

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

AMANDA DE AZEVEDO

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Aspidosperma discolor*
(APOCYNACEAE) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO DE 2015

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Aspidosperma discolor* (APOCYNACEAE) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA

AMANDA DE AZEVEDO

“Monografia apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de
Licenciatura em Química.”

Orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Jucimar Jorgeane de Souza

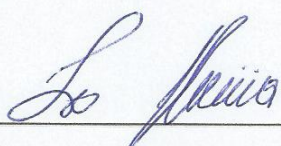
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2015

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Aspidosperma discolor* (APOCYNACEAE)
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA

“Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciatura em Química.”

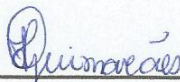
Campos dos Goytacazes, 19 de março de 2015.



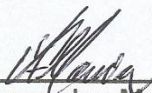
Prof. Ivo José Curcino Vieira (D. Sc., Química Orgânica) – UENF
(orientador)



Prof^a Jucimar Jorgeane de Souza (D.Sc., Ciências Naturais) – UNESA
(Co-orientadora)



Prof^a. Heloísa Alves Guimarães (D.Sc., Ciências Naturais) – IFF



Prof. Vinicius Fernandes Moreira (M. Sc., Produção Vegetal) – UNESA

“Onde há amor e sabedoria, não tem temor e nem ignorância.”
São Francisco de Assis

Dedico este trabalho ao grande homem que foi meu pai Jarcy de Azevedo,
aos meus irmãos, meus avós Antônio (*in memoriam*) e Lindalva
e à minha família que é e sempre será um porto seguro.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado uma encarnação muito abençoada, e uma missão que espero estar cumprindo da melhor maneira na Terra.

Ao meu pai que no pouco tempo que estivemos juntos, já foi o suficiente para torna-lo uma inspiração, e por saber que está sempre ao meu lado.

Ao meu irmão Alexandre, sua esposa Ana Paula, á Vera Regina e Luciana, por terem me acolhido em um momento difícil, me educarem e por terem me ensinado a ser uma pessoa boa e honesta.

Ao meu irmão Junior, por ser sempre meu melhor amigo, um conselheiro, parceiro para todas as horas e estar sempre torcendo para que possa ter o melhor possível na vida.

Aos meus irmãos Márcio, Cláudia, e toda minha família, por todo apoio e incentivo que sempre me foi dado.

Ao professor Dr. Ivo José Curcino Vieira, pela orientação e ensinamentos ao longo de toda minha jornada de graduação.

Ao professor Dr. Raimundo Braz, pela colaboração com este trabalho e ajuda nas determinações estruturais.

Ao professor Dr. Clóvis de Paula Santos e sua aluna Letícia Oliveira da Rocha pela parceria nos testes de atividade nematocida.

À professora Dr^a e amiga Jucimar Jorgeane pela co-orientação, pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

Aos colegas de laboratório Antônio Sérgio, Heloísa, Lara, Lidiana, Marcelo, Milena e Vinicius pela troca de conhecimento, conversas, cafés e risadas.

Aos meus grandes amigos Igor, Ingrid, Juliana, Maria Gabriela e Gabriel, por todos esses anos de convivência, pelo incentivo e pela torcida, que mesmo de longe foi fundamental.

Aos amigos que Campos me deu: Eline, Hádria, Laíssa, Michelle, Natália, Pedro, Rafaela, Tadeu e Tamaris, pelas conversas, cumplicidade, apoio e claro muitas festas, sem vocês esta jornada teria sido muito mais difícil.

Obrigada a todos, que torceram, rezaram, apoiaram, festejaram e me ajudaram neste ciclo que está se encerrando.

RESUMO

AZEVEDO, Amanda; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março de 2015; **Metabólitos secundários de *Aspidosperma discolor* (Apocynaceae) e avaliação da atividade nematicida**; Prof. Orientador: Ivo José Curcino Vieira; Co-orientadora: Jucimar Jorgeane de Souza.

Um grande número de alcaloides tem sido isolado do gênero *Aspidosperma*, pertencente a família Apocynaceae. Essa variedade de alcaloides tem sido responsáveis por uma grande diversidade de atividades biológicas, tais como ação hipotensora, sedativa, cardiotônica, antimicrobiana, antitumoral, antitérmica e disfunção erétil, entre outras. Este trabalho relata o isolamento, assim como a identificação e verificação da atividade biológica, dos compostos do extrato metanólico das cascas de *Aspidosperma discolor*. Foram isolados três metabólitos secundários: um iridoide, ácido logânico, e dois alcalóides, aspidoscarpina e aspidolimina, dos quais foram feitos ensaios biológicos de atividade nematicida. A determinação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base em dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , uni e bidimensionais. O alcaloide aspidolimina apresentou atividade nematicida. Os resultados estimulam a busca por alcaloides que sejam mais promissores, ou por modificações estruturais que possam potencializar a atividade nematicida desses alcaloides.

Palavras chave: Apocynaceae, *Aspidosperma*, metabólitos secundários, Atividade nematicida.

ABSTRACT

AZEVEDO, Amanda; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março de 2015; **Metabólitos secundários de *Aspidosperma discolor* (Apocynaceae) e avaliação da atividade nematicida**; Prof. Orientador: Ivo José Curcino Vieira; Co-orientadora: Jucimar Jorgeane de Souza.

A large number of alkaloids have been isolated from *Aspidosperma* genus, belonging to the Apocynaceae family. This variety of alkaloids has been responsible for a wide range of biological activities, such as hypotensive action, sedative, cardiogenic, antimicrobial, antitumor, antipyretic and erectile dysfunction etc. This work reports the isolation, as well as the identification and verification of the biological activity of the methanolic extract compounds present in the bark of *Aspidosperma discolor*. Three secondary metabolites were isolated: one iridoid, loganic acid, and two alkaloids, aspidoscarpine and aspidolimine of which biological assays of nematicidal activity were done. Structure determination of these substances was conducted based on spectroscopic data of ^1H and ^{13}C NMR, one and two dimensional. The aspidolimine alkaloid revealed nematicidal activity. The results stimulate the search for the most promising alkaloids, or structural modifications that may enhance the nematicidal activity of these alkaloids.

Keywords: Apocynaceae, *Aspidosperma*, secondary metabolites, nematicide activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Frutos e semente de <i>Aspidosperma discolor</i>	21
Figura 2 -	Tronco de árvore de <i>Aspidosperma discolor</i>	22
Figura 3 -	Reação promovida pela enzima triptofano-descarboxilase.....	24
Figura 4 -	Reação de condensação da triptamina e secologanina catalisada pela enzima strictosidina sintase.....	24
Figura 5 -	Esqueletos básicos das oito sub-classes de alcaloides indólicos terpênicos.....	26
Figura 6 -	Estrutura da loimbina.....	27
Figura 7 -	Alcaloides isolados de <i>Aspidosperma discolor</i>	28
Figura 8 -	Compostos isolados do extrato metanólico de <i>Aspidosperma discolor</i>	41
Figura 9 -	Espectro de massas de baixa resolução do alcaloide 21 em CDCl ₃	44
Figura 10 -	Espectro de RMN de ¹³ C-DEPTQ (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl ₃	55
Figura 11 -	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl ₃	56
Figura 12 -	Ampliação da região de δ_H 3,5-11,5 – 5,5 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl ₃	57
Figura 13 -	Ampliação da região de δ_H 1,8 – 3,2 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl ₃	58
Figura 14 -	Ampliação da região de δ_H 0,6 – 2,1 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl ₃	59
Figura 15 -	Espectro na região do infravermelho do alcaloide 20.....	60
Figura 16 -	Espectro de RMN de ¹³ C-DEPTQ (500 MHz) do alcaloide 20 em CDCl ₃	61
Figura 17 -	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz) do alcaloide 20 em CDCl ₃	62

Figura 18 -	Ampliação da região de δ_H 5 – 11 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 20 em $CDCl_3$	63
Figura 19 -	Ampliação da região de δ_H 2 – 5,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 20 em $CDCl_3$	64
Figura 20 -	Ampliação da região de δ_H 0,6 – 2,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 20 em $CDCl_3$	65
Figura 21 -	Mapa de correlação heteronuclear 2D HMBC do alcaloide 20 em $CDCl_3$	66
Figura 22 -	Mapa de correlação heteronuclear 2D HMQC ($^1J_{CH}$) do alcaloide 20 em $CDCl_3$	67
Figura 23 -	Espectro na região do infravermelho do iridoide 22.....	68
Figura 24 -	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (500 MHz) do alcaloide 22 em $CDCl_3$	69
Figura 25 -	Espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 22 em $CDCl_3$	70
Figura 26 -	Ampliação da região de δ_H 4,8 – 5,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 22 em $CDCl_3$	71
Figura 27 -	Ampliação da região de δ_H 3,6 – 4,4 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 22 em $CDCl_3$	72
Figura 28 -	Ampliação da região de δ_H 1,8 – 2,4 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 22 em $CDCl_3$	73
Figura 29 -	Mapa de correlação heteronuclear 2D HMQC ($^1J_{CH}$) do alcaloide 22 em $CDCl_3$	74
Figura 30 -	Mapa de correlação heteronuclear 2D HMBC do alcaloide 22 em $CDCl_3$	75
Figura 31 -.	Estruturas da aspidoscarpina, aspidolimina e albendazol.....	52

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 - Fracionamento do extrato metanólico.....	35
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Ensaio larvicida para os alcaloides 20 e 21.....	53
Gráfico 2 -	Ensaio ovicida para o alcaloides 20 e 21.....	53

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1 - Proposta de fragmentação para os alcaloides aspidoscarpina e aspidolimina (GUIMARÃES, 2013).....	44
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade biológica de alguns alcaloides.....	23
Tabela 2 -	Quantidade de extrato bruto obtido.....	33
Tabela 3 -	Estudo cromatográfico das frações coletadas no extrato bruto.....	36
Tabela 4 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-8	37
Tabela 5 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-8-4	37
Tabela 6 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-9.....	38
Tabela 7 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-9-2.....	39
Tabela 8 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-11	39
Tabela 9 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-11-4.....	40
Tabela 10 -	Estudo cromatográfico da fração MCDi-11-4-3.....	40
Tabela 11 -	Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcaloide aspidoscarpina (20), em comparação com valores de referência da literatura (MC LEAN et al., 1987).....	45
Tabela 12 -	Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do alcaloide aspidolimina (21) em comparação com valores de referência da literatura	48
Tabela 13 -	Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do iridoide ácido logânico (22).....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	A FAMÍLIA APOCYNACEAE.....	18
3.2	O GÊNERO <i>Aspidosperma</i>	19
3.3	A ESPÉCIE <i>Aspidosperma discolor</i>	20
3.4	ALCALOIDES.....	22
3.4.1	Alcaloides indólicos (derivados do L-Triptofano).....	23
3.4.2	Alcaloides de <i>Aspidosperma discolor</i>	27
3.5	ATIVIDADE NEMATICIDA.....	30
4	METODOLOGIA	32
4.1	ESCOLHA DA PLANTA.....	32
4.2	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	32
4.3	PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	33

4.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	33
4.5	TESTE DE ATIVIDADE NEMATICIDA.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	DESCRIÇÃO DO ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DE <i>Aspidosperma discolor</i>	35
5.2	ANÁLISE DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DE <i>Aspidosperma discolor</i>	36
5.3	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Aspidosperma discolor</i>	41
5.3.1	Determinação estrutural do alcaloide aspidolimina (21).....	42
5.3.2	Determinação estrutural do alcaloide aspidoscarpina (20).....	46
5.3.3	Determinação estrutural do derivado acetilado do iridoide ácido logânico (22).....	49
5.4	TESTE DE ATIVIDADE NEMATICIDA.....	52
6	CONCLUSÕES.....	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A evolução do conhecimento científico sobre as plantas e sua utilização pelo homem tem crescido de forma muito significativa na história. Civilizações primitivas perceberam a existência de plantas comestíveis e dotadas de toxicidade, que ao serem utilizadas no combate às doenças, revelavam empiricamente seu potencial curativo (BARROS, 2008).

Com a evolução dos processos tecnológicos, principalmente no que se refere à descoberta do antibiótico e os processos de síntese química, as plantas medicinais passaram a ser alternativas para a cura de centenas de doenças, como por exemplo: problemas cardíacos e disfunção erétil (NETO e CAETANO, 2005).

Estudos na área de plantas medicinais têm sido grandes aliados na luta contra doenças emergentes, levando a descoberta de um imenso arsenal, inserido na terapêutica moderna. Porém, a imensa biodiversidade do Brasil e o conhecimento popular na utilização destas plantas na terapêutica é uma importante base para novos estudos na busca do alívio e cura de uma grande gama de enfermidades (NETO e CAETANO, 2005).

Apesar de toda esta evolução tecnológica, a composição química das plantas medicinais foi, e continua sendo, de suma importância na medicina moderna, onde estudos revelaram substâncias muito importantes, que servem como material de partida para a síntese de novas drogas e como modelos para substâncias farmacologicamente ativas (NEWMAN et al., 2003).

Diante deste cenário, de valorização do uso das plantas medicinais, centenas de alcaloides têm sido isolados de espécies da família Apocynaceae, e tais alcaloides tem se mostrado biologicamente ativos e apresentado uma grande variedade de atividades farmacológicas, como por exemplo: ação hipertensora, cardiotônica, sedativa e antitumoral (QUINET, 2002).

A família Apocynaceae destaca-se por possuir uma riqueza de espécies que são utilizadas como fonte de madeira e látex, na alimentação, como ornamentais, medicinais e na construção civil (WATSON e DALLWITZ, 1992).

O presente trabalho realizou o estudo de uma espécie do gênero *Aspidosperma*, *Aspidosperma discolor*, buscando o isolamento e purificação de constituintes químicos e testes de atividade biológica dos mesmos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o aprendizado de técnicas cromatográficas clássicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliar as técnicas de cromatografia clássica: cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada em escala preparativa e cromatografia em camada delgada analítica.

Isolar, identificar estruturalmente e verificar a atividade biológica, de compostos obtidos a partir do extrato metanólico das cascas da espécie *Aspidosperma discolor*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A FAMÍLIA APOCYNACEAE

A Apocynaceae está taxonomicamente classificada, segundo Cronquist (1993) no Reino Plantae, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianiales (PEREIRA et al., 2007). Está subdividida em 424 gêneros, agrupada em 17 tribos pertencentes a cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Asclepioideae, Periplocoideae e Secamonioidae (ENDRESS e BRUYNS, 2000). Essa classificação pode sofrer variações de acordo com os critérios analisados, podendo haver outras possibilidades como a aproximação entre taxonomia Linneana e filogenética (com 4 subfamílias e 21 tribos) (SENNBLAD e BREMER, 2002; GUIMARÃES, 2013).

A família Apocynaceae se caracteriza por apresentar grande variedade morfológica em seus órgãos florais, presença de vasos laticíferos e diversidade de substâncias resultantes do seu metabolismo secundário que, na maioria das vezes, possuem propriedades farmacológicas (MOURA e AGRA, 1989).

Com aproximadamente 3700 espécies, esta família apresenta-se distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, com poucos gêneros ocorrendo em regiões temperadas (SANTOS et al., 2013).

No Brasil, são encontrados cerca de 95 gêneros e 850 espécies, que ocorrem em diversas formações, como as Florestas Pluviais Amazônica, Atlântica e de Tabuleiro, Floresta Seca, Restinga, Cerrado e Caatinga (SANTOS et al., 2013). Dentre os gêneros encontrados no Brasil, destaca-se o *Aspidosperma*, que apresenta grande importância no aspecto científico e econômico, pois além de fornecedor de madeira nobre, a maioria das espécies deste gênero são objetos de pesquisa na busca de novas substâncias com atividades biológicas (OLIVEIRA et al., 2009).

Esta família tem como característica marcante a presença de látex nos órgãos vegetativos e reprodutivos, e flores com perfloração contorta e são conhecidas por fornecer principalmente alcaloides, alguns deles com ampla utilização na medicina

tradicional. A *Hancornia speciosa* (Mangabeira), por exemplo, tem seus frutos consumidos ao natural ou usados como matéria prima na produção de doces, geleias, sorvetes e sucos. O suco leitoso do fruto e o látex dessa espécie são utilizados como medicamento caseiro para o tratamento de úlcera e tuberculose (BARROS, 2008).

Algumas espécies arbóreas, em particular a *Aspidosperma discolor*, conhecida popularmente como peroba, fornecem madeira para a construção civil, produção de móveis e ferramentas; borracha e gomas são produzidas a partir do látex de *Apocynum* spp. Outras são cultivadas como plantas ornamentais e algumas espécies encontram-se naturalizadas em muitas regiões, como por exemplo, *Catharantus roseus* de Madagascar, espécies mediterrâneas *Vinca major* e *Vinca minor* e plantas paleotropicals, como *Certopegia* e *Hoya* (RAPINI, 2000).

3.2 O GÊNERO *Aspidosperma*

O gênero *Aspidosperma* está inserido ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, subfamília: Plumerioidea e a tribo Plumerieae. (OLIVEIRA et al., 2009).

Espécies do gênero são encontradas apenas nas Américas, principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru. No Brasil foram catalogadas cerca de 52 espécies desse gênero, praticamente distribuídas em todos os ecossistemas. (OLIVEIRA et al., 2009).

Além de possuir elevado valor comercial devido à qualidade de suas madeiras, as cascas de espécies de *Aspidosperma* são muito utilizadas sob a forma de infusões pela medicina popular na Região Amazônica. A baixa toxicidade e a ausência de contraindicações dessas infusões têm contribuído para difusão deste uso (PEREIRA et al., 2007; GUIMARÃES, 2013).

A espécie *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose, já a espécie *A. nitidum* é utilizada como anticonceptiva, no tratamento de inflamações de útero e ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra o câncer, febre e

reumatismo e as cascas de *A. discolor*, são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária (PEREIRA et al., 2007).

A família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de estruturas alcaloídicas. No caso do gênero *Aspidosperma*, há predominantemente a ocorrência de alcaloides indólicos de ampla diversidade estrutural, muitos deles contendo esqueleto β -carbolínico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos. A marcação isotópica de precursores indica que a parte indólica desses alcaloides é derivada biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, provavelmente de carboidratos (PEREIRA et al., 2007).

Biologicamente, muitos alcaloides indólicos agem nos sistemas neurotransmissores, por isso, são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmo gênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético. Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia (PEREIRA et al., 2007).

3.3 A ESPÉCIE *Aspidosperma discolor*

A espécie possui sinonímia botânica com *Aspidosperma francisci* A. DC., é conhecida popularmente como pau-quina, cabo-de-machado, canela-de-velho, carapaúna, pau-pereiro, peroba-de-goma, peroba-de rego, quina-de-rego, peroba (IBGE, 2002).

Ocorrem na Amazônia, no sertão baiano, Triângulo Mineiro, Goiás, Espírito Santo e Distrito Federal, ocupando preferencialmente a porção inicial da floresta. É encontrada na floresta semidecídua do Brasil central e na mata alta inundável da região amazônica, é uma planta semidecídua heliófita ou esciófita (SILVA et al., 2004).

Suas flores pequenas variam de verde a branco-esverdeadas, dispostas em inflorescências terminais. Floresce nos meses de setembro-dezembro e os frutos amadurecem nos meses de maio-junho. Os frutos (**figura 1**) são achatados,

obovados, biconvexos, lenticelosos, ferrugíneos e sem pelos, apresentando sementes circulares com asa circular e núcleo seminífero central, que se dispersam pelo vento (SILVA et al., 2004).

Sua árvore pode atingir de 15 a 25m de altura, apresenta tronco retilíneo (**figura 2**), bastante sulcado, com casca fina rugosa e escura. A madeira é moderadamente pesada e dura, é fácil de trabalhar, porém de baixa durabilidade quando exposta ao ambiente. É empregada para a confecção de cabos de ferramentas e na construção civil, usada como vigas, esteios e caibros (SILVA et al., 2004).

Figura 1 - Fruto e sementes de *Aspidosperma discolor*.



Fonte: EOL- *Encyclopedia of life*, disponível em: <http://eol.org/pages/6852134/overview>.

Figura 2 - Tronco de árvore de *Aspidosperma discolor*



Fonte: SILVA, J. A.; LEITE, E. J.; NASCIMENTO, A. R. T.; REZENDE, J. M. D. Padrão e distribuição espacial e diamétrica de indivíduos de *Aspidosperma* spp. na Reserva Genética Florestal Tamanduá, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, P.21, 2004.

3.4 ALCALOIDES

Alcaloides (do árabe *al-quali*, nome vulgar da planta da qual a soda foi originalmente extraída) como próprio nome sugere são substâncias que possuem caráter básico, uma vez que apresentam em seu esqueleto um ou mais átomos de nitrogênio (HENRIQUES et al., 1999).

Relatos históricos demonstram o uso de extratos vegetais contendo alcaloides altamente tóxicos, usados como venenos, medicamentos ou como alucinógenos, desde tempos antigos. Podemos citar a execução do filósofo Sócrates pela ingestão de uma bebida proveniente do extrato de *Conium maculatum*, que continha o alcaloide coniina. Em decorrência a estes fatos, no século XIX surgiram vários trabalhos científicos, com a finalidade de obter substâncias com importância farmacológica (HENRIQUES et al., 1999; BARBOSA, 2005).

Os alcaloides possuem grande significado na indústria farmacêutica, por apresentarem diversas atividades biológicas (**tabela 1**) (HENRIQUES et al., 1999).

Tabela 1 - Atividade biológica de alguns alcaloides

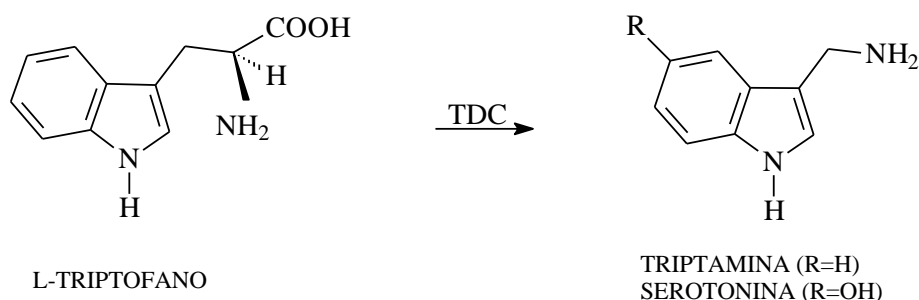
Alcaloide	Atividade Biológica
Emetina	Amebicida e Emético
Atropina	Anticolinérgico
Reserpina	Anti-hipertensivo
Quinina	Antimalárico
Camptotecina	Anti-tumoral
Noscapina	Antitussígeno
Morfina	Hipnoanalgésico
Quinidina	Depressor Cardíaco
Cafeína	Estimulante do SNC
Teotrobina	Diurético
Efedrina	Simpatomimético
Colchicina	Tratamento de gota
Tubocurarina	Miorrelaxante
Castanospermina	Antiviral

3.4.1 ALCALOIDES INDÓLICOS (DERIVADOS DO L – TRIPTOFANO)

Alcaloides indólicos podem ser divididos em dois grupos:

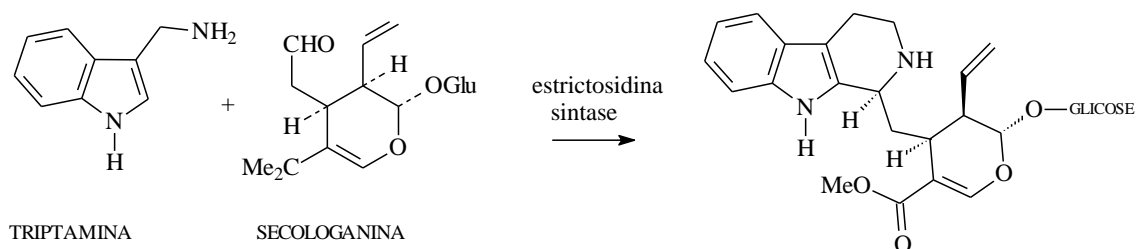
- a) **Alcaloides indólicos simples:** são alcaloides formados por modificações simples do L-triptofano, como descarboxilações, hidroxilações e metilações, formando a triptamina e serotonina (**figura 3**) (DEWICK, 2002).

Figura 3 - Reação promovida pela enzima triptofano-descarboxilase



b) **Alcaloides indólicos monoterpênicos:** são alcaloides formados pela reação de condensação (catalisada pela enzima estrictosidina sintase) entre a triptamina formada através de descarboxilação do L-triptofano (**figura 3**) e o iridóide secologanina originando a estrictosidina (**figura 4**) (DEWICK, 2002).

Figura 4 - Reação de condensação da triptamina e secologanina catalisada pela enzima estrictosidina sintase.



Em 1980, Kiskürek e Hesse subdividiram os alcaloides indólicos monoterpênicos em 8 classes. Em 1985, Van Beek ampliou essa classificação adicionando três classes: uma para um novo arranjo de esqueletos de alcaloides indólicos monoterpênicos (posteriormente denominada classe Tacamano), outra classe para alcaloides indólicos monoterpênicos diméricos e uma classe para todos os demais alcaloides indólicos monoterpênicos. Esta classificação foi feita de acordo com as variações das características estruturais dos esqueletos dos alcaloides. As nove principais classes são (CARLOS, 2007):

A- Corinanteano ou tipo C (Ex: sarpagina, ioimbina, ajmalicina, picranila). Esta subclasse de alcaloides tem demonstrado 46 variações no seu esqueleto e 1718 substâncias já foram isoladas, segundo consta a literatura.

B- Vincosano ou tipo D (ex: vincosidina, talbotina) 47 substâncias foram isoladas e já estão distribuídas dentro de 11 diferentes variações no esqueleto.

C- Valesiachotamano ou tipo V (ex: valesiachotamina) 2 variações no esqueleto e 83 alcaloides isolados.

D- Estricnano ou tipo S (ex: vomicina, akuamicina) 11 variações no esqueleto e 421 substâncias isoladas.

E- Aspidospermatano ou tipo A (ex: condilocarpina, aspidospermatina) 6 variações no esqueleto e 53 substâncias isoladas.

F- Eburnano ou tipo E (ex: vincamina, dicotina) 5 variações no esqueleto e 77 substâncias isoladas.

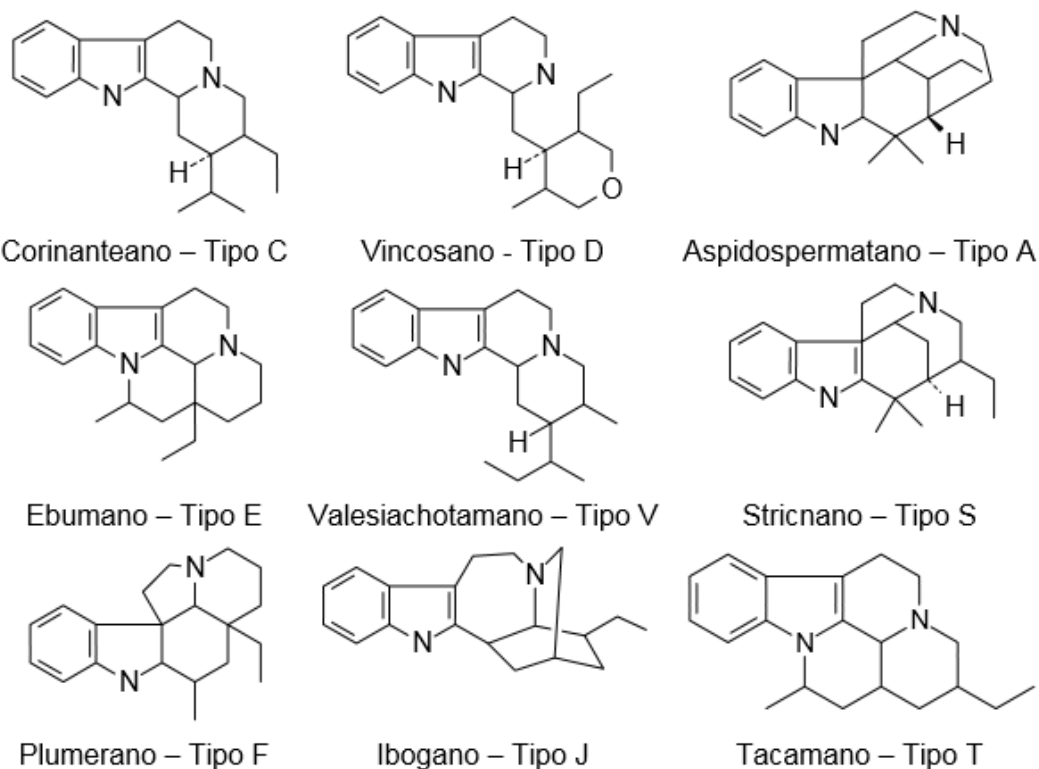
G- Plumerano ou tipo P (Ex: kopsina, aspidospermidina, tabersonina) 11 variações no esqueleto e 606 substâncias isoladas.

H- Ibogano ou tipo J (ex: voaluteina, ibogaina, pseudoaspidospermina, cataranti/na) 11 variações no esqueleto e 297 substâncias isoladas.

I- Tacamano ou Tipo T Ex: Tacamina

Os esqueletos das nove primeiras classes estão ilustrados na **figura 5**.

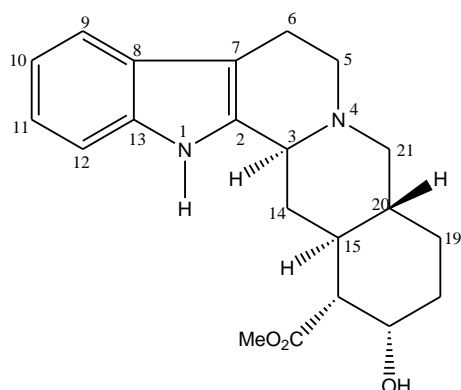
Figura 5 - Esqueletos básicos das oito sub-classes de alcaloides indólicos terpênicos



Os alcaloides indólicos monoterpênicos compreende-se em um dos maiores grupos de alcaloides em plantas, podendo ser encontrados em oito famílias, das quais merecem destaque as famílias Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae (SCHRIPSEMA et al., 2003).

O sistema de numeração aceito para os alcaloides indólicos monoterpênicos, está relacionado com sua biogênese, no qual tem-se como base a ioimbina, conforme ilustra a **figura 6** (SCHRIPSEMA et al., 2003).

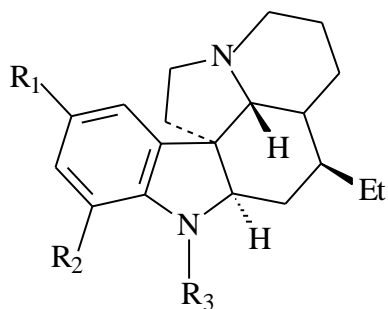
Figura 6 - Estrutura da Ioimbina



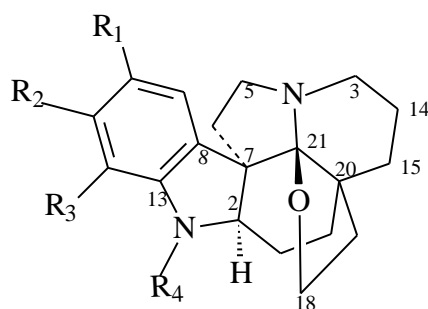
3.4.2 Alcaloides de *Aspidosperma discolor*

Até 1956 eram conhecidos apenas quatro alcaloides isolados de espécies de *Aspidosperma*. Atualmente esse número ultrapassa 100 alcaloides. Na **figura 7** estão representados os alcaloides isolados de *Aspidosperma discolor*: (+)-des-O-metilaspidospermina (**1**), (-)-des-N-metoxiaspidospermina (**2**), N-acetilaspidospermidina (**3**), desmetoxipalosina (**4**), desmetoxivalesina (**5**) (+)-haplocidina (**6**), 3 α -isoreserpilina (**7**), 3 α -reserpilina (**8**), 3 β -reserpilina (**9**), ioimbina (**10**), (-)- β -ioimbina (**11**), 3 α , 15 α , 16 α , 17 β , 20 α -quebrachina (**12**), isoreserpilinapseudo-indoxila (**13**), 3 α -10-metoxigeissoschizol (**14**), 3-epi-geissoschizol (**15**), 3-epi-10-metoxigeissoschizol (**16**), 3 α , 20 β -18,19-diidrocorinanteol (**17**), 2 α , 20 β -10-metoxi-18,19-diidrocorinanteol (**18**), 3 α , 20 α -10-metoxi-18,19-diidrocorinanteol (**19**) (PEREIRA et al., 2007).

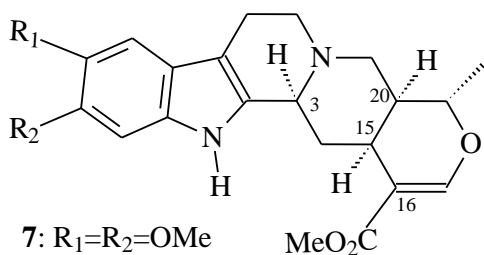
Figura 7 - Alcaloides aislados de *Aspidosperma discolor*.



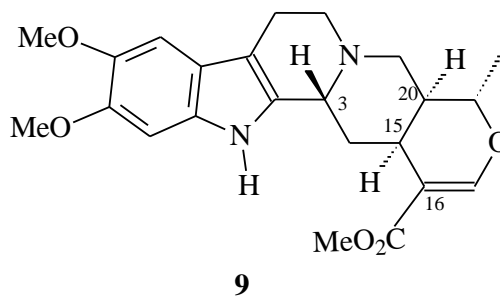
- 1: R₁= H; R₂=OH; R₃=COMe
- 2: R₁= H; R₂=H; R₃=COMe
- 3: R₁=H; R₂=H; R₃=CO₂Me
- 4: R₁=R₂=H; R₃=COEt
- 5: R₁=R₂=H; R₃=CHO



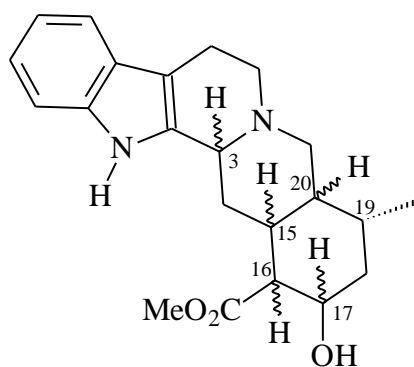
- 6: R₁=R₂=H; R₃=OH; R₄=COMe



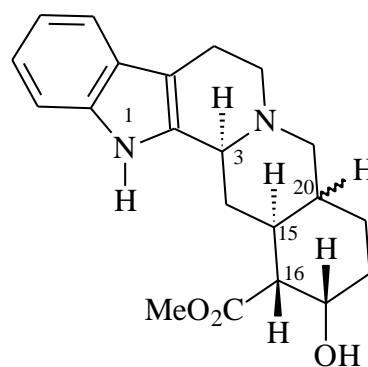
- 7: R₁=R₂=OMe
- 8: R₁=H; R₂=OMe



9



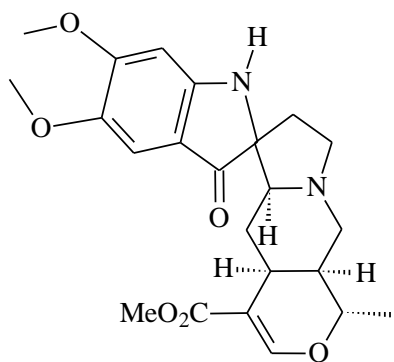
- 10: H-3 α ; H-15 α ; H-16 β ; H-17 β ; H-20 β



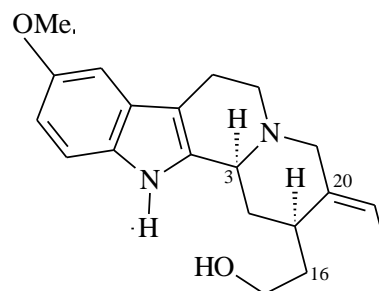
- 11: H-20 β

- 12: H-20 α

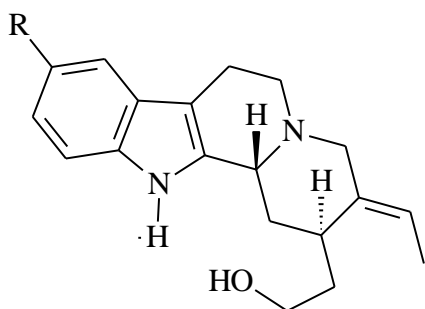
Continuação da figura 7 - Alcaloides isolados de *Aspidosperma discolor*



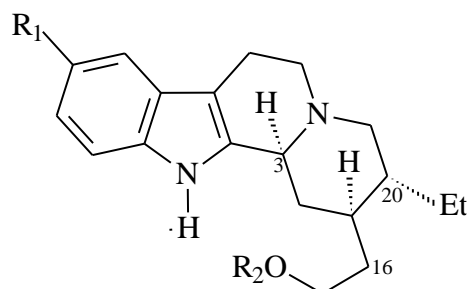
13



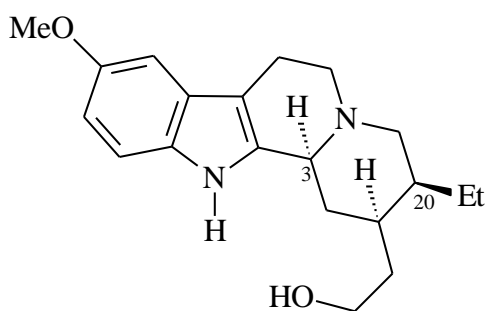
14



15: R=H
16: R=OMe



17: R₁=R₂=H
18: R₁=OMe R₂=H



19

3.5 ATIVIDADE NEMATICIDA

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, tem sido objeto de diversos estudos. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Os nematoides são vermes de corpo aproximadamente cilíndrico, geralmente alongados, afilando-se de modo gradual ou abrupto nas extremidades anterior e posterior. Vivem em quaisquer ambientes/ecossistemas onde exista água, sendo no geral sensíveis a fortes estresses hídricos. Ocorrem na água salgada, na água doce, no solo, em órgãos vegetais e tecidos de diferentes animais (SBN, 2011).

Os nematoides gastrintestinais representam um dos principais fatores limitantes para o sucesso sustentável da produção pecuária em todo o mundo, em especial pequenos ruminantes (PERRY e RANDOLPH, 1999). Quando parasitados, os animais apresentam como sinais clínicos: depressão do apetite, prejuízos nas funções gastrintestinais, alterações no metabolismo proteico, energético e mineral e mudanças no balanço hídrico com consequente perda no ganho de peso, interferência na ingestão de alimentos, retardo na idade reprodutiva e morte em animais seriamente afetados (CHARLES, 1992).

A forma de controle mais comum no tratamento e prevenção das nematodioses são os anti-helmínticos comerciais. Contudo, o uso inadequado destes produtos tem conduzido ao surgimento de uma resistência global dos helmintos a estas drogas (JACKSON e MILLER, 2006). Nas regiões Norte e Noroeste do estado do Rio de Janeiro, os estudos demonstram uma situação preocupante não somente pelo fato da resistência estabelecida em várias localidades, mas pela falta de conhecimento dos proprietários diante do problema e soluções (CRUZ et al., 2010). Somado a isto, há que se destacar a produção de resíduos tóxicos a organismos não alvos no meio ambiente, carne, leite e outros produtos de origem animal relacionado a estes fármacos (PADILHA, 1996).

É possível verificar um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos

com propriedades terapêuticas nos últimos tempos e embora as drogas sintéticas constituam maioria nas farmácias caseiras, os medicamentos à base de plantas, os fitoterápicos, vêm ganhando um espaço cada vez maior no combate e tratamento de diversas doenças. Os metabólitos secundários de plantas têm sido usados como fatores de interação com outros organismos, onde muito deles são de interesse biológico ou possuem atividade terapêuticas úteis ao homem (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

A busca por alternativas de controle que minimizem o uso de anti-helmínticos é necessária e neste aspecto o estudo com agentes biológicos e fitoterápicos tem demonstrado uma perspectiva no controle dessa parasitose (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005; STEAR et al., 2007). Destaca-se o uso de extratos vegetais que, quando comparados com anti-helmínticos comerciais, possuem inúmeras vantagens por ser biodegradável, não causar poluição ambiental e ainda diminuir o problema de resíduo (CHAGAS, 2004).

Baseando-se no conhecimento etnobotânico de plantas medicinais, novos compostos bioativos vem sendo descobertos com o auxílio de várias técnicas de isolamento usando extratos vegetais. Estes compostos bioativos vêm demonstrando um papel crucial na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças (ROCHA, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 ESCOLHA DA PLANTA

A escolha da planta pode ser feita através da verificação da ocorrência de determinado constituinte químico (alcaloide, flavonoide, entre outros), ou de um conjunto de constituintes de interesse para o estudo desenvolvido.

A espécie *Aspidosperma discolor* foi escolhida por ser da família Apocynaceae, a qual em estudos anteriores apresentou uma grande diversidade de alcaloides indólicos com importantes atividades biológicas.

4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As cascas do caule de *Aspidosperma discolor* foram coletadas em fevereiro de 2010, nas proximidades da Reserva Florestal da Companhia Vale, no município de Linhares – ES. A exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário da Reserva.

4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A secagem do material foi feita ao ar livre logo após a coleta, para evitar a presença de fungos. Após a secagem o material foi triturado usando moinho de martelos.

A extração dos componentes fixos foi feita a frio por maceração, utilizando metanol. As soluções obtidas foram destiladas a pressão reduzida em evaporador rotativo, fornecendo o extrato bruto, descrito na **tabela 2**.

Tabela 2 - Quantidade de extrato bruto obtido

Espécie botânica	Parte Botânica	Peso do material (g)	Solvente	Peso do Extrato (g)
<i>Aspidosperma discolor</i>	Cascas	932	Metanol	11,08

4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando gel de sílica 60G (0,063 – 0,200 mm).

As análises comparativas, para determinação da composição de cada fração, foram realizadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando cromatofolha de gel de sílica 60 F₂₅₄, as quais foram reveladas através da irradiação com luz na região do ultra violeta em comprimento de onda 254 e 365 nm, com o revelador cromogênico Vanilina/H₂SO₄ conc., seguido de aquecimento e com o revelador cromogênico de Draggendorff, específico para alcaloides.

As análises de cromatografia em camada delgada, em escala preparativa, foram realizadas utilizando placas de vidro com gel de sílica 60GF₂₅₄.

Após a purificação das substâncias, foram feitas análises espectroscópicas na região do infravermelho, espectro de massas (CG/EM) e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, com experimentos uni e bidimensionais, e também comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.

4.5 TESTE DE ATIVIDADE NEMATICIDA

Após a obtenção, os metabólitos isolados, aspidoscarpina e aspidolimina, foram testados para avaliar sua atividade nematicida.

Foram obtidas soluções estoques dos isolados 4,6 e 2,8 mg/mL, respectivamente e estas foram diluídas em DMSO 3%. As soluções foram testadas nas concentrações de 25, 20, 15, 10, 5 e 2,5 µg/mL, para ovos e larvas infectantes (L3), a fim de se obter o isolado bioativo.

Para os ensaios de atividade larvicida e ovicida foram usadas aproximadamente 130 L3 e 120 ovos/poço resuspenso em 0,02 mL de água destilada. Estes foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços e deixados em interação com as soluções por 48h à 27°C e 30°C, respectivamente em incubadora B.O.D. (ROCHA, 2012)

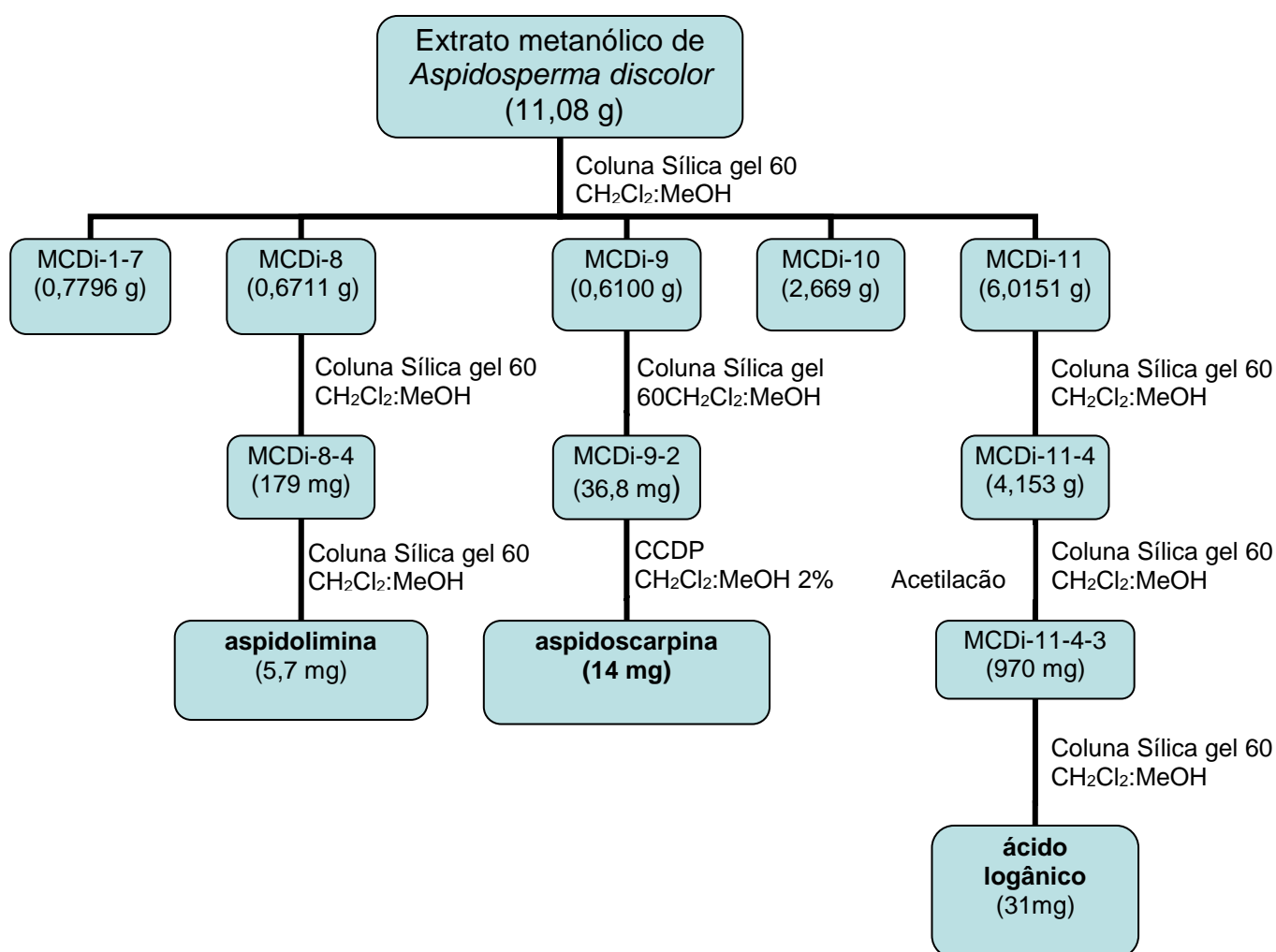
O controle negativo com DMSO 3% e água destilada e ainda um controle positivo com anti-helmíntico Albendazol 1 mg/mL foram feitos para comparação dos resultados.

Após 48h o número de L3 mortas e L1 eclodidas foram contabilizados com o auxílio de Microscópio Invertido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESCRIÇÃO DO ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DE *Aspidosperma discolor*

Fluxograma 1 - Fracionamento do extrato metanólico



5.2 ANÁLISE DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DE *Aspidosperma discolor*

Inicialmente o extrato com 11,08 g, foi submetido a cromatografia em coluna utilizando os solventes diclorometano e metanol em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento foram obtidas 40 frações que após análise por CCDA foram reunidas em 11 novas frações. A **tabela 03** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 03 - Estudo cromatográfico das frações coletadas do extrato bruto

Frações reunidas	Códigos	Quantidade (g)	Substâncias isoladas
1-7	MCDi-1	0,0317	*
8-10	MCDi-2	0,0328	*
11-15	MCDi-3	0,0449	*
16-21	MCDi-4	0,1078	*
22-27	MCDi-5	0,1189	*
27-30	MCDi-6	0,2025	*
31-33	MCDi-7	0,2410	*
34	MCDi-8	0,6711	
35-36	MCDi-9	0,6100	
37-39	MCDi-10	2,6690	*
40	MCDi-11	6,0151	

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi-8

A fração MCDi-8 (671 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro. Após este procedimento foram obtidas 50 frações que, através de CCDA,

foram reunidas em 6 novas frações. A **tabela 04** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 04 - Estudo cromatográfico da fração MCDi-8

Frações reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1-5	MCDi-8-1	38,4	*
6-9	MCDi-8-2	43,7	*
10-15	MCDi-8-3	95,3	*
16-40	MCDi-8-4	179,0	
41-47	MCDi-8-5	145,8	*
47-50	MCDi-8-6	120,4	*

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi-8-4

A fração MCDi-8-4 (179 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro. Após este procedimento foram obtidas 80 frações, entre elas o alcaloide **aspidolimina**. A **tabela 05** apresenta o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 05 - Estudo Cromatográfico da fração MCDi-8-4

Frações reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1-15	MCDi-8-4-1	9,2	*
16-28	MCDi-8-4-2	5,5	*
29-39	MCDi-8-4-3	5,7	aspidolimina
40-62	MCDi-8-4-4	33,5	*
62-80	MCDi-8-4-5	120,9	*

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi-9

A fração MCDi-9 (610 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro. Foram obtidas 90 frações que, através de CCDA, foram reunidas em 8 novas frações. O estudo cromatográfico das frações reunidas é apresentado na **tabela 06**.

Tabela 06 - Estudo cromatográfico da fração MCDi-9

Frações reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1-5	MCDi-9-1	4,8	*
6-25	MCDi-9-2	36,8	
26-47	MCDi-9-3	42,9	*
48-72	MCDi-9-4	28,7	*
73-80	MCDi-9-5	70,5	*
81-86	MCDi-9-6	132	*
87-89	MCDi-9-7	93,8	*
90	MCDi-9-8	190,6	*

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi-9-2

A fração MCDi-9-2 (36,8 mg) foi submetida a cromatografia em camada delgada em escala preparativa, para ser purificada, sendo utilizado como eluente diclorometano/metanol (98:02, v/v), onde foram coletadas 3 frações. Tal procedimento levou ao isolamento do alcaloide **aspidoscarpina**, a **tabela 07** apresenta o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 07 - Estudo cromatográfico da fração MCD- 9-2

Frações coletadas	Código	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1	MCD-9-2-1	7,5	*
2	MCD-9-2-2	14,6	aspidoscarpina
3	MCD-9-2-3	5,2	*

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi-11

A fração MCDi-11 (6,0151 g) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro. Após este procedimento foram obtidas 80 frações que através de CCDA, foram reunidas em 4 novas frações. O estudo cromatográfico da fração é apresentado na **tabela 08**.

Tabela 08 - Estudo cromatográfico da fração MCDi-11

Frações coletadas	Código	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1-13	MCDi-11-1	264	*
14-20	MCDi-11-2	567	*
21-60	MCDi-11-3	600	*
61-80	MCDi-11-4	4.153	

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi-11-4

A fração MCDi-11-4 (4,153 g) foi submetida a uma acetilação, reação na qual a amostra é diluída em piridina e em seguida em anidrido acético, após o período de 24 horas a amostra tem sua polaridade é reduzida.

Ao fim da acetilação a amostra foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro. Após este procedimento foram obtidas 80 frações que através de CCDA, foram reunidas em 4 frações. O estudo cromatográfico da fração é apresentado na **tabela 09**.

Tabela 09 - Estudo cromatográfico da fração MCDi 11-4

Frações coletadas	Código	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1-34	MCDi-11-4-1	379,7	*
35-40	MCDi-11-4-2	644,2	*
41-60	MCDi-11-4-3	970,0	
61-80	MCDi-11-5-4	1498,0	*

*Frações não trabalhadas

ANÁLISE DA FRAÇÃO MCDi11-4-3

A fração MCDi-11-4-3 (970mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano puro, com gradiente de eluição até metanol puro. Após este procedimento foram obtidas 80 frações, que foram reunidas em 5 novas frações, entre elas o derivado acetilado do iridoide **ácido logânico**. Na **tabela 10** é observado o estudo cromatográfico da fração.

Tabela 10 - Estudo cromatográfico da fração MCDi-11-4-3

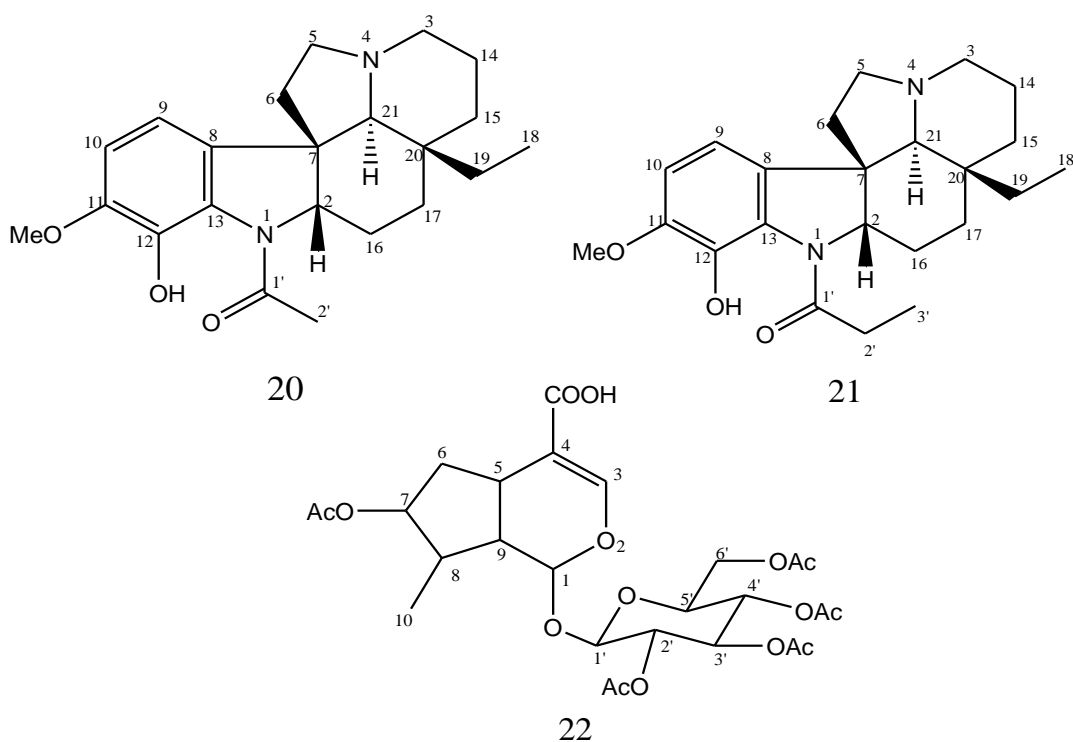
Frações coletadas	Códigos	Quantidade (mg)	Substâncias isoladas
1-12	MCDi-11-4-3-1	20,3	*
13-34	MCDi-11-4-3-2	31,3	ácido logânico
35-62	MCDi-11-4-3-3	163,7	*
63-78	MCDi-11-4-3-4	105,1	*
79-80	MCDi-11-4-3-5	609,3	*

*Frações não trabalhadas

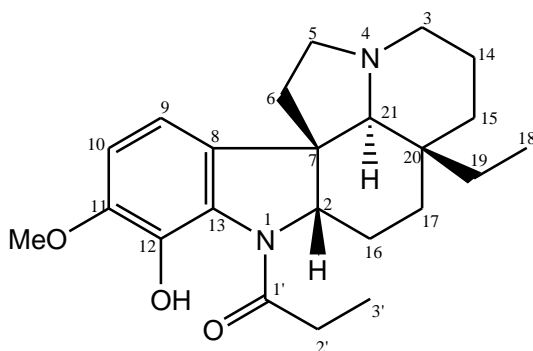
5.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO EXTRATO METANÓLICO DE *Aspidosperma discolor*.

Por meio das técnicas clássicas de cromatografia e pelas técnicas espectrométricas de elucidação estrutural foram isolados e caracterizados 3 compostos (**figura 8**), sendo eles os dois alcaloides indólicos aspideoscarpina (**20**) e aspidoimina (**21**) e o derivado acetilado do iridoide ácido logânico (**22**).

Figura 8 - Compostos isolados do extrato metanólico de *Aspidosperma discolor*



5.3.1 Determinação estrutural do alcaloide aspidolimina (21)



A substância presente na fração MCDi-8-4-3 se apresentou como um óleo amarelo, e foi revelada um alcaloide através do teste com o reagente dragendorff.

O espectro de massa de baixa resolução apresentou pico em $m/z = 384$, correspondente ao íon molecular $[M^+]$. Também foi possível observar a presença de pico base em $m/z = 124$, o que indica o fragmento $C_8H_{14}N^+$, que é típico de alcaloides semelhantes a aspidospermina (GUIMARÃES, 2013).

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – DEPTQ (**figura 10**) com a literatura permitiu reconhecer os sinais que correspondem a sete átomos de carbono não hidrogenados (cinco sp^2 , sendo um deles carbonílico em $\delta_C 172,8$) e dois sp^3), 4 carbonos metínicos (dois sp^2 e dois sp^3) e 9 metilênicos (todos sp^3) e 3 metílicos (incluindo um metoxílico em $\delta_C 56,52$) resumidos na **tabela 11**. A combinação destes dados com os dados fornecidos pelos espectros de 1H (**figuras 11-14**) e de massas (**figura 9**), possibilitaram propor, para o alcaloide MCDi-8-4-3, a fórmula molecular $C_{23}H_{32}N_2O_3 = (C)_6(C=O)(CH)_4 (CH_2)_9(CH_3)_2(MeO)(N)_2(OH)$, com nove graus de insuficiência ($C_{23}H_{50}N_2O_3 - C_{23}H_{32}N_2O_3 = H_{18}$), coerentes com a proposta para um esqueleto do tipo plumerano (esqueleto básico $C_{19}H_{26}N_2$ com oito graus de insuficiência, sendo quatro do anel aromático e quatro carbocíclicos) sustentando os grupos OH, MeO e $CH_3CH_2C=O$ (carbonila em $\delta_C 172,8$), que justificam a presença dos três átomos de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios; assim como o alcalóide aspidolimina, anteriormente isolado de *Aspidosperma limae* (GUIMARÃES, 2013).

A confirmação desta proposta pode ser baseada nos espectro de RMN 1H 1D (**figuras 11-14**) que revelaram a presença de dois sinais duplos, relativos a dois hidrogênios aromáticos em $\delta_H 6,62$ (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-9) e $\delta_H 6,68$ (1H, d, $J = 8,1$,

H-10), acoplado entre si com valores de J característico de acoplamento orto, condizente com um núcleo indólico 11-OMe, 12-OH dissustituído (GUIMARÃES, 2013).

Os substituintes no anel aromático e suas posições foram confirmados pela presença de sinais característicos no espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C . O sinal característico do carbono do grupo metoxila em δ_{C} 56,52 no espectro RMN ^{13}C .

A presença de uma função hidroxila foi confirmada pelo sinal característico do hidrogênio do grupo hidroxila em δ_{H} 10,97.

A presença do grupo etila ligado ao átomo de carbono sp^3 C-20 (tetrasustituído) foi reconhecida no espectro de RMN ^1H pelo sinal triplo do grupo CH_3 -18 em δ_{H} 0,65 (3H, t, $J = 7,5$ Hz) e pelos dois sinais múltiplos do grupo metilênico CH_2 -19 em δ_{H} 0,88 (1H, m, H-19a) e δ_{H} 1,44 (1H, m, H-19b).

A presença de carbonila ligada ao átomo de nitrogênio N-1 foi deduzida através do sinal em δ_{C} 172,88 do espectro de RMN ^{13}C , característico de uma função amida (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos restantes da molécula foi feita com base nos dados adicionais fornecidos pelos espectros 1D de RMN, nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

Os dados de espectros de RMN e de massas (**figura 9**) acima relatados para o alcaloide revelaram-se em acordo com os dados descritos na literatura (PINAR et al., 1962; GUIMARÃES, 2013) para o alcalóide aspidolimina (**21**), previamente isolado de *A. limae* e *A. obscurinervium*.

O **esquema 1** resume a proposta de fragmentação do alcaloide aspidolimina no espectrômetro de massas, com base no espectro (**figura 15**), justificando-se somente o pico base em $m/z = 124$ (100%). O pico em $m/z 383$ ($[\text{M}]^+ \cdot -\text{H}$) apareceu com abundância relativa significativa (27,8 %) e foi justificado através de eliminação do radical hidrogênio hidroxílico, sem ignorar as outras possibilidades envolvendo os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos metínicos CH-2 e CH-21 e metilênicos CH_2 -3 e CH_2 -5.

Line#:4 R.Time:22.8(Scan#:2435)

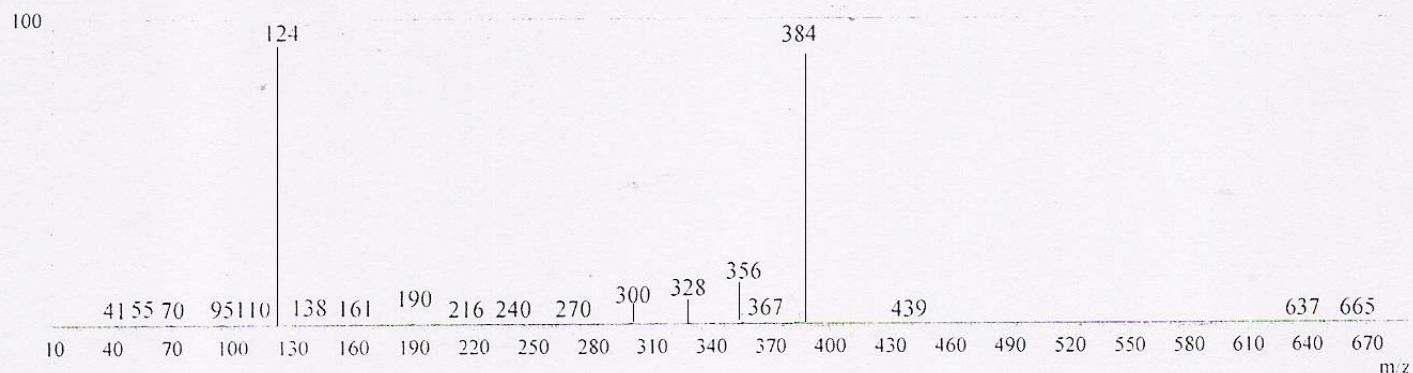


Figura 9 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o alcaloide 21

Esquema 1 - Proposta de fragmentação para os alcaloides aspidoescarpina e aspidoimina (GUIMARÃES, 2013)

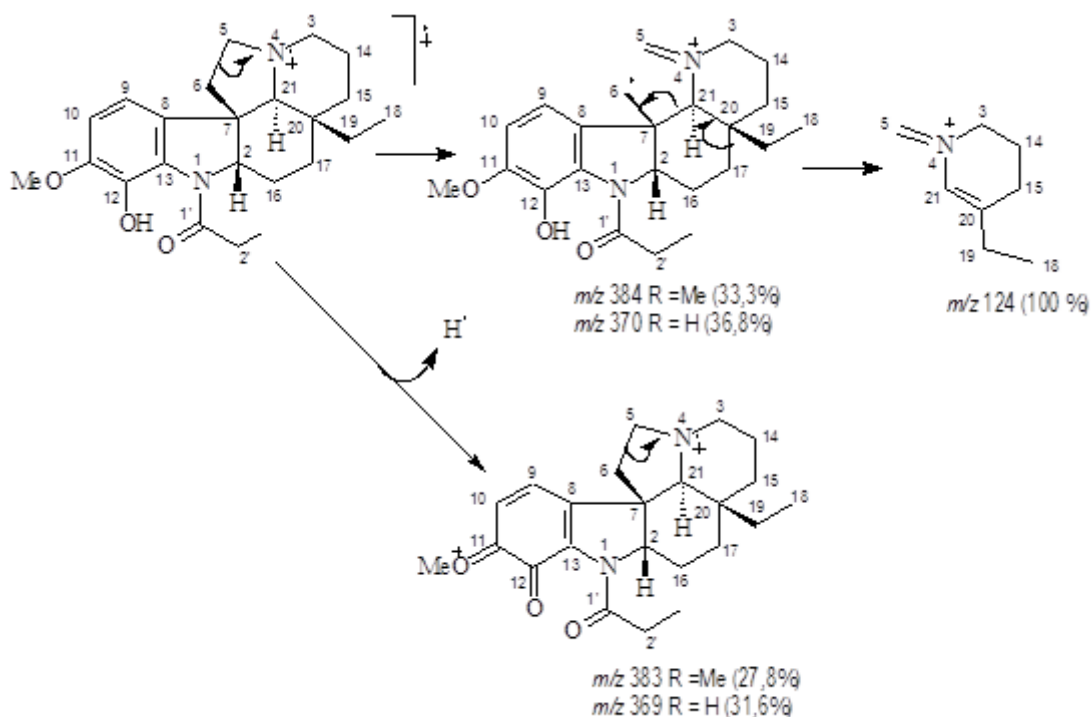
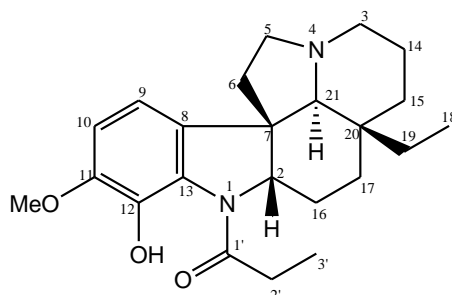
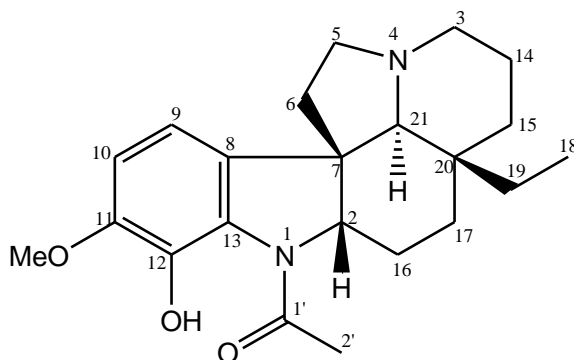


Tabela 11 - Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do alcaloide aspidolimina (**21**), em comparação com valores de referência da literatura (GUIMARES,2013 (*))



	ASPIDOLIMINA		Aspidolimina (*)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
7	52,21	-	52,2	-
8	133,10	-	133,1	-
11	149,41	-	149,4	-
12	137,56	-	137,6	-
13	127,79	-	127,0	-
20	35,53	-	35,5	-
1'	172,88	-	172,8	-
CH				
2	69,20	4,07 (m)	69,2	4,10 (m)
9	112,37	6,62 (d, 8,1)	112,2	6,60 (d, 8,2)
10	109,97	6,70 (d, 8,1)	110,0	6,68 (d, 8,2)
21	70,75	2,24 (s)	70,7	2,23 (s)
CH₂				
3	53,75	3,05 (dl);(10,0); 1,88 (m)	53,7	2,98; 1,97
5	52,50	3,13 (tl);(7,9); 2,27	52,5	3,05; 2,27
6	39,29	2,05 (m); 1,60 (m)	39,3	2,01; 1,50
14	21,53	1,85 (m); 1,20 (m)	21,5	1,70; 1,40
15	34,05	1,70 (m); 1,05 (m)	34,0	1,65; 1,08
16	25,33	1,99 (m); 1,45 (m)	25,4	1,85; 1,45
17	22,71	1,86 (m); 1,12 (m)	22,5	2,00; 1,13
19	30,11	1,44 (m); 0,88 (m)	30,7	1,37 (m); 0,86 (m)
2'	28,10	2,62; 2,34	28,1	2,62-2,40 (m)
CH₃				
18	6,80	0,65 (t; 7,5)	6,7	0,64 (t, 7,0)
2'	-			
3'	9,95	1,33 (t)	9,9	1,26 (t, 7,0)
MeO	56,52	3,91 (s)	56,5	3,87(s)
HO	-	10,97 (s)	-	10,98 (s)

5.3.2 Determinação estrutural do alcaloide aspidoscarpina (20)



A substância presente na fração MCDi-9-2-2, se apresentou como um óleo laranja e foi revelado também como um alcaloide pelo teste com o reagente dragendorff.

O espectro na região do infravermelho (**figura 15**) revelou bandas em torno de ν_{\max} 2926 cm^{-1} (característico de estiramento C-H), em adição a outras bandas em ν_{\max} 1633, 1462, 1249 cm^{-1} (característica do estiramento C=C do anel benzênico) (PAVIA, 2010).

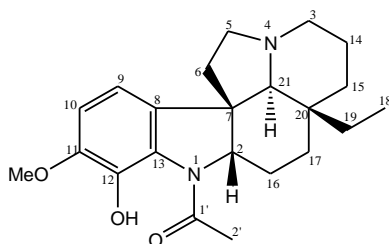
Com base na similaridade espectral da substância (**20**) com a (**21**), utilizou-se o mesmo procedimento analítico para caracterização estrutural. Os espectros RMN ^{13}C -DEPTQ (**figura 16**) e RMN ^1H (**figuras 17-20**), possibilitaram propor (**tabela 12**), para **20**, a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ = (C)6(C=O)(CH)4(CH₂)8(CH₃)2(MeO)(N)2(OH), com nove graus de insuficiência ($\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_3 - \text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 = \text{H}_{18}$), coerentes com a proposta para um esqueleto do tipo plumerano (esqueleto básico $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2$ com oito graus de insuficiência – quatro do anel aromático e quatro carbocíclicos) sustentando os grupos OH, MeO e $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ (carbonila em δ_{C} 169,38), que justificaram a presença dos três átomos de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios, em pleno acordo com o alcaloide aspidoscarpina (**20**), anteriormente isolado (MCLEAN, et al., 1960; GUIMARÃES, 2013).

A presença de carbonila ligada ao átomo de nitrogênio N-1 foi deduzida através do sinal em δ_{C} 169,38 do espectro de RMN ^{13}C , característico de uma função amida (BREITMAIER e VOELTER, 1987). Esse carbono carbonílico (C-1') apresentou correlações à longa distância com os 3H-2' (um sinal simpleto δ_{H} 2,33, $^2J_{\text{HC}}$) no espectro de HMBC (**figura 21**), caracterizando-se também a ligação de C-1' a um grupamento metila ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), sendo esta a principal diferença entre esta

molécula (**20**) e a anteriormente discutida aspidolimina (**21**). Outras correlações heteronucleares observadas nos espectros de HSQC (**figura 22**) e HMBC foram resumidas na **tabela 12**.

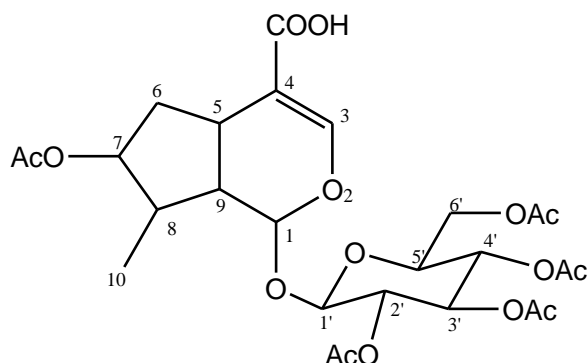
A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos restantes da molécula foi feita com base nos dados adicionais fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN, nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

Tabela 12 - Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcaloide aspidocarpina (**20**), em comparação com valores de referência da literatura (MCLEAN et al., 1987 (*))



C	ASPIDOSCARPINA				Aspidocarpina (*)	
	HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
7	52,10	-	H-2; 2H-6; H-21	2H-5; H-9	52,2	
8	133,13	-		H-2; H-21	133,1	
11	149,38	-	H-10	H-9; MeO-11; HO-12	149,5	
12	137,49	-	HO-12	H-10	137,5	
13	127,50	-		H-2; H-9; HO-12	127,5	
20	35,50	-	2H-19	3H-18	35,5	
1'	169,38	-	Me do Ac		169,3	
CH						
2	70,31	4,07 (m)		2H-6; H-21	70,3	4,07 (dd11,6)
9	112,38					6,61 (d, 8)
10	109,99					6,69 (d,8)
21	70,73					6,62 (d; 8,1)
CH₂						6,70 (d; 8,1)
3	53,74	3,05 (dt); 1,88 (m)		H-5B	53,7	2,24 (s)
5	52,32	3,13 (tl); 2,27			52,4	
6	39,41	2,05 (m); 1,60 (m)	2H-5	H-2	39,4	1,57 (m); 2,04 (m)
14	21,52	1,85 (m); 1,20 (m)	H-15b		21,5	1,72 (tm,12) 1,53 (dm,12)
15	34,04	1,70 (m); 1,05 (m)		H-3a, 2H-19	34,0	1,65 (td, 12,4) 1,11(td, 12,4)
16	25,12	1,99 (m); 1,45 (m)			25,1	1,86 (m); 1,52 (m)
17	22,91	1,86 (m); 1,12 (m)		H-15b; 2H-19; H-21	22,9	2,0 (td,12, 14) 1,15 (dm, 12)
19	30,09	1,44 (m); 0,88 (m)	3H-18	H-21	30,0	1,44 (m); 0,93 (m)
CH₃						
18	6,79	0,65 (t; 7,5)	2H-19		6,8	0,63 (t, 7,5)
2'	22,74	2,33 (s)			22,7	2,33 (s)
MeO	53,74	3,89 (s)			56,4	3,88 (s)
HO	-	10,97 (s)				10,98 (s)

5.3.3 Determinação estrutural do derivado acetilado do iridóide ácido logânico (22)



O composto **22** foi isolado como óleo marrom claro solúvel em metanol, apresentando fluorescência sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

O espectro da região do infravermelho do composto **22** (**figura 23**, **pág.**) apresentou bandas de absorção de OH referente a ácido carboxílico (3429 cm^{-1}), de C=O (1749 cm^{-1}), de C=C (1641 cm^{-1}), indicando a presença de grupo olefínico, e C-O-C (1219 cm^{-1}) (SILVERSTEIN, 2006; PAVIA et al., 2010).

A estrutura do composto **22** foi completamente elucidada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais. A análise do espectro de DEPTQ e HSQC, evidenciou a presença 26 átomos de carbono na estrutura.

A análise conjunta dos espectros de DEPTQ (**figura 24**) e HSQC (**figura 29**) sugeriu a presença de dois grupos acetais em C1 e C1' (δ_c 94,95 e 96,04), dois olefínicos em C3 e C4 (δ_c 151,13 e 112,86), um metilênico em C10 (δ_c 12,13), dois metínicos em C5 e C9 (δ_c 29,60 e 45,34), um carbono carboxílico em C11 (δ_c 171,85), além de uma unidade glicosídica.

No espectro de DEPTQ observou-se os sinais em δ_c 151,13 (CH-3) e δ_c 112,86 (C-4) sugerindo a ocorrência de uma insaturação entre esses átomos de carbono. O espectro de RMN ^1H (**figuras 25-28**) apresentou um singleto em δ_H 7,40 (H-3) confirmando a insaturação entre CH-3 e C-4. O mapa de correlação HMBC confirma a presença da insaturação, pois mostra a correlação para C-3 a $^3J_{\text{CH}}$ entre C-3 (δ_c 151,13)/H-1 (δ_H 5,25)/H-5 (δ_H 3,02) e para C-4 a $^2J_{\text{CH}}$ entre e C-4 (δ_c 112,86)/H-3 (δ_H 7,40)/H-5 (δ_H 3,02) e a $^3J_{\text{CH}}$ entre C-4 (δ_c 112,86)/H-6a (δ_H 2,26)/H-6b (δ_H 1,85)/H-9 (δ_H 2,20).

O sinal em δ_c 38,75 mostra a presença do carbono metilênico C-6 que está correlacionado com dois sinais em δ_H 2,26 e 1,85 no espectro de HSQC. A

confirmação é dada pelo mapa de correlação HMBC que mostra a correlação a $^2J_{CH}$ entre C-6 (δ_C 38,75)/H-8 (δ_H 1,98) e a $^3J_{CH}$ entre C-6 (δ_C 38,75)/H-9 (δ_H 2,20).

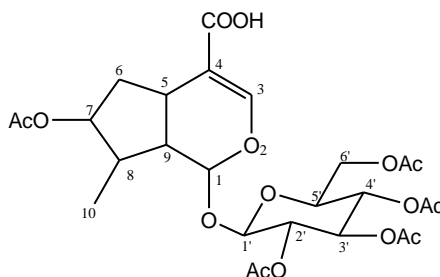
A presença do carbono metilênico ligado ao carbono metínico C-8 foi confirmado no espectro de DEPTQ, pelo sinal em δ_C 12,13 (C-10), correlacionado com um sinal em δ_H 1,04 (d, 6,6; 3H-10) no espectro de HSQC. A correlação heteronuclear, observada no mapa de correlação HMBC a $^2J_{CH}$ entre C-8 (δ_C 38,86)/3H-10 (δ_H 1,04) e a $^3J_{CH}$ entre C-7 (δ_C 38,86)/3H-10 (δ_H 1,04) e C-9 (δ_C 45,33)/3H-10 (δ_H 1,04) confirma a presença da metila nesta posição.

A presença do grupo carboxílico ligado ao C-4 do núcleo iridoidal (δ_C 112,86) pode ser confirmada pela correlação heteronuclear apresentada no mapa de correlação de HMBC através da correlação a $^3J_{CH}$ entre C-11 (δ_C 171,85)/H-3 (δ_H 7,40).

As correlações existentes entre H10-C7, indicaram que o grupo oximetilênico encontra-se conectado ao núcleo iridoidal através do carbono C7. Ainda pelo espectro de HMBC as correlações entre H1a e C1' confirmou a presença da unidade glicosídica na posição C1 do núcleo iridoidal.

O composto **22** trata-se de um iridoide glicosilado do tipo secologanínico, denominado ácido logânico. Os dados espectrais de HSQC e HMBC do composto **22** encontram-se na **tabela 13**.

Tabela 13 - Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do iridoide (**22**)



ÁCIDO LOGÂNICO				
C	HMQC		HMBC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
4	112,86	-	H-3; H-5	2H-6; H-9
11	171,85	-		H-3
AcO-7	170,71	-		H-7
CH				
1	94,95	5,25 (d; 3,4)	H-9	H-3; H-8; H-1'
3	151,13	7,40 (s)		H-1; H-5
5	29,60	3,02 (m)	H-6b	H-1; H-3; H-7
7	77,01	5,16 (tl, .4,4)		H-5; H-9; 3H-10
8	38,86	1,98 (m)	H-9; 3H-10	H-1; H-5
9	45,34	2,20 (m)	H-5; H-8	2H-6; H-7; 3H-10
CH₂				
6	38,75	2,26 (m); 1,85 (m)	H-8	H-9
CH₃				
10	12,13	1,04 (d; 6,6)		
AcO-7	20,23 ^a	1,95 (s) ^a		
Açúcar				
1'	96,04	4,87 (d; 8,1)	H-2'	H-1
2'	70,56	4,99 (dd; 8,1; 9,6)	H-1'	
3'	72,16	5,24 (t; 9,6)	H-2'; H-4'	
4'	68,18	5,11 (t; 9,6)	H-3'	2H-6'
5'	72,43	3,76 (ddd, 10,0; 4,4; 2,2)	H-4'; 2H-6'	
6'	61,70	4,31 (dd, 12,4; 4,4), 4,16 (dd, 12,4; 2,2)		H-4'
AcO-2'	169,17	-	MeCOO-2'	H-2'
AcO-3'	170,22	-	MeCOO-3'	H-3'
AcO-4'	169,44	-	MeCOO-4'	H-4'
AcO-6'	170,65	-	MeCOO-6'	H-6'
AcO-2'	21,09 ^a	2,10 (s) ^b		
AcO-3'	20,75 ^a	2,05 (s) ^b		
AcO-4'	20,70 ^a	2,04 (s) ^b		
AcO-6'	20,70 ^a	2,01 (s) ^b		

5.4 TESTE DE ATIVIDADE NEMATICIDA

Ao analisar o **gráfico 1** é possível observar que o alcaloide aspidolimina apresentou atividade de 33 % de L₃ (larvas no estágio infectante) mortas e o alcaloide aspidoscarpina apresentou atividade de 17% de L₃ mortas, esta atividade pode ser considerada alta, pois quando comparados com a atividade do controle positivo o anti-helmíntico comercial albendazol, os alcaloides apresentam atividade muito maior.

Estes valores mostram que os alcaloides tem grande potencial para serem utilizados como larvicidas no controle de nematodas.

Ao analisar o **gráfico 2** pode-se observar que nenhum dos dois alcaloides apresentaram atividade ovicida, pois a porcentagem de L₁ eclodidas é muito alto, mostrando que estes alcaloides não tem potencial para serem utilizados como ovicidas no controle de nematodas.

Quando comparada a estrutura do controle positivo Albendazol com as estruturas dos alcaloides testados (**figura 31**), é levantada a hipótese de a atividade larvicida dos alcaloides possa ser resultado de sua cadeia indólica, que também é apresentada na estrutura do Albendazol. E acredita-se que a modificação estrutural desses e outros alcaloides possam potencializar a atividade nematicida de tais compostos.

Figura 31 - Estrutura da aspidoscarpina, aspidolimina e albendazol

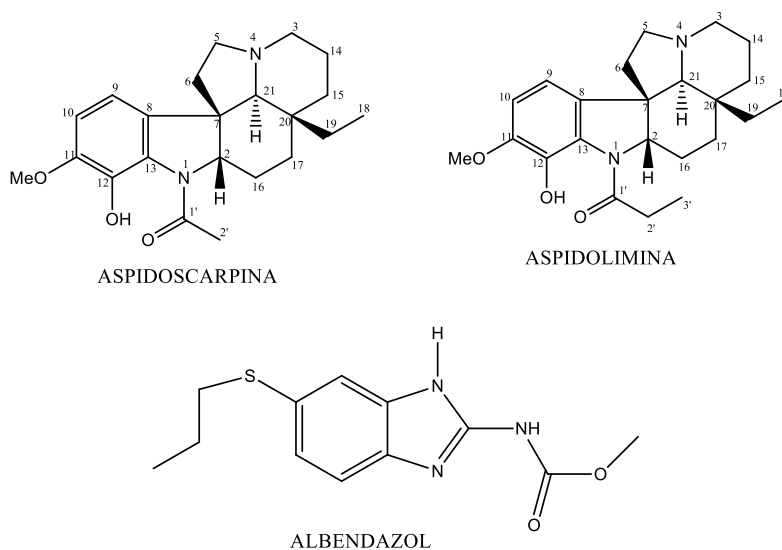


Gráfico 1 - Ensaio larvica para os alcaloides 20 e 21

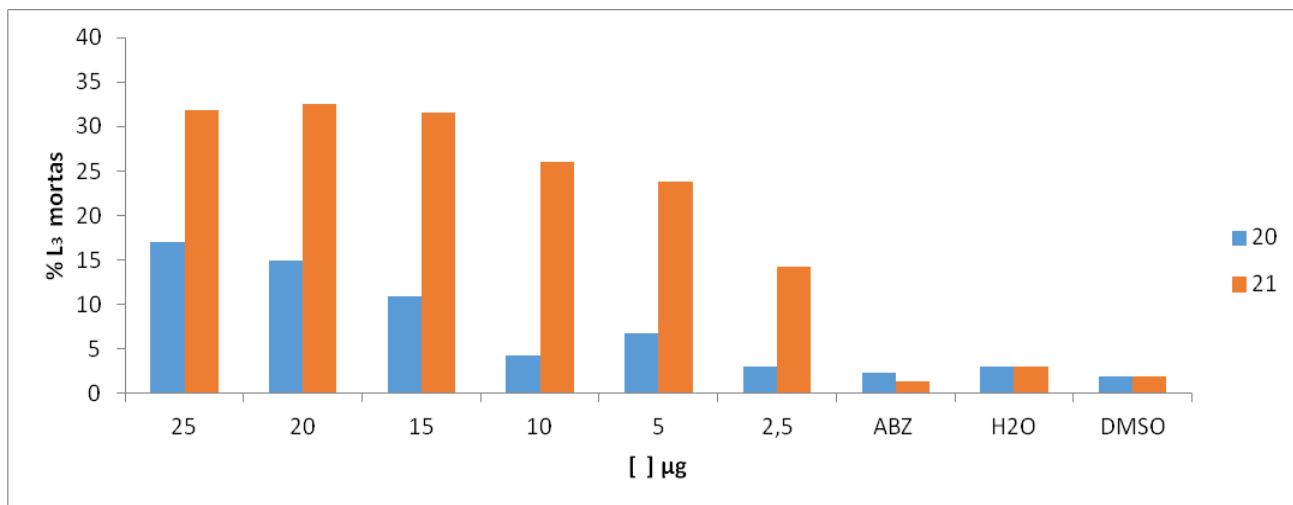
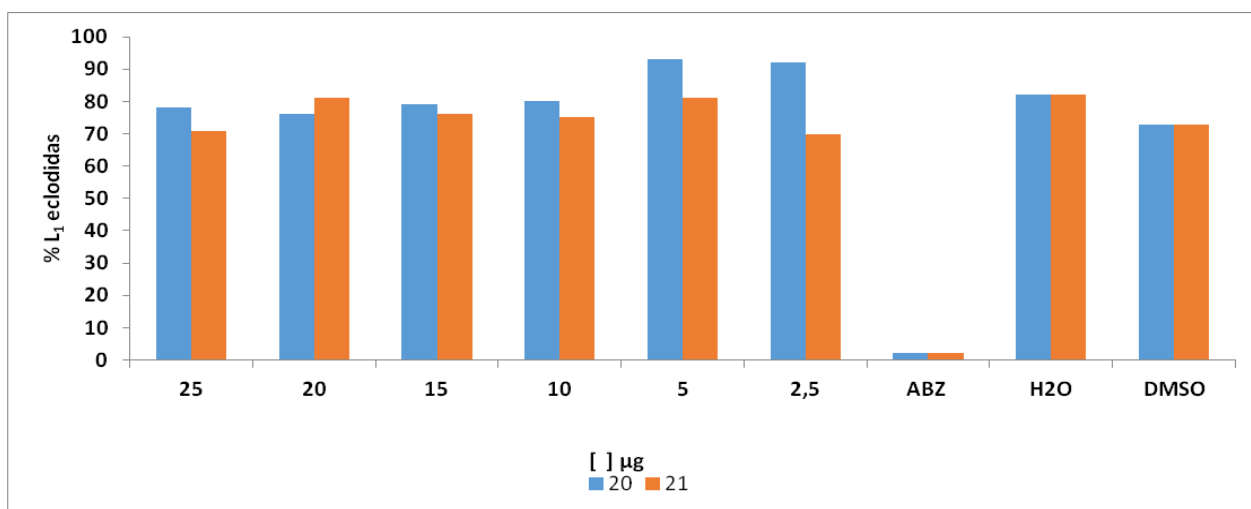


Gráfico 2 - Ensaio ovicida para o alcaloides 20 e 21



6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu o aprendizado das técnicas clássica de cromatografia, além do isolamento e identificação de três substâncias, sendo dois alcaloides (aspidoscarpina e aspidolimina) e o derivado acetilado de um iridoide (ácido logânico).

O alcaloide aspidolimina apresentou atividade larvicida de 33%, enquanto que aspidoscarpina apresentou atividade de 17%, que pode ser considerada baixa. Não foram observadas atividades ovicidas para os alcaloides.

Figura 10: Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl_3

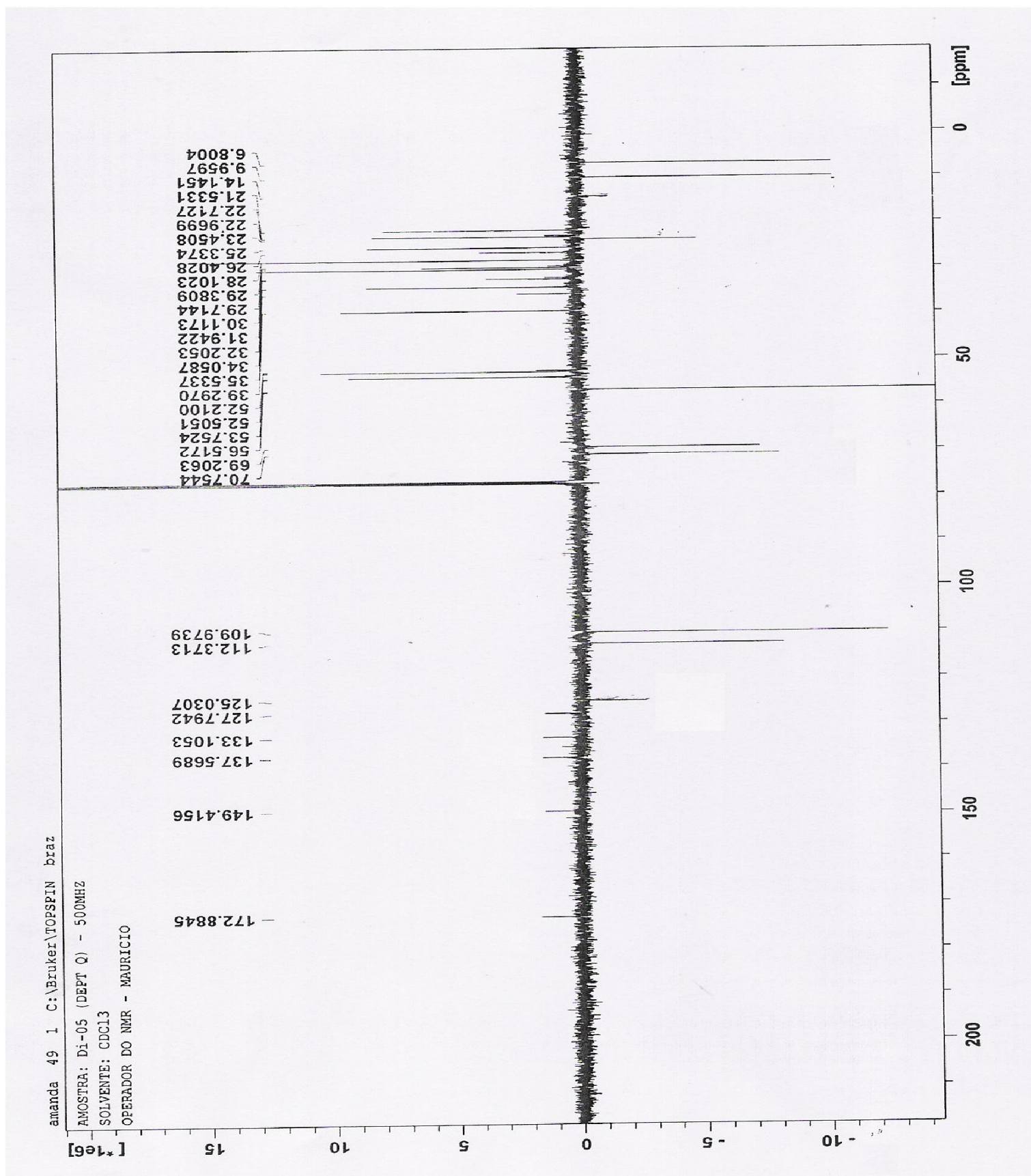


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl_3

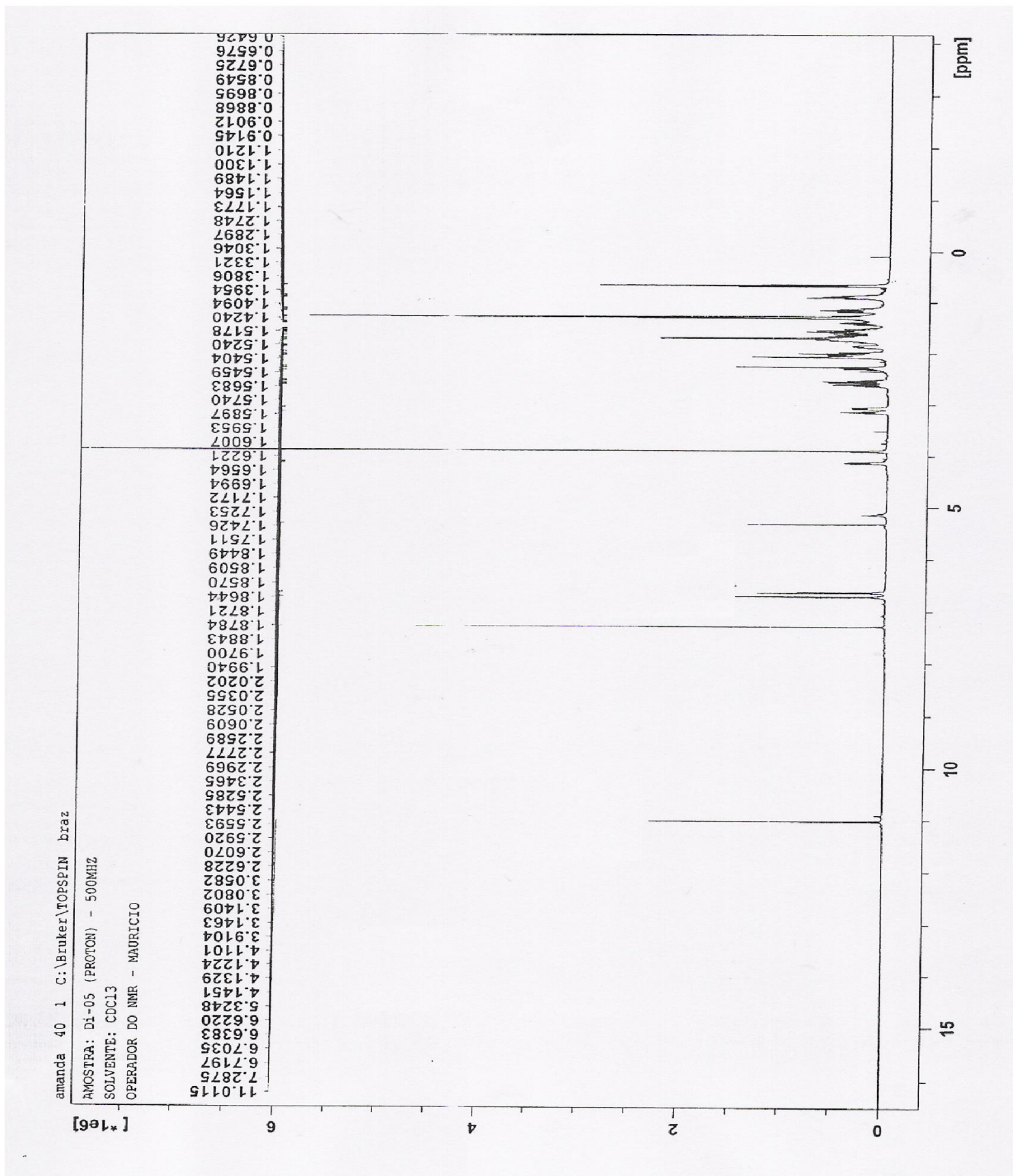


Figura 12: Ampliação da região de δ_H 3,5-11,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 21 em $CDCl_3$.

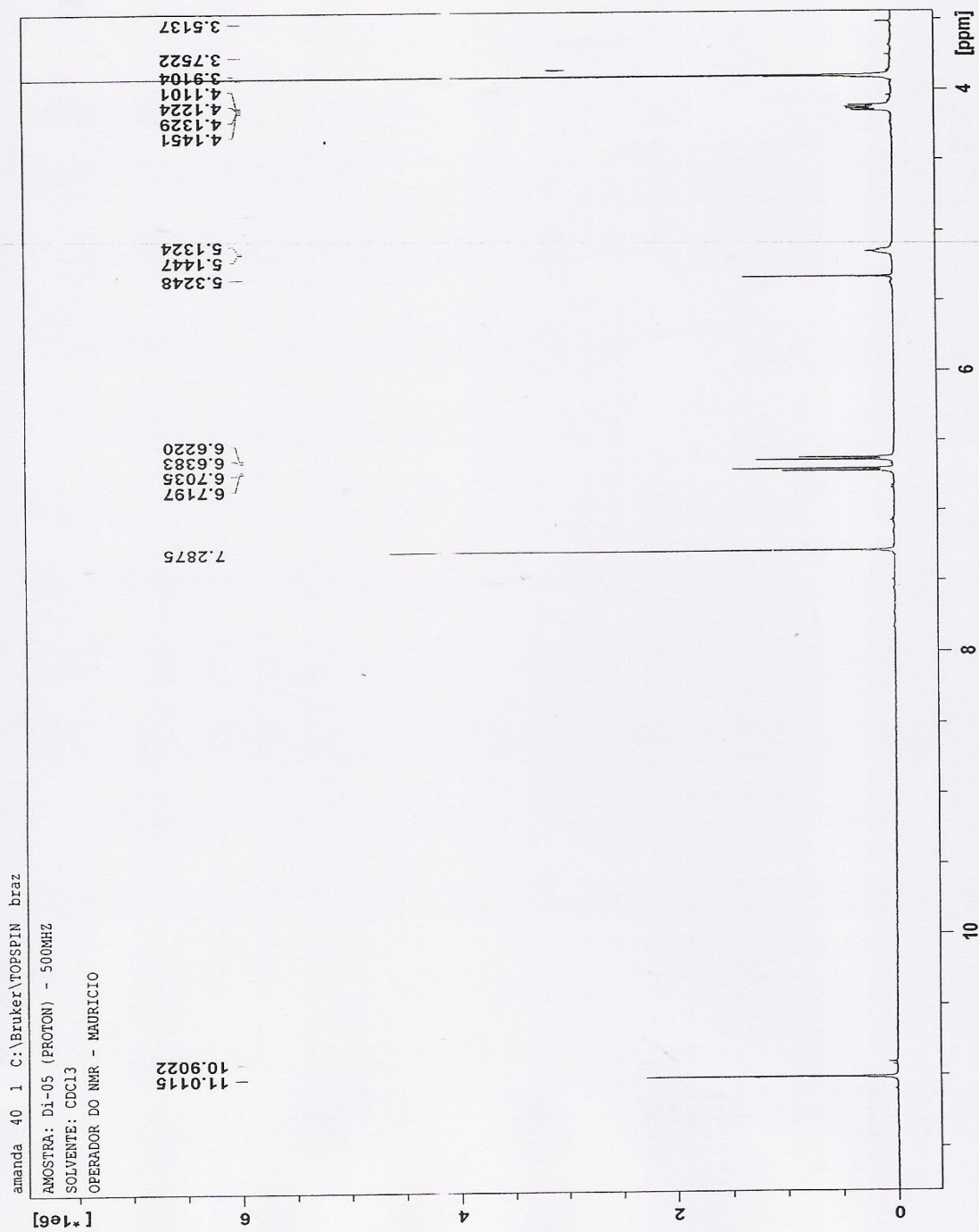


Figura 13: Ampliação da região de δ_H 1,8-3,2 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 21 em $CDCl_3$.

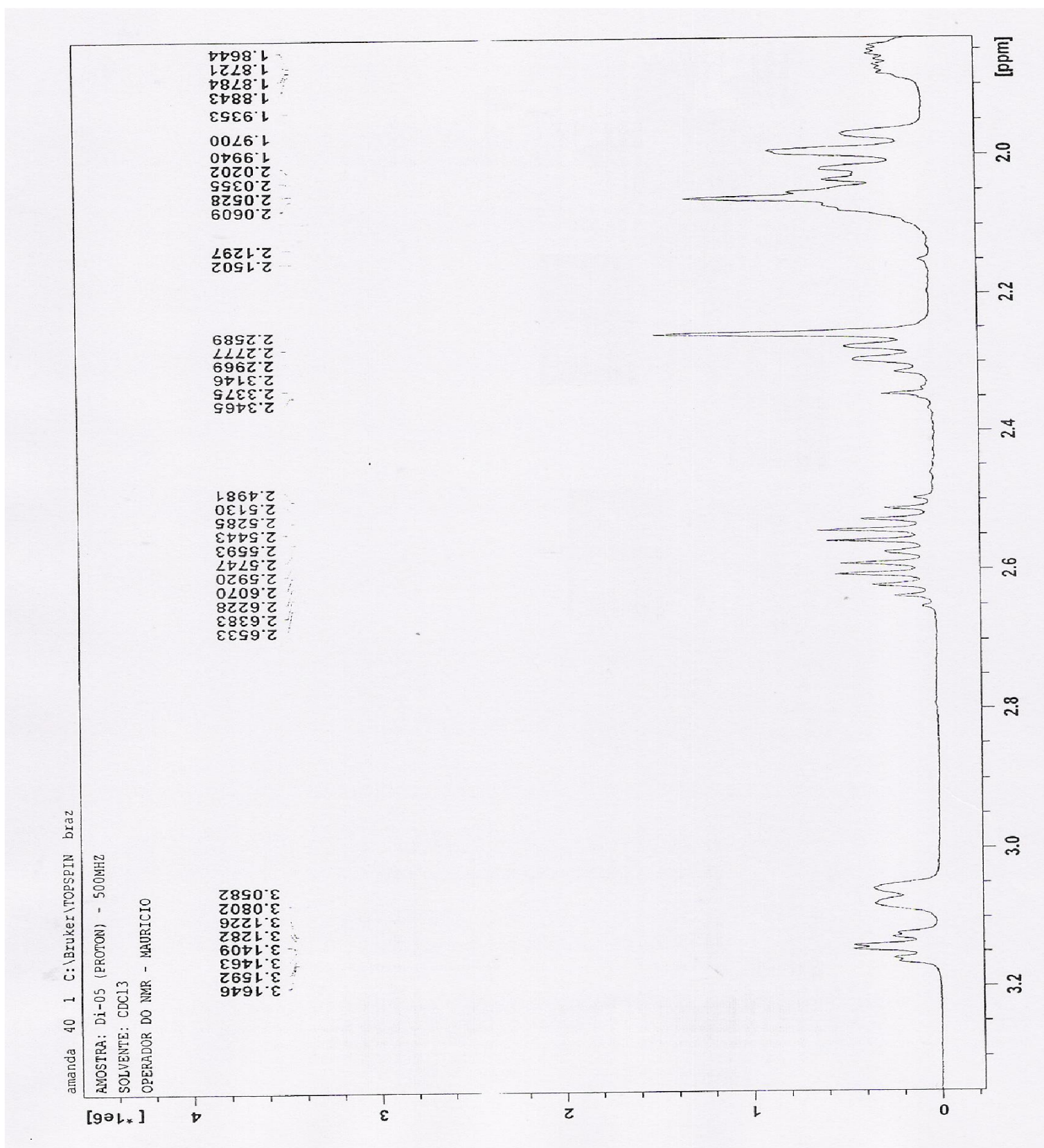


Figura 14: Ampliação da região de δ_H 0,6-2,1 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide **21** em $CDCl_3$.

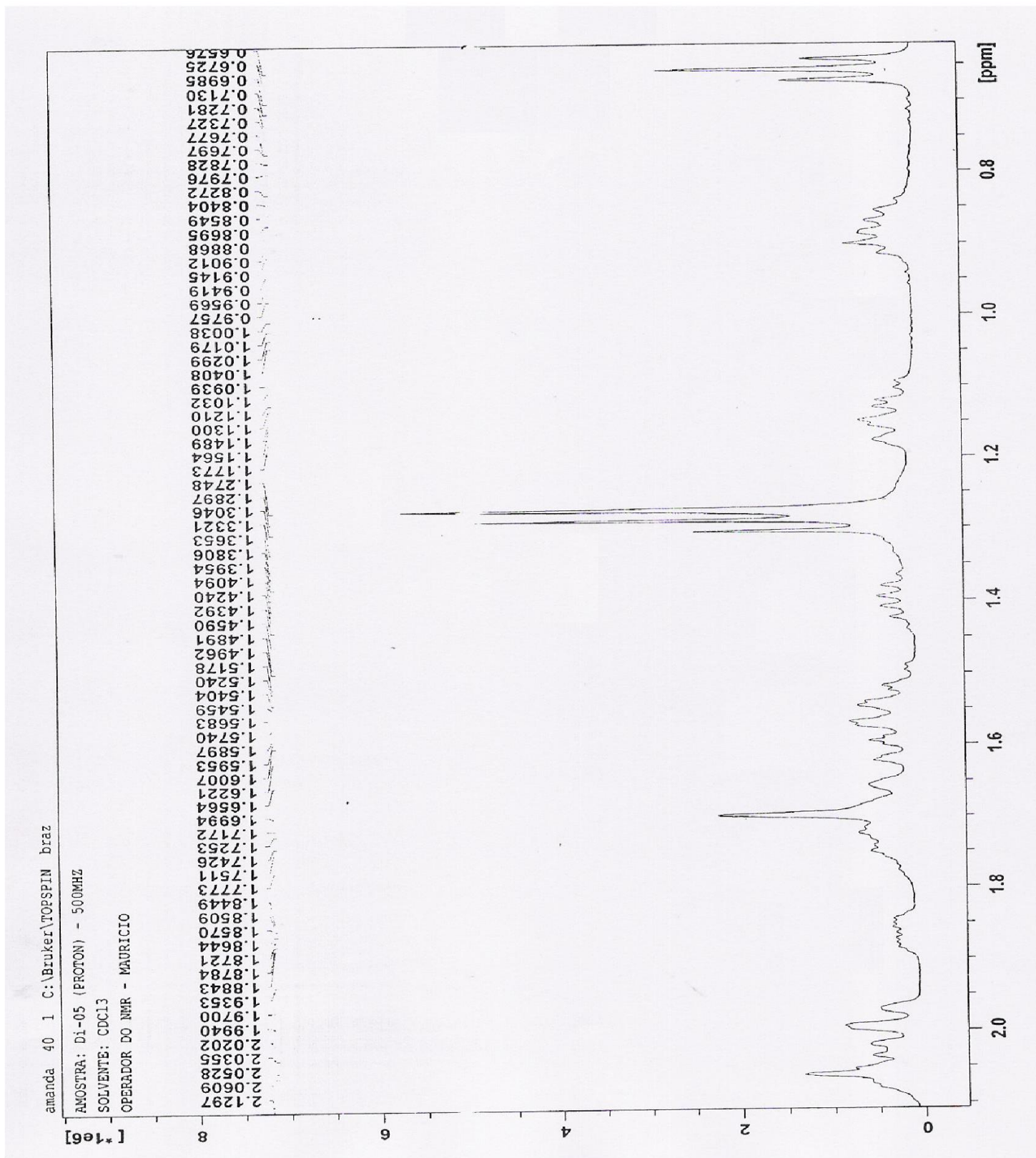
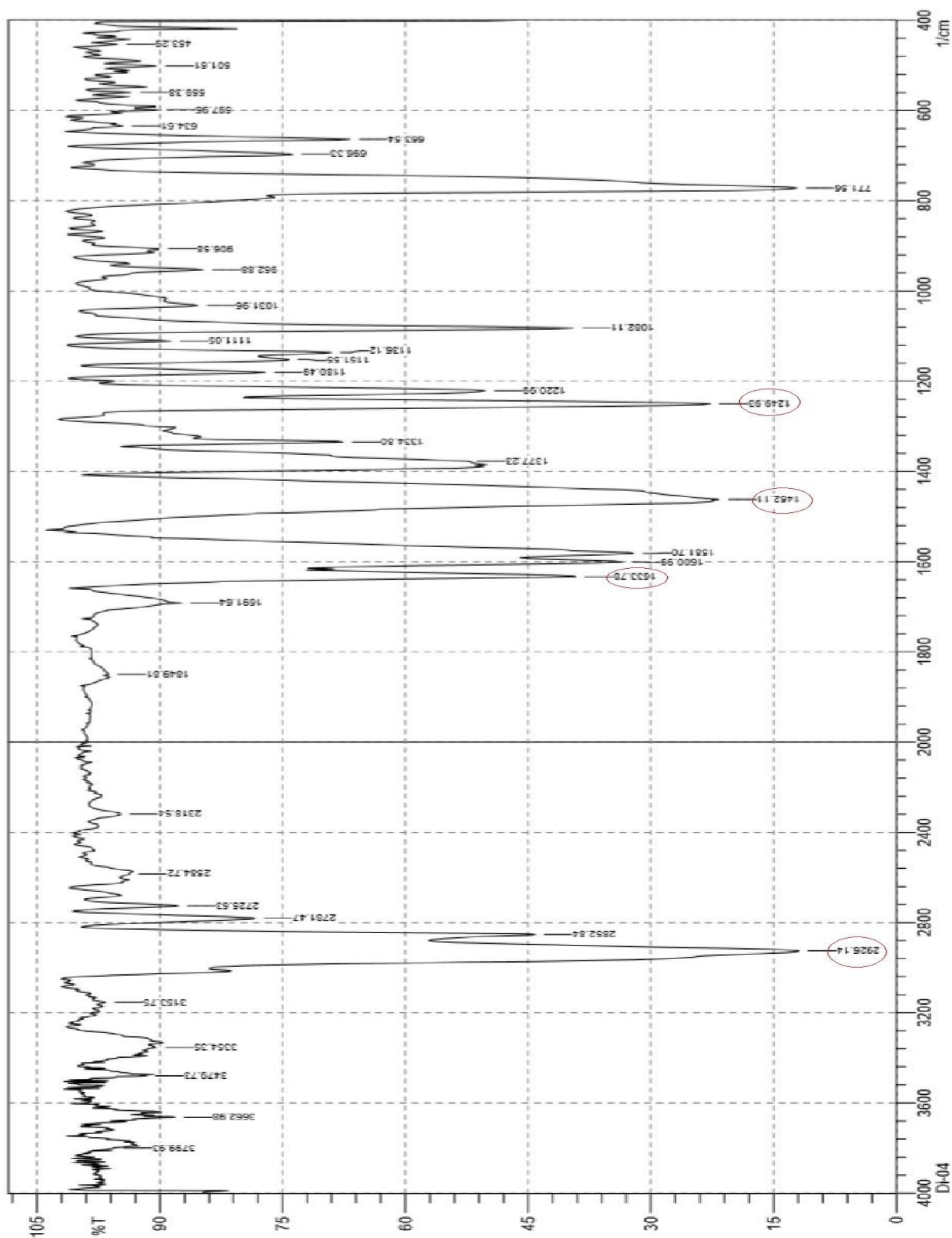


Figura 15 : Espectro na região do Infravermelho do alcaloide (20).



Date/Time: 19/3/2014 10:41:08

User: infra vermelho

No. of Scans:

Resolution:

Comment:

Di-04

Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (500 MHz) do alcaloide **20** em CDCl_3

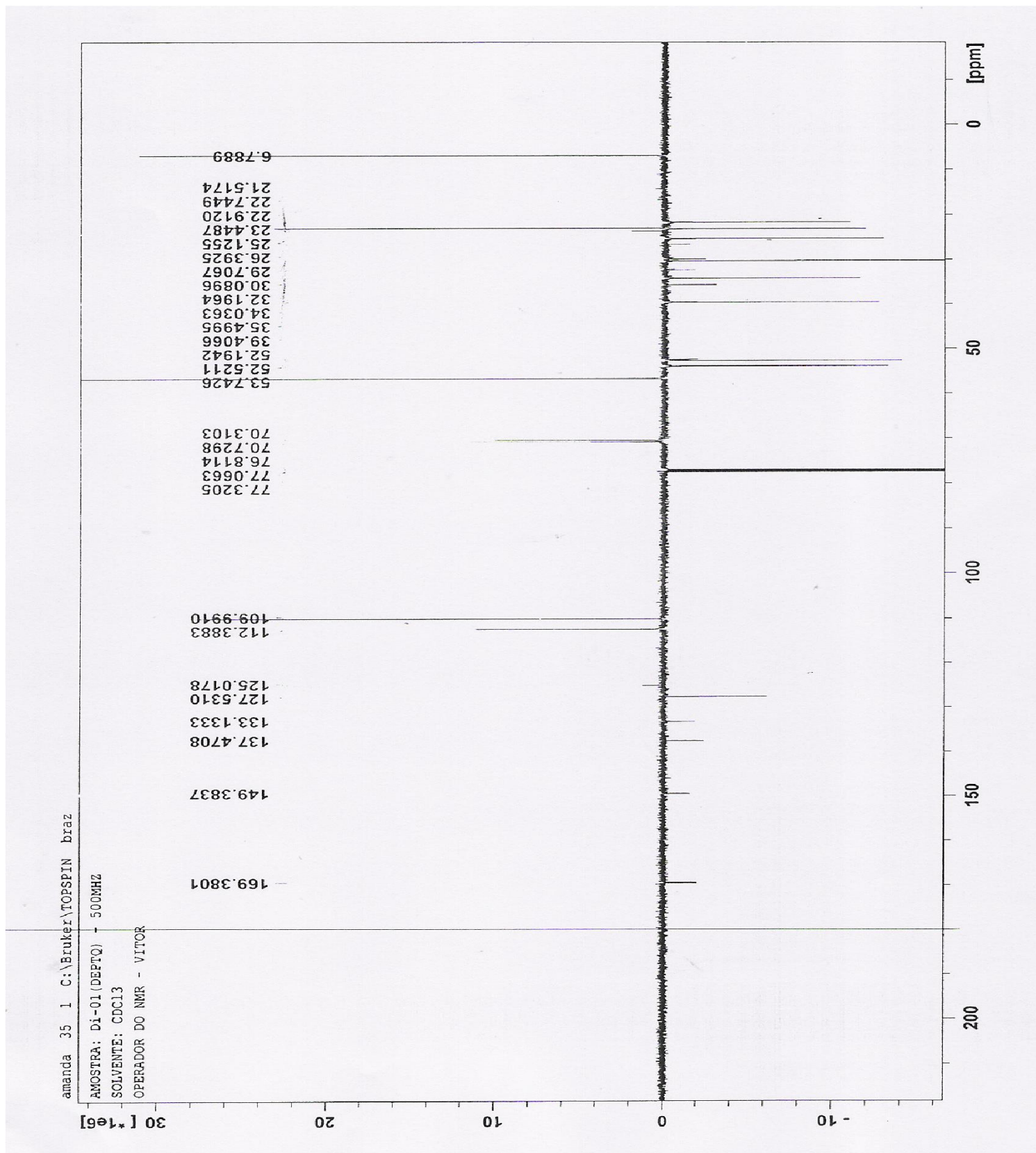


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) do alcaloide 21 em CDCl_3

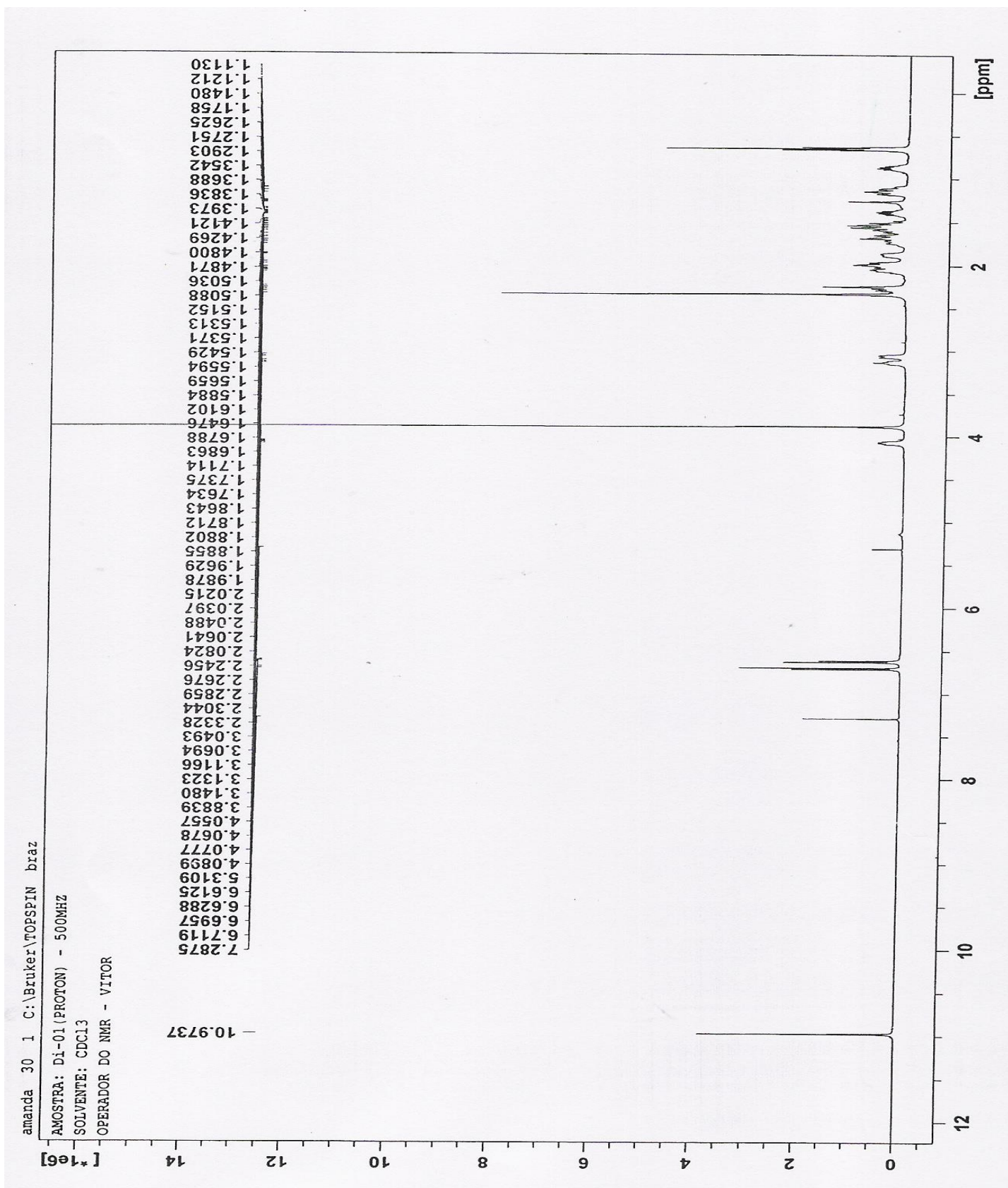


Figura 18: Ampliação da região de δ_H 5 - 11 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide **20** em $CDCl_3$.

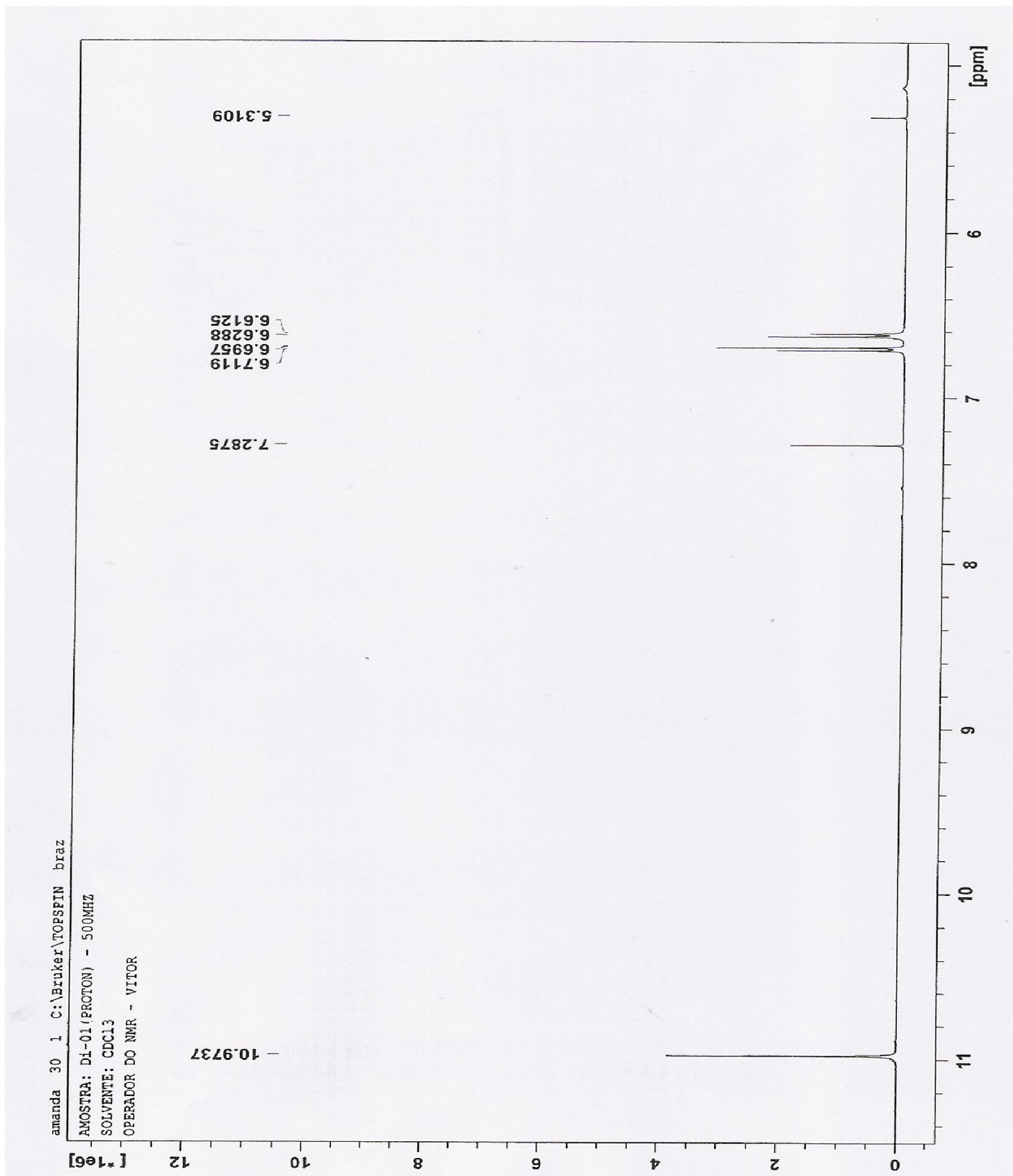


Figura 19: Ampliação da região de δ_H 2 – 5,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 20 em $CDCl_3$.

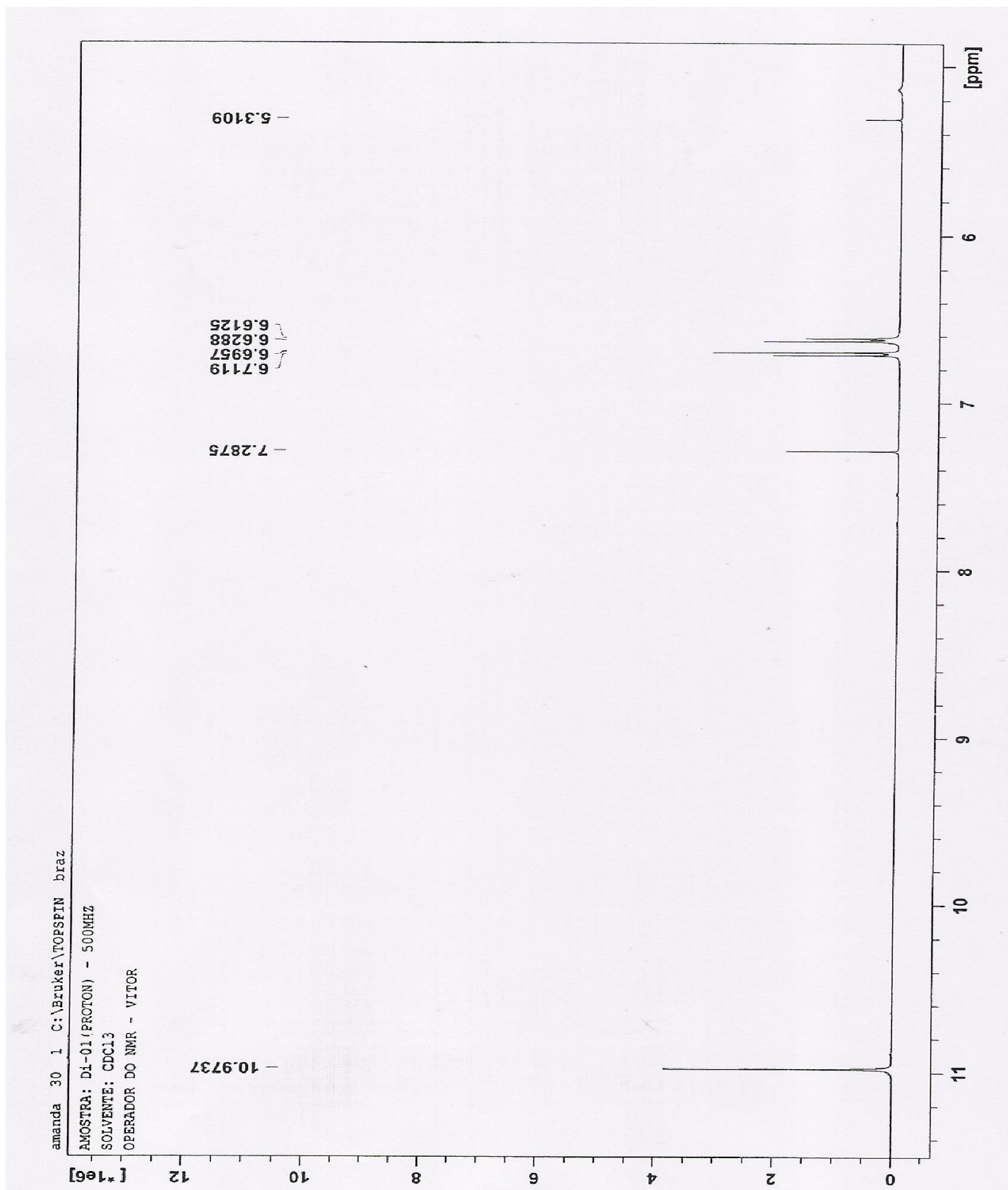


Figura 20: Ampliação da região de δ_H 0,6 – 2,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do alcaloide 20 em $CDCl_3$

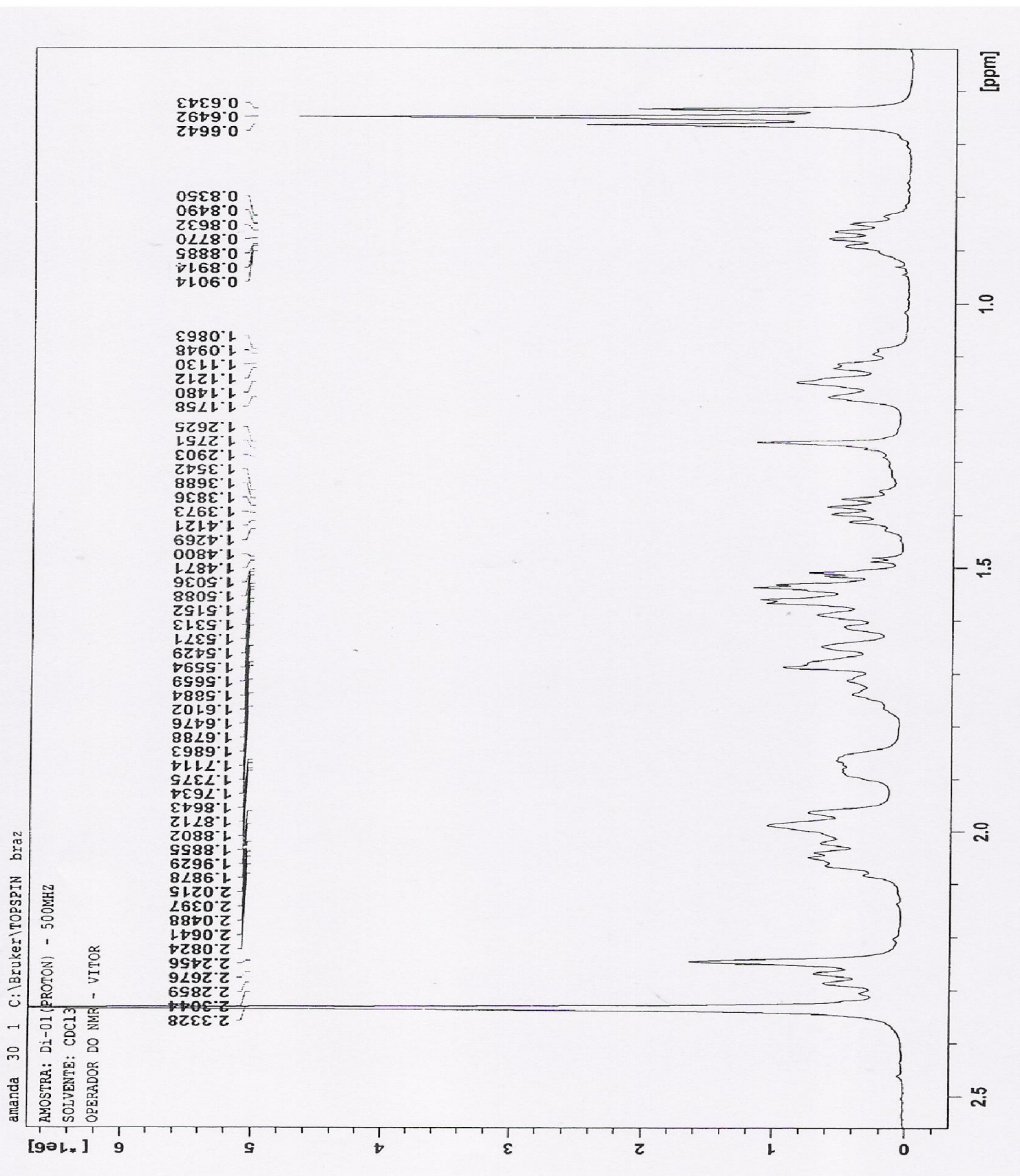


Figura 21: Mapa de correlação heteronuclear 2D HMBC do alcaloide **20** em CDCl₃.

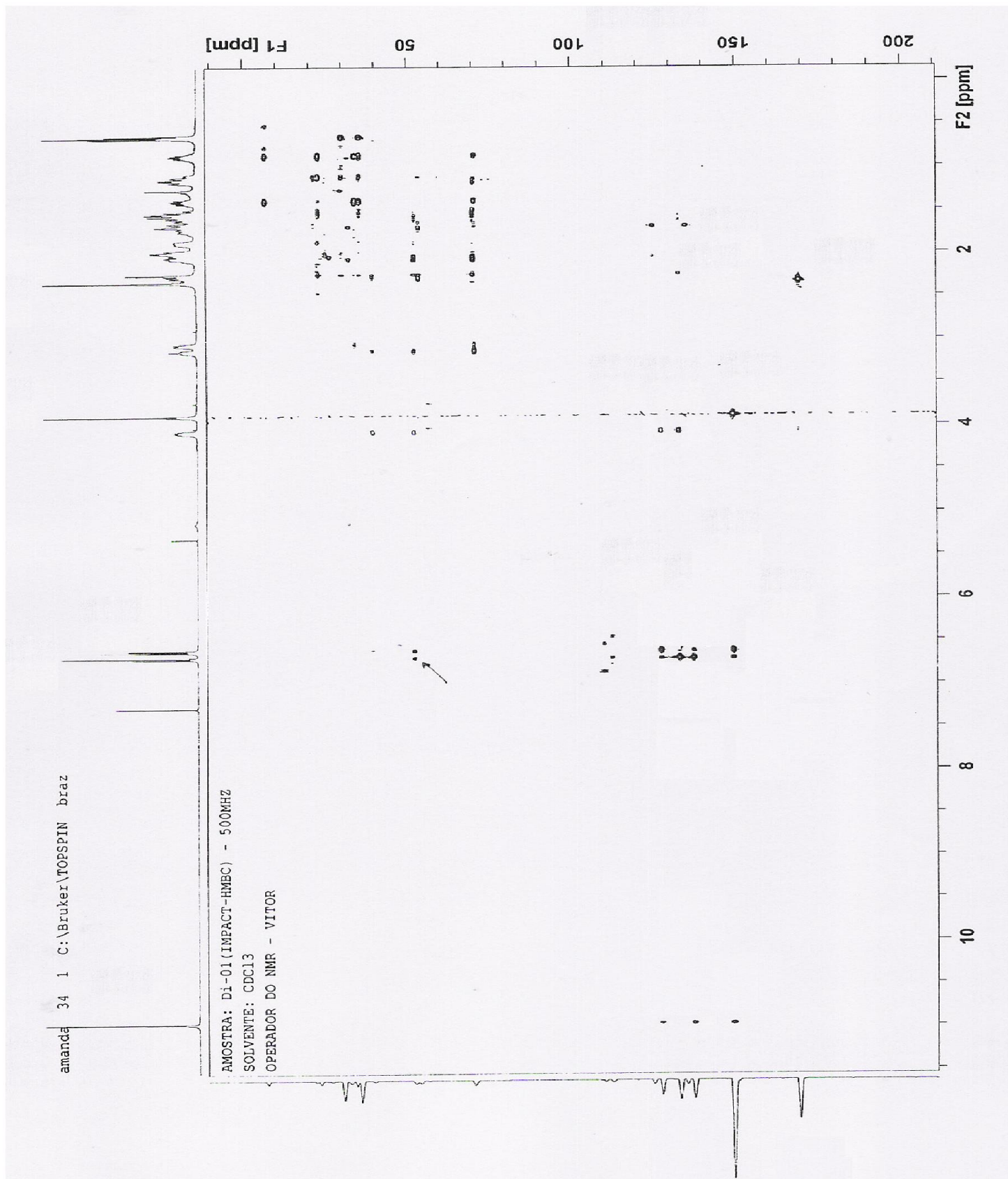


Figura 22: Mapa de correlação heteronuclear 2D HMQC ($^1J_{\text{HC}}$) do alcaloide (20) em CDCl_3 .

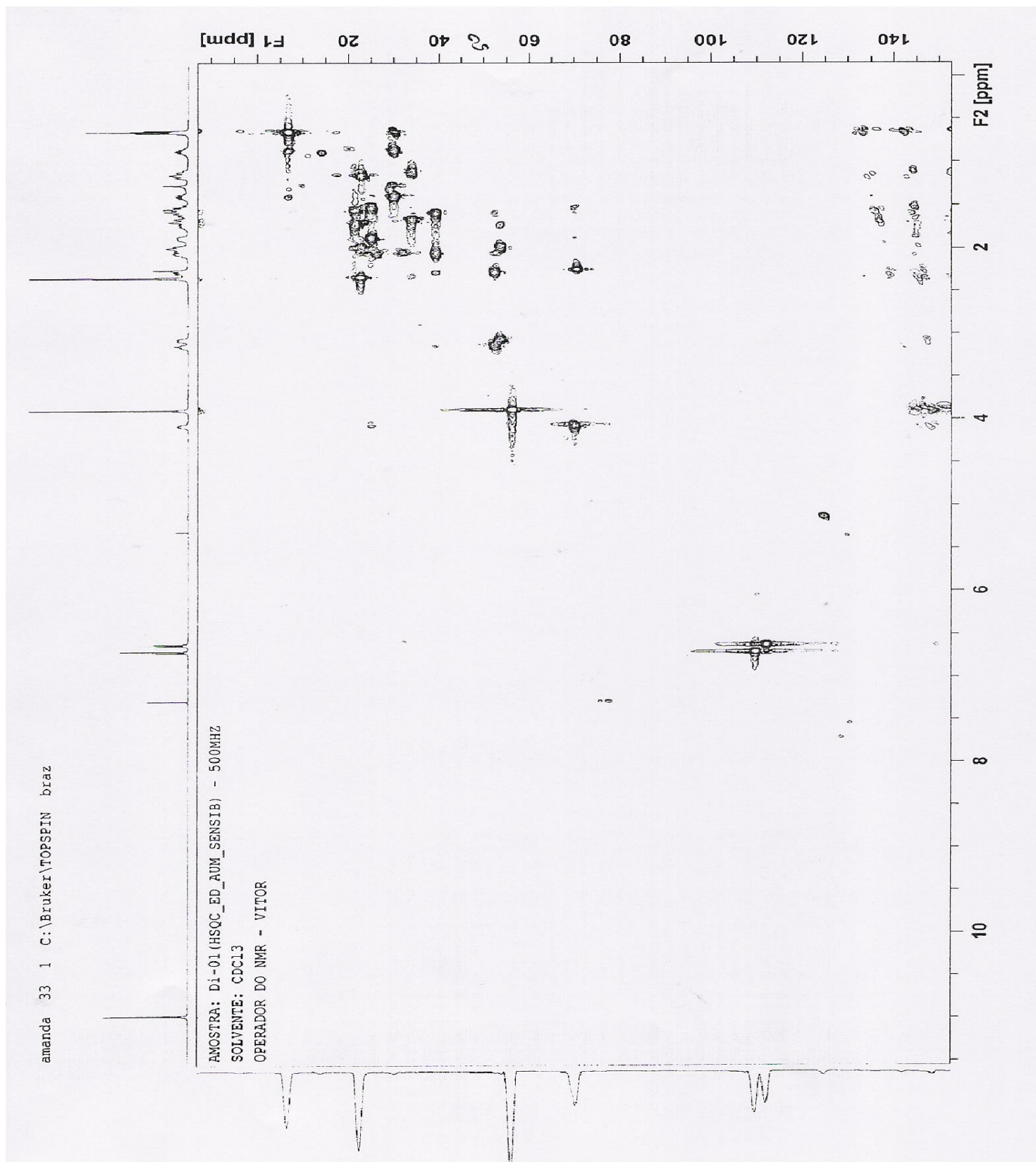


Figura 23 : Espectro na região do Infravermelho do iridoide (22).

SHIMADZU

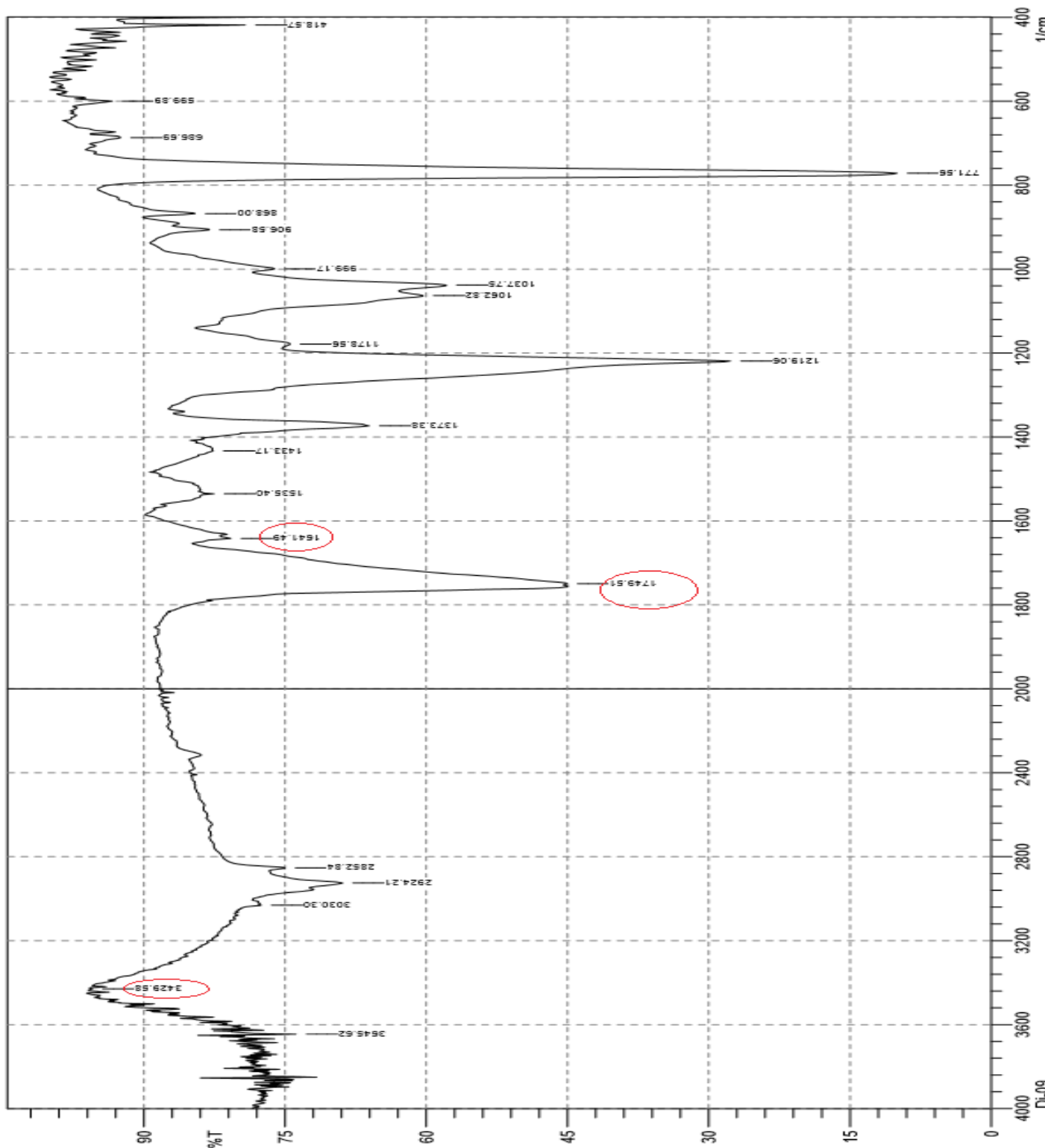


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (500 MHz) do iridoide **22** em CDCl_3

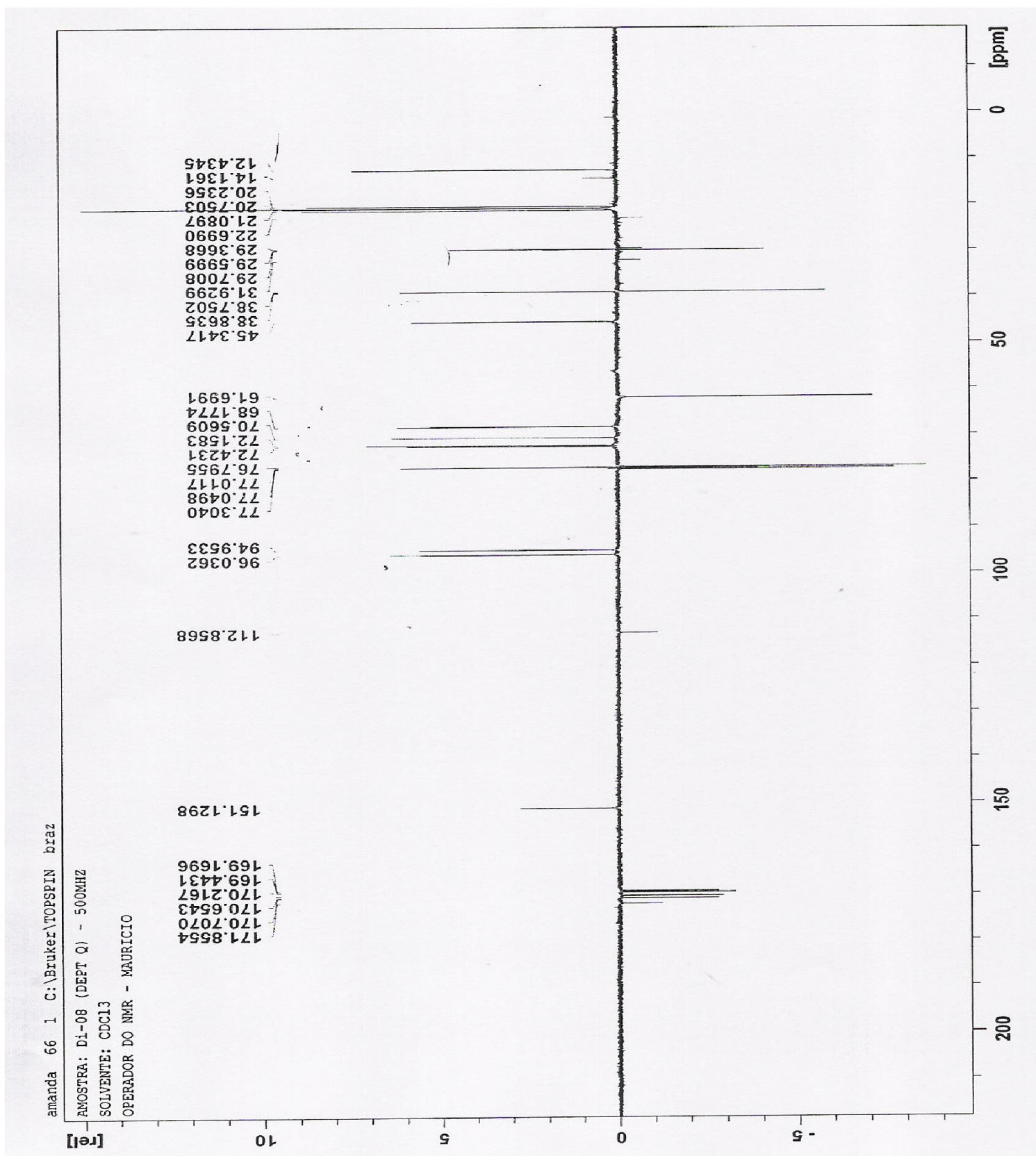


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) do iridoide **22** em CDCl_3

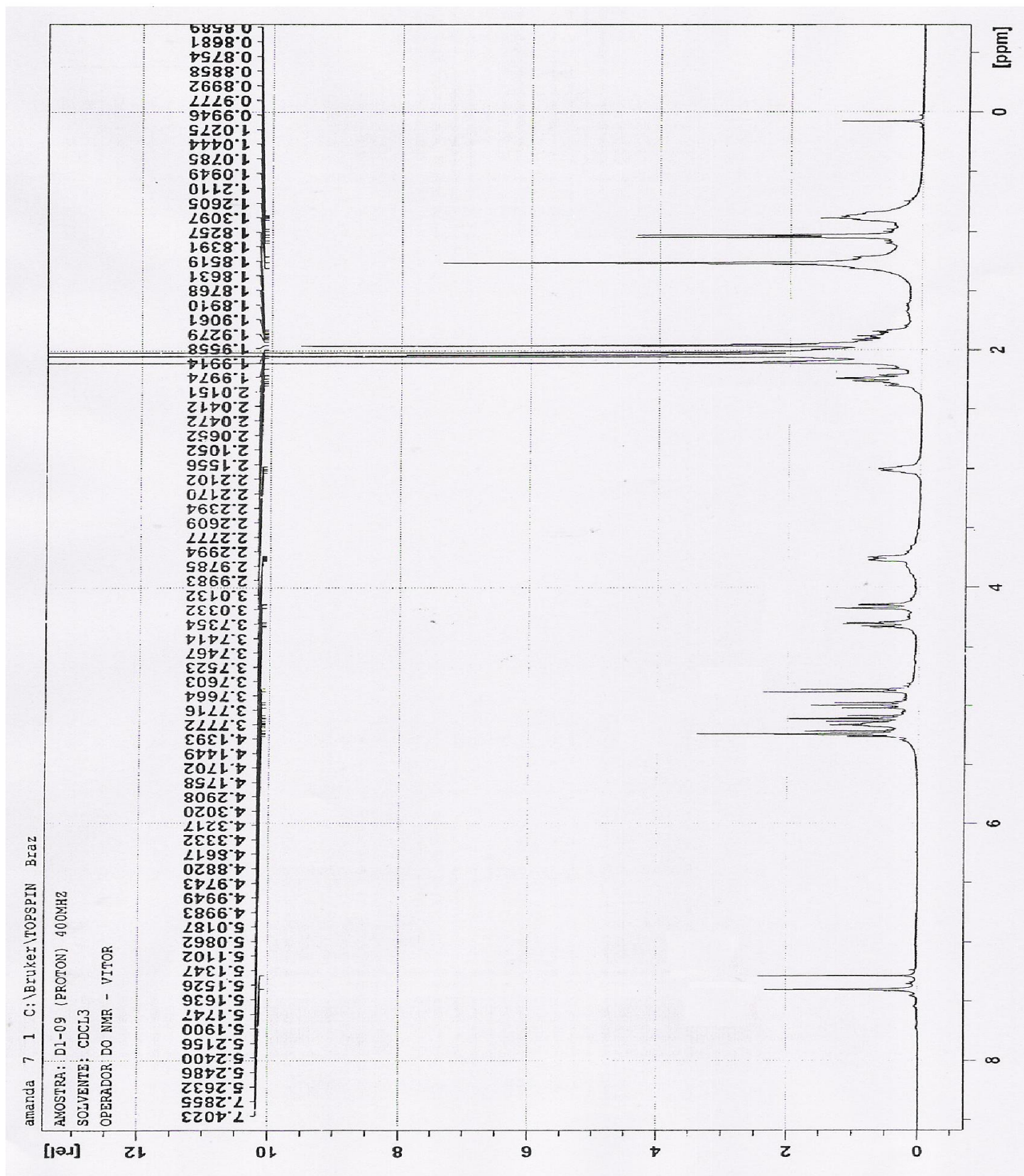


Figura 26 : Ampliação da região de δ_H 4,8 – 5,5 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do iridoide 22.

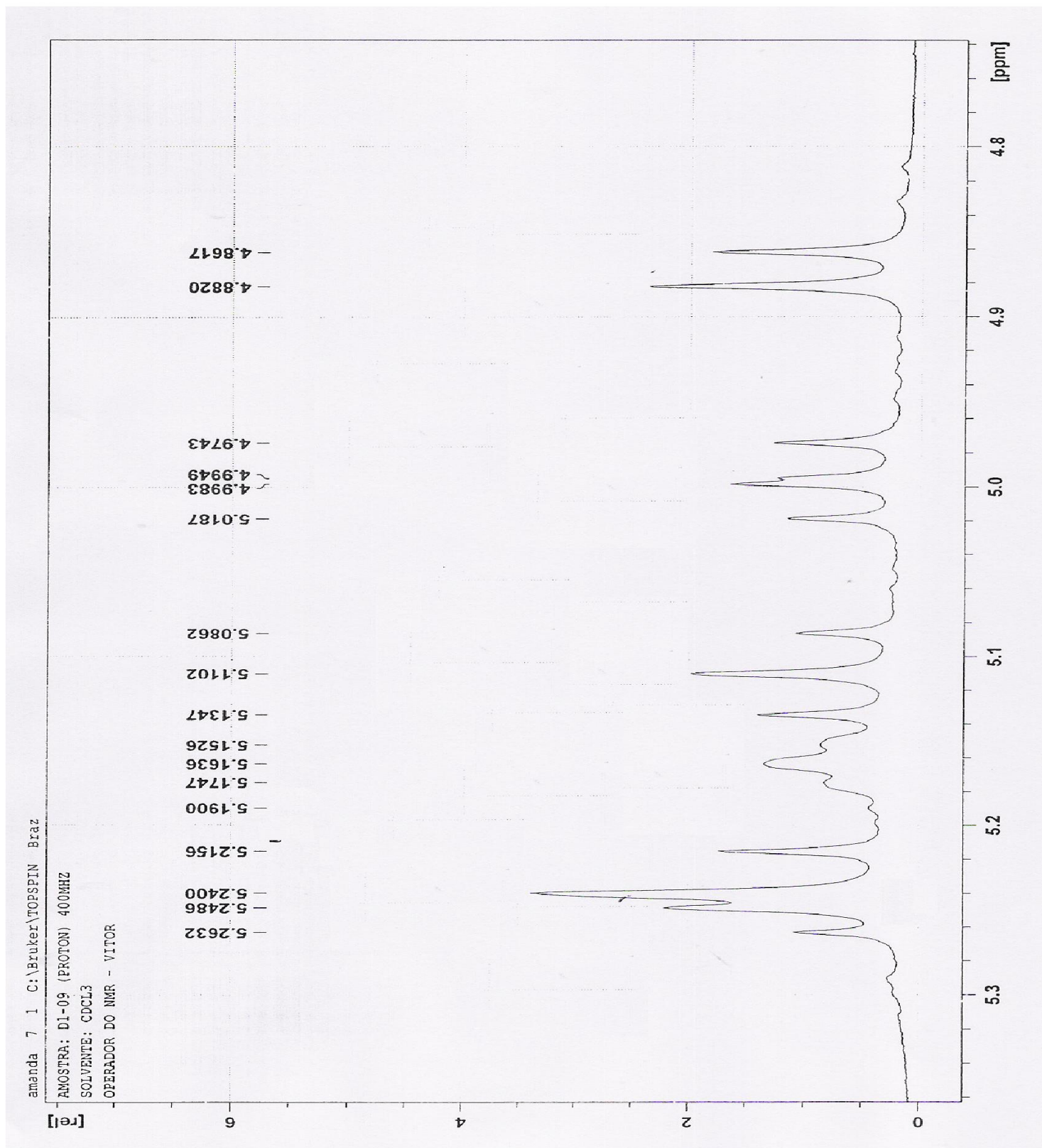


Figura 27: Ampliação da região de δ_H 3,6 – 4,4 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do iridoide 22.

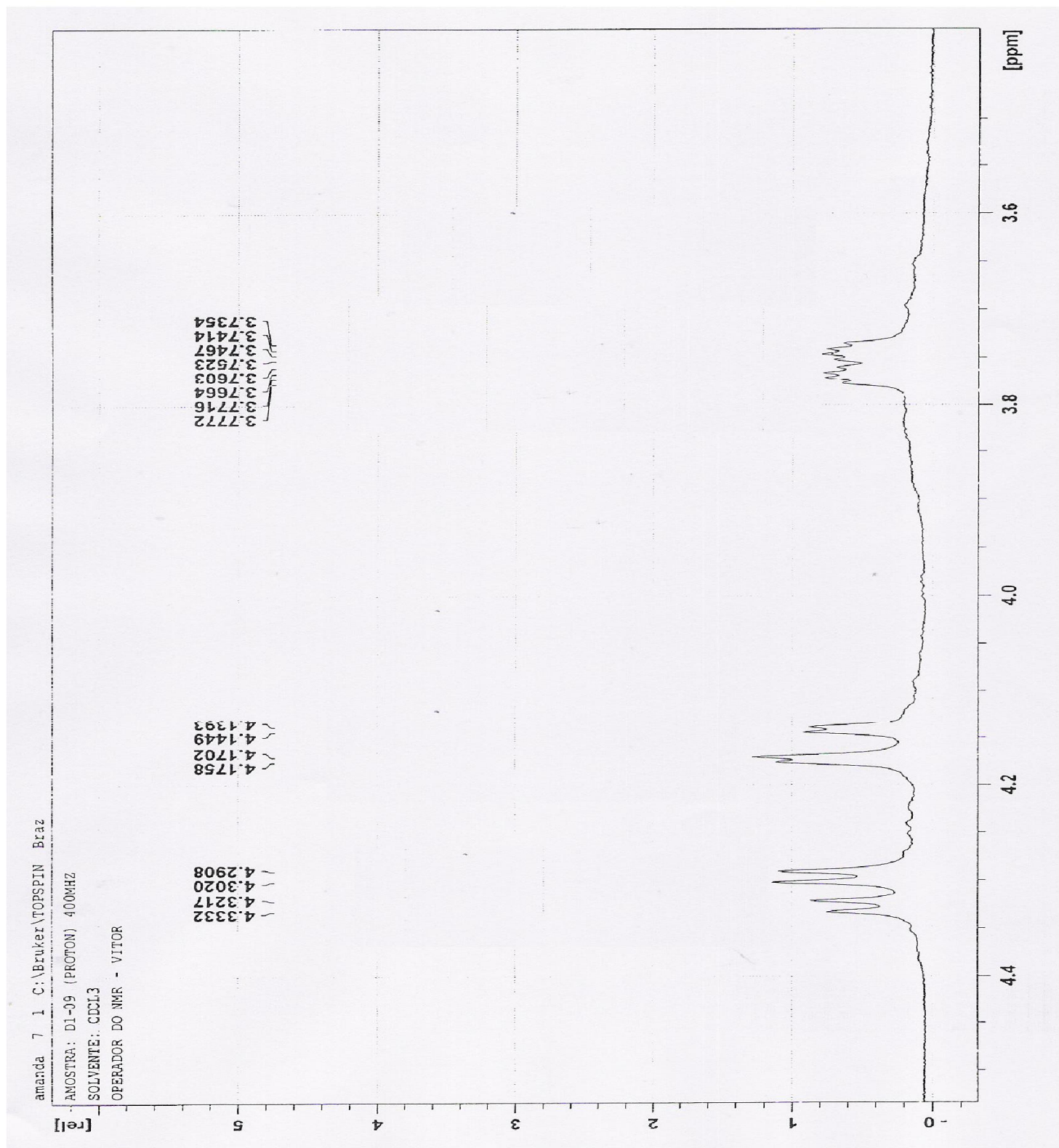


Figura 28: Ampliação da região de δ_H 1,8 – 2,4 do espectro de RMN de 1H (500 MHz) do iridoide **22**.

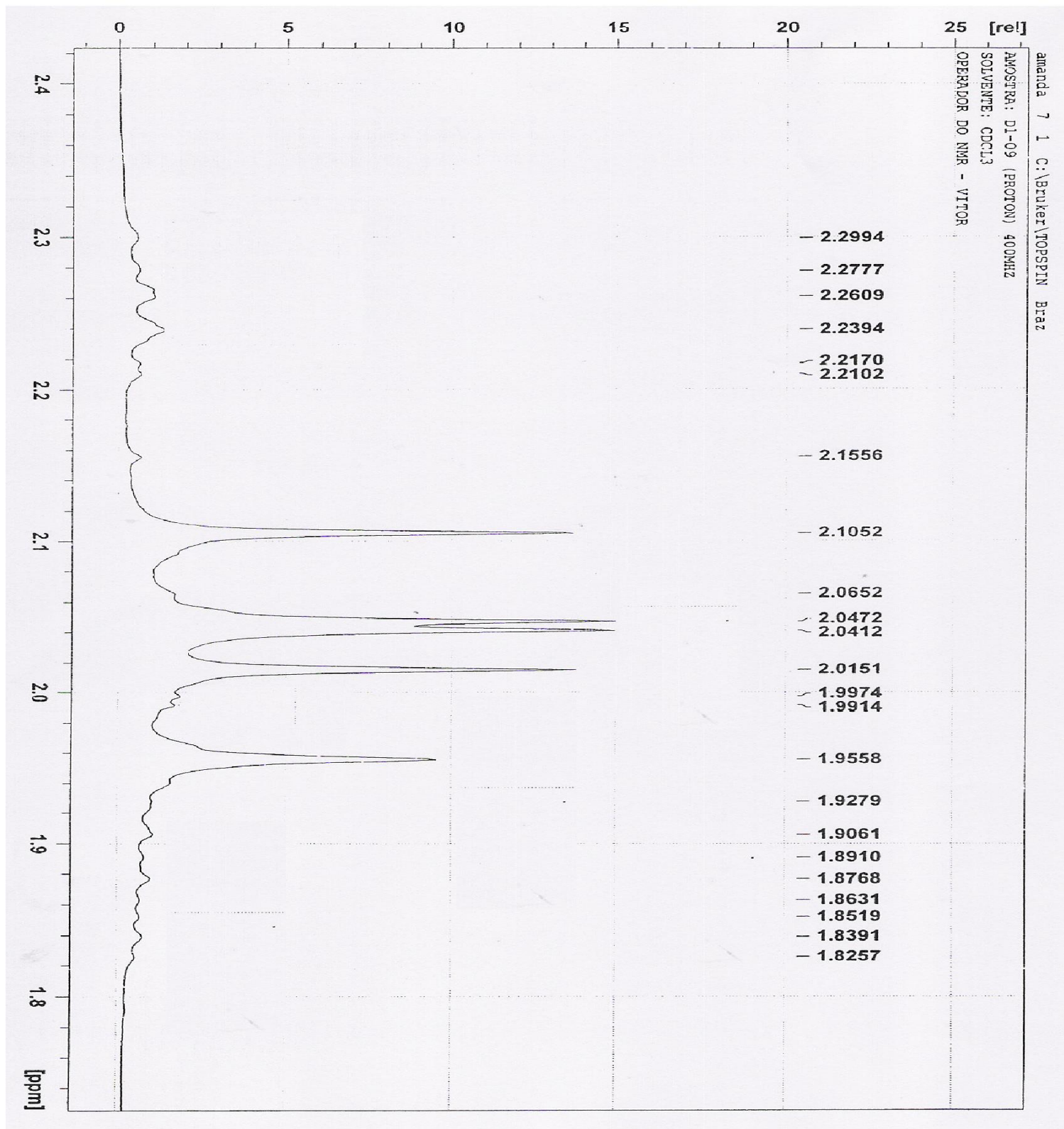


Figura 29: Mapa de correlação heteronuclear 2D HSQC ($^1J_{HC}$) do iridoide (22) em $CDCl_3$

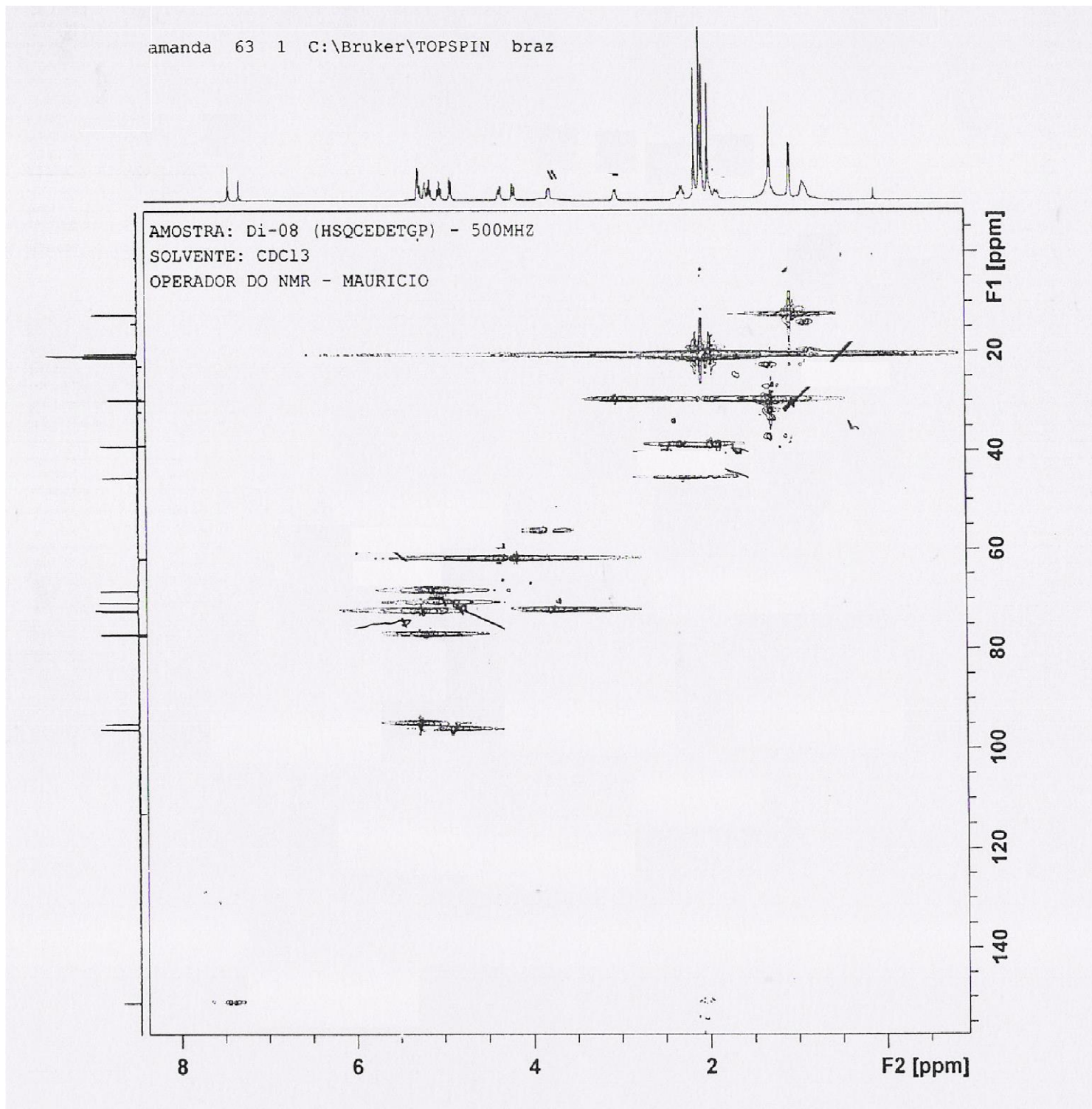
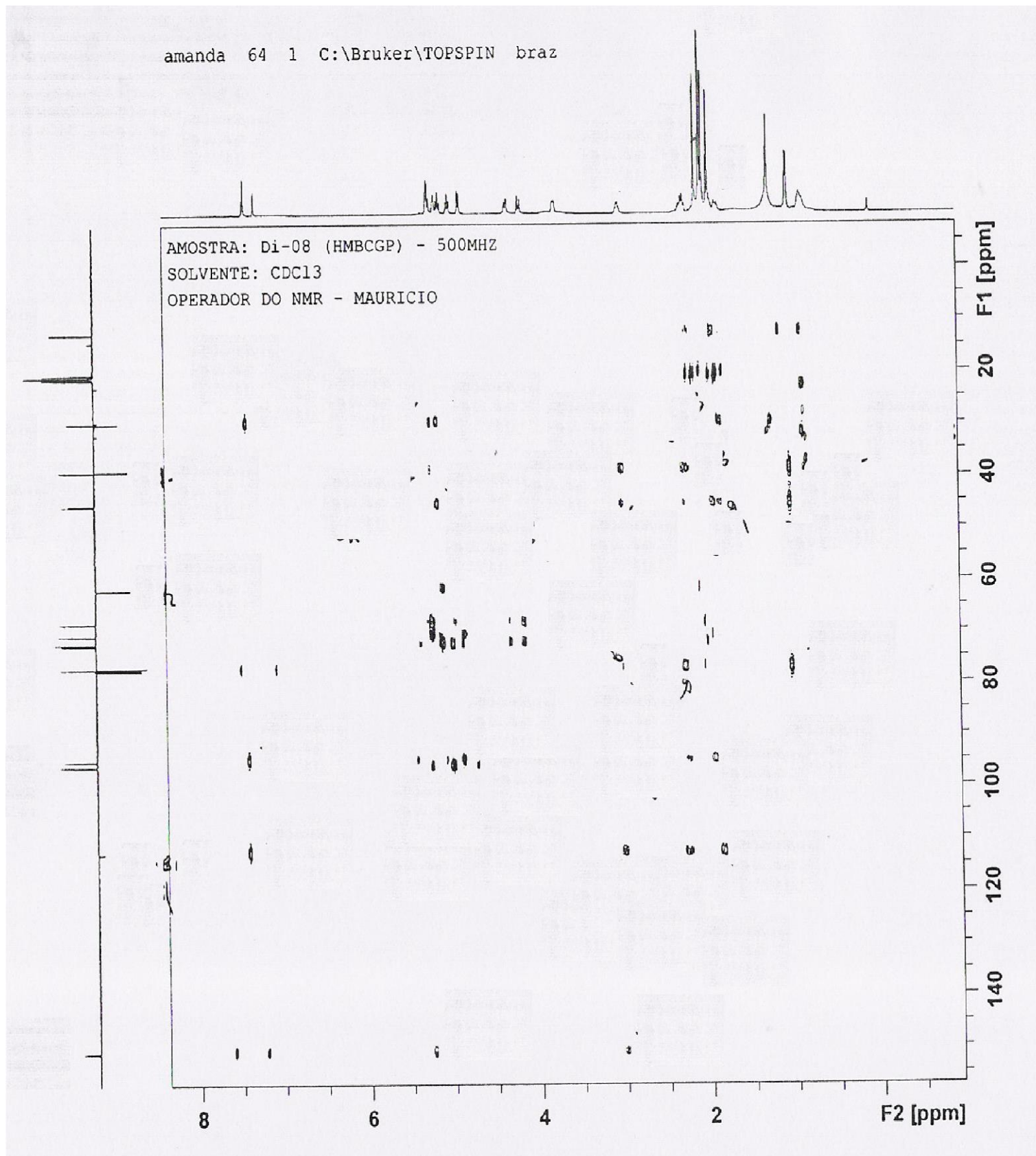


Figura 30: Mapa de correlação heteronuclear 2D HMBC do iridoide **22** em CDCl₃.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

BARBOSA, L. F. **Alcalóides indólicos do extrato metanólico das cascas das raízes de *Rauvolfia grandiflora* (APOCYNACEAE)**. 2005. 62f. Monografia (Licenciatura em Química) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BARROS, I. M. C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia spiciosa* (APOCYNACEAE)**. 2008. 194f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution Methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. 3. ed., Germany: VCH verlagsgesellschaft, 1987, 515 p.

CARLOS, L. A. **Alcalóides de *Rauvolfia grandiflora* e *Rauvolfia mattfeldiana* (APOCYNACEAE)**. 2007. 173f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHARLES, T. P. Verminoses dos bovinos de leite. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. (Eds.). **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil, 1992. p. 55-110.

CHAGAS, A. C. S. Controle de Parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 156-160, 2004.

CRUZ, D. G. DA, ROCHA, L. O DA, ARRUDA, S. S., PALIERAQUI, J. G. B., CORDEIRO, R. C., JUNIOR, E. S., MOLENTO, M. B., SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 340-343, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2. ed., John Wiley & Sons: England, 2002, 539 p.

ENDRESS, M. E.; BRYNS, P. V. A revised Classification of the Apocynaceae s.l. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.

GUIMARÃES, H. A. **Constituintes químicos de *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon* (APOCYNACEAE): Elucidação estrutural e atividade biológica**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2013.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: Generalidades e aspectos básicos. In: OLIVEIRA, C. M., et al., **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1 Ed. Editora da UFSC, 1999. p. 641-656.

HOUNZANGBE-ADOTE, M. S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MOUTAIROU, K.; HOSTE H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**. v. 78, n. 2, p. 155-160, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Árvores do Brasil Central espécies da região geoeconômica de Brasília**. Rio de Janeiro, 2002, p. 417.

JACKSON, F. E; MILLER, J. Alternative approaches to control-Quo vadit. **Veterinary Parasitology**. v. 139, n. 4, p. 371-384, 2006.

MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F.; ZHU, X. Assignment of the ^1H and ^{13}C spectra of aspidocarpine and assignment of the structure and stereochemistry of the von Braun reaction product of aspidocarpine by 2D nmr spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 200–204, 1987.

MOURA, M. D. B; AGRA, M. F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos Estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 273-279, 1989.

NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C.; **Plantas medicinais do popular ao científico**. UFAL, 2005. p. 9 -11.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over de the Period 1981-2002. **Journal Natural Product**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 145-168, 1999.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE): uma revisão. **Revista de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 1, p. 92-99, 2009.

PADILHA, T. Controle da verminose gastrointestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil. In: PADILHA, T. (Ed.), **Controle dos nematódeos gastrointestinais em ruminantes**. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil, 1996, p. 77-93.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª ed. Cengage Learning, 2010. 699.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcaloides Indólicos Isolados de Espécies do Gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PINAR, M.; SCHMID, H. Aspidolimin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 45, n. 4, p.1283-1286, 1962.

QUINET, C. G. P. **Apocynaceae Juss. Na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

RAPINI, A. Sistemática: **Estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da cadeia do espinhaço de Minas Gerais**. Tese – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000. 29-31 p.

ROCHA, L. O. **Avaliação com extratos vegetais com atividade larvicida e ovicida no controle in vitro de nematoides gastrointestinais de ovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 442-458, 2013.

SBN – Sociedade Brasileira de Nematologia, **Conhecendo os nematoides**, 2011. Disponível em <http://nematologia.com.br/category/o-que-sao-nematoides/> Acessado em: fevereiro/2015.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia- da planta ao medicamento**. 5 ed.: Editora UFSC, p.819- 846, 2003.

SENNBLAD, B.; BREMMER, B. Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenic Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 51, n. 3, p. 389-409, 2002.

SILVA, J. A.; LEITE, E. J.; NASCIMENTO, A. R. T.; REZENDE, J. M. D. **Padrão e distribuição espacial e diamétrica de indivíduos de *Aspidosperma* spp. na Reserva Genética Florestal Tamanduá, DF**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 21 p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, LTC: Rio de Janeiro, 2006.

STEAR, M. J.; DOLIGALSKA, M.; DONSKOW-SCHMELTER, K.; Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. **Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 139-151, 2007.

THIEMANN O. H. **Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae do estado de Sergipe**. II Seminário de pesquisa da FAP – SE. Aracaju, 2004. p. 1-3.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The Families of Flowering Plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. 1992. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>.> Acessado em janeiro/2015.