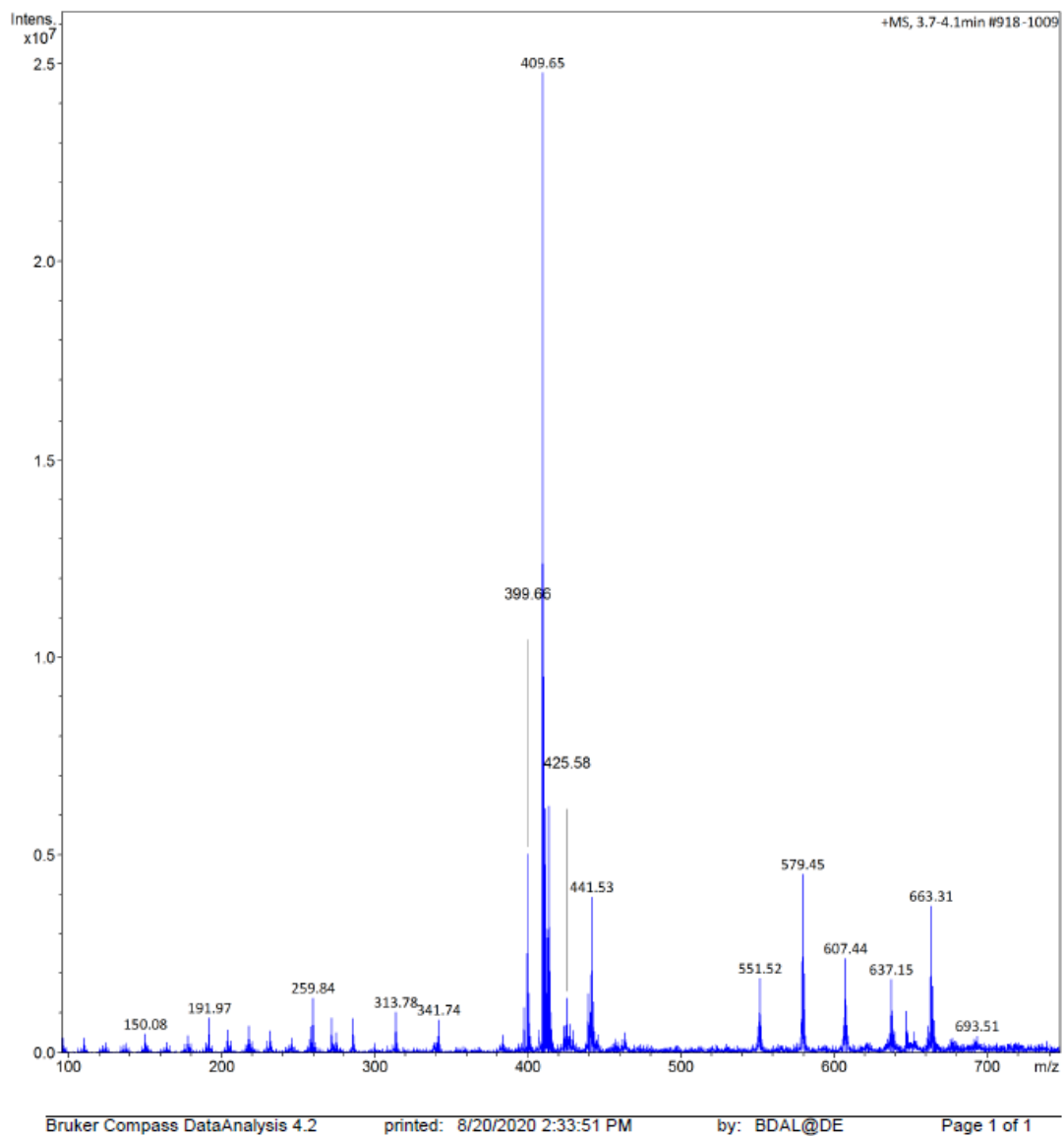


Anexo 49: Espectro de COSY (300/75 MHz) da substância F (41) em CD₃OD.

Marlene19_GuP2_MeOD (COSY; MeOD; 3.7 mg)
25/07/2019 Op.:Magno

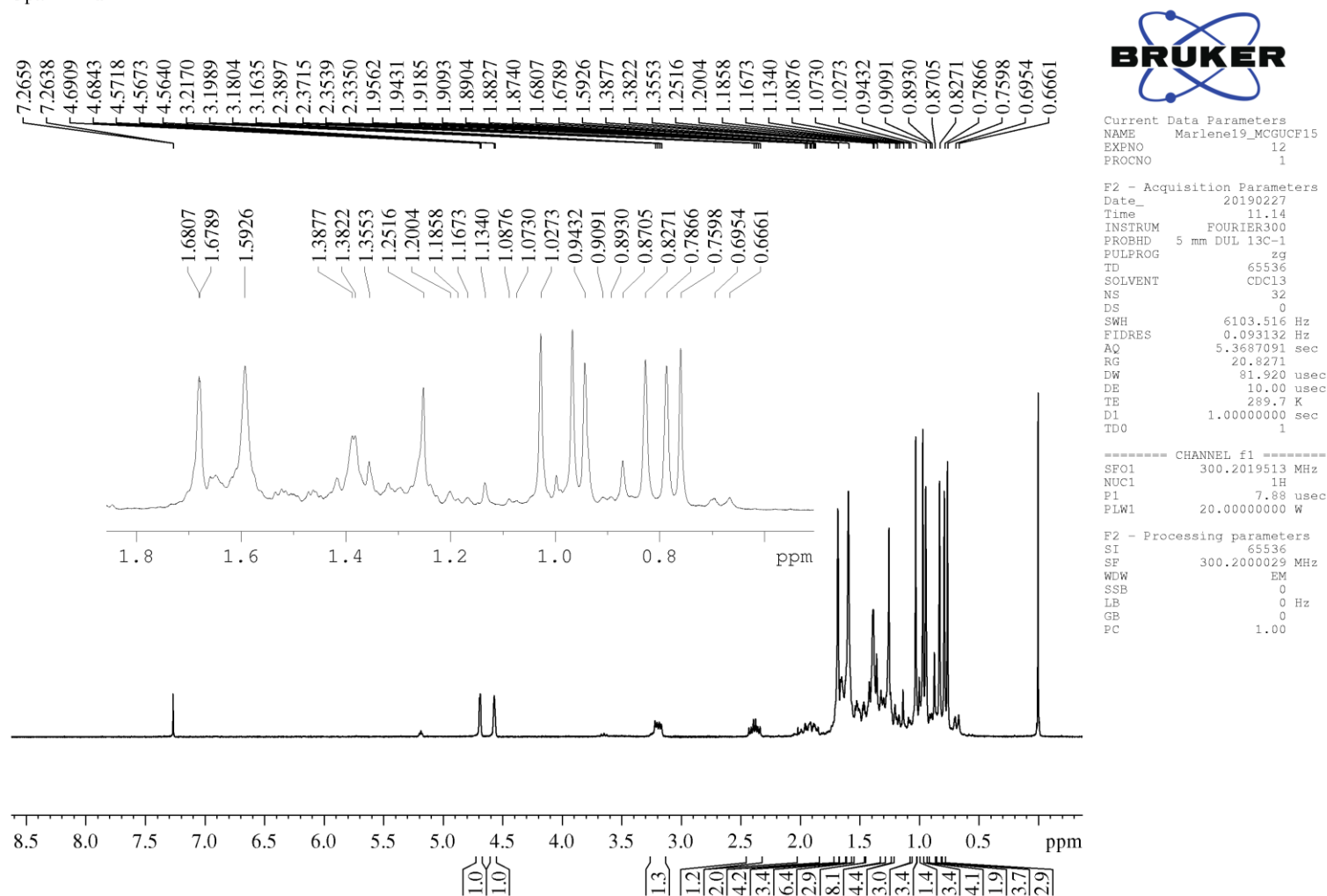


Anexo 50: Espectro de MS (APCI+) da substância D (57).



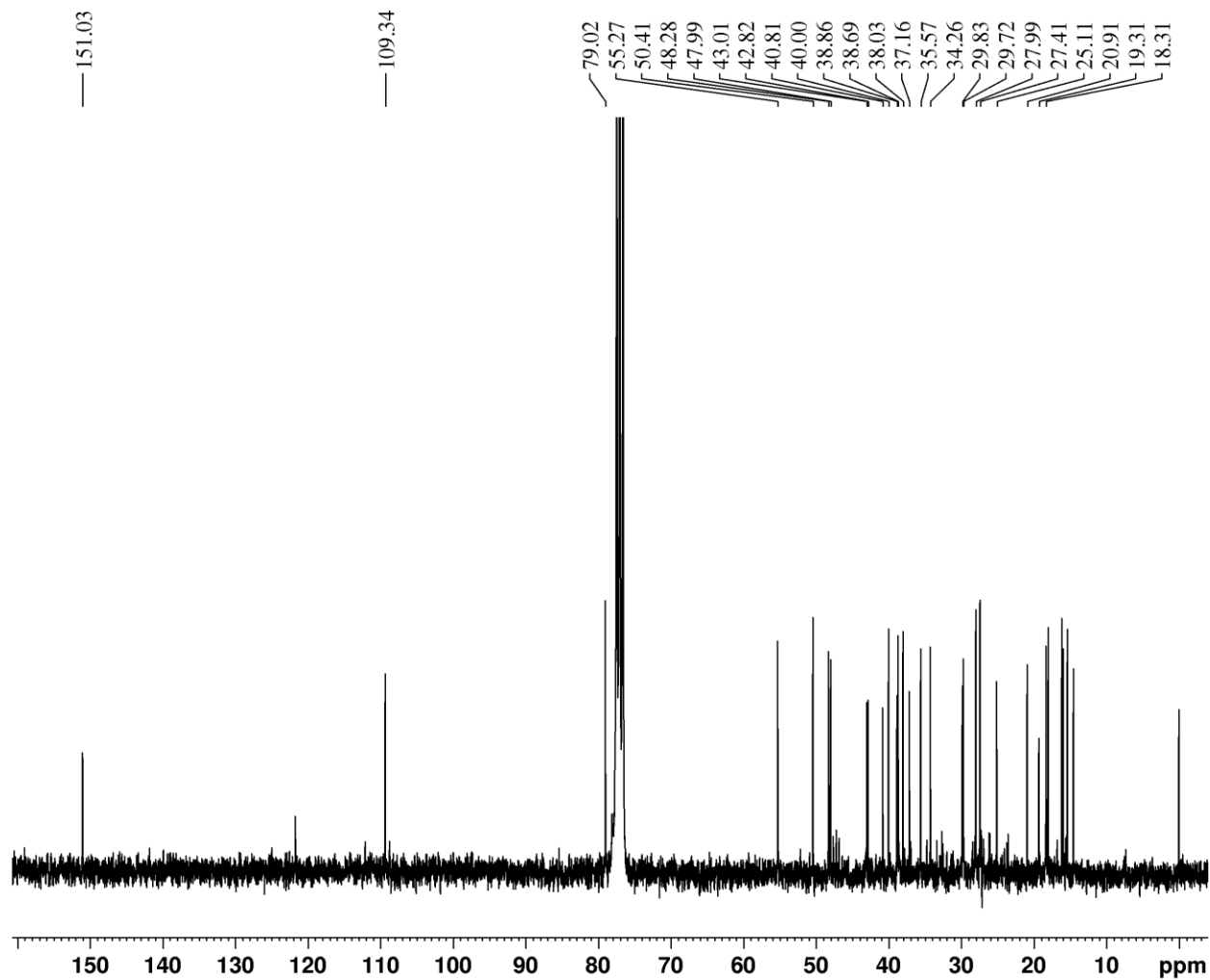
Anexo 51: Espectro de ^1H (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl_3 .

MCGUCF15 (1H; CDCl_3 ; 3,3 mg) 26/02/2019
Op.: Zelina



Anexo 52: Espectro de RMN de ^{13}C (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl_3 .

MCGUCF15 (13C; CDCl_3 ; 3,3 mg) 20/03/2019
Op.: Zelina



Current Data Parameters
NAME Marlene19_MCGUCF15
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20190321
Time 16.03
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 77228
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 293.5 K
D1 0.10000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.03084430 sec
L4 20
L5 2
P32 90.00 usec
TDO 1

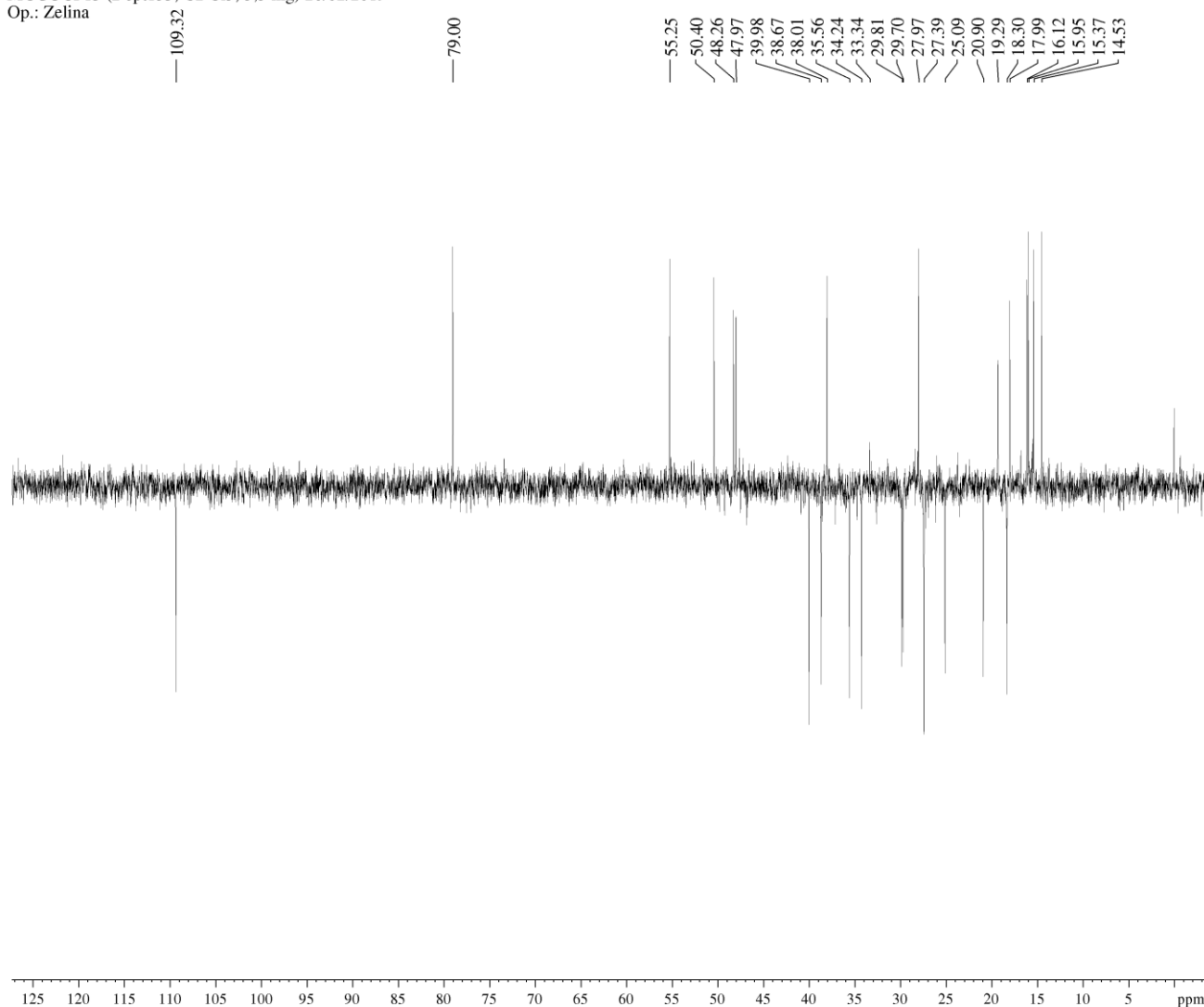
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo 53: Espectro de RMN DEPT 135 (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl₃.

MCGUCF15 (Dept135; CDCl₃; 3,3 mg) 26/02/2019
Op.: Zelina



Current Data Parameters
NAME Marlene19_MCGUCF
EXPNO 41
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20190227
Time 11.22
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 4096
DS 8
SWH 24414.063 H
FIDRES 0.372529 H
AQ 1.3421773 s
RG 501.187
DW 20.480 u
DE 10.00 u
TE 289.8 K
CNST2 145.0000000
D1 2.0000000 s
D2 0.00344829 s
D14 0.00001114 s
D33 0.00000825 s
D34 0.00344053 s
D35 0.00345340 s
L4 40
P32 90.00 u
TD0 1

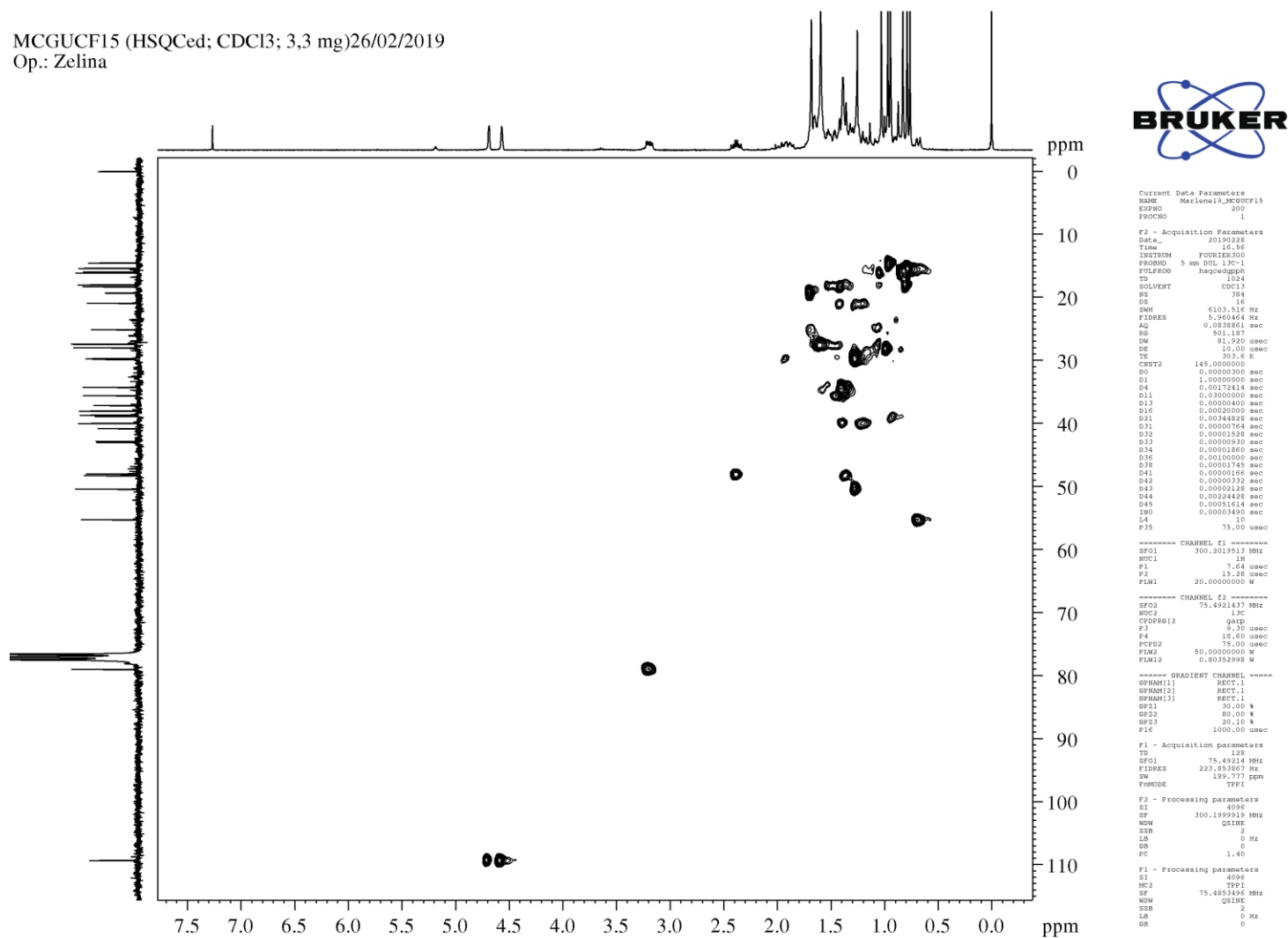
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4913881 M
NUC1 13C
P1 8.75 u
P2 17.50 u
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2009601 M
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 u
P4 16.50 u
PCPD2 90.00 u
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameter
SI 32768
SF 75.4853512 M
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 H
GB 0
PC 1.40

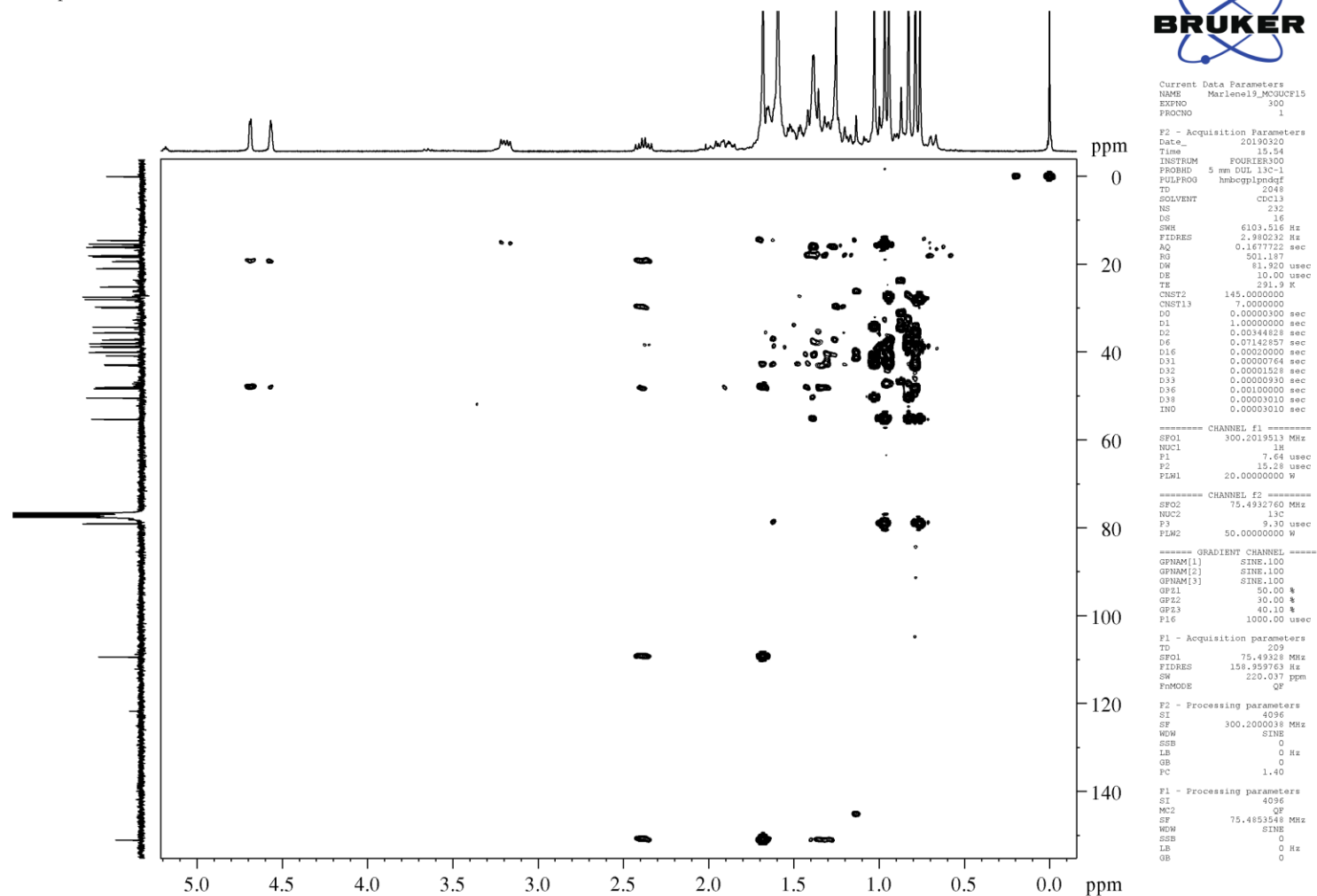
Anexo 54: Espectro de HSQC (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl₃.

MCGUCF15 (HSQCed; CDCl₃; 3,3 mg)26/02/2019
Op.: Zelina



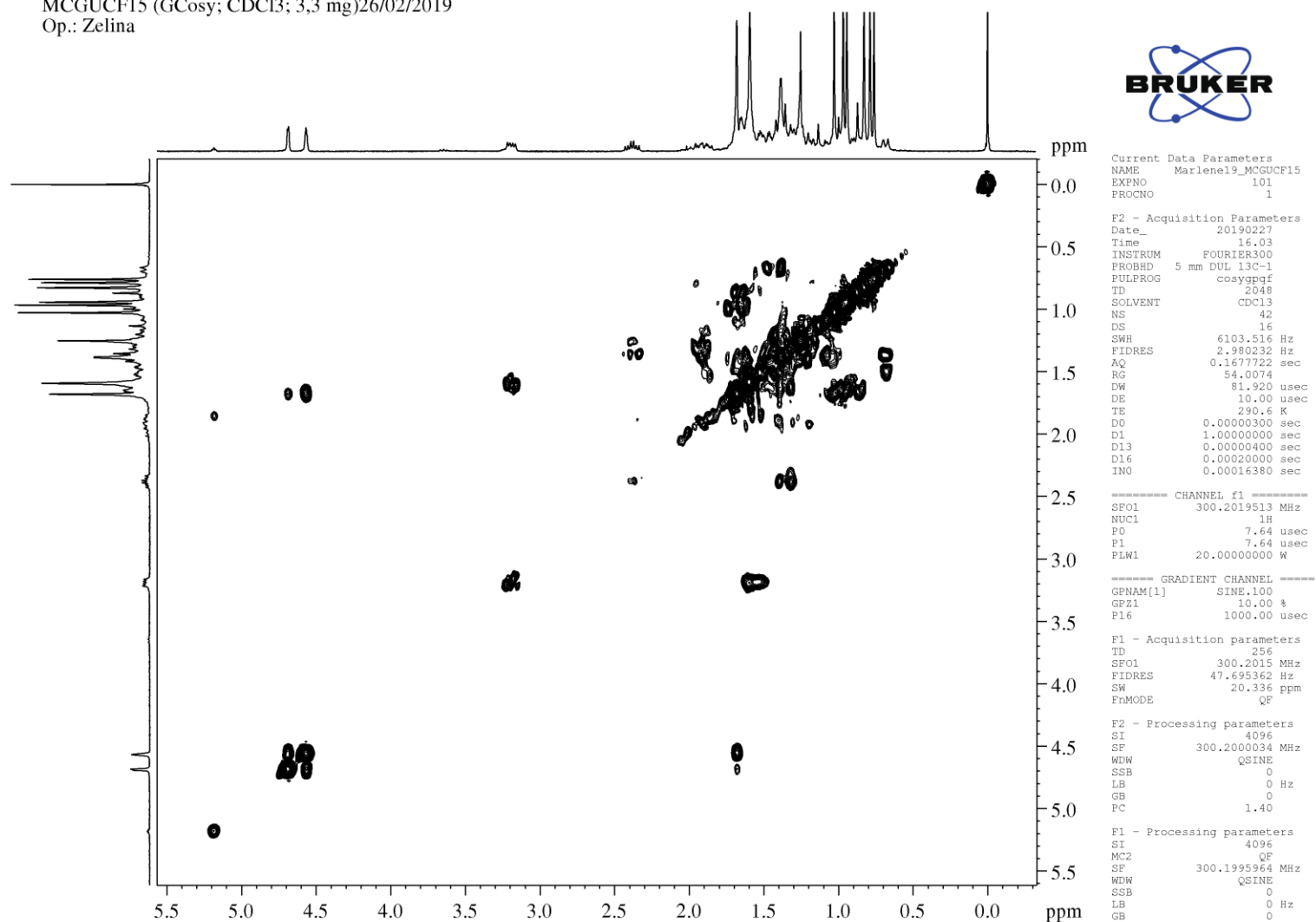
Anexo 55: Espectro de HMBC (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl₃.

MCGUCF15 (HMBC; CDCl₃; 3,3 mg)20/03/2019
Op.: Sabrina



Anexo 56: Espectro de COSY (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl₃.

MCGUCF15 (GCosy; CDCl₃; 3,3 mg)26/02/2019
Op.: Zelina



Anexo 57: Espectro de NOESY (300/75 MHz) da substância D (57) em CDCl₃.

MCGUCF15 (Noesy_G; CDC13; 3,3 mg)22/03/2019
Op.: Zelina

