

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Warszewiczia schwackei* (Rubiaceae)

MARIA TERESA FACHIN ESPINAR

MANAUS

2019

MARIA TERESA FACHIN ESPINAR

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Warszewiczia schwackei* (Rubiaceae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

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

E77e Espinar, Maria Teresa Fachin
Estudo químico e biológico de *Warszewiczia schwackei*
(Rubiaceae). / Maria Teresa Fachin Espinar. 2019
138 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. triptamina. 2. tetraidroharmano. 3. alcaloides. 4. atividade
antimalárica. I. Nunez, Cecilia Veronica II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título



246ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 26 de junho (quarta-feira) de 2019, às 14h, na sala de aula da CPPN/INPA.
Maria Teresa Fachin Espinar defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: “Estudo químico e biológico de *Warszewiczia schwackei* (Rubiaceae)”

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Cecilia Verônica Nunez	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 21967472890
Dr. Adrian Martin Pohlit	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 148.0079.648-44
Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 609579582-91
Dra. Fernanda Guilhon-Simplicio	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 779.819.602-15
Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 92571549049

Manaus, 26 de junho de 2019.

Resultado Final: Aprovado(a) (X)
Reprovado(a) ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

2019 - 26 de junho de 2019

Coordenador do PPGBIOTEC/UFAM

Dedico esta tese

A meu pai Manuel, por tanto e tudo na minha vida.
Em memória de minha amada mãe, Luzmila
(Você estará sempre em minha memória e no meu coração)

TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE

FILIPENSES 4:13

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado meus passos nesta caminhada, por ter colocado na minha vida tanto amor, paz e saúde. Por todas as bênçãos e sua graça que colocou no meu caminho pessoas maravilhosas que me motivaram para começar e terminar esta etapa da minha vida.

A meu pai Manuel, as minhas irmãs Tania e Nathalie, a minha sobrinha Sofia e a minha família em Manaus Blanca, Alejandro e Luis, pelo imenso e incondicional apoio em todas as horas.

A minha orientadora Dra. Cecilia Veronica Nunez, uma grande mulher, cientista, mãe. Muito obrigada pela orientação, mas principalmente pela acolhida e confiança em mim depositada. Sou muito grata pela amizade e carinho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório, vou mencionar todos eles na ordem alfabética, pois todos eles são importantes: André, Cris, Carol, Daniel, Isabel, Jéssica, Julio, Laila, Tais, Weison, Wendell, pelo convívio no laboratório, pela amizade, por intermináveis horas de risada e café.

Às amigas que a vida e Deus me deram e que mesmo distantes eu levo todas vocês no meu coração: Lorena Cursino, Diana Sangama, Giovana, Daiane, Giselle.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBiotec-UFAM).

Aos profissionais que ajudaram na realização dos testes e análise de RMN: Dra. Nadia Falcão, Magno, Sabrina, Zelina.

Aos professores e colegas de curso do Doutorado em Biotecnologia. Ao CNPq, CAPES, PPBio e FAPEAM, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram na execução deste projeto.

RESUMO

No Brasil, especialmente na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de espécies vegetais que ainda não foram estudadas química ou biologicamente, inclusive de espécies da família Rubiaceae, a qual é reconhecida principalmente pelo fato de produzir uma grande variedade de alcaloides de importância farmacológica. Nesse sentido, o presente trabalho visou o isolamento e a caracterização química de substâncias da espécie *Warszewiczia schwackei*, bem como a avaliação das atividades biológicas dos extratos. Para avaliação das atividades biológicas foram utilizados: os testes de DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina (para determinação da atividade antioxidante); microdiluição em caldo utilizando o método REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) (para determinação da atividade frente à cepa de *Mycobacterium tuberculosis* pan-sensível H37Rv); a cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum* (para determinação da atividade antimalárica); o microcrustáceo *Artemia salina* e células macrofágicas J774 A.1 (para avaliar a toxicidade); o ensaio *in vivo* sobre a membrana corioalantóica de embriões de galinha (para avaliar a atividade angiogênica). O fracionamento do extrato hexânico das folhas permitiu o isolamento de β -sitosterol e esqualeno, e do extrato metanólico das folhas foram obtidos 3 alcaloides indólicos: triptamina, tetraidroharmano e oclifuanina, o alcaloide 1-(2-aminofenil) etanol e também o flavonoide catequina. Os extratos metanólicos tanto de folhas como de galhos mostraram capacidade antioxidante frente a DPPH e a Fe^{3+} /fenantrolina e após avaliação biológica dos extratos estes apresentaram atividade moderada frente a *M. tuberculosis*, e no ensaio antimalárico também mostraram atividade frente a *P. falciparum*. Quando testados frente a *A. salina* foi possível observar que todos os extratos foram tóxicos na concentração de 1000 μ g/mL. Foi observado o potencial antiangiogênico dose-dependente de todos os extratos de *W. schwackei* e da substância triptamina com uma porcentagem de inibição de vasos sanguíneos de 40% na concentração de 1 μ g/mL. Os resultados obtidos mostraram o potencial biológico da espécie *W. schwackei* e incentivam a continuação do fracionamento para isolar outras substâncias e avaliá-las nos ensaios nos quais os extratos foram ativos com a finalidade de determinar se são as responsáveis pelas atividades biológicas.

Palavras-chave: triptamina, tetraidroharmano, alcaloides, atividade antimalárica.

ABSTRACT

In Brazil, especially in the Amazon region, there is a great biodiversity of plant species that have not yet been studied chemically or biologically, including species of the family Rubiaceae, which is recognized mainly for the production of a wide variety of alkaloids of pharmacological importance. In this sense, the aim of work is the isolation and chemical characterization of substances of the species *Warszewiczia schwackei*, as well as the evaluation of the biological activities of the extracts. To evaluate the biological activities the following were used: DPPH and Fe^{3+} /phenanthroline tests (to determine the antioxidant activity); microdilution in broth using the REMA (Resazurin Microtitre Assay) method (for determination of activity against pan-sensitive *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv); the multi-resistant *P. falciparum* strain K1 (for determination of antimalarial activity); the microcrustacean *Artemia salina* and macrophagic cells J774 A.1 (to assess toxicity); the *in vivo* test on the chorioallantoic membrane of chicken embryos (to assess angiogenic activity). The fractionation of the hexane extract of the leaves allowed for the isolation of β -sitosterol and squalene, and from the methanolic extract of the leaves 3 indole alkaloids were obtained: tryptamine, tetrahydroharman and ochrolifuanine, as well as a flavonoid: catechin. The methanolic extracts of both leaves and branches showed antioxidant capacity against DPPH and Fe^{3+} /phenanthroline and after biological evaluation of the extracts showed moderate activity against *M. tuberculosis*, and in the antimalarial trial also showed activity against *P. falciparum*. When tested against *A. salina*, it was possible to observe that all the extracts were toxic at the concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$. The dose-dependent antiangiogenic potential of all *W. schwackei* extracts was observed and tryptamine exhibited 40% inhibition of blood vessel growth at 1 $\mu\text{g/mL}$. The results showed the biological potential of the *W. schwackei* and encourage the continuation of the fractionation to isolate other substances and evaluate them in the same tests in which the extracts were active in order to determine if the substances are responsible for the biological activities.

Key words: triptamine, tetrahydroharman, alkaloids, antimalarial activity.

RESUMEN

En el Brasil, especialmente en la región Amazónica, existe una gran biodiversidad de especies vegetales que todavía no fueron estudiadas química o biológicamente, inclusive especies de la familia Rubiaceae, la cual es reconocida principalmente por el hecho de producir una gran variedad de alcaloides de importancia farmacológica. En ese sentido, el presente trabajo tiene por objetivo el aislamiento y la caracterización química de sustancias de la especie *Warszewiczia schwackei*, así como la evaluación de las actividades biológicas de sus extractos. Para la evaluación de las actividades biológicas se utilizaron: los ensayos de DPPH y Fe^{3+} /fenantrolina (para determinación de la actividad antioxidante); microdilución en caldo utilizando el método REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) (para determinación de la actividad frente a la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* pan-sensible H37Rv); la cepa multirresistente K1 de *P. falciparum* (para la determinación de la actividad antimalárica); el microcrustaceo *Artemia salina* y células macrofágicas J774 A.1 (para evaluar la toxicidad); el ensayo *in vivo* sobre la membrana corioalantóica de embriones de gallina (para evaluar la actividad angiogénica). El fraccionamiento del extracto hexánico de las hojas permitió el aislamiento de β -sitosterol y escualeno, y del extracto metanólico de las hojas fueron obtenidos 3 alcaloides indólicos: triptamina, tetrahidroharmano y ochrolifuanina, el alcaloide 1-(2-aminofenil) etanol y también un flavonoide: catequina. Los extractos metanólicos tanto de las hojas como de las ramas mostraron su capacidad antioxidante frente a DPPH y a Fe^{3+} /fenantrolina y después de realizar la evaluación biológica de los extractos estos presentaron actividad moderada frente a *M. tuberculosis*, y en ensayo antimalárico también mostraron actividad frente a *P. falciparum*. Cuando fueron probados frente a *A. salina* fue posible observar que todos los extractos fueron tóxicos en la concentración de 1000 μ g/mL. Fue observado el potencial antiangiogénico dosis-dependiente de todos los extractos de *W. schwackei* y de la sustancia triptamina, esta última con un porcentaje de inhibición de vasos sanguíneos de 40% en la concentración de 1 μ g/mL. Los resultados obtenidos mostraron el elevado potencial biológico de la especie *W. schwackei* e incentivan a continuar el fraccionamiento para aislar otras sustancias y evaluarlas con relación a los ensayos para los cuales los extractos fueron activos con la finalidad de determinar si estas son las responsables de las actividades biológicas.

Palavras-chave: triptamina, tetraidroharmano, alcaloides, actividad antimalárica.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Família Rubiaceae: aspectos botânicos, químicos e biológicos.....	4
2.1.1	Citotoxicidade	8
2.1.2	Atividade antioxidante	10
2.1.3	Atividade antibacteriana	11
2.1.4	Atividade antimicobacteriana	17
2.1.5	Atividade Antimalárica.....	19
2.1.6	Atividade angiogênica.....	22
2.1.7	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	25
2.2	Gênero <i>Warszewiczia</i>	25
2.2.1	<i>Warszewiczia schwackei</i> K. Schum.....	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	GERAL.....	30
3.2	ESPECÍFICOS:.....	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	Procedimentos gerais	31
4.2	Equipamentos utilizados	31
4.3	Coleta e identificação	32
4.4	Preparação e obtenção dos extratos vegetais	33
4.5	Análises químicas e fracionamentos dos extratos	34
4.5.1	Fracionamento do extrato hexânico das folhas.....	35
4.5.2	Fracionamento do extrato metanólico das folhas	37
4.6	Identificação das substâncias isoladas	43
4.7	Avaliação da atividade de citotoxicidade	43
4.8	Atividade antioxidante	44
4.9	Atividade antibacteriana	45
4.10	Atividade antimicobacteriana	47
4.11	Atividade antimalárica.....	49
4.12	Avaliação da atividade angiogênica	50
4.13	Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1	Coleta do material vegetal e preparo dos extratos	53
5.2	Identificação estrutural das substâncias isoladas	53
5.2.1	Identificação da substância I	55
5.2.2	Identificação da substância II	59
5.2.3	Identificação da substância III.....	60
5.2.4	Identificação da substância IV.....	68
5.2.5	Identificação da substância V	78
5.2.6	Identificação da substância VI.....	84

5.2.7	Identificação da substância VII	93
5.3	Avaliação das atividades biológicas	99
5.3.1	Atividade de citotoxicidade	99
5.3.2	Atividade antioxidante	100
5.3.3	Atividade antibacteriana	102
5.3.4	Atividade antimicobacteriana	103
5.3.5	Atividade antimalárica	103
5.3.6	Atividade antiangiogênica	106
5.3.7	Atividade de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	109
6	CONCLUSÕES	111
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química da substância grandiflorosida.	11
Figura 2. Estrutura química das substâncias citadas, com atividade antibacteriana.	17
Figura 3. Estrutura química de Isoniazida e Rifampicina.....	18
Figura 4. Estrutura química do iridoide 6 β -hidroxi-10- <i>O</i> -acetilgenipina.	19
Figura 5. Estrutura química de quinina e artemisinina.	21
Figura 6. Estruturas químicas de substâncias com atividade antimalárica.	22
Figura 7. Estruturas químicas de substâncias com atividade antiangiogênica.	24
Figura 8. Mapa da distribuição e concentração de espécies pertencentes ao gênero <i>Warszewiczia</i> no Brasil.	27
Figura 9. Estruturas químicas de substâncias obtidas a partir da espécie <i>Warszewiczia coccinea</i>	28
Figura 10. Distribuição de registros de espécies de <i>Warszewiczia schwackei</i> por localidade no Brasil.	29
Figura 11. Etiqueta com o número de depósito da exsicata de <i>Warszewiczia schwackei</i> expedida pelo herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.....	32
Figura 12. Fluxograma da preparação e obtenção de extratos a partir da espécie <i>Warszewiczia schwackei</i>	33
Figura 13. Fluxograma de fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	36
Figura 14. Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	38
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da substância número I identificada como esqualeno, (CDCl_3 , 300 MHz).....	56
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C da substância número I identificada como esqualeno, (CDCl_3 , 75 MHz).....	57
Figura 17. Mapa de contorno HSQC da substância número I identificada como esqualeno, (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).....	57
Figura 18. Estrutura e numeração da substância esqualeno.....	58
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da substância número II identificada como β -sitosterol, (CDCl_3 , 300 MHz).....	60
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da substância número III, identificada como ocolifuanina, com ampliação da região dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos ($\text{DMSO-}d_6$ com TMS, 300 MHz).....	63

Figura 21. Espectro bidimensional COSY, acoplamento H-H da substância número III, identificada como ocolifuanina (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 MHz).	63
Figura 22. Espectro bidimensional gHSQC da substância número III, identificada como ocolifuanina. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75MHz).	64
Figura 23. Espectro bidimensional HMBC da substância número III, identificada como ocolifuanina. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75 MHz).	65
Figura 24. Ampliação do espectro bidimensional HMBC da substância número III, identificada como ocolifuanina, acoplamentos de longa distância dos anéis indólicos. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75 MHz).	65
Figura 25. A. Espectro de RMN de ¹³ C da substância número III, identificada como ocolifuanina. B. Espectro de ¹³ C/DEPT 135 com destaque nos deslocamentos de carbonos metilénicos e metínicos mais desprotegidos. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 75 MHz).	66
Figura 26. Estrutura química da substância ocolifuanina.....	68
Figura 27. Espectro de massas de alta resolução da substância número IV, identificada como o alcaloide triptamina, isolado da espécie <i>Warszewiczia schwackei</i>	69
Figura 28. Espectro de RMN de ¹ H da substância número IV, identificada como triptamina. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 MHz).	70
Figura 29. Espectro de RMN de ¹ H da substância número IV, identificada como triptamina com ampliação dos sinais correspondentes aos hidrogênios que conformam o anel aromático no sistema indol. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 MHz).	71
Figura 30. A. Espectro de RMN de ¹³ C da substância número IV, identificada como triptamina. B. Espectro de ¹³ C/DEPT 135. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 75 MHz).	73
Figura 31. Espectro bidimensional de gHSQC (<i>J1</i>) da substância número IV, identificada como triptamina. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75 MHz).	74
Figura 32. Espectro bidimensional de gHSQC (<i>J1</i>) da substância número IV, identificada como triptamina, com ampliação das correlações que definem o anel indólico. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75 MHz).	75
Figura 33. Espectro bidimensional de HMBC da substância número IV identificada como triptamina. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75 MHz).	76
Figura 34. Ampliação das correlações que definem o anel indólico no espectro bidimensional de HMBC da substância número IV, identificada como triptamina. (DMSO- <i>d</i> ₆ com TMS, 300 e 75 MHz).	77
Figura 35. Estrutura da substância triptamina.....	78
Figura 36. Espectro de RMN de ¹ H da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	80
Figura 37. Espectro de RMN de ¹ H (com ampliações) da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	81

Figura 38. Espectro bidimensional gHSQC da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 e 75 MHz).	82
Figura 39. Espectro bidimensional HMBC da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 e 75 MHz).	83
Figura 40. Estrutura da substância 1-(2-aminofenil) etanol	84
Figura 41. Espectro de CL/EMAR da substância número VI, identificada como o alcaloide tetraidroharmano, isolado da espécie <i>Warszewiczia schwackei</i>	86
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD ₃ OD, com TMS. 300 MHz).....	87
Figura 43. Espectro de RMN de ¹ H (com ampliações) da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD ₃ OD, com TMS. 300 MHz).....	88
Figura 44. Espectro bidimensional COSY, acoplamento H-H da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD ₃ OD, com TMS. 300 MHz).....	89
Figura 45. Espectro bidimensional gHSQC da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD ₃ OD, com TMS. 300 e 75 MHz).....	89
Figura 46. Espectro bidimensional HMBC da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD ₃ OD, com TMS. 300 e 75 MHz).....	90
Figura 47. Principais correlações observadas para a estrutura da substância número VI, identificada como tetraidroharmano.	90
Figura 48. Estrutura da substância tetraidroharmano	91
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ H da substância número VII, identificada como catequina, (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	95
Figura 50. Espectro de RMN de ¹ H da substância número VII, identificada como catequina, com as ampliações dos hidrogênios correspondentes. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	96
Figura 51. Espectro bidimensional gHSQC da substância número VII, identificada como catequina, (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 e 75 MHz).	97
Figura 52. Espectro bidimensional HMBC e principais correlações da substância número VII, identificada como catequina.	98
Figura 53. Estrutura de alcaloides com esqueleto \square -carbolínicos com atividade antibacteriana frente a <i>S. aureus</i> e estrutura do alcaloide tetraidroharmano (REZA e ABBAS, 2007).....	103
Figura 54. Imagens da avaliação da atividade antiangiogênica frente aos extratos e substância de <i>Warszewiczia schwackei</i>	107

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies da família Rubiaceae que tiveram seus extratos avaliados para atividade antibacteriana.	12
Tabela 2. Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	36
Tabela 3. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 2-7 oriunda do extrato hexânico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	37
Tabela 4. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fase DCM do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	39
Tabela 5. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 59-60 obtidas da fase DCM do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	39
Tabela 6. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 24-29 (59-60) obtidas da fase DCM do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	40
Tabela 7. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 3-4 obtidas da fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	41
Tabela 8. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 5-10 obtidas da fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	42
Tabela 9. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 8 obtida da fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia schwackei</i>	43
Tabela 10. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martins et. al., 2014).	45
Tabela 11. Rendimento dos extratos obtidos a partir das folhas e galhos da espécie <i>Warszewiczia schwackei</i>	53
Tabela 12. Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância esqualeno. a) O experimento foi realizado a 300 MHz para ¹ H em CDCl ₃ , utilizando o TMS como padrão interno; b) Dados da literatura de acordo com Ragasa, et. al., (2015) (600 MHz, CDCl ₃).	58
Tabela 13. Dados de RMN de ¹³ C da substância número III, identificada como ocolifuanina. ^a O experimento foi realizado a 75 MHz para ¹³ C em DMSO-d ₆ , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com Robert et. al., (1983) (15,08 MHz, CDCl ₃).	67

Tabela 14. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância triptamina. ^a O experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H em DMSO- d_6 , utilizando o TMS como padrão interno b. Dados da literatura de acordo com WANG e CHEN (2007) (300 MHz, CDCl_3).....	78
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H da substância V identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz).....	84
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. ^a O experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H em CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno, ^b Dados da literatura de acordo com Fiot et al., 2006 (500 MHz).....	92
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H da substância número VII, identificada como catequina. ^a O experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H em DMSO- d_6 , ^b Dados da literatura de acordo com Cheng et al., 2014 (em DMSO- d_6 e 500 MHz).....	99
Tabela 18. Resultados da avaliação antioxidante dos extratos e fases de <i>Warszewiczia schwackei</i> frente à DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina.	101
Tabela 19. Resultados da avaliação antimalárica dos extratos de <i>Warszewiczia schwackei</i> frente a <i>P. falciparum</i>	104
Tabela 20. Resultados da avaliação antimalárica de extratos de espécies de plantas pertencentes à família Rubiaceae frente a <i>P. falciparum</i>	105
Tabela 21. Resultados da avaliação de toxicidade dos extratos de <i>Warszewiczia schwackei</i> frente a <i>A. salina</i>	109

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição das espécies estudadas por subfamília (entre 2009-2019); (CIN= Cinchonoideae, IXO= Ixorideae, RUB= Rubioideae); N=319.....	7
Gráfico 2. Atividades biológicas mais estudadas com espécies da família Rubiaceae (Entre 2009-2019); N=319	8
Gráfico 3. Porcentagem de inibição da angiogênese dos extratos e substância de <i>Warszewiczia schwackei</i>	108
Gráfico 4. Taxa de mortalidade de náuplios de <i>A. salina</i> em função da interação de concentrações e extratos de folhas e galhos de <i>Warszewiczia schwackei</i>	110
Gráfico 5. Taxa de mortalidade de náuplios de <i>A. salina</i> em função das concentrações de extratos testados de folhas e galhos de <i>Warszewiczia schwackei</i>	110

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AcOEt	acetato de etila
CCA	cromatografia em coluna aberta
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CIM	concentração mínima inibitória
CLSI	clinical and laboratory standards institute
COSY	espectroscopia de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$
DCM	diclorometano
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfoxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
HMBC	espectroscopia de correlação heteronuclear de múltiplos quantas
HSQC	espectroscopia de correlação heteronuclear de um único quantum
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MeOH	metanol
RMN	ressonância magnética nuclear/nuclear magnetic resonance
UV	ultravioleta
UFC	unidade formadora de colônia

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre constituíram uma importante fonte de substâncias para o tratamento de diversas doenças, e muitas destas estruturas químicas inspiraram a síntese de diferentes medicamentos, como por exemplo: morfina, codeína, atropina, cafeína, digoxina, entre outros (SATYAJIT e SARKER, 2007). Segundo Newman e Cragg (2016) entre 1981 e 2014 das 1211 novas substâncias aprovadas como drogas, 396 (33%) são derivadas de produtos naturais. Diante desse fato, as plantas ganham considerado destaque, tornando-as uma das principais fontes de metabólitos secundários.

Nesse contexto, o Brasil se apresenta como um cenário promissor para estudos de bioprospecção. Atualmente, dentro da flora brasileira, são reconhecidas 46.439 espécies (aproximadamente 20-22% do total existente no planeta), das quais 33.050 são Angiospermas (Flora do Brasil, 2017). É importante ressaltar que algumas dessas plantas se encontram em regiões tropicais, cuja condição climática favorece a ocorrência de uma grande diversidade de espécies possibilitando a produção de diferentes estruturas químicas.

Assim mesmo, é possível observar um grande número de estudos realizados com plantas dentro do Brasil, fato refletido na publicação em revistas internacionais de mais de 10.000 artigos científicos entre 2011 e 2013, relatando o isolamento, elucidação de estruturas químicas, e avaliação das atividades biológicas a elas relacionadas (DUTRA et al., 2016).

Uma das famílias vegetais mais estudadas atualmente é a Rubiaceae, considerada como a quarta maior família entre as espécies de Angiospermas no Brasil, dentre as quais 52,8% são consideradas endêmicas (BFG, 2015). Há relatos da grande diversidade

de metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies pertencentes a esta família, destacando-se principalmente a produção de alcaloides bioativos (FARIAS, 2006). Os alcaloides são exemplos de metabólitos secundários que originam diversos fármacos (BARREIRO, 1990), assim, os três principais alcaloides da medicina provêm desta família, a codeína, morfina, vincristina, vimblastina (CORDELL et al., 2001).

Por outro lado, a presença de outros tipos de metabólitos secundários conferem também a estas espécies pertencentes à família Rubiaceae, atividades biológicas relacionadas a doenças infecciosas tais como antibacteriano, antifúngico, antimalárico, como também doenças metabólicas sendo elas: câncer, diabetes, hipertensão, Alzheimer (ESTEVEZ et al., 2007; KAISER et al., 2016; ; NARAYAN et al., 2015; PANDEY e NEGI, 2016; RADICE et al., 2017).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com a espécie *Duroia macrophylla* (Rubiaceae) permitiram o isolamento de raunitidine (NUNEZ et al., 2009) triterpenos e alcaloides com importante atividade anti-tuberculose (MARTINS et al., 2013; MARTINS, 2014), e foi isolado um alcaloide indólico com potencial antitumoral e anti-tuberculose, que gerou duas patentes: (NUNEZ et al., 2012 e NUNEZ et al., 2014). Dessa mesma espécie foi relatada a atividade antioxidante (MARTINS et al., 2014). Assim como a capacidade antifúngica, antimicrobiana e larvicida de *D. macrophylla* e de *D. saccifera* (REIS et al., 2016). Das folhas de *Duroia longiflora* foram isolados biflavonoides (CRUZ et al., 2019) e estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisas mostram que algumas espécies de *Ferdinandusa* spp. coletadas na Reserva Ducke apresentam atividades antimicrobiana e tóxica sobre *Artemia salina* (RODRIGUES et al., 2014, MESQUITA et al., 2015).

Neste sentido, a pesquisa com espécies de Rubiaceae que possam gerar novos produtos (moléculas ativas ou protótipos de fármacos) é de fundamental importância.

Portanto, o presente trabalho realizou a bioprospecção da espécie do gênero *Warszewiczia* avaliando os seus extratos para as atividades: antibacteriana, antimicobacteriana, antimalárica, antioxidante, citotóxica, antiangiogênica e de toxicidade sobre *Artemia salina*. Os extratos ativos foram fracionados visando isolar as substâncias ativas. Espera-se que o presente estudo com a espécie *Warszewiczia schwackei*, contribua com o conhecimento científico e gere novos produtos biotecnológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Rubiaceae: aspectos botânicos, químicos e biológicos

A família Rubiaceae é posicionada na ordem Magnoliopsida e está constituída por aproximadamente 609 gêneros e 13.673 espécies com uma distribuição cosmopolita. No território brasileiro são reconhecidos 125 gêneros e 1.392 espécies, dos quais 15 gêneros e 727 espécies são consideradas endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2017).

Considerada uma das principais famílias da flora brasileira, ocorre como um importante elemento em quase todos os biomas (SOUZA e LORENZI, 2012). É possível encontrar espécies de Rubiaceae na mata Atlântica (564 espécies), no cerrado (406 espécies), floresta Amazônica (728 espécies), na caatinga (168 espécies), nos pampas (42 espécies) e no pantanal (34 espécies). Na floresta Amazônica é a terceira família com maior diversidade de espécies. É dividida em três subfamílias: Rubioideae, Ixorideae e Cinchonoideae (BREMER, 2009).

Segundo Martins e Nunez (2015), entre 1990 e 2014 aproximadamente 293 espécies de Rubiaceae foram estudadas, sendo 139 da subfamília Rubioideae, 80 de Ixoridae, 74 de Cinchonoideae. Como resultado, números expressivos de diferentes classes de metabólitos secundários foram isolados. Sendo que cada subfamília possui uma produção e distribuição majoritária distinta.

No entanto, os alcaloides são a classe química mais representativa nesta família vegetal. Muitos deles possuem atividades farmacológicas importantes como, por exemplo: cafeína (*Coffea arabica*); emetina (*Cephaelis ipecacuanha*) com atividade emética e anti-amebicida; quinidina (*Cephaelis ledgeriana*) anti-arrítmico; quinina (*Cinchona ledgeriana*) anti-malária e tônica e ioimbina (*Pausinystalia yoimba*) afrodisíaca (CORDELL et al., 2001).

Os alcaloides pertencem a uma classe química de metabólitos secundários que tem em comum um átomo de nitrogênio em um anel, a maioria são derivados de *L*-aminoácidos como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina. Em muitos casos encontram-se em combinação com um esteroide, secoiridoide (por exemplo: secologanina) ou uma parte de natureza terpênica; e apesar de existir diversas classes de alcaloides estes têm origens biosintéticas únicas (ST-PIERRE et al., 2013).

Nas plantas, um importante precursor de uma ampla variedade de alcaloides é o *L*-triptofano, um aminoácido aromático que possui um sistema de anel indólico, o qual tem sua origem na rota do chiquimato. Os alcaloides indólicos simples são aqueles compostos por triptamina e seus derivados *N*-metil e *N-N*-dimetil e são amplamente distribuídos nas plantas. A formação destes começa com a descarboxilação do aminoácido *L*-triptofano para triptamina, devido à ação da enzima triptofano descarboxilase (RAMAWAT, 2009).

Também é possível encontrar os denominados alcaloides β -carbolínicos simples, baseados em um sistema β -carbolino com a formação de um novo anel heterocíclico de 6 membros usando o lado da cadeia de etilamina da triptamina. Por outro lado, é possível observar complexos β -carbolinos como os alcaloides indólicos terpenoides os quais são produzidos empregando secologanina, onde em quase todas as estruturas é quase possível reconhecer a porção triptamina (DEWICK, 2002).

Das plantas foram isolados aproximadamente 12.000 alcaloides, dos quais mais de 2.500 são indólicos produzidos a partir de táxons relacionados filogeneticamente, principalmente encontrados na ordem Gentianales (Loganiaceae, Rubiaceae, Apocynaceae e Naucleaceae). São considerados como um dos principais marcadores químicos na família Rubiaceae (LARSSON, 2007; ZIEGLER e FACCHINI, 2008; ST-PIERRE et al., 2013; RAM, 2016).

Nesse contexto, os metabólitos secundários tornam-se uma importante ferramenta para auxiliar na correlação entre as diferentes espécies vegetais, permitindo a construção de sistemas taxonômicos com a consequente caracterização e classificação das mesmas dentro de cada família botânica. A família Rubiaceae está dividida em subfamílias, tribos e gêneros o que possibilita a observação de um padrão na produção dos metabólitos secundários (TAYLOR et al., 2007 e RAM, 2016).

De acordo com Larsson (2007) há uma ocorrência de alcaloides indólicos monoterpênicos, principalmente na família Rubiaceae. Estes alcaloides são derivados da condensação de dois precursores como triptamina e o monoterpene secoiridoide secologanina. Este tipo de alcaloide é produzido em maior quantidade na subfamília Cinchonoidae.

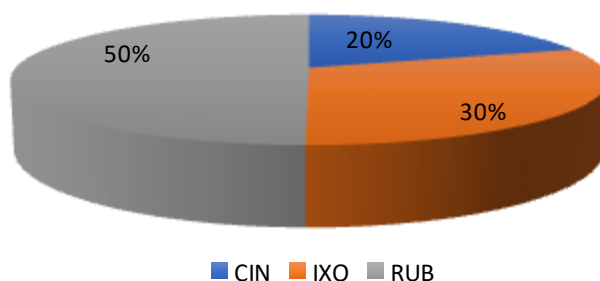
Por outro lado, observa-se a produção de outras classes químicas na família Rubiaceae, como iridoides, antraquinonas, triterpenos glicosilados, substâncias fenólicas, terpenos, flavonoides, todavia as antraquinonas são consideradas como marcadores químicos na subfamília Rubioide e os iridoides na subfamília Ixoroidae (MARTINS e NUNEZ, 2015).

Segundo Moreira e colaboradores (2015), dos 33 gêneros pertencentes à tribo Condamineea (subfamília Ixoroidae) entre as que se encontra o gênero *Warszewiczia*, aproximadamente 110 substâncias foram isoladas e caracterizadas, das quais 27% foram identificadas como sendo da classe química dos terpenos, e aproximadamente 25% foram alcaloides e destes 81% eram alcaloides indólicos, dentre os que se destacam o alcaloide indólico monoterpênico glicosilado strictosidina, os corinante derivados 5- α -carboxistrictosidina, isovallesiachotamina, vallesiachotamina, turbinatina, 3,4-deidrostrictosidina, ácido 3,4-deidrostrictosidina, ácido strictosidina, e os alcaloides β -carbolínicos: cordifolina, desoxicordifolina e ácido harman-3-carboxílico.

A grande quantidade de espécies que fazem parte da família Rubiaceae, além de ter a característica de se mostrarem produtoras das principais classes de metabólitos secundários, também é alvo de estudos sistemáticos para avaliar as mais diversas atividades farmacológicas, tanto de extratos como de substâncias puras (DUTRA et al., 2016)

Dados compilados das bases de dados ScienceDirect e PubMed entre os anos de 2009 e 2019 (últimos 10 anos) aproximadamente 319 espécies pertencentes à família Rubiaceae tiveram seus extratos, frações e metabólitos secundários estudados, das quais 50% foram da subfamília Rubioideae, 30% da Ixorideae e 20% da Cinchonoideae, conforme mostrado no gráfico 1.

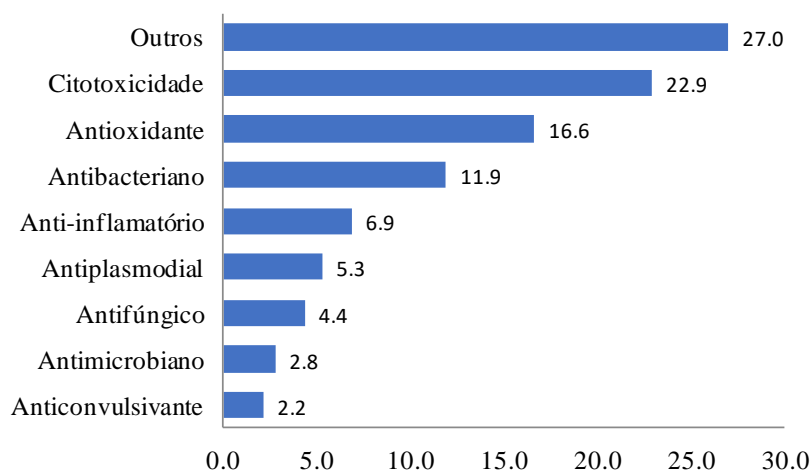
Gráfico 1. Distribuição das espécies estudadas por subfamília (entre 2009-2019); (CIN= Cinchonoideae, IXO= Ixorideae, RUB= Rubioideae); N=319.



Como mostrado no Gráfico 2, as espécies da família Rubiaceae são detentoras não somente de atividades biológicas como antibacterianos, antioxidantes, antimaláricos, estas também mostraram ter propriedades anticonvulsivante, ansiolítico, sedativo (NGO BUM et al., 2009), anti-nociceptivas, antiinflamatórias e antipiréticas (ABBAAH et al., 2010; TAÏWE et al., 2010; CHEN et al., 2015), imunoestimulador (NUDO et al., 2011), inibidor enzimático de acetilcolinesterasa, xantina oxidase, aldose redutase

e de lipopolissacarídeos (ZHENG et al., 2010; GACCHE et al., 2011; BERTELLIA et al., 2017; DUONG et al., 2017), reguladores dos canais iônicos (Na⁺, K⁺ -ATPase e Mg²⁺ -ATPase) no fígado e no cérebro (CANDEIAS et al., 2009), espasmolítico (CIMANGA et al., 2010), antielmíntico (WATERMAN et al., 2010), diurético (FREITAS et al., 2011), antidiarreico (SIBANDZE et al., 2010), laxativo (FABRI et al., 2011), antidiabético (DOMINGUES et al., 2011; MANOSROI et al., 2011), repelente contra o vetor *Anopheles stephensi* (KOVENDAN et al., 2014), neuroprotetor, antihiperlipidémico, hepatoprotetor (JEONG et al., 2011; LUO et al., 2011; TOPPO et al., 2017) e cardioprotetor (CHANDRASHEKAR et al., 2018).

Gráfico 2. Atividades biológicas mais estudadas com espécies da família Rubiaceae (Entre 2009-2019); N=319



2.1.1 Citotoxicidade

O câncer é uma doença originada por células denominadas cancerosas as quais entram no processo de crescimento desordenado e descontrolado, que posteriormente se disseminam através dos tecidos, levando à formação de tumores. Esse tipo de formação

celular pode ser originado a partir de células normais que sofrem algum tipo de mutação genética (TAJBAKHSH e SINGH, 2013).

No intuito de inibir este tipo de crescimento celular anormal são utilizados os medicamentos citotóxicos, definidos como aquelas substâncias que tem à capacidade de interferir no processo de proliferação da célula afetando principalmente na síntese proteica (JOSHI, 2007). Uma característica desse tipo de substância é a falta de seletividade tumoral, tornando-as altamente tóxicas para todos os tipos de células. Outra característica indesejável dos atuais fármacos antitumorais são os vários efeitos colaterais frequentemente relatados pelos pacientes, o que impulsiona uma constante busca por novas substâncias que permitam o desenvolvimento de novas classes de compostos citotóxicos, com destaque para aqueles modelos de origens naturais (RAVI e CHARI, 2008; SAEIDNIA e ABDOLLAHI, 2014).

Assim, produtos naturais com potencial para serem utilizados como antitumorais ainda continuam tendo um papel importante, conforme relatado por Newman e Cragg (2016), referindo que 56% das drogas antitumorais aprovadas entre 1981 e 2014 são originárias ou derivadas de produtos naturais. Esses dados condizem com o observado nos últimos anos com relação às pesquisas realizadas com espécies da família Rubiaceae, onde 22% de estudos são referentes à avaliação de extratos e/ou substâncias quanto a sua capacidade citotóxica (GANBOLD et al., 2010; Li et al., 2010; OGUNWANDE et al., 2010; PILARSKI et al., 2010).

Dentre as células utilizadas para avaliar o potencial anticancerígenos dos extratos de espécies da família Rubiaceae se encontram principalmente células de câncer de mama (MCF-7c3) (COMINIA, 2011), linhagens celulares de câncer de fígado humano (JAYA KUMAR et al., 2012). Também foram identificados mecanismos pelos quais substâncias obtidas desses extratos atuam, como por exemplo, os polissacarídeos

induzem a apoptose em linhagens celulares de câncer de pulmão, e as antraquinonas são capazes de inibir o crescimento das mesmas através da modulação da via JAK2/STAT3 induzida por IL-6 (LIN et al., 2019; SUN et al., 2019). Em outro estudo realizado por Zeng e colaboradores (2018), foi observado que o rubiardonol G extraído de *Rubia yunnanensis* possui a capacidade de induzir a apoptose mediada por NF-κB e JNK e parada G0/G1 de células HeLa.

2.1.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes formam parte de um conjunto de substâncias químicas ou produtos biológicos que neutralizam de uma forma direta ou indireta os efeitos nocivos dos radicais livres ou oxidantes (ZAMORA, 2007). Os radicais livres podem ser produzidos por funções celulares normais ou também ser induzidos por diferentes fatores ambientais ou fisiológicos (COUTINHO et al., 2009).

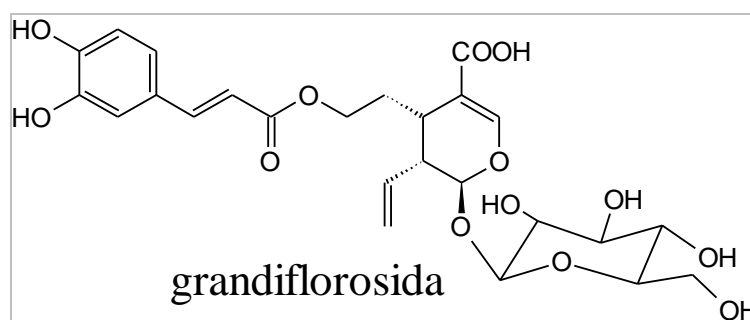
Diversos estudos demonstram que os radicais livres são os responsáveis pelo desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, e doenças neurodegenerativas como Alzheimer, o que motiva o interesse pelas substâncias antioxidantes no intuito de prevenir tais doenças (KORGE et al., 2008; YING et al., 2013 e MANSUROGLU et al., 2014).

As plantas são uma importante fonte de metabólitos com diferentes atividades biológicas. Pode-se observar que também são produtoras de princípios ativos com atividade antioxidante como é o caso das substâncias fenólicas, as quais podem ser úteis como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças patológicas envolvendo os radicais livres (AMARAL et al., 2009; RAMAWAT, 2009). Por exemplo, Chandel e colaboradores (2012) em um estudo realizado com as folhas da espécie *Anthocephalus cadamba* (Rubiaceae) relataram atividade antioxidante da fração em acetato de etila frente ao radical livre DPPH, com 90% de redução deste. Ao mesmo tempo em que foi

constatado que esta fração possuía um alto conteúdo de substâncias fenólicas. Em outro estudo realizado com as folhas de *Guettarda viburnoides* (Rubiaceae) foram isoladas substâncias como ácido ursólico, ácido uncárico, secoxiloganina e grandiflorosida (Figura 1), possuindo esta última atividade antioxidante significativa frente ao radical DPPH (NARESSI et al., 2015).

Por outro lado, extratos de espécies da família Rubiaceae também possuem capacidade antioxidante, não somente em ensaios conhecidos como o do DPPH. Em um estudo realizado por Wen e colaboradores (2011) relatou o potencial antioxidante de *Ixora parviflora* em um sistema de células/células e em fibroblastos humanos expostos a UV.

Figura 1. Estrutura química da substância grandiflorosida.



2.1.3 Atividade antibacteriana

As bactérias podem causar doenças ou lesões, as quais em alguns casos são induzidas por toxinas que estas produzem, ou quando a bactéria invade sítios anatômicos que são normalmente estéreis. Com a finalidade de combater essas doenças são utilizados diversos tipos de agentes terapêuticos, os quais agem através de diferentes mecanismos de ação (VERONESI e FOCACCIA, 2002).

Por outro lado, o uso incorreto desses agentes terapêuticos pode levar ao desenvolvimento potencial de tolerância ou resistência a estas substâncias por parte das

bactérias. Assim, na busca para combater os mecanismos de resistência aos antibacterianos, tornando o uso de produtos fitoquímicos e extratos de plantas como agentes modificadores de resistência (RMAs) interessante. (SIMOES et al., 2009)

Visto que os mesmos podem demonstrar seu potencial atuando por mecanismos de ação diferentes em relação aos antibióticos comerciais quando usados sozinhos ou por sinergismo, representando assim uma alternativa relevante no combate às bactérias resistentes (DAVIES e DAVIES, 2010).

Diversas espécies da família Rubiaceae foram estudadas para determinar seu potencial como antibacterianos, entre 2009 e 2019, aproximadamente 40 espécies (dados obtidos das bases de dados: ScienceDirect e PubMed) tiveram seus extratos e/ou frações avaliadas com relação a esta atividade. Destacando-se as seguintes (tabela 1):

Tabela 1. Espécies da família Rubiaceae que tiveram seus extratos avaliados para atividade antibacteriana.

Espécie	Parte da planta	Extrato tipo de solvente usado	Bactérias testadas	Referencia
Subfamília Rubioideae				
<i>Asperula arvensis</i>	Folhas	MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRS)	SHARIFI-RAD et al., 2016
<i>Borreria brasiliensis</i>	Planta inteira	Hex acetona etanol MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Bacillus subtilis</i> (isolado clínico); <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)	WONG et al., 2015
<i>Borreria exilis</i>	Planta inteira	Hex acetona etanol MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Bacillus subtilis</i> (isolado clínico); <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)	WONG et al., 2015
<i>Borreria laevicaulis</i>	Planta inteira	Hex acetona etanol MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Bacillus subtilis</i> (isolado clínico); <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)	WONG et al., 2015

<i>Borreria latifolia</i>	Planta inteira	Hex acetona etanol MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Bacillus subtilis</i> (isolado clínico); <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)	WONG et al., 2015
<i>Borreria remotifolia</i>	Planta inteira	Hex acetona etanol MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Bacillus subtilis</i> (isolado clínico); <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)	WONG et al., 2015
<i>Galium aparine</i>	Folhas	MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRS)	SHARIFI-RAD et al., 2016
<i>Hyperacanthus poivreii</i>	Folhas	MeOH	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i>	RAZAFINTSA LAMA et al., 2017.
<i>Hyperacanthus sp.1</i>	Folhas	MeOH	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i>	RAZAFINTSA LAMA et al., 2017.
<i>Morinda citrifolia</i>	Sementes	Hex DCM MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 e <i>Staphylococcus metilina resistente</i> (MRS)	DE LA CRUZ-SÁNCHEZ et al., 2019
<i>Morinda officinalis</i>	Raiz	Et	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 607), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) e <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633).	ZHAI et al., 2019
<i>Morinda tinctoria</i>	Folhas	Hex Cloroformio AcOEt MeOH	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	DEEPTI et al., 2012
<i>Myrmecodia pendens</i>	Bulbo	AcOEt	<i>Streptococcus mutans</i>	GARTIKA et al., 2018
<i>Myrmecodia tuberosa</i>	Tubérculos	MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	HANH et al., 2016
<i>Mitracarpus frigidus</i>	Partes aéreas	DCM	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442), <i>Salmonella enterica</i> sorovar <i>typhimurium</i> (ATCC 13311), <i>Shigella sonnei</i> (ATCC 11060), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13866), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536), <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	FABRI et al., 2012
<i>Mitracarpus villosus</i>	Folhas	DCM/ MeOH	<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 35667 e ATCC 700221) e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NGWOKE et al., 2017
<i>Pentanisia</i>	Rizomas	MeOH	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC	MPOFU et al

<i>prunelloides</i>		H ₂ O	11778), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) e <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	
<i>Psychotria bridsoniae</i>	Inflorescência	MeOH	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	RAZAFINTSA LAMA et al., 2017.
<i>Psychotria oreotrephesa</i>	Folhas Galhos Frutos	MeOH	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i>	RAZAFINTSA LAMA et al., 2017.
<i>Psychotria pilifera</i>	Folhas		<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775), <i>S. aureus</i> (ATCC 25922) e <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 10541).	LIU et al., 2016
<i>Rubia cordifolia</i>	Raiz	H ₂ O	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella enteritidis</i>	ISMAIL et al., 2016
<i>Spermacoce latifolia</i>	Planta inteira	Et	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	LUO et al., 2017
Subfamília Ixoroideae				
<i>Borojoa patinoi</i> Cuatrecasas	Fruto	H ₂ O	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonellatyphimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brochotrix thermosphacta</i> .	LÓPEZ et al., 2015
<i>Canthium Multiflorum</i>	Partes aéreas	DCM/ MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 799), <i>Actinobacter calco-aceticus</i> (DSM 30006), <i>Serratia plymuthica</i> (DSM 4540), <i>Pseudomonas stutzeri</i> (DSM 4166) e <i>Escherichia coli</i> (DSM 1116)	KOUAM et al., 2013
<i>Canthium subcordatum</i>	Frutos	Butanol AcOEt MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i>	JOUBOUHI et al., 2017
<i>Gardenia jasminoides</i>	Sementes	H ₂ O	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC13150), e <i>Salmonella enterica Typhimurium</i> (ATCC14028)	SARAVANAK UMAR et al., 2018
<i>Ixora megalophylla</i>	Folhas Gallhos	AcOEt	<i>Streptococcus mutans</i> (DMST 26095), <i>S. mitis</i> (ATCC 49456T)	PANYO et al., 2016
<i>Mussaenda roxburghii</i>	Partes aéreas	MeOH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MTCC 2488)	GHOSH et al., 2017

<i>Razafimandimbia sambiranensis</i>	Folhas Galhos	MeOH	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	RAZAFINTSA LAMA et al., 2017.
<i>Simira ecuadorensis</i>	Folhas	Et	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC 17802).	RONDÓN et al., 2018
<i>Vangueria madagascariensis</i>	Folhas frutos	MeOH	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> group A, <i>Streptococcus</i> group B, e <i>S. aureus</i> resistente a meticilina [MRSA])	MAHOMOOD ALLY e DILMOHAMED, 2016
<i>Vangueria spinosa</i>	Folhas	MeOH	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CHATTERJEE et al., 2011
Subfamília Cinchonoideae				
<i>Cinchona officinalis</i>	Casca	Et H ₂ O	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).	BUSSMANN et al., 2011
<i>Coptosapelta flavescens</i>	Raiz	acetona	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. aureus</i> metilina resistente	KONGYEN et al., 2014
<i>Hamelia patens</i>	Folhas	Et/H ₂ O	<i>Escherichia coli</i> (C600) <i>Staphylococcus aureus</i> (209P)	YASUNAKA et al., 2005
<i>Neolamarckia cadamba</i>	Frutos	H ₂ O	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>L. innocua</i> .	PANDEY et al., 2016

Algumas das espécies citadas na tabela acima também foram fracionadas e as substâncias obtidas identificadas e avaliadas para atividade antibacteriana. Das folhas da espécie *Vangueria spinosa* (Rubiaceae) foi isolado o flavonoide (-)-epicatequina-3-O-β-glucopiranosida (Figura 2) o qual apresentou atividade antibacteriana com CI₅₀ 4 mg/L frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHATTERJEE et al., 2011).

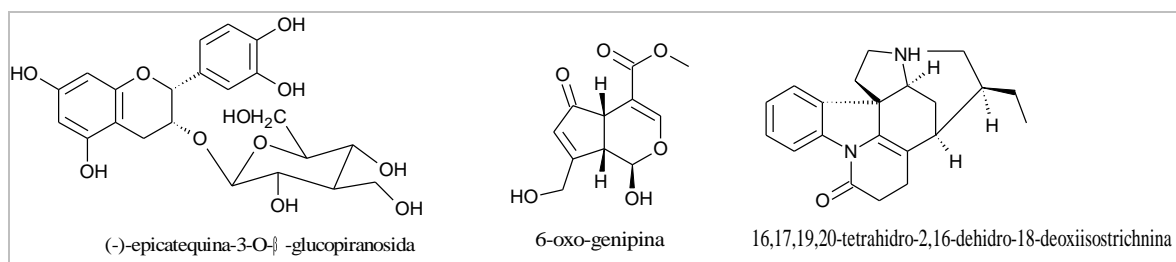
Em outro estudo realizado por Kouam e colaboradores (2013) com a espécie *Canthium multiflorum* (Rubiaceae), foram obtidas 13 substâncias, destacando-se o isolamento do iridoide 6-oxo-genipina (Figura 2), o qual foi testado frente à *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 799), *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM4166) e *Escherichia coli* (DSM 1116) para determinação de sua capacidade como antibacteriano, demonstrando uma significativa atividade inibitória frente a todas as cepas testadas e principalmente frente a *Staphylococcus aureus* com CIM de 0,01 µg/mL.

A partir das folhas da espécie *Psychotria pilifera*, foi isolado o alcaloide indólico 16,17,19,20-tetrahidro-2,16-dehidro-18-deoxiisostrichnina (Figura 2) o qual foi avaliado frente às cepas bacterianas *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados do ensaio mostraram que o alcaloide possui atividade antibacteriana frente a *E. coli* com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,781 µg/mL, a mesma concentração inibitória do antibiótico Cefotaxima (controle positivo) (LIU et al., 2016).

Extratos metanólicos das espécies *Hyperacanthus poivreii*, *Hyperacanthus* sp.1, *Hyperacanthus* sp.2, *Psychotria bridsoniae*, *P. oreotrephe* e *Razafimandimbisonia sambiranensis* todas pertencentes à família Rubiaceae, foram estudadas quanto a sua atividade antibacteriana frente às cepas *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Alguns dos extratos apresentaram CIM menor de 0,1mg/mL (RAZAFINTSALAMA et al., 2017).

Todas as estruturas das substâncias com atividade antibacteriana podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química das substâncias citadas, com atividade antibacteriana.



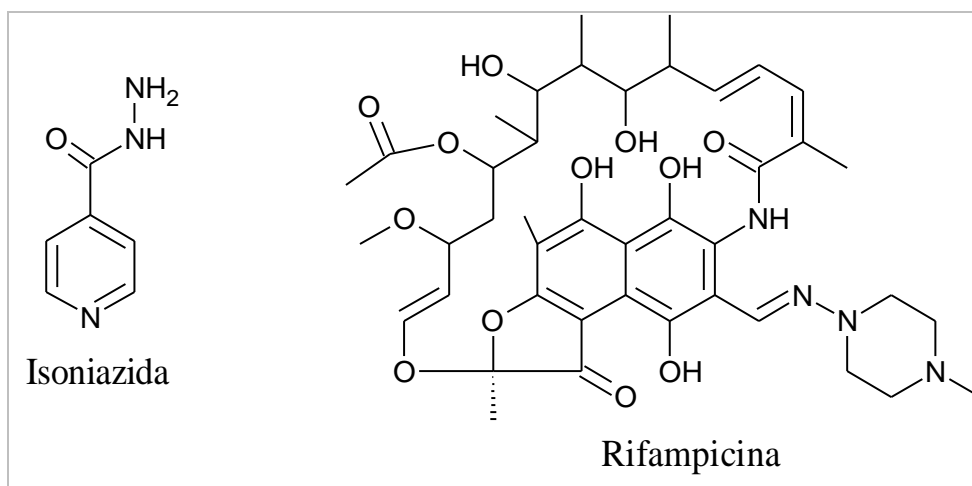
2.1.4 Atividade antimicrobacteriana

A tuberculose em humanos é causada principalmente pelo microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*, e é considerada como a nona principal causa de mortes e a primeira por doenças infecciosas no mundo; onde aproximadamente um terço da população mundial já foi infectada (ONU, 2017).

Segundo estimativas da OMS em 2016 foram registradas 1,3 milhões de mortes por tuberculose em pessoas HIV-negativas e de 374,000 em pessoas HIV-positivas. Além disso, também foi estimado que no mesmo ano, aproximadamente 10,4 milhões de pessoas foram infectadas (NGUTA et al., 2015; ONU, 2017). Isoniazida (Figura 3) e rifampicina (Figura 3) são os fármacos de primeira linha utilizados para o tratamento da tuberculose, os quais devem ser administrados durante um longo período de tempo o que contribui para uma elevada taxa de abandono do mesmo, favorecendo o desenvolvimento de cepas resistentes (ZHANG e YEWE, 2015).

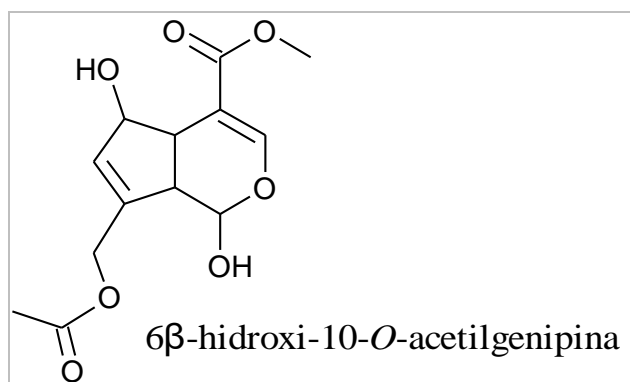
Em 2016, foram relatados 600.000 novos casos de tuberculose resistente a rifampicina, desses 490.000 tinham tuberculose multirresistente (ONU, 2017). Nesse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas com esquemas que encurtem o tempo de tratamento da tuberculose, e sendo os produtos naturais uma importante fonte de modelo de substâncias ativas, estes se tornam potenciais agentes anti-tuberculose (NGUTA et al., 2015).

Figura 3. Estrutura química de Isoniazida e Rifampicina.



Assim, na literatura são encontrados alguns exemplos de estudos realizados com espécies de Rubiaceae, como mostrado por Aro (2015) que testou os extratos de acetona das folhas de quinze espécies coletadas na África do Sul onde nove destas: *Cephalanthus natalensis* Oliv., *Cremanthium triflorum*, *Keetia* sp, *Kraussia floribunda*, *Mussaenda arcuata*, *Oxyanthus speciosus*, *Psychotria zombamontana*, *Mussaenda arcuata* e *Pavetta lanceolata* apresentavam atividade antimicobacteriana frente a cepas patogênicas de *M. tuberculosis* e cepas não patogênicas como *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* e *Mycobacterium bovis*. Também, Chaipukdee e colaboradores (2016) isolaram o iridoide 6 β -hidroxi-10-*O*-acetilgenipina (Figura 4) a partir da espécie *Rothmannia wittii* (Rubiaceae) o qual mostrou atividade antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* com um valor de CIM de 12,50 μ g/mL.

Figura 4. Estrutura química do iridoide 6β-hidroxi-10-O-acetilgenipina.



2.1.5 Atividade Antimalárica

A malária é uma doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. Estes possuem um ciclo complexo de vida, o qual precisa alternar entre hospedeiros. O mosquito *Anopheles* tem papel de vetor devido ao parasita ser transmitido aos humanos através da picada das fêmeas *Anopheles* infectadas (MILLER et al., 2002; PHILLIPS et al., 2017).

Dentre as espécies do gênero *Plasmodium* transmitidas pelo mosquito *Anopheles*, 6 destas são consideradas uma ameaça para saúde dos seres humanos: *Plasmodium ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. falciparum*, das quais as duas últimas representam uma maior ameaça, entretanto o *P. falciparum* é considerado o mais importante em termos de mortes ocasionadas por esta doença no mundo (COWMAN et al., 2016; OMS, 2017).

Os parasitas da malária provocam uma infecção que geralmente apresenta sintomas de uma doença febril leve (aguda), e outros como dor de cabeça, calafrios e vômitos, em muitos dos casos não se apresentam complicações e os episódios de febre são controlados pelas defesas imunitárias do corpo e após serem tratados com os

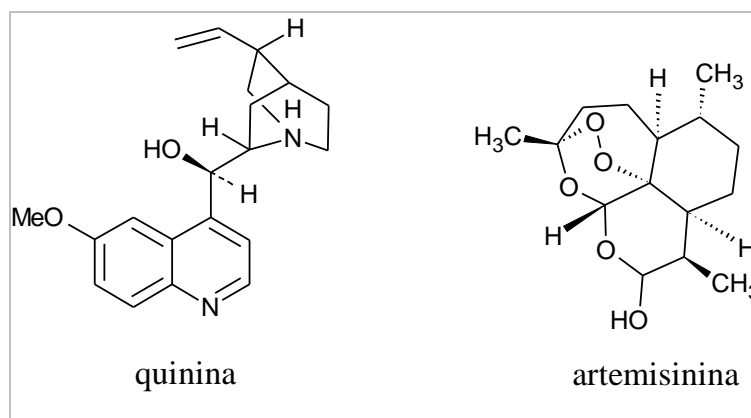
medicamentos adequados. Não obstante esta doença pode evoluir e tornar-se grave, levando inclusive à morte (MILLER et al., 2013).

As crianças são principalmente suscetíveis a desenvolver a forma mais grave da doença, com síndromes como: malária cerebral, acidose metabólica e anemia grave. Os medicamentos utilizados melhoram a sobrevivência do hospedeiro, porém, mesmo após tratamento com medicamentos de ação rápida como são os derivados de artemisinina, estima-se que a malária cerebral e a acidose metabólica tenham uma mortalidade de 15 a 20% e os sobreviventes podem sofrer sequelas neurológicas (MILLER et al., 2013).

Segundo mostra o relatório mundial sobre malária 2017 (OMS), em 2016 houve 5 milhões de casos a mais de malária do que em 2015, e as mortes ocasionadas por esta doença ficaram em torno de 445 mil. Ao mesmo tempo que a resistência a medicamentos antimaláricos se apresenta de forma recorrente, inicialmente frente a gerações de fármacos como cloroquina, atualmente as terapias combinadas baseadas em artimisinina estão relatando resistência a *P. falciparum*.

Os medicamentos antimaláricos, assim como outras drogas, podem ser descobertos através da triagem de pequenas moléculas ou de produtos naturais. De fato, um alcaloide importante com potente atividade antimalárica como a quinina foi isolada da espécie *Cinchona* spp. (Rubiaceae) (figura 5). Também a artemisinina (figura 5), tratamento atualmente recomendado para a malária, foi descoberta a partir de ervas medicinais chinesas usadas para tratar febres (MILLER et al., 2002).

Figura 5. Estrutura química de quinina e artemisinina.

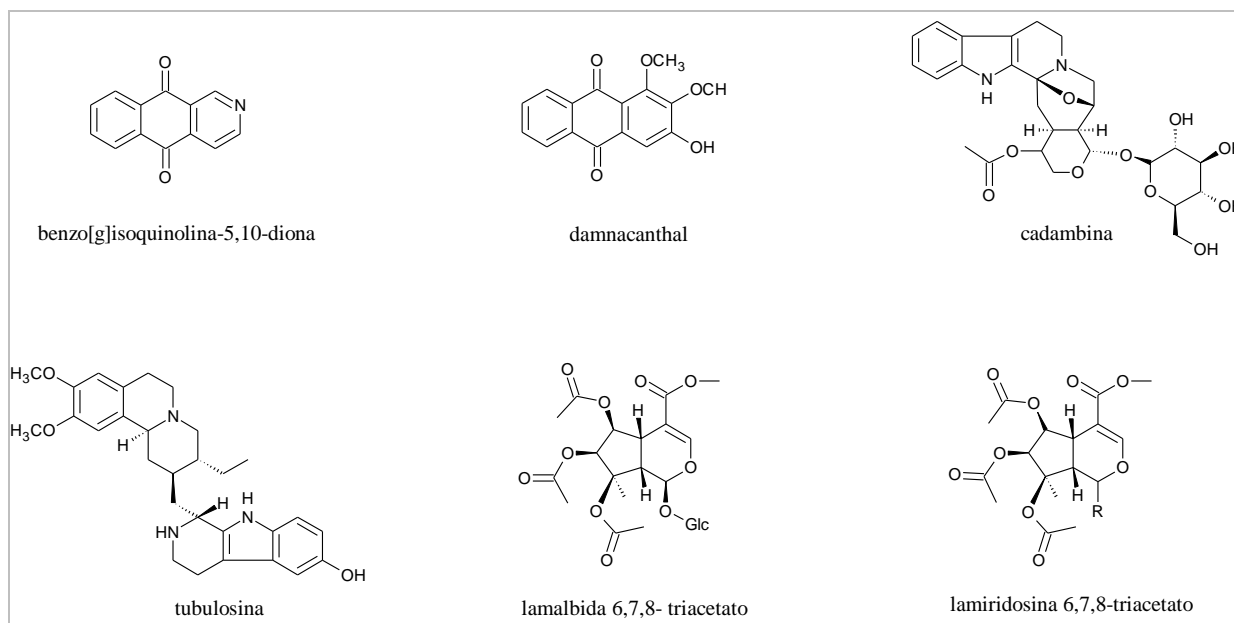


De espécies da família Rubiaceae foram testadas algumas substâncias que apresentaram importante atividade antimalárica. Como resultado de um estudo bioguiado com a espécie *Psychotria camponutans* foram isoladas duas benzoquinonas, das quais a benzo[g]isoquinolina-5,10-diona (figura 6) foi ativa frente a *P. falciparum* resistente à cloroquina, porém apresentou também uma elevada citotoxicidade (SOLIS et al., 1994). Outra espécie usada popularmente para tratar a malária é a *Anthocephalus chinensis* (Rubiaceae), da qual foram isoladas e caracterizadas 8 substâncias e testadas frente a cepa de *P. falciparum* K1 resistente à cloroquina, sendo a substância conhecida como cadambina (figura 6) um dos alcaloides majoritários presentes nesta espécie de Rubiaceae a que apresentou uma atividade antimalárica moderada, confirmando seu uso popular (KITAGAWA et al., 1996).

Sauvain e Moretti (1996), isolaram 3 alcaloides da espécie *Pogonopus tubulosus*, uma planta pertencente à família Rubiaceae e que tem uso popular na África do Sul como antimalárico. Dos 3 alcaloides o denominado como tubulosina (figura 6) foi o que apresentou uma maior atividade frente a cepas de *P. falciparum*, com uma CL₅₀ de 0,006 µg/mL.

Da *Morinda lucida*, outra espécie de Rubiaceae que foi estudada devido ao uso popular da mesma como antimalárico, foi isolada uma antraquinona conhecida como damnacantal (figura 6) a qual apresentou atividade antimalárica frente a *P. falciparum* conseguindo inibir em 100% o crescimento do parasita, na concentração de 30 µg/mL. (KOUMAGLO et al., 1991; SITTIE et al., 1999). Outra espécie de Rubiaceae, *Heinsia crinita* mostrou atividade antiplasmodial *in vitro* moderada, tanto para os extratos diclorometânicos dos galhos (CI₅₀ 29,2 µg/mL), como para os iridoides isolados a partir desta: lamalbida 6,7,8-triacetato (CI₅₀ 16,39 µg/mL) e lamiridosina 6,7,8-triacetato (CI₅₀ 44,56 µg/mL) (figura 6) (TSHIBANGUA et al., 2017).

Figura 6. Estruturas químicas de substâncias com atividade antimalárica.



2.1.6 Atividade angiogênica

O processo fisiológico conhecido como angiogênese permite que se ativem uma série de sinalizações químicas essenciais entre as células, possibilitando a formação de novos vasos sanguíneos participando no crescimento de órgãos e reparação dos vasos sanguíneos que foram danificados. Todavia, todo este processo de formação de novos

vasos pode ser inibido por outro conjunto de sinalizadores químicos (agentes anti-angiogênicos) (MOUSA e DAVIS, 2017).

Conseqüentemente, é necessário que ambos os tipos de sinalizadores (pro e anti-angiogênicos) se mantenham sempre em condições equilibradas para que a formação de novos vasos sanguíneos aconteça apenas quando seja necessário, pois o desequilíbrio entre os dois processos afetaria a progressão de diversas doenças sistêmicas, como é o caso de processos infecciosos, isquêmicos e do câncer (CARMELIET, 2005).

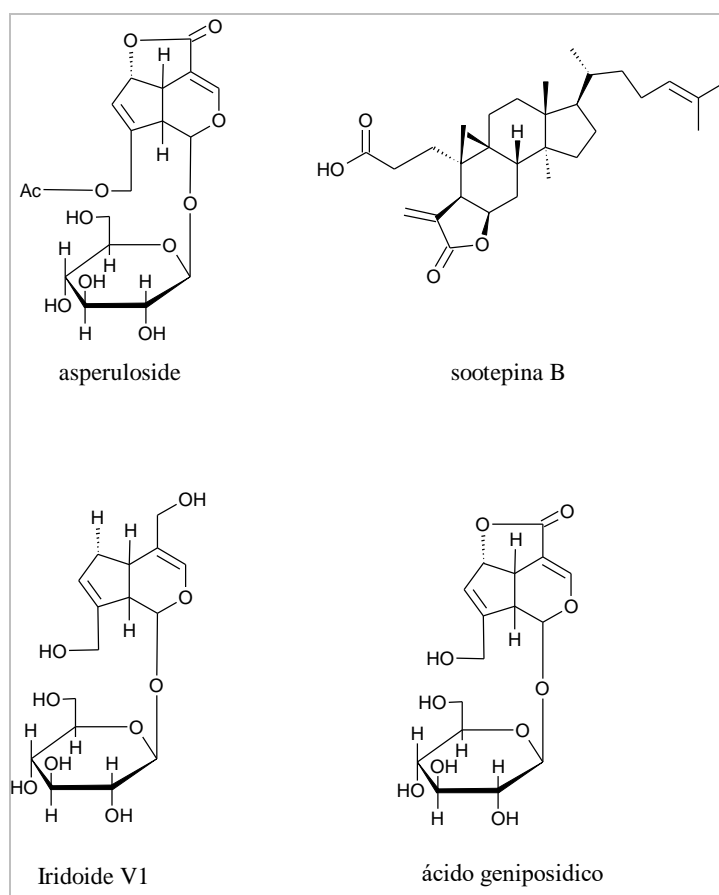
Nesse contexto, devido ao fato da angiogênese ter um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, se faz necessário o estudo dos mecanismos angiogênicos, assim como testar novas substâncias (podendo ser estas de origem natural) que possam ser utilizadas como potenciais drogas angiogênicas ou antiangiogênicas (AKITA, 2014).

Existem alguns estudos da atividade anti-angiogênica de Rubiaceae spp. como o realizado por Liang e colaboradores (2008) que isolaram e testaram o iridóide monoterpênóide glicosilado: asperuloside (figura 7) a partir de *Oldenlandia diffusa* (Rubiaceae) e observaram a inibição de novos vasos sobre embriões de peixe zebra em um 30% na concentração de 40 μM . Em outro estudo, o efeito antiangiogênico de triterpenos 3,4-seco-cicloartano isolados de *Gardenia obtusifolia* e *G. sootepensis*, foram avaliados por Pudhom e colaboradores (2012) o ensaio utilizou o modelo do anel aórtico de ratos (*ex-vivo*), aonde o triterpeno sootepina B (figura 7) apresentou uma potente atividade dose-dependente ao inibir a formação de novos vasos com um CI_{50} de 4,46 μM . Uma supressão da proliferação de células endoteliais e formação tubular foi observado (PUDHOM et al., 2012).

Em outro exemplo, da espécie *Galium tunetanum* foram isolados iridóides glicosilados, os quais foram testados para avaliar seu potencial angiogênico sobre a

formação de novos vasos na membrana corioalantóica de embriões de galinha. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram os efeitos antiangiogênicos das substâncias: asperuloside, ácido geniposídico e o iridoide V1 (figura 7), que inibiram a angiogênese em 67%, 59% e 54% respectivamente, sendo estes resultados dose-dependente (concentrações de 0.5–2 µg/ovo) (CAMERO et al., 2018). Chen e colaboradores (2018), observaram a capacidade proangiogênica (no modelo *in vivo* utilizando embriões de peixe Zebra) de naftoquinonas e antraquinonas que foram isoladas dos extratos etanólico e aquosos das raízes de *Rubia cordifolia* (Rubiaceae), sendo relatado o potencial de incrementar a atividade angiogênica em até 25%.

Figura 7. Estruturas químicas de substâncias com atividade antiangiogênica.



2.1.7 Toxicidade sobre *Artemia salina*

Um extrato ou substância bioativa pode ser considerada tóxica em doses elevadas, para determinação da toxicidade é possível realizar uma triagem avaliando a letalidade sobre um organismo animal simples como o microcrustáceo de água salgada, *Artemia salina* Leach (McLAUGHLIN e ROGERS, 1998), pois os cistos de *A. salina* permanecem viáveis durante muitos anos e são, por conseguinte, são uma adequada fonte biológica para um bioensaio rápido, simples e barato (MAYORGA et al., 2010).

Por várias décadas o microcrustáceo *A. salina* tem sido utilizado rotineiramente em laboratórios de todo o mundo como um organismo teste para pré-triagem de extratos de plantas com potencial medicinal (por exemplo, antimicrobianos ou antiparasitários) avaliando a toxicidade de produtos naturais, determinação de metabólitos fúngicos com atividade tóxica e também usados para avaliar o efeito dos produtos químicos em ambientes aquáticos (GONZÁLEZ et al., 2007; KOUTSAFTIS e AOYAMA, 2007).

Alguns autores relatam uma alta correlação entre os resultados obtidos por este teste e os testes antitumorais (realizados com células humanas), observando que a DE₅₀ de citotoxicidade são aproximadamente um décimo dos valores de CL₅₀ observados frente a *Artemia salina* (McLAUGHLIN e ROGERS, 1998; CARBALLO et al., 2002). Em um estudo comparativo realizado por Lagarto e colaboradores (2001), foi observado que existe uma alta correlação entre os resultados obtidos pelo teste frente *Artemia salina* e os resultados *in vivo* realizado com ratos, permitindo inferir à toxicidade aguda oral de extratos de plantas.

2.2 Gênero *Warszewiczia*

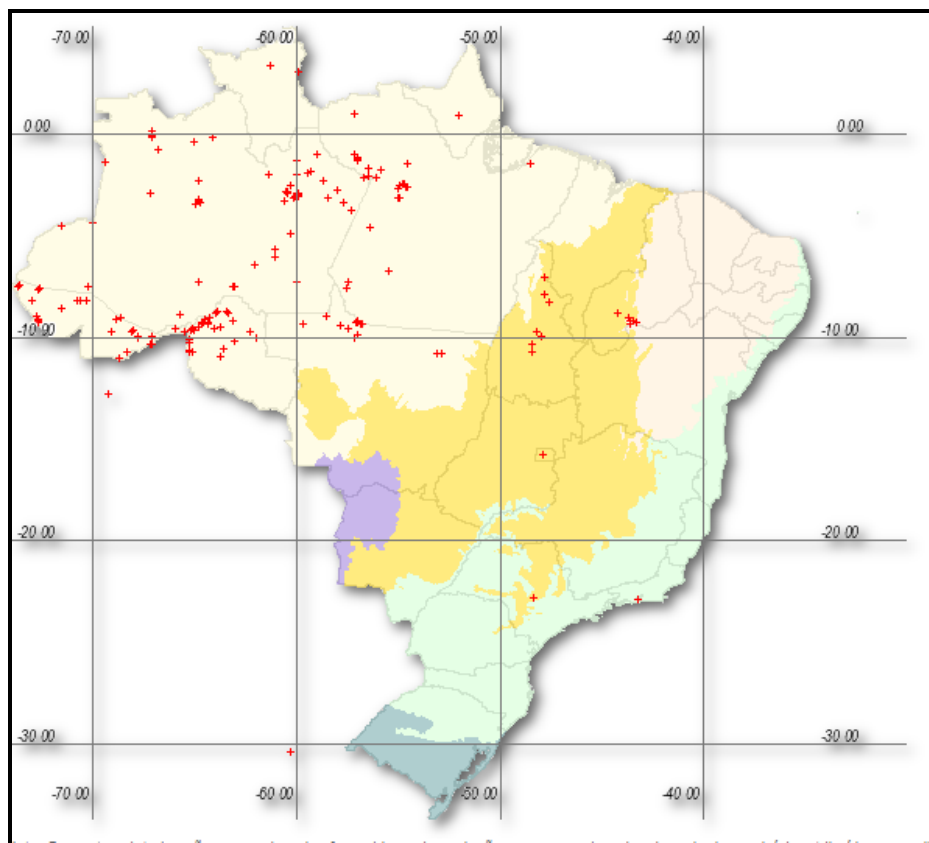
O gênero *Warszewiczia* possui oito espécies: *W. ambigua* Standl., *W. coccinea* (Vahl) Klotzsch, *W. elata* Ducke, *W. cordata* Spruce ex K. Schum., *W. longistaminea* K. Schum., *W. schwackei* K. Schum., *W. peltata* Wedd., *W. uxpanapensis* (Lorence)

C.M.Taylor (Flora do Brasil, 2017). Têm distribuição principalmente na América do Sul e Central. No Brasil, são encontradas em domínios fitogeográficos na Amazônia e caatinga, no Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins, Bahia, Piauí, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Figura 8).

Foi descrito inicialmente por Klotzsch e classificado dentro da tribo Rondeletieae (Sub-familia: Cinchonoideae) por vários autores como Hooker (1873), Schumann (1889, 1891), Robbrecht (1988), Delprete (1996), porém Bremer e Eriksson (2009) passaram a considerar este gênero como parte da tribo Condamineae (Subfamília: Ixoridae), a mesma classificação realizada por Kainulainen e colaboradores (2010) baseada em estudos filogenéticos sobre aspectos moleculares, ecológicos e morfológicos deste gênero.

Morfologicamente, as plantas correspondentes a este gênero se apresentam como árvores ou arbustos hermafroditas. Com ramos cilíndricos ou tetragonais, às vezes com exsudado resinoso. As folhas podem ser opostas, pecioladas, decussadas e as flores bissexuais. Os frutos se apresentam capsulares, globosos, subglobosos ou turbinados, lenhosos; com sementes numerosas, comprimidas ou angulosas (TAYLOR et al., 2007; LORENCE e TAYLOR, 2012).

Figura 8. Mapa da distribuição e concentração de espécies pertencentes ao gênero *Warszewiczia* no Brasil.



Fonte: www.splink.org.br (acessado em: 23 de maio de 2019)

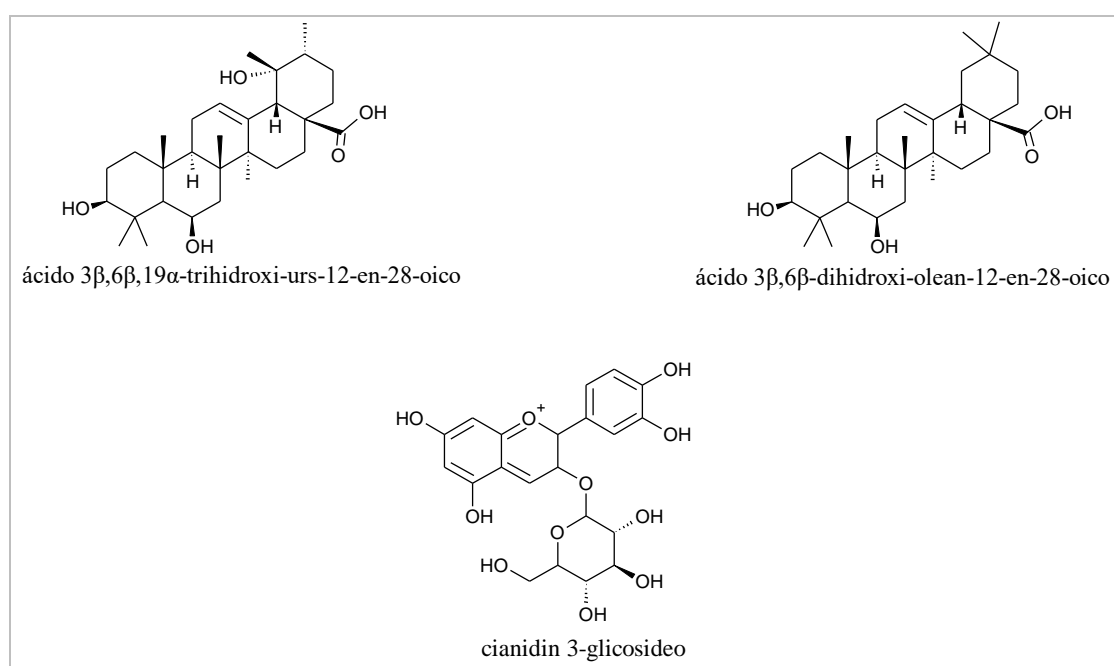
Em países como Colômbia, algumas espécies os galhos de *Warszewiczia* são utilizados como homeostático, o chá da raiz também é usado como laxante, antipirético, a infusão de flores é empregada como antiparasitário. No Peru, as raízes são utilizadas para o tratamento de hemorragia nasal, e em Porto Rico como antipirético (LORENCE e TAYLOR, 2012).

Uma triagem realizada com 133 espécies de Rubiaceae do herbarium do Panamá para determinação da presença de alcaloides, demonstrou a presença de alcaloides na espécie *Warszewiczia coccinea* (SOTO-SOBENIS et al., 2001).

Calderon e colaboradores (2009) realizaram um fracionamento bioguiado do extrato de folhas da espécie *Warszewiczia coccinea*, obtendo dois triterpenos: ácido

3 β ,6 β ,19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-oico e ácido 3 β ,6 β -dihidroxi-olean-12-en-28-oico (ácido sumaresinolico), ambas as substâncias com atividade anti-colinesterase. Da mesma espécie também foi isolada a substância cianidin 3-glicosídeo. Mas nenhum alcaloide foi isolado (Figura 9) (MOHAMMED e SEAFORTH, 1981). De *W. cordata* foi observado a capacidade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*, mediante o método MTT, onde o extrato etanólico dos galhos apresentou uma atividade moderada com CI₅₀ igual a 60,6 μ g/mL frente as formas amastigotas, enquanto que não apresentou atividade para as formas promastigotas (ESTEVEZ et al., 2007).

Figura 9. Estruturas químicas de substâncias obtidas a partir da espécie *Warszewiczia coccinea*.

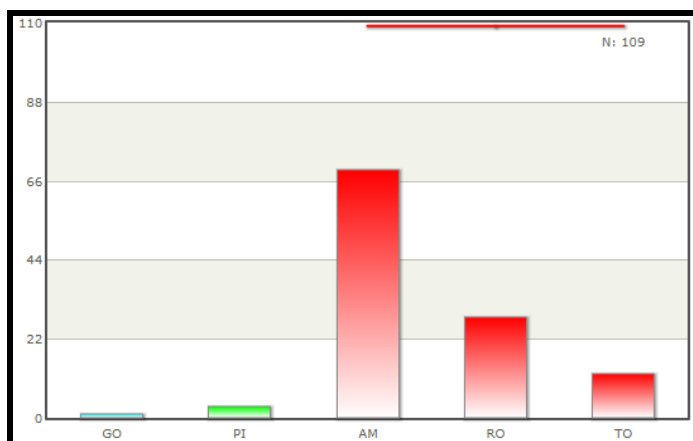


2.2.1 *Warszewiczia schwackei* K. Schum.

A espécie *Warszewiczia schwackei* se apresenta como árvore com aproximadamente 15 m de altura e 10-15 cm de diâmetro. Possui tronco acanalado e base acanalada, com folhas pecioladas e o pecíolo 2 - 3,5 cm de comprimento, ferrugíneo-tomentoso (TAYLOR et al., 2007).

Ocorre nas florestas tropicais do Peru, Colômbia, Venezuela, Equador e no Brasil, na região norte, no Amazonas (maior quantidade de registros de coletas realizadas, segundo observado na figura 10), Rondônia, Tocantins e no Nordeste, na Bahia e Piauí. Na Reserva A. Ducke ocorre na floresta de vertente e de platô, com flores e frutos de fevereiro a julho (Flora do Brasil, 2017).

Figura 10. Distribuição de registros de espécies de *Warszewiczia schwackei* por localidade no Brasil.



Fonte: www.splink.org.br (acessado em: 23 de maio de 2019)

Na literatura consultada, não foram encontradas pesquisas relatando algum tipo de estudo fitoquímico ou de bioprospecção, que visem à caracterização química e biológica aprofundada dos metabólitos da espécie *W. schwackei*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Conhecer a atividade biológica e composição química de *Warszewiczia schwackei*.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Realizar a avaliação biológica dos extratos de *Warszewiczia schwackei*, quanto às atividades antioxidantes, antimicrobianas, antimicobacterianas, antimaláricas, de citotoxicidade, antiangiogênicas e de toxicidade frente à *Artemia salina*;
- Isolar as substâncias presentes nos extratos ativos;
- Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas através da combinação de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C , mono e bidimensionais) e espectrométricos (espectrometria de massas).

4 METODOLOGIA

4.1 Procedimentos gerais

No presente trabalho foi realizada a bioprospecção da espécie *Warszewiczia schwackei*. Para isto, inicialmente foram coletados folhas e galhos, os quais foram secos, moídos e extraídos com solventes e os extratos avaliados nos ensaios biológicos e químicos. Os extratos foram fracionados e as substâncias obtidas identificadas.

4.2 Equipamentos utilizados

- **Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Bruker BioSpin AG, modelo Fourier 300 Ultrashield, 300 MHz. O solvente utilizado na dissolução das amostras foi clorofórmio deuterado (CDCl_3), dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), os espectros de hidrogênios foram obtidos na frequência de 300 MHz e os espectros de carbono foram obtidos na frequência de 75 MHz, os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamentos em Hz.

- **Espectrometria de alta resolução (EMAR)**

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro da Bruker, modelo microTOF-Q II, analisador *time of flight*, fonte ESI em modo positivo e negativo com resolução de 17500 (FWHM). Utilizou-se o programa Compass, versão 4.1 para controle, aquisição e processamento dos dados.

- **Outros equipamentos**

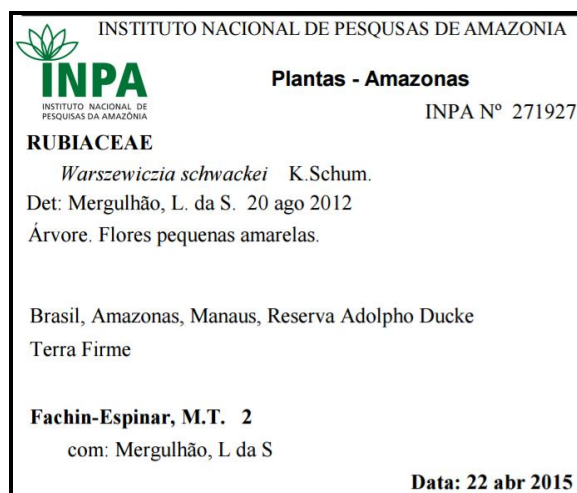
- Banho de ultrassom: UNIQUE, modelo USC-2800, Frequência US: 40 kHz.
- Leitor de Elisa: Thermo scientific, Multiskan GO.
- Evaporador rotatório: Fisatom, modelo 550.

- Balança analítica: Shimadzu, modelo: AUY220.
- Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-6AD, desgaseificador: DGU-14A, ligado a um detector UV/DAD: SPD-M20A prominence e a detector de fluorescência: SCL-10A-VP Shimadzu.
- Incubadora de ovos: Juli, chocmaster.
- Espectrofotômetro: Femto, modelo Cirrus 80ST.

4.3 Coleta e identificação

O material vegetal foi coletado em 22 de abril de 2015 na Reserva A. Ducke/INPA, localizado no Km 26, rodovia AM 010, município de Manaus, AM. Foi preparada a exsicata do material vegetal, enviada para identificação taxonômica e depositada no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Biodiversidade do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. (Figura 11)

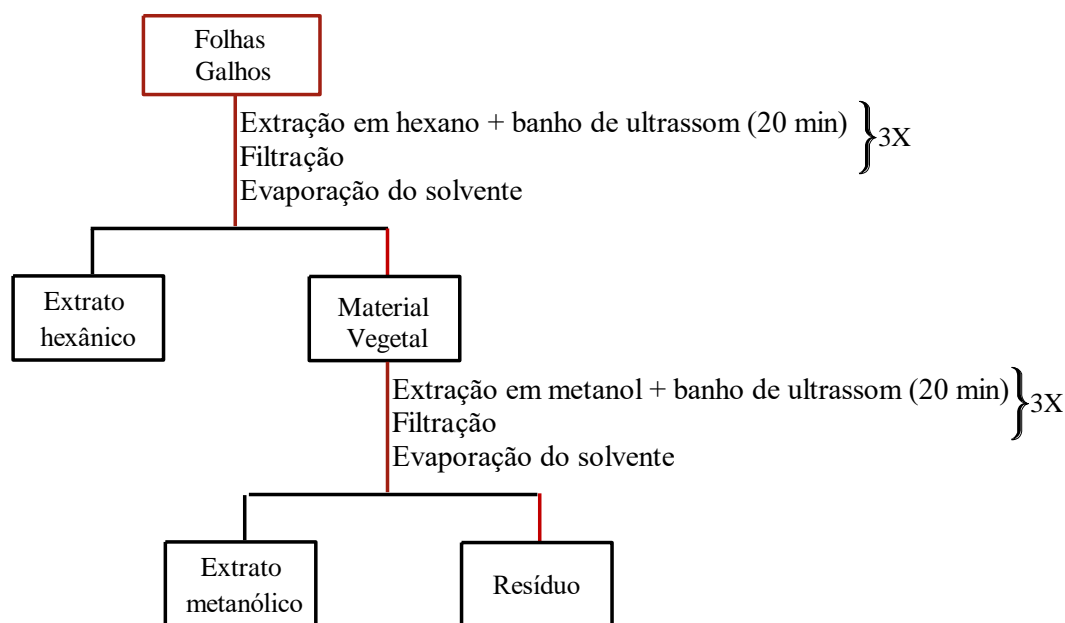
Figura 11. Etiqueta com o número de depósito da exsicata de *Warszewiczia schwackei* expedida pelo herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.



4.4 Preparação e obtenção dos extratos vegetais

O material vegetal foi inicialmente separado em folhas e galhos, secos em estufa a 40°C e triturado em moinho de facas para posterior extração com solventes orgânicos e preparo dos extratos. O material seco e moído foi primeiramente extraído com hexano (folhas 1,30 g/10 mL m:v, galhos 1,30 g/10 mL), usando banho de ultrassom por 20 min. Após isso o material vegetal foi filtrado e novamente extraído com hexano. Este procedimento foi repetido mais duas vezes (totalizando 3 extrações com hexano). Após a extração com hexano, o material vegetal folhas e galhos (1,30 g/10 mL) foi seco e extraído com metanol, também com auxílio de banho de ultrassom por 20 min. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos filtrados (hexânico e metanólico), foram concentrados utilizando evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura < 50°C (Figura 12).

Figura 12. Fluxograma da preparação e obtenção de extratos a partir da espécie *Warszewiczia schwackei*.



4.5 *Análises químicas e fracionamentos dos extratos*

As análises químicas iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio com sílica gel impregnado com indicador de fluorescência UV₂₅₄ (Alugram SIL G/UV₂₅₄). As amostras foram aplicadas nas cromatoplacas e eluídas com solventes escolhidos em diferentes proporções de acordo com a polaridade das amostras. Para a revelação das substâncias presentes nas placas cromatográficas foram utilizados métodos físicos como: luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 e 365 nm), e métodos químicos como: iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e reagente de Dragendorff, onde a solução reveladora foi borrifada sobre a cromatoplaca.

Os extratos foram analisados também por ressonância magnética nuclear de ¹H, para obter informação sobre as classes químicas que iriam direcionar o fracionamento, o qual foi feito usando diversas técnicas cromatográficas, como:

Cromatografia em coluna aberta (CCA), utilizando-se diferentes fases estacionárias como sílica gel (Sigma-Aldrich 230-400 mesh), florisil (Sigma-Aldrich, 100-200 mesh), Sephadex LH-20 (Sigma), entre outras e eluídas com os solventes apropriados, conforme mais embaixo

Cromatografia líquido-líquido (partição), para os extratos metanólicos de folhas e galhos, os quais foram solubilizados na proporção de 1:50 (1 g de extrato para 50 mL de solvente), sendo o solvente inicial uma solução de metanol e água destilada (50:50 v/v), uma vez solubilizada a amostra foi extraída com diclorometano (DCM) por três vezes e finalmente com acetato de etila (AcOEt), obtendo-se três fases (DCM, AcOEt e H₂O-MeOH).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) esta técnica de separação foi utilizada durante o processo de purificação das amostras. Foram utilizadas duas colunas: Luna 5 μ C18(2) 100A, tamanho: 250 x 4,60 mm (analítica) e a coluna Luna 5 μ C18(2) 100A, tamanho: 250 x 10,00 mm (semi-preparativa). Os solventes usados foram metanol, acetonitrila (grau HPLC, TEDIA), água Milli-Q e ácido acético.

4.5.1 Fracionamento do extrato hexânico das folhas

O extrato hexânico das folhas foi submetido a fracionamento como mostrado no fluxograma (Figura 13), onde inicialmente 2,00 g desse extrato foram separados em coluna cromatográfica aberta de vidro (Vidrolabor, Labor-Quim/Brasil) de 26 x 3 cm utilizando-se como fase estacionária 100 g de sílica gel (Sigma-Aldrich, 100-200 mesh) e eluída em gradiente de DCM 100%, DCM/AcOEt (9:1; 7:3; 1:1; 3:7), AcOEt 100%, AcOEt/acetona (1:1) e MeOH 100% o que rendeu 56 frações (Tabela 2). Após análise por CCDC, foram reunidas e selecionadas para refracionamento as seguintes frações: 2 a 7, 18 a 22, 29 a 37, bem como a fração 23.

Figura 13. Fluxograma de fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

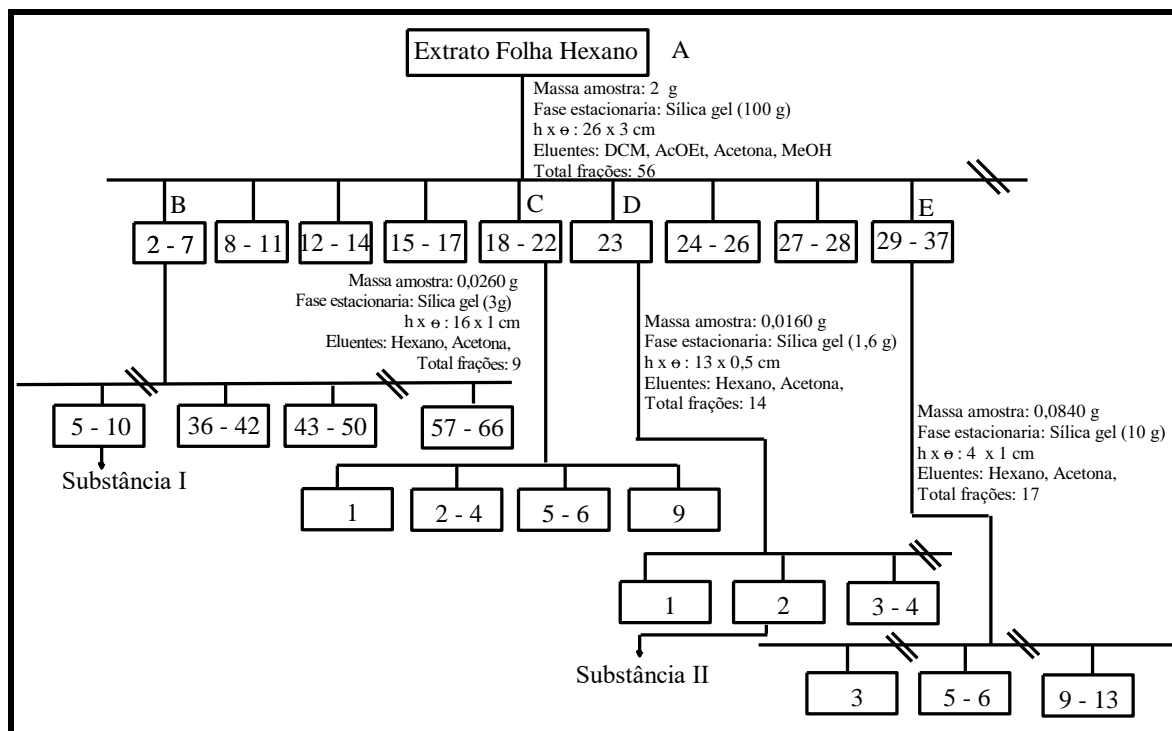


Tabela 2. Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-14
DCM/AcOEt 9:1	15-22
DCM/AcOEt 7:3	23-28
DCM/AcOEt 1:1	28-32
DCM/AcOEt 3:7	33-38
AcOEt 100%	39-41
AcOEt/acetona 1:1	42-50
MeOH 100%	51-56

A fração 2-7 (0,800 g) foi fracionada em coluna de sílica gel (64 g) de 18 cm de altura e 3 cm de diâmetro com os solventes hexano 100%, hexano/DCM (95:0,5; 8:2; 1:1; 3:7), DCM 100%, DCM/acetona (1:1), acetona (100%) e MeOH 100%, obtendo-se 71 frações (Tabela 3). Destas as frações 5 a 10 foram reunidas por mostrar características semelhantes quando analisadas por CCDC e devido ao elevado grau de

pureza observado foi enviado para ser analisado por RMN de ^1H , obtendo-se assim a substância denominada de I.

Tabela 3. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 2-7 oriunda do extrato hexânico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

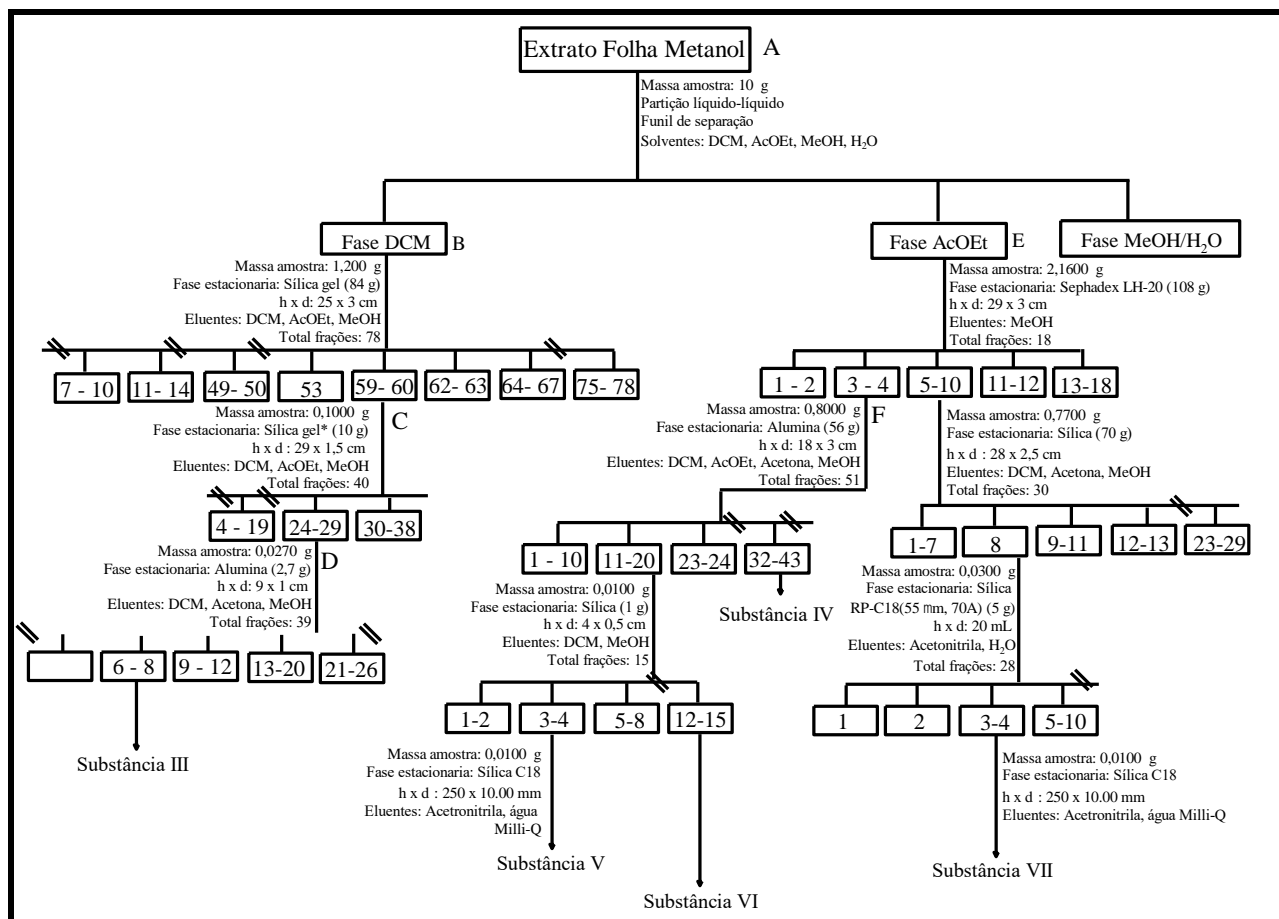
Sistemas de eluição	Frações coletadas
hexano 100%	1-19
hexano/DCM 95:0,5	20-29
hexano/DCM 8:2	30-39
hexano/DCM 1:1	40-52
hexano/DCM 3:7	53-58
DCM 100%	59-61
DCM/acetona 1:1	62-65
acetona 100%	66-70
MeOH 100%	71

A partir do fracionamento da fração número 23 (0,0160 g), utilizando-se coluna cromatográfica aberta de vidro com fase estacionária de sílica gel (1,6 g) de 13 cm de altura e 0,5cm de diâmetro e eluída com hexano/acetona (8:2) (frações de 1 a 13) e acetona 100% (fração 14). Obtiveram-se 14 frações e após análises por CCDC e RMN de ^1H foi possível determinar que a fração número dois, apresentava um elevado grau de pureza, denominando-a de substância II.

4.5.2 Fracionamento do extrato metanólico das folhas

O extrato metanólico das folhas (10,00 g) foi submetido a fracionamento como mostrado no fluxograma (Figura 14). Inicialmente realizou-se uma partição líquido-líquido. A amostra foi solubilizada em 500 mL de uma mistura de MeOH/H₂O (50:50 v/v) e posteriormente extraído com os solventes DCM e AcOEt, obtendo-se as três fases.

Figura 14. Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.



*Sílica gel impregnada com acetato de sódio.

A fase DCM (1,200 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica aberta, com sílica gel como fase estacionária (84 g) de 25 cm de altura e 3 cm de diâmetro e eluída com os solventes: DCM 100%, DCM/AcOEt (9:1; 7:3; 1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (9:1), AcOEt/MeOH (1:1) e MeOH 100% (Tabela 4), obtendo-se no total 78 frações. As frações foram analisadas por CCDC e foi observado a possível presença de alcaloides entre as frações 49 a 63 quando reveladas com reagente de Dragendorff e foram reunidas de acordo com a semelhança nos Rfs das mesmas.

Tabela 4. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fase DCM do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-16
DCM/AcOEt 9:1	17-27
DCM/AcOEt 7:3	28-38
DCM/AcOEt 1:1	39-49
AcOEt 100%	50-60
AcOEt/MeOH 9:1	61-66
AcOEt/MeOH 1:1	67-77
MeOH 100%	78

Após a reunião das frações 59-60 (0,1000 g), esta foi refracionada utilizando-se uma coluna com sílica gel (10 g) de 29 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro. A impregnação da sílica foi realizada com acetato de sódio, para isto foi preparada uma solução de 1 g de acetato de sódio em 10 mL de H₂O destilada. Esta última foi adicionada aos 10 g de sílica e posteriormente adicionados mais 50 mL de MeOH e agitado com bastão para uniformizar. Após secar à temperatura ambiente, foi colocada em estufa a mais ou menos 65°C por aproximadamente 30 min. Depois desse tempo a coluna foi empacotada e eluída normalmente com o primeiro sistema começando por DCM/AcOEt (6:4; 1:1; 4:6; 2:8; 1:9), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (9:1; 7:3; 2:8) e MeOH 100%. As frações coletadas em cada sistema podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 59-60 obtidas da fase DCM do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/AcOEt 6:4	1-3
DCM/AcOEt 1:1	4-5
DCM/AcOEt 4:6	6-7
DCM/AcOEt 2:8	8-12
DCM/AcOEt 1:9	13-18
AcOEt 100%	19-25
AcOEt/MeOH 9:1	26-30
AcOEt/MeOH 7:3	31-37
AcOEt/MeOH 2:8	38-39
MeOH 100%	40

As 40 frações obtidas do fracionamento da fração 59-60 foram analisadas por CCDC e algumas destas foram reunidas, determinando-se continuar o fracionamento das frações reunidas 24-29 (0,0270 g) em coluna aberta de alumina (2,7 g) de 9 cm de altura e 1 cm de diâmetro e eluída com DCM/acetona (6:4; 2:8), acetona 100%, acetona/MeOH(9:1; 8:2; 6:4; 1:1) e MeOH 100% (Tabela 6), obtendo-se um total de 39 frações das quais foi possível isolar a substância III.

Tabela 6. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 24-29 (59-60) obtidas da fase DCM do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/ acetona 6:4	1-14
DCM/ acetona 2:8	15-17
acetona 100%	18-20
acetona /MeOH 9:1	21-24
acetona /MeOH 8:2	25-28
acetona /MeOH 6:4	29-30
acetona /MeOH 1:1	31-36
MeOH 100%	37-39

Também foi realizado o fracionamento da fase acetato de etila das folhas (2,1600 g), por meio de uma coluna aberta com fase estacionária de Sephadex LH-20 (108 g) de 29 cm de altura e 3 cm de diâmetro, utilizando-se um sistema de eluição isocrático com MeOH 100% e foram obtidas 18 frações. Após análises das mesmas em CCDC a fração reunida 3-4 (0,800 g) foi refractionada em coluna aberta de alumina (56 g) de 18 cm de altura e 3 cm de diâmetro, onde o sistema de eluição foi DCM/AcOEt (1:1; 4:6; 3:7), AcOEt 100%, AcOEt/acetona (9:1; 1:1; 3:7), acetona 100%, acetona/MeOH (8:2; 1:1; 3:7) e MeOH 100%, obtendo-se 51 frações como mostrado na tabela 7. Posteriormente, na análise por CCDC, foi possível observar que as frações de 32 a 43 se encontravam com um elevado grau de pureza e foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C (uni e bidimensional). Essas frações foram denominadas de substância IV.

Tabela 7. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 3-4 obtidas da fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/AcOEt 1:1	1-8
DCM/AcOEt 4:6	9-13
DCM/AcOEt 3:7	14-17
AcOEt 100%	18-21
AcOEt/ acetona 9:1	22-26
AcOEt/ acetona 1:1	27-30
AcOEt/ acetona 3:7	31-33
acetona 100%	34-37
acetona /MeOH 9:1	38-41
acetona /MeOH 7:3	42-45
acetona /MeOH 2:8	46-48
MeOH 100%	49-51

Posteriormente as frações reunidas de 11 a 20 (0,0100 g) foram refracionadas utilizando-se fase estacionaria de sílica (1 g) em uma coluna de vidro de 4 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro. A amostra foi eluída com um sistema de eluição isocrático com DCM/MeOH (9:1) e foram obtidas um total de 15 frações. Após análises das mesmas em CCDC foi possível observar que as frações de 3-4 ainda se encontravam em mistura. A mesma foi refracionada por CLAE, utilizando-se uma coluna Luna 5 μ C18(2) 100A, tamanho: 250 x 10,00 mm (semi-preparativa). Os solventes usados foram acetonitrila (20%) (grau CLAE, Tedia), água Milli-Q, obtendo-se uma fração de um pico majoritário que foi enviado para análise por RMN de ^1H , ^{13}C (uni e bidimensional) e após análise foi determinado que se tratava de uma substância que foi denominada de V.

A fração de 12-15 se encontrava com um elevado grau de pureza e foi analisada por RMN ^1H , ^{13}C (uni e bidimensional) e espectrometria de massas. Foi verificado que se tratava de uma outra substância diferente que foi denominada de VI.

Da mesma fase (acetato de etila), foram fracionadas as frações reunidas de número 5-10 (0,7700 g), em coluna cromatográfica aberta de vidro, utilizando-se como fase estacionaria sílica gel (70 g) de 28 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro. Para isto

foram utilizados os solventes DCM, acetona e MeOH nas seguintes proporções: DCM/acetona (7:3; 1:1; 2:8), acetona 100%, acetona/MeOH (9:1; 1:1) e MeOH 100%, obtendo-se 30 frações (Tabela 8).

Após análises por CCDC de todas as frações, estas foram reunidas pela similaridade observada e foi dada continuidade ao fracionamento por CLAE da fração número 8 (0,0300 g), para o qual foi utilizada uma coluna Strata (Phenomenex©) RP-C18-E (55 µm, 70A) de 5 g/20 mL, os solventes utilizados para eluir a amostra foram: acetonitrila e água deionizada acidificada com ácido acético (pH= 5) nas seguintes proporções: acetonitrila/H₂O (1:9; 2:8; 3:7; 1:1; 6:4), acetonitrila 100%, obtendo-se 28 frações (Tabela 9) as quais, após análises por CCDC e reveladas com cloreto férrico, foram reunidas e enviadas para análise por RMN ¹H, ¹³C (uni e bidimensional) e espectrometria de massas. Assim foi verificado que se tratava de uma mistura de flavonoides, motivo pelo qual a fração foi refractionada por CLAE, utilizando-se uma coluna Luna 5 µ C18(2) 100A, tamanho: 250 x 10,00 mm (semi-preparativa). Os solventes usados foram acetonitrila (20%) (grau CLAE, Tedia), água Milli-Q acidificada (pH= 5) com ácido acético, obtendo-se um pico majoritário que foi enviado para análise por RMN de ¹H, ¹³C (uni e bidimensional) e após análise foi determinado que se tratava de uma substância que foi denominada de VII.

Tabela 8. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 5-10 obtidas da fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/ acetona 7:3	1-6
DCM/ acetona 1:1	7-12
DCM/ acetona 2:8	13-15
acetona 100%	16-21
acetona /MeOH 9:1	22-23
acetona /MeOH 1:1	24-29
MeOH 100%	30

Tabela 9. Sistema de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração 8 obtida da fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
acetonitrila/H ₂ O 1:9	1-6
acetonitrila/H ₂ O 2:8	7-10
acetonitrila/H ₂ O 3:7	11-16
acetonitrila/H ₂ O 1:1	17-20
acetonitrila/H ₂ O 6:4	21-23
acetonitrila/H ₂ O 100%	24-28

4.6 Identificação das substâncias isoladas

A identificação/caracterização das substâncias isoladas foi realizada por meio das análises dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (mono e bidimensionais) e LC/EM, conforme as características estruturais.

4.7 Avaliação da atividade de citotoxicidade

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica (NUPEMM) da faculdade de Medicina da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), sob supervisão da Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada segundo a metodologia recomendada por Ahmed e colaboradores (1994). Foram utilizadas células macrofágicas J774 A.1. Inicialmente as células foram mantidas em meio completo RPMI-1640, suplementado com: 10% de soro bovino fetal inativado por calor (FBS); penicilina 100 U/mL e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C, em atmosfera umidificada com CO₂ a 5%. Após atingir à confluência, as células foram retiradas e contadas. Para o ensaio de citotoxicidade, 1x10⁵ células/mL foram semeadas em 200 µL de meio completo em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, com a finalidade de permitir a adesão celular antes do teste com os extratos.

Os extratos foram dissolvidos em DMSO e submetidos a uma dupla diluição seriada, obtendo-se concentrações entre 1250 e 3,9 µg/mL. As células foram expostas aos extratos nas diferentes concentrações durante um período de 24 h. Após esse período uma solução de resazurina foi adicionada às culturas celulares e incubada por mais 6 horas. A respiração celular é um parâmetro utilizado como indicador de viabilidade celular que é detectado pela redução da resazurina a resorufina, cuja cor rosa e fluorescência indica viabilidade celular, enquanto que uma persistente cor azul da resazurina é um sinal de morte celular. As medições de fluorescência (530 nm de excitação e 590 nm de emissão) foram realizados em um microfluorímetro SPECTRAfluor Plus (Tecan). O valor da CI_{50} foi definido como a maior concentração de extrato na qual 50% das células são viáveis em relação ao controle.

4.8 *Atividade antioxidante*

Este ensaio foi realizado no laboratório de bioprospecção e biotecnologia (LABB-INPA). Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método com DPPH, segundo descrito por Martins e colaboradores (2014). Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH solubilizando 28 mg do DPPH em 1 mL de DCM e adicionando MeOH até atingir o volume de 100 mL. Também foi preparada uma solução do ácido ascórbico (controle positivo) com água deionizada em uma concentração de 900 µg/mL a partir da qual foram preparadas diluições resultando nas seguintes concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e 720 µg/mL.

Posteriormente foram preparadas as curvas com DPPH, adicionando-se em seis micro-tubos 990 µL de DPPH mais 10 µL da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, foi adicionada uma solução dos extratos na concentração

de 0,5 mg/mL nas soluções de DPPH, em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro das soluções após 30 minutos de reação.

Para avaliação da atividade antioxidante utilizando o método com Fe^{3+} a curva foi feita adicionando em seis novos micro-tubos 10 μL da solução de ácido ascórbico (controle positivo) nas diferentes concentrações, mais 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} e 980 μL da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 508 nm.

Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, foi adicionada uma solução dos extratos na concentração de 0,5 mg/mL nas soluções de Fe^{3+} / fenantrolina, em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância (508 nm) no espectrofotômetro das soluções após 1 h de reação.

Para ambos os testes os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico, utilizando-se a escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante proposta por Martins e colaboradores (2014) (Tabela 10).

Tabela 10. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martins et al., 2014).

Análise da atividade antioxidante (mg de extrato/ mg de ácido ascórbico)	Escala de comparação
Menor que 1,0	Muito ativo
Entre 1,1 e 2,0	Ativo
Entre 2,1 e 3,0	Atividade moderada
Maior que 3,1	Inativo

4.9 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada no laboratório de bioprospecção e biotecnologia (LABB-INPA).

Cepas: Para os ensaios antibacterianos foram utilizadas cepas bacterianas sensíveis (ATCC) gram-positivas e gram-negativas, cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ) *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606-143), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Edwardsella tarda* (ATCC 15947), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella enteritidis* (ATCC 6051) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600).

Preparação do inóculo: para preparação do inóculo, os microrganismos testes foram repicados em 10 mL de caldo Müeller-Hinton, posteriormente a suspensão foi incubada durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação. Após turvação do caldo Müeller-Hinton (MH), foram preparadas as suspensões bacterianas, ajustando-se a turbidez da cultura com solução salina estéril ou caldo. A concentração do inóculo foi padronizada comparando a turbidez com a solução padrão de 0,5 da escala de McFarland, em espectrofotômetro (625 nm) obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,10, o que equivale a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

Método de diluição em caldo: Para esta análise, o método utilizado foi o de microdiluição segundo orientações propostas por CLSI (2012). Os extratos foram primeiramente solubilizados em DMSO a 5%.

Inicialmente foram adicionados em cada um dos poços (microplaca de 96 poços) 100 µL do meio de cultura e na primeira fila 100 µL da concentração inicial do extrato (2000 µg/mL) e posteriormente foram realizadas diluições seriadas sucessivas (microdiluição 1:2) a modo de obter-se concentrações entre 1000 e 15,6 µg/mL do extrato e em seguida foram adicionados 10 µL do inóculo (diluída 20 vezes contendo aproximadamente $1,5 \times 10^4$ UFC/mL).

Para o controle negativo foi utilizado 100 µL de caldo mais DMSO (concentração final de 5%) e 10 µL inóculo. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina nas concentrações de 125 a 0,97 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida, antes da placa ser incubada à temperatura e tempo adequados para cada microrganismo, foi realizada uma leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm. Após o período de incubação foi realizada uma segunda leitura no espectrofotômetro (sob as mesmas condições iniciais) para determinação ou não do crescimento bacteriano.

4.10 Atividade antimicobacteriana

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica (NUPEMM) da faculdade de Medicina da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), sob a supervisão da Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos.

O método REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) é um ensaio colorimétrico que emprega indicadores de oxidação-redução para determinar o perfil de susceptibilidade frente à micobactérias. Considerado rápido e simples, utiliza a resazurina como um indicador de oxi-redução para avaliar a viabilidade dos microrganismos teste (PALOMINO et al., 2002).

Preparação da suspensão e do inóculo micobacteriano: a atividade dos extratos, frações e substâncias foram avaliadas frente à cepa de *Mycobacterium tuberculosis* pan-sensível H37Rv (ATCC 27294). A cepa foi cultivada em meio Ogawa-Kudoh por aproximadamente 14 dias a uma temperatura de 37°C. Após esse período foi preparada uma suspensão bacteriana em um tubo estéril contendo perolas de vidro e homogeneizada com água destilada para ajuste da turbidez segundo o tubo 1 da escala

de McFarland. Em seguida a suspensão foi adicionada ao caldo Middlebrook 7H9 na proporção de 1:20 (FRANZBLAU et al., 1998).

Preparação das placas de triagem: as amostras foram testadas frente às cepas de *M. tuberculosis*, onde foi avaliada a sensibilidade do microrganismo utilizando uma concentração fixa de 400 µg/mL, em uma microplaca de 96 poços. Em cada um dos poços de teste foram adicionados 75 µg/mL de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) para *M. tuberculosis*, 75 µg/mL do extrato na concentração de 400 µg/mL e 75 µg/mL do inóculo. Assim, a concentração da amostra em cada poço foi de 400 µg/mL. Posteriormente, a placa foi incubada na estufa a 37 °C durante sete dias após esse período de incubação, 30 µL de resazurina a 0,02% foram adicionados a cada poço. A placa foi reincubada a 37°C por dois dias e após esse período as placas foram lidas. A leitura foi baseada na mudança de cor, do azul para o rosa quando ocorre oxi-redução do corante devido ao crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). Para todos os testes foram utilizados antimicrobianos como controle positivo isoniazida e rifampicina os quais são considerados os principais antibióticos para cepas *M. tuberculosis* sensíveis e possuem padrões de CIM de 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL, respectivamente.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM): após a triagem, foram selecionados os extratos que apresentaram atividade antimicobacteriana na concentração de 400 µg/mL, para avaliar a CIM (FRANZBLAU et al., 1998). Em todos os poços teste foram adicionados 100 µg/mL do meio e 100 µL do extrato partindo-se de uma concentração de 400 µg/mL no primeiro poço (microdiluição 1:2) e 100 µg/mL do inóculo bacteriano em todos os poços. Após isso a placa foi incubada na estufa a 37 °C por sete dias.

Após incubação foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,02% em cada poço dos ensaios, incubando-se por mais dois dias na estufa a 37°C. O corante age como um indicador da viabilidade celular. A leitura foi baseada na mudança de cor, do azul para o rosa quando ocorre oxi-redução do corante devido ao crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

4.11 Atividade antimalárica

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* (CSAS-INPA), sob supervisão do Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit.

Cepa K1 de *P. falciparum*: A cepa multirresistente (resistente à cloroquina e pirimetamina) K1 (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) foi mantida em cultivo contínuo em eritrócitos humanos do tipo A+ a 37°C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e nitrogênio balanceado), segundo método de Trager e Jensen (1976). Para o microteste foi utilizada uma parasitemia inicial de 1 – 2% e hematócrito de 2%.

Extratos: As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfoxido DMSO na concentração estoque de 1 mg/mL e posteriormente diluídas em meio completo (RPMI 1640) para obtenção das concentrações de teste (50 e 5 µg/mL). Os antimaláricos usados como padrões foram: cloroquina e quinina, sendo estes avaliados em sete concentrações, 2,5 a $3,4 \times 10^{-3}$ µg/mL, como controles. Cada amostra diluída foi testada em triplicata no *screening*, e em duplicata para cálculo de CI₅₀, em microplaca de 96 poços.

Teste antimalárico: O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto e colaboradores (2007), em condições semelhantes à cultura do parasita. As diluições das amostras foram aplicadas em poços de microplaca contendo hemácias com uma parasitemia inicial de 1% no estágio anel. Finalmente cada poço continha um volume

final de 200 µL. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C nas mesmas condições da cultura. Cada concentração foi testada em triplicata. O controle do crescimento do parasita foi realizado em poços contendo apenas a suspensão de hemácias e DMSO a 1%. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi avaliado mediante microscopia óptica, preparando-se esfregaços sanguíneos para cada poço, corados em panótico® e observados em microscópio para contagem dos parasitas. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra}}{\text{parasitemia do controle}} \right) \times 100$$

A concentração inibitória (CI₅₀) foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0, onde o efeito antiparasitário das amostras foi medido em relação ao controle livre de drogas, em um intervalo de confiança de 95% (IC 95).

4.12 Avaliação da atividade angiogênica

A avaliação da atividade angiogênica foi realizada no laboratório de bioprospecção e biotecnologia (LABB-INPA). Foi utilizada a metodologia da Membrana Corioalantóica (CAM) de acordo com o descrito por Nguyen, Shing e Folkman (1994).

Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de 37 °C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação (idade embrionária E2), uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde a câmara de ar do ovo está localizada e assim, uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada a fim de evitar-se a aderência dos embriões nas membranas ovulares. Concomitantemente, outra janela foi aberta com aproximadamente 15 mm de diâmetro na região localizada acima da membrana corioalantoica.

Ambas as janelas foram fechadas com fita adesiva e fita isolante para minimizar a perda de umidade. Assim, os embriões foram incubados por mais 72 h para que alcançassem a fase embrionária de 6 dias (E6). Nesta fase, os ovos foram abertos e implantados os discos de metilcelulose adsorvidos com os extratos ou substâncias em estudo, exatamente no terço externo da membrana corioalantóica. Novamente, foi fechado o espaço aberto para implantar o disco, e a incubação continuou por mais 48 h, até que chegar à idade embrionária de 8 dias (E8) de experimento, momento que foi avaliada a atividade antiangiogênica.

As imagens de cada ovo em triplicata foram registradas com uma câmera fotográfica. As imagens foram utilizadas para a contagem de vasos sanguíneos que interceptaram o disco e vasos presentes em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão da média.

4.13 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

A avaliação da atividade de toxicidade sobre *A. salina* foi realizada no laboratório de bioprospecção e biotecnologia (LABB-INPA). Para o ensaio, foram utilizados 10 mg de cistos de *A. salina* os quais foram colocados para eclosão e crescimento numa solução salina (3,8%) e mantidos durante 48 h a uma temperatura de 25 a 28 °C e iluminação com lâmpada fluorescente.

Após o período de eclosão, as larvas de *A. salina* foram transferidas para placas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas para cada poço. Em cada placa, foram realizados os controles do meio salino e do solvente. Os extratos foram adicionados nos poços do teste, na concentração inicial de 1000 mg/mL. As placas com as larvas de *A. salinam* foram mantidas por 24 h sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, foi avaliado o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto nos poços da substância teste. Após o teste dos extratos na concentração de 1000 mg/mL, as amostras que apresentaram acima de 50% de mortalidade das larvas, foram

consideradas como tóxicas e foram testados novamente em concentrações menores entre 500 e 15 mg/mL para encontrar a CL₅₀.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

A exsicata da espécie coletada foi depositada sob o número 271927 no Herbário do INPA. Após a secagem e moagem das folhas e galhos e posterior preparo dos extratos mecânicos e metanólicos foi possível obter as seguintes massas e rendimentos, como mostrado na tabela 11.

Tabela 11. Rendimento dos extratos obtidos a partir das folhas e galhos da espécie *Warszewiczia schwackei*.

Parte vegetal	Material seco (g)	Extrato Hex. (g)	Rendim. Hex. (%)	Extrato MeOH (g)	Rendim. MeOH (%)
Galhos	1053,60	0,72	0,06	12,00	1,13
Folhas	519,75	4,00	0,76	35,00	6,00

De acordo com os dados observados na tabela acima o extrato que teve uma maior porcentagem de rendimento foi o extrato metanólico das folhas.

5.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas

Inicialmente os extratos hexânicos e metanólicos de folhas e galhos foram submetidos a análises por CCDC, mostrando a possível presença de terpenos quando revelados com $Ce(SO_4)_2$, pois apresentou uma coloração vermelho escuro. Observou-se também a presença de substâncias fluorescentes sob a luz UV (254 e 365 nm), um indicativo da presença de cromóforos. Os extratos MeOH das folhas e galhos quando revelados com Dragendorff mostraram a presença de alcaloides pois verificou-se manchas de coloração laranjada, indicando a presença dos mesmos. E quando revelados com cloreto férrico, observou-se a presença de manchas entre azul escuro a preto,

indicativo de substâncias fenólicas. Posteriormente os quatro extratos foram analisados por RMN de ^1H .

O fracionamento sucessivo do extrato hexânico das folhas como mostrado no item 4.5.1 permitiu o isolamento e identificação de duas substâncias identificadas como: esqualeno (1) e β -sitosterol (2). A partir do fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei* (item 4.5.2), foi possível a obtenção de três alcaloides identificados como: triptamina (3), 1-(2-aminofenil) etanol (4), o tetraidroharmano 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina (5), ocolifuanina (6) e um flavonoide catequina (7).

5.2.1 Identificação da substância I

A substância **I** foi obtida na forma de sólido amorfo, cor amarela. Apresentou coloração lilás quando revelada com anisaldeído e eluída em hexano 100% e Rf de 0,5 cm. Foi identificada através da análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 15) como sendo o terpeno esqualeno, no qual foi possível observar um multiplete entre δ_{H} 5,07 e 5,12 sugerindo a presença de hidrogênios correspondentes a ligações duplas, uma concentração de sinais com deslocamentos entre δ_{H} 1,97 e 2,04 correspondentes a hidrogênios metilênicos ligados a carbonos olefínicos, também foi observados dois singletos largos em δ_{H} 1,66 e 1,58 os quais foram atribuídos a hidrogênios metílicos ligados a carbonos olefínicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16) mostraram 6 sinais entre δ_{C} 135,10 e 124,26 correspondentes a carbonos olefínicos, três sinais com deslocamentos em δ_{C} 131,27; 134,90 e 135,10 que pelo mapa de correlação de HSQC (*J1*) (Figura 17) observou-se que não se encontravam ligados a hidrogênios, outros três sinais em δ_{C} 124,40; 124,30 e 124,26 ligados a hidrogênios, como observado nessa região no mapa de correlação de HSQC, constatando-se que se tratavam de carbonos metínicos. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar sinais em δ_{C} 39,73; 39,68; 28,27; 26,75; 25,73 os quais corresponderiam aos carbonos metilênicos, assim como também os sinais em δ_{C} 24,91; 17,70; 16,05; 16,01 os quais foram atribuídos aos carbonos metílicos.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da substância número I identificada como esqualeno, (CDCl_3 , 300 MHz)

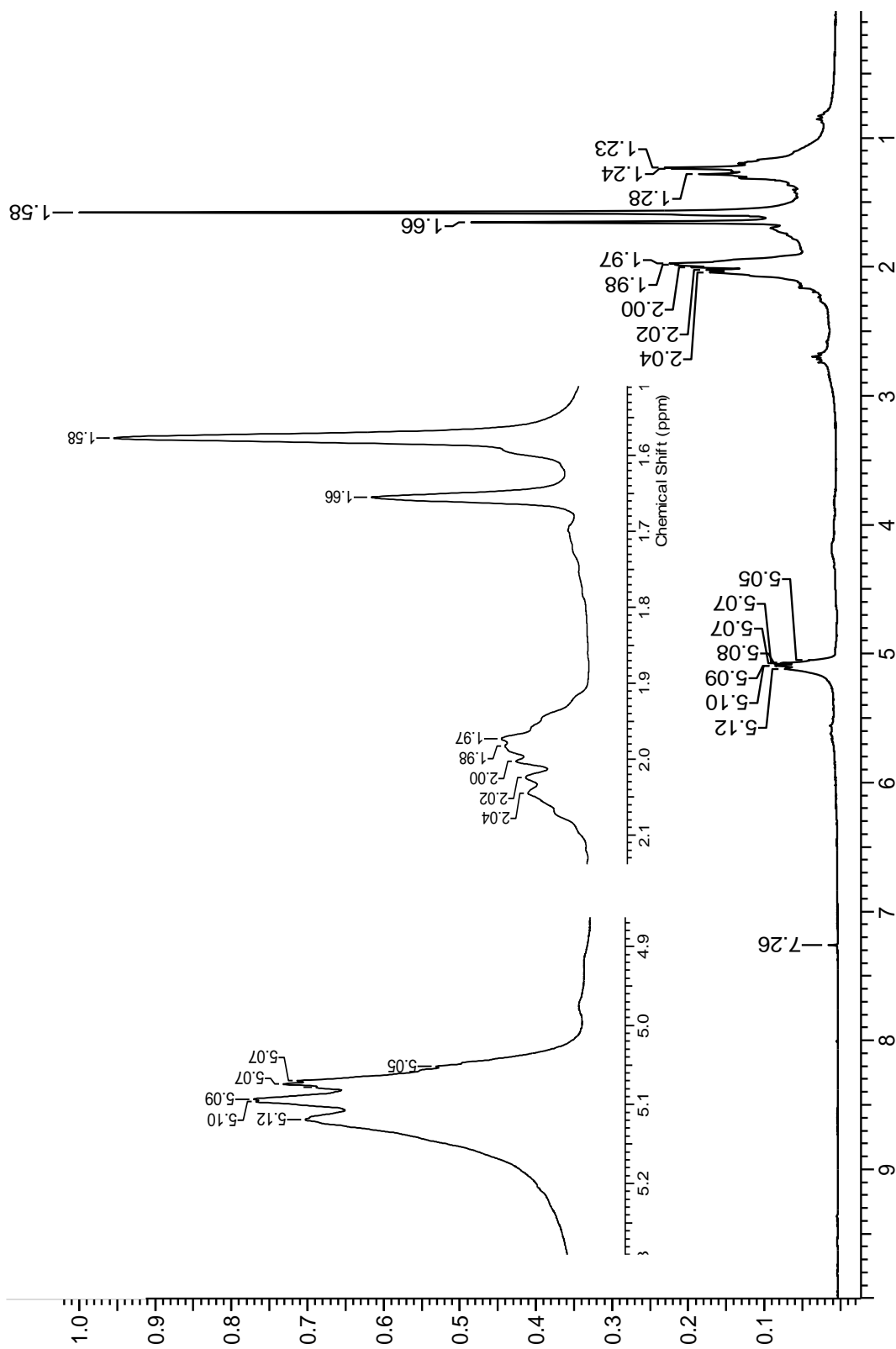


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C da substância número I identificada como esqualeno, (CDCl_3 , 75 MHz).

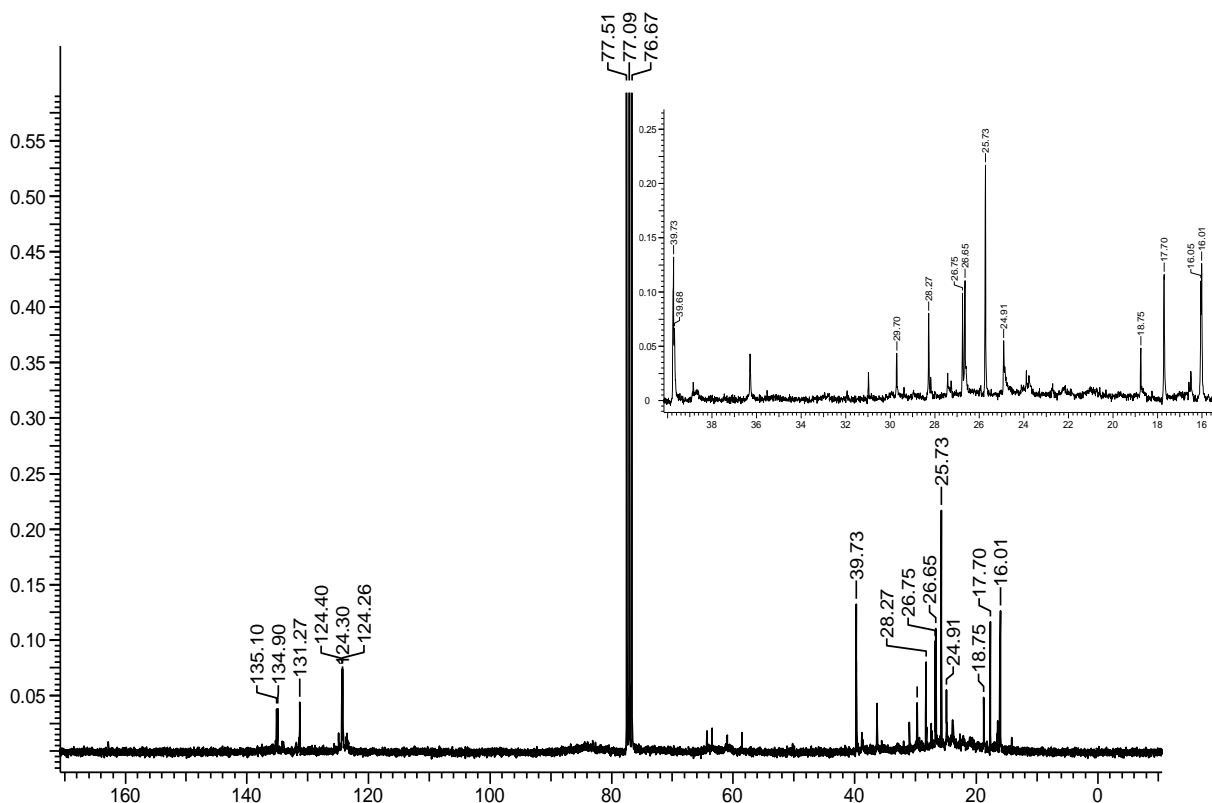
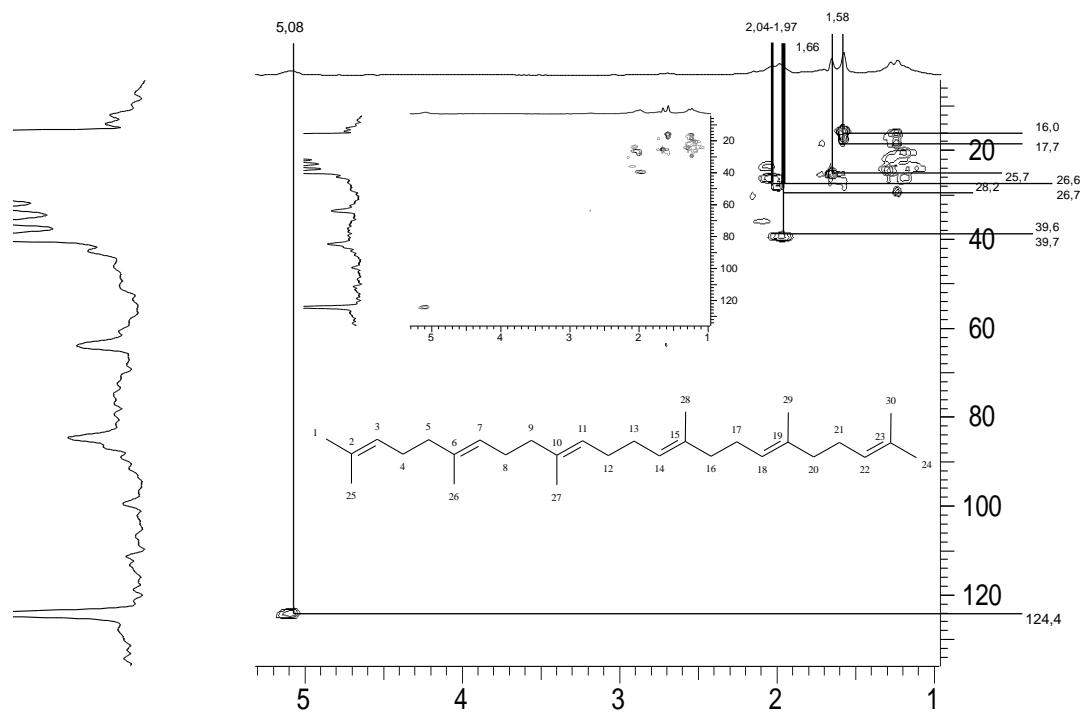


Figura 17. Mapa de contorno HSQC da substância número I identificada como esqualeno, (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)



Após a comparação de todos os dados obtidos com a literatura consultada (Tabela 12) confirmou-se que se tratava do esqualeno ($C_{30}H_{50}$) (Figura 18) (RAGASA et. al., 2015). Esta substância é classificada dentro da classe química dos triterpenos, e já foi isolada de várias famílias vegetais como, por exemplo, o reportado por Cursino et al.,(2009), a partir das folhas de *Minquartia guianensis* (Olacaceae).

Figura 18. Estrutura e numeração da substância esqualeno.

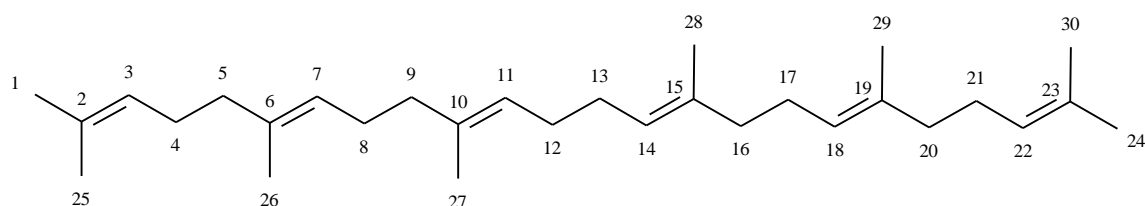


Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C e 1H da substância esqualeno. a) O experimento foi realizado a 300 MHz para 1H em $CDCl_3$, utilizando o TMS como padrão interno; b) Dados da literatura de acordo com Ragasa, et. al., (2015) (600 MHz, $CDCl_3$).

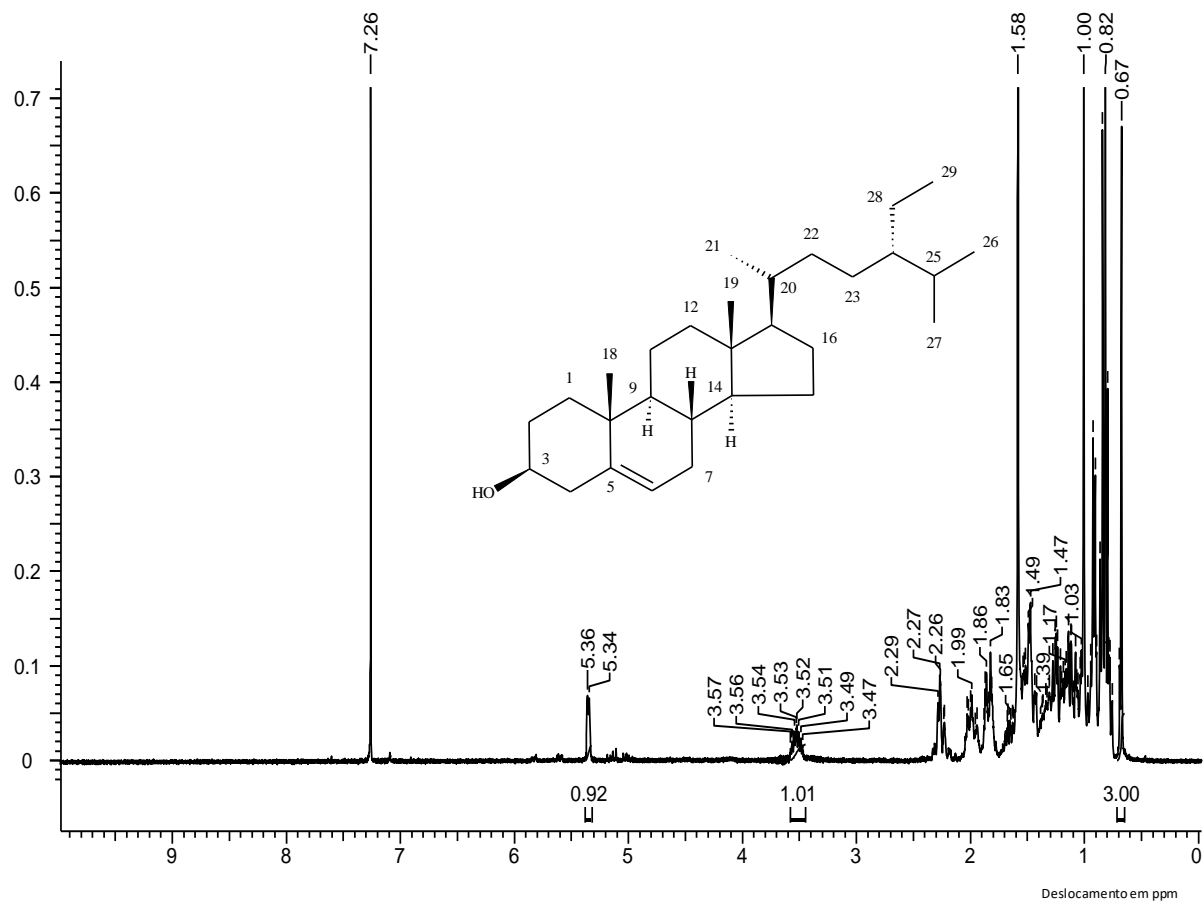
Posição	Dados observados ^a		Dados da literatura ^b	
	^{13}C (75 MHz)	1H (300 MHz)	^{13}C (101 MHz)	1H (400 MHz)
1 e 24	25,7	1,66 (s)	25,6	1,68 (s)
2 e 23	131,2		131,2	
3 e 22	124,4	5,07-5,12(m)	124,4 ^a	5,10-5,14(m)
4 e 21	26,6	1,97-2,04(m)	26,8 ^b	1,98-2,07(m)
5 e 20	39,6	1,97-2,04(m)	39,7 ^c	1,98-2,07(m)
6 e 19	134,9		134,8	
7 e 18	124,3	5,07-5,12(m)	124,3 ^a	5,10-5,14(m)
8 e 17	26,7	1,97-2,04(m)	26,7 ^b	1,98-2,07(m)
9 e 16	39,7	1,97-2,04(m)	39,7 ^d	1,98-2,07(m)
10 e 15	135,1		135,1	
11 e 14	124,2	5,07-5,12(m)	124,3 ^a	5,10-5,14(m)
12 e 13	28,2	1,97-2,04(m)	28,2	1,98-2,07(m)
25 e 30	17,7	1,58(s)	17,6	1,60(s)
26 e 29	16,0	1,58(s)	16,0 ^c	1,60(s)
27 e 28	16,0	1,58(s)	15,9 ^c	1,60(s)

Na literatura consultada, dentro da família Rubiaceae, este triterpeno já foi isolado das espécies *Nauclea latifolia* (Sub-família: Cinchonoideae) (NGNOKAM et al., 2003); *Psychotria vellosiana* (Sub-família: Ixorideae) (MORENO et al., 2014) e da *Ixora philippinensis* (Sub-família: Ixorideae) (RAGASA et al., 2015), portanto este é o primeiro relato no gênero *Warszewiczia* (Sub-família: Ixorideae).

5.2.2 Identificação da substância II

A substância **II** obtida na forma de cristais incolores, apresentando coloração lilás quando revelada com anisaldeído e eluída em hexano/acetona (8:2) e R_f de 0,28. Foi identificada como β-sitosterol por meio da análise do espectro de RMN de ¹H o qual mostra sinais característicos desse esteroide quando comparados com os dados na literatura (ARAGÃO et al., 1990). Foi observado uma concentração de sinais com deslocamentos entre δ_H 0,67 e 1,6 correspondentes às metilas presentes nesta substância, assim como vários sinais entre δ_H 1,8 e 2,2 correspondentes aos grupos metilênicos. Também foram observados multipletos com deslocamento em δ_H 5,3 e em δ_H 3,5 sendo estes sinais correspondentes ao hidrogênio oleofínico (H-5) e ao hidrogênio carbinólico (H-3), respectivamente (Figura 19). O β-sitosterol (C₂₉H₅₀O) é um dos esteroides comumente encontrados em várias espécies de Rubiaceae (MARTINS e NUNEZ, 2015).

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da substância número II identificada como β -sitosterol, (CDCl_3 , 300 MHz).



5.2.3 Identificação da substância III

A substância **III** obtida na forma de um sólido amarelo amorfo, apresentando coloração laranjada quando revelada com reagente de Dragendorff e eluída em acetona/MeOH (90:10) e R_f de 0,5 foi analisada por RMN de ^1H de 300 MHz, RMN de ^{13}C de 75 MHz, incluindo experimentos de COSY, HSQC e HMBC, dissolvida em $\text{DMSO}-d_6$. E os espectros de LC-MS mostraram a presença do íon aduto para o pico com tempo de retenção de 2,50 min no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 439,2847) e íon de $\text{M}-\text{H}^-$ (m/z 437,2685) no modo negativo, consistente com 438 m/z , condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_4$. A análise de todos esses dados permitiram identificar a

substância como o alcaloide ocolifuanina. O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais correspondentes aos hidrogênios de dois anéis aromáticos característicos de dois sistemas indólicos, caracterizados pela presença de um multipletto entre δ_{H} 6,90 e 7,03 integrando para 4H e um dubleto em δ_{H} 7,36 (2H, $J = 7,0$ e $7,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ_{H} 7,27 (2H, $J = 8,2$ e $8,2$ Hz) (Figura 20). Assim, a análise do espectro de COSY (Figura 21) permitiu atribuir as posições de cada hidrogênio.

Foi observado no mesmo espectro de RMN de ^1H , dois singletos em δ_{H} 10,85 e 10,70 integrando para um hidrogênio cada um os quais foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos dois núcleos indólicos, o que foi confirmado no mapa de contorno de gHSQC (Figura 22), onde os mesmos não apresentavam correlação diretamente com carbono. Também no espectro bidimensional de HMBC (Figura 23) foi possível estabelecer a correlação desses N-H com os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em δ_{H} 10,85 acoplando com os carbonos em δ_{C} 136,07, 135,86, 126,63 e 105,98, enquanto que o sinal em δ_{H} 10,70 encontra-se acoplando com δ_{C} 137,89, 135,46, 127,05 e 106,98, confirmando a presença dos dois grupos indol (Figura 24).

Ao analisar os espectros de RMN ^{13}C (Figura 25), bem como o de DEPT 135, ao mesmo tempo, foi possível observar a presença de oito sinais referentes a carbonos quaternários pertencentes aos dois núcleos indólicos, com deslocamentos em δ_{C} 137,8, 136,0, 135,8, 135,4, 127,0, 126,6, 106,9 e 105,9. O espectro de DEPT 135 permitiu a observação da presença de oito carbonos metilênicos com deslocamentos em δ_{C} 60,0 (C-21), 52,6 (C-5), 41,7 (C-5'), 37,6 (C-16), 34,4 (C-14), 22,8 (C-19), 22,3 (C-6') e 21,5 (C-6). Os carbonos nas posições 21 e 5 encontram-se mais desblindados devido a estarem ligados diretamente com o átomo de nitrogênio do sistema quinolizidina.

No mapa de contorno gHSQC observou-se que os hidrogênios com deslocamentos entre δ_H 6,90 e 7,37 se encontram ligados diretamente aos carbonos em δ_C 120,1; 120,0; 118,1; 117,9; 117,3; 117,1; 110,8 e 110,7, sendo assim atribuídos aos anéis aromáticos.

Também foram observados no espectro de RMN de 1H sinais com deslocamentos em δ_H 4,17 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz), os quais estão diretamente ligados ao carbono metínico em δ_C 48,5 (C-17) de acordo com o espectro de gHSQC.

Observa-se também a presença de um carbono metílico em δ_C 10,8 acoplado com os hidrogênios com deslocamento em δ_H 0,88 (3H, *t*, $J = 7,2$ Hz), correspondentes à metila da cadeia lateral de etila.

Após a observação de todos os dados e quando comparados com os encontrados na literatura (Tabela 13) foi possível identificar a substância como sendo o alcaloide indólico ocolifuanina (Figura 26), classe química característica de espécies pertencentes à família Rubiaceae. Esta substância está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Warszewiczia*.

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da substância número III, identificada como ocolifuanina, com ampliação da região dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos (DMSO- d_6 com TMS, 300 MHz).

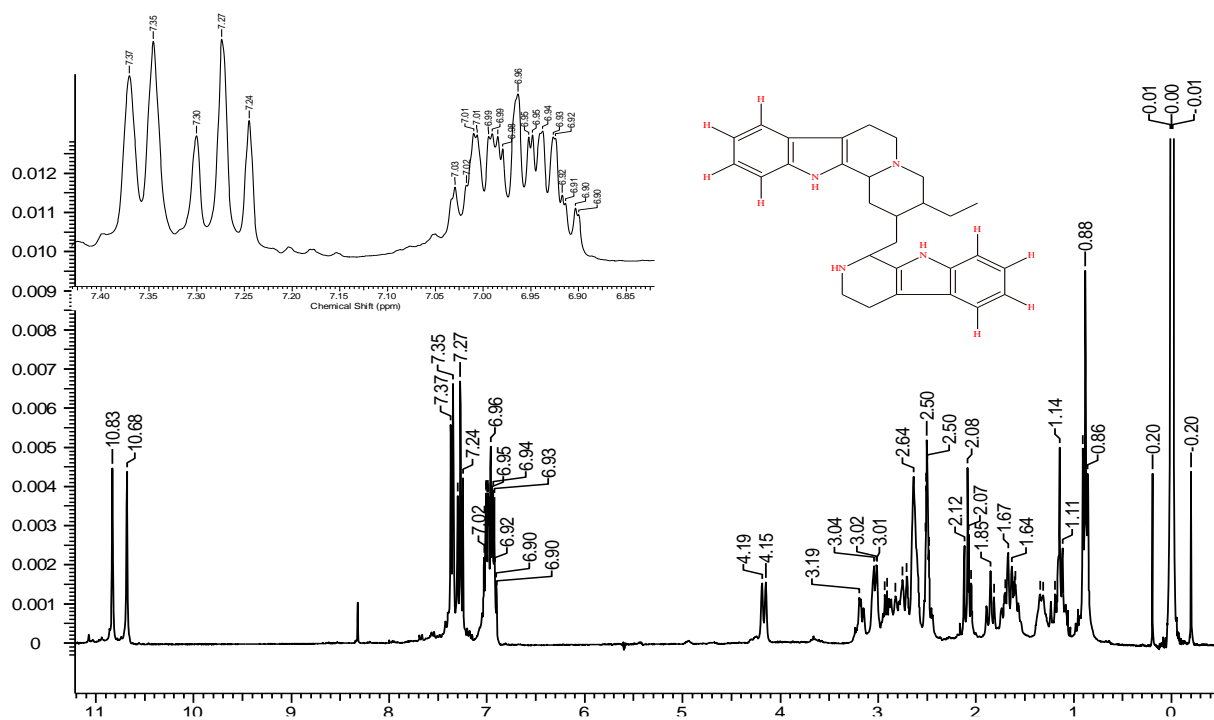


Figura 21. Espectro bidimensional COSY, acoplamento H-H da substância número III, identificada como ocolifuanina (DMSO- d_6 com TMS, 300 MHz).

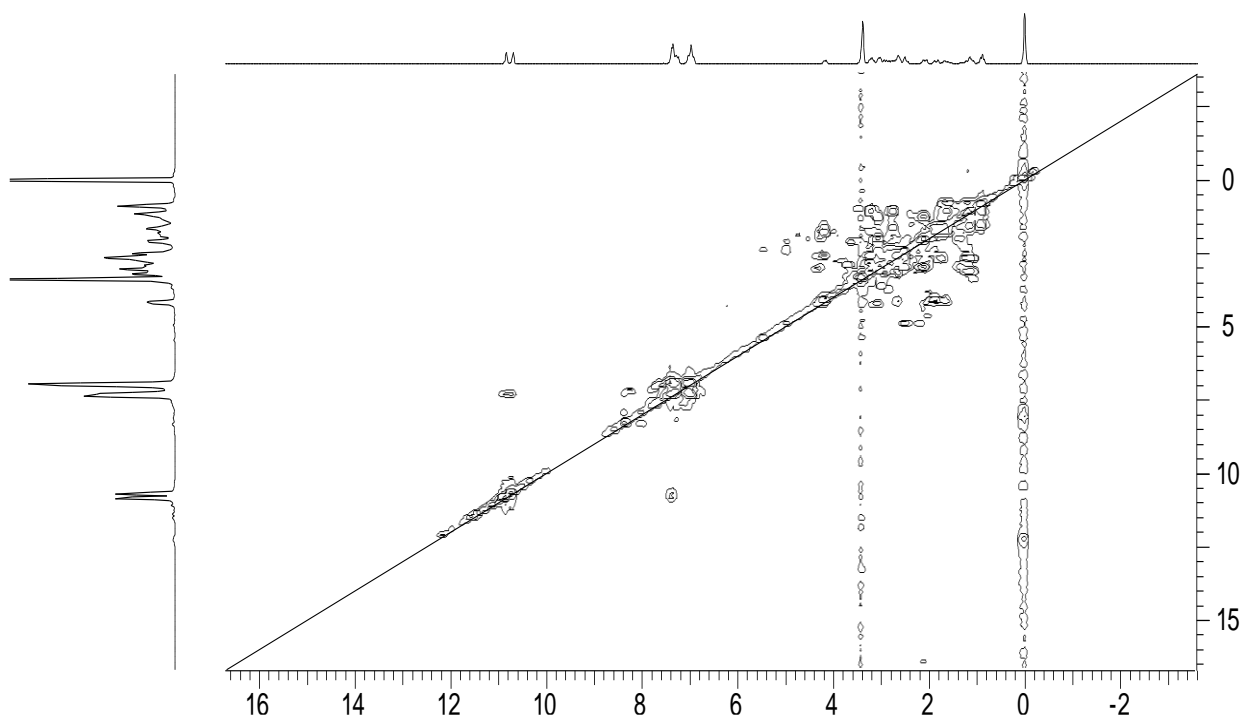


Figura 22. Espectro bidimensional gHSQC da substância número III, identificada como oclrolifuanina. (DMSO-*d*₆ com TMS, 300 e 75MHz).

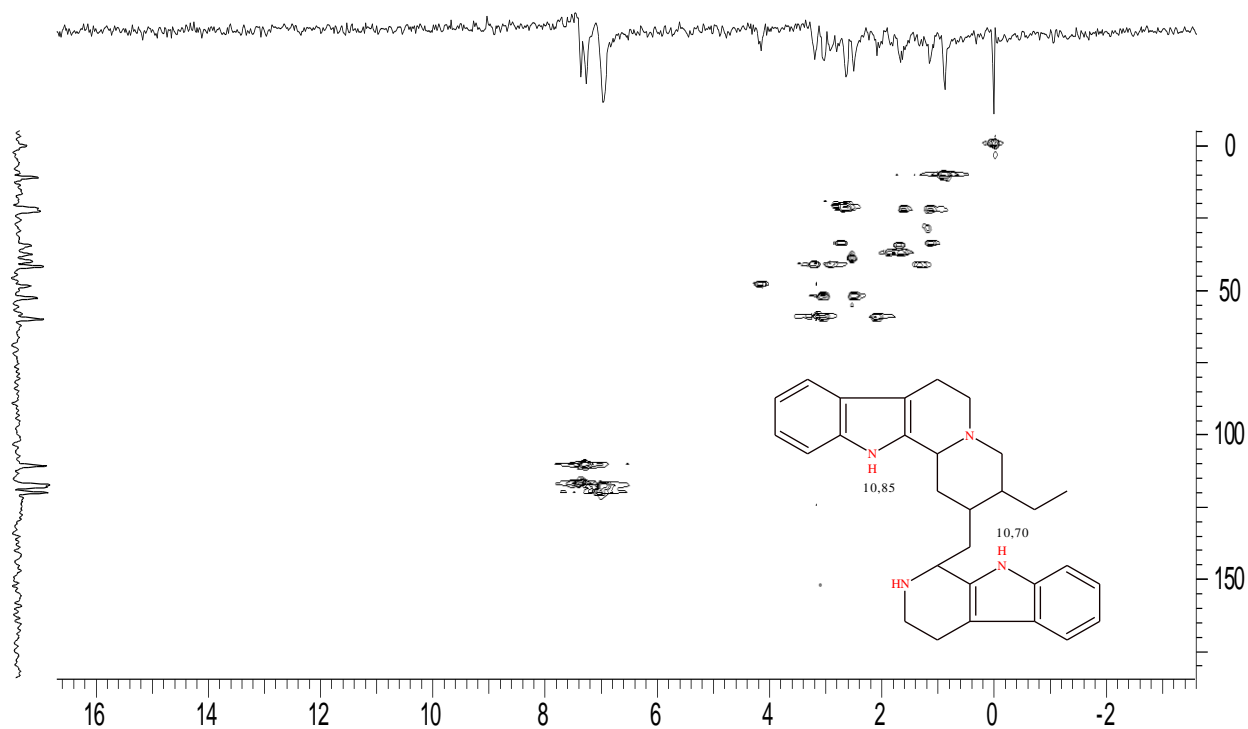


Figura 23. Espectro bidimensional HMBC da substância número III, identificada como ocolifuanina. (DMSO- d_6 com TMS, 300 e 75 MHz).

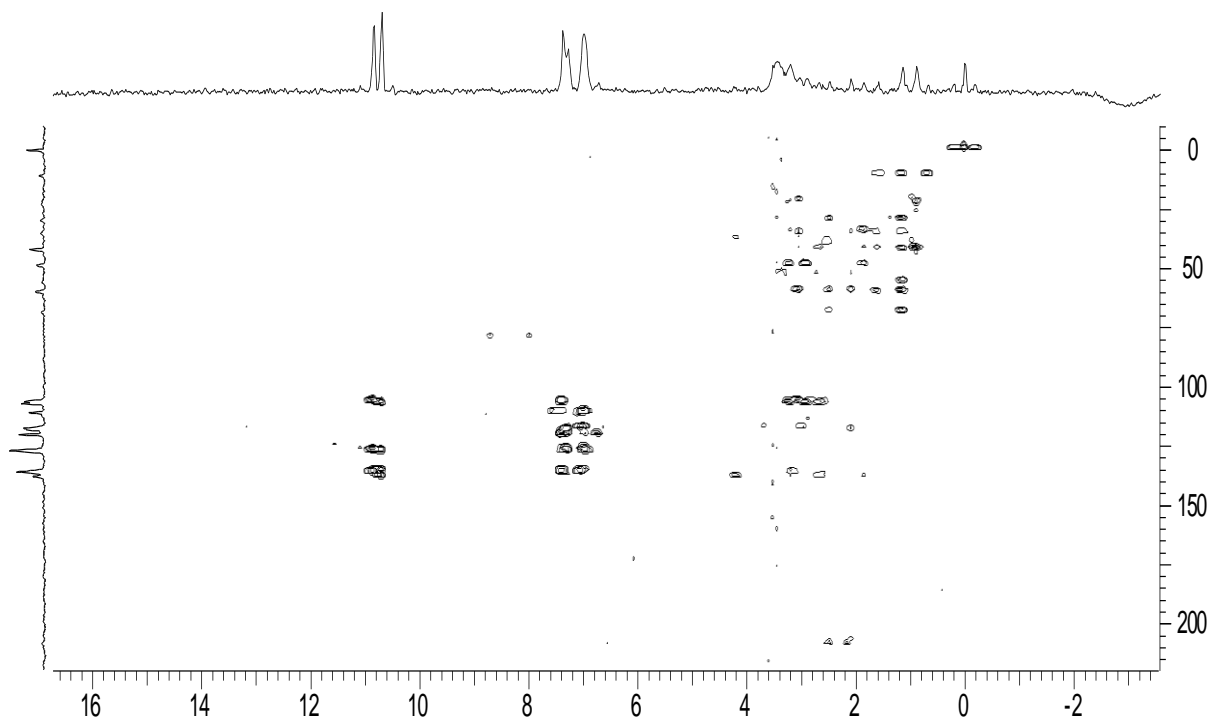


Figura 24. Ampliação do espectro bidimensional HMBC da substância número III, identificada como ocolifuanina, acoplamentos de longa distância dos anéis indólicos. (DMSO- d_6 com TMS, 300 e 75 MHz).

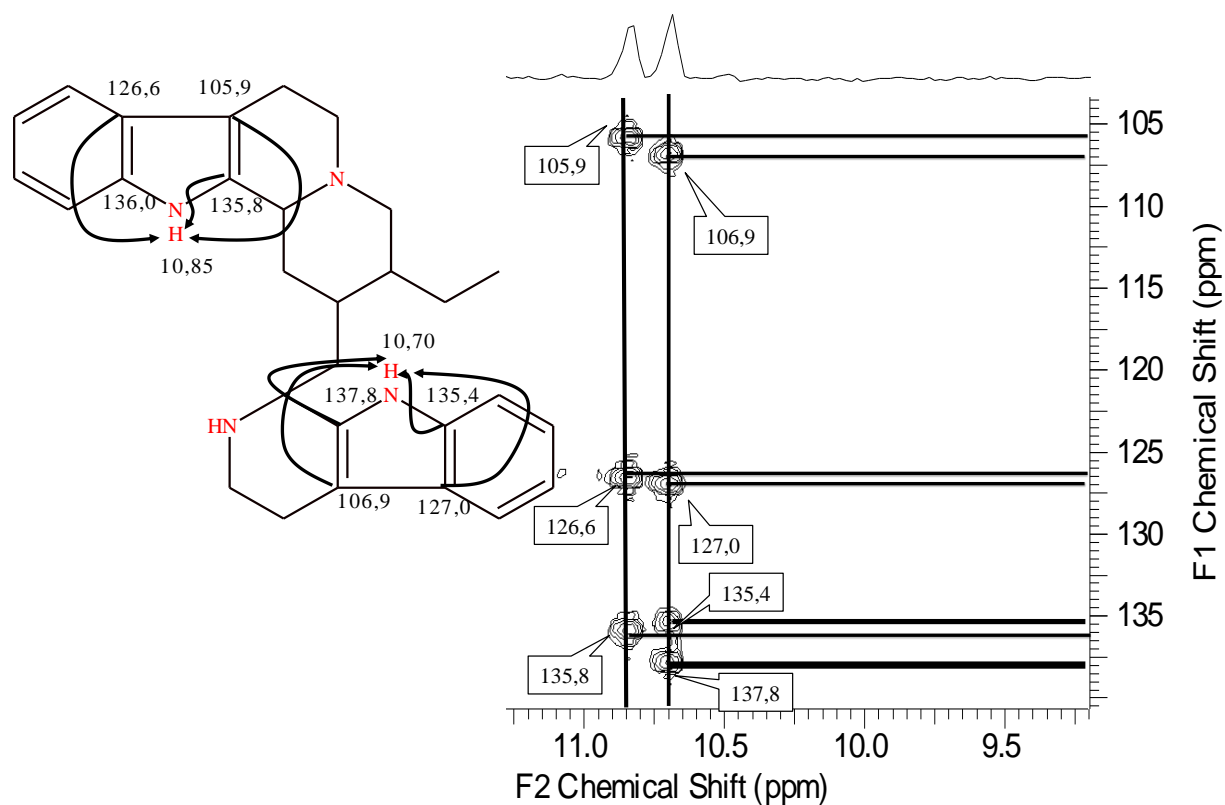


Figura 25. A. Espectro de RMN de ^{13}C da substância número III, identificada como ocolifuanina. B. Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 com destaque nos deslocamentos de carbonos metilênicos e metínicos mais desprotegidos. (DMSO- d_6 com TMS, 75 MHz).

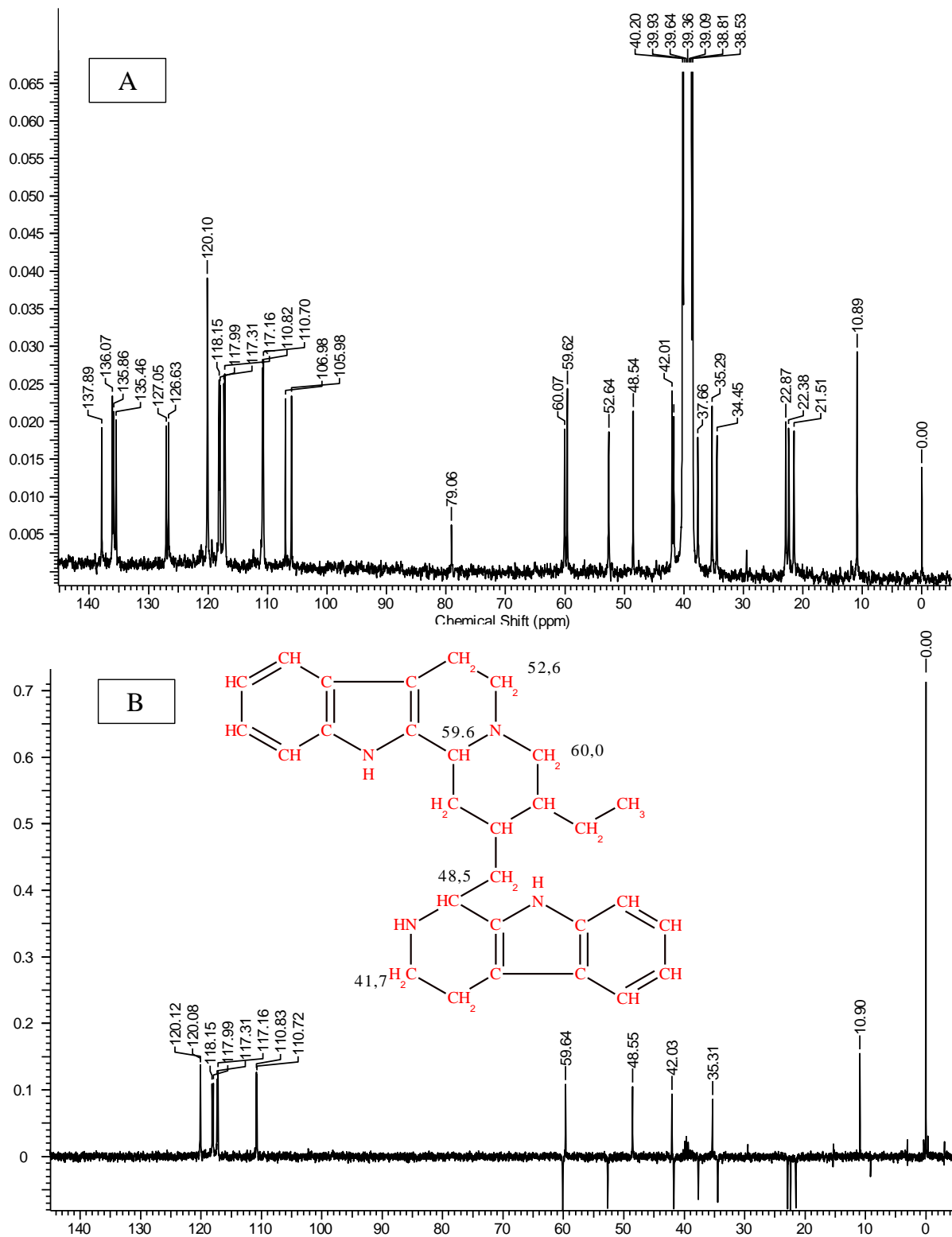
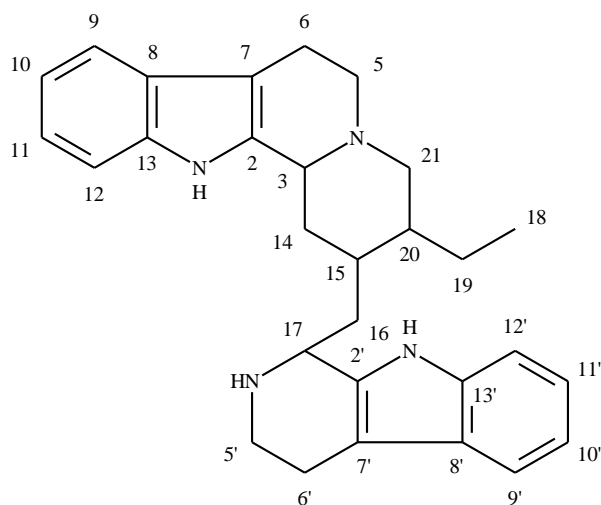


Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C da substância número III, identificada como ocolifuanina. ^aO experimento foi realizado a 75 MHz para ^{13}C em DMSO-d₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Robert et. al., (1983) (15,08 MHz, CDCl₃).

Posição	Dados observados ^a	Dados da literatura ^b
	^{13}C (75 MHz)	^{13}C (15,08 MHz)
2	135,8	134,6
3	59,6	59,5
5	52,6	52,9
6	21,5	21,6
7	105,9	107,3
8	126,6	127,0
9	117,3	117,7
10	117,1	118,9
11	120,0	120,9
12	110,7	110,8
13	136,0	135,8
14	34,4	36,4
15	35,2	37,8
16	37,6	38,4
17	48,5	51,9
18	10,8	11,2
19	22,8	23,8
20	42,0	42,5
21	60,0	52,1
2'	137,8	135,5
5'	41,7	42,0
6'	22,3	22,4
7'	106,9	108,6
8'	127,0	127,2
9'	117,9	117,9
10'	118,1	119,3
11'	120,1	121,6
12'	110,8	110,8
13'	135,4	135,9

Figura 26. Estrutura química da substância ocolifuanina



5.2.4 Identificação da substância IV

A substância **IV** foi obtida na forma de um sólido amorfo, cor amarela e foi identificada como o alcaloide triptamina. Quando analisada por CCDC foi eluída com DCM/MeOH (8:2) apresentando um R_f de 0,37 e uma cor laranja quando revelada com Dragendorff mostrando ser um alcaloide. Devido a seu grau de pureza foi analisado por RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo os experimentos bidimensionais COSY, HSQC e HMBC. Os espectros de CL-EMAR (Figura 27) mostraram a presença do aduto ionizado no tempo de retenção de 0,8 min no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 161,1005) e no modo negativo ($[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 159,0712), compatível com m/z 160 e a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2$.

A fração foi solubilizada com 550 μL DMSO- d_6 e colocada em um tubo de 5 mm. O espectro de RMN de ^1H obtido (Figura 28) mostrou sinais correspondentes aos hidrogênios que conformam um anel aromático no sistema indol (Figura 29), o qual se caracteriza pela presença de quatro hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,09 (1H, *dd*, $J = 8,5$ e $7,5$ Hz), 7,00 (1H, *dd*, $J = 8,5$ e $7,6$ Hz), 7,56 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz) e 7,38 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz), também foi observado um singlete em δ_{H} 10,98 (N-H) apesar

da integral ser de 0,1 observou-se que fazia parte da substância, pois apresentou correlação no mapa de correlação de HMBC.

Figura 27. Espectro de massas de alta resolução da substância número IV, identificada como o alcaloide triptamina, isolado da espécie *Warszewiczia schwackei*.

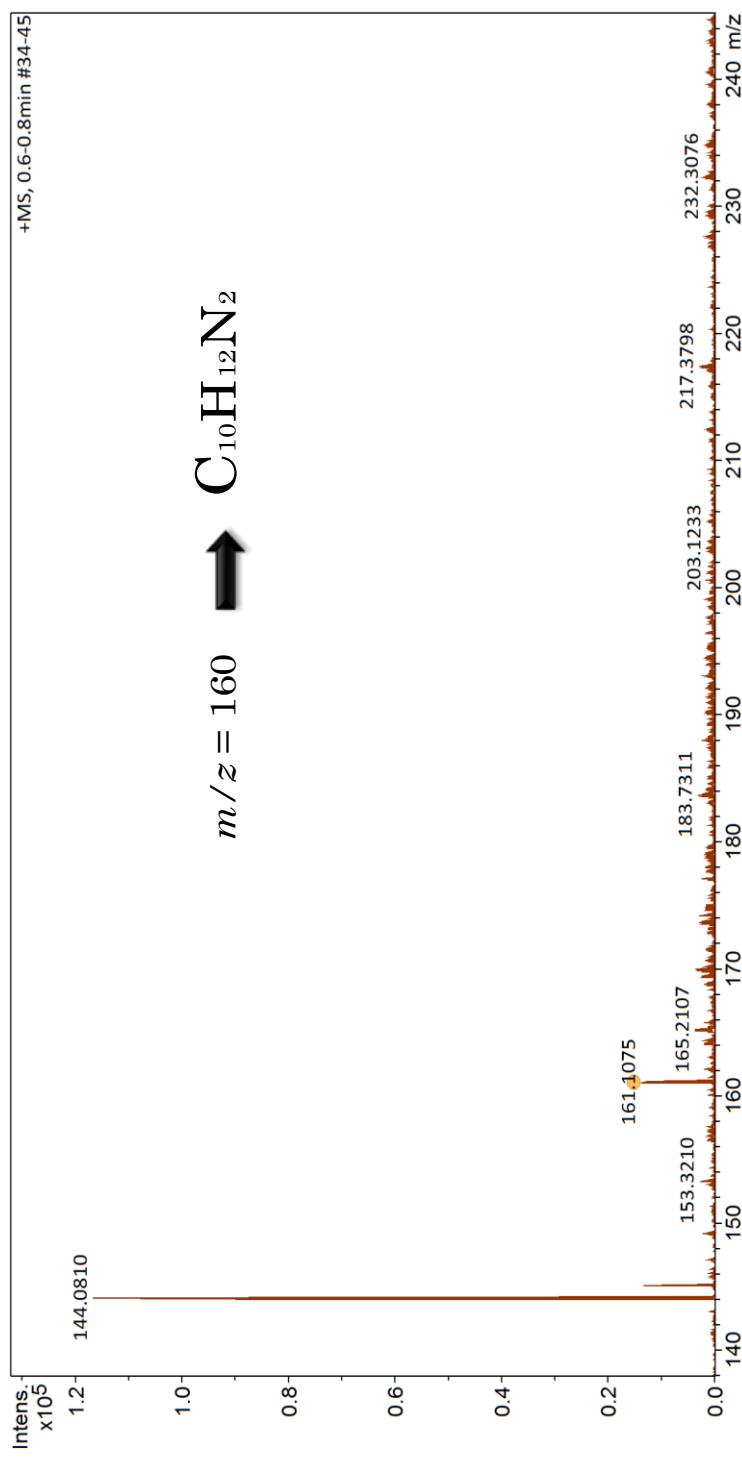


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da substância número IV, identificada como triptamina. (DMSO- d_6 com TMS, 300 MHz).

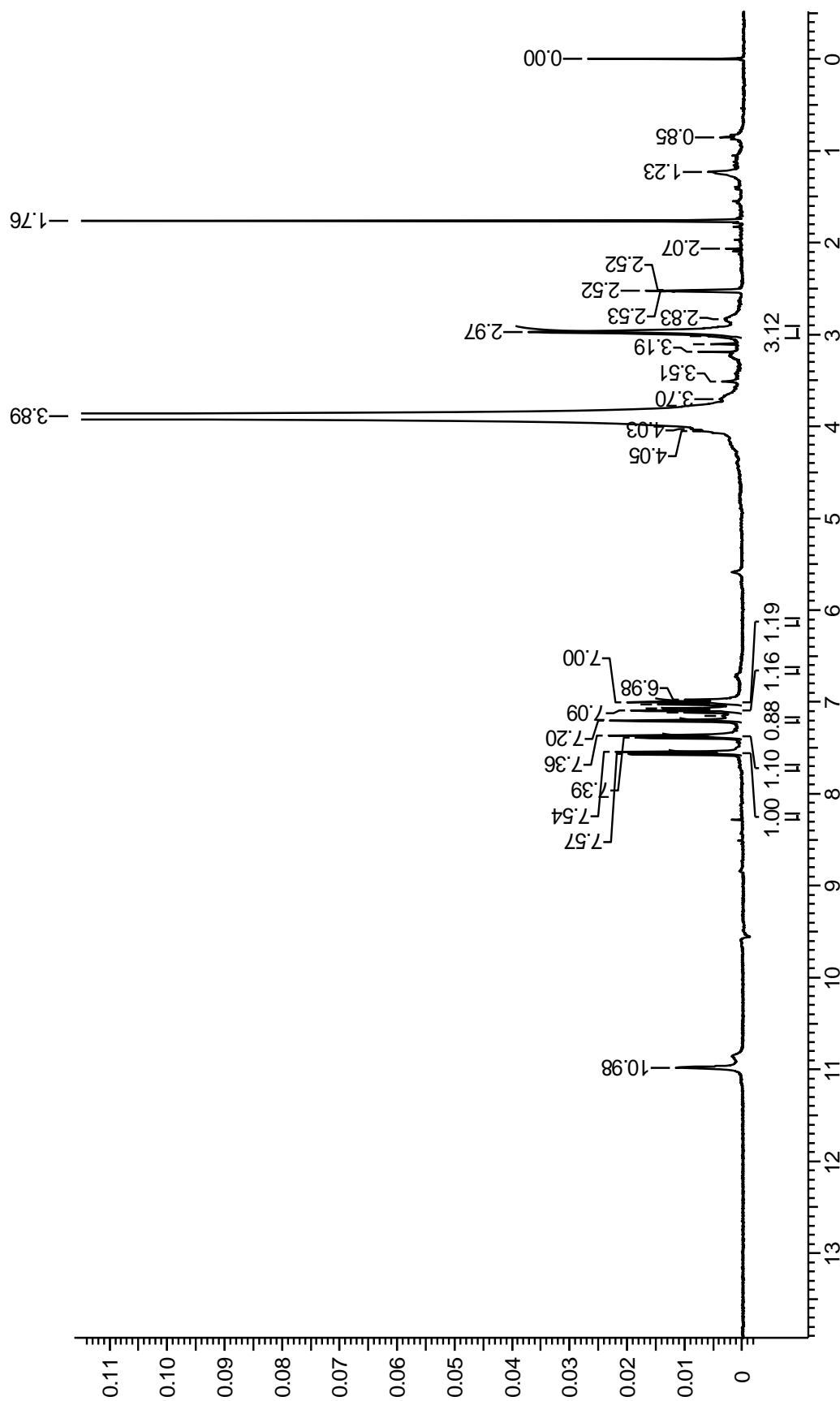
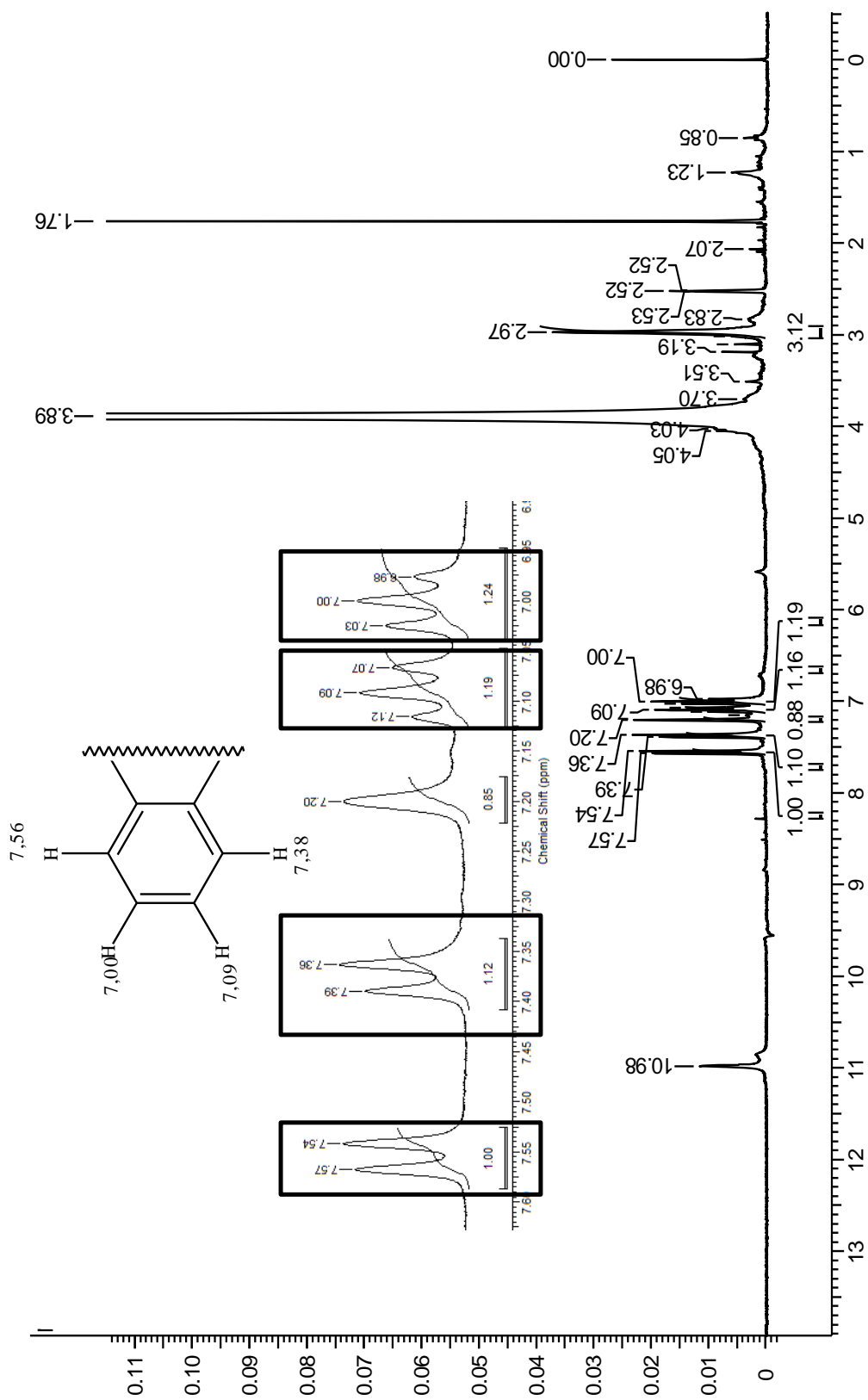


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da substância número IV, identificada como triptamina com ampliação dos sinais correspondentes aos hidrogênios que conformam o anel aromático no sistema indol. (DMSO- d_6 com TMS, 300 MHz).



A correlação entre os hidrogênios descritos anteriormente e os carbonos observados no espectro de ^{13}C (Figura 30) com deslocamentos em δ_{C} 120,98; 118,29; 118,09 e 111,40, foi confirmada pelo espectro bidimensional de gHSQC (Figuras 31 e 32). No mesmo espectro foi possível estabelecer que o sinal em δ_{H} 10,98 não mostrava correlação com carbono, indicando que se tratava de um hidrogênio ligado a heteroátomo. No entanto, a presença do núcleo indol na estrutura da substância em análise, foi corroborada pelas correlações deste hidrogênio com os sinais em δ_{C} 136,17; 122,98; 110,46 e 126,84 no espectro de HMBC (Figura 33 e 34).

Figura 30. A. Espectro de RMN de ^{13}C da substância número IV, identificada como triptamina. B. Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135. (DMSO- d_6 com TMS, 75 MHz).

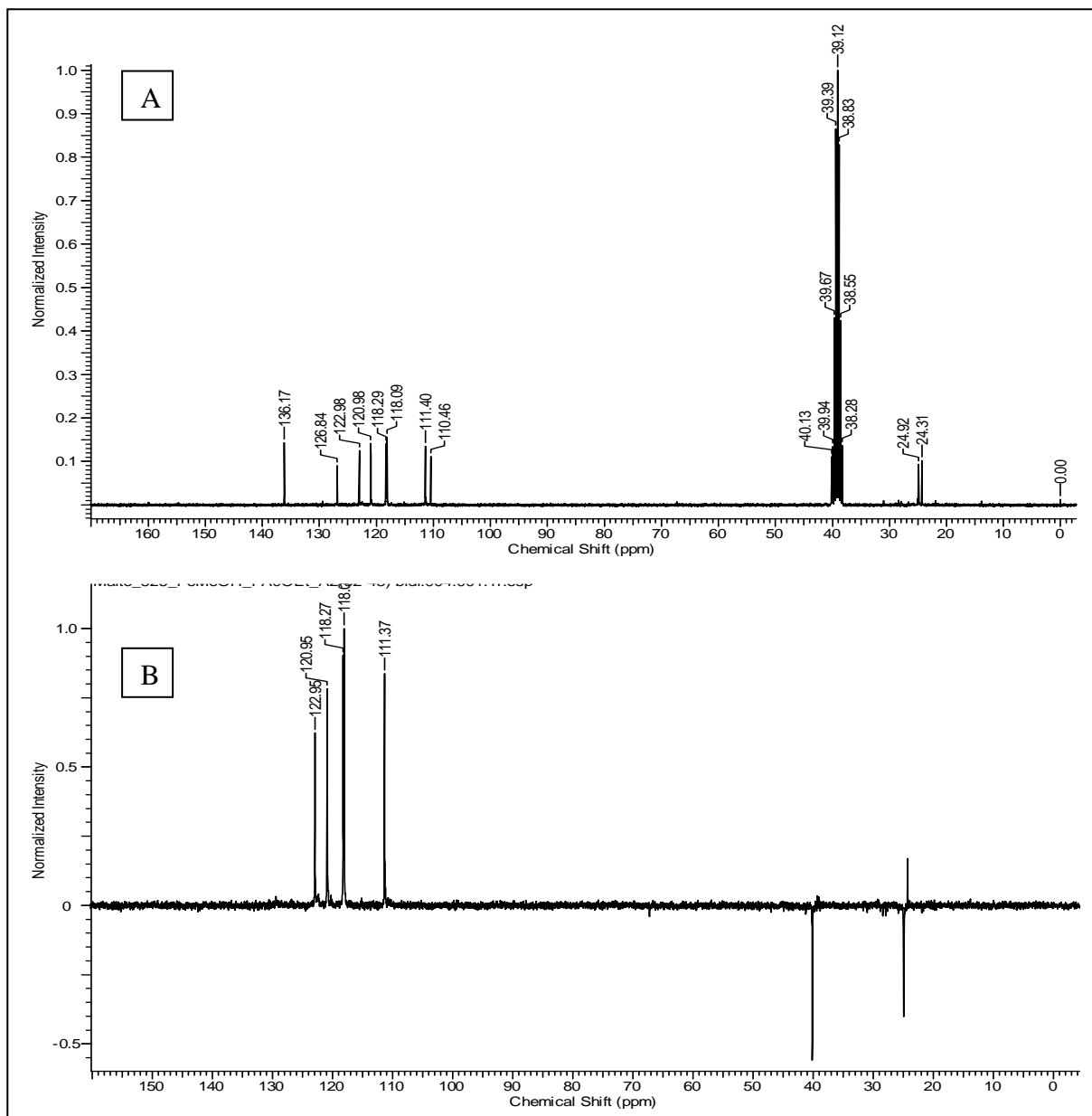


Figura 31. Espectro bidimensional de gHSQC (*J*₁) da substância número IV, identificada como triptamina. (DMSO-*d*₆ com TMS, 300 e 75 MHz).

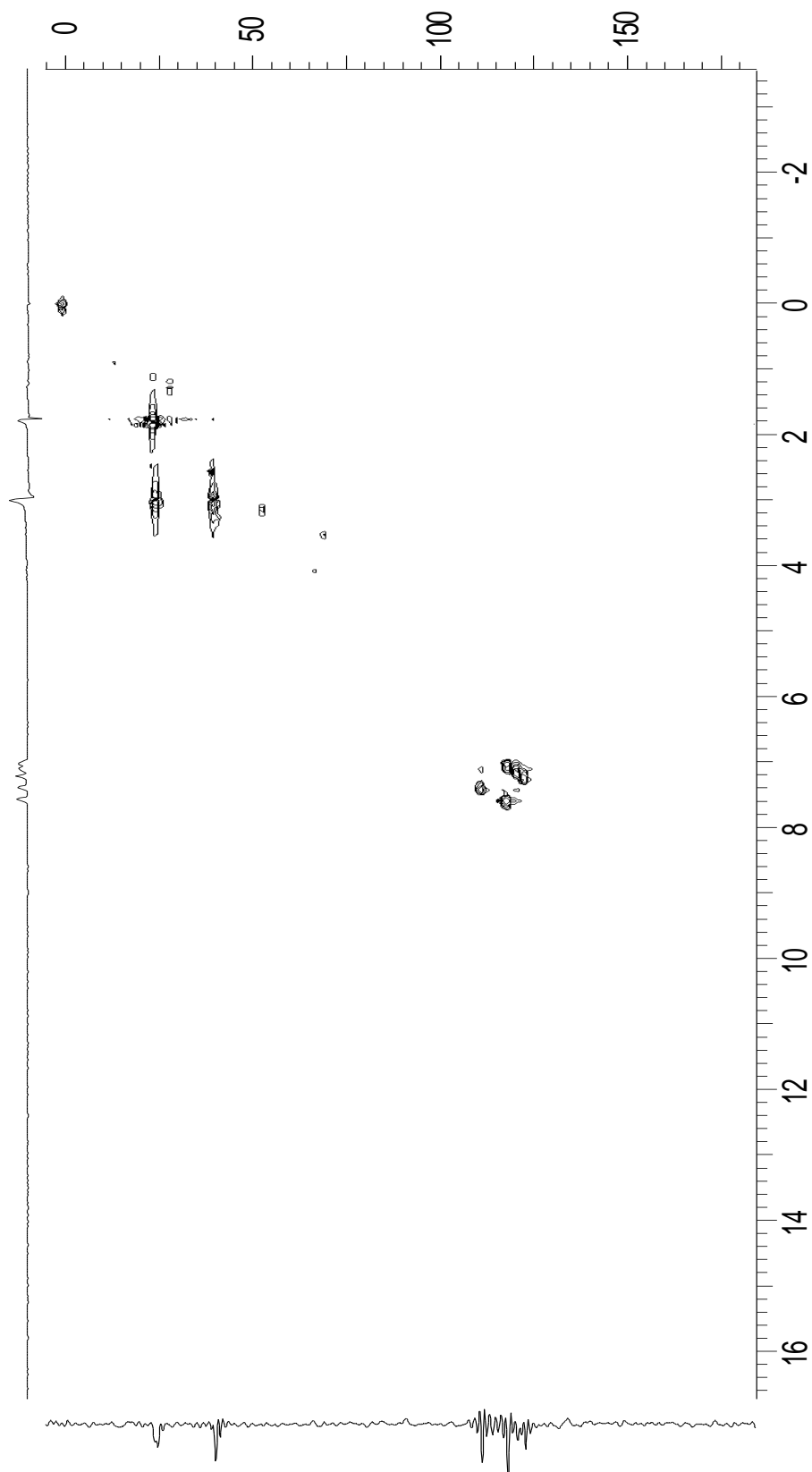


Figura 32. Espectro bidimensional de gHSQC (JI) da substância número IV, identificada como triptamina, com ampliação das correlações que definem o anel indólico. (DMSO- d_6 com TMS, 300 e 75 MHz).

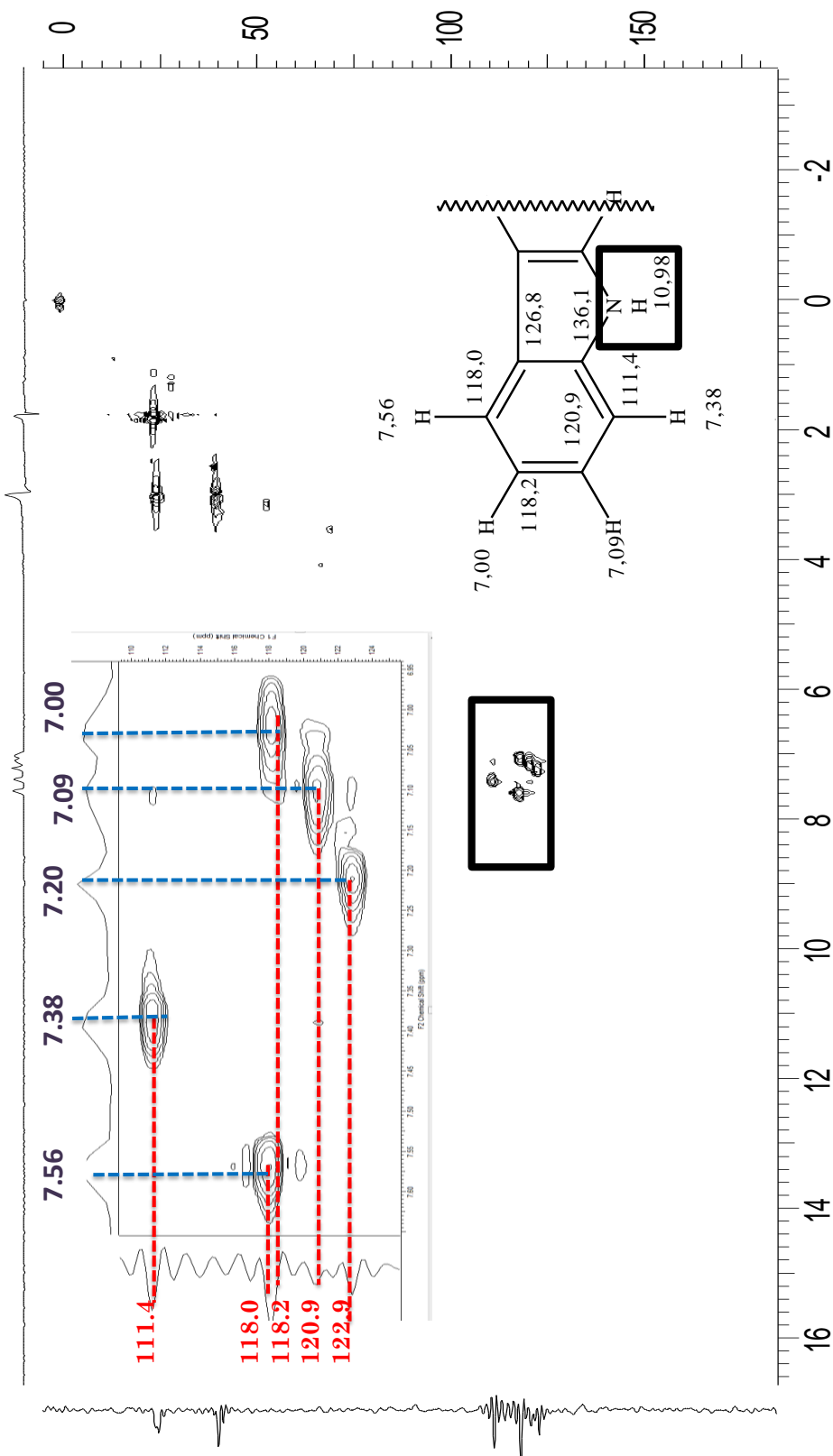


Figura 33. Espectro bidimensional de HMBC da substância número IV identificada como triptamina. (DMSO- d_6 com TMS, 300 e 75 MHz).

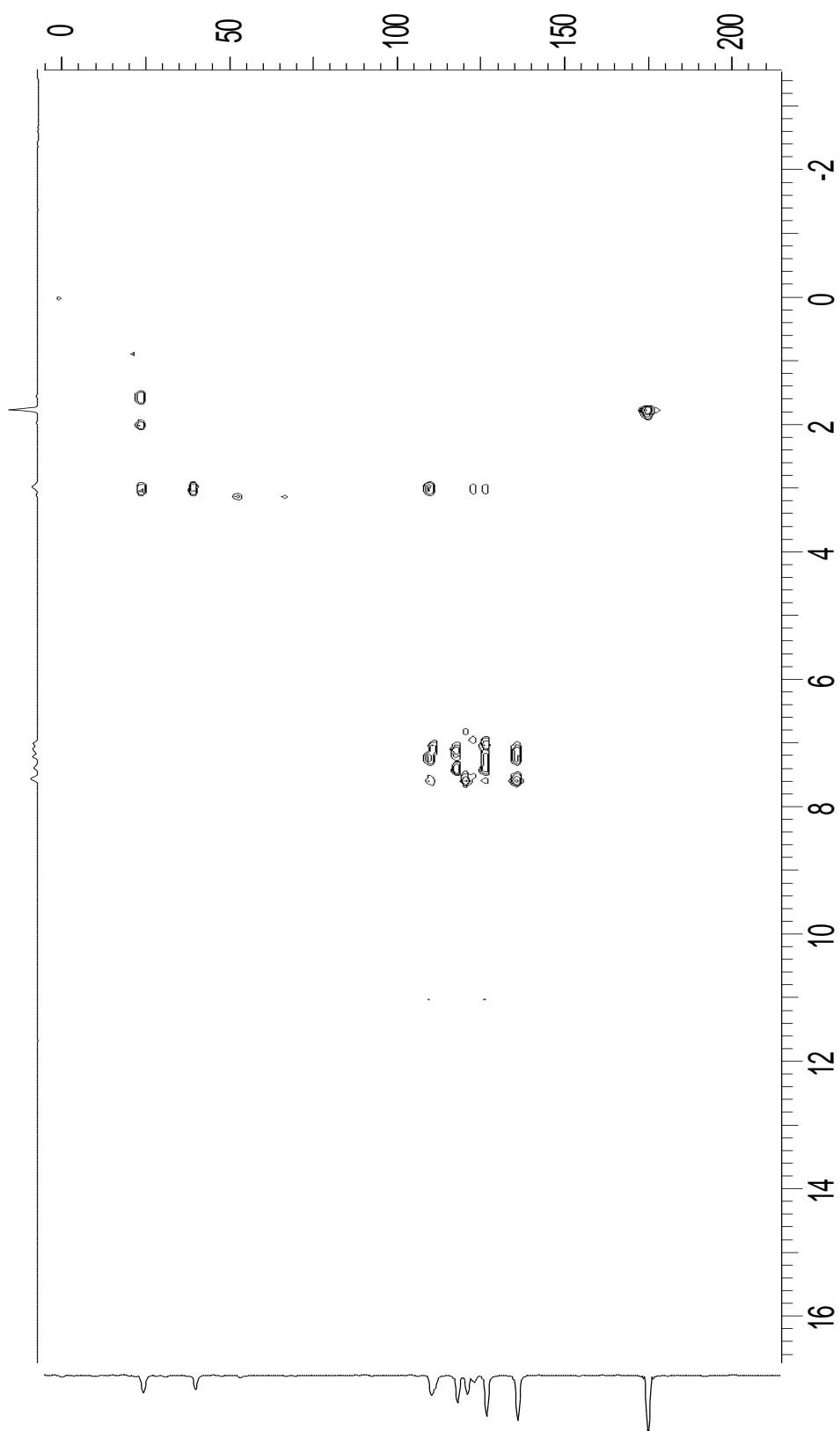
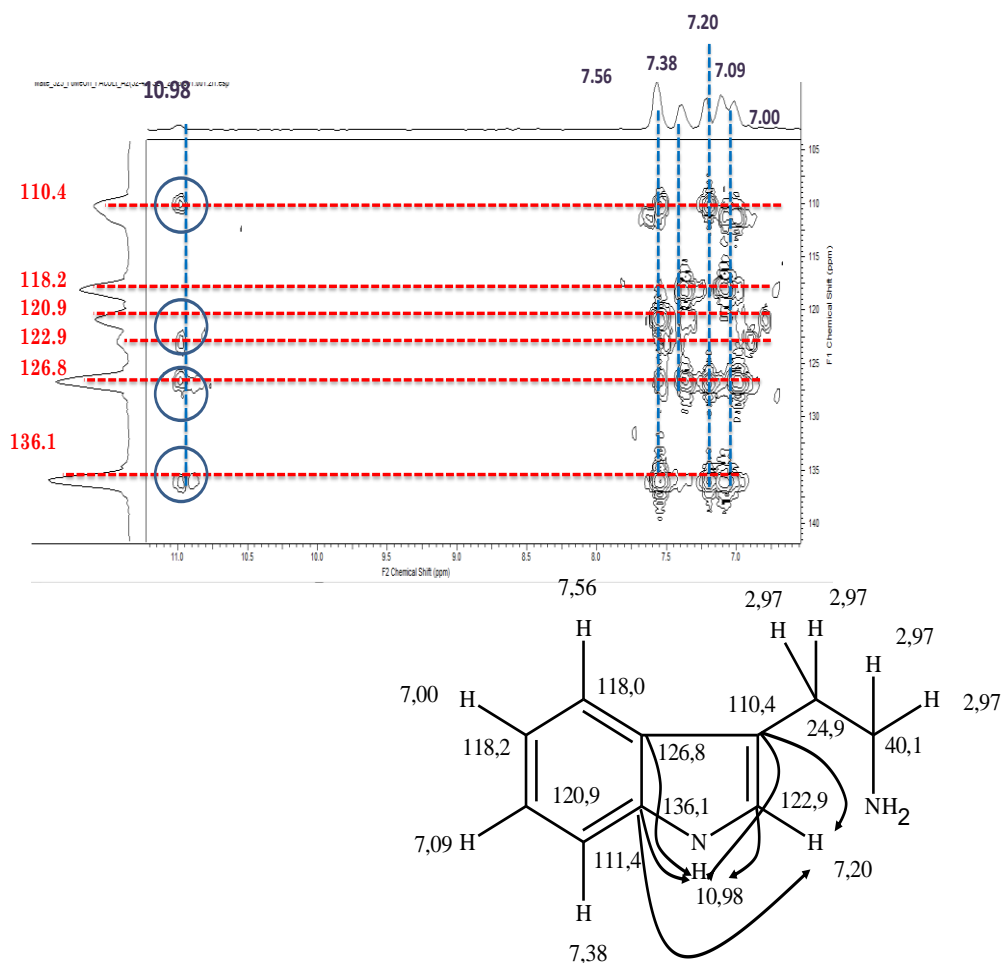


Figura 34. Ampliação das correlações que definem o anel indólico no espectro bidimensional de HMBC da substância número IV, identificada como triptamina. (DMSO- d_6 com TMS, 300 e 75 MHz).



Foi possível observar também a presença de dois carbonos metilênicos em δ_{C} 24,92 e 40,13; ambos os carbonos acoplado com hidrogênios em δ_{H} 2,97 (4H, *m*), o que foi confirmado no espectro de HMBC. Todos esses dados obtidos por espectrometria de massas, assim como os obtidos por RMN foram comparados com os encontrados na literatura (Tabela 14) confirmando que a substância triptamina (Figura 35) era o componente majoritário da fração (WANG e CHEN, 2007).

É importante ressaltar que a triptamina é um importante precursor na rota biossintética de alcaloides indólicos. Estudos realizados com espécies da tribo Condamineae pertencentes à família Rubiaceae indicam que 24% das substâncias

isoladas são alcaloides sendo que dessa porcentagem, 81% são alcaloides indólicos (MOREIRA et al., 2015). Este é o primeiro relato dessa substância isolada do gênero *Warszewiczia*.

Figura 35. Estrutura da substância triptamina

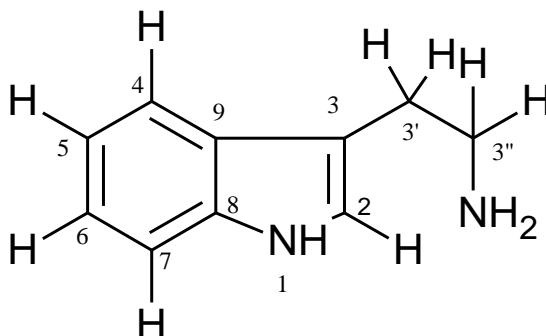


Tabela 14. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância triptamina. ^aO experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H em $\text{DMSO-}d_6$, utilizando o TMS como padrão interno b. Dados da literatura de acordo com WANG e CHEN (2007) (300 MHz, CDCl_3).

Posição	Dados observados ^a		Dados da literatura ^b	
	^{13}C (75 MHz)	^1H (300 MHz)	^{13}C (101 MHz)	^1H (400 MHz)
3'' -CH ₂ -	40,1	2,97 (4H, <i>m</i>)	42,6	2,81 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6,3 Hz)
3' -CH ₂ -	24,9	2,97 (4H, <i>m</i>)	29,45	2,75 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6,3 Hz)
2	122,9	7,20 (<i>s</i>)	122,4	7,11 (<i>s</i>)
3	110,4		112,5	-
4	118,0	7,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	118,2	7,51 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)
5	118,2	7,00 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 7,6 Hz)	117,9	6,96 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)
6	120,9	7,09 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 7,6 Hz)	120,6	7,05 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)
7	111,4	7,38 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	111,2	7,33 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)
8	136,1	-	136,1	-
9	126,8	-	127,26	-
1-NH	-	10,98 (<i>s</i>)	-	10,77 (<i>s</i>)

5.2.5 Identificação da substância V

A substância **V** foi obtida por CLAE na forma de um sólido amorfo, cor amarela, e analisada por RMN de ^1H , incluindo os experimentos bidimensionais, HSQC e HMBC. Foi identificada como 1-(2-aminofenil) etanol

A substância foi solubilizada com 150 μL DMSO- d_6 e colocada em um tubo de 3 mm. O espectro de RMN de ^1H obtido (Figura 36) mostrou sinais correspondentes aos hidrogênios de um anel aromático dissustituído (Figura 37), o qual se caracteriza pela presença de quatro hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,93 (1H, *ddd*, $J = 6,8; 6,8$ e $1,2$ Hz), 7,01 (1H, *ddd*, $J = 6,8; 6,8$ e $1,2$ Hz), 7,28 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz), 7,36 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz).

A correlação entre os hidrogênios descritos anteriormente e os carbonos com deslocamentos em δ_{C} 120,5; 118,1; 117,5 e 110,7, foi confirmada pelo espectro bidimensional de gHSQC (Figuras 38). No mesmo espectro foi possível estabelecer que o sinal em δ_{H} 10,98 não mostrava correlação com carbono, indicando que se tratava de um hidrogênio ligado a heteroátomo.

No espectro de HSQC foi possível observar também a presença de três hidrogênios com deslocamento em δ_{H} 1,40 (1H, *d*, $J = 6,9$ Hz) acoplado com carbono metílico em δ_{C} 19,4. Outras correlações foram confirmadas no espectro de HMBC conforme mostrado na figura 39. Todos esses dados obtidos por RMN (Tabela 15) permitiram identificar a substâncias como o 1-(2-aminofenil) etanol (Figura 40).

De acordo com a literatura consultada este é o primeiro relato dessa substância isolada como um produto natural. E a referência que a cita como produto de síntese (MANNAM e SEKAR, 2009), contém deslocamentos químicos não condizentes com a estrutura proposta. Neste trabalho estamos realizando a correção dos dados da literatura.

Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).

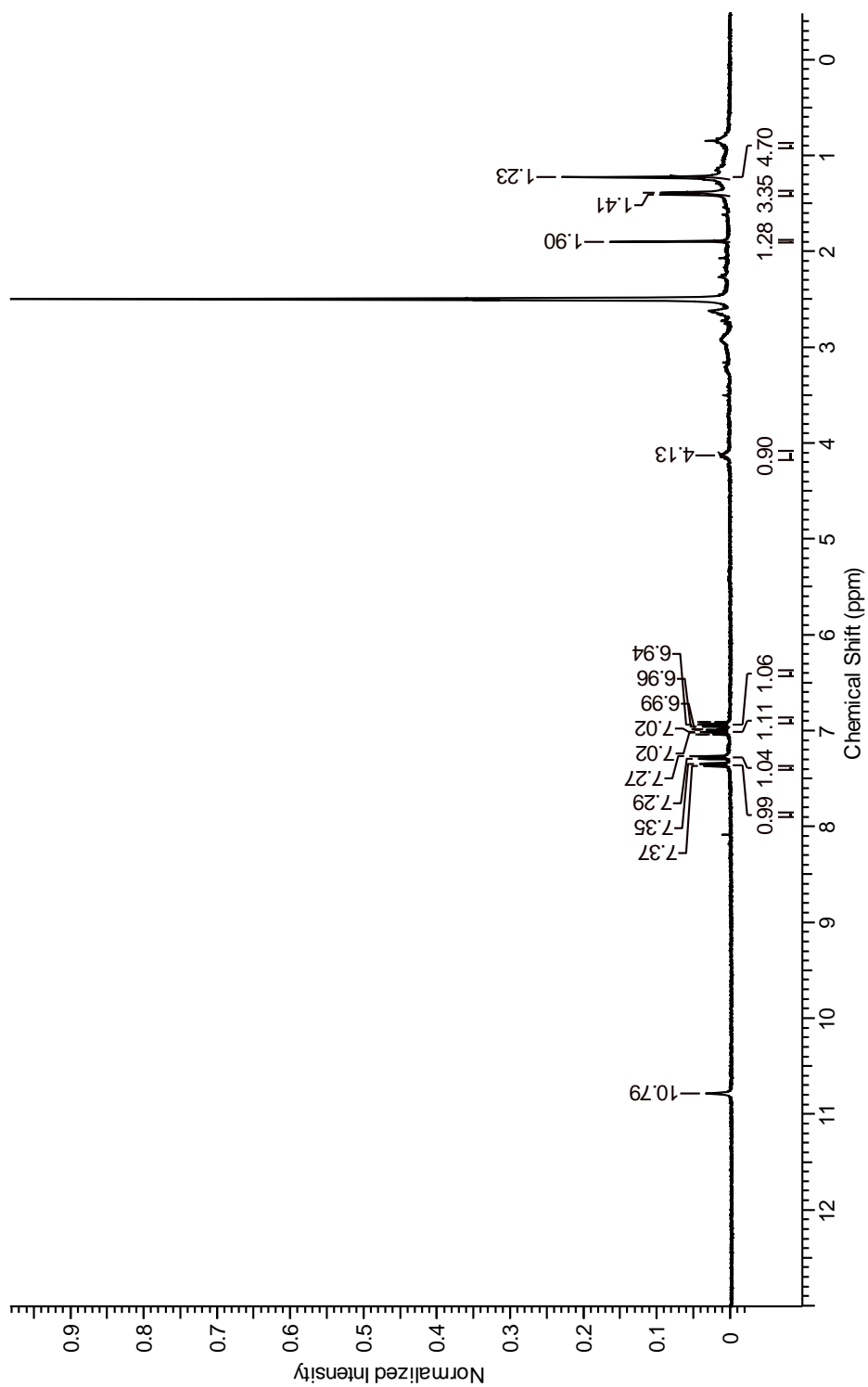


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (com ampliações) da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- d_6 , 300 MHz).

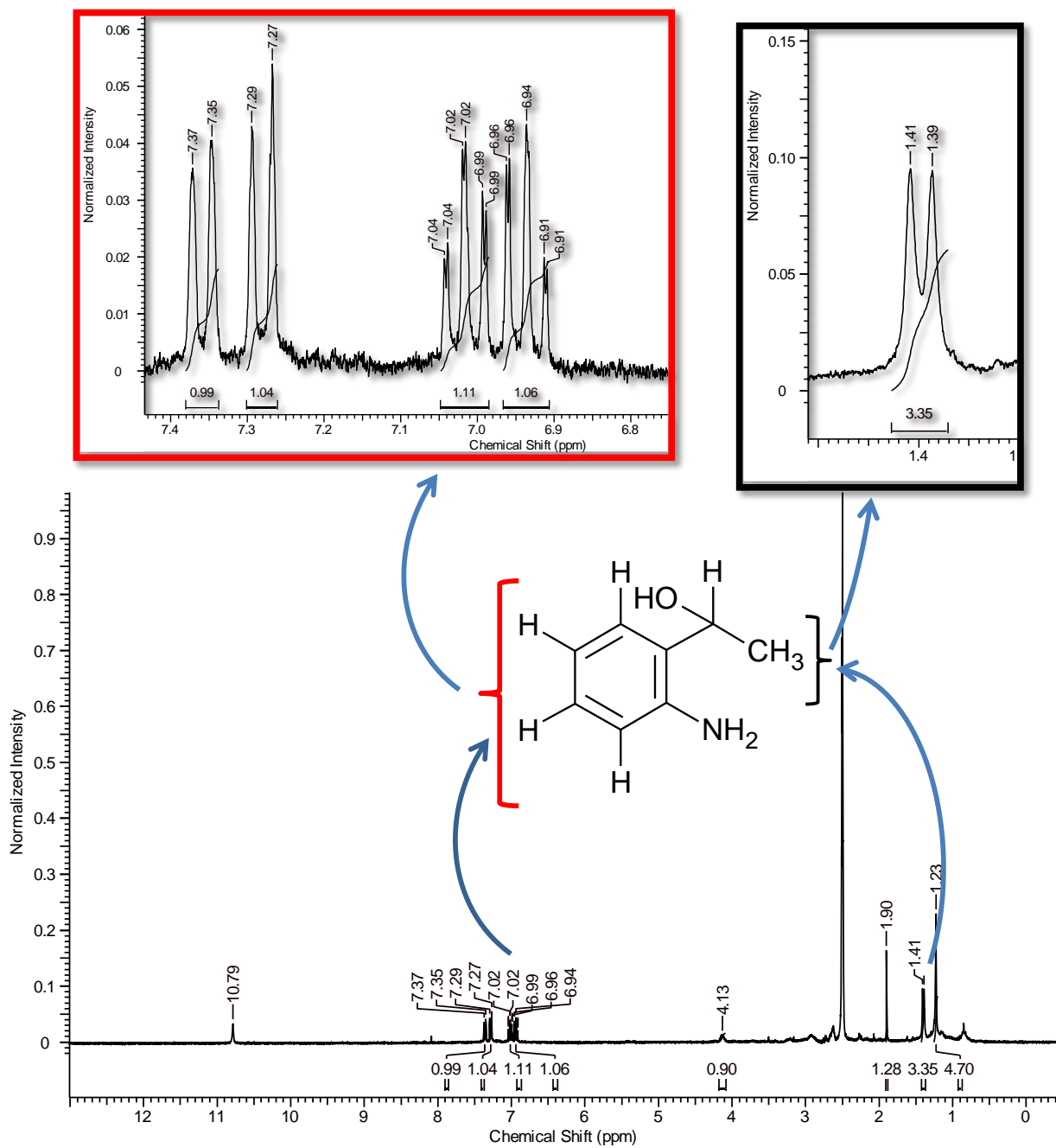


Figura 38. Espectro bidimensional gHSQC da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz).

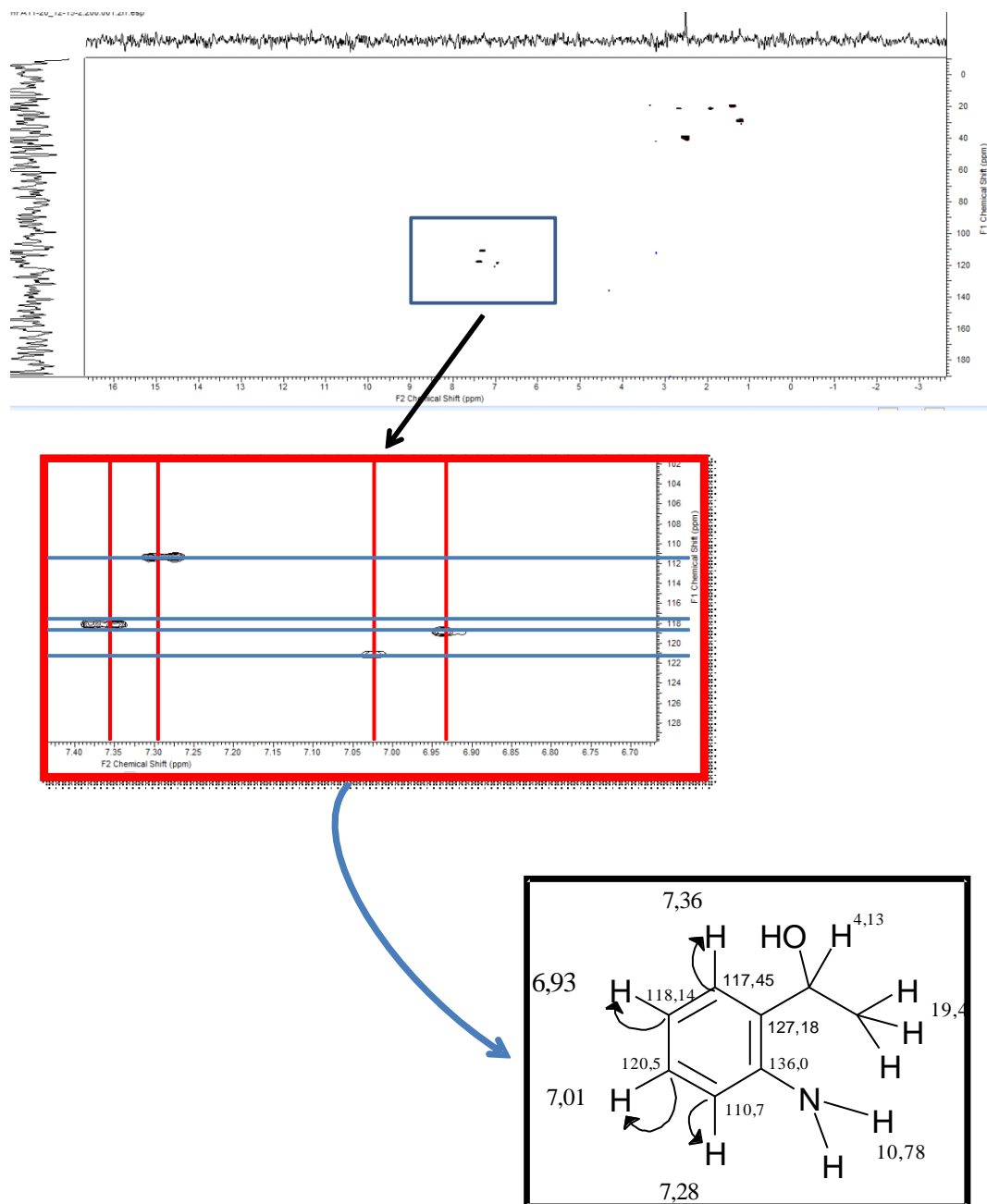


Figura 39. Espectro bidimensional HMBC da substância número V, identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO-*d*₆, 300 e 75 MHz).

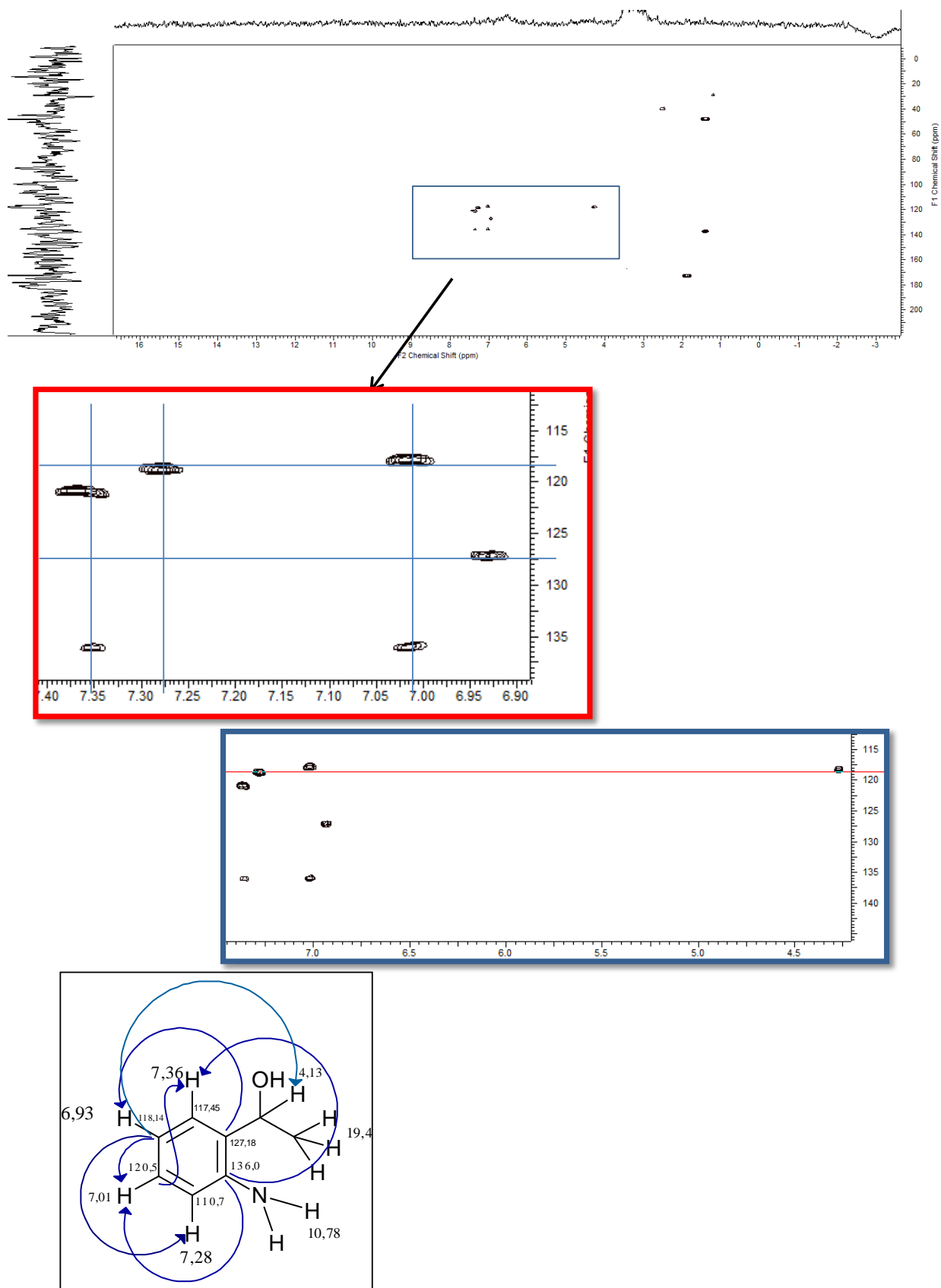
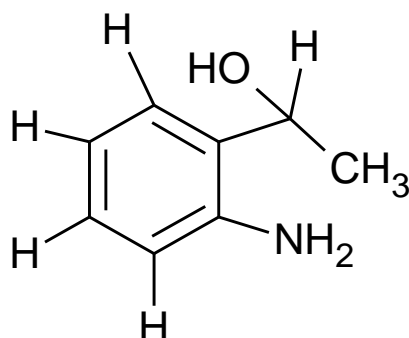


Tabela 15. Dados de RMN de ^1H da substância V identificada como 1-(2-aminofenil) etanol. (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz).

Posição	Dados observados		
	^1H (300 MHz)	HSQC <i>J1</i> (C-H)	HMBC <i>J2, J3</i> (C-H)
2	-	-	136,0 \rightarrow 4 e 6
3	7,28 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,88 Hz)	110,7	ND
4	7,01 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 6,8; 6,8 e 1,2 Hz)	120,5	120,5 \rightarrow 6
5	6,93 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 6,8; 6,8 e 1,2 Hz)	118,1	118,1 \rightarrow 4 e 8
6	7,36 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,88 Hz)	117,5	117,5 \rightarrow 4
7	-	-	127,1 \rightarrow 3 e 5
8	4,13 (1H, <i>m</i>)	48,3	48,3 \rightarrow 9
9	1,40 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,88 Hz)	19,4	ND
1-NH ₂	10,98 (<i>s</i>)	-	ND

ND: não detectado.

Figura 40. Estrutura da substância 1-(2-aminofenil) etanol



5.2.6 Identificação da substância VI

A substância **VI** obtida na forma de um sólido amarelo amorfo, apresentando coloração laranja quando revelada com reagente de Dragendorff e eluída em DCM/MeOH (95:5) e *R_f* de 0,71, foi identificada como o alcaloide tetraidroharmano. A substância foi analisada por RMN de ^1H de 300 MHz, ^{13}C de 75 MHz, incluindo experimentos de COSY, HMBC e HSQC dissolvida em metanol deuterado. Os espectros de CL-EMAR (Figura 41) mostraram tempo de retenção de 2,50 min para o pico do íon

aduto ionizado no modo positivo ($[M+H]^+$, m/z 187,1225) e no modo negativo $[M-H]^-$ (m/z 185,0712), consistente com m/z 186 e a fórmula molecular $C_{12}H_{14}N_2$.

O espectro de RMN de 1H (Figura 42) mostrou os sinais correspondentes aos hidrogênios do anel aromático do sistema indólico, caracterizado pela presença de quatro hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_H 7,12 (1H, *ddd*, $J = 7,9; 7,0; 1,3$ Hz), 7,03 (1H, *ddd*, $J = 7,9; 7,0; 1,3$ Hz), 7,45 (1H, *dl*, $J = 7,9$ Hz) e 7,33 (1H, *dl*, $J = 7,9$ Hz) (Figura 43).

No mapa de contorno gHSQC observou-se que os quatro hidrogênios se encontram ligados aos carbonos em δ_C 121,82; 118,94; 117,73 e 110,85, respectivamente. Também foram observados no espectro de RMN de 1H sinais com deslocamentos em δ_H 1,68 (3H, *d*, $J = 6,8$ Hz) e 4,64 (1H, *q*, $J = 6,8$ Hz), os quais estão correlacionando entre si, observado pela análise de espectros de COSY (Figura 44) e diretamente ligados aos carbonos em δ_C 16,88 e 49,09, respectivamente, pelo espectro de gHSQC (Figura 45) e ambos correlacionam entre si no espectro de HMBC (Figura 46). Observa-se também a presença de dois carbonos metilênicos em δ_C 18,90 e 41,48, sendo que o primeiro acopla com os hidrogênios com deslocamento em δ_H 3,01 (2H, *m*) e o segundo carbono é pró-quiral e os hidrogênios ligados a ele possuem deslocamento químico de 3,36 (1H, *ddd*, $J = 12,4; 8,2$ e $5,2$ Hz) e 3,64 (1H, *dt*, $J = 12,4$ e $4,5$ Hz). As principais correlações podem ser observadas na figura 47.

Figura 41. Espectro de CL/EMAR da substância número VI, identificada como o alcaloide tetraidroharmano, isolado da espécie *Warszewiczia schwackei*.

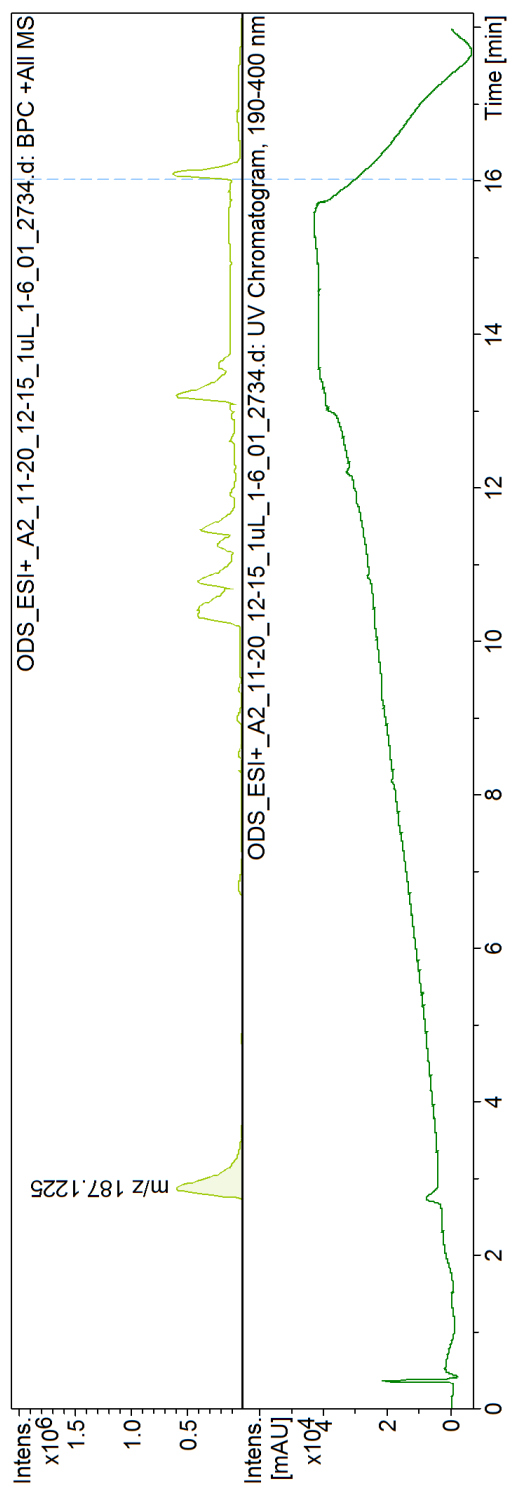


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD_3OD , com TMS. 300 MHz).

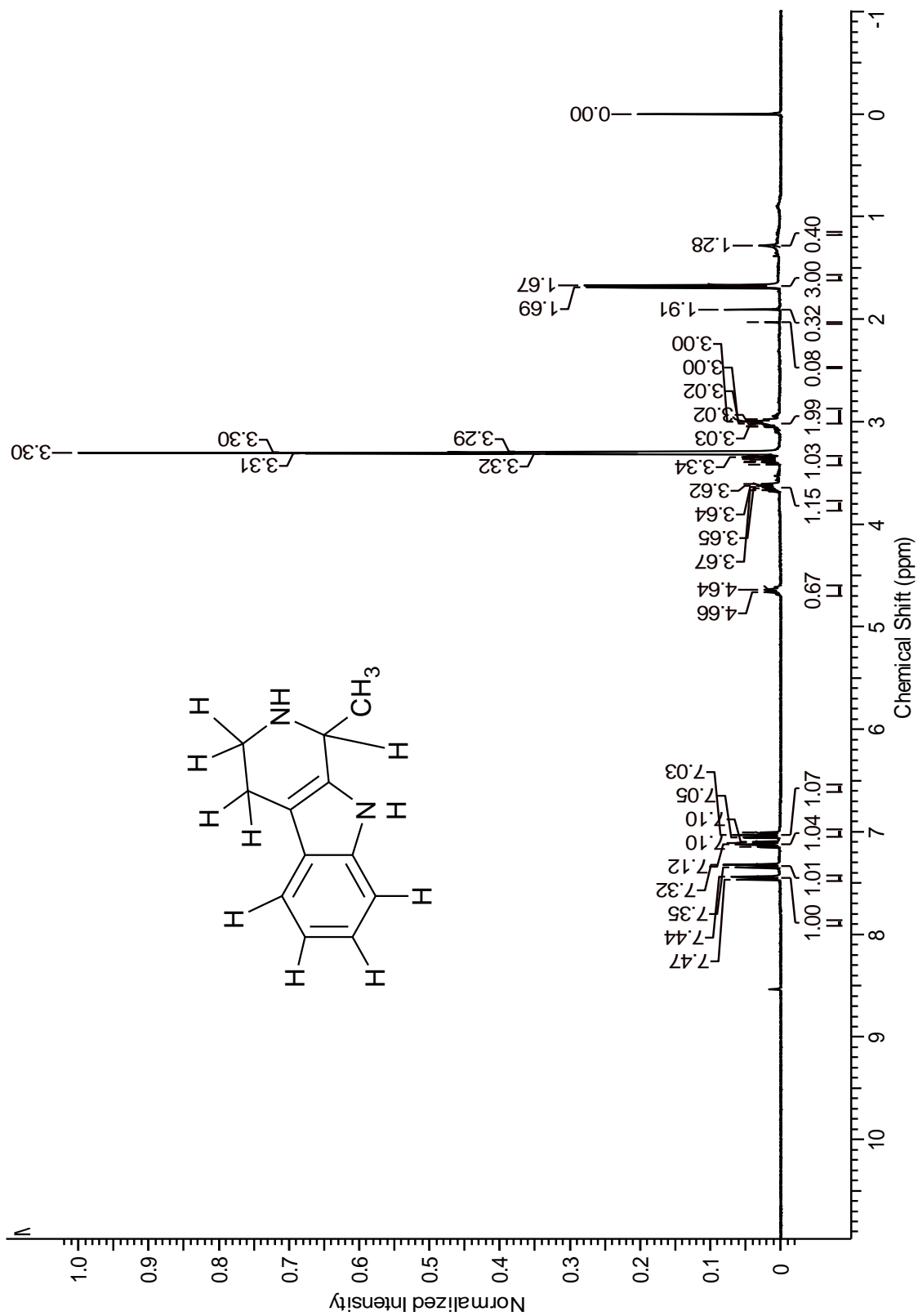


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (com ampliações) da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD_3OD , com TMS, 300 MHz).

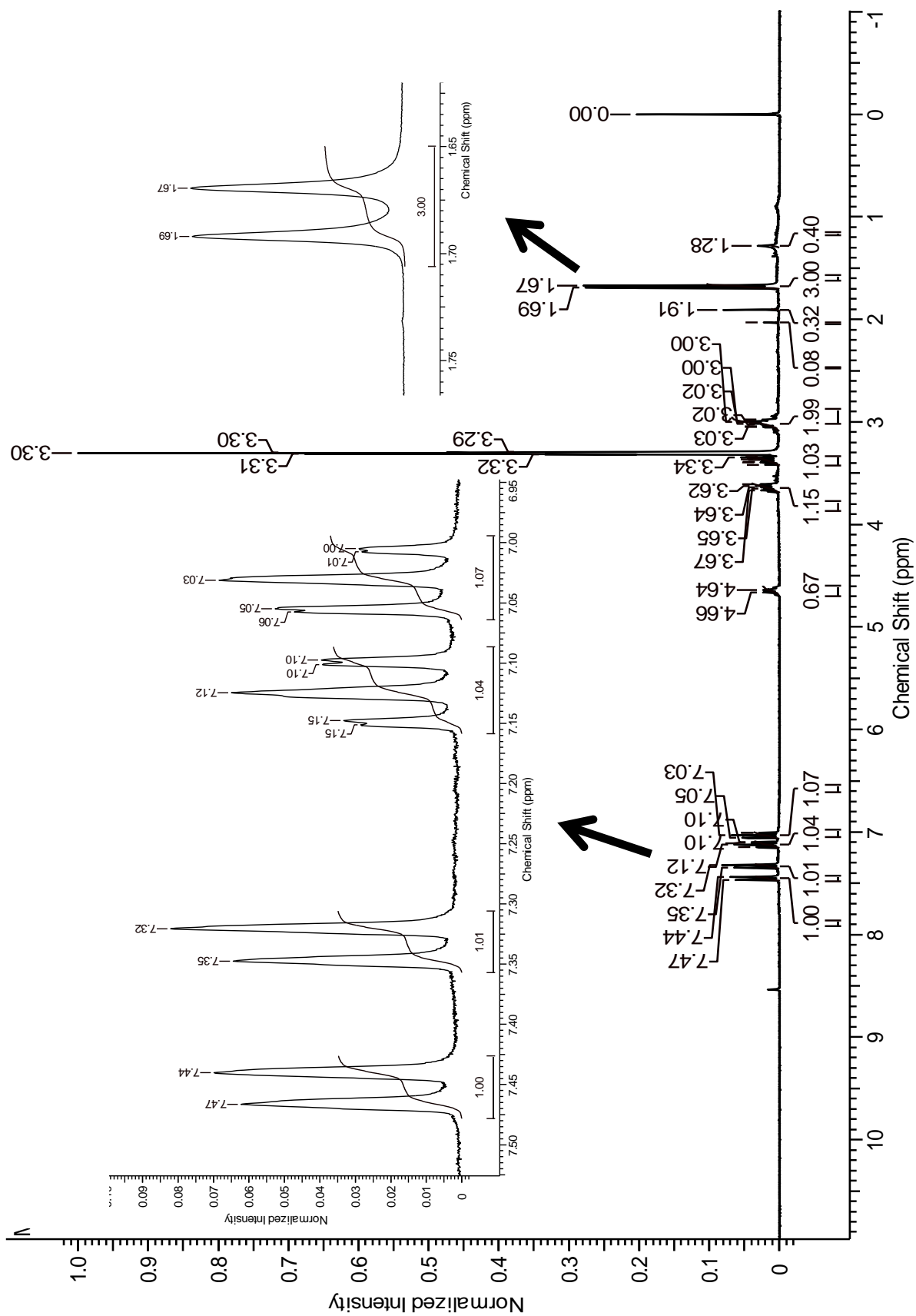


Figura 44. Espectro bidimensional COSY, acoplamento H-H da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD₃OD, com TMS. 300 MHz).

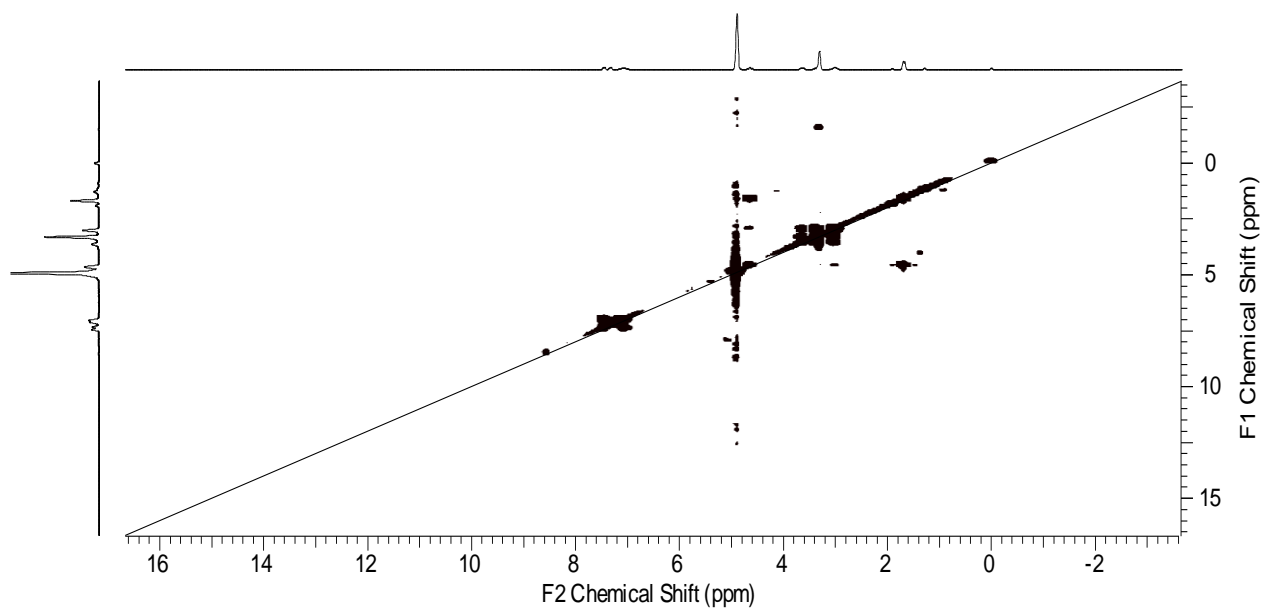


Figura 45. Espectro bidimensional gHSQC da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD₃OD, com TMS. 300 e 75 MHz).

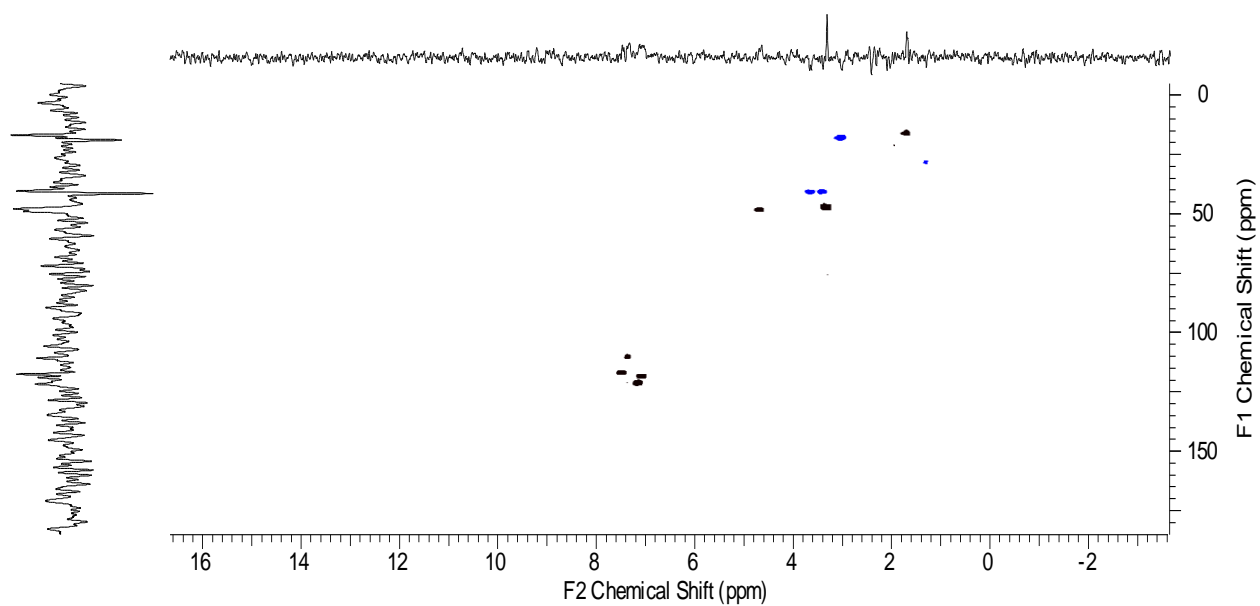


Figura 46. Espectro bidimensional HMBC da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. (CD₃OD, com TMS. 300 e 75 MHz).

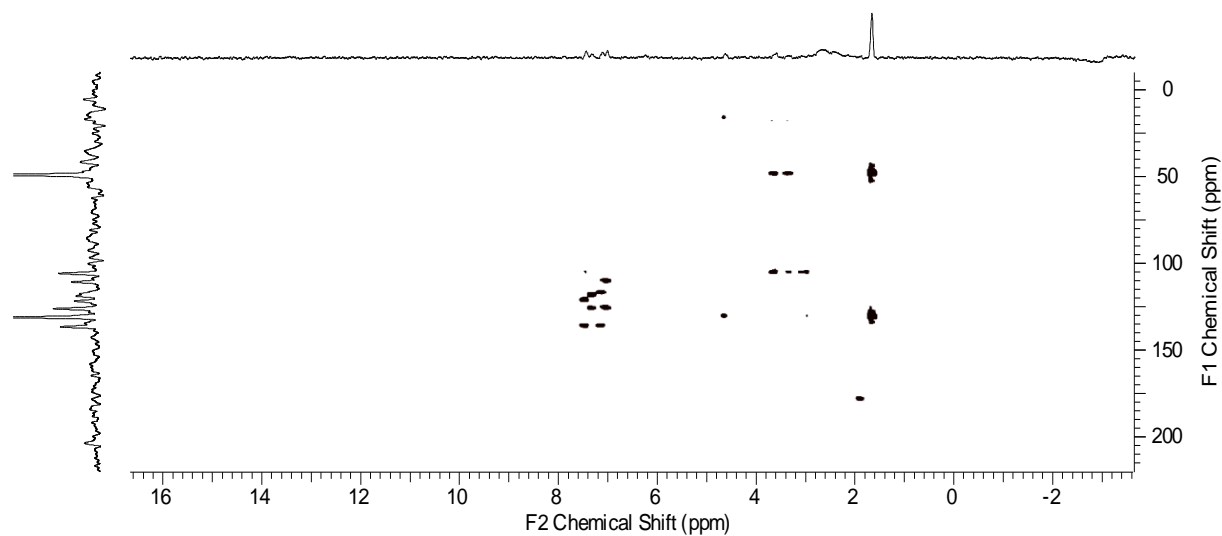
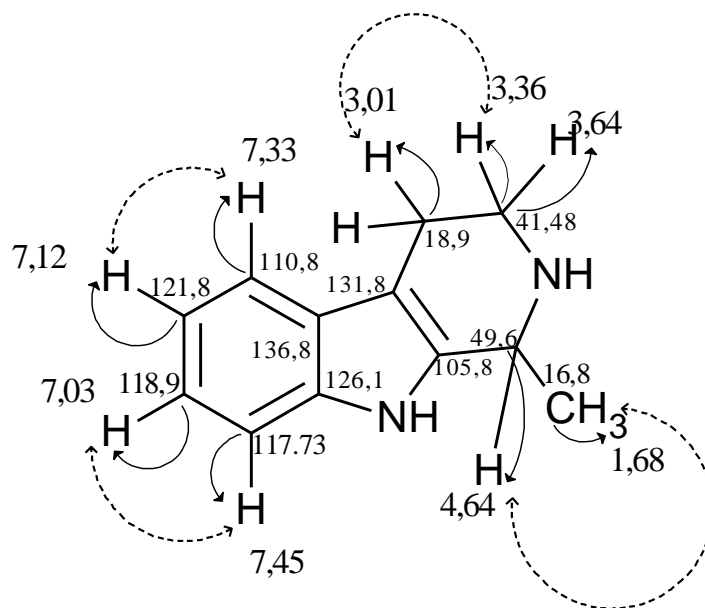
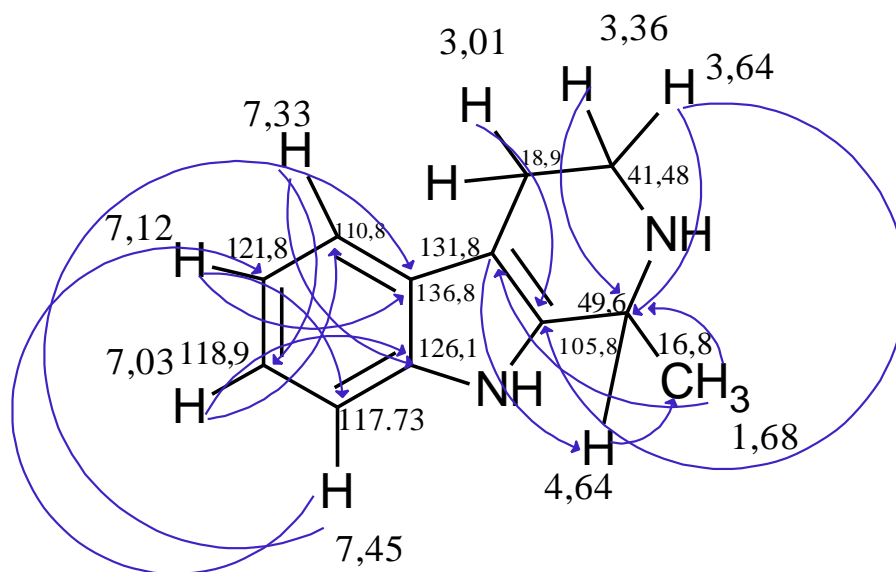


Figura 47. Principais correlações observadas para a estrutura da substância número VI, identificada como tetraidroharmano.





- Correlações COSY (H-H)
- Correlações HSQC (J_1)
- Correlações HMBC

Após a observação de todos os dados e quando comparados com os encontrados na literatura (Tabela 16) (FIOT et. al., 2006) foi possível identificar a substância como sendo o alcaloide indólico tetraidroharmano (1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina) (Figura 48), classe química característica de espécies pertencentes à família Rubiaceae, o que corrobora com classificação botânica. Esta substância está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Warszewiczia*.

Figura 48. Estrutura da substância tetraidroharmano

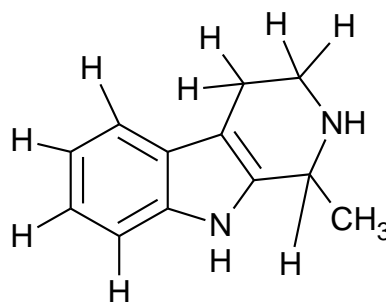


Tabela 16. Dados de RMN de ^1H da substância número VI, identificada como tetraidroharmano. ^aO experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H em CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno, ^bDados da literatura de acordo com Fiot et al., 2006 (500 MHz).

Posição	^1H multiplicidade (300 MHz para ^1H) ^a	^1H multiplicidade (500 MHz para ^1H) ^b
1	4,64 (1H, <i>q</i> , $J = 6,8$ Hz)	4,10 (1H, <i>qt</i> , $J=6,7; 1,7$)
2 -N-H	-	-
3Pseudoax	3,36 (1H, <i>ddd</i> , $J = 12,4; 8,2$ e $5,2$ Hz)	3.28 (1H, <i>ddd</i> , $J= 12,5, 5,2, 3,5$)
3Pseudoeq	3,64 (1H, <i>dt</i> , $J = 12,4$ e $4,5$ Hz)	2.95 (1H, <i>ddd</i> , $J=12,5, 9,1; 5,0$)
4Pseudoax	3,01 (2H, <i>m</i>)	2.78(1H, <i>ddd</i> , $J=15,2;5,2;3,6;1,7$)
4Pseudoeq	-	2.69(1H, <i>dddd</i> , $J=15,2, 9,1; 5,2; 1,9$)
4a	-	-
4b	-	-
5	7,33 (1H, <i>dl</i> , $J = 7,9$ Hz)	7.37 (1H, <i>dt</i> , $J= 8,0; 1,0$)
6	7,12 (1H, <i>ddd</i> , $J = 7,9; 7,0; 1,3$ Hz)	6.96 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,1; 1,2$)
7	7,03 (1H, <i>ddd</i> , $J = 7,9; 7,0; 1,3$ Hz)	7.04 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,0; 7,1; 1,1$)
8	7,45 (1H, <i>dl</i> , $J = 7,9$ Hz)	7.28 (1H, <i>dt</i> , $J=8,0, 1,1$)
8a	-	-
9-NH	-	-
9a	-	-
1-CH₃	1,68 (3H, <i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)	1,46 (3H, <i>d</i> , $6,7$ Hz)

5.2.7 Identificação da substância VII

A substância **VII** foi obtida na forma de um sólido branco amorfo, apresentando coloração escura (azul escuro) quando revelada com o revelador cloreto férrico (FeCl_3) e foi analisada por RMN de ^1H de 300 MHz, incluindo experimentos de HSQC, HMBC e dissolvida em DMSO-d_6 . O espectro de RMN de ^1H (Figura 49 e 50) mostrou 5 sinais correspondentes aos hidrogênios de dois anéis aromáticos, 2 sinais característicos de um anel tetrasubstituído com deslocamentos em δ_{H} 5,68 e 5,88 ambos os sinais integrando para 1 hidrogênio cada e com constante de acoplamento $J=2$ Hz (acoplamento *meta*). Os outros 3 sinais com deslocamentos em δ_{H} 6,58 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,9$ Hz), 6,67 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz) e 6,71 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e HSQC (Figura 51) permitiram observar também a presença de um dubleto com deslocamento em δ_{H} 4,46 e com constante de acoplamento $J = 7,2$ Hz integrando para 1 hidrogênio acoplado com carbono em δ_{C} 80,7, assim como um quinteto largo com deslocamento em δ_{H} 3,80 e com integral para 1 hidrogênio acoplado com carbono em δ_{C} 66,2 e a presença hidrogênios metilênicos um duplo dubleto com deslocamento em δ_{H} 2,64 (1H, *dd*, $J = 16,4$ e $5,4$ Hz) e o segundo duplo dupleto em δ_{H} 2,33 (1H, *dd*, $J = 16,4$ e $8,0$ Hz) ambos acoplados com um carbono em δ_{C} 27,73.

O espectro bidimensional de HMBC (figura52) mostrou a presença de carbonos não hidrogenados com deslocamentos em δ_{C} 156,66, 156,28, 154,24, 131,03, 99,45 os quais foram posicionados de acordo com as correlações observadas no mesmo espectro. A posição dos hidrogênios não aromáticos em δ_{H} 4,46, 3,80, 2,64 e 2,33 foram atribuídos após análise do espectro de HMBC, onde observou-se principalmente uma correlação entre os sinais em δ_{H} 4,46, 2,64 e 2,33 com o carbono em δ_{C} 66,2 o qual está

diretamente ligado com o hidrogênio em δ_H 3,80. As análises das outras correlações encontram-se na tabela 17.

Após análise de todos os espectros e correlações observadas e comparando com a literatura (CHENG et al., 2014), foi possível determinar que se tratasse do flavonoide: catequina, sendo que a principal diferença observada entre catequina e epicatequina é nas constantes de acoplamento dos hidrogênios alifáticos, enquanto que para catequina são observadas um dubleto δ_H 4,46 (H-2) e um multiplete δ_H 3,80 (H-3) e dois duplo dubleto δ_H 2,64 ($J = 16,4$ e $5,4$ Hz) e δ_H 2,33 ($J = 16,4$ e $8,0$ Hz), correspondentes aos hidrogênios H-4 α e H-4 β para epicatequina os valores das constantes de acoplamento para estes hidrogênios e de 15,5 e 4,5 Hz e 15,5 e 3,0 Hz, respectivamente. (LOBO et al., 2008 e CHENG et al., 2014).

Esta substância está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Warszewiczia*.

Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância número VII, identificada como catequina, ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).

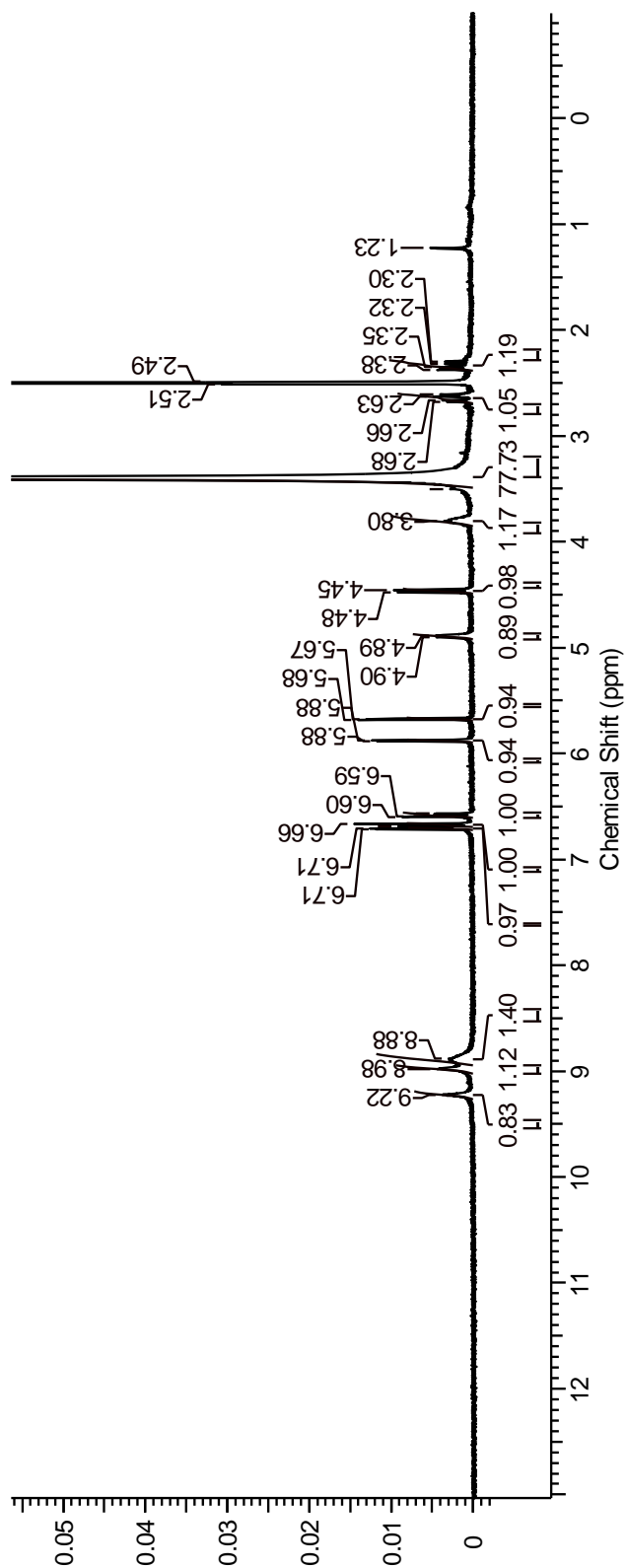


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H da substância número VII, identificada como catequina, com as ampliações dos hidrogênios correspondentes. (DMSO- d_6 , 300 MHz).

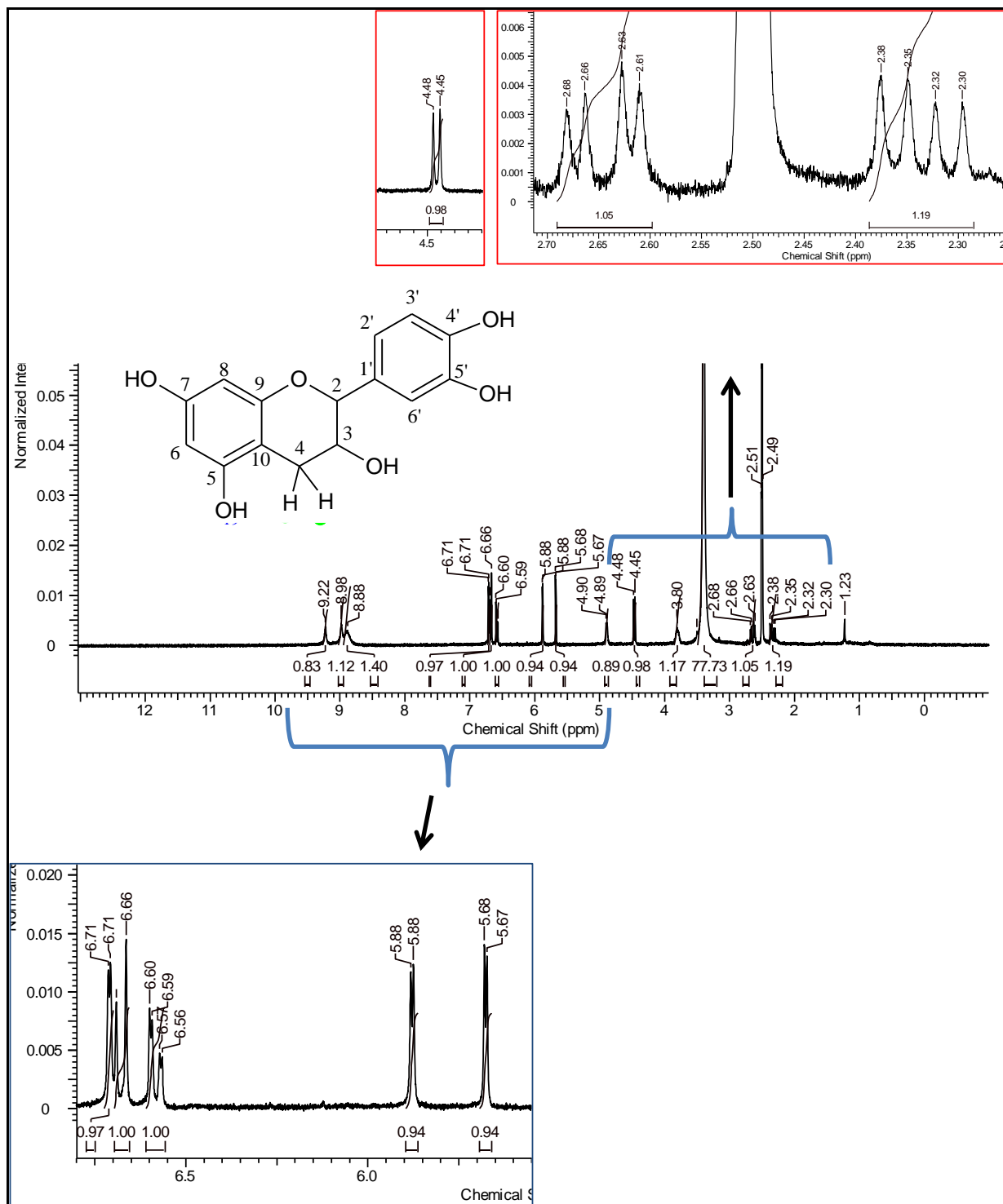


Figura 51. Espectro bidimensional gHSQC da substância número VII, identificada como catequina, (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz).

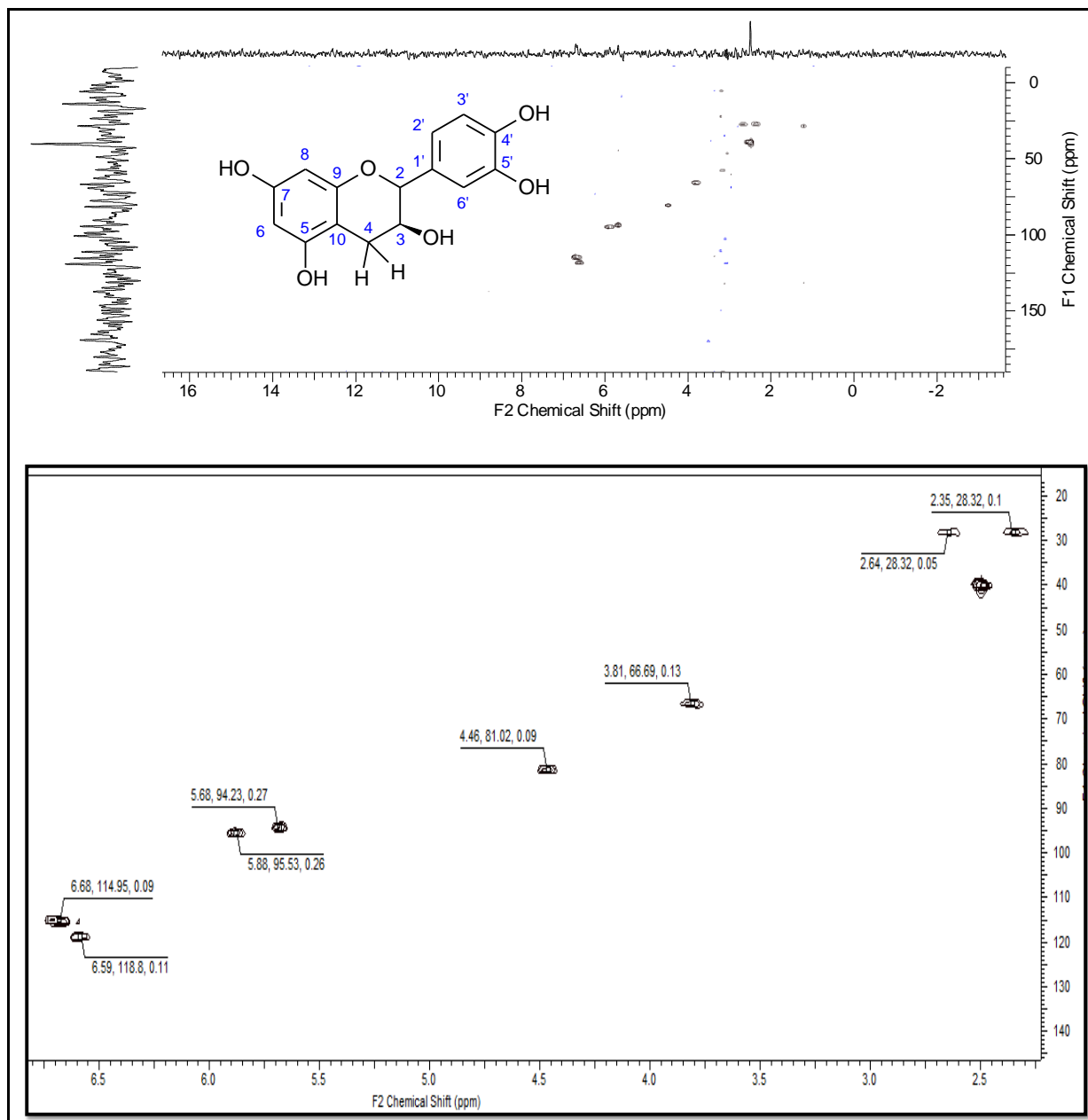


Figura 52. Espectro bidimensional HMBC e principais correlações da substância número VII, identificada como catequina.

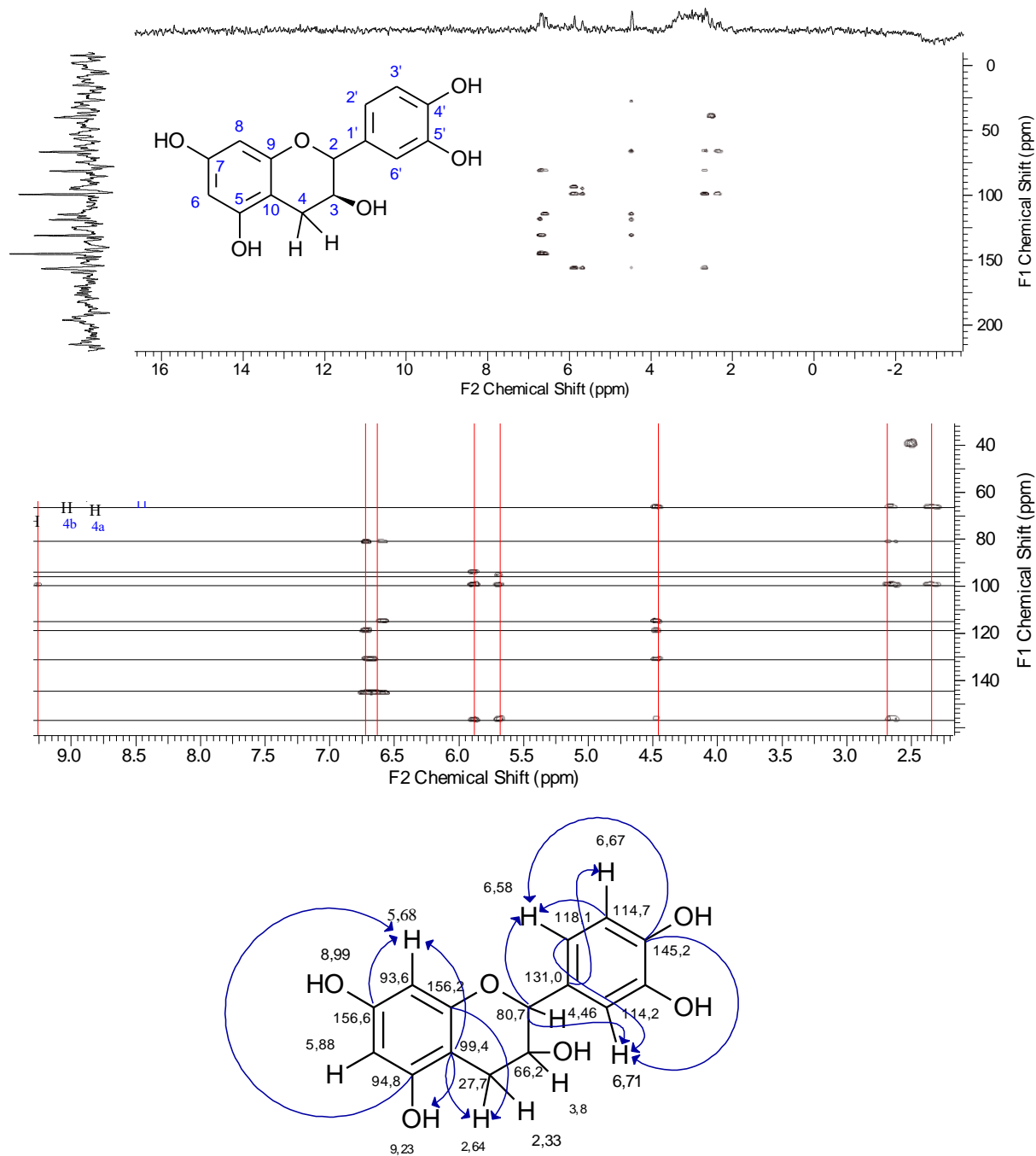


Tabela 17. Dados de RMN de ^1H da substância número VII, identificada como catequina. ^aO experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H em DMSO- d_6 , ^bDados da literatura de acordo com Cheng et al., 2014 (em DMSO- d_6 e 500 MHz).

Posição	δH (multi., J em Hz) (300 MHz- DMSO- d_6) ^a	HMBC da substância VII J_2, J_3 (C-H)	δH (multi., J em Hz) (500 MHz- DMSO- d_6) ^b
2	4,46 (1H, $d, 7,2$)	ND	4,46 (1H, $d, 7,5$)
3	3,80 (1H, m)	66,2 \rightarrow 2 e 4α - β	3,80 (1H, $ddd, 8,0, 7,5, 5,5$)
4 α	2,64 (1H, $dd, 16,4$ e $5,4$)	ND	2,64 (1H, $dd, 16,0$ e $5,5$)
4 β	2,33 (1H, $dd, 16,4$ e $8,0$)	ND	2,33 (1H, $dd, 16,0$ e $8,0$)
5	9,23 (1H, s)	ND	
6	5,88 (1H, $d, 2,0$)	ND	5,87 (1H, $d, 1,0$)
7	8,99 (1H, s)	ND	
8	5,68 (1H, $d, 2,0$)	ND	5,67 (1H, $d, 1,0$)
9	-	156,25 \rightarrow 8, 6 e 4α - β	-
10	-	99,45 \rightarrow 5, 6 e 8	-
1'	-	131,03 \rightarrow 2 e 3'	-
2'	6,58 (1H, $dd, 8,2$ e $1,9$)	118,15 \rightarrow 2 e 6'	6,58 (1H, $dd, 8,0$ e $2,0$)
3'	6,67 (1H, $d, 8,2$)	ND	6,67 (1H, $d, 8,0$)
4'	-	145,24 \rightarrow 2', 3' e 6'	-
5'	-	ND	-
6'	6,71 (1H, $d, 1,9$)	114,28 \rightarrow 2 e 2'	6,70 (1H, $d, 2,0$)

ND: não detectado.

5.3 Avaliação das atividades biológicas

5.3.1 Atividade de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade é uma das atividades mais estudadas entre as espécies de Rubiaceae, conforme foi mostrado na revisão de literatura, aonde dos 321 artigos publicados um total de 22% são referentes à avaliação desta atividade frente a diferentes linhagens celulares, tanto sadias como tumorais humanas, as quais apresentam diversos mecanismos de ação.

Especificamente no caso de macrófagos, o interesse em verificar a toxicidade de extratos ou substâncias frente a este tipo de células, é devido à correlação que existe entre os macrófagos e o desenvolvimento de outras doenças como é caso do câncer, aonde este tipo celular é uma das principais encontradas no microambiente tumoral,

como parte de uma resposta imunológica aos tumores. Isto ocorre porque quase sempre existe uma inflamação associada. Além disso, os macrófagos podem regular e contribuir na progressão e crescimento tumoral (angiogênese) (PETERSON et al., 2016).

Outra doença diretamente relacionada com os macrófagos é a tuberculose, a qual é causada pelo *M. tuberculosis*, que afeta principalmente os pulmões, infectando os macrófagos, impedindo a apoptose dos mesmos, conseqüente destruição do agente patógeno (BEHAR et al., 2010). Com isto, neste estudo, foi realizada também a avaliação da citotoxicidade dos extratos de *W. schwackei* frente a macrófagos. Os resultados obtidos mostraram que o extrato metanólico dos galhos não apresentou citotoxicidade com uma $CI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. Fiot e colaboradores (2006) não observaram uma atividade citotóxica de três alcaloides indólicos: harmano ($CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$), harmalano ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), tetraidroharmano ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), frente a monócitos humanos (células THP1). Resultados concordantes com os obtidos uma vez que, neste estudo foi possível mostrar a presença de alcaloides indólicos e também o isolamento do tetraidroharmano.

5.3.2 Atividade antioxidante

A avaliação dos extratos hexânicos e metanólicos de folhas e galhos; e das fases dos extratos metanólicos das folhas quanto a sua capacidade como antioxidante por ambas as metodologias (DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina), mostrou que os extratos metanólicos de folhas e galhos assim como as fases acetato de etila e hidrometanólica apresentaram valores entre 1 e 3 quando comparados com o ácido ascórbico, sendo considerados como ativos (Tabela 18).

Tabela 18. Resultados da avaliação antioxidante dos extratos e fases de *Warszewiczia schwackei* frente à DPPH e Fe³⁺/fenantrolina.

Parte da planta	Extrato	Método usando DPPH ●			Método usando Fe ³⁺ /fenantrolina		
		Valores médios			Valores médios		
		\Delta ABS ₅₁₇	[AA] _{eq}	Equiv. (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)	\Delta ABS ₅₀₈	[AA] _{eq}	Equiv. (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)
Galho	Hexano	0,058±0,009	0,252±0,076	20,897±5,370	-0,059±0,052	-0,253±0,105	-23,05±12,085
Galho	Metanol	0,242±0,020	1,870±0,176	2,691±0,267	1,033±0,069	1,941±0,139	2,58±0,180
Folha	Hexano	0,070±0,011	0,361±0,100	14,540±3,705	0,035±0,053	-0,065±0,106	144,26±603,320
Folha	Metanol	0,283±0,023	2,233±0,199	2,250±0,193	1,329±0,269	2,537±0,540	2,04±0,493
Folha	Metanol/FDCM	0,084±0,110	0,484±0,963	10,430±0,193	0,000±0,677	0,000±1,362	10,60±4,860
Folha	Metanol/FAcoEt	0,391±0,109	3,180±0,958	1,614±4,561	0,000±0,663	0,000±1,333	1,40±4,263
Folha	Metanol/FMH ₂ O	0,266±0,007	2,084±0,059	2,495±1,182	0,325±0,096	0,518±0,194	2,31±3,922

Esses resultados observados são concordantes, já que os extratos e fases que mostraram atividade foram os extraídos com solventes polares, onde são extraídos a maioria das substâncias fenólicas. Essas últimas possuem características estruturais que lhes conferem a capacidade de agir como substâncias antioxidantes, como por exemplo o caso do antioxidante conhecido, quercetina (CARDOSO et al., 2010).

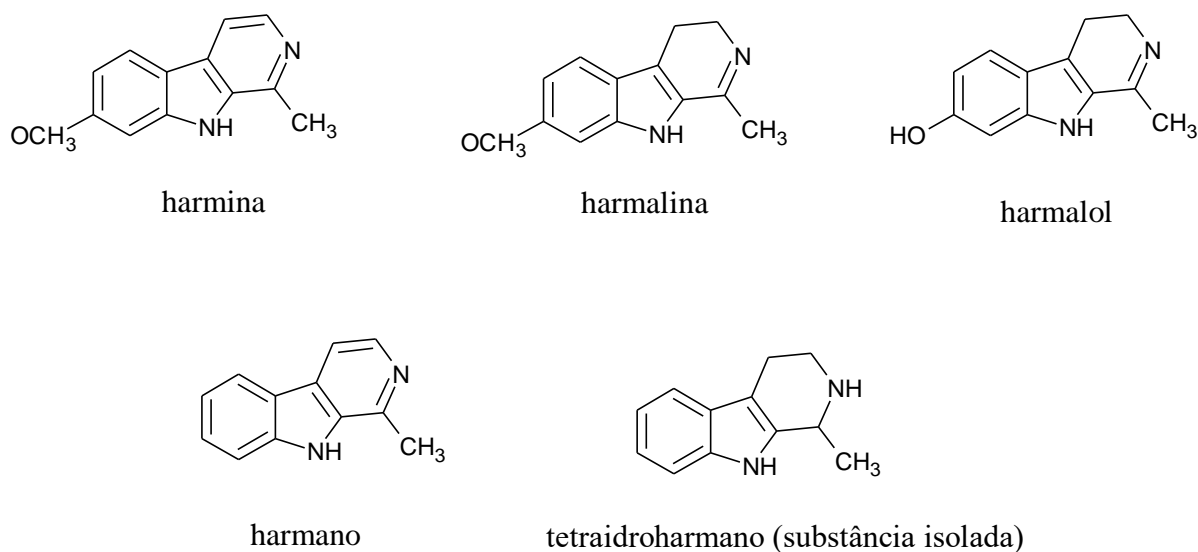
As frações mais ativas como antioxidantes foram as da fase acetato de etila obtida do extrato metanólico das folhas, a partir das quais foi possível isolar a substância identificada como catequina (flavonoide), como mostrado no item do estudo fitoquímico de *W. schwackei*. No entanto, provavelmente não somente os flavonoides sejam os responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos estudados, pois foi relatado em outros estudos a capacidade antioxidante de vários tipos de alcaloides β -carbolínicos (harman, harmine, harmol, harmalina e harmalol) em estudos *in vitro* e *in vivo*, assim como também da substância triptamina, a qual se mostrou como um potente antioxidante de sistemas enzimáticos (MOURA et al., 2007 e TSE et al., 1991). Este tipo de alcaloides possui como estrutura principal grupos fenólicos que atuam como

substâncias antioxidantes. Kuruva e colaboradores (2013) também avaliaram a capacidade antioxidante de novos derivados de triptamina. Algumas das citadas substâncias foram isoladas dos extratos metanólicos das folhas de *W. schwackei*.

5.3.3 Atividade antibacteriana

Ao avaliar todos os extratos obtidos de *W. schwackei* não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microorganismos testados. Embora, na literatura consultada tenham sido encontrados relatos sobre a capacidade antibacteriana de alcaloides β -carbólicos que mostraram atividade antibacteriana frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli* que foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo observando-se os CIM de harmina 0,6 e 0,7 mg/mL; harmalina 0,9 e 2,5 mg/mL; harmalol 1,2 e 2 mg/mL e harmano 2 e 0,6 mg/mL (REZA e ABBAS, 2007; SONG et al., 2014). Observando esses resultados seria possível inferir que a capacidade antibacteriana deste tipo de alcaloides estaria relacionada com os substituintes presentes no anel aromático como metoxila e hidroxila (Figura 53) (DAI et al., 2018), e provavelmente isto esteja correlacionado com os resultados obtidos, pois os alcaloides isolados neste trabalho não apresentam os substituintes mencionados, ou os mesmos se encontram em concentrações baixas.

Figura 53. Estrutura de alcaloides com esqueleto β -carbolínicos com atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e estrutura do alcaloide tetraidroharmano (REZA e ABBAS, 2007).



5.3.4 Atividade antimicobacteriana

Os resultados observados após avaliação dos extratos frente a *M. tuberculosis*, mostraram que somente os extratos metanólicos de folhas e dos galhos apresentaram um CIM de $> 400 \mu\text{g/mL}$ e de $400 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, e desses dois o metanólico das folhas mostrou também ser bactericida com uma concentração bactericida mínima (CBM) de $400 \mu\text{g/mL}$. Estes resultados estariam diretamente correlacionados com o observado frente capacidade dos extratos de causar a morte dos macrófagos a qual apresentou a mesma concentração de $400 \mu\text{g/mL}$, pois existe uma relação entre as células macrófagos e o agente patógeno que causa a tuberculose, como explicado no item dos resultados da atividade citotóxica.

5.3.5 Atividade antimalárica

Os resultados obtidos após a realização do teste antimalárico (tabela 19) revelaram que os dois extratos: hexânico dos galhos e metanólico das folhas, na

concentração de 50 µg/mL, testados frente a *P. falciparum*, reduziram em 98 e 92% respectivamente o crescimento do parasita, sendo então ambos os extratos considerados ativos, posteriormente foi realizada uma diluição dos extratos a fim de se avaliar os mesmos na concentração de 5 µg/mL, observando-se uma redução menor na porcentagem de crescimento do parasita.

Tabela 19. Resultados da avaliação antimalárica dos extratos de *Warszewiczia schwackei* frente a *P. falciparum*.

Extrato	Classificação da atividade*	Redução do crescimento do parasito (%)	
		50 (µg/mL)	5 (µg/mL)
Galhos Hexano	A	98,07	17,49
Folhas MeOH	A	92,03	1,44

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido o seguinte critério para a inibição do crescimento dos parasitos, sendo:

- de 80 a 100% = ativas (A)
- de 50 a 79% = parcialmente ativas (PA)
- < 50% = inativa (I)

Após realizar um levantamento bibliográfico nas principais bases de dados, sobre os usos populares da espécie *W. schwackei* foi possível constatar que a mesma não é utilizada na medicina tradicional no Brasil, principalmente em relação à atividade antimalárica, constituindo-se na certidão negativa de usos tradicionais desta espécie, motivo pelo qual foi avaliada para determinação da atividade antimalárica.

De acordo com o observado na revisão de literatura sobre espécies da família Rubiaceae, existem várias espécies que mostraram uma moderada a elevada atividade antiplasmodial *in vitro*, e quando observados os valores de CI₅₀ frente a cepas resistentes para as espécies listadas na tabela 20, os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial antiplasmodial dos extratos de folhas e galhos de *W. schwackei*.

Tabela 20. Resultados da avaliação antimalárica de extratos de espécies de plantas pertencentes à família Rubiaceae frente a *P. falciparum*.

Espécie da família Rubiaceae	Cepa cloroquina- sensível	Cepa cloroquina resistente	Referência
	CI ₅₀ µg/mL		
<i>Keetia leucantha</i>	13,8	26,5	BEAUFAY et al., 2019 e BERO et al., 2009
<i>Nauclea pobeguinii</i>	44	32	MESIA et al., 2010
<i>Morinda pubescens</i>	62,7	80,63	RAVIKUMAR et al., 2012
<i>Vangueria infausta</i>	2	-	BAPELA et al., 2019

Estes resultados biológicos são concordantes com os resultados obtidos no estudo fitoquímico da espécie *W. schwackei*, que permitiram o isolamento de alcaloides indólicos a partir do extrato metanólico das folhas, entre estes o alcaloide tetraidroharmano, que segundo o relatado por Fiot e colaboradores (2006) apresentou atividade antiplasmodial *in vitro* frente a cepas cloroquina-resistente com um CI₅₀ de 8,56 µg/mL. Nesse mesmo estudo foram relatadas as atividades antiplasmodial de outros alcaloides com estrutura indólica como hamano e harmalano os quais mostraram atividade antiplasmodial com CI₅₀ de 3,29 e 22,43 µg/mL, respectivamente. Consequentemente, poderia-se inferir que um dos responsáveis da atividade antiplasmodial da espécie estudada seja a presença de alcaloides indólicos (SUN et al., 2008)

Por outro lado, os resultados observados com relação à citotoxicidade nos três ensaios realizados de membrana corioalantoica, citotoxicidade sobre macrófagos e de toxicidade sobre *A. salina*, mostraram que os extratos testados têm uma moderada atividade citotóxica dose-dependente, o que nos levaria a inferir que a atividade antimalárica dos extratos estudados não teria correlação direta com sua citotoxicidade.

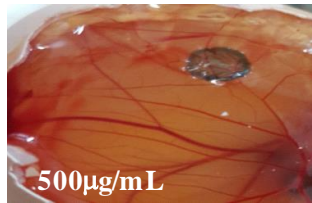
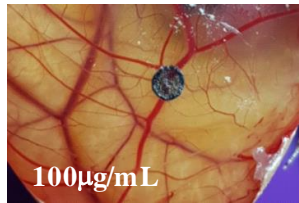
5.3.6 Atividade antiangiogênica

Os resultados obtidos a partir da avaliação dos extratos e da substância triptamina obtido do extrato metanólico das folhas de *W. schwackei* mostraram que os extratos metanólicos de galhos e folhas foram os mais ativos apresentando atividade antiangiogênica, reduzindo a formação de vasos em 80 e 60%, respectivamente, enquanto que os extratos hexânicos de galhos e folhas apresentaram uma redução na formação de vasos da membrana corioalantóica de 70 e 40% respectivamente. Todos esses resultados foram avaliados na concentração de 100 µg/mL. A triptamina, substância testada na concentração de 1 µg/mL mostrou uma redução de vasos de 60% aproximadamente. Esta substância é considerada uma importante droga neurotransmissora que apresenta um anel indol responsável pelas diversas atividades biológicas que são atribuídas a este alcaloide destacando as atividades de antimicrobiano, antioxidante, antifúngico (ANTOLINI et al., 1999; PALEY, 2011; KURUVA et al., 2013). De acordo com a literatura consultada, substâncias como alcaloides β carbolínicos (GONG et al., 2016) e flavonoides como as catequinas (KONDO et al., 2002) têm a capacidade de inibir a angiogênese, pelo que, possivelmente estas substâncias seriam as responsáveis pela atividade antiangiogênica observada ao avaliar os extratos de *W. schwackei*.

Foi possível observar que todos os extratos mostraram um efeito dose-dependente com uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$) (Figura 54 e Gráfico 3).

Figura 54. Imagens da avaliação da atividade antiangiogênica frente aos extratos e substância de *Warszewiczia schwackei*.

Avaliação da Atividade Antiangiogênica frente ao extrato hexânico das folhas de *Warszewiczia schwackei*



Tóxico

1000µg/mL

Avaliação da Atividade Antiangiogênica frente ao extrato hexânico dos galhos de *Warszewiczia schwackei*

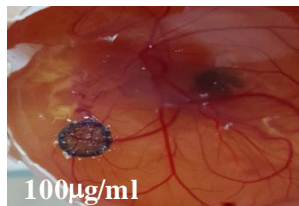


Tóxico

500µg/mL

1000µg/mL

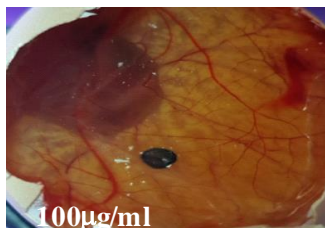
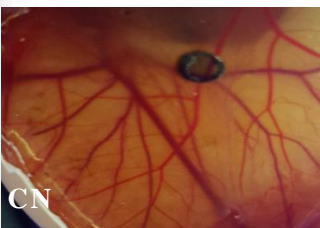
Avaliação da Atividade Antiangiogênica frente ao extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia schwackei*



Tóxico

1000µg/mL

Avaliação da Atividade Antiangiogênica frente ao extrato metanólico dos galhos de *Warszewiczia schwackei*

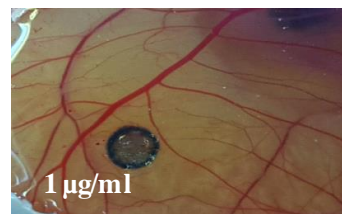


Tóxico

500µg/mL

1000µg/mL

Avaliação da Atividade Antiangiogênica frente à substância triptamina isolada de *Warszewiczia schwackei*

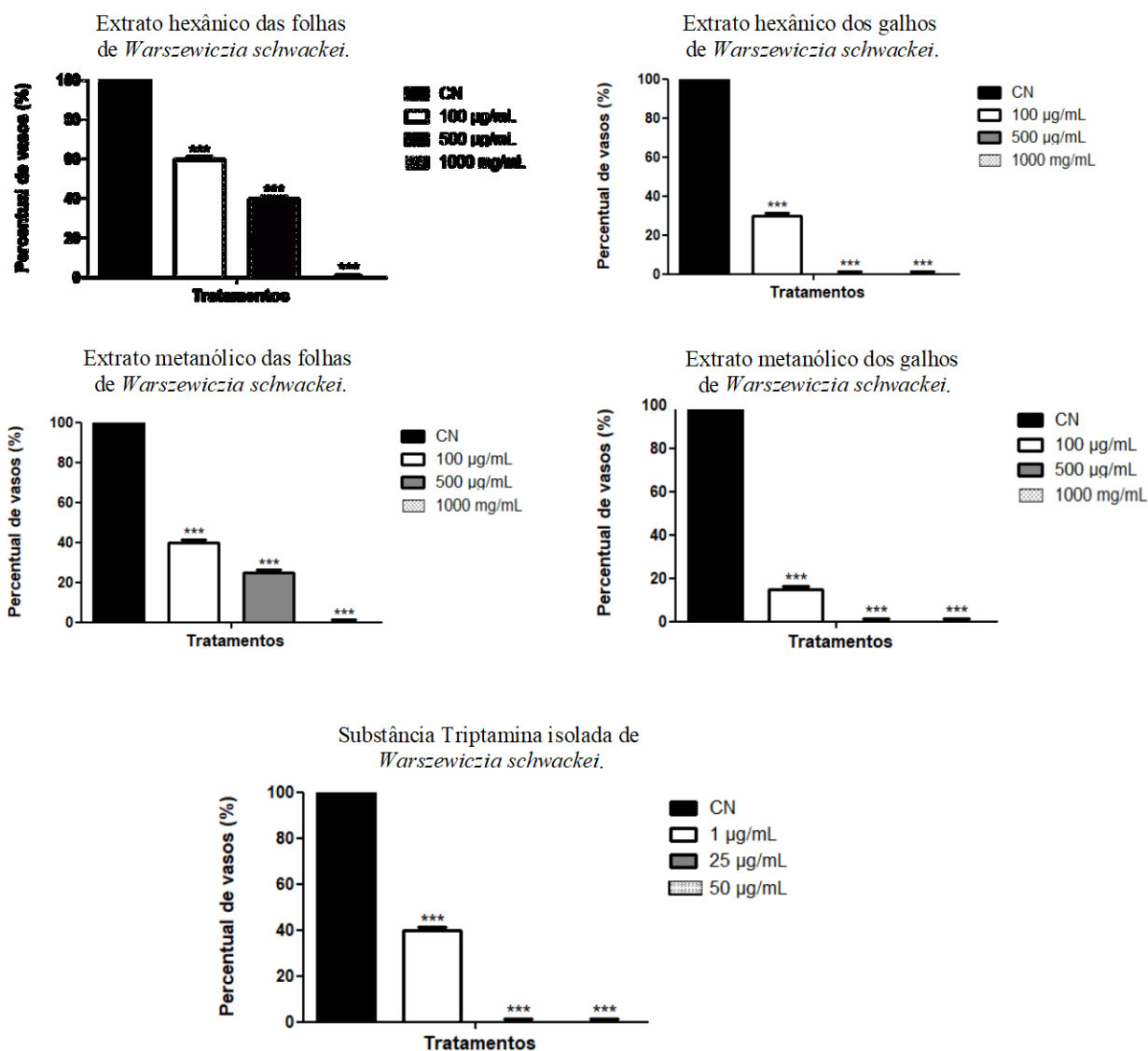


Tóxico

25µg/mL

50µg/mL

Gráfico 3. Porcentagem de inibição da angiogênese dos extratos e substância de *Warszewiczia schwackei*.



*Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Por outro lado, ao analisar os resultados foi possível observar que os extratos dos galhos (hexânicos e metanólicos) foram considerados tóxicos nas concentrações de 500 µg/mL e os extratos das folhas foram menos tóxicos, mostrando esse efeito somente na concentração de 1000 µg/mL. Estes resultados de toxicidade confirmam os outros resultados obtidos durante o presente estudo aonde os extratos dos galhos se mostraram os mais tóxicos, tanto frente a *A. salina* como sobre macrófagos.

Em geral, algumas das estratégias utilizadas para inibir a formação de novos vasos são induzir citotoxicidade sobre as células presentes durante os processos inflamatórios, como é o caso dos macrófagos, e observando os resultados obtidos de citotoxicidade sobre as mesmas, aonde a atividade citotóxica foi de 400 µg/mL enquanto que a atividade antiangiogênica dos extratos metanólicos dos galhos mostrou atividade na concentração de 100 µg/mL o que levaria a inferir que o potencial antiangiogênico dos extratos não estaria diretamente correlacionada com essa atividade e sim provavelmente com outros processos envolvidos na formação de novos vasos como a inibição de proangiogênicos que têm a capacidade de aumentar a infiltração de células hematopoiéticas formando assim novos vasos (citocinas, quimiocina) (CARMELIET, 2005).

5.3.7 Atividade de toxicidade frente à *Artemia salina*

Tabela 21. Resultados da avaliação de toxicidade dos extratos de *Warszewiczia schwackei* frente a *A. salina*.

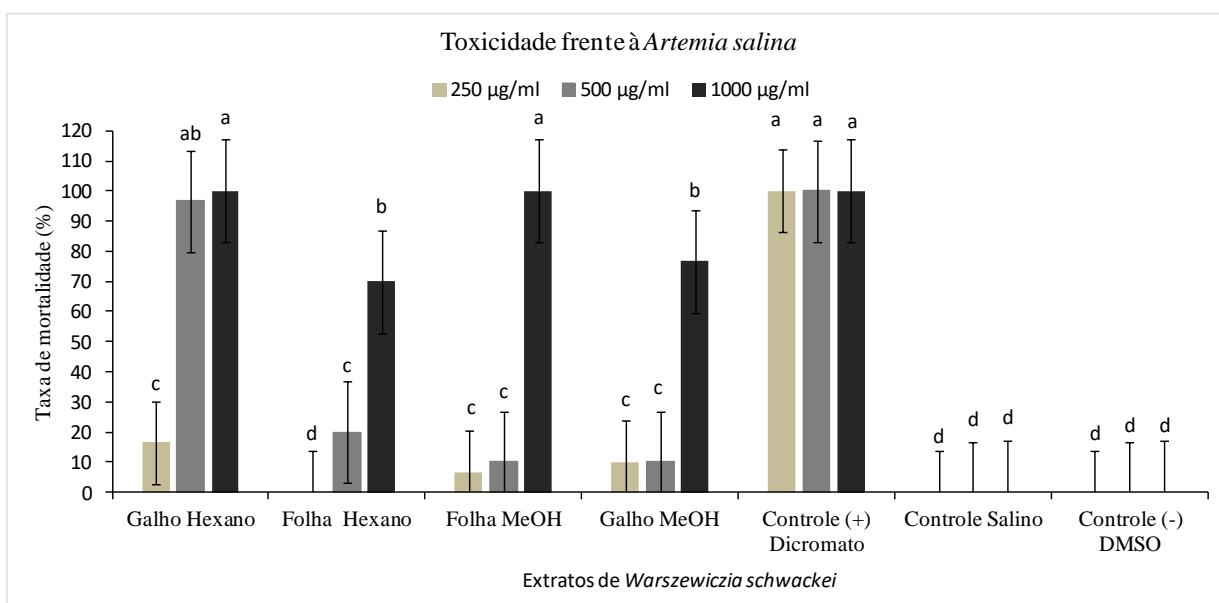
Extrato testado	Porcentagem de mortalidade		
	Concentração utilizada 1000 (µg/mL)	Concentração utilizada 500 (µg/mL)	Concentração utilizada 250 (µg/mL)
Folhas hexano	70	20	0
Galhos hexano	100	96	16
Folhas MeOH	100	10	6
Galho MeOH	76	10	10
Controle Salino	0	0	
Controle Negativo (DMSO)	0	0	0
Controle Positivo (Dicromato de potássio) 0,1%	100	100	100

Como observado na tabela acima, os quatro extratos testados mostraram uma porcentagem de mortalidade maior do que 50%, portanto foram considerados tóxicos frente à *A. salina*, na concentração de 1000 µg/mL. Foram testados em concentrações

menores observando-se que os extratos hexânicos dos galhos foram os que mostraram uma porcentagem maior de mortalidade de *A. salina* na concentração de 500 µg/mL.

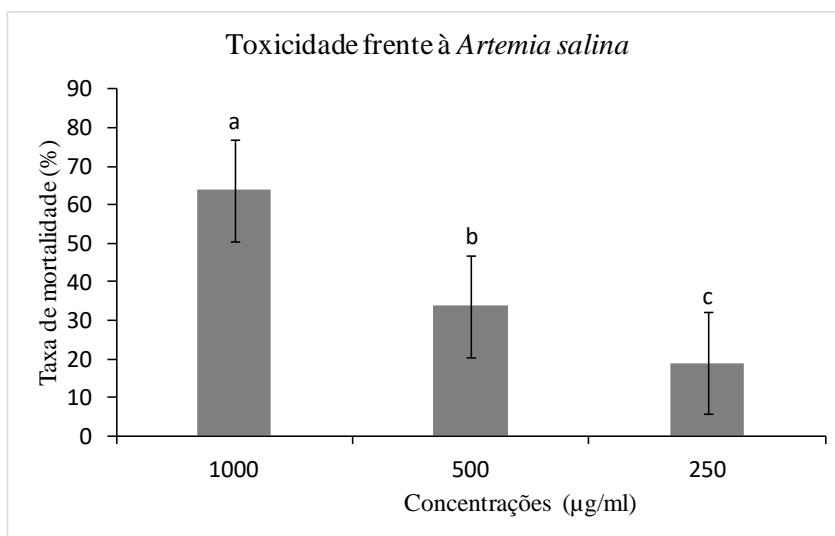
Ao analisar os resultados obtidos, estatisticamente pelo teste de Tukey foi possível observar que existe uma relação dose-dependência para atividade mostrada pelos extratos (Gráfico 4 e 5).

Gráfico 4. Taxa de mortalidade de náuplios de *A. salina* em função da interação de concentrações e extratos de folhas e galhos de *Warszewiczia schwackei*.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Gráfico 5. Taxa de mortalidade de náuplios de *A. salina* em função das concentrações de extratos testados de folhas e galhos de *Warszewiczia schwackei*.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

6 CONCLUSÕES

Considerando que os principais alcaloides isolados de espécies da família Rubiaceae, dentro da qual se encontra a espécie *Warszewiczia schwackei*, são alcaloides indólicos monoterpênicos, derivados da condensação de triptamina e secologanina, este estudo permitiu realizar um aporte quimiotaxonômico, pois foram isolados e identificados principalmente alcaloides triptamina, tetraidroharmano, 1-(2-aminofenil) etanol e oclifuanina, além do esteroide β -sitosterol, do terpenoide esqualeno e também do flavonoide catequina.

As avaliações do potencial dos extratos frente às diferentes atividades biológicas realizadas neste trabalho permitiram observar o potencial biológico da espécie em estudo, principalmente dos extratos metanólicos, como agentes antioxidantes, antimaláricos e antiangiogênicos, atividades que estariam diretamente relacionadas à presença de alcaloides indólicos e de flavonoides, ambas classes identificadas nesse estudo, ao mesmo tempo em que estas atividades não seriam correlacionadas a sua citotoxicidade, pois mostraram uma toxicidade dose-dependente para os ensaios frente a macrófagos e *A. salina*.

Os resultados obtidos mostraram o elevado potencial biológico da espécie *Warszewiczia schwackei* e incentivam a continuação do fracionamento para isolar outras substâncias e avaliá-las quanto aos ensaios nos quais os extratos foram ativos a fim de determinar se são as responsáveis pela atividade biológica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAH, J.; AMOS, S.; CHINDO, B.; NGAZAL, I.; VONGTAU, H. O.; ADZU, B.; GAMANIEL, K. S. Pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy: Effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127, p. 85–90, 2010.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunology Methods**. v.170, p. 211–224, 1994.
- AKITA, M. Development of in vitro method for assaying anti-angiogenic effect of drugs. **in: anti-angiogenesis drug discovery and development**. v. 2, Cap. II, p. 63-111, 2014.
- ALVES SANTANA, C.; RODRIGUES DE ALBUQUERQUE, F.R.; FERNANDES DA SILVA, B.A.; MENDES DE LACERDA, G.; RODRIGUES, L.B.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, J.R., VALE, M.L., MELO COUTINHO, H.D., ALENCAR DE MENEZES, I.R. Evaluation of the antioxidant and gastroprotective activity and HPLC analysis of the hydroalcoholic extract of *Tocoyena formosa* leaves (Cham. & Schlecht) K. Schum, **Food and Chemical Toxicology** . 2018.
- AMARAL, S.; MIRA, L.; NOGUEIRA, J. M. F.; PEREIRA, A.; FLORÊNCIO, M. H. Plant extracts with anti-inflammatory properties — A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure – antioxidant activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 1876–1883, 2009.
- ANDRADE-NETO, F. V.; POHLIT, M. A.; PINTO, A. C. S; SILVA, E. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W.

- D.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R.. *In vitro* of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memorias instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, n. 3, p. 559-565, 2007.
- ANTOLINI, M.; BOZZOLI, A.; GHIRON, C.; KENNEDY, G.; ROSSI, T. Analogues of 4, 5-bis (3, 5-dichlorophenyl)-2-trifluoromethyl-1imidazole as potential antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p. 023-1028, 1999.
- ARAGÃO, P. C. A.; TOLEDO, J. B., MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Química nova*, v. 13, n. 4, p.254-259, 1990.
- ARO, A. O.; DZOYEM, J. P.; HLOKWE, T. M.; MADOROBA, E.; ELOFF, J. N.; MCGAW, L. J. Some south african rubiaceae tree leaf extracts have antimycobacterial activity against pathogenic and non-pathogenic *Mycobacterium* species. **Phytotherapy Research**, v.29, n.7, p. 1004-1010, 2015.
- BAPELA, M. J.; HEYMAN, H.; SENEJOUX, F.; MARION MEYER, J. J. ¹H NMR-based metabolomics of antimalarial plant species traditionally used by Vha-Venda people in Limpopo Province, South Africa and isolation of antiplasmodial compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 228, p. 148–155, 2019.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.
- BEAUFAY, C.; HENRY, G.; STREEL, C.; BONY, E.; HÉRENT, M-F.; BERO, J.; QUETIN-LECLERCQ, J. Optimization and validation of extraction and quantification methods of antimalarial triterpenic esters in *Keetia leucantha* plant and plasma. **Journal of Chromatography B**. v. 1104, n. november2018, p. 109-118, 2019.

- BEHAR, S.; DIVANGAHI, M. E. REMOLD, H. Evation of inate immunity by *Mycobacterim tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 668-674, 2010.
- BERO, J.; GANFON, H.; JONVILLE, M., FRÉDÉRICH, M.; GBAGUIDI, F.; DEMOL, P.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vitro antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, p. 439–444, 2009.
- BERTELLIA, P. R.; BIEGELMEYERA, R.; RICOB, E. P.; KLEIN-JUNIORA, L. C.; NATALLY, S. B.; HENRIQUESA, A. T. Toxicological profile and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Palicourea deflexa*, a source of β -carboline alkaloids. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 201, p. 44–50, 2017.
- BFG (THE BRAZIL FLORA GROUP), Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil, **Rodriguésia [online]**, v.66, n.4, p. 1085-1113, 2015.
- BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 96 p. 4–26, 2009.
- BUSSMANN, R. W.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; TOWNESMITH, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacolog**. v. 137, n. 1, p. 121–140, 2011.
- CALDERON, A.; SIMITHY, J.; QUAGGO, G.; ESPINOSA, A.; LOPEZ-PEREZ, J. L.; GUPTA, M. P. Triterpenes from *Warszewiczia coccínea* (Rubiaceae) as inhibitors of acetylcholinesterase. **Natural Products Communication**. v. 4, n. 10, p. 1323-1326, 2009.
- CAMERO, C. M.; GERMANÒ, M. P.; RAPISARDA, A.; D'ANGELO, V.; AMIRA, S.; BENCHIKH, F.; BRACA, A.; DE LEO, M. Anti-angiogenic activity of iridoids

- from *Galium tunetanum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 28, n. 3, p. 374–377, 2018
- CANDEIAS, M. F.; ABREU, P.; PEREIRA, A.; CRUZ-MORAIS, J. Effects of strictosamide on mouse brain and kidney Na⁺, K⁺ -ATPase and Mg²⁺ -ATPase activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 121, p. 117–122. 2009.
- CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 2-5, 2002.
- CARDOSO, M. L.; SILVA, R. C.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**. v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**. v. 438, 2005.
- CHAIPUKDEE, N.; KANOKMEDHAKUL, K.; KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROMA, R.; PYNE, S. G. Two new bioactive iridoids from *Rothmannia wittii*. **Fitoterapia**. v. 113, n.1, p. 97-101, 2016.
- CHANDEL, M; SHARMA, U.; KUMAR, N.; SINGH, B; KAUR, S., Antioxidant activity and identification of bioactive compounds from leaves of *Anthocephalus cadamba* by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 5, n. 12, p. 977-985, 2012.
- CHANDRASHEKAR, B. S.; PRABHAKARA, S.; MOHAN, D.; SHABEER, BASAVARAJ BHANDARE, M NALINI, PS.; SHARMILA, DL.; MEGHANA, BASANTH KUMAR REDDY, HM HANUMANATHA RAO, H SAHAJANANDA, ANBAZHAGAN, K. Characterization of *Rubia cordifolia* L. root extract and its

- evaluation of cardioprotective effect in Wistar rat model. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 50, n. 1, p.12–21, 2018.
- CHATTERJEE, S.K.; BHATTACHARJEE, I.; CHANDRA, G., Isolation and identification of bioactive antibacterial components in leaf extracts of *Vangueria spinosa* (Rubiaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 4, n.1, p. 35-40, 2011.
- CHENG. W., WEN-DONG, X.; XIAO-NA, F.; JIAN-GONG, S. Flavonoids from root of *Machilus wangchiana*. **China Journal of Chinese Materia Medica**. v. 39, n. 19, p. 3794-3797, 2014
- CHEN, J. Y.; WU, H.; LI, H.; HU, S. L.; DAÍ, M. M.; CHEN, J. Anti-inflammatory effects and pharmacokinetics study of geniposide on rats with adjuvant arthritis. **International Immunopharmacology**. v.24, n.1, p.102–109, 2015.
- CHEN, Y.; CHEN, P. D.; BAO, B. H.; SHAN, M. Q.; ZHANG, K. C.; CHENG, F. F.; CAO, Y. D.; ZHANG, L.; DING, A. W. Anti-thrombotic and pro-angiogenic effects of *Rubia cordifolia* extract in zebrafish. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 12, n. 219, p. 152-160, 2018.
- CIMANGA, R. K.; MUKENYI, P. N. K.; KAMBU, O. K.; TONA, G. L.; APERS, S.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A. J. The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 215–220, 2010.
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão. Approved Standard. CLSI, v. 23, n. 1, 2015.
- COMINIA, L.R.; FERNANDEZ, I.M.; RUMIE VITTAR, N.B.; NÚÑEZ MONTOYA, S.C., CABRERA, J. L.; RIVAROL, V. A. Photodynamic activity of anthraquinones

- isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f . (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1093–1095, 2011.
- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, p.183-205, 2001.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.
- COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: **Biology and disease**. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610-624, 2016.
- CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA JUNIOR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazônica**, v. 3, n. 1, p. 181-186, 2009.
- CRUZ, F. S.; PACHECO DE ARAÚJO, M. G.; NUNEZ, C. V. Leaves of *Duroia longiflora*: Isolation of a Biflavanoid and Histochemical Analysis. **Natural Product Communications**, v. 14, p. 1934578X1984977, 2019
- DAI, J.; DAN, W.; REN, S.; SHANG, C.; WANG, J. Design, synthesis and biological evaluations of quaternization harman analogues as potential agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 160, p. 23-36, 2018.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.
- DE LA CRUZ-SÁNCHEZ, N.G.; GÓMEZ-RIVERA, A.; ALVAREZ-FITZ, P.; VENTURA-ZAPATA E.; PÉREZ-GARCÍA, M. D.; AVILÉS-FLORES, M., GUTIÉRREZ-ROMÁN, A. S.; GONZÁLEZ-CORTAZAR M. Antibacterial activity of *Morinda citrifolia* Linneo seeds against Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 347–353, 2019.

- DEEPTI, K.; UMADEVI, P.; VIJAYALAKSHMI, G.; VINOD, B. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Morinda tinctoria* Roxb . Leaf Extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, n. 3, p. S1440-S1442, 2012
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- DOMINGUES, A.; SARTORI, A.; ASSIS, M.; MARIA, L.; VALENTE, M.; CAMARGO, L.; MARLENE, R. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 635–642, 2011.
- DUONG, N. T.; VINH, P. D.; THUONG, P. T.; HOAI, N. T.; THANH, L.N.; BACH, T. T.; NAM, N. H., ANH, N. H. Xanthine oxidase inhibitors from *Archidendron clypearia* (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants. **Asian pacific journal of tropical medicine**. v. 10, n. 6, p. 549–556, 2017.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, p.25, 2016.
- ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; TANGO PISANGO, M.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 254-259, 2007.
- FABRI, R. L.; DE OLIVEIRA ARAGÃO, D. M.; FLORÊNCIO, J. R.; CARDOSO, G. M. M.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CASTANON, M. C. M. N.; SCIO, E. *In vivo* laxative and toxicological evaluation and *in vitro* antitumour effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts . **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 439–448, 2011.

- FABRI, R. L.; GRAZUL, R. M.; DE CARVALHO, L. O.; COIMBRA, E. S.; CARDOSO, G. M. M.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M.; DA SILVA, A. D.; SCIO, E. Antitumor, antibiotic and antileishmanial properties of the pyranonaphthoquinone psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 84, n. 4, p. 1081–1089, 2012.
- FARIAS, F. M., PASSOS, C. S., ARBO, M. D., ZUANAZZI, J. A. S., STEFFEN, V. M., & HENRIQUES, A. T. Monoamine levels in rat striatum after acute intraperitoneal injection of strictosidinic acid isolated from *Psychotria myriantha* Mull . Arg . (Rubiaceae). **Phytomedicine**, v. 17, n. 3–4, p. 289–291, 2010.
- FARIAS, F.M. *Psychotria myriantha* Mull Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqüiotáxica e sobre o sistema nervoso central. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
- FIOT, J.; SANON, S.; AZAS, N.; MAHIOUA, V.; OLIVIA, J.; LUC A.; GUY, B.; OLLIVIER, E. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p.173–178, 2006.
- FLORA DO BRASIL. Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 16 Ago. 2017.
- FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAM, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, B. K.; FERGUSON, R. M. Rapid low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362-366, 1998.

- FREITAS, P. C. M.; PUCCI, L. L.; VIEIRA, M. S.; LINO, R. S.; OLIVEIRA, C. M. A.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Diuretic activity and acute oral toxicity of *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 501–503, 2011.
- GACCHE, R. N.; DHOLE, N. A. Profile of aldose reductase inhibition, anti-cataract and free radical scavenging activity of selected medicinal plants: An attempt to standardize the botanicals for amelioration of diabetes complications. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 8, p. 1806–1813, 2011.
- GANBOLD, M.; BARKER, J.; MA, R.; JONES, L.; CAREW, M. Cytotoxicity and bioavailability studies on a decoction of *Oldenlandia diffusa* and its fractions separated by HPLC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 396–403, 2010.
- GARTIKA, M.; PRAMESTI, H. T.; KURNIA, D.; SATARI, M. H. A terpenoid isolated from sarang semut (*Myrmecodia pendans*) bulb and its potential for the inhibition and eradication of *Streptococcus mutans* biofilm. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018
- GHOSH, R.; DAS, M. C.; SARKAR, A.; DAS, A.; SANDHU, P.; DINDA, B.; AKHTER, Y.; BHATTACHARJEE, S.; DE, U. C. Exploration of phytoconstituents from *Mussaenda roxburghii* and studies of their antibiofilm effect. **Chemistry and Biodiversity**. v. 14, n. 10, 2017
- GONG, G.; LIN, Q.; J. XU, F. YE, L. JIANG, W. LIU, M.F. HE, F. FENG, W. QU, XIE, N. *In vivo* SAR e STR analyses of alkaloids from *Picrasma quassioides* identify 1-hydroxymethyl-8-hydroxy- β -carboline as a novel natural angiogenesis inhibitor. **RSC Advances**, v.1231, n. 6, p. 9484–9494, 2016.

- GONZÁLEZ, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 24, p. 59-61, 2007.
- HANH, N. P.; PHAN, N. H.; THUAN, N. T.; HANH, T. T.; VIEN, L. E. T.; THAO, N. P.; THANH, N. V.; CUONG, N. X.; BINH, N. Q.; NAM, N. H.; KIEM, P. V.; KIM, Y. H.; MINH, C. V. Two new simple iridoids from the ant-plant *Myrmecodia tuberosa* and their antimicrobial effects. **Natural Product Research**. v. 30, n. 18, p. 2071-2076, 2016
- ISMAIL, YAZAN.; WEDYAN, M.; AL-ZU'ABE, M.; ABDERRAHMAN, S. Antimicrobial activity of *Rubia cordifolia*: Methods to determine antimicrobial activity. **Research Journal of Medicinal Plants**. v. 10, n. 8, p. 457-462, 2016.
- IWU, M. M.; DUNCAN, A. R.; OKUNJI, C. O. New antimicrobials of plant origin. **Perspectives on new crops and new uses**, p. 457-462, 1999.
- JAYA KUMAR, D.; JAYA SANTHI, R. Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of *Morinda pubescens* leaves in human liver cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 5, n. 5, p. 362–366, 2012.
- JEONG, G-S.; LEE, D-S.; KIM, D-C.; JAHNG, Y.; SON, J-K.; LEE, S-H.; KIM, Y-C. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of mollugin via up-regulation of 97 heme oxygenase-1 in mouse hippocampal and microglial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, p. 226–234, 2011.
- JOSHI, MC. Cytotoxic drug: Towards safer chemotherapy practices. **Indian Journal of Cancer**, v. 44, n. 1, p. 31-35, 2007.
- JOUBOUHI, C.; TAMOKOU, J. D.; NGNOKAM, D.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; KUIATE, J. R. Iridoids from *Canthium subcordatum* iso-

butanol fraction with potent biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

KAINULAINEN, K.; PERSSON, C.; ERIKSSON, T.; BREMER, B. Molecular systematics and morphological character evolution of the Condamineae (Rubiaceae). **American Journal of Botany**. v. 97, n. 12, p. 1961-1981, 2010.

KAISER, S.; RAMOS CARVALHO, A.; PITTOL, V.; DIETRICH, F.; MANICA, F.; MACHADO, M.; SOUZA DE OLIVEIRA, L.F.; OLIVEIRA BATTASTINI, A.N.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Genotoxicity and cytotoxicity of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* (cat's claw): Chemotype relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, v.189, n.1, p.90-98, 2016.

KITAGAWA, I.; WEI, H.; NAGAO, S. MAHMUD, T.; HORI, K.; KOBAYASHI, M.; UJI, T.; SHIBUYA, H. Characterization of 3'-*O*-Caffeoylsweroside, a New Secoiridoid Glucoside, and Kelampayoside A and B Two New Phenolic Apioglucosides from the Bark of *Antrocephalus chinensis* (Rubiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 6, p. 1162-1167, 1996.

KONDO, T.; TOSHIRO, O.; KOICHI, IGURA.; YUKIHIKO, H.; KAJI K. TEA catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. *Cancer Letters*. v. 180, p. 139-144, 2002.

KONGYEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; SAWANGJAROEN, N.; SONGSING, P.; MADARDAM, H. Anthraquinone and naphthoquinone derivatives from the roots of *Coptosapelta flavescens*. **Natural Product Communications**. v. 9, n. 2, p. 219-220, 2014

- KORGE, P.; PING, P.; WEISS, J. N. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation: modulation by nitric oxide. **Circulation Research**, p. 873–880, 2008.
- KOUAM, S.F.; NGOUONPE, A. W.; BULLACH, A.; LAMSHÖFT, M.; KUIGOUA, G. M.; SPITELLER, M. Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium multiflorum* (Rubiaceae). **Fitoterapia**, v.91, n. 1 p.199-204, 2013.
- KOUMAGLO, K.; GBEASSOR, M.; NIKABU, O.; SOUZA, C.; WERNER, W. Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*. **Planta Médica**, v. 58, n. 1992 p.533-534, 1991.
- KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**. v. 387, n. 1-3, p. 166-174, 2007. 98
- KOVENDAN, K.; SHANTHAKUMAR, S. P.; PRASEEJA, C.; KUMAR, P. M.; KADARKARAI M.; VINCENT, S. Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**.; v. 4, n. 1, p. 173-180, 2014.
- KURUVA, C. S.; KATLA, V. R.; KADIAM, C. V. S.; VALLURU, L.; WUDAYAGIRI, R. Synthesis and antioxidant activity of novel phosphorylated tryptamine derivatives: QSAR DESCRIPTORS. **Indo American Journal of Pharm Research**. v. 3, p. 1416-1426,2013.
- LAGARTO, A. P.; SILVA, R. Y.; GUERRA, I. S.; IGLESIAS, L. B. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀)

- value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- LARSSON, S. The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2903-2907, 2007.
- LI, M.; JIANG, R.; HON, P.; CHENG, L.; LI, L.; ZHOU, J.; SHAW, P.; BUT, P. P. Authentication of the anti-tumor herb *Baihuasheshicao* with bioactive marker compounds and molecular sequences. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1239–1245, 2010.
- LIN, L.; CHENG, K.; XIE, Z.; CHEN, C.; CHEN, L.; HUANG, Y.; LIANG, Z. Purification and characterization a polysaccharide from *Hedyotis diffusa* and its apoptosis inducing activity toward human lung cancer cell line A549. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 122, p. 64–71, 2019.
- LIANG, Z.; HE, M.; FONG, W.; JIANG, Z.; ZHAO, Z. A comparable, chemical and pharmacological analysis of the traditional Chinese medicinal herbs *Oldenlandia diffusa* and *O. corymbosa* and a new valuation of their biological potential. **Phytomedicine**. v. 15, n. 4, p. 259-267, 2008
- LIU, L.; SONG, C.; KHAN, A.; LI, X.; YANG, X.; CHENG, G.; LIU, Y.; LUO, X., A potent antibacterial indole alkaloid from *Psychotria pilifera*, **Journal of Asian Natural Products Research**, v.18, n. 8 p.798-803, 2016.
- LOBO, L. T.; FERREIRA CASTRO, K. C.; ARRUDA, M. S. P.; DA SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, G. M.S.P.; SANTOS, A. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Química Nova**. v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.
- LÓPEZ, C. C.; MAZZARRINO, G.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Assessment of antioxidant and

- antibacterial potential of borojo fruit (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas) from the rainforests of South America. **Industrial Crops and Products**. v. 63, p. 79-86, 2015.
- LORENCE, D. H.; TAYLOR, C. M. Descripción de la familia Rubiaceae. **Flora Mesoamericana**, v. 4, n. 2, p. 1-563, 2012
- LUO, Y.; LI, G.; LI, G.; YAN, J.; YI, J.; ZHANG, G. discovery and identification of 2-phenylethyl 2,6-dihydroxybenzoate as a natural lipid-lowering lead. **Planta Medica**, v. 77, n. 18, p. 2047–2049, 2011.
- LUO, Y.; SHEN, H-Y.; SHEN, Q-X.; CAO, Z-H.; ZHANG, M.; LONG, S-Y.; WANG, Z-B.; TAN, J-W. A new anthraquinone and a new naphthoquinone from the whole plant of *Spermacoce latifolia*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 19, n. 9, p. 869-876, 2017
- MANNAM, S. e SEKAR, G. An enantiopure galactose oxidase model: synthesis of chiral amino alcohols through oxidative kinetic resolution catalyzed by a chiral coppercomplex. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 20, p. 497-502, 2009. 99
- MANOSROI, J.; MOSES, Z. Z.; MANOSROI, W.; MANOSROI, A. Hypoglycemic activity of Thai medicinal plants selected from the Thai / Lanna Medicinal Recipe Database MANOSROI II. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 92–98, 2011.
- MANSUROGLU, B.; DERMAN, S.; YABA, A.; KIZILBEY, K. Protective effect of chemically modified SOD on lipid peroxidation and antioxidant status in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p.79-87, 2014.
- MARTINS, D. **Estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**. Amazonas, Manaus, 2014. Tese de Doutorado, Universidade Federal

do Amazonas/Programa De Pós-Graduação Multi-Institucional Em Biotecnologia – Ppgbiotec.

MARTINS, D.; CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; SALOMÉ, K. S.; DA SILVA, P. E. A.; BARISON, A.; NUNEZ, C. V. Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae), **BioMed Research International**, v. 2013.

MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; ALMEIDA DE OLIVEIRA, T.; LIMA, K. C.; CAVALCANTI, R. M.; TELES, B. R.; NUNEZ, C. V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 6, p. 158-171, 2014.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**. v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015.

MAYORGA, P., PEREZ, K. R., CRUZ, S. M., CACERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.

McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. The uses of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

MESIA, K.; CIMANGA, R. K.; DHOOGHE, L.; COS, P., APERS, S.; TOTTE, J.; MAES, L. Antimalarial activity and toxicity evaluation of a quantified *Nauclea pobeguinii* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 10–16, 2010.

MESQUITA, D. W. DE O.; MESQUITA, A. S. S.; CURSINO, L. M. DE C.; SOUZA, E. S.; OLIVEIRA, A. C.; PINHEIRO, C. C. DE S.; NOVAES, J. A. P.; OLIVEIRA, J. A. A.; NUNEZ, C. V. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 604-613, 2015.

- MESQUITA, D. W.; MESQUITA, A. S. S.; CURSINO, L. M. C.; SOUZA, E. S.; OLIVEIRA, A. C.; NOVAES, J. A. P.; PINHEIRO, C. C. S.; OLIVEIRA, J. A. A.; NUNEZ, C.V. **Biological Activities of some Amazonian Rubiaceae plant species.** Revista brasileira de plantas medicinais (no prelo).
- MILLER, L. H.; ACKERMAN, H. C.; SU, X-Z.; WELLEMS, T. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine.** v. 19, n. 2, p. 157-167, 2013.
- MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, M. K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v.415, n. 6872 p.673-679, 2002.
- MOHAMMED, M. J.; SEAFORTH, C. E. Extractives of *Warszewiczia coccinea* Klotzch. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 12, p. 72-73, 1981.
- MAHOMOODALLY, M. F. e DILMOHAMED, S. Antibacterial and antibiotic potentiating activity of *Vangueria madagascariensis* leaves and ripe fruit pericarp against human pathogenic clinical bacterial isolates. **Journal of Traditional and Complementary Medicine.** v. 6, p. 399-403, 2016.
- MOREIRA, V. F.; VIEIRA, I. J.C.; BRAZ-FILHO, R. Chemistry and Biological Activity of Condamineae Tribe: A Chemotaxonomic Contribution of Rubiaceae Family. **American Journal of Plant Science.** v. 6, n. 16, p. 2612-2631, 2015.
- MORENO, B. P.; FIORUCCI, L. L. R.; BARROTO DO CARMO, M. R.; SARRAGIOTTO, M. H.; BALDOQUI, D. C. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 80-82, 2014.
- MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; BOEIRA, J. M.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J. Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. **Mutagenesis.** v. 22, n. 4, p. 293-302, 2007

- MOUSA, S. A. e DAVIS, P. J. angiogenesis and anti-angiogenesis strategies in cancer
in: Anti-angiogenesis strategies. In Cancer Therapeutics. Cap I, p. 1-19, 2017
- MPOFU, S.; TANTOH NDINTEH, D.; VAN VUUREN, S. F.; OLIVIER, D. K.;
 KRAUSE, R. W. M. Interactive efficacies of *Elephantorrhiza elephantina* and
Pentanisia prunelloides extracts and isolated compounds against gastrointestinal
 bacteria. **South African Journal of Botany**. v. 94, p. 224–230, 2014.
- NARAYAN, D.; UMA, K.; AMINUL, I.; PALLAB, K. H. Inhibitory effects of
Anthocephalus cadamba stem bark fractions intercede anti-inflammatory and
 carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Oriental Pharmacy and
 Experimental Medicine**, v.15, n.1, p.123-134, 2015. 101
- NARESSI, M. A.; MANHOLER, D.D.; AMES, F. Q.; BERSANI-AMADO, C. A.;
 FORMAGIO, A. S. N.; PEREIRA, Z.V.; COSTA, W. F.; BALDOQUIA, D. C.;
 SARRAGIOTTO, M. H. Chemical Constituents, Anti-Inflammatory, And Free-
 Radical Scavenging Activities Of *Guettarda viburnoides* Cham. & Schlttdl.
 (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 932-936, 2015.
- NGNOKAM, D.; AYAFOR, J. F.; CONNOLLY, J. D.; NUZILLARD, J. M.
 Nauclefolinine: A new alkaloid from the roots of *Nauclea Latifolia*. **Bulletin of
 the Chemical Society of Ethiopia**, v. 17, n. 2, p. 173-176, 2003.
- NGUYEN, T. D.; PHAM, D. V.; PHUONG, T. T.; NGUYEN, T. H.; LE, N. T.; TRAN, T.
 BA.; NGUYEN, H. N.; NGUYEN, H. A. Xanthine oxidase inhibitors from
Archidendron clypearia (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of
 Vietnamese medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10,
 n. 6, p. 549–556, 2017.
- NGO BUM, E., TAIWE, G. S., MOTO, F. C. O., NGOUPAYE, G. T., NKANTCHOUA,
 G. C. N., PELANKEN, M. M., RAKOTONIRINA, A. Anticonvulsant, anxiolytic,

- and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice. **Epilepsy and Behavior**, n. 15, v. 4, p. 434–440, 2009.
- NGUTA, J. M.; APPIAH-OPONG, R, NYARKO, A. K.; YEBOAH-MANU, D.; ADDO, P. G. A., Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products, **International Journal of Micobacteriology**, v. 4, n. 3, p. 165-183, 2015.
- NGWOKE, K. G.; ORAME, N.; LIU, S.; OKOYE, F. B. C.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. A new benzophenone glycoside from the leaves of *Mitracarpus villosus*. **Natural Product Research**. v. 31, n. 20, p. 2354-2360, 2017
- NUDO, L. P.; CATAP, E. S. Immunostimulatory effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 613–620, 2011.
- NUNEZ, C. V.; SANTOS, P. A.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; MESQUITA, A. S. S.; BAILLEUL, F. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Medica**, v. 75, p. 1037-1037, 2009.
- NUNEZ, C.V.; MARTINS, D.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A. **Uso de composto, método ex-vivo, processo e extrato purificado**. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140308636, data de depósito: 09/12/2014, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- NUNEZ, C.V.; VASCONCELOS, M. C. **Novo alcaloide antitumoral de duroia macrophylla**. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: 102PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

- NUNEZ, CV; ROUMY, V.; MESQUITA, D. W. O.; MESQUITA, A.S. S.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; HENNEBELLE, T. Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Medica** (Internet), v. 78, p. PI287, 2012.
- NEWMAN, D. J. e CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v. 79, n. 3, p. 629- 661, 2016.
- OGUNWANDE, I. A.; WALKER, T. M.; BANSAL, A.; SETZER, W. N.; ESSIEN, E. E. Essential oil constituents and biological activities of *Peristrophe bicalyculata* and *Borreria verticillata*. **Natural Product Communications**. v. 5, n. 11, p. 1815–1818, 2010.
- OMS. Organização Mundial da Saude. **World Malaria Report**. Nações Unidas. 2017.
- ONU. Assembleia Geral das Nações Unidas. **Informe mundial sobre la tuberculosis**. Nações Unidas. 2017.
- ONYESOM, I.; OSIOMA, E.; OKEREKE, P. C. *Nauclea latifolia* aqueous leaf extract eliminates hepatic and cerebral *Plasmodium berghei* parasite in experimental mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 5, n. 7, p. 546–551, 2015.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resarzurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PANDEY, A.; NEGI, P. S. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Neolamarckia cadamba*: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.181, n.1, p.118-135, 2016.
- PANYO, J.; MATSUNAMI, K.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla*

against some oral pathogens. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, n,9 p. 1522-1527, 2016

PETERSON TE, KIRKPATRICK ND, HUANG Y, FARRAR CT, MARIJT KA, KLOEPPER J, DATTA M, AMOOZGAR Z, SEANO G, JUNG K, KAMOUN WS, VARDAM T, SNUDERL M, GOVEIA J, CHATTERJEE S, BATISTA A, MUZIKANSKY A, LEOW CC, XU L, BATCHELOR TT, DUDA DG, FUKUMURA D, JAIN RK. Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 4470–4475, 2016.

PHILLIPS, M. A.; BURROWS, J. N.; MANYANDO, C.; ROB HOOFT VAN H.; VAN VOORHIS, W. C.; WELLS, T. N. C. Malaria. **Nature Reviews, Disease Primers**, v.3, n.17050, p. 1-24, 2017.

PILARSKI, R.; FILIP, B.; WIETRZYK, J.; KURA, M.; GULEWICZ, K. (2010). Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1133–1139, 2010.

PUDHOM, K.; NUANYAI, T.; MATSUBARA, K.; VILAIVAN, T. Antiangiogenic activity of 3,4-seco-cycloartane triterpenes from Thai *Gardenia* spp. and their semi-synthetic analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, n. 1, p. 512–517, 2012.

RADICE, M; BRAVO, L.; PÉREZ, M.; JOFFRE, C.; TAPUY, A.; RIOFRÍO, A.; NEILL, D.; CHIURATO, M. Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante. **Revista Amazónica Ciencia y Tecnología**, v.6, n.1, p. 55-64, 2017.

- RAGASA, C. Y.; TAN, M. C.; FORTIN, D. R.; SHEN, C-C. Chemical constituents of *Ixora philippinensis* Merr. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 9, p.62-67, 2015.
- RAM, S. Chemotaxonomy: A tool for plant classification. **Journal of Medicinal Plants Studies**. v. 4, n. 2, p. 90-93, 2016
- RAMAWAT, K. G. The Chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In: RAMAWAT, K. G. **Herbal Drugs: ethnomedicine to modern medicine**. Edit. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Cap. 2, p. 402, 2009.
- RAVI, V. J.; CHARI, T. Cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs. **Accounts of Chemical Research**. v. 41, n. 1, p. 98-107, 2008.
- RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S. J.; SUGANTHI, P. In vitro antiplasmodial activity of ethanolic extracts of South Indian medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease journal**. p. 180-183, 2012
- RAZAFINTSALAMA, V. E.; RALAMBONIRINA RASOARIVELO, S.T.; RANDRIAMIALINORO, F.; RANARIVELO, L.; RAKOTONANDRASANA, S.R.; PETIT, T.; SARTER, S. Antibacterial activities of fourteen medicinal plants from the endemic plant diversity of Madagascar. **South African Journal of Botany**, v.112, n.1 , p. 303-307, 2017.
- REIS, A. J.; LUCAS CARRION, L.; RODRIGUES, K.; MONTELLI FENALTI, J.; MATA-SANTOS, T.; SCAINI, C. J.; MARTINS, D.; DE OLIVEIRA MESQUITA, D. W.; SPIROTT STEIN MESQUITA, A.; NUNEZ, C. V.; ALMEIDA DA SILVA, P. E.; FERNANDES RAMOS, D. Avaliação das atividades antifúngica, antimicobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. **Revista De Epidemiologia E Controle De Infecção**, v. 1, p. 1-16, 2016.

- REZA, V. R. M. e ABBAS, H. Cytotoxicity and antimicrobial activity of harman alkaloids. **Journal of Pharmacology and Toxicology**. v. 2, p. 677-680, 2007.
- ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; POUPAT, C. POTIER, P. Aspidosperma de guyane: Alcaloides de aspidosperma *Marcgravianum*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 694-707, 1983.
- RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSINO, L. M. DE C.; JEFFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSORIO, M. I. C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antifungal activity of Brazilian Amazon plants extracts against some species of *Candida* spp. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 5, p. 445-453, 2014.
- RONDÓN, M.; MONCAYO, S.; CORNEJO, X.; SANTOS, J.; VILLALTA, D.; SIGUENCIA, R.; DUCHE, J. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. **Journal of King Saud University – Science**. v. 30, p. 500–505, 2018.
- RUBIACEAE. In: Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB24621>>. Acesso em: 12 Fev. 2018
- SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Perspective studies on novel anticancer drugs from natural origin; a comprehensive review. **International Journal of Pharmacology**. v. 10, n. 2, p. 90–108, 2014.
- SARAVANAKUMAR, K., CHELLIAH, R.; SHANMUGAM, S.; NIPUN, B. V.; OH, D. H.; KANDASAMY, K.; WANG, M-H. Green synthesis and characterization of

- biologically active nanosilver from seed extract of *Gardenia jasminoides* Ellis. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B.** v. 185, p. 126-135, 2018.
- SATYAJIT D. SARKER, L. N. Chemistry for pharmacy students: general, organic, and natural product chemistry. 1. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, v. I, 2007. 540 p.
- SAUVAIN, M. e MORETTI, C. Antimalarial activity of alkaloids from *Pogonopus tubulosus*. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 3, p. 198-201, 1996.
- SIBANDZE, G. F.; ZYL, R. L. VAN; VUUREN, S. F. VAN. The anti-diarrhoeal properties of *Breonadia salicina*, *Syzygium cordatum* and *Ozoroa sphaerocarpa* when used in combination in Swazi traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 2, p. 506–511, 2010.
- SHARIFI-RAD, M.; IRITI, M.; SHARIFI-RAD, M.; GIBBONS, S.; SHARIFI-RAD, J. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of Rubiaceae, Fabaceae and Poaceae plants: A search for new sources of useful alternative antibacterials against MRSA infections. **Cellular and Molecular Biology**. v. 62, n. 9, p. 39-45, 2016
- SIMOES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.
- SITTIE, A.A.; LEMMICH, E.; OLSEN, C. E.; HVII, L.; KHARAZMI, A.; NKRUMAH, F. K.; CHRISTENSE, S. B. Structure-activity studies: *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. **Planta Médica**, v. 65, n. 1999, p. 259-261, 1999.
- SOLIS, P. N.; LANG'AT', C.; GUPTA, M. P.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; PHILLIPSON, J. D. Bio-active compounds from *Psychotria camponutans*. **Planta Médica**, v. 61, n. 1995, p. 62-65, 1994.

- SONG, H.; LIU, Y.; LIU, Y.; WANG, L.; WANG, Q.; Synthesis and antiviral and fungicidal activity evaluation of β -carboline, dihydro- β -carboline, tetrahydro- β -carboline alkaloids, and their derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1010-1018, 2014.
- SOTO-SOBENIS, A.; CASTILLO, B.; DELGADO, A.; GONZÁLEZ, A.; MONTENEGRO, R. Alkaloid screening of herbarium samples of rubiaceae from panama. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 161-169, 2001
- SOUZA, V. C. e LORENZI, H. Botânica sistemática – guaiilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. [S.l.]: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.
- ST-PIERRE, B.; BESSEAU, S.; CLASTRE, M.; COURDAVAULT, V.; COURTOIS, M.; CRÈCHE, J.; DUCOS, E.; BERNONVILLE, T. D.; DUTILLEUL, C.; GLÉVAREC G.; IMBAULT, N.; LANOUE, A.; OUDIN, A.; PAPON, N.; PICHON, O.; GIGLIOLI-GUIVARC, N. Deciphering the evolution, cell biology and regulation of monoterpene indole alkaloids, In: **Advances in Botanical Research**, v. 68, p.73-109, 2013.
- SUN, J.; LOU, H; DAI, S; XU, H; ZHAO, F; LIU, K. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. **Phytochemistry**, v. 68, p 1405- 1410, 2008.
- SUN, C.; YANG, J.; CHENG, H. B.; SHEN, W. X.; JIANG, Z. Q., WU, M. J.; LI, L.; LI, W.T.; CHEN, T. T.; RAO, X. W.; ZHOU, J. R.; WU, M. H. 2-Hydroxy-3-methylantraquinone inhibits lung carcinoma cells through modulation of IL-6-induced JAK2/STAT3 pathway, **Phytomedicine**, v. 61, 2019.
- TAÏWE, G. S.; TALLA, E.; SIDIKI, N.; DZEUFIET, P. D.; DAWE, A.; OKOMOLO MOTO, F. C.; WAARD, M. DE. Antipyretic and antinociceptive effects of *Nauclea*

- latifolia* root decoction and possible mechanisms of action. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 1, p. 15–25, 2010.
- TAJBAKSH, J.; SINGH, J. Toxicology and Epigenetics. In: **Medical epigenetics**. Cap 13, Edit. Tollefsbol, T.O. Elsevier. ISBN: 978-0-12-803239-8.2013
- TAYLOR, A. C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p 549- 616, 2007.
- TRAGER, W.; JENSEN, J.B..Human malaria parasites in continuous culture. **Science**. v. 193, n, 4254, p. 673-675, 1976.
- TSE, S. Y. H.; MARK, I. T.; DICKENS, B. F. Antioxidative properties of harmaline and β -carboline alkaloids. **Biochemical Pharmacology**. v. 42, p. 459-464, 1991.
- TSHIBANGUA, P. T.; KAPEPULAA, P. M.; KAPINGAB, M. J.; MUKUTAB, A. T.; KALENDAB, D. T.; TCHINDAC, A. T.; MOUITHYS-MICKALADD, A. A.; JANSENA, O.; CIECKIEWICZA, E.; TITSA, M.; ANGENOTA, L.; FRÉDÉRICH, M. Antiplasmodial activity of *Heinsia crinita* (Rubiaceae) and identification of new iridoids. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 196, p. 261-266, 2017.
- TOPPO, E.; DARVIN, S. S.; ESAKKIMUTHU, S. AL-DHABI, N. A. Antihyperlipidemic and hepatoprotective effects of Gardenin A in cellular and high fat diet fed rodent models, **Chemico-Biological Interactions**. v. 269, p. 9-17, 2017.
- WATERMAN, C.; SMITH, R. A.; PONTIGGIA, L.; DERMARDEROSIAN, A. (2010). Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 755–759, 2010.
- WEN, K. C.; CHIU, H. H.; FAN, P. C.; CHEN, C. W.; WU, S. M.; CHANG, J. H.; CHIANG, H. M. Antioxidant activity of *Ixora parviflora* in a cell/cell-free system and in UV-exposed human fibroblasts. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5735–5752, 2011.

- WANG, Y. e CHEN, C. Synthesis of deuterium labeled tryptamine derivatives. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 54, n. 5, p. 1363-1368, 2007.
- WONG, K-Y.; VIKRAM, P.; CHIRUVELLA, K. K.; MOHAMMED, A. Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria* sps (Rubiaceae). **Journal of King Saud University – Science**. v. 27, n. 4, p. 302-311, 2015.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2. ed. [S.l.]: atheneu, v. I, 2002.
- YASUNAKA, K.; ABE, F.; NAGAYAMA, A.; OKABEB, H.; LOZADA-PEREZ, L.; LOPEZ-VILLAFRANCO, E.; MUNIZ, E. E.; AGUILAR, A.; REYES-CHILPAE, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95 p. 293–299, 2005
- YAZHENG, L.; KITTS, D. D. Activation of antioxidant response element (ARE)-dependent genes by roasted coffee extracts. **Food & Function**, v. 3, p. 950–954, 2012.
- YING, P.; YICUN, C., QINGNAN, L.; XIAOYU, Y.; JINZHI, W.; JINHONG, Z. The synthesis and evaluation of novel hydroxyl substituted chalcone analogs with *in vitro* anti free radicals pharmacological activity and *in vivo* anti-oxidation activity in a free radical-injury Alzheimer’s model. **Molecules**, v. 18, p. 1693-1703, 2013
- ZAMORA, D. J. Antioxidants: micronutrients fighting for health. **Revista Chilena de Nutricion**, v. 34, p. 1-11, 2007.
- ZENG, G. Z.; WANG, Z.; ZHAO, L. M.; FAN, J. T.; TAN, N.H. NF- κ B and JNK mediated apoptosis and G0/G1 arrest of HeLa cells induced by rubiarbonol G, an arborinane-type triterpenoid from *Rubia yunnanensis*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 220, p. 220–227, 2018.

- ZIEGLER, J.; FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 735-769, 2008.
- ZHAI, HJ.; YU, JH.; ZHANG, Q.; LIU, HS.; ZHANG, JS.; SONG, XQ.; ZHANG, Y.; ZHANG H. Cytotoxic and antibacterial triterpenoids from the roots of *Morinda officinalis* var. *officinalis*. **Fitoterapia**. v. 133, p. 56-61, 2019
- ZHANG, Y. e YE W, W-W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. **The international Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 19, n. 11 p. 1276-1289, 2015
- ZHENG, X.; YANG, D.; LIU, X.; WANG, N.; LI, B.; CAO, H.; LU, Y.; WEI, G.; ZHOU, H.; ZHENG, J. Identification of a new anti-LPS agent , geniposide , from *Gardenia jasminoides* Ellis , and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n. 10, p. 1209-1219, 2010.