UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

Análise Química e Estabelecimento de Culturas *in vitro* de *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. e *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.

Tese de Doutorado

Melânia Lopes Cornélio

Prof. Dr. Paulo R. H. Moreno
Orientador

São Paulo
2002

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005055

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cornélio, Melânia Lopes
C814a Análise química e estabelecimento de culturas in vitro de
Aspidosperma cylindrocarpon Muell. Arg. e *Aspidosperma*
polyneuron Muell. Arg. / Melânia Lopes Cornélio --
São Paulo, 2002.
143p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch

1. Produtos naturais : Química orgânica 2. Alcalóide :
Química orgânica I. T. II. Moreno, Paulo Roberto
Hrihorowitsch, orientador

547.7 CDD

“Análise Química e Estabelecimento de Culturas *in vitro* de *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. e *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.”

MELÂNIA LOPES CORNÉLIO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Orgânica.

Aprovada por:

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. MASSAYOSHI YOSHIDA
IQ – USP

Profa. Dra. DAISY DE BRITO REZENDE
IQ – USP

Profa. Dra. EDNA TOMIKO MIYAKE KATO
FCF - USP

Profa. Dra. MARIA CLAUDIA MARX YOUNG
IB – SP

SÃO PAULO
08 DE OUTUBRO 2002.

À Deus o verdadeiro sopro da vida.

À Jean pela força, confiança e carinho sempre constante.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo R. H. Moreno pela orientação, apoio e amizade para realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Massayoshi Yoshida e Massuo J. Kato pelo incentivo.

À Profa Dra. Dominique C. H. Fischer pela ajuda concedida.

À Profa Dra. Domitilla Tomáz pela coleta do material vegetal indispensável para execução desse trabalho.

À Profa Dra. Luciana Retz do Instituto de Botânica pelas sugestões.

À Renata P. Limberger e Miriam A. Apel e Profa Dra. Amélia T. Henriques pela análise por CG-EM do óleo volátil.

À Profa. Dra. Cláudia Marx Young pelos testes biológicos antifúngico e antitumoral e às Profas Dras. Silvia Di Santi e Karin Kirchgatter pelos testes antimaláricos.

Às Profas. Dras. Daisy de Brito Rezende e Edna Tomiko Miyake Kato pelas sugestões e correções.

Aos funcionários da Central Analítica, em especial ao Márcio N. Wandermuren, por toda atenção.

Aos colegas e funcionários do B11T pela agradável convivência diária, Ana Paula Santos, Ana Paula Danelutte, Angélica yucari, Cecília Nunes, João Henriques, Mara Constantin, Patrícia Sartorelli, Isabel Moraes, Ingrid Collantes, Marcos Enoque, Roberto Martins e Sérgio Galdino por toda atenção.

Aos alunos de iniciação científica, Renato e Neto, pela ajuda na parte experimental.

Enfim, a tudo e todos que colaboraram de alguma maneira na elaboração desta tese.

À CAPES pela bolsa concedida.

Sumário

AGRADECIMENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ESQUEMAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
 CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO GERAL	
I.1 Metabolismo vegetal	2
I.2 Alcalóides indólicos	6
I.3 Gênero <i>Aspidosperma</i>	8
I.4 Cultura de células vegetais	10
I.5 Objetivos	12
I.6 Referências bibliográficas	13
 CAPÍTULO II- ESTUDO QUÍMICO DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> Muell. Arg.	
II.1 Generalidades	18
II.2 Material e métodos	20
II. 2.1 Equipamentos e materiais utilizados	20
II.2.2 Material vegetal	21
II.2.3- Extração dos alcalóides de <i>A. polyneuron</i>	21
II.2.4 Isolamento dos alcalóides de <i>A. polyneuron</i>	23
II.2.5 Condições para análise por cromatografia em fase gasosa (CG)	24
II.3 Óleo volátil de <i>A. polyneuron</i>	24
II.3.1 Obtenção do óleo volátil de folhas de <i>A. polyneuron</i>	24
II.3.2 Análise dos componentes do óleo volátil de <i>A. polyneuron</i> por CG/EM	25
II.3.3 Identificação dos componentes do óleo volátil de <i>A. polyneuron</i>	25
II.4 Resultados e Discussão	26
II.4.1 Rendimento da extração dos alcalóides de <i>A. polyneuron</i>	26
II.4.2 Dados físicos e espectrométricos dos alcalóides identificados de <i>A. polyneuron</i>	27
II.4.3 Caracterização dos alcalóides	28
II.5 Análise do óleo volátil	45
II.6 Referências bibliográficas	48

CAPÍTULO III- ESTUDO QUÍMICO DE *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell Arg

III.1 Generalidades	52
III.2 Material e Métodos	54
III.2.1 Material vegetal	55
III.2.2 Extração dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i>	55
III.2.3 Separação e isolamento dos alcalóides tde <i>A. cylindrocarpon</i>	57
III.2.4 Condições para análise por cromatografia em fase gasosa (CG)	60
III.2.5 Variação da composição dos alcalóides durante a germinação <i>in vitro</i> de <i>A. cylindrocarpon</i>	61
III.2.6 Óleo volátil de <i>A. cylindrocarpon</i>	63
III.2.6.1 Obtenção do óleo volátil de <i>A. cylindrocarpon</i>	63
III.2.6.2 Análise dos componentes do óleo volátil de <i>A. cylindrocarpon</i> por cromatografia a gás, acoplado a espectrometria de massas	64
III.2.6.3 Identificação dos componentes	64
III.3 Resultado e Discussão	64
III.3.1 Rendimentos das extrações dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i>	64
III.3.2 Dados físicos e espectrométricos dos alcalóides identificados de <i>A. cylindrocarpon</i>	65
III.3.3 Caracterização dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i>	67
III.3.4 Caracterização dos alcalóides por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)	67
III.3.5 Extração dos alcalóides durante o desenvolvimento de plântulas de <i>A. cylindrocarpon</i> cultivadas <i>in vitro</i>	85
III.3.6 Análise dos componentes do óleo volátil de <i>A. cylindrocarpon</i>	87
III.4- Referências bibliográficas	90

CAPÍTULO IV- ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS *IN VITRO*

IV.1 Generalidades	94
IV.2 Material e Métodos	97
IV.2.1 Material vegetal	97
IV.2.2 Formulação e preparação do meio de cultura	97
IV.2.3 Procedimento de desinfecção e condições de germinação	97
IV.2.3.1 Sementes de <i>A. cylindrocarpon</i>	98
IV.2.3.2 Sementes de <i>A. polyneuron</i>	99
IV.2.4 Preparação de meios de cultura para indução de calos	101
IV.2.5 Obtenção de suspensões celulares de <i>A. cylindrocarpon</i>	105
IV.2.6 Determinação da curva de crescimento da suspensão celular de <i>A. cylindrocarpon</i>	105
IV.3 Caracterização química da cultura de <i>A. cylindrocarpon</i>	106
IV.3.1 Extração dos alcalóides das células das suspensões e do meio de cultura de <i>A. cylindrocarpon</i> e análise do perfil cromatográfico por CLAE desses extratos	108

IV.4 Resultados e Discussão-----	108
IV.4.1 Germinação das sementes de <i>A. polyneuron</i> e <i>A. cylindrocarpon</i> -----	108
IV.4.2 Indução de calos-----	111
IV.4.3 Suspensões celulares de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	116
IV.4.4 Curva de crescimento da suspensão celular de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	117
IV.4.5 Análise, por CLAE, dos alcalóides contido nos extratos das células das suspensões e do meio de cultura de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	119
IV.5 Referências bibliográficas-----	121
CAPÍTULO V ATIVIDADE BIOLÓGICA	
V.1 Generalidades-----	127
V.2 Material e Métodos-----	128
V.2.1 Estudo da atividade biológica dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> e <i>A. polyneuron</i> -----	128
V.2.2 Bioensaio com Cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	128
V.2.3 Bioensaio para verificação de atividade antifúngica-----	129
V.2.4 Ensaio antibacteriano-----	130
V.2.4.1 Preparação da amostra-----	130
V.2.4.2 Preparação do inóculo-----	130
V.2.4.3 Método de preparação de difusão do Ágar-ágar-----	131
V.2.5 Bioensaio para verificação de atividade antimalárica-----	131
V.2.5.1 Critério de inclusão-----	131
V.2.5.2 Microtestes de Sensibilidade-----	132
V.3 Resultados e discussão-----	132
V.3.1 Avaliação da atividade antitumoral com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	132
V.3.2 Ensaios de bioautografia com fungos-----	133
V.3.3 Ensaio antibacteriano-----	134
V.3.4 Avaliação da atividade antimalárica, com cepa K1 e cepa Palo Alto-----	135
V.4 Referências Bibliográficas-----	138
CONCLUSÕES-----	142

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1- Esquema da origem metabólica dos principais metabólitos secundários aromáticos. CM (corismato mutase), ICS(isocorismato sintase) e AS (antranilato sintase).-----	4
Figura I.2- Núcleos heterocíclicos das principais classe de alcalóides.-----	5
Figura I.3- Exemplos de diferentes estruturas de alcalóides monoterpênicos. -----	7
Figura I.4- Posição botânica do gênero <i>Aspidosperma</i> dentro da família Apocynaceae -----	8
Figura I.5- Estruturas de alcalóides indólicos isolados de diferentes espécies de <i>Aspidospermas</i> -	9
Figura II.1- Parte do ramos com flores e folhas de <i>A. polyneuron</i> Muell. Arg. -----	18
Figura II.2- Hábito de <i>A. polyneuron</i> Muell. Arg.-----	18
Figura II.3- Cromatograma da fração F1APa-----	29
Figura II.4- Substância F1APa, cilindrocarina-----	30
Figura II.5- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de cilindrocarina, por EI a 70eV-----	31
Figura II.6- Espectro de massas para cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, EI a 70eV-----	32
Figura II.7- Cromatograma da fração F5APa e F5APa'-----	33
Figura II.8- Substância F5APa, aspidospermina-----	34
Figura II.9- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de aspidospermina, por EI a 70eV-----	35
Figura II.10- Espectro de massas para aspidospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, EI a 70eV-----	36
Figura II.11- Substância F5APa', desmetil-aspidospermina-----	37
Figura II.12-Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de desmetil-aspidospermina, por EI a 70eV-----	38
Figura II.13- Espectro de massas para desmetil-aspidospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV-----	39
Figura II.14- Cromatograma da fração F8a-11AP-----	40
Figura II.15- Substância F8a-11AP, desmetóxi-aspidospermina-----	41
Figura II.16- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de desmetóxi-aspidospermina, por EI a 70eV-----	41
Figura II.17- Espectro de massas para desmetóxi-aspidospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A-----	42
Figura II.18- cromatograma da fração F8b-11AP-----	42
Figura II.19- Substância F8b-11AP, pirifolidina-----	43
Figura II.20- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de pirifolidina, por EI a 70eV-----	44

Figura II.21- Espectro de massas para pirifolidina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV-----	45
Figura II.22- Estruturas químicas dos constituintes presente no óleo volátil de <i>A. polyneuron</i> -----	47
Figura III.1- Parte do ramos com flores e folhas de <i>A. cylindrocarpon</i> Muell. Arg.-----	52
Figura III.2- Hábito de <i>A. cylindrocarpon</i> Muell. Arg.-----	52
Figura III.3- Aparelhagem utilizada para separação dos alcalóides-----	58
Figura III.4- Cromatograma da fração 3FMPLCB, N-benzoil-20-hidróxi-cilindrocarina-----	68
Figura III.5- Substância 3MPLCB, N-benzoil-20-hidróxi-cilindrocarina-----	68
Figura III.6- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de N-benzoil-20-hidróxi-cilindrocarina, por EI a 70ev-----	69
Figura III.7- Espectro de massas para N-benzoil-20-hidróxi-cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70ev -----	70
Figura III.8- Cromatograma da substância 3FMPLCCa, N-cinamoil-20-hidróxi-cilindrocarina-----	71
Figura III.9- Substância 3FMPLCCa, N-cinamoil-20-hidróxi-cilindrocarina-----	72
Figura III.10- Fragmentação para interpretação do espectro de massas de N-cinamoil-20-hidróxi-cilindrocarina, por EI a 70eV-----	72
Figura III.11- Espectro de massa para N-cinamoil-20-hidróxi-cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV-----	73
Figura III.12- Cromatograma da fração 3FMPLCC, N-benzoil-cilindrocarina-----	73
Figura III.13- Substância 3FMPLCCa, N-benzoil-cilindrocarina-----	74
Figura III.14- Fragmentação para interpretação do espectro de massas de N-benzoil-cilindrocarina, por EI a 70eV-----	75
Figura III.15- Espectro de massas para N-benzoil-cilindrocarina-----	76
Figura III.16- Cromatograma da fração 2CFa -----	76
Figura III.17- Substância 2CFa, 16- epi-vincamina-----	77
Figura III.18- Fragmentação para interpertação do espectro de massas de 16-epi-vincamina, por EI a 70eV-----	78
Figura III.19- Espectro de massas para 16-epi-vincamina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV-----	79
Figura III.20- Cromatograma da fração 2CFb-----	79
Figura III.21- Substância 2CFb, tetra-hidro-alstonina-----	80
Figura III.22- Fragmentação para interpretação do espectro de massas de tetra-hidro-alstonina, por EI a 70eV-----	81
Figura III.23- Espectro de massas para tetra-hidro-alstonina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV-----	82
Figura III.24- Cromatograma da fração 3CFa, aspidospermina-----	82
Figura III.25-Substância 3CFa, aspidospermina-----	83
Figura III.26- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de aspidospermina, por EI a 70eV-----	84
Figura III.27- Espectro de massas para aspidospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV -----	85
Figura III.28- Variação da concentração de (1) N-benzoil-cilindrocarina (t _r =23,57 min) e (2) N-cinamoil-20-hidróxi-cilindrocarina (t _r = 25,22 min), durante o processo de germinação <i>in vitro</i> - de	86

sementes de <i>A. cylindrocarpon</i> determinado por CLAE, (a) cromatograma das folhas de plantas adultas, (b) cromatograma das sementes, (c) quarta semana de germinação <i>in vitro</i> , (d) oitava semana de germinação <i>in vitro</i> -----	
Figura III.29- Estruturas químicas dos constituintes presente no óleo volátil de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	89
Figura IV.1- Sementes de <i>A. cylindrocarpon</i> (Lorenzi, 1992)-----	98
Figura IV.2- Esquema de preparo das sementes de <i>A. cylindrocarpon</i> para germinação-----	99
Figura IV.3- Sementes de <i>A. polyneuron</i> (Lorenzi, 1992)-----	100
Figura IV.4- Esquema de preparo das sementes de <i>A. polyneuron</i> para germinação-----	101
Figura IV.5- Erlenmeyer adaptado, utilizado na obtenção da curva de crescimento das células de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	106
Figura IV.6- Germinação <i>in vitro</i> de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	111
Figura IV.7- Germinação <i>in vitro</i> de <i>A. polyneuron</i> -----	112
Figura IV.8- Calos de <i>A. cylindrocarpon</i> no meio ML11-----	113
Figura IV.9- Calos de <i>A. polyneuron</i> no meio ML3-----	113
Figura IV.10- Suspensão celular de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	116
Figura IV.11- Células da suspensão celular de <i>A. cylindrocarpon</i> com aumento de 400 vezes----	117
Figura IV.12- Curva de crescimento das células de <i>A. cylindrocarpon</i> . Cada resultado representa à $\bar{X} \pm e.p$ de 3 experimentos-----	118
Figura IV.13- Composição dos alcalóides produzidos por <i>A. cylindrocarpon</i> (1) $t_r = 25,22$ min corresponde a <i>N</i> -benzoil-cilindrocarina e (2) <i>N</i> -cinamoil-20-hidróxi-cilindrocarina (a) cromatograma das folhas da planta adulta (b) células da suspensão (c) meio de cultura das suspensões-----	120
Figura V.1- Esquema ilustrativo das mutações sofridas pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizado no bioensaio-----	129

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1- Importantes efeitos farmacológicos de alcalóides -----	5
Tabela II.1- Eluentes usados nas diversas cromatografias-----	24
Tabela II.2- Rendimentos dos alcalóides extraídos de <i>A. polyneuron</i> -----	27
Tabela II.3- Fracionamento cromatografico dos alcalóides de <i>A. polyneuron</i> -----	28
Tabela II.4- Composição do óleo volátil das folhas de <i>A. polyneuron</i> -----	46
Tabela III.1- Gradiente de eluição usado no MPLC-----	58
Tabela III.2- Gradiente empregado para a análise dos alcalóides extraídos das sementes-----	62
Tabela III.3- Rendimentos dos alcalóides extraídos de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	67
Tabela III.4- Composição química do óleo volátil das folhas de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	88
Tabela IV.1- Metabólitos bioativos produzidos em cultura vegetal <i>in vitro</i> -----	96
Tabela IV.2- Composição dos meios usados para germinação das sementes de <i>A. polyneuron</i> e <i>A. cylindrocarpon</i> -----	101
Tabela IV.3- Composição dos meios usados para indução de calos das seguintes espécies: <i>A. polyneuron</i> e <i>A. cylindrocarpon</i> -----	102
Tabela IV.4- Variação na concentração de Tiamina, ANA, BAP e 2,4D em meios para indução de calos de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	103
Tabela IV.5- Composição dos meios variando alguns reguladores de crescimento-----	103
Tabela IV.6- Variação dos tipos químicos de reguladores de crescimento em meios para indução dos calos <i>A. cylindrocarpon</i> -----	104
Tabela IV.7- Gradiente empregado para a análise dos alcalóides extraído das células da suspensão e do meio de cultura de <i>A. cylindrocarpon</i> analisados por CLAE-----	107
Tabela IV.8- Efeito da composição do meio sobre a germinação de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	110
Tabela IV.9- Efeito da composição do meio sobre a germinação de <i>Aspidosperma polyneuron</i> ----	110
Tabela IV.10- Efeito de reguladores de crescimento na indução de calos de <i>A. cylindrocarpon</i> ----	112
Tabela IV.11- Efeito de reguladores de crescimento na indução de calos de <i>Aspidosperma polyneuron</i> -----	113
Tabela V.1- Avaliação da atividade antitumoral dos alcalóides com cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na presença dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	133
Tabela V.2- Atividade antifúngica dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	134
Tabela V.3- Atividade antibacteriana dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> e <i>A. polyneuron</i> . Os experimentos foram realizados (n=3)-----	135
Tabela V.4- Bioensaio antimalárico realizado com a cepa Palo Alto na presença dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> -----	136
Tabela V.5- Bioensaio antimalárico realizado com a cepa K1 na presença dos alcalóides de <i>A. Cylindrocarpon</i>	137

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema II.1- Metodologia de extração dos alcalóides de <i>A. polyneuron</i> —————	22
Esquema II.2- Procedimento de isolamento da fração de alcalóides de <i>A. polyneuron</i> —————	23
Esquema III.1- Metodologia de extração dos alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> Muell. Arg—————	56
Esquema III.2- Fracionamento da fração de alcalóides de <i>A. cylindrocarpon</i> —————	60
Esquema III.3- Procedimento de extração dos alcalóides das plântulas <i>in vitro</i> e sementes de <i>A. cylindrocarpon</i> —————	63
Esquema IV.1- Esquema de extração dos alcalóides das células das suspensões e do meio cultura de <i>A. cylindrocarpon</i> —————	108

Lista de abreviaturas e símbolos

λ	comprimento de onda
μg	micrograma
μL	microlitros
2,4-D	ácido diclorofenóxi-acético
AG_3	ácido giberelínico
BAP	6-benzil-amino-purino
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CF	coluna filtrante
CG	cromatógrafo a gás
CG/EM	cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CH_2Cl_2	diclorometano
CI_{50}	Concentração inibitória de 50%
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
EI	impacto eletrônico
G	Gamborg
H	horas
H_3PO_4	ácido fosfórico
m/m	razão massa-massa
m/z	razão massa-carga
min	minutos
mL	mililitros
MPLC	cromatografia líquida de média pressão
MS	Murashige & Skoog
Na_2SO_4	sulfato de sódio anidro
NAA	ácido naftaleno-acético
NH_4OH	hidróxido de amônia
Picloram	ácido- 4-amino- 3,5,6- tricloro-picolínico
R_f	fator de retenção
rpm	rotação por minutos
tr	tempo de retenção

UV	ultra-violeta
v/m	relação volume-massa
v/v	relação volume-volume

RESUMO

As espécies *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. pertencentes à família Apocynaceae, de ocorrência natural no estado de São Paulo, foram objeto de investigação química e estabelecimento de culturas *in vitro*.

Como não havia relatos da composição dos alcalóides presentes nas folhas de ambas as espécies, nossos estudos foram concentrados nessa parte do vegetal. Adicionalmente, foi analisado a composição dos óleos voláteis destas espécies. Como são descritas diversas atividades biológicas para os alcalóides indólicos, foram analisados as atividades antitumoral, antimicrobiana e antimalárica dos extratos de alcalóides totais.

Os alcalóides das folhas de *A. polyneuron* foram obtidos através de partição ácido-base com solventes orgânicos e foram isolados por técnicas cromatográficas de adsorção, sendo analisadas por CG/MS. Na espécie *A. polyneuron* foram identificados 5 alcalóides indólicos do tipo aspidospermatano: aspidospermina, desmetil-aspidospermina, desmetóxi-aspidospermina, cilindrocarina e pirifolidina.

O estudo químico das folhas de *A. cylindrocarpon*, através de técnicas cromatográficas e CG/MS permitiu a identificação de alcalóides indólico do tipo aspidospermatano (aspidospermina, *N*-benzoíl-cilindrocarina, *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina) do tipo erbunano (16-*epi*-vincamina) e do tipo hetero-ioimbano (tetra-hidro-alstonina).

Os óleos voláteis foram obtidos das folhas por destilação por arraste a vapor. O óleo de *A. polyneuron* apresentou um constituinte majoritário, o diterpeno caureno (73,7%), e aldeídos de cadeia longa. No óleo volátil das folhas de *A. cylindrocarpon* foram identificados 25 constituintes que correspondem a 96,1% do óleo bruto. Principalmente sesquiterpenos hidrocarbonados (germacreno-D, β -cariofileno) e sesquiterpenos oxigenados (espatulenol, *epi*-globulol e globulol),

além de monoterpenos hidrocarbonados (α -pineno) e oxigenado (linalol) e aldeídos de cadeia longa.

Na cultura de células *in vitro* de *A. polyneuron*, foi possível apenas a indução de calos friáveis.

A cultura de células da *A. cylindrocarpon* foi estabelecida desde as células não diferenciadas. Dos calos até as suspensões celulares. As culturas apresentam fase *lag* com aproximadamente 4 dias, seguida de uma fase de crescimento exponencial e de uma fase com crescimento linear, com duração de 15 dias. Após essa fase as células entram numa fase estacionária de crescimento.

Nos ensaios de autobiografia para determinação da atividade antifúngica frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, ambos extratos de alcalóides totais apresentaram respostas positivas.

A atividade antimalárica foi avaliada em cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em sistema de reparo do DNA (RS321, Rad 52Y). Neste ensaio, apenas os alcalóides das folhas de *A. cylindrocarpon* apresentaram atividade.

A atividade antitumoral foi determinada *in vitro* com isolados de *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (K1) e resistentes (Palo Alto). Como havia relato dessa atividade para *A. polyneuron* foram feitos testes apenas para *A. cylindrocarpon* (folhas e ramos). Os extratos alcaloídicos apresentaram uma forte inibição do desenvolvimento dos parasitos. A CI_{50} para o isolado K1 foi de 9,0 μ g/mL para os ramos e folhas 8,0 μ g/mL e para o isolado Palo Alto, ramos foi de 13,3 μ g/mL e folhas 10,5 μ g/mL.

ABSTRACT

Aspidosperma polyneuron Muell. Arg. and *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. belong to Apocynaceae and naturally occur in São Paulo State (Brazil). Both species were chemically investigated and *in vitro* cultures established.

As there were no previous studies concerning the alkaloid composition from the leaves, our studies were focused on this plant part. Moreover, the volatile oil composition was determined for both species. As several biological activities have been described for indole alkaloids, the antimicrobial, antitumor and antimalarial activities were assayed for the total alkaloids.

The leaf alkaloids were extracted by acid/base partitioning with organic solvents and isolated by adsorption chromatography techniques. The isolated alkaloids were analysed by GC-MS.

A. polyneuron leaves afforded 5 aspidospermatane alkaloids: aspidospermine, demethoxy-aspidospermine, demethylaspidospermine, cylindrocarine and pyrrolidine.

In *A. cylindrocarpon* leaves different indole alkaloid skeletons were identified, 4 aspidospermatanes (aspidospermine, *N*-benzoyl-cylindrocarine, *N*-benzoyl-20-hydroxy-cylindrocarine, *N*-cynamoyl-20-hydroxy-cylindrocarine), 1 eburnane (16-*epi*-vincamine) and 1 heteroyohimbane (tetrahydroalstonine).

The volatile oils were extracted from the leaves by steam distillation. *A. polyneuron* oil consisted of one single major compound, the diterpene kaurene (73,7%), and several long chain aldehydes. On the other hand, from the *A. cylindrocarpon* oil 25 constituents could be identified corresponding to 96.1% of the crude oil. The major components were sesquiterpene hydrocarbons (germacreno-D, β -caryophyllene), oxygenated sesquiterpenes (spathulenol, *epi*-globulol, globulol), a monoterpene hydrocarbon (α -pinene), an oxygenated monoterpene (linalool) and also several long chain aldehydes.

For *A. polyneuron*, callus cultures were induced, while for *A. cylindrocarpon* was also possible the establishment of cell suspension cultures.

A. cylindrocarpon cell suspension cultures showed a lag phase of growth for approximately 4 days. The lag phase was followed by a growth phase for 15 days. After 20 days of culture the cells showed a stationary growth.

Alkaloid extract from both species showed a antifungal activity in the bioautography assay with *Clasdosporium cladosporiodes* and *C. sphaerospermum*.

The antitumor activity was evaluated with mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the DNA repair system (RS321 and Rad 52Y). In this assay, only the leaf alkaloids of *A. cylindrocarpon* presented activity.

In vitro antimalarial assay were performed with *Plasmodium falciparum* chloroquine sensitive (K1) and resistant (Palo Alto). As such an activity was previously reported for *A. polyneuron*, only *A. cylindrocarpon* alkaloid extracts from leaves and stems were tested. Both alkaloid extracts showed strong inhibition of the parasite development. The IC₅₀ for the K1 isolate were 9.0 µg/mL for the leaves and 8,0 µg/ml for the stems. The Palo Alto isolated presented a higher IC₅₀, 13,3 µg/mL stems and 10,5 µg/mL.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Metabolismo vegetal.

As plantas produzem uma vasta quantidade de substâncias químicas, sendo que parte delas são fundamentais para a manutenção do metabolismo celular. Os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros fazem parte desse grupo de compostos essenciais, cuja síntese compõe o metabolismo primário dos vegetais. O metabolismo primário refere-se a todos os processos bioquímicos envolvendo reações, designadas como anabólicas ou catabólicas, que resultam nos processos de assimilação, respiração, transporte e diferenciação.

Já os compostos originados de vias metabólicas não comprometidas com os processos de manutenção celular fazem parte do chamado metabolismo secundário e, portanto, são denominados metabólitos secundários.

Segundo Wink (1990), metabólitos secundários são produtos diferenciados, de distribuição restrita a certos grupos taxonômicos e menos essenciais (ou não essenciais) para o crescimento e conservação da vida das espécies vegetais. Estes produtos possuem um elevado valor agregado, sendo utilizados pela humanidade como inseticidas, pigmentos, perfumes e substâncias bioativas.

A separação dessas duas vias metabólicas é complexa e a classificação em metabólitos primários e secundários depende muito da importância de determinada substância para uma determinada espécie, assim como do estágio de desenvolvimento em que esta se encontra.

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produto de excreção do metabolismo vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, com propriedades biológicas interessantes. Entretanto, atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do organismo produtor ao seu ambiente. De fato, já foram reconhecidas as funções de várias substâncias pertencentes a esta classe

de metabólitos, por exemplo, defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e função de sinalização hormonal nas plantas (Wink, 1990; Rhodes, 1994).

De acordo com Mann (1987), há três pontos principais de origem e produção de compostos secundários, diferenciados mediante seus precursores:

- Ácido chiquímico, como precursor de inúmeros compostos aromáticos;
- Aminoácidos, fonte de alcalóides e peptídios;
- Acetil-CoA, que através de duas rotas biossintéticas origina compostos, como poliacetilenos, terpenos, esteróides e outros.

A via do ácido chiquímico é uma das maiores rotas biossintéticas em plantas superiores e engloba a formação dos três aminoácidos aromáticos mais importantes: fenilalanina, tirosina e triptofano (Verpoorte *et al.*, 1997). Estes aminoácidos são precursores de uma das principais classes de metabólitos secundários, conhecidos como alcalóides (Figura I.1) (Verpoorte *et al.*, 1997). Segundo Henriques *et al.*, (2000) os alcalóides são substâncias nitrogenadas farmacologicamente ativas, ocorrendo predominantemente nas angiospermas.

Segundo Pelletier *et al.*, (1983), alcalóides são substâncias orgânicas cíclicas contendo pelo menos um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Os alcalóides subdividem segundo a estrutura química do núcleo heterocíclico contendo o nitrogênio, podendo-se destacar os alcalóides indólicos, imidazólicos, isoquinolínicos, quinolínicos, tropânicos, piridínicos e piperidínicos (Robbers *et al.*, 1997) (Figura I.2).

Figura I.1- Esquema da origem metabólica dos principais metabólitos secundários aromáticos. CM (corismato mutase), ICS(isocorismato sintase) e AS (antranilato sintase).

Figura I.2- Núcleos heterocíclicos das principais classes de alcalóides.

Os alcalóides constituem um dos mais importantes grupos de metabólitos secundários, apresentando importantes atividades biológicas. Aproximadamente 30 deles são usados na medicina, com amplo conjunto de efeitos farmacológicos (Tabela I.1; Van Beek, 1984).

Tabela I.1- Importantes efeitos farmacológicos de alcalóides (Van Beek, 1984).

Efeito farmacológico	Alcalóides
Antiarrítmico	Quinidina, ajmalina
Antibacteriano	Berberina
Anticancerígeno	Vinblastina, vincristina,
Antiinflamatório	Colchicina
Antimalárico	Quinina
Antitussígeno	Glaucina , noscapina
Atua no SNA	Pilocarpina, atropina, hiosciamina, efedrina
Atua no SNC	Reserpina, cafeína
Hipnoanalgésico	Morfina, codeína
Hipotensivo	Reserpina, rescinamina e protoveratrin
Anestésico local	Cocaína
Relaxante muscular	Tubocurarina, papaverina, teofilina
Vasodilatador	Vincamina

I.2 Alcalóides Indólicos.

A importante classe dos alcalóides indólicos conta com mais de 4000 substâncias conhecidas. A maior subclasse dentro dos alcalóides indólicos é dos indolo-terpênicos, abrangendo cerca de 3000 substâncias conhecidas. Os compostos destas subclasses são derivados da condensação de uma molécula de triptamina com o seco-iridóide secologanina, dando origem ao precursor universal de todas as subclasses, a strictosidina (Facchini, 2001). Apesar de quase todos os membros do grupo serem derivados desses dois compostos, diversos rearranjos resultam em uma enorme variedade estrutural, com grande número de centros assimétricos.

Os alcalóides indólicos podem ser classificados de acordo com as características dos rearranjos do seu esqueleto monoterpênico, que estão relacionadas à sua biogênese. Estes rearranjos dão origem a quatro tipos principais de esqueletos denominados aspido-spermatano, corinanteano, estricnano e ibogano (Figura I.3). Estas denominações são derivadas das plantas de onde foram isolados pela primeira vez (Cordell, 1974; Dewick, 1997).

Figura I.3- Exemplos de diferentes estruturas de alcalóides monoterpênicos.

I.3 Gênero *Aspidosperma*

Um dos gêneros muito estudados durante as décadas de 60 e 70 foi o *Aspidosperma* pertencente à família Apocynaceae, subfamília Rauvolfioideae, tribo Alstonieae (Figura I.4; Endress & Bruyns, 2000). As 52 espécies desse gênero foram organizadas em 9 diferentes séries, de acordo com suas características florais. Essas espécies têm distribuição Neotropical, estando presente desde o Sul do México até a Argentina, abrangendo a região sudeste do Brasil e a Amazônia. Na região sudeste do País, o gênero *Aspidosperma* é representado pelas espécies: *A. album*, *A. compactinervium*, *A. cylindrocarpon*, *A. discolor*, *A. illustre*, *A. parvifolium*, *A. polyneuron*, *A. ramiflorum*, *A. spruceanum*, *A. tomentosum* (Corrêa, 1974; Allorge, 1980).

Este gênero tem despertado a atenção de inúmeros pesquisadores devido à presença de diferentes grupos de substâncias bioativas, dentre as quais destacam-se os alcalóides (Gilbert *et al.*, 1964; Figura I.5). Os alcalóides indólicos de *A. marcgravianum* e de *A. quebracho-blanco* apresentaram atividade antimicrobiana e analgésica respectivamente (Verpoorte, *et al.*, 1983; Benoit *et al.*, 1989). Foram descritas, ainda, ações tônica, febrífuga e antiasmática para outras espécies do gênero (Floriani, 1937).

<u>Família</u>	<u>Subfamília</u>	<u>Tribo</u>	<u>Gênero</u>
Apocynaceae	Rauvolfioideae	Alstonieae	<i>Alstonia</i>
	Apocynoideae	Vinceae	<i>Aspidosperma</i>
	Periplocoideae	Willughbeae	<i>Geissospermum</i>
	Secamonoideae	Tabemamontaneae	<i>Haplophyton</i>
	Asclepiadoideae	Melodineae	<i>Laxoplumeria</i>
		Hunterieae	<i>Microplumeria</i>
		Plumerieae	<i>Strempeliopsis</i>
		Carrisseae	<i>Tonduzia</i>
		Alyxieae	<i>Vallesia</i>

Figura I.4- Posição botânica do gênero *Aspidosperma* dentro da família Apocynaceae (Endress & Bruyns, 2000).

Orolifuanina A

A. excelsum

Metóxi-tubotaina

A. excelsum

Compactinervina

A. excelsum

Razinilam

A. quebracho-blanco

Acetil-aquamidina

A. quebracho blanco

Ramiflorina A

A. ramiflorum

Beninina

Aspidosperma sp

Vandricina

Aspidosperma sp

Figura I.5 - Estruturas de alcalóides indólicos isolados de diferentes espécies de *Aspidosperma*.

I.4 Cultura de células vegetais.

Quando surgiram hipóteses sobre a importância ecológica e evolutiva dos metabólitos secundários vegetais durante as décadas de 60 e 70, a compreensão da bioquímica e biologia molecular era ainda limitada. Este cenário mudou drasticamente nos últimos anos devido, principalmente, a muitos estudos relacionados à regulação da biossíntese de metabólitos secundários, principalmente os efetuados em culturas de células (Matsuki, 1996).

Inicialmente, por volta dos anos 30, as culturas de células vegetais foram desenvolvidas para demonstrar a longevidade das células meristemáticas de algumas plantas através da subcultura de calos. Após aproximadamente 25 anos, eram empregadas na desdiferenciação celular a partir de um explante de tecido vegetal gerando formação de calos, com subsequente rediferenciação das células a partir dos calos (Constabel & Vasil, 1987). Na década de oitenta, surgiram os primeiros relatos de identificação de metabólitos secundários em espécies vegetais cultivadas tanto na forma de calos como em suspensões celulares. Desta época, podem ser citadas a produção de sanguinarina em *Papaver somniferum* (Eilert *et al.*, 1985), berberina em *Coptis japonica* (Fukui *et al.*, 1982), ginsenosídeo em *Panax ginseng* (Furuya *et al.*, 1983a e 1983b), chiconina em *Lithospermum erythrorhizon* (Tabata *et al.*, 1987), catarantina em *Catharanthus roseus* (Smith *et al.*, 1987), aspidochibina em *Aspidosperma quebracho-blanco* (Obitz *et al.*, 1986) dentre outros estudos. As suspensões celulares e a cultura de calos passaram, então, a constituir uma nova fonte de produção destes metabólitos.

No entanto, vários autores observaram que pode haver diferenças entre a produção de metabólitos secundários em culturas de células e nas plantas adultas diferenciadas da mesma espécie (Brown *et al.*, 1990; DiCosmo & Towers, 1984). Estas diferenças estão relacionadas às condições ambientais do cultivo de células e à composição do meio de cultura. As culturas de células tanto podem sintetizar

os metabólitos em concentrações muito baixas como podem até deixar de produzi-los. Além disso, a produção de metabólitos secundários pode, também, ser bastante comprometida em células morfológicamente não diferenciadas (calos, suspensões celulares e células meristemáticas), pois sua síntese depende de enzimas específicas as quais, por sua vez, podem ser reguladas pelo desenvolvimento do vegetal ou presença de tecidos específicos (Sierra, 1991).

No entanto, inúmeros trabalhos têm sido realizados nesta área e, de acordo com Zenk (1991), as culturas de células tornaram-se uma ferramenta indispensável e central para o estudo da biossíntese de metabólitos secundários. Como exemplos interessantes do uso de cultura de células nesse tipo de pesquisa temos o estudo da reação enzimática de codeinona à codeína (Lenz & Zenk, 1995), a biossíntese de terpenóides em culturas de células de *Catharanthus roseus* (Arigoni *et al.*, 1997), a biossíntese de paclitaxel em culturas de células de *Taxus chinensis* (Eisenreich *et al.*, 1996) e de outros taxóides desta mesma espécie (Menhard *et al.*, 1998).

Como contra-ponto, existem desvantagens que incluem o esforço contínuo de se manter estes sistemas celulares através da realização freqüente de sub-cultura, os custos de manutenção e os problemas causados pela instabilidade genética, os quais determinam a alteração das células afetando seu comportamento e, conseqüentemente, a produção de determinado metabólito secundário (Charlwood & Moustou, 1988). Existem poucos exemplos de produção econômica de substâncias naturais por essa técnica, cujo emprego constitui ainda um desafio.

I.5 Objetivos

Tendo em vista a importância dos alcalóides indólicos, o presente trabalho teve como objetivos isolar e identificar a estrutura dos principais alcalóides presentes nas espécies *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. e *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg., além do estudo da composição química do óleo volátil das folhas dessas espécies.

Adicionalmente, pretendia-se estabelecer culturas celulares com o intuito de induzir a produção *in vitro* dos alcalóides de forma a comparar a capacidade biossintética da planta adulta com aquela exibida pelas culturas celulares.

Devido à reconhecida atividade biológica dos alcalóides indólicos, realizaram-se ensaios com os extratos obtidos das folhas, para verificar sua eventual ação: antitumoral, antifúngica e antimalárica.

I.6 Referências bibliográficas

- ALLORGE, L. Considerations sur la systématique des Apocynaceae. *In* Morfologie et chimiotaxonomie des Apocynaceae: Conclusions phylogénétiques et biogéographiques. (Allorges, L., Husson, H. P., Saatres, C., eds.), C.r. somm. Séanc. Soc. Biogéogr, v. 57, p. 112-26, 1980.
- ARIGONI, D., SAGNER, S., LATZEL, C., EISENREICH, W., BACHER, A., ZENK, M. H. Terpenoids biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, p.10600-10605, 1997.
- BENOIT, P. S., ANGRY, R. L., LYON, R. L., FONG, H. H. S., FARNSWORTH, N. R. Biological and Phytochemical Evaluation of Plants XIII: Preliminary Estimation of Analgesic Activity of Rhazinilam, a Novel Alkaloids Isolated from *Aspidosperma quebracho-blanco* Leaves. *Planta Med.*, v. 62. p. 833, 1989.
- BROWN, G., EDE, R. M., SIMOLA, L. K., LEMMETYINEN, J. Lignins released from *Picea abies* suspension cultures-true native spruce lignin. *Phytochemistry.*, v. 29, p. 2535-2538, 1990.
- CHARLWOOD, B.V. & MOUSTOU, C. Essential oil accumulation in shoot-proliferation cultures of *Perlagonium* spp. *In* : ROBINS, R. J., RHODES, M. J. C., (ed.). *Manipulating secondary metabolism in culture*. Cambridge University. p. 187-194, 1988.
- CONSTABEL, F & VASIL, I. K. Cell culture in phytochemistry. Volume. 4 *In*: VASIL, IK (ed in chief) *Cell Cultrure and Somatic Cell Genetics of plants*. Academic Press, 1987.
- CORDELL, G. A. The biosynthesis of indole alkaloids. *Lloydia.*, v. 37, p. 219-298, 1974.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, v. 5. p. 448-461, 1974.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. New York: Jonh Wiley & Songs Ltda, 466 p, 1997.
- DISCOSMO, F & TOWERS, G. N. H. Stress and secondary metabolism in cultured plant cell, *Recent. Adv. Phytochem.*, v. 18, p. 97-175, 1984.

- EILERT, U., KURZ, W. G. W., CONSTABEL, F. Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J. Plant. Physiol.*, v. 76, p. 65, 1985.
- ENDRESS, M. E. & BRUYNS, P. V. A revised Classification of the Apocynaceae. I. *The Botan. Rev.*, v. 66, p. 1-56, 2000.
- EISENREICH, W., MENHARD, B., HYLANDS, P. J., ZENK, M. H., BACHER, A. Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 6431-6436, 1991.
- FACCHINI, P. J. Alkaloids Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Plant. Mol. Biol.*, v. 52, p. 29-66, 2001.
- FERREIRA-MARCONDES, W. Novas taxa para o gênero *Aspidosperma* Mart. Nom. cons. (Apocyanaceae). *Rev. Bras. Bot.*, v.14. p. 127-132, 1991.
- FLORIANI, L. Composicion química y acción terapéutica del Quebracho Blanco y del Palo rosa (*Aspidosperma*). *Rev. Farmac. (Buenos Aires)*, p. 135-141, 1937.
- FUKUI, H., NAKAGAWA, K., TSUDA, S., TABATA, M. Production of isoquinoline alkaloids by cell suspension cultures of *Coptis japonica*. In plant Tissue and Cell Culture (A. Fujiwara, ed. Maruzen Co., Tokyo), p. 313-314, 1982.
- FURUYA, T., YOSHYKAWA, T., ISHII, T., KAJII, K. Studies on plant tissue cultures. 38. Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Planta Med.*, v. 47, p. 200-204, 1983a.
- FURUYA, T., YOSHYKAWA, T., ISHI, T., KAJII, K. Studies on plant tissue cultures. 38. Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Planta Med.*, v. 48, p. 83-87, 1983b.
- GILBERT, B., NAKAGAWA, D. Y., JOUTE, J. A., FLORES, S. E., BRISSELESE, J. A., CAMPELLO, J., CARRAZZONI, E. P., OWELLEN, R. J., BLOSSEY, E. C., BROWN JR., K. S., DJERASSI, C. The Alkaloids of Twelve *Aspidosperma* species. *Tetrahedron.*, v. 21. p. 1141-1146, 1964.
- HENRIQUES, A. T., KERBER, V. A., MORENO, P. R. H., Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. O., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ ed. da UFSC, p. 641-646, 2000.

- LENZ, R. & ZENK, M. H. Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur. J. Biochem.*, v. 233, p. 132-139, 1995.
- MANN, J. *Secondary metabolism*. 2ed. Oxford: Claredon, 1987.
- MATSUKI, M. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Aust. J. Bot.*, v. 44, p. 613-634, 1996.
- MENHARD, B., EISENREICH, W., HYLANDS, P. J. BACHER, A., ZENK, M. H. Taxoids from cell cultures of *Taxus chinensis*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 113-125, 1998.
- PELLETIER, S. W. ed. *Alkaloids*, vols I-6. New York, Jonh Wiley & Sons, Inc., 1983-1988; V. 7-8 New York, Springer-Verlag New York Inc., 1991-1992.
- OBITZ, P., STÖCKIGT, J., MENDONZA, L. A., AIMI, N., SAKAI, S. I. Alkaloids from cell cultures of *Aspidosperma quebracho-blanco* In: PELLETIER, S. W. *Alkaloids chemical and biological perspectives* v.9, p.236-246, 1983.
- ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 372 p, 1997.
- RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. *Plant. Mol. Biol.*, v.24, p. 1-20, 1994.
- SIERRA, M.I. *Aspects of indole alkaloids accumulation in Tabernaemontana tissue cultures: differentiation, peroxidases and stability*. Leiden, 132p, 1991. (tese de doutorado- Leiden Univesity).
- SMITH, J. I., SMART, N. J., MISAWA, M., KURZ, W. G. W., TALLEVISI, S.G., DISCOMO, F. Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulfate. *Plant. Cell. Rep.*, v. 26, n.2, p. 29-33, 1987.
- TABATA, M., OGINO, F., YOSHIOKA, K., YOSHIKAWA, N., HIRAOKA, N. Selection of cell lines with higher yield of secondary products, 1978. In *Frontiers of Plant Tissue Culture* (T. A. Thorpe, ed), University of Calgary, Calgary, Alberta. Canada, p. 213-222, 1978.
- VAN BEEK, T. A. *Pharmacognostical studies of some Tabernaemontana species*. Leiden, 161p, 1984. (Tese de Doutorado- Leiden University).

- VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., MORENO, P. R. H., Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. *In: CORDELL, A. G. The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*. San Diego: Academic Press, p. 240-242, 1997
- VERPOORTE, R., KOS-KUYCK, E., TSOI, A.T. A., RUIGROG, C. L. M., JONG, G. De., BARHEIM SVENDSEN, A. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from Surinam. *Planta Med.*, v. 48. p. 283-289, 1983.
- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. *In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (ed). Secondary products from plant tissue culture*. Oxford: Claredon, 1990.
- ZENK, M. H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry.*, v. 30, p. 3861-3863, 1991.

CAPÍTULO II

ESTUDO QUÍMICO DE *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.

II.1 Generalidades

A. polyneuron (Apocynaceae) é conhecida popularmente como peroba-rosa, peroba-amargosa, peroba-paulista e peroba-açu. Esta espécie apresenta uma madeira de coloração amarelo-rosada, uniforme ou com manchas escuras, de superfície lisa, pesada, dura e de grande durabilidade que é muito usada na: construção civil, como vigas, caibros, assoalhos e escadas; em obras externas como postes e dormentes; na confecção de móveis pesados. A espécie é de ocorrência em matas da América do Sul, principalmente no Brasil, desde a Bahia até o Paraná. A casca é amarga, adstringente e febrífuga (Corrêa, 1974; Lorenzi, 1992).

A árvore pode alcançar de 8 a 20 metros de altura, com troncos que atingem mais de 80 cm de diâmetro, exibindo ramos relativamente delgados, glabros e finamente rimosos. As folhas são de oblongas a obovais, elíticas, curtas e abruptamente acuminadas sendo obtusas ou arredondadas em direção ao ápice cujo comprimento de 4 a 12 cm, A inflorescência de coloração grisea é congesta, subterminal e situa-se na axila da penúltima ou da última folha, formando um dicásio relativamente denso, pubérulo de brácteas pequenas e cálice com lobos variando de largamente ovais, a agudos ou arredondados, de folíolos clavado-oblongos que apresentam 3 a 6 cm de comprimento e 1 a 1,5 cm de largura. As sementes são obtusas, com asa basal mais longa do que larga (Corrêa, 1974; Lorenzi, 1992) (Figura II.1 e Figura II.2).

Figura II. 1- Parte do ramos com flores e folhas de *A. polyneuron* Muell. Arg.

Figura II. 2- Hábito de *A. polyneuron* Muell. Arg.

No primeiro estudo com relação à composição química dos alcalóides de *A. polyneuron* foram isolados e identificados nas cascas do vegetal aspidoespermina, aspidoespermicina e aspidoespermamina (Floriani, 1937).

Em estudos posteriores, foram isolados, da mesma parte do vegetal, quebrachamina, palosina, ioimbina (Schumtz & Lehner, 1959), polineurídina e normacusina B (Antonaccio *et al.*, 1962).

As folhas de *A. polyneuron* não haviam sido analisadas. Desta maneira, nosso trabalho teve como objetivo isolar os alcalóides majoritários presentes nas folhas.

II. 2 Material e Métodos

II. 2.1 Equipamentos e materiais utilizados

O material vegetal foi moído em moinho tipo Harley.

Todos os solventes (Vetec e Synth) utilizados nas extrações e para eluições em colunas cromatográficas foram devidamente destilados, segundo procedimentos usuais (Assumpção, 1968). Para as análises cromatográficas por CG (Cromatografia à gás) foi utilizado solvente de grau cromatográfico (Merck).

As placas de CCDP (cromatografia em camada delgada preparativa) foram preparadas utilizando-se sílica gel 60G e/ou 60GF₂₅₄ (5-40 μm), ambas da Merck. As placas cromatográficas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de gel de sílica em água destilada sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador "Quickfit". As espessuras das camadas de gel de sílica foram de 1,0 mm para CCDP. Para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizou-se a espessura de 0,5 mm de sílica gel.

Para as colunas cromatográficas do tipo FLASH e coluna filtrante foi utilizado, como adsorvente, gel de sílica 60 (63- 200 μm) (Merck).

As revelações das placas em camada delgada comparativas e preparativas foram feitas com os reveladores para alcalóides Bouchardat e Dragendorff e/ou irradiação sob luz ultra-violeta (254 e 356 nm).

As análises por cromatografia à gás acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) foram feitas em um aparelho Shimadzu QP5050A, quadrupolar com ionização por impacto eletrônico (IE), a 70eV. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,3 μm de espessura.

II.2.2 Material vegetal

A espécie *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. foi coletada, no período de 1998-1999, de indivíduos previamente identificados no Parque Ecológico de Campinas- UNICAMP/SP.

II.2.3 Extração dos alcalóides e *A. polyneuron*

As folhas e ramos de *A. polyneuron* foram separados, secados e moídos em moinho, obtendo-se dessa forma o material na forma de pó. Depois foram submetidas a extração por percolação com etanol (80°GL) por 4 dias ou mais, até apresentarem teste negativo na presença dos reveladores de alcalóides Dragendorff e Bouchardat (Farnsworth *et al.*, 1962). As soluções alcoólicas foram concentradas à vácuo, a 60°C, até eliminação completa do solvente, originando um extrato etanólico bruto das folhas e ramos. Estes extratos foram então tratados com uma solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 mol/L e filtrados em celite. A solução ácida foi extraída com hexano para eliminar os ácidos graxos. A fase ácida, livre de ácidos graxos, foi em seguida alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado até pH 9 e, subsequente, extraída com diclorometano (CH_2Cl_2), por diversas vezes, até resultado negativo frente aos reagentes de Bouchardat e Dragendorff. A fase em diclorometano foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada em rota-evaporador a 35°C, fornecendo uma fração de alcalóides totais (Esquema II. 1).

Esquema II. 1- Metodologia de extração dos alcalóides de *A. polyneuron*.

II.2.4 Isolamento dos alcalóides de *A. polyneuron*

Os alcalóides totais obtidos das folhas de *A. polyneuron* foram submetidos a cromatografia em coluna do tipo FLASH (coluna de vidro de 110 mm de altura e 20 mm de diâmetro, tendo como adsorvente sílica gel 60. Foi utilizada, também, uma pré-coluna de 47 mm de altura e 20 mm de diâmetro preenchida com a mesma fase estacionária, sob atmosfera de nitrogênio (1atm). A coluna cromatográfica foi eluída, inicialmente, com diclorometano puro, aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente por adição de metanol.

Foram coletadas 25 frações de 50 mL que foram evaporadas sob atmosfera de nitrogênio e analisadas por CCDC por eluição com mistura de solventes S2 (Tabela II.1). Após a análise, as frações foram reunidas e purificadas por CCDP, utilizando-se os sistemas de eluentes descritos na tabela II.1. Foram identificadas, cinco substâncias codificadas como F1APa, F5APa, F5APa', F8a-11AP e F8b-11AP (Esquema II.2).

Esquema II.2- Procedimento de isolamento da fração de alcalóides totais de *A.polyneuron*.

Tabela-II.1- Eluentes usados nas diversas cromatografias.

Códigos dos sistemas de solventes	Eluentes (v/v)
S1	Clorofórmio: metanol (50:50)
S2	clorofórmio: metanol: amônia (80: 19,5; 0,5)
S3	Clorofórmio: metanol (80:20)
S4	clorofórmio: metanol: amônia (84,5: 15; 0,5)

II.2.5 Condições para análise por cromatografia em fase gasosa (CG).

Após fracionamento dos alcalóides de *A. polyneuron* através da coluna Flash. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia à gás para verificação da pureza. Utilizaram as seguintes condições de análise: temperatura do injetor 250⁰C, temperatura do detector 310⁰C, temperatura inicial 100⁰C (2 min), temperatura final 290⁰C (10 min), taxa de aquecimento 10⁰C/min e volume de injeção 3 µL.

II.3- Óleo volátil de *A. polyneuron*.

II.3.1 Obtenção do óleo volátil de folhas *A. polyneuron*.

O óleo volátil das folhas de *A. polyneuron* foi obtido por destilação por arraste a vapor, em processo contínuo em aparelho do tipo Clevenger (F. Bras. IV, 1988), Transcorridos 4 horas esperou-se que fosse atingida a temperatura ambiente e procedeu-se à leitura do volume de óleo obtido. O cálculo de

rendimento foi feito considerando-se o volume de óleo volátil recolhido em relação à massa de material vegetal seco utilizada.

II.3.2 Análise dos componentes do óleo volátil de *A. polyneuron* por CG/EM.

Após obtenção do óleo por hidrodestilação, foi realizada análise dos componentes do óleo volátil de *A. polyneuron*. O óleo volátil de *A. polyneuron* foi analisado por cromatografia em fase gasosa (CG) em um cromatógrafo Shimadzu GC-17A dotado de software Shimadzu GC-10 e equipado com uma coluna DB-5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com sílica fundida (5% de difenil e 95% de dimetilpolissiloxano), e filme de 0,20µm de espessura, com hélio como gás carreador (1mL/min) e detector de ionização de chama. O injetor e o detector foram programados a 180°C e 260°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada entre 60°C e 280°C, com taxa de aquecimento de 5°C/min.

III.3.3 Identificação dos componentes do óleo volátil de *A. polyneuron*.

A identificação das substâncias presentes no óleo essencial foi realizada por comparação dos índices de retenção (determinados relativamente aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos) e dos espectros de massa com aqueles registrados em bases de dados de referência (NIST 62 e NIST 12, National Institute of Standard and Tecnology, Quioto, Japão, onde estão registrados mais de 65.000 compostos; Adams, 1989). Neste experimento, o índice de Kováts é usado para corrigir o tempo de retenção com relação a variações de metodologia e de equipamento, para comparação com banco de dados (Sandra & Bicchi, 1987; Collins *et al.*, 1997).

O índice de retenção foi obtido através da seguinte equação:

$$I = 100z + 100 \frac{(\log t'_{RX} - \log t'_{RZ})}{(\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ})}$$

Onde: z= número de átomos de carbono do padrão anterior com menor massa molecular.

t'_{RX} = tempo de retenção ajustado do composto X, onde que $t'_{RZ} < t'_{RX} < t'_{R(Z+1)}$.

t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$ = tempos de retenção ajustados dos padrões anteriores e posteriores, de alcanos de cadeia normal no cromatograma da série homóloga.

II.4 Resultado e Discussão

II.4.1 Rendimento da extração dos alcalóides de *A. polyneuron*.

Observou-se que a quantidade de alcalóides não variou nas diferentes partes da planta (folhas e ramos). Ambas partes do vegetal apresentaram um rendimento de 0,1% (Tabela II.2).

Tabela II.2- Rendimentos dos alcalóides extraídos de *A. polyneuron*.

Parte usada	<i>A. polyneuron</i>	
	Material seco (g)	Rendimento Massa (g) (%)
Folhas	1000,0	1,0 0,1
Ramos	410,0	0,420 0,1

II.4.2- Dados físicos e espectrométricos dos alcalóides identificados de *A. polyneuron*,

a) Substância F1APa= cilindrocarina.

cristais amarelos, fórmula molecular $C_{21}H_{28}N_2O_3$

m/z (%)= 160,10 (7,62), 168,15 (100), 196,15 (11,72), 282,20 (20,67), 328,25 (6,77), 356,35 (16,48).

b) Substância F5APa= aspidospermina.

cristais amarelos, fórmula molecular $C_{22}H_{30}N_2O_2$

m/z (%)= 57,05 (16,45), 94,00 (2,34), 124,15 (100), 125,15 (9,34), 152,15 (5,91), 152,15 (5,91), 172,25 (2,14), 326,35 (4,21), 354,35 (20,84).

c) Substância F5APa'= desmetil-aspidospermina.

cristais amarelos, fórmula molecular $C_{21}H_{28}N_2O_2$

m/z (%)= 124,05 (100), 125,05 (8,71), 152,15 (4,06), 160,00 (5,08), 174,05 (2,10), 312,15 (13,25), 340,25 (14,09).

d) Substância F8a-11AP= desmetóxi-aspidospermina.

cristais amarelos, fórmula molecular $C_{21}H_{28}N_2O$

m/z (%)= 124,00 (100), 130,05 (4,75), 144,05 (4,31), 152,15 (4,93), 168,10 (2,39), 324,35(9,74).

e) Substância F8b-11AP= pirifolidina.

cristais amarelos, fórmula molecular $C_{23}H_{32}N_2O_3$

m/z (%)= 69,10 (2,58), 124,10 (100), 152,15 (6,06), 168,15 (4,22), 280,20 (3,23), 341,35 (2,48), 356,35 (11,02), 384,30 (16,78).

II.4.3 Caracterização dos alcalóides.

Os alcalóides totais de *A. polyneuron* foram fracionados em coluna Flash, obtendo-se 25 frações reunidas segundo os resultados da análise por CCDC com o eluente S2 (Tabela II.1), como descrito, por exemplo, no esquema II.2. O critério empregado para reunião das frações foi a semelhança na composição das frações e quantidade suficiente de material para análise posterior (Tabela II.3).

Tabela II.3- Fracionamento cromatográfico dos alcalóides de *A. polyneuron*.

Frações reunidas	Códigos das Frações	Massa (mg)
1	F1AP	30,0
2-5	F5AP	25,9
6-7	F6-7AP	50,0
8-11	F8-11AP	100,0
12-18	F12-18AP	250,0
19-25	F19-25AP	200,0

A primeira fração coletada da coluna FLASH foi purificada por CCDP por eluição com a mistura de solventes S3 (Tabela II.1) fornecendo uma substância codificada como F1AP (30mg). Após CCDP da fração F1AP foi possível isolar um material codificado como F1APa, o qual foi analisado por CG/EM.

O cromatograma da fração F1APa apresentou vários picos, dos quais foi possível identificar apenas o de $t_r=25,55$ min (Figura II.3).

Figura II.3- Cromatograma da fração F1APa.

Observou-se no espectro de massas desse composto fragmentos característicos para núcleo indólico do tipo aspidospermatano (Figura II.6), pois estavam presentes três picos importantes para essa caracterização. O primeiro, pode ser atribuído à perda do substituinte em C5 juntamente com um átomo de hidrogênio, transferido de C19 levando a formação de um fragmento de m/z 328 (7%) originado por perda de uma molécula de acetato de etila (M-74), o segundo via rearranjo do tipo McLafferty é o pico-base de $m/z=168$, atribuível à perda de um cátion radical piperidínico. Outro fragmento observado foi o de $m/z=196$ (6,31%) originado por um mecanismo alternativo àquele que origina o pico-base $m/z=168$ em alcalóides do tipo aspidospermatano (Biemann, 1962; Milborrow & Djerassi, 1969; Hesse, 1974; Cordell, 1989).

Através da comparação com dados de literatura e dos mecanismos para as fragmentações foi possível identificar esse alcalóide como cilindrocarina (Figura II. 4, II.5, II.6).

Figura II.4- Substância F1APa, cilindrocarina.

Figura II.5- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de cilindrocarina, por EI a 70eV.

Figura II.6- Espectro de massas para cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, EI a 70eV.

O material resultante da reunião das frações F2-F5 (25,9 mg) obtidas da coluna Flash foi submetido a recromatografia como o eluente S1 (Tabela II.1). Foram obtidas duas frações que foram analisadas por CCDC, utilizando-se esse mesmo eluente S1 (Tabela II.1). A observação da placa cromatográfica destas frações observadas sob luz UV mostrou a presença de duas manchas de coloração amarelo-clara e levou à obtenção de duas frações codificadas como F5APa e F5APb (12 mg cada). A Fração F5APb não pôde ser caracterizada por CG/EM.

A fração F5APa foi analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo identificadas duas substâncias majoritárias F5APa e F5APa'.

O cromatograma dessa fração apresenta dois picos majoritários de tempos de retenção dos quais, o de $t_r=24,20$ min, pôde ser atribuído à aspidospermina (Figura II.8), por análise dos espectros de massas obtido por EI, a 70eV (Figuras II. 9 e II.10), por enquanto o de $t_r=25,27$ min foi caracterizado como sendo devido à desmetil-aspidospermina (Figura II.12).

Figura II.7- Cromatograma da fração F5APa e F5APa'.

A substância com $t_r=24,20$ min (Figura II.7) também apresentou fragmentações características do núcleo aspidospermatano ($m/z=124, 152$; Figura II.10). A perda de etileno ($M-28$; $m/z=326$) é característica de núcleos não-oxygenados na posição 21 e é devida à aromatização do anel B e à eliminação de uma molécula neutra de etileno (Budzikiewicz *et al.*, 1964; Schmutz & Lehner 1959; Antonaccio *et al.*, 1962). Em substâncias que apresentam esse tipo de esqueleto, a ionização acontece predominantemente no nitrogênio alicídico, o qual é estabilizado pela clivagem α das ligações C12-C19 e C2-C3, conduzindo a um radical de carbono secundário que pode se estabilizar pela perda de etileno, esse processo gera, um radical localizado em um carbono terciário, detectando-se o cátion radical de $m/z=326$ (Figura II.9)

Este íon-radical é estabilizado pela perda de um radical indol-metila gerando um cátion piperidínico, de $m/z=124$, que é o pico-base. Uma outra alternativa de fragmentação após a cisão da ligação C12-C19 dá origem ao fragmento de $m/z 152$ (6%).

A comparação com os dados de literatura indicou-nos a presença de um grupo acetila ligado ao átomo de nitrogênio (Biemann *et al.*, 1961; Biemann *et al.*, 1963; Hesse, 1974; Pinar *et al.*, 1962) e levou-nos à identificação desta substância como aspidospermina (Figura II.8).

As fragmentações características observadas no espectro de massas da substância F5APa encontram-se nas Figuras II.9 e II.10.

Figura II.8 Substância F5APa, aspidospermina.

Figura II.9- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de aspidofermina, por EI a 70eV.

Figura II.10- Espectro de massas para aspidoaspermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, EI a 70eV.

O espectro de massas da substância de $t_r=25,27$ min também apresentou fragmentações características do núcleo aspidoaspermato ($m/z=124, 152$) e ($M-28$; Figura II.12). Verificou-se que o padrão de fragmentação observado nessa molécula é similar ao descrito para a aspidoaspermina, com a ionização preferencial da molécula no nitrogênio alicíclico e estabilização da carga, dando origem ao fragmento de $m/z=312$ (6%) por perda de etileno ($M-28$). (Figura II.12). O íon radical formado é estabilizado pela perda de um radical indol-metila restando o cátion-radical piperidínico de $m/z 124$ como pico-base. Um mecanismo alternativo de fragmentação após cisão da ligação C12-C19 dá origem ao fragmento de $m/z=152$ (4%) (Figura II.12). O fato do padrão de fragmentação observado para a molécula ser similar ao exibido pela substância F5APa da diferença de massa entre as duas moléculas ser de apenas 15 unidades, juntamente com os dados da literatura permite atribuir a esta substância a

estrutura desmetil-aspidospermina (Hesse, 1974; Budzikiewicz *et. al.*, 1964)
(Figura II.11).

Figura II.11- Substância F5APa', desmetil-aspidospermina.

Figura II.12- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de desmetil-aspidospermina, por EI a 70eV.

Figura II.13- Espectro de massas para desmetil-aspidospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

A fração de F8-11AP (100 mg), analisada por CCDC utilizando-se como eluente S3 (Tabela II.1), revelou a presença de duas manchas, quando as placas eram observadas sob luz UV. Essa fração, foi purificada por CCDP, empregou-se o sistema eluente S4 (Tabela II.1), obtendo-se duas frações codificadas como F8a-11AP (20 mg) e F8b-11AP (15 mg). Estas frações foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas permitindo a identificação de dois alcalóides.

O cromatograma obtido para a fração F8a-11AP (Figura II.14) apresenta alguns picos dos quais, o de $t_r=23,35$ min, corresponde à substância desmetóxi-aspidospermina (Figura II.15), como indica a análise do espectrograma no qual observa-se o íon molecular de m/z 324, (Figura II.17).

Figura II.14- Cromatograma da fração F8a-11AP.

Nesse espectro também foram observados três fragmentos característicos do núcleo aspidospermatano (M-28), $m/z = 124$ e $m/z = 152$ (Figuras II.10; II.13, II. 17). Após ionização da molécula no nitrogênio alicíclico, a estabilização da carga é promovida pela perda de etileno (M-28) formando-se o fragmento de $m/z = 296$ (10%). O íon radical é posteriormente estabilizado pela perda de um radical indol-metila formando-se o cátion piperidínico de $m/z = 124$ como pico-base. Um mecanismo alternativo de fragmentação após a cisão da ligação C12-C19 dá origem ao fragmento de $m/z = 152$ (5%) (Figuras II.16 e II.17). A comparação dos espectros de massas obtidos para essas três substâncias, de esqueleto aspidospermatano mostra que a intensidade dos fragmentos pode mudar dependendo do tipo de substituição que a molécula apresenta, ou seja, a intensidade relativa dos fragmentos observados depende do substituinte encontrado no núcleo aspidospermatano como: metila, metoxila, acila, hidroxila, etc.... Contudo, os núcleos aspidospermatanos apresentam sempre alguns picos característicos, como pode ser visto nos espectrogramas anteriores (Figura II.6, II. 10, II.14). Através de comparação com dados de literatura foi possível identificar esse alcalóide como desmetóxi-aspidospermina (Budzikiewicz *et. al.*, 1964; Hesse, 1974).

Figura II.15 Substância F8a-11AP, desmetóxi-aspidospermina.

Figura II.16- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de desmetóxi-aspidospermina, por EI a 70eV.

Figura II.17- Espectro de massas para desmetóxi-aspidospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

A fração F8b-11AP apresentou um pico com $t_r=28,67$ min (Figura II.18) cujo espectro de massas apresenta um íon molecular de m/z 384 (Figura II.21).

Figura II.18- Cromatograma da fração F8b-11AP.

Como foram observados os fragmentos de $m/z=124$ e 152, também presentes na molécula de aspidospermina, o grupamento metoxila adicional estaria localizado no anel indólico. Esses mesmos fragmentos foram observados nos espectros de massas das substâncias anteriores.

A ionização da molécula no nitrogênio alicíclico e a posterior estabilização da carga origina o fragmento de $m/z=356$ (10%) por perda de etileno (M-28). O íon radical gerado é estabilizado pela perda de um radical indol-metila e formação do cátion piperidínico ($m/z=124$) como pico-base. Um mecanismo alternativo de fragmentação após cisão da ligação C12-C19 dá origem ao fragmento de $m/z=152$ (6%) (Figura II.20). Através da comparação com os dados de literatura foi possível identificar esta substância como pirifolidina (Budzikiewicz *et. al.*, 1964; Hesse, 1974) (Figura II.19).

Figura II.19- Substância F8b-11AP, pirifolidina.

Figura II.20- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de pirifolidina, por EI a 70eV.

Figura II.21- Espectro de massas para pirifolidina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

II.5 Análise do óleo volátil

O rendimento percentual em óleo volátil (m/m) das folhas de *A. polyneuron* foi de 0,035%.

A simples hidrodestilação das folhas de *A. polyneuron* produziu um óleo de cor amarelo-clara. Foram identificados sete componentes, correspondendo a 87,2% do óleo total das folhas de *A. polyneuron* (Tabela II.4). O principal constituinte encontrado foi um diterpeno hidrocarbonado, identificado como caureno (73,7%) (Figura II.21). Esse componente apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Mendonza *et al.*, 1996). Os outros componentes encontrados em menor proporção e somando um total de 4,4% foram identificados como linalol (monoterpeno oxigenado), α -copaeno (sesquiterpeno hidrocarbonado), β -cariofileno (sesquiterpeno hidrocarbonado), além de terem sido detectados pentadecanal, hexenol e hexadecanona, que contribuíam com 9,1% dos componentes do óleo total.

Dados da literatura mostram que a família Apocynaceae apresenta variação nos componentes do óleo volátil. Por exemplo, nas flores de *Plumeria obtusa* foram identificados 47 componentes do óleo total, sendo os principais constituintes salicilato de benzila (39%) e os sesquiterpenos (2E, 6E)-farnesol (8%) e (E)-nerolidol (5%) (Kamariah, 1999), enquanto para *Catharanthus roseus*, foram identificados 75 constituintes no óleo bruto, representados por uma série de alcanos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, terpenóides e fenilpropanóides. Esses dados, somados aos resultados encontrados para *A. polyneuron*, reforçam a grande variação na composição do óleo volátil nas espécies desta família (Brun *et al.*, 2001).

Tabela II.4- Composição do óleo volátil das folhas de

A. polyneuron.

Constituintes	Índice de Kováts	Percentual (%)
(Z)-3-hexenol	216	1,1
linalol	632	1,6
α -copaeno	1334	1,2
β -cariofileno	1442	1,7
pentadecanal	2128	6,3
2-hexadecanona	2403	1,7
caureno	2804	73,7
TOTAL		87,2

Figura II.22- Estruturas químicas dos constituintes presentes no óleo volátil de *A. polyneuron*.

II. 6 Referências bibliográficas

- ADAMS, R.P., Identification of Essential Oil by Ion Trap Mass Spectroscopy. Academic Press, San Diego, 302p, 1989.
- ANTONACCIO, L. D., PEREIRA, N. A., GILBERT, B., VORBRUGGEN, H., BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J. M., DURHAM, L. J., DJERASSI, C. Alkaloid Studies. XXXIII. Mass spectrometry in structural and stereochemical Problems. VI. polyneuridine, A new alkaloid from *Aspidosperma polyneuron* and some observations on mass spectra of indole alkaloids. *Helv. Chim. Act.*, v. 84, p. 2161-2169, 1962.
- ASSUMPÇÃO, R M.V., MORITA, T. *Manual de soluções, Reagentes e Solventes*. Edgard Blücher Ltda, 629p, 1968.
- BIEMANN, K. Mass spectrometry, Organic chemical Applications. McGraw-Hill Book Company, New York, 369p, 1962.
- BIEMANN, K., SPITELLER-FRIEDMANN, M., SPITELLER, G. An investigation by Mass Spectrometry of the Alkaloids of *Aspidosperma quebracho-blanco*. *Tetrahedron Lett.*, v. 14, p. 485-492, 1961.
- BIEMANN, K., SPITELLER-FRIEDMANN, M., SPITELLER, G. Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. X. Alkaloids of the bark of *Aspidosperma quebracho blanco*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 85, p. 631-638, 1963.
- BRUN, G., BESSIÈRE, J. M., DIJOUX-FRANCA, M. G., DAVIS, B., MARIOTTE, A. M. Volatile Components of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae). *Flav. Frag. J.*, v. 16, p. 116-119, 2001.

BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D. Structure elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry Volume I Alkaloids. São Francisco: Holden-Day, v.I, p.232, 1964.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 7. Ed. Campinas: editora da UNICAMP, 279p, 1997.

CORDELL, G. A., SHAMMA, M., SAXTON, E. J., SMITH, G. F. Dictionary of alkaloids indexes. Edited . W Southon, J .Buckingham. 1989.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, v. 5. p. 448-461, 1974.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ed. São Paulo: Atheneu, Partel, 1988.

FARNSWORTH, N. R., PILEWSKI, N. A., DRAUS, F. J. Studies on False-Positive Alkaloids Reactions with Dragendorff's Reagent. *Lloydia*, v. 25, p. 312-319, 1962.

FLORIANI, L. Composicion y acción terapéutica del Quebracho Blanco y del Palo rosa (*Aspidosperma*). *Rev. Farmac. (Buenos Aires)*, v.25, p. 135-141, 1937.

HESSE, M. Indolalkaloide Teil1: Text. Verlag Chemie, v. 1, 261p, 1974.

HESSE, M. Indolalkaloide Teil2: Spektren. Verlag Chemie, v. 1, 98p, 1974.

KAMARIAH, A.S., LIM, L. B. L., BASER, K. H. C., OZEK, T., DEMIRCI, B. Composition of the essential oil from *Plumeria obtusa* L. *Flav. Frag. J.*, v. 14, p. 237-240, 1999.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras, Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arboreas Nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, p. 21, 25, 1992.

- MENDONZA, L., WILKENS, M., URZÚA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates of diterpenoids and flavanoids isolated from some *Chillean Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.58, 85-88, 1997.
- MILBORROW, B. V & DJERASSI, C. Alkaloid Studies. Part LXI. The structure of twelve new alkaloids from *Aspidosperma cylindrocarpon*. *J. Chem. Soc.*, p. 417-424, 1969.
- PINAR, M., VON PHILIPSBORN, W., VETTER, W., SCHMID, H. Limaspermin. *Helv. Chim. Act.*, v. XLV, p. 2260-2265, 1962.
- SANDRA, P. & BICCHI, C. *Capillary Gas Chromatography Essential Oil Analysis*. New York: Huetthing, 1987.
- SCHMUTZ, J. & LEHNER, H. Die alkaloide von *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. *Helv. Chim. Act.*, v. XLII, p. 874-878, 1959.

CAPÍTULO III

ESTUDO QUÍMICO DE *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg.

III.1 Generalidades

A espécie *A. cylindrocarpon* (Apocynaceae) é uma árvore conhecida popularmente como peroba-poca ou peroba-iquira. Possui uma madeira pesada e de grande durabilidade quando não está em contato com o solo e a umidade, que é usada na construção civil como assoalhos, batentes, vigas e caibros; na construção naval, em obras externas como postes, mourões, na confecção de vagões e carrocerias. Encontra-se no Paraná, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais, sendo típica das matas de planalto, principalmente nas regiões mais quentes (Corrêa, 1974; Lorenzi, 1992).

Esta espécie é uma árvore que atinge de 4 a 12 metros de altura, possui ramos relativamente delgados, glabros ou irregularmente pubérulos quando novos e finamente rimosos na fase adulta. As folhas variam de ovais a lanceoladas-elípticas, agudamente acuminadas, sendo obtusas com base obtusa a aguda, de 5 a 12 cm de comprimento e 1,5 a 6 cm de largura, de consistência rígido-membranácea, brilhantes e glabras. A inflorescência, apresenta-se como panícula, subterminal situa-se na axila das folhas mais elevadas, dicásios dicotômicos ou raramente pubérulos, brácteas ligeiramente lanceoladas, caducas, cálice com lobos ovais, agudos, glabros ou levemente ciliados. A corola alva, glabra ou raramente pubérulo-papilosa, externamente branca, tubo com 2 a 3 mm de comprimento (Corrêa, 1974;) (Figura III.1 e Figura III.2).

Figura III.1- Parte do ramo com flores e folhas de *A. cylindrocarpon* Muell. Arg.

Figura III.2- Hábito de *A. cylindrocarpon* Muell. Arg.

A revisão bibliográfica sobre o gênero *Aspidosperma cylindrocarpon* abrangeu o período de 1910 a 2002 com base no Chemical Abstracts visou a composição química e as atividades biológicas relatadas para essa espécie tendo sido encontrado apenas um estudo químico e nenhuma descrição detalhada sobre atividade biológica (Milborrow & Djerassi, 1969).

Quanto ao aspecto químico, foram identificados alcalóides dos tipos indólico e di-hidro-indólico nas cascas de *A. cylindrocarpon* (Milborrow & Djerassi, 1969). Os alcalóides cilindrocarina, cilindrocarpina, cilindrocarpidina são majoritários e os outros correspondiam a modificações na estrutura da cilindrocarina. Este último é um alcalóide de núcleo aspidospermatano, originando os derivados *N*-acetil-20-hidróxi-cilindrocarina, *N*-formil-cilindrocarpinol, *N*-formil-20-hidróxi-cilindrocarina, *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, *N*-acetil-cilindrocarpinol, *N*-di-hidro-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, 20-hidróxi-cilindrocarina, *N*-formil-cilindrocarina, 17-dimetóxi-*N*-acetil-cilindrocarina, *N*-benzoíl-cilindrocarina e *N*-metil-cilindrocarina (Milborrow & Djerassi, 1969).

Desta maneira, nosso objetivo foi estudar o aspecto químico das folhas de *A. cylindrocarpon*, pois até o presente momento não há relato dessa parte do vegetal. Além disso, nós também comparamos a produção de alcalóides na planta adulta com o material obtido da cultura de células em suspensão.

III.2 Material e Métodos

O material vegetal foi pulverizado em moinho tipo Harley

Todos os solventes (Vetec e Synth) utilizados nas extrações e nas eluições das colunas cromatográficas foram devidamente tratados e destilados, segundo procedimentos usuais (Assumpção & Morita 1968). Para as análises cromatográficas em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Merck).

Para as placas de CCD (cromatografia em camada delgada) utilizou-se como suporte gel de sílica 60G e/ou 60GF₂₅₄ (5-40 μ m), ambas da Merck. As placas cromatográficas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de gel de sílica em água destilada sobre placas de vidro, utilizando-se um espalhador "Quickfit ". As espessuras das camadas de gel de sílica foram de 1,0 mm para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizamos a espessura de 0,5 mm de gel de sílica.

Para revelação das placas de camada delgada comparativas e preparativas foram utilizados reagentes para alcalóides como Bourchardat e Dragendorff e/ou irradiação com luz ultra-violeta (254 e 356 nm).

Nas análise por CLAE foi utilizado um cromatógrafo líquido analítico Hewlett-Parckard 1050, equipado com bomba quaternária e detector espectrofotométrico do tipo multicanal na região do UV, ajustado para 280 nm, munido de injetor automático Shimadzu SIL-9A e de uma coluna de fase reversa RP-18 ODS-Hypersil (5 μ m d.i., 100 x 2,1 mm), com fluxo de 0,6mL/min e volume de injeção 10 μ L.

III.2.1 Material vegetal

A espécie *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. foi coletada, no período de 1998-1999, de indivíduos previamente identificados na Fazenda Campininha em Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo-SP.

III.2.2 Extração dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

As folhas e ramos de *A. cylindrocarpon* foram separados, secados e moídos, obtendo-se dessa forma o material na forma de pó. Depois foram submetidas a extração por percolação com etanol a 80°GL por 4 dias ou mais, até apresentarem teste negativo frente aos reveladores de alcalóides Dragendorff e Bouchardat (Farnsworth *et al.*, 1962). As soluções alcoólicas foram concentradas sob vácuo a 60°C, originando um extrato etanólico bruto das folhas e ramos. Estes extratos foram tratados com uma solução aquosa de ácido fosfórico 0,1mol/L e filtrados em celite. A solução ácida foi extraída com hexano para eliminar os ácidos graxos. A fase ácida, livre de ácidos graxos, foi em seguida alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado até pH igual a 9 e, subsequente, extraída com diclorometano (CH₂Cl₂) por diversas vezes, até resultados negativo nos testes com os reagentes de Bouchardat e Dragendorff. A fase em diclorometano foi secada sobre sulfato de sódio anidro e concentrada em rota-evaporador a 35°C, fornecendo uma fração de alcalóides totais (Esquema III.1).

Esquema III.1- Metodologia de extração dos alcalóides de *A. cylindrocarpon* Muell. Arg.

III.2.3 Separação e isolamento dos alcalóides totais de *A. cylindrocarpon*.

Os alcalóides totais de *A. cylindrocarpon* (1,0 g) foram inicialmente separados através de uma coluna (13 cm de altura e 5 cm de diâmetro) contendo como fase estacionária gel de sílica (35 g) submetida a pressão reduzida (Figura III.3), utilizando-se como eluentes: diclorometano; diclorometano: metanol (70:30); diclorometano: metanol (50:50); metanol (100%). Realizou-se a mudança de eluentes quando as frações apresentavam resultados negativos frente aos reagentes para alcalóides. O volume de cada fração coletada foi de 50mL. Subsequentemente, as frações foram analisadas por CCDC segundo à semelhança das frações, sendo obtidas 3 frações da coluna filtrante: fração 1CF apresentou massa de 0,600 g, a fração 2CF apresentou massa de 0,3918 g e a fração 3CF massa de 0,200 g. Devido ao maior rendimento, começou a etapa de separação pela a fração 1CF. As frações 2CF e 3CF foram submetidas a cromatografia em camada preparativa (CCDP) usando como eluente clorofórmio:metanol (95:5, v/v) e cuba saturada com vapores de amônia.

Para a separação dos componentes da fração 1CF, empregou-se um sistema de cromatografia líquida de média pressão (MPLC), dotada de uma coluna de 30 cm de altura e 5 cm de diâmetro e bomba binária Buchii, com detector UV (280 nm), sendo a fase estacionária sílica RP-18 (Waters, 50-100 μ), e o eluente um gradiente de solução de ácido acético a 0,1% (v/v) e metanol (Tabela III.1). A massa injetada da fração 1CF foi de 0,600 g.

Figura III.3- Aparelhagem utilizada para separação dos alcalóides.

Tabela III.1- Gradiente de eluição usado no MPLC.

Tempo (min)	Metanol (%)	Solução de ácido acético 0,1% (v/v)
15	60	40
20	70	30
30	80	20
45	100	0

A eluição foi monitorada por um detector de UV a 280 nm, sendo coletadas frações de acordo com o aparecimento de picos no registrador. Esta separação forneceu 17 frações que, em seguida, foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCDC). Os resultados da CCDC permitiram a reunião das 17 frações em apenas 3, utilizando-se como critério de semelhança os valores de R_f das manchas observadas em cada fração analisada. Assim, as frações 1 a 4 foram reunidas em uma fração denominada 1FMPLC (0,100 g), as frações 5 a 9 foram reunidas na fração 2FMPLC (0,150 g) e as frações 10 a 17 foram reunidas na fração 3FMPLC (0,230 g).

Dessas, selecionou-se a fração 3FMPLC, por ser a de maior massa, para purificação.

Foram testados vários sistemas de eluentes para a separação dos alcalóides por CCDC da fração 3FMPLC. Após vários testes, foi definido como eluente clorofórmio:metanol na proporção (95:5; v/v).

Assim, essa fração foi purificada por CCDP fornecendo três frações: 3FMPLCA (15,9 mg); 3FMPLCB (6,6 mg) e 3FMPLCCa (15,0 mg). Essas frações foram analisadas por CCDC, podendo-se verificar que cada fração apresentava apenas uma mancha, indicando, possivelmente, a presença de uma substância em cada fração. Posteriormente, as frações foram submetidas a análise por cromatografia a gás.

As frações 2CF e 3CF obtidas da coluna filtrante foram submetidas a cromatografia em camada delgada preparativa, sendo possível isolar da fração 2CF duas substâncias denominadas 2CFa (10 mg) e 2CFb (5 mg) que foram analisadas por cromatografia a gás. Da fração 3CF foi possível o isolamento de uma substância que se apresentava impura e também foi analisada por cromatografia a gás, sendo codificada como 3CFa (10 mg) (Esquema III.2). Ambas as frações posteriormente foram submetidas à análise CG/EM cujas condições estão descritas no item III.2.4.

Esquema III.2- Fracionamento da fração de alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

III.2.4 Condições para análise por cromatografia em fase gasosa (CG).

As frações 3FMPLCA, 3FMPLCB e 3FMPLCCa obtidas da fração de alcalóides totais de *A. cylindrocarpon* foram analisadas através de cromatografia a gás para verificar a sua pureza, nas seguintes condições: cromatógrafo a gás HP-5890 Series; detector de ionização de chama (FID) e integrador HP-3396, com

coluna HP-5 (30 m x 0,2 mm x 0,3 μ m). Para a caracterização dos alcalóides por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) foi empregado o aparelho Shimadzu QP5050A, quadrupolar e ionização por impacto eletrônico (IE), a 70 eV. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar DB5 de (30 m x 0,25 mm x 0,33 μ m), utilizando-se as seguintes condições de análise: temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 310°C, temperatura inicial 100°C (2 min), temperatura final 290°C (10 min), taxa de aquecimento 10°C/min e volume de injeção 3 μ L.

III.2.5 Variação da composição dos alcalóides durante a germinação *in vitro* de *A. cylindrocarpon*.

As plântulas de *A. cylindrocarpon* foram obtidas como descrito no item IV.2.3 e foram analisadas a partir da 2ª semana até a 20ª semana. Cada plântula foi retirada de seu meio original e, em seguida, foram separadas folhas primárias, hipocótilos e radículas. Cada uma dessas partes foi armazenada no escuro, à temperatura de aproximadamente 10°C, até o momento da extração. As diferentes partes do vegetal foram extraídas com 15 mL de etanol, separadamente, num almofariz. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotatório a aproximadamente 35°C. Ao extrato seco, foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido fosfórico 0,1 mmol/L. A seguir, a solução aquosa ácida foi extraída com 10 mL de hexano. O sistema bifásico foi levado à centrifuga por 15 min (9900g). A fase ácida foi separada e basificada com NH₄OH até pH=10 e extraída com diclorometano (10 mL) e a fase orgânica analisada por CLAE (Esquema III.3). As condições de separação em CLAE foram as seguintes: cromatógrafo HP 1050, com injetor automático Sil-9A (Shimadzu), equipado com detector UV/VIS ajustado para 280 nm, coluna ODS-Hypersil C18 (5 μ m, 100 x 2,1 di mm), em fluxo de 0,6mL/min e volume de injeção 10 μ L.

Diversos sistemas de eluentes foram testados, utilizando-se gradientes de metanol, acetonitrila (ACN) e solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1mmol/L). A fase móvel empregada consistiu de um gradiente com dois sistemas de eluentes: solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1mmol/L+ (ACN 97:3, v/v), (solvente A) e ACN (solvente B)(Tabela III.2).

Tabela III.2- Gradiente empregado para a análise dos alcalóides extraídos das sementes.

Tempo (min)	% Solvente A *	% Solvente B**
0	100	0
2	100	0
40	0	100
45	0	100
50	100	0

*Solvente A: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1mmol/L+ ACN (97:3, v/v).

** Solvente B: ACN.

Esquema III.3- Procedimento para a extração dos alcalóides das plântulas *in vitro* e sementes de *A. cylindrocarpon*.

III.2.6 Óleo volátil de *A. cylindrocarpon*.

III.2.6.1 Obtenção do óleo volátil de *A. cylindrocarpon*.

O óleo volátil das folhas de *A. cylindrocarpon* foi obtido do mesmo modo que o descrito para *A. polyneuron* no item II. 3.1.

III.2.6.2 Análise dos componentes do óleo volátil de *A. cylindrocarpon* por cromatografia a gás, acoplada a espectrometria de massas.

A análise dos componentes do óleo volátil foi realizada da mesma forma que descrita para *A. polyneuron* no item II.3.2.

III.2.6.3 Identificação dos componentes

A identificação das substâncias do óleo volátil de *A. cylindrocarpon* foi realizada como descrito no item II.3.3.

III.3 Resultado e Discussão

III.3.1 Rendimentos das extrações dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

O rendimento das folhas de *A. cylindrocarpon* é aproximadamente, o dobro daquele encontrado para os ramos (Tabela III.3). Nesta espécie, a quantidade de alcalóides encontrada nos ramos foi cerca de 3 vezes menor do que aquela encontrada para *A. polyneuron* (Tabela II.2). Devido ao maior rendimento de alcalóides nas folhas e à falta de estudos na literatura, deu-se preferência ao isolamento de alcalóides desta parte da planta.

Tabela III.3 - Rendimentos dos alcalóides extraídos de *A. cylindrocarpon*.

Parte utilizada	<i>A. cylindrocarpon</i>		
	massa (Kg)	Massa (g)	Rendimento (%)
Folhas	2,75	2,0	0,07
Ramos	1,20	0,4	0,03

III.3.2 Dados físicos e espectrométricos dos alcalóides identificados de *A. cylindrocarpon*.

a) Substância 3FMPLCB= *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina.

Sólido amorfo, marrom, fórmula molecular $C_{28}H_{32}N_2O_5$

m/z (%)= 51,00 (6,29), 77,00 (52,06), 105,00 (100), 212,25 (15,15), 266,20 (14,04), 281,25 (17,85), 184,15 (99,20), 387,35 (64,36), 461,35 (1,12), 476,35 (22,11).

b) Substância 3FMPLCC= *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina.

Sólido amorfo, marrom, fórmula molecular $C_{30}H_{24}N_2O_5$

m/z (%)= 77,05 (48,83), 103,10 (51,29), 131,10 (94,84), 184,25 (100,00), 253,05 (18,34), 268,05 (7,38), 281,35 (7,38), 372,05 (10,53), 411,35 (59,77), 502,45 (16,83).

c) Substância 3FMPLCCa= *N*-benzoíl-cilindrocarina.

Sólido amorfo, marrom, fórmula molecular $C_{28}H_{32}N_2O_4$

m/z (%)= 77,05 (32,98), 105,05 (57,04), 168 (100%), 194,25 (3,65), 207, 25 (14,77), 224,20 (3,36), 207,25 (14,77), 224,20 (3,36), 251,20 (5,62), 266,30 (10,40), 281,25 (17,34), 291,00 (2,75), 313,00 (3,24), 356 (3,02), 386,40 (29,90), 401,35 (3,56), 417,35 (3,98), 445,35 (2,59), 460,40 (13,00).

d) Substância 2CFa= 16-*epi*-vincamina.

Sólido amorfo, marrom, fórmula molecular $C_{21}H_{26}N_2O_3$

m/z (%)= 82,10 (24,34), 167,25 (28,51), 224,30 (34,62), 237,45 (23,67), 252,30 (100), 267,30 (44,33), 295,40 (27,71), 325,33 (37,12) 354,455 (52,03).

e) Substância 2CFb= tetra-hidro-alstonina.

Sólido amorfo, marrom, fórmula molecular $C_{21}H_{24}N_2O_3$

m/z (%)= 77,10 (18,92), 95,20 (8,43), 129,25 (11,44), 143,20 (12,59), 156,20 (57,88), 169,20 (25,93), 184,30 (13,65), 223,30 (38,09), 251,35 (36,00), 337,50 (39,72), 352,50 (100).

f) Substância 3CFa= Aspidospermina.

Sólido amorfo, marrom, fórmula molecular $C_{22}H_{30}N_2O_2$

m/z (%)= 57,05 (16,45), 94,00 (2,34), 124,15 (100%), 125,15 (9,34), 152,15 (5,91), 152,15 (5,91), 172,25 (2,14), 326,35 (4,21), 354,35 (20,84).

III.3.3 Caracterização dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

A fração 3FMPLCA obtida da separação por MPLC, bem como as frações 3FMPLCB e 3FMPLCCa foram analisadas por cromatografia a gás, de modo a possibilitar a identificação estrutural dos alcalóides, obtendo-se picos com boa resolução. Assim, as amostras posteriormente foram analisadas por CG/EM.

III.3.4 Caracterização dos alcalóides por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM).

Embora a fração 3FMPLCA, quando analisada por CG/EM tenha apresentando um componente majoritário, não foi possível atribuir uma estrutura a este composto apenas com base nos dados do espectograma

O cromatograma da fração 3FMPLCB apresentou uma substância com $t_r=23,57$ min e em cujo espectro de massas observava-se uma fragmentação característica para alcalóides do tipo aspidospermatano, com um íon molecular de $m/z=476$ (22%) (Figuras III.4 e III.7) (Milborrow & Djerassi, 1968). A racionalização dos principais fragmentos obtidos considera a ionização inicial no nitrogênio da parte alicíclica da molécula, sítio que possibilita a estabilização de uma carga positiva, com a formação de um fragmento de $m/z=387$ (64%), originado de clivagem α homolítica ao nitrogênio. Esse tipo de fragmentação é comum em núcleos do tipo aspidospermatano. O fragmento de $m/z=184$ (99%) é originado da cisão da ligação C12-C19 originando um cátion piperidínico. Também observou-se a formação de um íon de $m/z=105$ (100%) como pico-base devido a uma cisão homolítica entre o substituinte benzoíla e o nitrogênio do anel indólico. Este íon

benzoíla sofre uma nova fragmentação perdendo uma molécula de monóxido de carbono originando o íon fenila ($m/z = 77$, 52%). Analisando as fragmentações e comparando com modelos descritos na literatura, foi possível determinar a estrutura como *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina (Milborrow & Djerassi, 1968; Hesse, 1974; Rahman, 1989, Cordell *et al.*, 1989) (Figura III.5 e III.6).

Figura III.4- Cromatograma da fração 3FMPLCB.

Figura III.5- Substância 3FMPLCB, *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina.

Figura III.6- Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de *N*-benzoil-20-hidroxi-cilindrocarina, por EI a 70ev.

Figura III.7- Espectro de massas para *N*-benzoil-20-hidroxi-cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70ev.

A análise do cromatograma obtido por CG/EM da fração 3FMPLCCa mostrou uma substância de $t_r = 25,15$ min (Figura III.8).

Figura III.8- Cromatograma da fração 3FMPLCCa.

Analisado, o espectro de massas dessa substância apresentou fragmentações características para alcalóides do tipo aspidospermatano e íon molecular de $m/z = 502$ (17%). Verificou-se que o modelo de fragmentação observado nessa molécula é similar ao descrito para *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina (3FMPLCB), com ionização do nitrogênio alicíclico e estabilização da carga, originando o fragmento de $m/z=413$ (37%). Também foi observada a formação do cátion radical piperidínico de $m/z=184$ (100%). A principal diferença detectada foi um substituinte *N*-cinamoíla ligado ao nitrogênio do anel indólico, que forma o íon cinamoíla de $m/z=131$ (95%). O íon cinamoíla é posteriormente, estabilizado pela perda de uma molécula de monóxido de carbono, originando o íon fenil-etenila de $m/z=107$ (51%) e, subsequente, pela perda de eteno, gerando o íon fenila ($m/z=77$, 49%) (Milborrow & Djerassi, 1968; Hesse, 1974; Rahman, 1989, Cordell *et al.*, 1989). A comparação com o espectro de massas relatado por Milborrow & Djerassi, (1969) permitiu identificar o alcalóide como sendo *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina (Figura III.9). As fragmentações que conduzem aos picos característicos observados no espectro de massas desse composto encontram-se nas figuras (Figuras III.10 e III.11).

Figura III.9- Substância 3FMPLCCa, *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina.

Figura III.10- Fragmentação para interpretação do espectro de massas de *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, por EI a 70eV.

Figura III.11- Espectro de massas para *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70ev.

A fração 3MPLCCa, quando analisada, apresentou no cromatograma um pico com $t_r=23,57$ min (Figura III.12).

Figura III.12- Cromatograma da fração 3FMPLCCa, *N*-benzoíl-cilindrocarina.

O espectro de massas correspondente a essa substância apresentou um íon molecular de m/z 460 (13%) (Figura III.15) e, pelas características observadas mostrou três fragmentos importantes. O primeiro, corresponde à perda de uma molécula de acetato de metila (M-74) e um substituinte junto com um átomo de hidrogênio levando a um pico intenso de $m/z=386$ (30%) devido a um rearranjo do tipo McLafferty. O pico-base, de $m/z=168$, deve-se ao cátion piperídínico. Também observou-se a formação de um íon de $m/z=105$ (57%) devido a uma cisão homolítica entre o substituinte benzoíla e o nitrogênio do anel indólico. Este íon benzoíla sofre uma nova fragmentação, perdendo uma molécula de monóxido de carbono, originando o íon fenila de $m/z=77$ (33%). Esses fragmentos obedecem ao padrão descrito para as duas moléculas anteriores (Figura III.6 e III.10), característico para alcalóides do tipo aspidospermatano. O padrão de fragmentação observado no espectro de massas comparado com o de literatura, possibilitou a determinação da estrutura deste alcalóide como *N*-benzoíl-cilindrocarina (Milborrow & Djerassi, 1969; Hesse, 1974, Cordell *et al.*, 1989) (Figuras III.13 e III.14).

Figura III.13- Substância 3FMPLCCa, *N*-benzoíl-cilindrocarina.

Figura III.14- Fragmentação para interpretação do espectro de massas de *N*-benzoil-cilindrocarina, por EI a 70eV.

Scan # : 3464
Mass Peak # : 98
Base Peak : 168.20 (40360)

Figura III.15- Espectro de massas de *N*-benzoíl-cilindrocarina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

O cromatograma da fração 2CFa mostrou um pico com $t_r = 34,24$ min (Figura III.16).

Figura III.16- Cromatograma da fração 2CFa.

Pelas características das fragmentações observadas no espectro de massas da substância 2CFa e comparação com dados de literatura foi possível evidenciar que se tratava de um alcalóide do tipo eburnano (Budzikiewicz *et. al.*, 1964). A primeira fragmentação observada nessa classe de alcalóides acontece com estabilização de carga no nitrogênio alicíclico da molécula pela perda de um hidrogênio (M-1), com uma alta abundância relativa (52%), devido à estabilização por conjugação com o sistema indólico. O íon molecular de $m/z=354$ apresenta uma grande abundância relativa de 52,03% (Figura III.18). Adicionalmente, o íon molecular sofre um rearranjo do tipo retro Diels-Alder com abertura do anel C. Alternativamente, pode ocorrer perda de um radical carbóxi-metila formando-se o íon de $m/z=295$. Uma fragmentação, também do tipo retro Diels-Alder, conduz à abertura do anel D, originando o pico-base do espectro ($m/z=252$). As intensidades relativas dos fragmentos observados, por comparação com dados da literatura, permitiram concluir que essa substância não se tratava da vincamina e sim de seu epímero 16-*epi*-vincamina (Mockrý & Kompis, 1963; Hesse, 1974; Budzikiewicz *et. al.*, 1964, Cordell *et al.*, 1989) (Figuras III.17 e III.19).

Figura III.17- Substância 2CFa, 16-*epi*-vincamina.

Figura III.18- Fragmentação para interpretação do espectro de massas de 16-*epi*-vincamina, por EI a 70eV.

Figura III.19- Espectro de massas para 16-*epi*-vincamina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

O cromatograma da fração 2CFb apresentou um pico com $t_r = 24,35$ min (Figura III.20).

Figura III.20- Cromatograma da fração 2CFb, tetra-hidro-alstonina.

O espectro de massas da fração 2CFb (Figura III.22) exibiu um íon molecular de $m/z = 352$ que é, também, o pico-base do espectrograma. Uma das características dos espectros de massas de alcalóides do tipo hetero-ioimbano é a perda de um radical de hidrogênio ($M-1$) (Budzikiewicz *et. al.*, 1964), originando um

íon com abundância relativa elevada devido à estabilização por conjugação com o sistema indólico e complementação da camada de valência do nitrogênio.

Observou-se uma fragmentação que envolve um mecanismo de retro Diels-Alder no anel C, seguida por uma cisão homolítica ativada alilicamente entre C14-C15, com a regeneração do íon conjugado de $m/z=156$. Essa fragmentação é favorecida pela presença da dupla ligação do anel heterocíclico. Outro caminho possível para a fragmentação envolve a localização da carga no N alicíclico e a homólise em C3 e C1, a qual origina o fragmento de $m/z=169$ (26%) e 184 (13,6%).

O íon molecular e o padrão de fragmentação indicam, para esta substância, a estrutura da ajmalicina. Contudo, a intensidade relativa de alguns fragmentos é diferente. Para ajmalicina, o fragmento de $m/z=184$ apresenta maior abundância do que aquele de $m/z=169$ e o fragmento de $m/z=337$ apresenta intensidade relativa muito pequena ou encontra-se ausente. Estes dados indicam, para este composto, a estrutura da tetra-hidro-alstonina, epímero da ajmalicina com fusão *cis* dos anéis D e E (Figura III.21) (Antonaccio *et. al.*, 1962; Hesse *et. al.*, 1965; Hesse, 1974, Cordell *et al.*, 1989). As fragmentações que conduzem aos picos característicos observados no espectro de massas desse composto encontram-se nas figuras III.22; III.23.

Figura III.21- Substância 2CFb, tetra-hidro-alstonina.

Figura III.22– Fragmentação para interpretação do espectro de massas de tetra-hidro-alstonina, por EI a 70eV.

Figura III.23- Espectro de massas para tetra-hidro-alstonina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

O cromatograma da fração 3CFa apresentou uma substância com tempo de retenção 24,20 min (Figura III.24).

Figura III.24 Cromatograma da fração 3CFa, aspidospermina.

O espectro de massas desse componente apresentou fragmentos característicos do núcleo aspidospermatano ($m/z = 124, 152$) e perda de etileno ($M-28$), característica de núcleos não-oxigenados na posição 21, devida à

aromatização do anel B e à eliminação de uma molécula neutra de etileno (Budzikiewicz *et al.*, 1964; Schmutz & Lehner 1959; Antonaccio *et al.*, 1962). Nessa substância, a ionização também acontece predominantemente no nitrogênio alicíclico, o qual é estabilizado pela clivagem α que pode acontecer na ligação C12-C19 e C2-C3 formando um radical em um carbono secundário o qual é estabilizado pela perda de etileno com radical rearranjado para um carbobo terciário.

Este íon radical é estabilizado pela perda de um radical indol-metila, formando o íon piperidínico de m/z 124 como pico-base. Uma outra alternativa de fragmentação após a cisão da ligação C12-C19 dá origem ao fragmento de m/z 152 (6%).

A comparação com dados de literatura sugere a estrutura da aspidospermina para este alcalóide (Figura III.25) (Biemann *et al.*, 1961; Biemann *et al.*, 1963; Budzikiewicz *et al.*, 1964; Schmutz & Lehner 1959; Antonaccio *et al.*, 1962). As fragmentações conduzindo aos picos característicos observados no espectro de massas do composto 3CFa encontram-se nas figuras (Figuras III.26 e III.27).

Figura III.25- Substância 3CFa, aspidospermina.

Figura III.26 -Fragmentação para a interpretação do espectro de massas de aspido-permina, por EI a 70eV.

CH₃

Figura III.27- Espectro de massas para aspodospermina, obtido no espectrômetro Shimadzu QP5050A, por EI a 70eV.

III.3.5 Extração dos alcalóides durante o desenvolvimento de plântulas de *A. cylindrocarpon* cultivadas *in vitro*.

Nas plântulas jovens, 2 a 4 semanas após a germinação, a concentração de *N*-benzoíl-cilindrocarina foi maior do que a de *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina. Após a 6^ª semana, durante o desenvolvimento, a proporção de *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina aumentou até atingir o mesmo perfil observado para as folhas adultas. A identificação das substâncias foi realizada por CLAE através da comparação com os alcalóides de *A. cylindrocarpon* previamente identificados, injetados como referência. Observou-se que o perfil cromatográfico se altera nas primeiras semanas e, depois, é similar ao observado na planta adulta, indicando que a biossíntese dos alcalóides de *A. cylindrocarpon* apresentou é dependente do estágio de desenvolvimento da planta.

Figura III.28- Variação da concentração de (1) *N*-benzoíl-cilindrocarina ($t_r=23,57$ min) e (2) *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina ($t_r= 25,22$ min), durante o processo de germinação *in vitro* de sementes de *A. cylindrocarpon* determinado por CLAE, (a) cromatograma dos alcalóides das folhas de plantas adultas, (b) cromatograma das sementes, (c) quarta semana de germinação *in vitro*, (d) oitava semana de germinação *in vitro* e (e) décima oitava semana de germinação *in vitro*.

III.3.6 Análise dos componentes do óleo volátil de *A. cylindrocarpon*.

O rendimento do óleo (m/m) obtido das folhas de *A. cylindrocarpon* foi de 0,030%. A composição do óleo de *A. polyneuron* é mais simples do que a observada para o óleo de *A. cylindrocarpon*, como descrito na tabela III.4.

As folhas de *A. cylindrocarpon* produziram um óleo de cor amarelo-clara, composto por uma mistura de mais de 30 substâncias. Foram identificados 25 dos constituintes do óleo, que correspondem a 96,1% do óleo bruto. Os compostos foram identificados pelo Índice de Kováts, por comparação com amostras autênticas e com dados de literatura (Adams, 1995; Jennings & Shibamoto, 1980). O óleo apresentou cerca de 52,1% de sesquiterpenos (6,5% de sesquiterpenos oxigenados e 45,6% de sesquiterpenos hidrocarbonados) e cerca de 6,4% de monoterpenos (6,0% oxigenados e 0,4% hidrocarbonados). O β -cariofileno (14,3%) foi o componente majoritário, seguido de outros sesquiterpenos como o biciclogermacreno-D (14,2%) e germacreno-D (9,3%). O germacreno-D é considerado como precursor de muitas outras estruturas de sesquiterpenos (Biilow & König 1990) (Figura III.29). O principal monoterpeno oxigenado foi o linalol (6,0%), o qual apresenta propriedades sedativas (Yoshiaki *et al.*, 1998). Derivados de ácidos graxos e outras substâncias como: pentadecanal, (Z)-3-hexenol, hexadecanol, octadecanal e nonadecanal foram também detectados no óleo, contribuindo com 37,7% do óleo total (Tabela III.4). Verifica-se, através da análise da composição dos óleos voláteis das duas espécies de *Aspidosperma*, uma grande variação em sua composição. A espécie *A. polyneuron* tem, como composto majoritário um diterpeno, o caureno, enquanto *A. cylindrocarpon* apresenta diversos sesquiterpenos como componentes majoritários, além de aldeídos de cadeia longa.

Tabela III.4- Composição química do óleo volátil das folhas de *A. cylindrocarpon*.

Constituintes	Índice de Kováts	Percentagem
Monoterpenos hidrocarbonados		
α -pineno	912	0,4
Monoterpenos oxigenados		
linalol	1072	6,0
Sesquiterpenos hidrocarbonados		
β -elemeno	1359	0,3
α -farneseno	1478	0,4
β -cubeneno	1357	0,6
allo-aromadendreno	1428	1,0
δ -cadineno	1493	1,5
α -humuleno	1420	1,8
α -copaeno	1343	2,2
germacreno-D	1451	14,2
β -cariofileno	1388	14,3
Sesquiterpenos oxigenados		
α -muurolol	1619	0,5
(E)-nerolidol	1533	0,6
óxido de β -cariofileno	1550	0,7
globulol	1552	1,2
<i>epi</i> -globulol	1559	1,2
espatulenol	1546	2,5
Outros constituintes		
(Z)-3-hexenal	826	0,3
octadecanal	2002	0,6
hexadecanol	1856	1,7
(z)-3-benzoato de hexenila	1539	3,7
pentadecanal	1684	6,7
nonadecanal	2086	22,9
Óleo total		94,6

Figura III.29- Estruturas químicas dos constituintes presentes no óleo volátil de *A. cylindrocarpon*.

III.4- Referências bibliográficas

- ADAMS, R.P. *Identification of Essential Oil by Ion Trap Mass Spectroscopy*. Academic Press, San Diego, 302p, 1989.
- ANTONACCIO, L. D., PEREIRA, N. A., GILBERT, B., VORBRUEGGEN, H., BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J. M., DUHAM, L. J., DJERASSI. Alkaloid Studies. XXXIII. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. VI. Polyneuridine, A new Alkaloid from *Aspidosperma polyneuron* and Some observations on Mass Spectral of Indole Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 84, p. 2161-2169, 1962.
- ASSUMPÇÃO, R M.V., MORITA, T. *Manual de soluções, Reagentes e Solventes*. (ed.): Edgard Blücher Ltda, 629p, 1968.
- BIEMANN, K., SPITELLER-FRIEDMANN, M., SPITELLER, G. An investigation by Mass Spectrometry of the Alkaloids of *Aspidosperma quebracho-blanco*. *Tetrahedron Lett.*, v. 14, p. 485-492, 1961.
- BIEMANN, K., SPITELLER-FRIEDMANN, M., SPITELLER, G. Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. X. Alkaloids of the bark of *Aspidosperma quebracho blanco*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 85, p. 631-638, 1963.
- BIILOW, N. & KÖNIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigation of acid catalyzed, photochemical and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry.*, v. 55, p.141-168, 2000.

- BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D. Structure elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry Volume I Alkaloids. São Francisco: Holden-Day, v.I, p.232, 1964.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7. Ed. Campinas: editora da UNICAMP, 279p, 1997.
- CORDELL, G. A., SHAMMA, M., SAXTON, E. J., SMITH, G. F. Dictionary of alkaloids indexes. Edited . W Southon, J .Buckingham. 1989.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil a das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, v. 5. p. 448-461, 1974.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ed. São Paulo: Atheneu, Partel,1988.
- FARNSWORTH, N. R., PILEWSKI, N. A., DRAUS, F. J. Studies on False-Positive Alkaloids Reactions with Dragendorff's Reagent. *Lloydia.*, v. 25, p. 312-319,1962.
- HESSE, M. Indolalkaloide Teil1: Text. Verlag Chemie, v. 1, 261p, 1974.
- HESSE, M. Indolalkaloide Teil2: Spektren. Verlag Chemie, v. 1, 98p, 1974.
- HESSE, M., VETTER, W., SCHMID, H. Das massenpektrometrische Verhalten quartärer Stickstoffverbindungen. *Helv. Chim. Act.*, v. 48, p. 674-689, 1965.
- JENNINGS, W. & SHIBAMOTO, T. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, New York,1980.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras, Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Árboreas Nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, p. 21, 25, 1992.
- MEDINA, J. D., HURTADO, J. A., Alkaloids of the Seeds of *Aspidosperma exalatum* Monachino. *Planta Med.*, v. 32, p. 130-132, 1977.
- MILBORROW, B. V. & DJERASSI, C. Alkaloid Studies. Part LXI. The structure of twelve new alkaloids from *Aspidosperma cylindrocarpon.*, *J. Chem. Soc.*, p.417-424, 1969.

- MOKRÝ, J. & KÓMPIS. 14-Epivincamine, A new alkaloid from *Vinca minor* L. *Tetrahedron Lett.*, p.1917-1919, 1963.
- RAHMAN, A.U., Structure Elucidation (Part B) *In: Studies in Natural Products Chemistry.*, v. 5, p. 135-197, 1989.
- SCHMUTZ, J. & LEHNER, H. Die Alkaloide von *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. *Helv. Chim. Act.*, v. XLII, p. 874-878, 1959.
- SUGAWARA, Y., HARA, C., TAMURA, K., FUJII, T., NAKAMURA, K., MASUJIMA, T., AOKI, T. Sedative effects on human of inhalation of essential oil of linalool; Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Anal. Chim. Act.*, v. 365, p. 293-299, 1998.
- SANDRA, P. & BICCHI, C. *Capillary Gas chromatography in Essential Oil Analysis.* New York: Huetthing, 1987.

CAPÍTULO IV

ESTABELECIMIENTO DE CULTURA DE CÉLULAS *IN VITRO*

IV.1 Generalidades

A expressão cultura de células e de tecidos vegetais *in vitro* designa um conjunto de procedimentos visando obter o crescimento, em meio líquido ou sólido, de fragmentos de órgãos, de concentração de tecidos ou de células isoladas de plantas superiores. As culturas são mantidas em meios nutritivos semi-sólidos, ou em suspensões e são mantidas sob condições assépticas. As vantagens apresentadas pelo estudo das culturas de células *in vitro* são as seguintes (Leclercq, 1984):

a) possível produção de substâncias úteis, sob controle estrito das condições do ambiente, portanto independente das mudanças climáticas e da composição do solo.

b) manutenção de condições assépticas rigorosas, pois as culturas não são expostas a microorganismo e a insetos.

c) a obtenção de cultura de células em condições-padrão de laboratório independe da região de origem da planta, tropical ou temperada.

d) redução de custos e aumento da produtividade, que podem ser obtidos pelo controle automático do crescimento celular e pela regulação racional dos processos metabólicos.

A cultura de células vegetais apresenta numerosas variáveis que influenciam o crescimento e a produção de metabólitos secundários sendo, por isso, muito importante a definição de uma estratégia eficiente para a produção de compostos bioativos.

O caso específico do estudo do estabelecimento de culturas de células como descrito na família Apocynaceae é um exemplo onde grande número de substâncias portadoras de atividades biológicas são produzidas nas espécies *Catharanthus roseus* L. (G) Don, *Alstonia constricta*, *Apocynum cannabinum*; *Rauwolfia serpentina*, *Coptis japonica*, *Tabernaemontana divaricata* (Harris *et al.*, 1964; Vepoorte *et al.*, 1993; Morris, 1986).

Cultura de tecidos permite o estudo da biossíntese e o isolamento de enzimas envolvidas na produção de metabólitos secundários como, por exemplo, os alcalóides do tipo indólico: serpentina e ajmalicina (Morris, 1986; Moreno *et. al.*, 1995).

Muitas substâncias de interesses farmacológicos, com estruturas complexas ou de estereoquímica bem definida, produzidas por espécies vegetais têm sido obtidas em cultura de células devido a dificuldades de sua síntese química (Leclercq, 1984) (Tabela IV.1).

Tabela IV.1- Metabólitos bioativos produzidos em cultura vegetal *in vitro*.

Metabólitos	Cultura vegetais	Tipo de cultura	Referências
Ajmalicina Serpentina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Suspensão celular (raíz)	Rout <i>et al.</i> , 2000.
Antraquinonas derivado da emodina	<i>Cassia tora</i> <i>Morinda citrifolia</i> <i>Atropa belladonna</i>	Calos, suspensão celular (folhas)	Oksman-Caldentey & Hiltunen, 1996. Rout <i>et al.</i> , 2000;
Atropina, hiociamina e escopolamina	<i>Datura spp.</i> <i>Hyocyamus niger</i> <i>Scoplia japonica</i>	Suspensão celular (folhas e raízes)	Charlwood & Rhodes, 1990.
Berberina e jatrorrizina	<i>Coptis japonica</i>	Suspensão celular (folhas)	Charlwood & Rhodes, 1990.
α -Bisabolol e farnesol	<i>Anthemis nobilis</i>	Suspensão celular (plântulas, raíz)	Charlwood & Rhodes, 1990.
Cafeína	<i>Coffea spp</i>	Calos, suspensão celular (semente)	Charlwood & Rhodes, 1990.
Campototecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Calos, suspensão celular (folhas e cascas)	Oksman-Caldentey & Hiltunen, 1996.
Diosgenina	<i>Dioscorea</i>	Calos, suspensão celular (plântula,)	Rout <i>et al.</i> , 2000.
Ginsenosídeos Panaxadiol Panaxatriol Plumbagina	<i>Panax ginseng</i> <i>Plumbago zeynalica</i>	Calos, suspensão celular (raíz)	Charlwood & Rhodes, 1990.
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Calos, suspensão celular (plântula raízes)	Rout <i>et al.</i> , 2000.
Estaquidrina	<i>Medicago sativa</i>	Calos, somática embriogênese (folhas)	Charlwood & Rhodes, 1990; Charlwood <i>et al.</i> , 1988.
Escopolamina	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Calos (folhas)	Rout <i>et al.</i> , 2000; Rout <i>et al.</i> , 1999.
Vincamina	<i>Vinca minor</i>	Suspensão celular (folhas)	Charlwood & Rhodes, 1990.

Outra espécie da família Apocynaceae que teve suas condições para cultivo *in vitro* estabelecidas foi *A. quebracho-blanco*, sendo a única dentre as Aspidospermas (Obitz *et al.*, 1986).

Devido à grande importância das substâncias bioativas produzidas por essas espécies e ao seu crescimento lento foi de nosso interesse estabelecer as condições de cultura de células *in vitro* para *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron*.

IV.2 Material e Métodos

IV.2.1 Material vegetal

As sementes de *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron* foram adquiridas do Instituto Florestal do Estado de São Paulo-SP.

IV.2.2 Formulação e preparação do meio de cultura

Os meios de cultura empregados consistiam de sais inorgânicos MS (Murashige & Skoog, 1962) e G (Gamborg *et al.*, 1968). Várias formulações de meios de cultura foram empregadas nas diferentes etapas do trabalho, tais como modificação no suplemento de vitaminas, reguladores de crescimento, antioxidantes e quantidade da fonte de carbono. O pH do meio de cultura foi ajustado entre 5,7-5,8, com NaOH 0,1 mol/L e HCl 1mol/L, com o auxílio de pH-metro (TECNAL modelo TEC-2). Nos meios semi-sólidos adicionou-se ainda 0,17% (p/v) de Phytigel® (Aldrich). Nas tabelas abaixo encontram-se listados os meios empregados para germinação (Tabela IV.2) e indução de calos (Tabela IV.3).

Os meios foram distribuídos em placas de Petri de 100x200 mm e frascos de 50x120 e 30x110 mm, dependendo do objetivo da formulação, fechados com filme de polietileno, papel de alumínio ou papel crepe e esterilizados em autoclave vertical a 121°C , durante 15-20 min.

IV.2.3 Procedimento de desinfecção e condições de germinação

Foram escolhidas sementes com melhores características morfológicas, para germinação *in vitro*. Todo o processo de descontaminação foi realizado em condições assépticas.

IV.2.3.1 Sementes de *A. cylindrocarpon*.

- As sementes desprovidas das alas foram lavadas 5 vezes com água destilada esterilizada (Figura IV.1).
- Foram, a seguir, lavadas com água esterilizada contendo duas gotas de detergente e novamente lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada.
- Em sequência, foram imersas em etanol 70% durante 1min e mantidas sob constante agitação.
- Posteriormente, foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada.
- As sementes intactas foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio 10% (p/v) durante 15 min.
- A seguir, foram lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada.
- Foram transferidas para placas de Petri contendo 20 mL de meio de germinação MS ou B5 (Tabela IV.2). Em cada placa, foram colocadas quatro sementes e mantidas no escuro, a 24-26°C, até atingirem o período de germinação (Figura IV.2).

Figura IV.1- Sementes de *A. cylindrocarpon* (Lorenzi, 1992).

Figura IV.2- Esquema de preparo das sementes de *A. cylindrocarpon* para germinação.

IV.2.3.2 Sementes de *A. polyneuron*

- As sementes desprovidas das alas foram lavadas cinco vezes com água esterilizada (Figura IV.3).
- Foram lavadas, com uma solução de H_2SO_4 a 10%(v/v), por 10 min.
- Foram lavadas, cinco vezes, com água destilada esterilizada.
- A seguir, foram lavadas com água esterilizada contendo duas gotas de detergente e lavadas cinco vezes com água esterilizada.
- As sementes foram imersas numa solução de etanol 70% (v/v), por 1 min .

- Depois lavadas com água destilada e esterilizada, três vezes.
- As sementes intactas foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio 10% (p/v) por 15 min.
- A seguir, lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada. Depois, foram transferidas para placas de Petri contendo 20 mL de meio de germinação MS ou B5 (Tabela IV.2). Foram colocadas quatro sementes por placas, que foram mantidas no escuro, a 24-26°C, até atingirem o período de germinação (Figura IV.4).

Figura IV.3- Sementes de *A. polyneuron* (Lorenzi, 1992).

Figura IV.4- Esquema de preparo das sementes de *A. polyneuron* para germinação

Tabela IV.2- Composição dos meios usados para germinação das sementes de *A. polyneuron* e *A. cylindrocarpon*.

Sais básicos	Cinetina (mg/L)	Tiamina (mg/L)
MS*	0,2	1,0
G*	0,2	1,0

*Todos os meios continham sacarose 30g/L., Phytigel ® (1,7g/L).

IV.2.4 Preparação de meios de cultura para indução de calos

Para indução de calos foram feitos explantes a partir de folhas primárias, hipocótilos e radículas de *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron*. Estes foram colocados em placas de Petri contendo meio semi-sólido, com diferentes composições de auxinas e citocininas (Loyola-Vargas *et al.*, 1986, Brodelius, 1986; Brodelius *et al.*, 1988) (Tabela IV.3, IV.4, IV.5 e IV.6). As placas contendo os explantes foram incubadas no escuro, à temperatura de 24-26°C.

Tabela IV.3- Composição dos meios usados para indução de calos de *A. polyneuron* e *A. cylindrocarpon*.

Meios	Sais	mio-inositol	tiamina-HCl	NAA	Cinetina	BAP	2,4-D	Cisteína	AG ₃
ML1	MS	100	0,4	2,0	0,2	-	-	-	-
ML2	MS	100	0,1	2,0	-	0,2	-	-	-
ML3	MS	-	-	-	1,0	-	5,0	-	-
ML4	MS	-	-	0,02	-	0,05	-	-	0,02
ML5	MS	-	-	0,01	-	0,025	-	-	0,01
ML6	MS	100	0,1	2,0	1,0	0,2	-	-	-
ML7	MS	200	0,4	4,0	1,0	0,4	-	-	-
ML8	MS	-	-	0,2	-	-	-	-	0,5
ML9	MS	-	-	-	-	-	0,5	-	-
ML10	MS	-	-	-	-	-	5,0	-	-
ML11	MS	-	-	-	-	0,5	5,0	-	-
ML12	MS	-	-	5,0	-	-	-	-	-
ML13	MS	-	-	5,0	-	0,5	-	-	-
ML14	G	-	-	-	0,2	-	1	-	-
ML15	G	-	-	2,0	0,1	-	-	-	-
ML16	G	-	-	-	0,2	-	2,0	5,0	-
ML17	G	-	-	4,0	0,1	-	-	-	-
ML18	G	-	-	4,0	-	0,1	-	-	-
ML19	G	-	-	-	2,0	-	2,0	-	-
ML20	G	-	-	-	0,1	-	4,0	-	-

* Todos os meios continham sacrose 30g/L. Concentração em (mg/L) dos meios utilizados.

Tabela IV.4- Variação na concentração de Tiamina, ANA, BAP e 2,4-D em meios para indução de calos de *A. cylindrocarpon*.

Meios *	Sais	Vitaminas	Mio-inositol (mg/L)	Tiamina (mg/L)	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)	2,4D (mg/L)
ML21	G	G	200	0,4	---	0,5	5,0
ML22	"	"	100	"	---	"	1,0
ML23	"	"	"	"	---	"	2,5
ML24	"	"	"	"	---	"	4,0
ML25	"	"	"	"	---	"	10,0
ML26	"	"	"	"	---	1,0	"
ML27	"	"	"	"	---	2,0	"
ML28	"	"	"	"	---	5,0	"
ML29	"	"	"	"	---	10,0	"
ML30	"	"	"	8,0	---	0,5	"
ML31	"	"	"	16,0	---	"	"
ML32	"	"	"	24,0	---	"	"
ML33	MS	MS	100	0,4	1,0	0,22	---
ML34	"	"	200	0,4	5,0	"	---
ML35	"	"	"	0,4	10,0	"	---
ML36	"	"	"	0,4	15,0	"	---
ML37	"	"	"	0,4	20,0	"	---

* Todos os meios continham : sacarose (30g/L), Phytigel® (1,7g/L) e mistura antioxidante (1mg/L).

Tabela IV.5- Composição dos meios variando alguns reguladores de crescimento.

Meios	Picloram (mg/L)	Água de coco (mL/L)	Cisteína (mg/L)	Ác. Nicotínico (mg/L)	Piridoxina (mg/L)	Mio-inositol (mg/L)	Picloram+ 2,4-D (mg/L)
ML38	2	50	100	1	1	700	-
ML39	-	50	100	1	1	700	2

*Todos os meios continham: sacarose (30g/L), Phytigel® (1,7g/L) e mistura antioxidante (1mg/L).

Tabela IV.6- Variação dos tipos químicos de reguladores de crescimento em meios para indução dos calos *A. cylindrocarpon*.

Código do meio	Picloram (mg/L)	BAP (mg/L)	2,4-D (mg/L)
ML40	0,10	0,5	-
ML41	0,25	0,1	-
ML42	0,25	0,25	-
ML43	0,25	0,50	-
ML44	0,50	0,10	-
ML45	0,50	0,25	-
ML46	0,50	0,50	-
ML47	0,75	0,10	-
ML48	0,75	0,25	-
ML49	0,75	0,50	-
ML50	0,75	0,50	-
ML51	1,00	0,50	-
ML52	0,05	0,10	0,25
ML53	0,05	0,10	0,25
ML54	0,10	0,10	0,25
ML55	0,10	0,25	0,25
ML56	0,20	0,10	0,25
ML57	0,20	0,25	0,25
ML58	0,25	0,10	0,25
ML59	0,25	0,50	0,25
ML60	0,50	0,50	0,25

Meio MS (Murashige & Skoog, 1965). Todos os meios continham:
sacarose (30g/L), Phytigel® (1,7g/L) e mistura antioxidante (1mg/L).

IV.2.5 Obtenção de suspensões celulares de *A. cylindrocarpon*.

Os calos friáveis, obtidos de diferentes explantes, foram utilizados para o estabelecimento de culturas de células, em suspensão. Os calos foram inoculados em um meio de cultura de formulação idêntica àquela em que foram induzidos, porém sem o agente geleificante (Tabela IV.3, IV.4, IV.5). As suspensões celulares foram estabelecidas a partir de 2 a 4 calos (~ 3 g). As culturas líquidas foram mantidas a 25°C, sob iluminação (1500 lux) e agitação em um agitador orbital (100 rpm) constante.

IV.2.6 Determinação da curva de crescimento da suspensão celular de *A. cylindrocarpon*.

As suspensões celulares de *A. cylindrocarpon* apresentaram melhor crescimento nos meios ML22 e ML37 (Tabela IV.4), motivo pelo qual ambos foram escolhidos para determinação da curva de crescimento.

As suspensões celulares foram incubadas a 25°C sob iluminação (1500 lux) e agitação em um agitador orbital (100 rpm) constantes.

O crescimento da cultura celular foi medido pelo volume total de células da cultura. Esse volume é medido em tubo de diâmetro pré-determinado, fixado e comunicante ao erlenmeyer utilizado para obtenção dos dados da curva de crescimento (Figura IV.5). A medida da altura (cm) ocupada pela massa de células empacotadas, determinada ao inclinar-se o erlenmeyer; em função do tempo gasto para atingir esse estágio de desenvolvimento fornece a taxa de crescimento de uma cultura.

A curva de crescimento da cultura de *A. cylindrocarpon* foi determinada por esse método, sendo as medidas tomadas a intervalos de 4 dias, até ser atingida a fase estacionária da curva de crescimento (Constabel & Vasil, 1987).

As suspensões celulares de *A. cylindrocarpon* obtidas no meio ML22 e ML37 a partir de calos obtidos de explantes de folhas primárias e hipocótilos foram observadas em microscópio (NikON R modelo eclipse E600). Posteriormente, as lâminas contendo a suspensão celular foram coradas com revelador para alcalóides (Reagente de Dragendorff) e observadas novamente.

Figura IV.5- Erlenmeyer adaptado, utilizado na obtenção da curva de crescimento das células de *A. cylindrocarpon*.

IV.3 Caracterização química da cultura de *A. cylindrocarpon*.

IV.3.1 Extração dos alcalóides das células e do meio de cultura de *A. cylindrocarpon* e determinação do perfil cromatográfico desses extratos por CLAE.

As células da suspensão e do meio de cultura obtidos de *A. cylindrocarpon* foram submetidas a processo de extração para obtenção dos alcalóides (Esquema IV.1). Posteriormente, os alcalóides obtidos das células da suspensões e do meio de cultura foram analisados por CLAE utilizando-se um cromatógrafo HP 1050 com injetor automático (Shimadzu) Sil-9A, equipado com detector UV/VIS ajustado para 280 nm. A análise foi efetuada em uma coluna ODS-Hypersil C18 (5 μ m, 100x2,1 di mm), com fluxo de 0,6 mL/min e volume de injeção 10 μ L. Como eluente, empregou-se um gradiente de uma mistura de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1mmol/L e acetonitrila 97:3 (solvente A) e ACN (solvente B). O sistema de gradiente está representado na tabela abaixo (Tabela IV.7).

Tabela IV.7- Gradiente empregado para a análise dos alcalóides extraído das células da suspensão e do meio de cultura de *A. cylindrocarpon* analisados por CLAE.

Tempo (min)	% Solvente A ^a	% Solvente B ^b
0	100	0
2	100	0
40	0	100
45	0	100
50	100	0

^a Solvente A: (NH₄)₂HPO₄ 1mmol/L+ACN 97:3 (v/v)

^b Solvente B: ACN

Esquema IV.1- Esquema de extração dos alcalóides das células em suspensões e do meio de cultura de *A. cylindrocarpon*.

IV.4 Resultados e Discussão

IV.4.1 Germinação das sementes de *A. polyneuron* e *A. cylindrocarpon*.

A descontaminação das sementes de *A. cylindrocarpon* segundo o protocolo descrito foi suficiente para permitir uma germinação eficiente. O mesmo método, quando empregado para *A. polyneuron*, não foi efetivo, sendo a taxa de contaminação das sementes de 60%; a germinação das sementes não infectadas não ocorreu mesmo após 6 semanas de incubação. Assim, foi necessário desenvolver outro método para a desinfecção. O uso de solução de ácido sulfúrico foi essencial para a escarificação das

sementes, pois esse procedimento diminuiu a taxa de contaminação até valores inferiores a 10% e obteve-se a germinação. Observamos que as sementes de ambas as espécies desenvolveram-se muito bem nos dois tipos de meios testados, sem nenhuma diferença quanto à taxa de germinação. Em testes estatísticos (t-student; Levin, 1987) nível de significância menor foi que 0,05%. A germinação das sementes de ambas as espécies ocorreu entre a segunda e a quarta semana depois do início da cultura, com uma maior incidência na terceira semana (Tabela IV.8). Após a sexta semana, praticamente não mais se observou germinação, em ambas as espécies. As sementes de *A. polyneuron*, por terem sido tratadas com ácido sulfúrico, apresentaram germinação em período mais curto do que as de *A. cylindrocarpon*. Para os meios testados, a taxa de germinação das sementes de ambas as espécies, apresentou valores que variaram de 95 a 98%. (Tabelas IV.8 e IV.9; Figuras IV.6 e IV.7)

É comum observar uma ampla variação, entre as espécies, com relação à taxa de germinação e à viabilidade das sementes. À viabilidade foi maior em sementes recém-adquiridas e diminuiu drasticamente com o tempo de armazenagem, sendo a viabilidade inicial mantida por três meses. O período curto de viabilidade das sementes de *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron* dificultou a continuidade dos experimentos.

Para verificação da influência da luz na germinação *in vitro*, experimentos foram conduzidos no escuro em paralelos seguindo os mesmos protocolos desenvolvidos para as sementes de cada uma das espécies, não sendo observados diferenças significativas.

Tabela IV.8- Efeito da composição do meio sobre a germinação de *A. cylindrocarpon*.

Código do meio	Sais basais	Suplemento (mg/L)		Tempo de germinação (semanas)	Percentagem de germinação $X \pm e.p$
		cinetina	tiamina		
1	^a MS	0,2	1,0	2-3	95,7 $\pm$ 0,7
2	^b G	0,2	1,0	2-3	97,4 $\pm$ 0,8

^aMS, Murashige & Skoog, 1962.

^b Gamborg, 1968.

Tabela IV.9- Efeito da composição do meio sobre a germinação de *A. polyneuron*.

Código do meio	Sais basais	Suplemento (mg/L)		Tempo de germinação (semanas)	Percentagem de germinação ($X \pm e.p$)
		cinetina	tiamina		
1	^a MS	0,2	1,0	1-2	98,5 $\pm$ 0,4
2	^b G	0,2	1,0	1-2	98,4 $\pm$ 0,2

^aMS, Murashige & Skoog, 1962

^b Gamborg, 1968

Figura IV.6- Germinação *in vitro* de *A. cylindrocarpon*.

Figura IV.7- Germinação *in vitro* de *A. polyneuron*.

IV.4.2 Indução de calos

Em *A. polyneuron* e *A. cylindrocarpon*, a indução de calos foi observada principalmente em explantes de folhas primárias e hipocótilos, que apresentaram calos mais desenvolvidos (Tabelas IV.10 e IV.11; Figuras IV.8 e IV.9). Em ambas as espécies, foi possível observar formação de tecido caloso nos seguintes meios: ML2, ML3, ML6, ML7, ML1, ML10, ML11 e ML15 (Tabelas IV.10 e IV.11). Os calos formados nesses meios apresentaram coloração amarelo-pálida e consistência pouco friável, sendo de difícil emprego no estabelecimento de suspensões celulares. Foi observada uma menor frequência de indução nos explantes provenientes de folhas. Neste material, inicialmente surgiam calos de coloração branca, nas bordas das folhas, que rapidamente tornavam-se escuros, devido a processo de oxidação decorrente, provavelmente, da produção de compostos fenólicos (Street, 1977; Lercari *et al.*, 1999). Em outras composições contendo altas concentrações de 2,4-D e baixas de BAP, codificada como ML11 (Tabelas IV.10 e IV.11) foi observada, para *A. cylindrocarpon*, a formação de calos de cor amarelo-clara de consistência friável e de desenvolvimento lento.

Com a espécie *A. polyneuron* foram realizadas algumas tentativas de obtenção de suspensões celulares com calos cultivados no meio ML3, apresentou os melhores resultados em experimentos prévios (Tabela IV.10 e IV.11). As mudanças climáticas impossibilitaram a aquisição das sementes para obtenção de explantes, o que

impossibilitou a realização de outras tentativas de indução de calos para posterior obtenção de suspensões celulares com a espécie *A. polyneuron*.

Tabela IV.10- Efeito de reguladores de crescimento na indução de calos de *A. cylindrocarpon*.

Código do meio	Indução de calos das diferentes partes dos explantes		Tempo de indução (semana)	Coloração dos calos
	Folhas primárias	Hipocótilos		
ML2	0	73,49 ± 2,9	5	amarelo-claro
ML3	0	55,92 ± 1,7	5	amarelo-claro
ML6	0	43,70 ± 1,0	5	amarelo-claro
ML7	0	31,57 ± 1,4	6	amarelo-claro
ML10	0	20,00 ± 0,6	5	branco
ML11	92,12 ± 4,2	91,07 ± 0,4	5	amarelo-claro
ML15	0	15,51 ± 1,1	6	branco

Cada resultado é média ± e.p de 5 experimentos.

Tabela IV.11- Efeito de reguladores de crescimento na indução de calos de *A. polyneuron*.

Código do meio	Indução de calos das diferentes partes dos explantes		Tempo de indução (semana)	Coloração dos calos
	Folhas primárias	Hipocótilos		
ML2	0	$90,43 \pm 0,4$	5	amarelo-claro
ML3	84 ± 33	$95,08 \pm 1,1$	5	amarelo-claro
ML6	0	$57,33 \pm 1,2$	5	amarelo-claro
ML7	0	$49,33 \pm 5,4$	6	amarelo-claro
ML10	0	$33,45 \pm 1,6$	5	branco
ML11	$75,12 \pm 4,2$	$86,40 \pm 0,6$	5	amarelo-claro
ML15	0	$25,09 \pm 0,1$	6	branco

Cada resultado é média $\pm$ e.p de 5 experimentos.

($p < 0,05$).

Figura IV.8- Calos de *A. cylindrocarpon* no meio ML11.

Figura IV.9- Calos de *A. polyneuron* no meio ML3.

Esses ensaios demonstraram que os meios de indução mais eficientes são: ML21, ML22 ML33. Com o intuito de acelerar a indução e a velocidade de crescimento foram ensaiadas ovas formulações para indução de calos.

Os calos formados nestes meios apresentavam coloração amarelo-pálida e eram relativamente friáveis. Os calos provenientes das folhas apareciam nas bordas dos explantes e eram de coloração branca, porém estes logo escureciam e morriam (alguns destes sobreviviam quando separados do tecido-mãe). Para manutenção e crescimento da cultura foram testados novos meios, formulados a partir da variação de alguns componentes do meio ML22 (ML26, ML27, ML28, ML30, ML31, ML32).

O melhor desenvolvimento da cultura foi observado em ML22 (para hipocótilo e radículas) e ML28 (para os explantes de folhas primárias). No meio ML22, a frequência de calos friáveis, com características adequadas para iniciar culturas de células em suspensão, foi maior do que nos outros meios testados. Também foi testada a composição basal de sais LS (George & Putt 1987; Linsmaier & Skoog, 1965), com resultados positivos, observando-se indução de calos friáveis a partir de explantes de folhas primárias e hipocótilo. Contudo ainda se necessitava de um período de 6 semanas para o desenvolvimento dos calos. Por este motivo, foram realizadas modificações na concentração da auxina empregada (ANA) originando os meios ML34, ML35, ML36 e ML37. Esses meios foram testados em explantes de hipocótilos e folhas primárias. O meio que apresentou melhor resultado foi o ML37, capaz de desenvolver calos grandes com coloração amarelo-clara e friáveis, no período de 4 semanas.

A obtenção da morfogênese *in vitro* é, atualmente, um processo empírico onde são testadas para cada espécie, ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, os seguintes fatores: fonte de explante, composição mineral do meio de cultura e também suas vitaminas e fontes de carbono, balanço hormonal, condições ambientais e estado celular inerente ao tecido-mãe, bem como suas modificações fisiológicas, bioquímicas e fatores genéticos (Skoog & Miller, 1957; Tran Thanh Van *et al.*, 1973; Tran Thanh Van *et al.*, 1974; Cousson & Tran Thanh Van, 1980).

Devido ao processo empírico que envolve a cultura de células, e aos vários fatores responsáveis pelo desenvolvimento do processo de diferenciação celular, foram necessárias mudanças nos protocolos estabelecidos para as culturas de células de *A. cylindrocarpon*, ou seja, variou-se a quantidade dos principais hormônios, auxinas e citocininas utilizados na morfogênese. Existem evidências, obtidas através da variação na proporção auxina/citocininas em culturas de células vegetais, de que esses hormônios apresentam um efeito indireto (Peres *et al.* 1999). Esse efeito é facilmente observável quando se utilizam

auxinas sintéticas, como 2,4 D (ácido dicloro-fenoxi-acético), o ANA (ácido naftaleno-acético), ou citocininas sintéticas como a benzi-lamino-purina (BAP).

Assim, foram testadas outras substâncias com efeito de auxinas com o objetivo de induzir calos em um período menor de tempo. Estas formulações estão apresentadas na Tabela IV.3. A auxina empregada nestes meios foi o picloram (ácido-4-amino- 3,5,6-tricloro-picolínico), um herbicida que pode atuar como regulador de crescimento (Dinehkumar *et al.*, 1995).

Os meios ML48-ML60 (Tabela IV.7) não apresentaram resultados promissores, pois os explantes de folhas primárias escureciam com muita rapidez e os explantes obtidos de hipocótilos induziram calos com muita dificuldade, apenas nas bordas dos hipocótilos e não apresentavam crescimento. Alguns dos testes de variação dos reguladores de crescimento (Tabela IV.7) apresentaram resultados promissores. Os meios ML40-ML47 induziam calos friáveis com coloração amarelo-claro e branca, apresentando um rápido crescimento em quatro semanas. Esses meios podem constituir outra fonte para o crescimento de calos friáveis e são também uma tentativa de desenvolvimento mais rápido das suspensões celulares de *A. cylindrocarpon*. Também foram testados meios que continham na sua composição água de côco, pois a mesma possui citocininas naturais que poderiam promover um crescimento celular mais rápido. No entanto, os experimentos realizados com água de côco não apresentaram resultados positivos para indução de calos de *A. cylindrocarpon* (Tabela IV.5).

Apesar de seguirmos os princípios básicos de testar empiricamente diversos parâmetros, muitas vezes o desenvolvimento da cultura foi lento e não houve indução de calos tão friáveis quanto necessário para a obtenção de suspensões celulares das espécies em estudo. Um fator que poderia explicar esse comportamento seria a ocorrência de falhas em uma das seguintes etapas do processo de morfogênese *in vitro*: 1) indução; 2) divisão celular e 3) diferenciação (Allan, 1988). Alternativamente, estas falhas também poderiam estar relacionadas a outros fatores, tais como: a proporção entre os reguladores de crescimento (auxina/citocinina) para indução da morfogênese, totipotência das células vegetais e variáveis genéticas (Tran Than Van, 1981).

IV.4.3 Suspensões celulares de *A. cylindrocarpon*.

As primeiras tentativas de obtenção de culturas de células em suspensão foram feitas com os meios ML22 e ML3, a partir de calos obtidos de explantes de folhas primárias e hipocótilos. As suspensões celulares apresentaram coloração amarelo-clara e crescimento lento (Figura IV.10). A observação, ao microscópio, das suspensões celulares de *A. cylindrocarpon* mostrou células desenvolvidas que, ao serem coradas com revelador para alcalóides (Reagente de Dragendorff), exibiram formação de precipitado de cor amarelo-tijolo, indicando a presença de alcalóides nos vacúolos. Também foi observada a formação de precipitados amarelo-tijolo no citoplasma e no meio de cultura, indicando que os alcalóides produzidos dentro da célula estavam em diferentes compartimentos celulares. Esse transporte de alcalóides entre os diferentes compartimentos celulares foi também observado na espécie *Catharanthus roseus* (Deus-Neumann & Zenk, 1984; Deus-Neumann & Zenk, 1986; Blom *et al.*, 1991) (Figura IV.11).

Figura IV.10- Suspensão celular de *A. cylindrocarpon*.

Figura IV.11- Células da suspensão celular de *A. cylindrocarpon* com aumento de 400 vezes.

IV.4.4 Curva de crescimento da suspensão celular de *A. cylindrocarpon*.

Dentre as diversas técnicas de medida de aumento celular, optamos pelo método descrito no item IV.2.6, devido à reduzida quantidade de material celular disponível para a realização dos inóculos. As medidas foram feitas durante o ciclo de crescimento celular, que compreende algumas fases, que refletem a alteração contínua do ambiente, até que crescimento das células vegetais esgota definitivamente os nutrientes do meio de cultura e a produção dos metabólitos (Otha & Vepoorte, 1992).

Na curva de crescimento de *A. cylindrocarpon*, observamos uma fase *lag* de crescimento refratário que durou aproximadamente 2 dias, seguida de uma fase de crescimento exponencial e, outra de crescimento linear, com duração de 10 a 15 dias. As fases de desaceleração progressiva, período em que as células não mais se dividem e estacionária teve seu início em torno dos 20 dias de cultura, indicando um esgotamento de nutrientes do meio e morte celular (Figura IV.12).

Dados de literatura mostram que a duração das fases de crescimento varia segundo as espécies vegetais estudadas e dentro de uma mesma espécie. As modificações na

formulação do meio de cultura podem alterar a duração das diferentes fases (Constabel & Vasil, 1987). A produção de metabólitos também pode sofrer alteração ao longo da curva de crescimento como, por exemplo, nas suspensões celulares de *Catharanthus roseus* e *Rauwolfia serpentina* (Constabel & Vasil, 1987; Dodds & Roberts, 1985; Dagnino, 1995; Endress, 1994).

Figura IV.12- Curva de crescimento das células de *A. cylindrocarpon*. Cada resultado representa a $\bar{X} \pm \text{e.p}$ de 3 experimentos.

IV.4.5 Análise, por CLAE, dos alcalóides contidos nos extratos das células das suspensões e do meio de cultura de *A. cylindrocarpon*.

A comparação dos cromatogramas obtidos dos alcalóides totais das folhas e das suspensões celulares demonstrou que as folhas apresentam uma composição química mais complexa do que a observada para as suspensões celulares. Os alcalóides majoritários *N*-benzoíl-cilindrocarina e *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina estão presentes nas suspensões celulares, em proporção diferente daquela encontrada nas folhas adultas e próxima do observado em plântulas jovens. Tanto nas células como no meio de cultura a *N*-benzoíl- cilindrocarina ocorre maior concentração. Estes resultados demonstram que o metabolismo nas suspensões celulares e nas folhas adultas é diferente (Figura IV.13).

Figura IV.13- Composição dos alcalóides produzidos por *A. cylindrocarpon* (1) $tr=23,57$ min corresponde a *N*-benzoíl-cilindrocarina e (2) $tr=25,22$ min corresponde a *N*-cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, (a) cromatograma das folhas da planta adulta (b) células da suspensão (c) meio de cultura das suspensões.

IV.5 Referências bibliográficas

- ALLAN, E. Plant cell culture. *In*: Stafford, A., Warren, G. Plant cell and tissue culture. London: Open university Press Milton Keynes., p. 2-24. 1998.
- BLOM, T. Transport and accumulation of alkaloids in plant cell. Leiden, 117p, 1991. (Tese de Doutorado- Leiden University.
- BRODELIUS, P. *In*: Handbook of plant cell culture (ed.): D.A Evans et al., Macmillan, London, 287p, 1986.
- BRODELIUS, P., FUNK, C., SHILLITO, R.D. Permeabilization of cultivated plant cells electroporation for release of intracellularly stored secondary products. *Plant. Cell. Rep.*, v.7, p. 186-188, 1988.
- CHARLWOOD, B. V. & RHODES, M. J. C. Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Oxford University Press, v. II, p 288, 1990.
- CHARLWOOD, K.A. , BROWN, S., CHARLWOOD, B.V. *In*: Manipulating secondary metabolism in culture (ed.): R.J. Robins and M.J.C. Rhodes. Cambridge University Press, Cambridge, p. 195,1988.
- CONSTABEL, F & VASIL, I. K. Cell culture in phytochemistry. Volume 4 *In*: VASIL, I. K. (ed in chef) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press. 1987.
- COUSSON, A. & TRAN THANH VAN, K. M. *In vitro* control of de new flower differentiation from tabacco thin cell layer on liquid medium. *Physiol. Plant.*, v. 51, p. 77-84, 1980.

- DAGNINO, D. E. Alkaloids metabolism in plant cell suspension cultures with special emphasis on product breakdown. Leiden, 74p, 1989. (Tese de Doutorado- Leiden University).
- DEUS-NEUMANN, B. & ZENK, M. H. A highly selective alkaloids uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta.*, v. 162, p. 250, 1984.
- DEUS-NEUMANN, B. & ZENK, M. H. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve ion trap mechanism, *Planta.*, v. 167, p. 44, 1986.
- DINESHKUMAR, V., KIRTI, P.B., SACHAN, J. K.S., CHOPRA, V.L. Picloram induced somatic embriyogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant. Sci.*, v. 109, p. 207-213, 1995.
- DODDS, J. H. & ROBERTS, L. W. *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2 ed. Cambridge University Press, New York, 232p, 1985.
- ENDRESS, R., Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag, Germany, 353p, 1994.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, v.50, p. 151-158, 1968.
- GEORGE, E.. F. & PUTTOCK, R. J. M. *In: Plant Culture Media.*, v. 1, p. 405, 1987.
- HARRIS, A. L., NYLUND, B., CAREW, D. P. Tissue Culture of certain members of the Apocynaceae. *Lloydia.*, v. 27, p. 322-327, 1964.
- LECLERCQ, J. Interêts des cultures de cellules et de tissus vegetaux *in vitro* et leurs applications pharmaceutiques. *J. Pharm. Belg.*, v. 39, p. 401-408, 1984.

- LERCARI, B., MOSCATELLI, H. A., GHIRARDI, E., NICECEFORO, R., BERTRAM, L.
Photomorfogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. *Plant. Sci.*, v.140, p.53-64, 1999.
- LEVIN, J., Estatística Aplicada a Ciência Humanas. São Paulo, Harbra Ltda, 392p 1987.
- LINSMAIER, E. M. & SKOOG, F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plantarum.*, v. 18. p. 101-127, 1965.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras, Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, p. 21, 25, 1992.
- LOYOLA-VARGAS, V.M., VELASCO, C., MENDEZ, B.M. OROPEZA. C., REYES, J., ROBERT, M.L., *In*: International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Biosynthesis of alkaloids in green callus of *Catharanthus roseus*. *In*: somers DA, Gengebach, BG. Biesboer D.D., Hackett, W.P., Green, C.E.. (ed.): Minneapolis: International Association for Planta Tissue, p.67,1986.
- MORENO, P. R.H., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, v. 42, p. 1-25, 1995.
- MORRIS, P. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. III Alkaloids metabolism in cultured leaf tissue and primary callus. *Planta Med.*, v. 25, p. 127-132, 1986.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, v.15, p.473-497, 1962.
- OBITZ, P., STÖCKIGT, J., MENDONZA, L. A., AIMI, N., SAKAI, S. I. Alkaloids from cell cultures of *Aspidosperma quebracho-blanco* *In*: PELLETIER, S. W Alkaloids chemical and biological perspectives v.9, p.236-246, 1983.

- OKSMAN-CALDENTY & HILTUNEN, RAIMO. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Corps Res.*, v. 45, p. 57-69, 1996.
- OTHA, S. & VEPOORTE, R. Some accounts of variation (heterogeneity and/ or instability) in secondary metabolites production by cell culture. *Annu. Rep. Nat. Sci. Home. Econ.*, v. 32, p. 9-23, 1998.
- PERES, L. E.P., AMAR, S., KERBAUY, G. B., SALATINO, A. A., ZAFFARI, G. R., MERCIER, H., Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). Into buds. *J. Plant. Physiol.*, v. 155, p. 551-555, 1999.
- ROUT, G. R., SAMANTARAY, S., DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotech. Adv.*, v. 18, p. 91-120, 2000.
- SCHULTE, A E., DURÁN, E. M. L., HEIJDEN, R. V. D., VERPOORTE, R. Mevalonate kinase activity in *Catharanthus roseus* plants and suspension cultured cells. *Plant. Sci.*, v. 150, p. 59-69, 2000.
- SKOOG, F. & MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* v. 11, p. 118-231, 1957.
- STREET, H. E. Plant Tissue Culture. Second Edition. Blackwell Scientific Publications Oxford, 614p, 1977.
- TRAN THANH VAN, K. M. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explant of *Nicotiana tabacum* L. *Planta.*, v. 115, p. 87-92, 1973.
- TRAN THANH VAN, K.M. Control of morphogenesis in vitro cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, v. 32, p. 291-311, 1981.

TRAN THANH VAN, K.M., NGUYEN, T. D., CHLYAH, A. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissues of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, v. 119, p. 149-159, 1974.

VEPOORTE, R., HEIDJEN, V. D., SCHRISPSEMA, J. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: presents status and prospects. *J. Nat. Prod.*, v. 56, p. 186-207, 1993.

CAPÍTULO V

ATIVIDADE BIOLÓGICA

V.1 Generalidades.

Devido ao fato da grande maioria dos alcalóides indólicos apresentarem interessantes atividades biológicas, essas substâncias têm sido testadas em diferentes ensaios. Várias espécies da família Loganiaceae e Apocynaceae cujos principais constituintes são alcalóides apresentam atividade antimicrobiana (Verpoorte *et al.*, 1978, 1982a e b).

Vários alcalóides apresentam atividade antimicrobiana tais como: afinisina, aspidospermina, ibogamina, iboxigaina, isoraunescina, isovoacangina e tabernantina (Mitscher *et al.*, 1972a). Em *Vallesia antillana*, os alcalóides aparicina e aspidospermina apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e negativas (Verpoorte *et al.*, 1983). Alguns alcalóides também apresentaram atividade antifúngica (Quetin-Leclercq *et al.*, 1995).

Duas espécies de *Aspidosperma* apresentaram atividade antimicrobiana, *A. excelsum* e *A. marcgravianum* (Verpoorte *et al.*, 1983). A espécie *A. quebracho-blanco* apresentou ações febrífuga, tônica, antiasmática e contra doenças cardíacas (Floriani, 1937). Derivados sintéticos de alcalóides do tipo aspidospermatano apresentaram atividade antimalárica (Mitaine-Offer *et al.*, 2002).

Todas essas menções de atividade biológica em alcalóides de *Aspidosperma*, levaram-nos a testar os alcalóides obtidos de *A. polyneuron* e *A. cylindrocarpon* para atividades antimicrobiana, antitumoral e antimalárica.

V.2 Material e Métodos

V.2.1 Estudo da atividade biológica dos alcalóides de *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron*.

V.2.2 Bioensaio com cultura de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os ensaios para avaliação da atividade antitumoral foram realizadas no Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) com colaboração da Dr^a. Maria Cláudia Marx Young.

A triagem biológica foi feita com três tipos de linhagens de *S. cerevisiae* (Rad+, RS321 e Rad52Y). A linhagem Rad+ é definida como tipo selvagem, enquanto Rad52Y e RS321 são linhagens mutantes produzidas a partir de Rad+ (Figura V.1). A interpretação dos resultados deste bioensaio está fundamentada na diferença de tamanho do halo de inibição provocada pelos extratos bioativos nas culturas de cada linhagem. A resposta diferencial entre uma levedura que faz reparos (Rad+) e uma que não é capaz de reconstruir a sequência do DNA (Rad52Y) na presença de uma determinada amostra (extrato bruto e /ou substância pura) é indício de atividade em uma amostra. Portanto, para verificar a atividade da amostra testada frente às linhagens mutantes *S. cerevisiae* mede-se o halo de inibição da cultura (Jonhson *et al.*, 1986). Os alcalóides obtidos das folhas e dos ramos de *A. cylindrocarpon* foram diluídos e ensaiados como descrito por Gunatilaka *et al.*, (1994).

Figura V.1- Esquema ilustrativo das mutações sofridas pelas linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no bioensaio.

V.2.3 Bioensaio para avaliação de atividade antifúngica.

Os ensaios para determinação de atividade antifúngica foram realizadas no Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) com colaboração da Dr^a. Maria Cláudia Marx Young.

Foi usada a técnica de autobiografia (Homans & Fuchs, 1970), para a determinação de substâncias fungitóxicas.

Foram utilizados os fungos *Clasdosporium clasdosporoides* e *Clasdosporium sphaerospermum* como reveladores: o primeiro é sapróbio e o segundo, fitopatogênico. Estas duas espécies foram escolhidas por não serem patogênicas ao homem,

produzirem uma grande quantidade de esporos e apresentarem crescimento uniforme, em cultura.

As amostras foram aplicadas em cromatoplasacas Merck e, após evaporação completa do solvente, meio de cultura líquido contendo esporos do fungo revelador, foi nebulizado sobre as placas. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C em câmara úmida, durante 48h, em ausência de luz.

Após a incubação, pôde-se observar o crescimento do fungo sobre toda a placa exceto nas áreas onde se encontram as substâncias fungitóxicas. Existe uma relação entre a inibição e a concentração da amostra aplicada, pode-se avaliar a atividade antifúngica de uma substância por comparação de seu limite de detecção com os de antibióticos usados como padrão (Nistatina 1µg). Dessa forma, pode-se avaliar se uma substância tem ou não ação antifúngica (Homans & Fuchs, 1970; Van der Sluis & Van Arkel, 1981).

V.2.4 Ensaio antibacteriano.

V.2.4.1 Preparação da amostra.

As frações de alcalóides totais de ambas as espécies foram ressuspensas em uma solução de etanol:Tween20:água (1:1:98 v/v/v). Com a solução obtida foi realizado o teste antimicrobiano.

V.2.4.2 Preparação do inóculo.

Os microrganismos usados nos experimentos foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Escherichia coli* (ATCC 10531) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), incubados por 24 horas em tubos de ensaios contendo meio antibiótico nº 1 (Merck). Após este período, foi preparada a suspensão de microorganismo em solução salina (0,9%) e feita a leitura de transmitância de 20% em comprimento de onda $\lambda = 560\text{nm}$.

V.2.4.3- Método de difusão em ágar.

O meio foi preparado por adição de uma camada basal de 10mL de ágar antibiótico nº 1 (Merck) em placas de Petri de 10 mm de diâmetro. Após solidificação da camada basal, foi distribuída sobre ela a mistura de 1 mL de suspensão de microorganismo com 4 mL de ágar antibiótico nº 1 (Merck). Quando o meio adquiriu consistência sólida, foram feitos orifícios de 3,5 ou 5,0 mm de diâmetro, na superfície do meio. A amostra e o controle (Cloranfenicol 1mg/mL) foram colocados dentro dos orifícios e as placas foram incubadas por um período de 24 horas, após as quais foram medidas as zonas de inibição.

V.2.5 Bioensaio para verificação de atividade antimalárica.

Os testes antimaláricos realizados *in vitro* foram feitos no Laboratório de Malária e Entomologia da SUCEN, em São Paulo.

V.2.5.1 Critérios de Inclusão

Foram usadas amostras de sangue de pacientes de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 10 anos, apresentando parasitemias maiores que 5.000 formas assexuadas por mm³ de sangue, diagnosticadas pelo Laboratório de Malária e Entomologia da SUCEN, em São Paulo.

V.2.5.2 Microtestes de Sensibilidade

Foram utilizadas placas de cultura de tecidos com cavidades nas quais foram colocadas diluições seriadas dos alcalóides totais de *A. cylindrocarpon*. Para as diluições, foi utilizada água desmineralizadas. As placas foram mantidas a 37°C até a completa secagem das soluções contendo alcalóides e depois estocadas a 4°C, até o momento de sua utilização. Os isolados da cepa Palo Alto (sensível à cloroquina) e cepa K1 (resistente à cloroquina) foram testados quanto à sua sensibilidade, segundo a técnica descrita por Rieckmann *et al.*, (1987) que emprega uma placa para cada microorganismo. Os isolados foram descongelados, centrifugados e os trofozoítas jovens foram ressuspensos em meio de cultura completo (com bicarbonato de sódio e soro humano) a hematócrito de 5%. Essa suspensão foi aplicada às microplacas em que tinham sido colocadas as substâncias a serem testadas. Por observação da cavidade controle (sem o material em análise) o crescimento dos parasitas foi observado até que atingissem o estágio de esquizonte. Nessa fase, foram retiradas gotas espessas do soro de cada cavidade da placa tendo sido determinado, então, o número de esquizontes. Para cada concentração da solução de alcalóides foi contado o número de esquizontes.

V.3 Resultados e discussão

V.3.1 Avaliação da atividade antitumoral com *Saccharomyces cerevisiae*.

As frações de alcalóides obtidos das folhas e ramos de *A. cylindrocarpon* foram testadas frente às cepas Rad +, RS52Y e RS321. Os alcalóides das folhas produziram um halo de inibição, frente a ambas as cepas mutantes, com diâmetros de 13,5 mm e de 15,5 mm (n=2), respectivamente (Tabela V.1). Estes resultados indicam uma

potencial atividade antitumoral para alcalóides provenientes das folhas. Os alcalóides obtidos dos ramos não foram capazes de inibir as cepas mutantes. Pelo resultado obtido verificou-se que os alcalóides das folhas de *A. cylindrocarpon* apresentaram efeitos genéticos, pois os mesmos não inibiram o crescimento da cepa Rad+ que indica ausência de toxicidade inespecífica. Como esses alcalóides não apresentaram uma grande diferença de inibição entre as cepas mutantes, estes podem estar atuando nos dois sistemas de reparo do DNA testados, mais especificamente recombinação mitótica e reparos dependentes da topoisomerase I.

Vários alcalóides e outras substâncias obtidas de várias espécies vegetais foram avaliadas quanto a esta atividade. Muitas das substâncias testadas apresentaram uma ação antitumoral, entre elas a olivacina e seus derivados (Malonne *et al.*, 2000), vincadiformina e aspidospermina (Sturdíková *et al.*, 1986), campotecina, metóxi-campototecina, coronaridina, pericalina, heineatina e 10-metóxi-eglandina (Gunasekera *et al.*, 1980), boldina (Moreno *et al.*, 1991), reserpina, esquiminina e queleritrina (Henriques *et al.*, 1991), taxol, artemisinina, swainsonina, elipticina (Quetin-Leclercq, 1994), uncarina C e uncarina E (Lee *et al.*, 1999).

Tabela V.1- Avaliação da atividade antitumoral dos alcalóides com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na presença dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

Alcalóides totais	Concentração (µg/mL)	RAD + (controle)	RS52Y Média (mm)	RS321 Média (mm)
Folhas	1000	-	X=13,5 mm	X=15,5 mm
Ramos	1000	-	-	-

V.3.2 Ensaio de bioautografia com fungos.

Os testes para atividade antifúngica foram realizados com os alcalóides totais de *A. cylindrocarpon* frente a *C. cladosporoides* e *C. sphaerospermum*. Os resultados

obtidos estão apresentados na Tabela V.2. Os alcalóides de ambas partes da planta foram capazes de inibir moderadamente o crescimento dos dois fungos com 100 µg da amostra. Estes resultados indicam uma moderada atividade frente aos fungos filamentosos.

Tabela V.2- Atividade antifúngica dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

Alcalóides totais	Concentração (µg/mL)	<i>Clasdosporium clasdosporioides</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
Folhas	100	++	++
Ramos	100	++	++

Legenda: + fraca inibição
 + + média inibição
 + + + forte inibição

V.3.3 Ensaio antibacteriano

Os alcalóides de *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron* não apresentaram nenhuma atividade antibacteriana frente aos microrganismos testados, na quantidade de 120 µg (Tabela V.3). No entanto, a espécie *A. marcgravianum* apresentou ação bacteriana (Verpoorte, 1982a).

Tabela V.3- Atividade antibacteriana dos alcalóides de *A. cylindrocarpon* e *A. polyneuron*. Os experimentos foram realizados (n=3).

Materiais testados	Parte da planta	Concentração (mg/mL)	Quantidade adicionada (μL)	Inibição do microorganismo (mm)		
				<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>A. cylindrocarpon</i>	Folhas	4,0	30	0	0	0
<i>A. polyneuron</i>	Folhas	4,0	30	0	0	0
	Ramos	4,0	30	0	0	0
Solvente			30	0	0	0
Cloranfenicol (1mg/mL)			20	23,3	19,0	17,5

V.3.4 Avaliação da atividade antimalárica, com cepa K1 e cepa Palo Alto

O teste antimalárico realizado com os isolados de *P. falciparum* K1 e Palo Alto, respectivamente, sensíveis e resistentes à cloroquina, para os alcalóides das folhas (32 μg/mL) e dos ramos (32 μg/mL) de *A. cylindrocarpon* demonstraram inibição em torno de 95% do desenvolvimento dos trofozoítas, em ambos casos.

A concentração necessária para obter 50% de inibição do desenvolvimento de esquizontes é denominada CI_{50} . Os alcalóides de *A. cylindrocarpon* apresentaram frente ao isolado Palo Alto uma CI_{50} de 13,3 μg/mL para os ramos e 10,5 μg/mL para as folhas. Com o isolado K1 os alcalóides dos ramos apresentaram CI_{50} =9,0 μg/mL e folhas CI_{50} =8,0 μg/mL (Tabela V.4) e (Tabela V.5).

Esses resultados indicam uma potencial atividade antimalárica nos extratos alcaloídicos de *A. cylindrocarpon*. Na literatura, observamos que o alcalóide aspidospermina apresentou um valor de CI_{50} entre 3,2-15,4 μmol/L, contra o *Plasmodium falciparum* (Mitaine-Offet *et. al.*, 2002). Verificou-se em nosso estudo que a espécie *A. cylindrocarpon* possui vários alcalóides com esqueleto do tipo

aspidopermatano, o mesmo tipo deste alcalóide. Existem referências que indicam o mesmo tipo de atividade para as espécie *A. polyneuron* e *A. megalocarpon* (Floriani, 1937; Weniger *et. al.*, 2001).

Tem-se tentado desvendar o mecanismo de ação de produtos naturais capazes de inibir o desenvolvimento dos esquizontes. Um dos mecanismos mais estudados e observados seria o mecanismo de transporte que regula o influxo de *L*-glutamina pela membrana do eritrócito humano contaminado durante o desenvolvimento sexual do *P. falciparum*. Foi descoberto que a *L*-glutamina é indispensável para o seu o desenvolvimento. Muitas espécies vegetais foram capazes de inibir o influxo de *L*-glutamina, como por exemplo a berberina (*Berberis*) e pimenta preta (*Piper niger*) (Elford, 1986). Os alcalóides de *A. cylindrocarpon* podem apresentar o mesmo mecanismo de ação citado acima ou este poderia estar relacionado com suas atividades genotóxicas. Contudo, ensaios mais específicos são necessários para esclarecer o seu mecanismo de ação.

Tabela V.4- Bioensaio antimalárico realizado com a cepa Palo Alto na presença dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

Concentração (mg/mL)	% inibição de desenvolvimento dos esquizontes	
	Folhas	Ramos
0,032	95,1	84,6
0,016	53,6	56,4
0,008	43,9	23,1
0,004	9,7	20,5
0,002	9,7	5,1

Tabela V.5- Bioensaio antimalárico realizado com a cepa K1 (cepa sensível) na presença dos alcalóides de *A. cylindrocarpon*.

Concentração (mg/mL)	% inibição de desenvolvimento dos esquizontes	
	Folhas	Ramos
0,032	71,4	84,6
0,016	64,2	76,9
0,008	50	41
0,004	34,1	25,6
0,002	9,5	9,8

V.4 Referências Bibliográficas

- ELFORD, B.C. L-Glutamine Influx in Malaria-Infected Erythrocytes: a Target for Antimalarials?. *Parasitol. Today.*, v. 2, p. 309-312, 1986.
- FLORIANI, L. Composicion y acción terapeutica del Quebracho Blanco y del Palo rosa (Aspidosperma). *Rev. Farmac. (Buenos Aires)*, v.25, p. 135-141,1937.
- GRAHAM, J. G., QUINN, M. L., FABRICANT, D. S., FARNSWORTH, N. R. Plants used against cancer- na estension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol.*, v. 73, p. 347-377, 2000.
- GUNASEKERA, S. P., CORDELL, A. G., FARNSWORTH, N. R. Anticancer indole alkaloids of *Ervatamia heyneana*. *Phytochemistry.*, v. 19, p. 1213-1218, 1980.
- GUNATILAKA, A. A. L., KINGSTON, D.G.I., JOHNSON, R. K. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer natural products. *Pure Appl. Chem.*, v. 66, p. 2219-2222, 1994.
- HENRIQUES, J. A. P., MORENO, P. R. H., VON POSER, G. L., QUEROL, C. C., HENRIQUES, A. T. Genotoxic Effect of Alkaloids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 86, Supl. II, p. 71-74, 1991.
- HOMANS, L. A. & FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.*, v. 51. p. 325-327, 1970.
- JOHNSON, R.H., BARTUS, H.F., HOFFMAN, G. A., BARTUS, J.O.L., MONG, S-M., FAUCETTE, L. F., MCCABE, J. A. C., MIRABELLI, C.K. *In: In vitro and in vivo Models for detection of the new Antitumor Drugs*, ed. por Hanka, L. J., Kondo, T., white, R. J., Organizing Committee of the 14th International Congress of Chemotherapy, Kioto, p. 15-26, 1986.
- LEE, K. K., ZHOU, B-N., KINGSTON, D. G. I., VAISBERG, A. J., HAMMOND, G. B. Bioactive indole alkaloids from the Bark of *Uncaria guianensis*. *Planta Med.*, v. 65, p. 759-760, 1999.
- MALONNE, H., FARINELLE, S., DECAESTECKER, C., GORDOWER, L., FONTAINE, J., CHAMINADE, F., SAUCIER, J.M., ATASSI, G., KISS, R. *In Vitro and In Vivo Pharmacological Characterizations of the Antitumor Properties of Two New Olivacine Derivatives*, S16020-2 and S30972-1. *Clinic. Canc. Res.*, v. 6, p. 3774-3782, 2000.

- MITAINE-OFFER, A. -C., SAUVAIN, M. VALENTIN, A., CALLAPA, J., MAILLÉ, M., ZÉCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine*, v. 9, p. 142-145, 2002.
- MITSCHER, L. A., LEU, R. P., BATHALA, M. S., WU, W. N., BEAL, J. L. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, v.35, p. 157-166, 1972a.
- MORENO, P. R. H., VARGAS, V. M. F., ANDRADE, H. H. R., HENRIQUES, A. T., HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutat. Res.*, v. 260, p. 145-152, 1991.
- QUETIN-LECLERCQ. Agents anticancéreux et antiparasitaires potentiels dans le domaine des alcaloïdes indoliques. *J. Pharm. Belg.*, v. 49, p. 181-192, 1994.
- QUETIN-LECLERCQ, J., FAVEL, A., BALANSARD, G., REGLI, P., ANGENOT, L. Screening for in vitro antifungal activities of some indole alkaloids. *Planta Med.*, v. 61, p. 475-477, 1995.
- RIECKMANN, K.H.; SAX, L.J., CAMPBELL, G.H., MREMA, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* - an *in vitro* microtechnique. *Lancet*, v. 1, p. 22-23, 1978.
- STURDÍKOVÁ, M., FUSKA, J., GROSSMANN, E., VOTICKÝ, Z. New Compounds with Cytotoxic and Antitumor Effect Part 6: Monomeric indole alkaloids of *Vinca minor* L. and their Effect on P388 Cells. *Pharmazie*, v. 41, p. 270-272, 1986.
- VAN BEEK, T. A., KUIJLAARS, F. L. C. THOMASSEN, P. H. A. M., VERPOORTE, R., BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobially Active from *Tabernaemontana pachysiphon*. *Phytochemistry*, v. 23, p. 1771-1778, 1984.
- VAN DER SLUIS, W. G & VAN ARKEL, J. Thin-Layer Chromatographic Assay of Photoactive Compounds (Furocoumarins) Using the Fungus *Penicillium expansum* As A Test Organism. *J. Chromatogr.* v. 214, p. 349-359, 1981.
- VERPOORTE, R. & BAERHEIM SVENDSEN, A. Alkaloids of *Strychnos dolichothyrsa*. *J. Pharm. Sci.*, v. 67, p. 171-174., 1978.
- VERPOORTE, R., KOS-KUYCK, E., TSOI, A.T. A., RUIGROG, C. L. M., JONG, G. De., BAERHEIM SVENDSEN, A. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from Surinam. *Planta Med.*, v. 48, p. 283-289, 1983.
- VERPOORTE, R., RUIGROK, C. L. M., BAERHEIM SVENDSEN, A. Medicinal plants of Surinam. II. Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. *Planta Med.*, v. 46, p. 149, 1982a.

- VERPOORTE, R., TJSIN A TSOI, A., DOORNE, H V., BAERHEIM SVENDSEN, A. Medicinal plants of Surinam. I. Antimicrobial activity of some medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, v.5, p. 221-226, 1982b.
- VERPOORTE, T. A., VAN BEEK, P. H. A. M., THOMASSEN, J., AANDEWIEL, J., BAERHEIM SVENDSEN, A. Screening of Antimicrobial Activity of some Plants Belonging to the Apocynaceae and Loganiaceae. *J. Ethnopharmacol.*, v.8, p. 287-302, 1983.
- WENIGER, B., ROBLEDO, S., ARANGO, G. J., DEHARO, E., ARAGÓN, R., MUÑOZ, V., CALLAPA, J., LOBSTIEN, ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombiam plants. *J. Ethnopharmacol.*, v. 78, p. 193-200, 2001.

CONCLUSÕES

No estudo químico das espécies *A. polyneuron* e *A. cylindrocarpon* foram identificados alcalóides indólicos do tipo aspidospermatano. Foram identificados 5 alcalóides nas folhas de *A. polyneuron*: cilindrocarina, aspidospermina, desmetil-aspidospermina, desmetóxi-aspidospermina e pirifolidina. Comparando com o material das cascas, já estudado anteriormente encontramos uma composição um pouco diferente, pois não há relato nessa espécie dos seguintes alcalóides: cilindrocarina, desmetil-aspidospermina, desmetóxi-aspidospermina e pirifolidina pela primeira vez identificados nessa espécie.

Na espécie *A. cylindrocarpon* isolamos 6 alcalóides, sendo quatro alcalóides do tipo aspidospermatano (*N*-benzoíl-cilindrocarina, *N*-benzoíl-20-hidróxi-cilindrocarina, cinamoíl-20-hidróxi-cilindrocarina e aspidospermina), um do tipo erbunano (16-*epi*-vincamina) e um do tipo hetero-ioimbano (tetra-hidro-alstonina). Os alcalóides do tipo aspidospermatano identificados nas cascas do vegetal, anteriormente relatados na literatura, tem uma composição similar aquela encontrada nas folhas do vegetal. A exceção é a aspidospermina que não havia sido relatada nessa espécie, bem como os alcalóides 16-*epi*-vincamina e tetra-hidro-alstonina.

No óleo volátil obtido das folhas de *A. polyneuron* foi possível identificar os seguintes constituintes: linalol, α -copaeno, β -cariofileno, pentadecanal, hexadecanona, (z)-3-hexenol e caureno, sendo o diterpeno caureno o componente majoritário correspondendo a 73,2% do óleo bruto. A análise do óleo volátil de *A. cylindrocarpon* permitiu a identificação de 25 dos contituíntes correspondendo a 96,1% do óleo bruto analisado. O óleo volátil de *A. cylindrocarpon* apresentou uma grande variedade na sua composição incluindo monoterpenos, sesquiterpenos e alguns ácidos graxos. Podemos observar que mesmo dentro do mesmo gênero temos uma variação da composição do óleo volátil que poderia ser alvo de estudos de quimotaxonômia.

Pelos resultados obtidos no estabelecimento de culturas de células *in vitro* podemos concluir que a estas têm uma composição química semelhante a das plântulas jovens, o que poderá proporcionar futuros estudos biossintéticos nas espécies estudadas. Para aumentar a produção dos alcalóides nas culturas *in vitro* são ainda necessários experimentos de otimização do meio e de condições de cultivo. Outra estratégia que poderia ser empregada nesse sentido seria o uso de agentes eliciadores. Devido ao crescimento lento e facilidade de oxidação das culturas celulares poderia ser testada a possibilidade de cultura de raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* ou de células modificadas com *A. tumefaciens*. Nesses cultivos a regulação da biossíntese poderia ser estudada.

Realizamos testes biológicos e verificamos que os alcalóides de *A. cylindrocarpon* apresentaram atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporoides* e antitumoral contra as cepas RS52Y e RS321. No entanto os alcalóides de ambas as espécies não apresentaram efeito antibacteriano.

Adicionalmente, os alcalóides de *A. cylindrocarpon* apresentaram uma potente atividade antimalárica nos ensaios contra *P. falciparum*. Estas atividades podem estar relacionadas com a presença de alcalóides do tipo aspidospermatano. *A. cylindrocarpon* poderia ser uma fonte de novos fármacos com efeitos genotóxicos ou contra a malária.

Os alcalóides presentes nos extratos deveriam ser testados isoladamente nos ensaios modelos. Uma alternativa para contornar as dificuldades de isolamento seria a síntese ou semi-síntese dos alcalóides majoritários. Assim poderíamos obter modelos para estudos de relação estrutura atividade (SAR) na tentativa de obter fármacos mais potentes e com menores efeitos colaterais.