

RODRIGO SANT'ANA CABRAL

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade
anticolinesterásica de *Conchocarpus
fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani
(Rutaceae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2011

RODRIGO SANT'ANA CABRAL

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade
anticolinesterásica de *Conchocarpus
fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani
(Rutaceae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: Dra. Maria Cláudia Marx Young

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Cabral, Rodrigo Sant'Ana

C117e Estudo fitoquímico e a avaliação da atividade anticolinesterásica de
Conchocarpus fontanesianus (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae) / Rodrigo
Sant'Ana Cabral -- São Paulo, 2011.
85 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2011
Bibliografia.

1. Metabolismo secundário. 2. Alcalóide. 3. Espectrometria de massa. I. Título

CDU: 581.19

***Aos meus pais Genésio e Cleusa,
aos meus irmãos Renato e Fernanda,
pelos bons momentos e apoio, dedico este trabalho.***

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Genésio Sant'Ana Cabral e Cleusa Alves de Souza Cabral, que sempre foram exemplos de vida para mim; pelo apoio e por sempre acreditar e incentivar meus estudos.

Aos meus irmãos, Renato e Fernanda, que além de irmãos são grandes amigos.

Aos meus primos, tios e tias, pelos bons momentos em família.

À Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente do Instituto de Botânica pelo suporte.

Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, pela estrutura e por tornar possível a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Claudia Marx Young, minha orientadora e "mãe científica", pelo carinho, ensinamentos e por confiar em meu potencial, desde a iniciação científica, acreditando na realização deste trabalho.

À Dra. Carmen Lúcia Queiroga do CPQBA, UNICAMP, pela colaboração e realização das análises em espectrometria de massas de alta resolução e ao Dr. Marcos N. Eberlin do Laboratório Thomson Espectrometria de Massa, UNICAMP, por ceder o laboratório e equipamentos para realização das análises.

À Dra. Inês Cordeiro, pelo auxílio na realização da primeira coleta e por identificar a espécie estudada.

Ao amigo Dr. Paulo Roberto H. Moreno, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao Dr. João Henrique G. Lago, que vem me ajudando desde a iniciação científica e que colaborou enormemente com este trabalho.

A todos os pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica por todo auxílio durante o mestrado.

À Dra. Vanderlan da Silva Bolzani coordenadora do projeto "Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Novos Fármacos - Fase II" dentro do programa BIOTA/FAPESP (Processo nº 03/02176-7).

À FAPESP pelo apoio ao projeto temático.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Ana Alice, Maria Aperecida e Mary Monteiro por todo o auxílio durante o mestrado.

Ao amigo e irmão Lamartine da Nobrega Netto que inesperadamente nos deixou saudades, pela amizade e bons momentos vividos.

Aos amigos e irmãos de Lavras que estão longe, em Minas Gerais, mais que fazem parte da minha vida.

A todos os amigos do Instituto de Botânica, principalmente do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pela convivência, conversas, risadas e cervejas nos finais de dia, amenizando o estresse.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e apoio ao projeto.

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

Índice

1. Introdução.....	01
1.1. Mata Atlântica.....	01
1.2. Família Rutaceae.....	03
1.3. Gênero <i>Conchocarpus</i>	04
1.4. <i>Conchocarpus fontanesianus</i> (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani.....	07
1.5. Metabolismo Secundário.....	09
1.5.1. Terpenos.....	10
1.5.2. Compostos Fenólicos.....	11
1.5.3. Compostos Nitrogenados.....	11
1.6. Doença de Alzheimer.....	12
1.7. Inibidores da Acetilcolinesterase.....	14
2. Objetivos.....	19
2.1. Geral.....	19
2.2. Específicos.....	19
3. Material e Métodos.....	20
3.1. Material Botânico - <i>Conchocarpus fontanesianus</i> (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani.....	20
3.2. Obtenção do Extrato Etanólico (EE).....	20
3.3. Obtenção da Fração de Alcalóides Totais.....	21
3.4. Análises Cromatográficas.....	22
3.4.1. Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	22
3.4.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	23
3.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	23
3.5. Identificação dos Compostos Purificados.....	23
3.5.1. Análise por LC-DAD e LC-MS.....	24

3.5.2. Análise por ESI-MS.....	24
3.5.3. Análise por GC-MS.....	24
3.6. Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase.....	25
3.6.1. Ensaio Qualitativo por Bioautografia (CCDA).....	25
3.6.2. Quantificação da Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE) em Microplaca.....	26
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1. Obtenção e Rendimento do Extrato Etanólico (EE), FALC e Fr.HEX.....	27
4.2. Análises Cromatográficas e Purificação da FALC.....	28
4.3. Identificação dos Compostos Purificados.....	39
4.3.1. Análise por LC-MS e LC-DAD.....	39
4.3.2. Análise por ESI(+)-MS.....	45
4.3.3. Análise por GC-MS.....	48
4.3.4. Identificação dos Compostos Purificados.....	51
4.4. Análise da Atividade Anticolinesterasica.....	57
4.4.1. Análise da Atividade Anticolinesterasica no EE, FALC e Fr.HEX.....	57
4.4.2. Análise da Atividade Anticolinesterasica sobre os Compostos Purificados da Fração de Alcalóides Totais.....	59
5. Conclusão.....	64
6. Resumo.....	65
7. Abstract.....	67
8. Referências Bibliograficas.....	69

1. Introdução

As plantas superiores constituem uma das fontes naturais mais importantes de alimentos, fibras, madeira e também de diversos produtos químicos como óleos, essências, corantes, além de diversas substâncias de importância farmacêutica. Durante o período de 1981 a 2002, 61% dos 877 novos fármacos desenvolvidos foram provenientes de produtos naturais, ou substâncias desenvolvidas a partir deles (Newman *et al.*, 2003). Embora as plantas sejam fontes renováveis, é cada vez mais difícil extrair quantidades suficientes de certos compostos em algumas espécies devido à crescente demanda por novas substâncias (Cragg *et al.*, 1993).

O Brasil está entre os 12 países com maior biodiversidade vegetal, sendo particularmente rico em plantas medicinais. Aproximadamente 20% de todas as angiospermas estão distribuídas na Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado. Em razão disso, a exploração racional e a conservação da diversidade biológica é uma questão de prioridade e urgência (Bolzani *et al.*, 1999).

Muitos fatores são importantes para o sucesso no descobrimento de novos fármacos, dentre eles a diversidade química dos compostos que serão selecionados, cujas fontes podem ser: produtos naturais, compostos sintéticos ou química combinatória. Dentre estas possibilidades os produtos naturais são considerados como a fonte de maior diversidade química (Trevisan *et al.*, 2003).

1.1. Mata Atlântica

A expressão “Mata Atlântica”, adotada por vários autores, indica simplesmente a proximidade da floresta com o Oceano Atlântico. Essa formação deve sua exuberância à grande umidade do ar, trazida pelos ventos marinhos, que se precipita sob a forma de chuva nas costas, ao subirem para camadas frias de maior altitude. O clima ao longo da Mata Atlântica varia entre tropical, tropical de altitude e subtropical. De acordo com o Manual Técnico da Vegetação Brasileira do IBGE, a Floresta Atlântica compreende um conjunto de tipologias vegetais, localizado na faixa litorânea brasileira desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, representado principalmente pela Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional e encaves de campos e brejos de altitude (Região Nordeste), associados a ecossistemas costeiros de restinga, mussunungas e mangues (Guedes *et al.*, 2005).

A Mata Atlântica é constituída por uma parcela significativa de flora endêmica, sendo que estimativas indicam que a cada duas espécies arbóreas uma ocorre exclusivamente neste bioma, ou seja, haveria 50% de espécies exclusivas (Mori *et al.*, 1981).

O bioma da Mata Atlântica é uma das maiores áreas de floresta tropical, ocupando o segundo lugar em extensão nas Américas, logo após a Floresta Amazônica. Atualmente está incluída entre os principais “hotspots” do mundo, sendo um dos centros de altíssima biodiversidade em que a extensão original foi dramaticamente reduzida, colocando em risco a sobrevivência de muitas espécies de animais e plantas (Guedes *et al.*, 2005).

A implementação de Unidades de Conservação da Natureza (UCs) é uma estratégia mundial, adotada como a forma mais efetiva de conservação *in situ* da biodiversidade. As UCs constituem áreas de especial importância para preservação e conservação ambiental, desempenhando papel de grande relevância na manutenção da diversidade ecológica. Em um contexto mais amplo, as UCs protegem não apenas a biodiversidade de flora e fauna, mas também os seus processos ecológicos de interação. Existem no Estado de São Paulo 236 áreas naturais protegidas, divididas em 21 categorias de manejo de âmbito federal, estadual e particular, considerando Unidades de Proteção Integral, Unidades de Uso Sustentável e outras áreas especialmente protegidas (Xavier *et al.*, 2008).

Diversas UCs foram criadas no Estado de São Paulo, entre elas a Estação Ecológica Jureia-Itatins (decreto estadual nº 24.646/1986, lei estadual nº 5.649/1987 e lei estadual nº 12.406/2006). A Estação Ecológica Juréia-Itatins (E.E.J.I.), uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, abrange parte dos municípios de Iguape, Itariri, Miracatu e Peruíbe, no sul do estado, possuindo uma área de 92.223,00 hectares (ha) (**Figura 1**). Esta área se destaca pelo seu grau de preservação devido à dificuldade de acesso, caracterizando-se como um dos melhores e mais preservados trechos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Mamede *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2008). A Estação Ecológica Juréia-Itatins encontra-se a 210 km da cidade de São Paulo e a 100 km da cidade de Cubatão, na região do Vale do Ribeira do Iguape (Agripino *et al.*, 2004).



Figura 1: Mapa da Estação Ecológica Juréia-Itatins, com sua delimitação territorial (Fonte: <http://www.fflorestal.sp.gov.br>).

Dentre as diversas espécies de ocorrência natural na E.E.J.I., a espécie *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani é uma das encontradas nessa região.

1.2. A Família Rutaceae

Rutaceae, pertencente à ordem Sapindales (Bremer *et al.*, 2009), possui cerca de 155 gêneros e 1600 espécies, distribuídas em regiões Temperadas, Subtropicais e Tropicais, com maior incidência nas regiões da América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil são descritos 33 gêneros, 192 espécies sendo 107 endêmicas, 17 subespécies e 8 variedades (Pirani & Groppo, 2010).

As Rutaceas são normalmente plantas lenhosas, árvores ou arbustos, raramente ervas ou lianas, frequentemente com espinhos. Em geral possuem folhas alternas, compostas, sem estípulas; inflorescência cimosa; flores pouco vistosas, bissexuadas ou unissexuadas; ovário súpero e raramente apresenta mais que o dobro de estames por pétala ou sépala; o fruto é em drupa, baga, folículo ou cápsula (Souza & Lorenzi, 2008). Esta família possui muitas espécies com grande importância econômica, dentre elas destacam-se as pertencentes ao gênero *Citrus*, que produzem tanto frutos de importância econômica (laranja, limão, tangerina) quanto óleos essenciais utilizados em perfumaria, ao gênero *Pilocarpus*, que são fontes de pilocarpina, um fármaco utilizado no tratamento do glaucoma, e aos gêneros *Boronia*, *Choisya*, *Poncirus* e *Skimmia*, usadas como ornamentais (Barroso *et al.*, 1986; Chase *et al.*, 1999). Existem ainda

espécies produtoras de madeira de boa qualidade como pau-marfim (*Balfourodendron riedelianum*) e o guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*) (Souza & Lorenzi, 2008).

Grande diversidade de metabólitos secundários foi encontrada nessa família, tais como: alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico (principalmente furoquinolínicos, indólicos e quinolínicos), cumarinas (principalmente furano e pirano cumarinas), lignanas, flavonóides, limonóides (triterpeno) e óleos voláteis. (Waterman, 1975; Ribeiro & Kaplan, 2002; Taveira *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2008; Albarici *et al.*, 2010).

1.3. O Gênero *Conchocarpus*

O gênero *Conchocarpus*, pertencente à família Rutaceae e subfamília Rutoideae, é composto por arbustos ou pequenas arvores de até 7 metros de altura, com folhas alternas, inflorescência geralmente terminal ou extra-axilar, cálice relativamente pequeno e uma corola tubular formada por pétalas coerentes. Este gênero possui 45 espécies que são distribuídas da Nicarágua ao norte da Bolívia e região sudeste do Brasil (Kallunki & Pirani, 1998; Pirani, 2002; Groppo *et al.*, 2008).

No Brasil, espécies desse gênero ocorrem em quase todos os estados, com exceção de alguns onde ainda não foram descritas espécies, conforme mostra o mapa de distribuição na **Figura 2**. (Pirani, 2010).

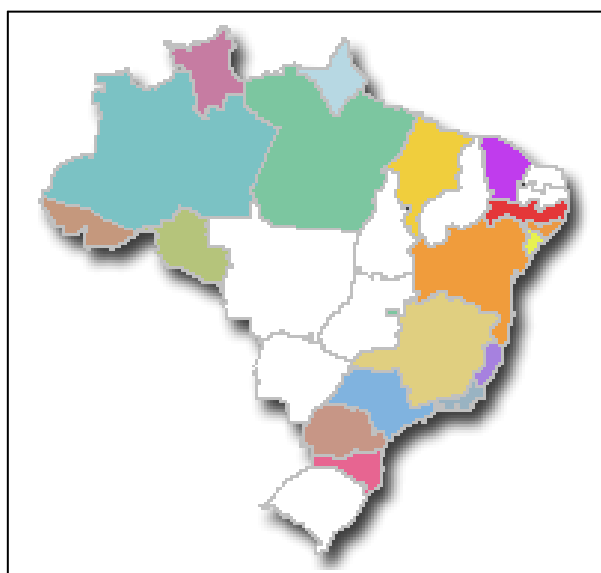


Figura 2: Mapa de distribuição do gênero *Conchocarpus* no Brasil. Estados em branco não foram registrados indivíduos do gênero (Pirani, 2010).

Para algumas espécies pertencentes a esse gênero foram realizados estudos químicos e biológicos. Em estudo químico realizado com a espécie *Conchocarpus gaudichaudianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani, quatro novos alcalóides foram isolados do extrato etanólico dos ramos caulinares, sendo três deles do tipo indoloquinazolônico (**Figura 3A**) e um do tipo quinolônico (**Figura 3B**). Também foram isoladas duas amidas conhecidas, a *N-trans*-cumaroiltiramina e *N-trans*-feruloiltiramina (**Figura 3C**) (Cortez *et al.*, 2009).

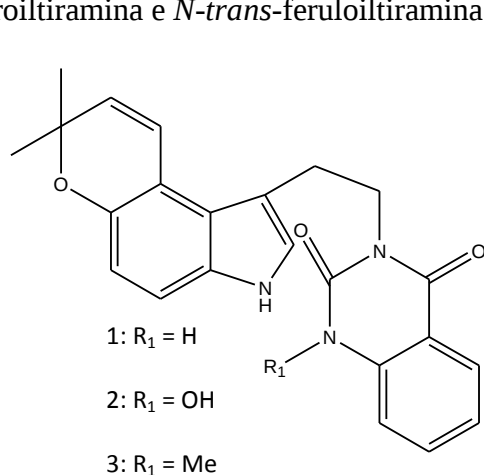


Figura 3A: Alcalóides indoloquinazolônicos.

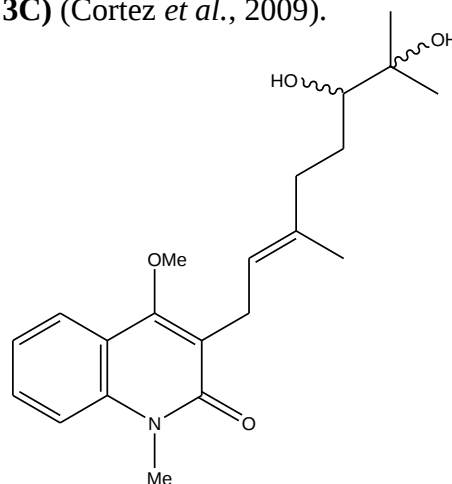


Figura 3B: Alcalóide quinolônico.

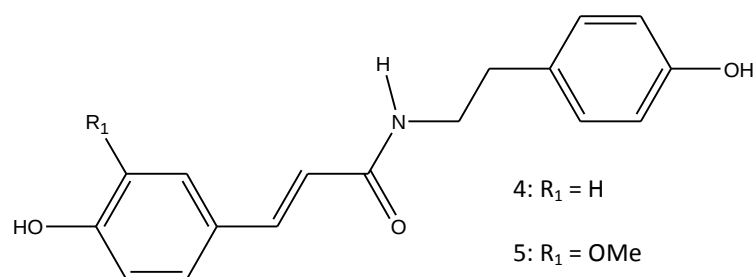


Figura 3C: Alcalóides *N-trans*-cumaroiltiramina (4) e *N-trans*-feruloiltiramina (5).

Em *Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (= *Angostura heterophylla*), extratos e frações de caules e folhas permitiram o isolamento de diversas substâncias. No extrato hexânico de caules foram isolados os esteróides β -sitosterol e estigmasterol. Da fração acetato de etila do extrato hexânico de folhas se isolou 7-metoxiflavona, flavona e 5-hidroxiflavona (**Figura 4A**). Da fração diclorometânica proveniente do extrato hexânico de folhas, foram isolados o benzoato de β -sitosterila (**Figura 4A**) e uma mistura de piranoflavonas inéditas (**Figura 4B**). Da fração acetato de etila do extrato metanólico de caules, flavona, 7-metoxiflavona e os alcalóides haplotusina e 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**Figura 4A**). Todas as substâncias isoladas foram testadas contra as formas

tripomastigotas do *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de chagas; as mais ativas foram os alcalóides haplotusina ($IC_{50}=136,9 \mu M$) e o 2-fenil-1-metil-4-quinolona ($IC_{50}=144,9 \mu M$) (Ambrozin *et al.*, 2008).

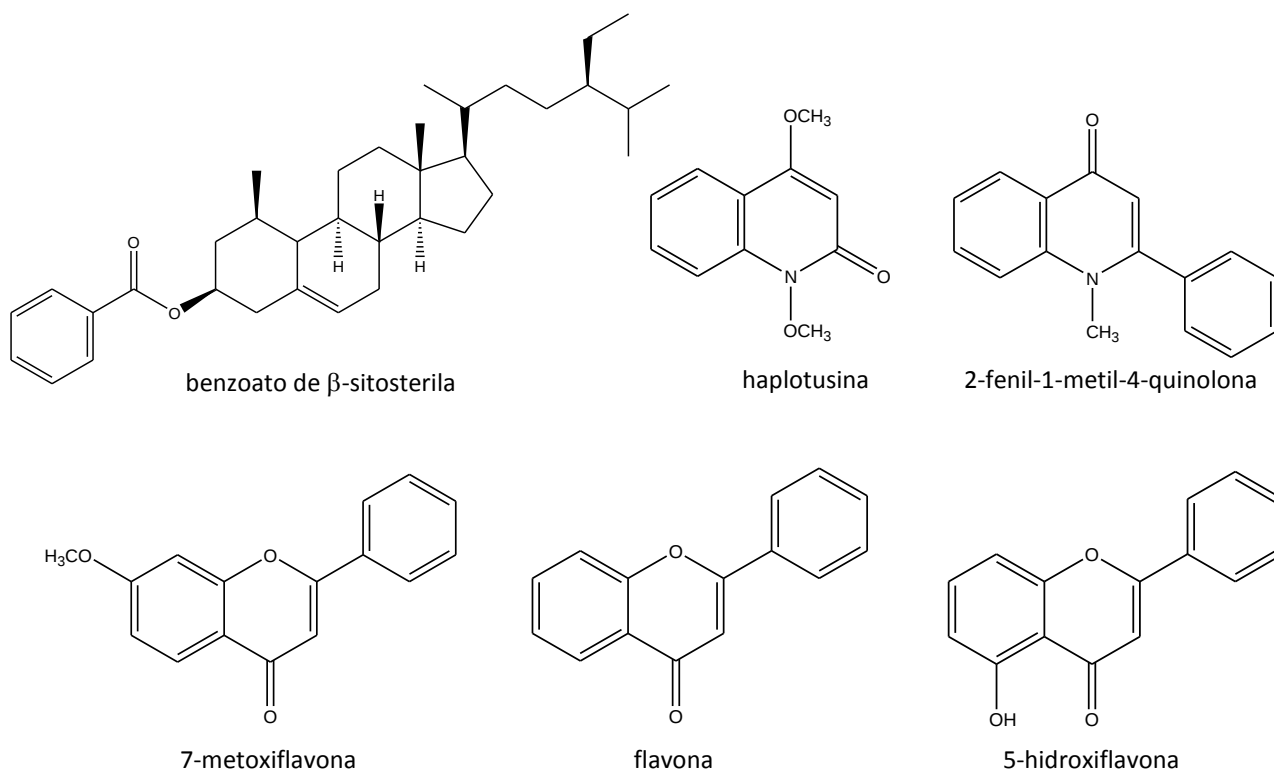


Figura 4A: Substâncias isoladas de *C. heterophyllus*.

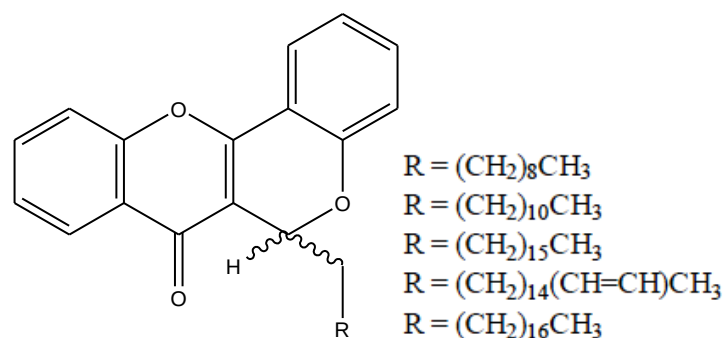


Figura 4B: Mistura de piranoflavonas inéditas.

Na espécie *Conchocarpus paniculatus* (Engl.) Kallunki & Pirani (= *Angostura paniculata*), do extrato em diclorometano das folhas foram isolados dois novos alcalóides acridônicos, cuspanina e cusculina (**Figura 5**). Ambos apresentaram atividade moluscicida moderada contra a espécie de caracol aquático *Biomphalaria glabrata*, com LC_{50} de 5ppm para cuspanina e 20 ppm para cusculina. Esses alcalóides também apresentaram atividade citotóxica moderada contra linhagens de células cancerígenas (Vieira *et al.*, 1992).

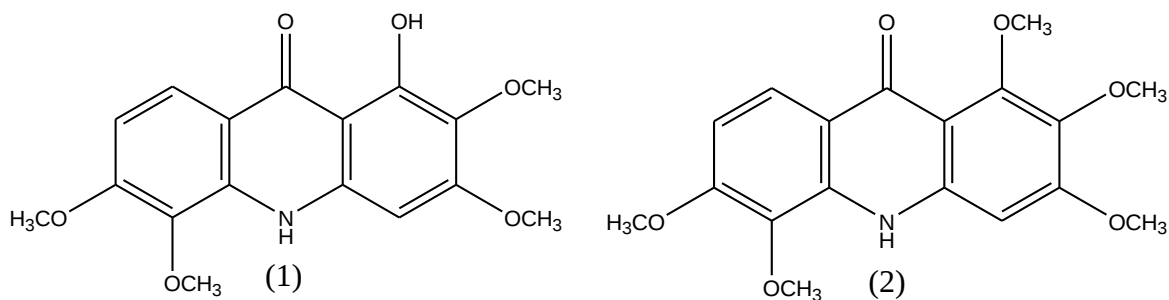


Figura 5: Alcalóides cuspanina (1) e cusculina (2) isolados de *C. paniculatus*

O Extrato metanólico de folhas de *Conchocarpus inopinatus* Pirani demonstrou forte atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* ($IC_{50}=1,39$ mg/mL). As frações diclorometano ($IC_{50}=1,29$ mg/mL) e acetato de etila ($IC_{50}=1,44$ mg/mL) obtidas da partição do extrato metanólico de folhas também apresentaram forte atividade tripanomicida (Mafezoli *et al.*, 2000).

Já na espécie *Conchocarpus macrophyllus* J.C.Mikan foi encontrado o relato de apenas uma substância isolada, o alcalóide acridônico conhecido como arborinina (**Figura 6**) (Veloza, 1995).

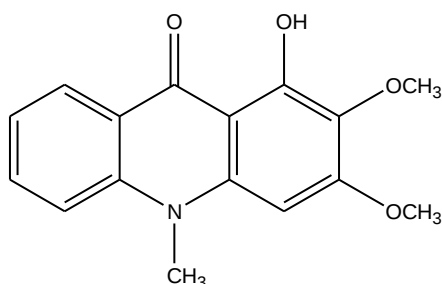


Figura 6: Alcalóide arborinina isolado de *C. macrophyllus*

Em 1998 Kallunki & Pirani realizaram um trabalho de transposição taxonômica publicado no Kew Bulletin, reclassificando algumas espécies pertencentes à família Rutaceae, do gênero *Angostura* para o gênero *Conchocarpus*. Dentre estas espécies, *Angostura fontanesiana* foi reclassificada como *Conchocarpus fontesianus*.

1.4. *Conchocarpus fontesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani

Conchocarpus fontesianus (**Figura 7**), conhecida popularmente como pitaguará, possui estrutura de arbusto ou arvoreta, podendo atingir de 1 a 3 metros de altura. Possuem folhas alternas, unifolioladas com nervação broquidódroma e com calosidade na base da folha

junto ao pecíolo. A inflorescência é em pseudoracemos isolados com flores bem espaçadas. As flores são pentâmeras subsésseis com cálice campanulado e profundamente pentalobulado, com glândulas salientes (Kallunki & Pirani, 1998; Pirani, 2002).

A espécie é nativa, endêmica e se distribui pelos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, sendo encontrada em regiões de Floresta Ombrófila Densa de Encosta, em áreas de Mata Atlântica, mais precisamente em regiões de restinga (Pirani, 2002; Pirani, 2010).

Relatos de moradores que vivem nos locais de ocorrência desta espécie indicam que sua madeira é utilizada na fabricação de agulhas para confecção de redes de pesca, devido à sua maleabilidade e resistência.

Em levantamentos bibliográficos realizados foi observada a ausência de estudos sob o ponto de vista químico da espécie *Conchocarpus fontanesianus*, não havendo referências quanto ao seu metabolismo secundário. Um único trabalho encontrado, realizado por Agripino *et al.* (2004), submete o extrato bruto das folhas de *C. fontanesianus* a testes de atividade antitumoral, antibactericida e antifúngico, apresentando fraca atividade.

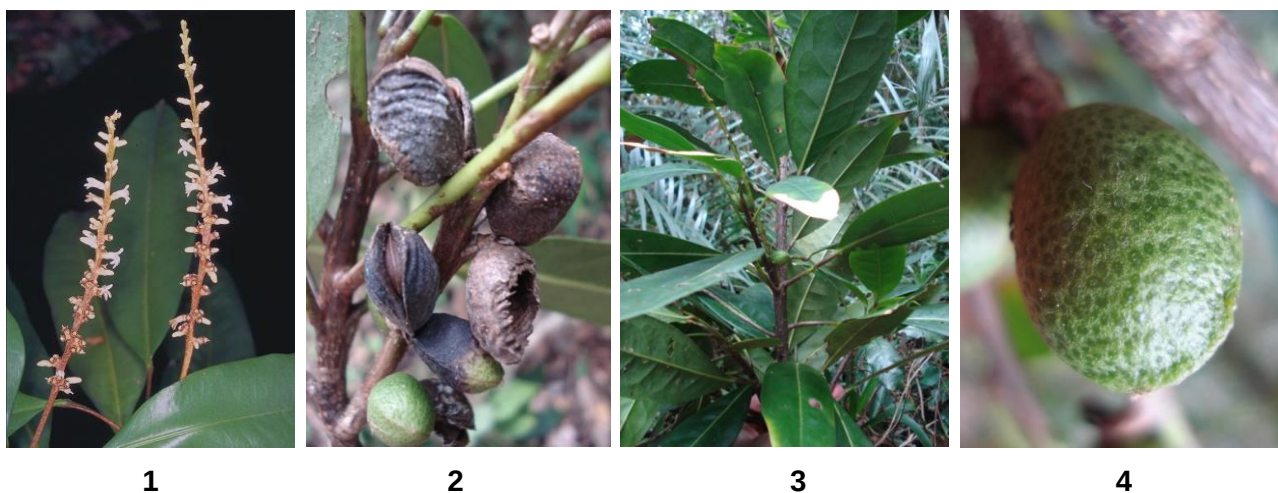


Figura 7: Fotos de *C. fontanesianus* no local de coleta. 1-inflorescência, 2-frutos secos, 3-ramo caulinar com folhas e 4-fruto verde.

1.5. Metabolismo Secundário

Metabolismo é o nome dado ao conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. As rotas metabólicas de síntese, degradação e interconversão das moléculas essenciais, bem como as reações que visam à conservação de energia são similares. Em plantas superiores as rotas do metabolismo secundário, entretanto, não são tão gerais e talvez só sejam ativadas durante alguns estádios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataque de microorganismos (Mann, 1987). Alguns grupos dessas substâncias apresentam distribuição restrita, ou seja, são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal. Em geral essas substâncias não apresentam uma ação direta conhecida nos processos como respiração, fotossíntese, transporte de solutos, translocação, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Essa enorme variedade de compostos orgânicos que parece não ter função direta no crescimento e desenvolvimento das plantas superiores é conhecida como metabólitos especiais, produtos naturais, produtos secundários ou metabólitos secundários. (Taiz & Zeiger, 2006).

Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Os metabólitos secundários possuem ação sobre fatores bióticos, como na defesa contra a herbivoria e ataque de patógenos, na competição entre plantas e na atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes. Esses compostos também possuem ação protetora em relação a fatores abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à luz ultravioleta e deficiência de nutrientes (Castro *et al.*, 2005).

De acordo com Harborne (1988): *“A riqueza de metabólitos secundários em plantas é, pelo menos explicável no simples fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar; eles não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais”*.

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. (Taiz & Zeiger, 2006). O ciclo biossintético geral dos metabólitos secundários é demonstrado na **Figura 8**.

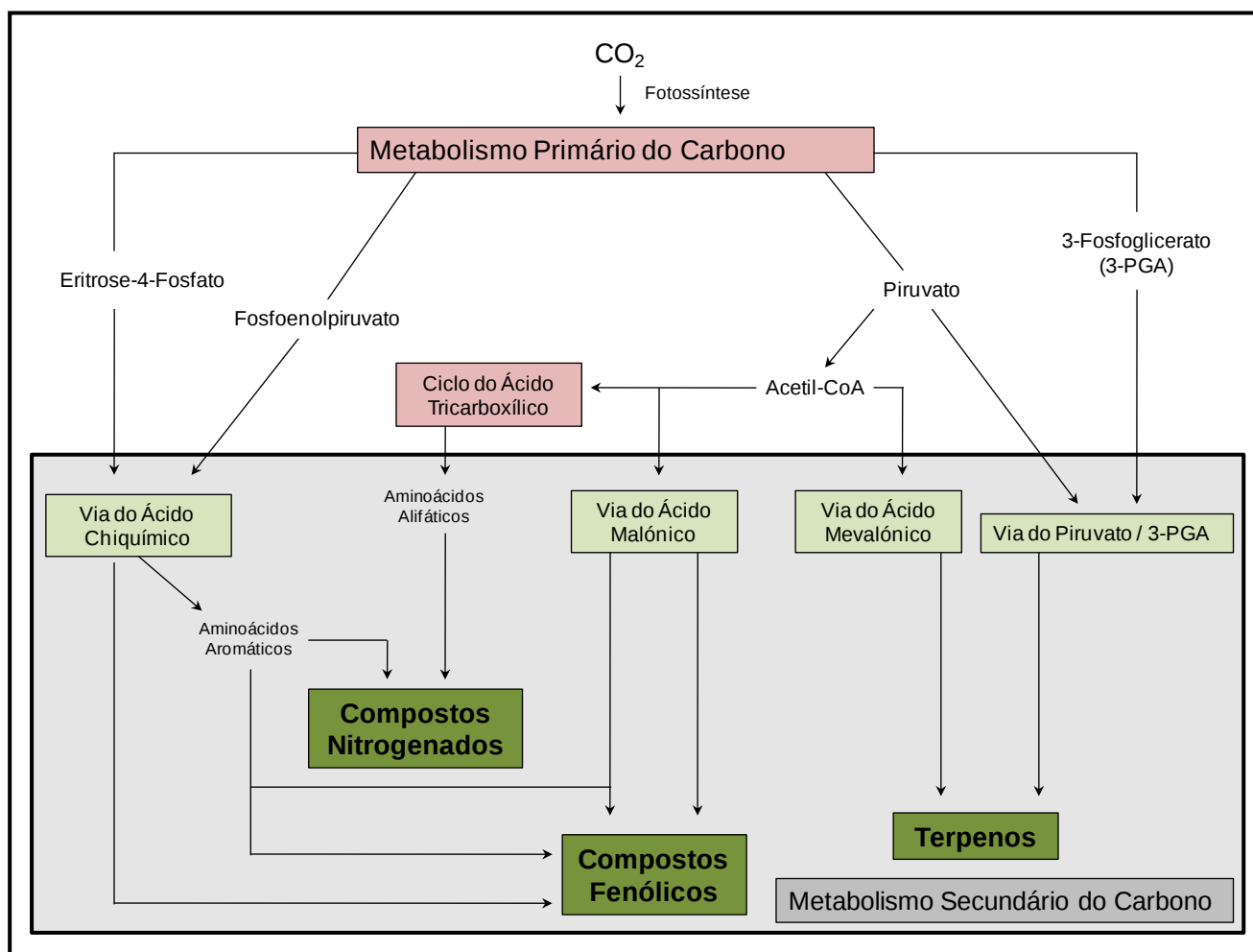


Figura 8: Rota de biossíntese dos metabólitos secundários (Aharoni *et al.*, 2006; Taiz & Zeiger, 2006; Santos, 2007).

1.5.1. Terpenos

Terpenos, terpenóides ou isoprenóides são compostos que derivam da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano, elemento estrutural básico dos terpenos também chamado de unidades isoprênicas (isopentenilpirofosfato – IPP). São classificados de acordo com o número de unidades pentacarbonadas que possuem. Constituem o maior grupo de produtos secundários e as diversas substâncias dessa classe são sintetizadas a partir duas vias: a via clássica, também conhecida como via do ácido mevalônico (mevalonato) cujos precursores são piruvato e o Acetil CoA, e a via descoberta mais recentemente, conhecida como via do metileritritol fosfato (MEP), cujos precursores são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. Em geral os terpenos

são compostos tóxicos e deterrentes para muitos insetos e mamíferos, tendo como uma de suas funções a de defesa (Taiz & Zeiger, 2006; Aharoni *et al.*, 2006).

Muitos vegetais possuem misturas de monoterpenos (10 carbonos) e sesquiterpenos (15 carbonos) voláteis, conhecidos como óleos essenciais, os quais conferem aroma característico, além de possuir reconhecidas propriedades como repelentes de insetos e atrativo para polinizadores (Castro *et al.*, 2005).

1.5.2. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são produtos secundários que contém um grupo fenol (um grupo hidroxila funcional em um anel aromático). Os fenóis são um grupo quimicamente heterogêneo, com cerca de 10.000 substâncias conhecidas. Em geral agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (Taiz & Zeiger, 2006).

Essas substâncias são sintetizadas por meio de duas rotas metabólicas principais: a do ácido chiquímico e a do acetato-polimalato (ácido malônico). Em vegetais superiores a rota mais significativa é a do ácido chiquímico. Os compostos conhecidos como cumarinas (lactonas de fenilpropanóides), com efetiva ação de defesa, pertencem a este grupo e são derivados do ácido cinâmico através da via do ácido chiquímico. Os compostos fenólicos possuem também importante função na proteção contra o estresse fotooxidativo (Castro *et al.*, 2005).

1.5.3. Compostos Nitrogenados

Os compostos nitrogenados constituem uma variedade de metabólitos secundários que contêm nitrogênio em sua estrutura. Essa categoria inclui compostos bem conhecidos na defesa das plantas contra a herbivoria como os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e os alcalóides, os quais são de grande interesse devido ao seu efeito tóxico e suas propriedades farmacológicas. A grande maioria dos compostos nitrogenados é sintetizada a partir de aminoácidos comuns (Taiz & Zeiger, 2006).

Os alcalóides são a principal classe de compostos nitrogenados encontrada no metabolismo secundário de plantas superiores, constituindo cerca de 20% das substâncias

naturais descritas, aproximadamente 15.000 substâncias identificadas. Em geral, nessas substâncias o átomo de nitrogênio faz parte do anel heterocíclico (alcalóides verdadeiros) e em sua grande maioria possuem caráter alcalino devido à presença de um par de elétrons não pareados no nitrogênio. Porém também existem alcalóides de caráter ácido como a colchicina e piperina (Kutchan, 1995). São substâncias farmacologicamente ativas possuindo acentuado efeito no sistema nervoso dos vertebrados. São utilizados desde a Grécia antiga, como no caso do filósofo Sócrates que foi executado pela ingestão de uma bebida preparada à base de cicuta (*Cicuta maculata*), contendo o alcalóide coniina (Robbers *et al.*, 1996).

De maneira geral esses metabolitos são sintetizados a partir de duas vias: a via do ácido chiquímico, formando os alcalóides aromáticos a partir dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano e a via do acetil-CoA, formando os alcalóides alifáticos a partir dos aminoácidos ornitina e lisina, oriundos do ciclo do ácido cítrico (Santos, 2007).

De fato a principal função dos alcalóides é a defesa, devido a sua toxicidade e ao seu gosto amargo. Porém outra função pode ser sugerida para essas substâncias, como a proteção contra radiação ultravioleta (UV), devido ao fato da maioria desses compostos possuírem núcleos aromáticos altamente absorventes deste tipo de radiação (Henriques *et al.*, 2007).

1.6. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa (**Figura 9**), de grande impacto sócio-econômico, responsável por 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas de 65 anos (Viegas *et al.*, 2004). Dados epidemiológicos indicam uma potencialidade considerável de aumento na incidência da doença nas próximas duas décadas devido ao aumento mundial na expectativa de vida (Johnson *et al.*, 2000).

O processo degenerativo progressivo das funções psicomotoras e cognitivas, descrito inicialmente pelo patologista alemão Alois Alzheimer em 1907, dura cerca de 8 a 10 anos, desde o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos até a morte. Esta patologia afeta 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 anos e 39% acima de 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo. As regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, particularmente o córtex frontal e hipocampo, são aqueles mais comprometidos pelas alterações bioquímicas decorrentes de DA. Dentre as causas mais evidentes da gênese da DA estão a ocorrência de deposição extracelular de peptídeo β -amilóide (derivado do precursor amilóide de proteína – APP) em plaquetas senis e

a formação errática de neurofibrilas intracelulares, formando emaranhados neurofibrilares intraneurais. Esses emaranhados neurofibrilares contêm uma forma anormal, hiperfosforilada, de uma proteína associada aos microtúbulos, à proteína TAU (Viegas *et al.*, 2004).

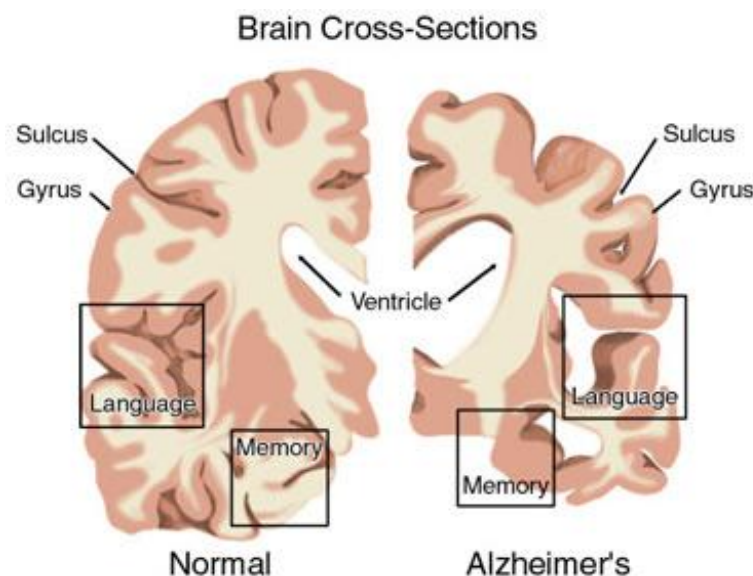


Figura 9: Comparação entre um cérebro normal e o de um portador de Alzheimer.

Em nível celular, a DA está associada com déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. A morte de neurônios colinérgicos leva a redução de 80 a 90% da produção de colina-acetil-transferase no hipocampo e córtex temporal e entre 40 e 70% nos córtex parietal e frontal (Davies, 1978; Guela & Mesulam, 1994). Há uma clara diminuição dos receptores muscarínicos e nicotínicos em portadores de Alzheimer, principalmente nos terminais colinérgicos pré-sinápticos (DeLucia & Oliveira-Filho, 2004; Warpman *et al.* 1993).

O tratamento sintomático da doença de Alzheimer envolve primeiramente a restauração da função colinérgica. O fundamento da “Hipótese Colinérgica da Doença de Alzheimer” propõe que a degeneração dos neurônios colinérgicos dos núcleos basais do prosencéfalo associada à perda de neurotransmissão colinérgica no córtex cerebral e em outras áreas contribui para a deterioração das funções cognitivas observadas em pacientes com DA. Sugere-se, portanto, que uma elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar um dos sinais da doença, a deficiência de aprendizagem (Francis *et al.*, 1999; Trevisan *et al.*, 2003).

1.7. Inibidores da Acetilcolinesterase

Várias abordagens terapêuticas foram desenvolvidas ao longo dos últimos 20 anos com o objetivo de otimizar o funcionamento do sistema colinérgico dos portadores de DA. A estratégia que se mostrou mais eficaz até o momento foi a utilização de substâncias inibidoras da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor colinérgico acetilcolina (**Figura 10**) (Almeida, 1998).

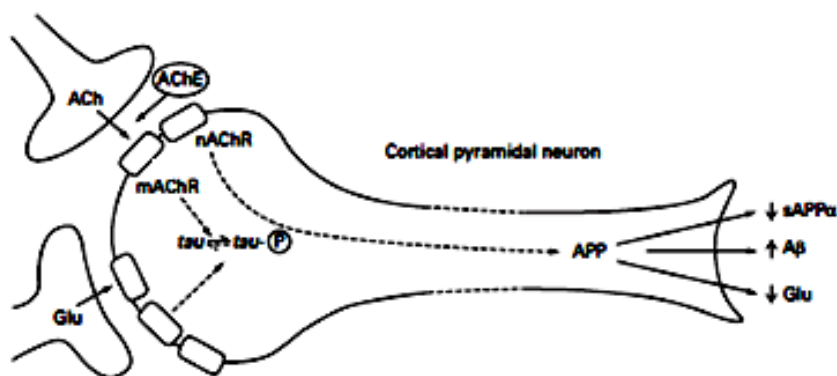


Figura 10: Mecanismo de ação da enzima acetilcolinesterase (Francis *et al.*, 1999).

Estas substâncias afetam tanto as sinapses colinérgicas periféricas quanto as centrais e agem estabilizando as funções cognitivas em um período de cerca de um ano em aproximadamente 50% dos pacientes. Em alguns pacientes, cerca de 20%, esta estabilidade cognitiva pode se manter por um período maior que 24 meses (**Figura 11**) (Giacobini, 2003).

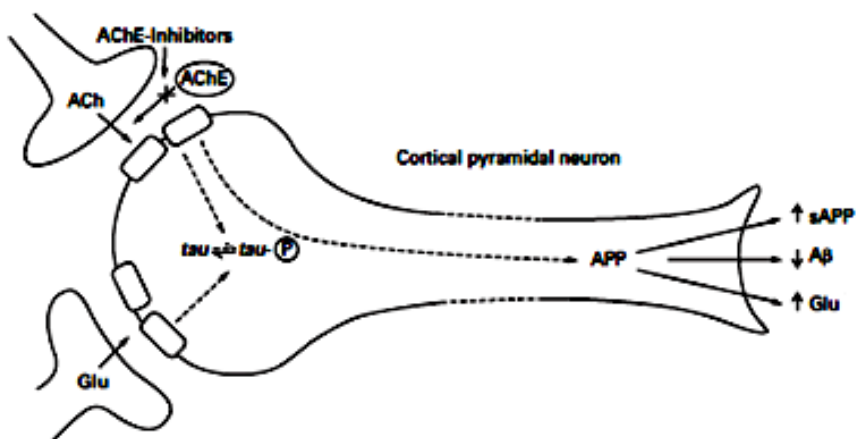


Figura 11: Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos (Francis *et al.*, 1999).

Acreditava-se que a terapêutica baseada em inibidores de colinesterases se limitava a melhorar a transmissão colinérgica pelo aumento nos níveis de acetilcolina sem interferir na cascata neurodegenerativa da doença, apenas amenizando alguns sintomas da doença (Bartus *et al.*, 1982; Bullock & Dengiz, 2005). Porém pesquisas recentes mostraram que a acetilcolinesterase (AChE) apresenta um papel importante na deposição da proteína β -amilóide, algumas vezes em função catalítica, a AChE pode influenciar a formação fibrilar da proteína, sendo que este efeito independe da atividade normal de hidrólise da enzima e está associada com o sítio aniônico periférico (DeFerrari *et al.*, 2001). Estudos sugerem que agentes colinérgicos podem ativar vias não-amiloidogênicas com potencial para prevenir a formação da proteína β -amilóide (Racchi *et al.*, 2003).

No Sistema Nervoso Periférico, os inibidores da enzima acetilcolinesterase agem elevando a atividade da acetilcolina nas sinapses pós-ganglionares parasimpáticas, aumentando a secreção de glândulas salivares, lacrimais, gastrointestinais e brônquicas, causam bronquiconstrição, hipotensão, bradicardia, queda da pressão intraocular e aumentam a atividade peristáltica (Cummings, 2000).

Existem atualmente estudos com diversas substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase (AChE) para o desenvolvimento de medicamentos úteis no controle e tratamento da DA. A fisostigmina (**Figura 12A**), alcalóide indólico isolado das sementes da espécie *Physostigma venenosum* (Fabaceae), foi o inibidor reversível de colinesterase mais estudado nas fases iniciais de desenvolvimento de fármacos antidepressão. No entanto, apesar de apresentar melhoras significativas no comportamento, possui fortes efeitos hepatotóxicos (Hess, 1975; Bartus, 1979; Cummings, 2000).

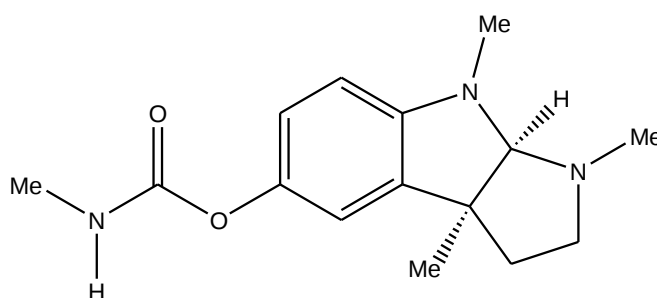


Figura 12A: Estrutura química do alcalóide Fisostigmina.

A Huperzina A (**Figura 12B**), isolada da planta utilizada na medicina chinesa *Huperzia serrata* (Huperziaceae), é um alcalóide com potente atividade anticolinesterásica, um inibidor reversível e seletivo. Apresenta longa duração e efeitos colaterais colinérgicos

periféricos mínimos, em doses terapêuticas. Na China, huperzina A já foi aprovada como um medicamento paliativo para ser utilizado por portadores da DA (Barbosa Filho *et al.*, 2006).

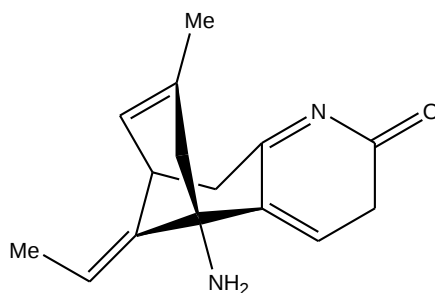


Figura 12B: Estrutura química do alcalóide Huperzina A.

A tacrina (**Figura 12C**), que foi o primeiro fármaco aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1993, é uma amina sintética, um inibidor de colinesterase reversível que demonstrou uma melhora na cognição e comportamento dos pacientes com Alzheimer, porém apresentou efeitos colaterais severos (Almeida, 1998). Associado ao alto custo, a tacrina também apresenta biodisponibilidade baixa e hepatotoxicidade importante (Maltby *et al.*, 1994).

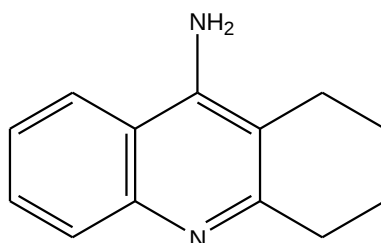


Figura 12C: Estrutura química da Tacrina.

Outro fármaco desenvolvido foi o donepezil (**Figura 12D**), inibidor reversível que promove uma melhora cognitiva significativa e retarda os sintomas progressivos da doença. O donepezil, um derivado sintético do alcalóide piperidina, geralmente é bem tolerado, embora apresente típicos efeitos colaterais colinérgicos como náuseas, diarreia e constipação (Francis *et al.*, 1999; Racchi *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 1996).

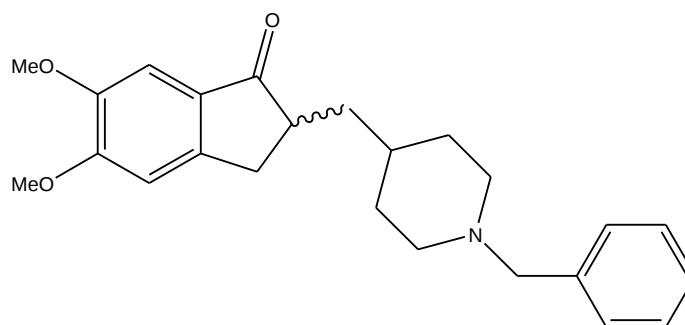


Figura 12D: Estrutura química do Donepezil.

A rivastigmina (**Figura 12E**), um inibidor sintético e pseudo-irreversível da acetilcolinesterase do tipo carbamato, apresentou em pesquisas pré-clínicas significativa seletividade pelo sistema nervoso central (SNC), produzindo efeitos benéficos significantes tanto para a cognição como para o comportamento de pacientes com a doença em estágio médio ou moderado (Anand *et al.*, 1996; Racchi *et al.*, 2003).

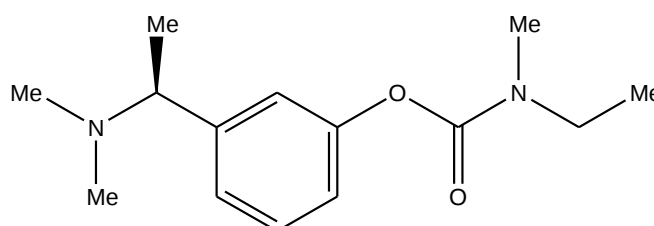


Figura 12E: Estrutura química da Rivastigmina.

A última droga aprovada pela FDA para o tratamento da DA foi a galantamina (**Figura 12F**), um alcalóide terciário fenantrênico isolado de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), que inibe a AChE de forma reversível, competitiva e modula de forma alostérica os receptores nicotínicos de acetilcolina. Estudos sobre a eficácia de galantamina demonstraram que em doses baixas produz efeitos benéficos no tratamento dos sintomas cognitivos e não-cognitivos da DA, apresentando uma farmacocinética favorável com uma meia-vida relativamente curta (aproximadamente 7 h) e alta biodisponibilidade. Seus efeitos colaterais incluem problemas gastrointestinais de média intensidade (Scott & Goa, 2000).

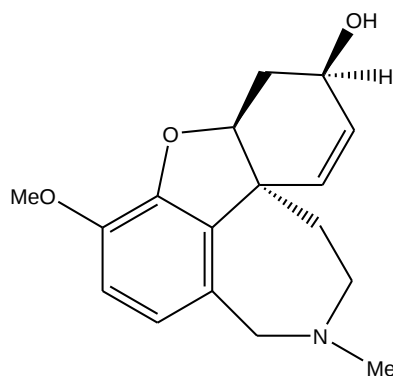


Figura 12F: Estrutura química do alcalóide Galantamina.

Os inibidores de acetilcolinesterase aprovados pela FDA, EUA, para o tratamento da doença de Alzheimer (DA) são a tacrina (Cognex[®]), donepezil (Aricept[®]), rivastigmina (Exelon[®]) e a galantamina (Reminyl[®]) (Almeida 1998, Racchi *et al.* 2003).

A seleção de espécies vegetais com atividade inibidora da acetilcolinesterase para o tratamento da Doença de Alzheimer já vem sendo realizada pelo grupo, inclusive com uma patente que contempla o desenvolvimento de um medicamento a partir de uma espécie vegetal nativa (Patente DEINPI-010247, 08-10-03). Este trabalho surgiu do projeto temático “Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Novos Fármacos - Fase II” dentro do programa BIOTA/FAPESP (Processo nº 03/02176-7), cujos objetivos principais são a descoberta de fármacos de alto valor comercial, a conservação e o desenvolvimento sustentável dos biomas Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Neste contexto, o estudo de *Conchocarpus fontanesianus* com atividade inibidora da acetilcolinesterase, detectada no extrato bruto obtido do caule (ramos caulinares sem folhas) em triagens realizadas por nosso grupo em regiões de Mata Atlântica, é de grande importância para o conhecimento de seus constituintes ativos.

2. Objetivos

2.1. Geral

Realizar o estudo químico de *C. fontanesianus* direcionado para a obtenção dos compostos responsáveis pela atividade inibidora da acetilcolinesterase.

2.2. Específicos

1. Avaliar o potencial anticolinesterásico do extrato etanólico e frações obtidas de ramos caulinares sem folhas (caules) de *C. fontanesianus*, de espécimes coletados na Estação Ecológica Juréia-Itatins, São Paulo.
2. Purificar as frações ativas responsáveis pela atividade anticolinesterásica.
3. Caracterizar as substâncias químicas presentes nas frações ativas.
4. Avaliar o potencial anticolinesterásico das substâncias purificadas.

3. Material e Métodos

3.1. Material Botânico - *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani

Os ramos caulinares sem folhas (caules) de *C. fontanesianus* foram coletados na Estação Ecológica Juréia-Itatins (licença processo SMA nº 260.108 – 007.532 2009), Núcleo Arpoador, São Paulo (Lat. 24°22'58,5" S, Long. 47°01'07,5" O, Altitude 38m). Após a triagem, o material foi colocado em galpão próprio para secagem, a temperatura ambiente. O material seco foi moído em moinho de facas para obtenção do pó (Moinho de facas TE 625 Tipo Cróton, Marca TECNAL, Mesh 20).

Uma exsicata (voucher – coletor nº RSCabral 09) da planta se encontra depositada no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt/SMA). A **Figura 13** indica o local de coleta na Estação Ecológica Juréia-itatins dos indivíduos estudados.

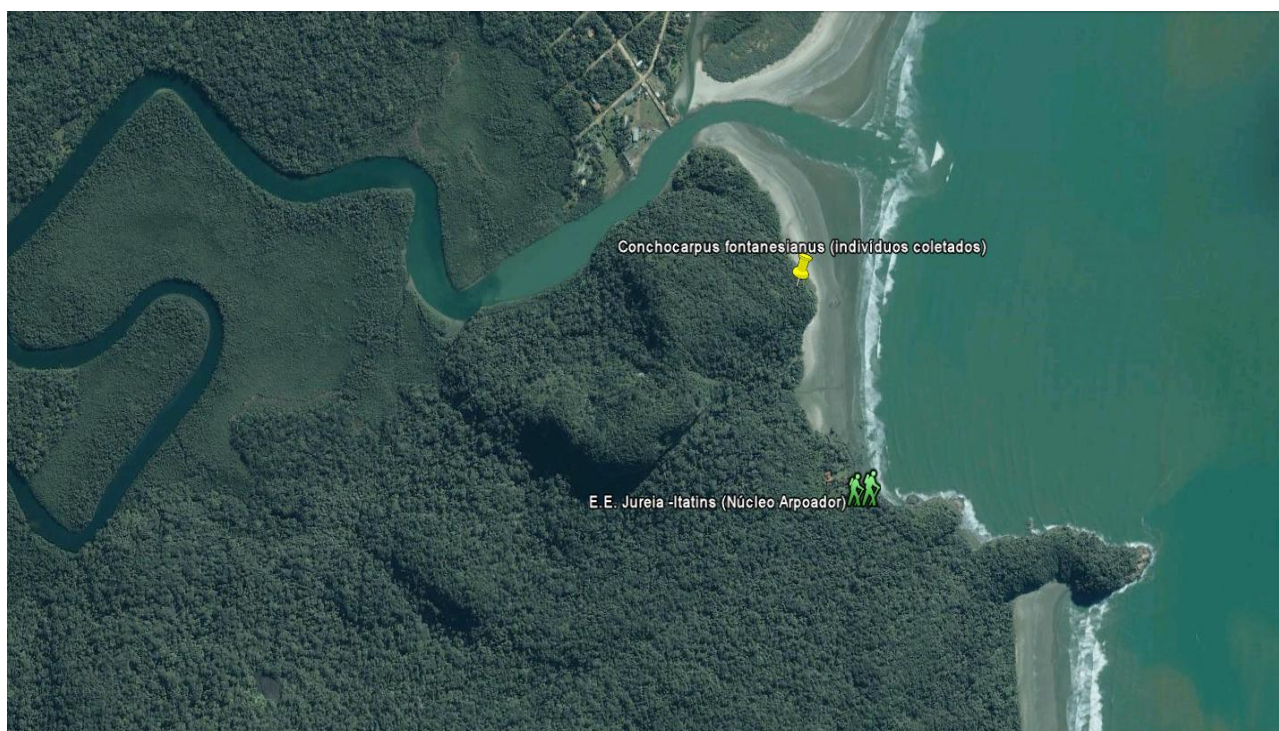


Figura 13: Foto aérea do local de coleta (Fonte: Google Earth 2010).

3.2. Obtenção do Extrato Etanólico (EE)

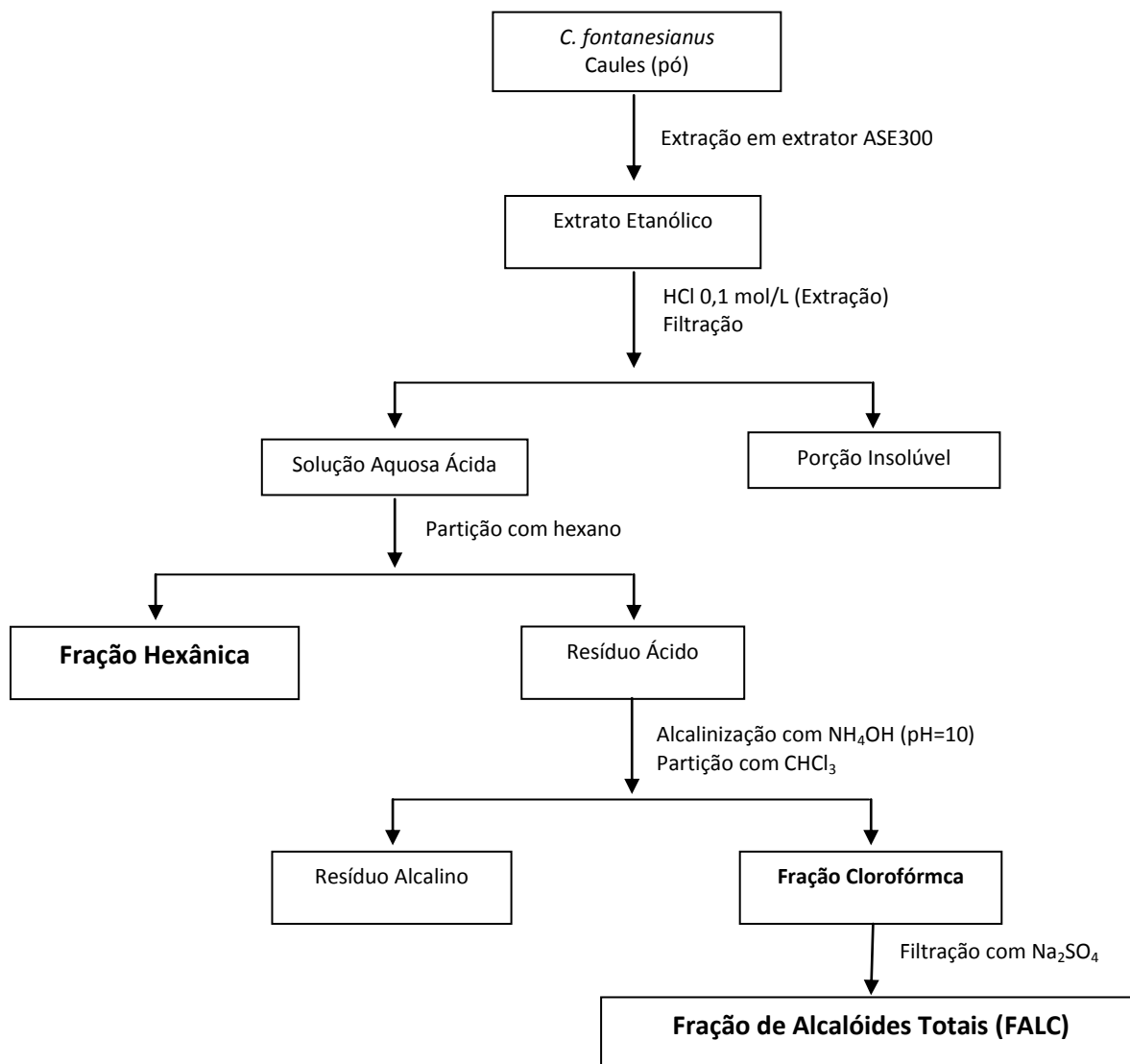
O pó do caule de *C. fontanesianus* foi submetido à extração com álcool etílico comercial, sob pressão (1500 - 1700 psi) e temperatura de 60° C em extrator ASE300 (DIONEX). A solução etanólica obtida foi concentrada em evaporador rotatório e

posteriormente levada ao banho-maria (50° C) para eliminação completa do álcool etílico e obtenção do extrato etanólico bruto seco (EE).

3.3. Obtenção da Fração de Alcalóides Totais

A extração dos alcalóides foi feita pelo método STAS-OTTO (ácido/base). O extrato etanólico bruto seco obtido foi submetido à lavagem com água ácida (HCl 0,1 mol/L). Após a lavagem o material foi filtrado e a solução aquosa ácida resultante da lavagem foi submetida à partição líquido/líquido com hexano, por sete vezes. A solução hexânica (fração orgânica-1) foi concentrada em evaporador rotatório dando origem a fração hexânica (Fr.HEX). A resíduo ácido restante da partição com hexano foi alcalinizado até pH 10 com hidróxido de amônio e submetido à partição líquido/líquido com clorofórmio por sete vezes até o esgotamento dos alcalóides. A fração clorofórmica resultante (fração orgânica-2) foi filtrada em sulfato de sódio anidro para retirar a umidade e posteriormente concentrada em evaporador rotatório e banho-maria (50°C), obtendo-se a fração de alcalóides totais (FALC). A cada partição, tanto com hexano quanto com clorofórmio, sempre foi utilizado uma quantidade de solvente duas vezes o volume da solução particionada.

O extrato etanólico (EE), a fração hexânica (Fr.HEX) e a fração de alcalóides totais (FALC) foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da atividade anticolinesterásica, qualitativamente e quantitativamente. O resíduo alcalino resultante da partição com clorofórmio foi descartado, pois não apresentou atividade. O fluxograma do processo de partição (extração ácido/base) segue abaixo (**Fluxograma 1**).



Fluxograma 1: Processo de extração de alcalóides em sistema ácido/base (Stas-Otto).

3.4. Análises Cromatográficas

3.4.1. Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

O amostras foram analisadas em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) e sistema de solvente CHCl₃:MeOH:NH₄OH, 90:7,5:2,5 v/v. Após desenvolvimento da cromatografia, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda (λ) de 254 nm e 366 nm, em equipamento CAMAG ReproStar 3 e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z.

3.4.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

A purificação da FALC foi realizada em cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP), em placas de vidro de 20 X 20 cm com sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck), utilizando-se equipamento automático CAMAG para preparar as placas e uma proporção de 30 gramas de sílica em 75 mililitros de água destilada para cinco placas. A espessura da camada de sílica na placa foi de 0,5 mm. O sistema de eluição utilizado na CCDP foi CHCl₃:MeOH:NH₄OH, 90:7,5:2,5 v/v. Após a eluição e análise sob luz UV de (λ) 254 nm e 365 nm, as faixas de interesse foram marcadas e separadas. Após a separação das faixas de interesse, a sílica contendo material adsorvido foi submetida à filtração com metanol em sistema sob vácuo. O material resultante foi submetido ao banho maria (40 °C) para completa eliminação do solvente.

3.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para verificação do perfil cromatográfico foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Varian Pro Star 310 (analítico) com loop de 20 μ L, detecção em luz ultravioleta de (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min e a fase móvel acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e água deionizada (milli Q) na proporção de 10:45:45 v/v, de modo isocrático. O tempo total de corrida foi 30 minutos.

A FALC foi diluída em MeOH na concentração de 1mg/mL e foram injetados 20 μ L no aparelho. Utilizou-se coluna C-18 de fase reversa da marca Varian, POLARIS 5 (250 x 4,6 mm; 5 μ); essa coluna é indicada quando se utiliza um sistema móvel com grande porcentagem de água.

3.5. Identificação dos Compostos Purificados

A FALC foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector foto diodo (LC-DAD), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) com analisador do tipo quadrupolar de armadilha de íons (íon trap) e espectrometria de massas de inserção direta com analisador de massas por tempo de voo (ESI-MS).

As substâncias purificadas foram analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) com analisador de massas quadrupolar.

A fração hexânica (Fr.HEX) apresentou menor atividade anticolinesterásica em relação à fração de alcalóides totais (FALC) e por esse motivo a mesma não foi submetida à purificação e identificação dos compostos presentes.

3.5.1. Análise por LC-DAD e LC-MS

As análises em LC-DAD e LC-MS foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). O sistema utilizado foi composto por um LC da marca Shimadzu, com bomba LC-10AD vp, detector UV-Vis SPD-M10A vp, injetor automático SIL-10AF, coluna C-18 de fase reversa Phenomenex Luna (250 X 4,6mm - 5 μ) e um MS modelo Esquire Plus 3000 da marca Bruker, com fonte de íons em eletrospray e analisador do tipo quadrupolar de armadilha de íons (ion trap). Todos os dados foram obtidos no modo positivo ESI(+).

A amostra da FALC foi preparada em concentração de 1mg/mL, injetando-se 20 μ L e como fase móvel da análise cromatográfica ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45 v/v, de modo isocrático.

3.5.2. Análise por ESI-MS

A análise por ESI-MS foi realizada no equipamento QToF MS spectrometer (Micromass, Manchester, UK), tendo como fonte de ionização eletrospray. As condições gerais empregadas foram: temperatura da fonte 100 °C, voltagem do capilar 2,1 kV e voltagem do cone 40 V. Todos os dados foram obtidos no modo positivo ESI(+)-MS e foram tratados usando o programa Mass Lynx 3.5 (Waters, Manchester, UK). As amostras foram dissolvidas em MeOH 100% (+ 0,1% HCOOH) ou em MeOH:H₂O (1:1, + 0,1% HCOOH) e analisadas por inserção direta.

3.5.3. Análise por GC-MS

O sistema GC-MS foi composto por um cromatógrafo a gás Agilent 6890 Series, com coluna apolar HP-5MS de 30 m X 0,25 mm (0,25 μ m de filme) e um espectrômetro de massas Agilent 5937 NetWork tendo como fonte de ionização impacto eletrônico com analisador de massas do tipo quadrupolo. O sistema utilizou Hélio (He) como gás de arraste.

As amostras (FALC e compostos purificadas) foram preparadas em [10 mg/mL] e analisadas utilizando duas metodologias. O primeiro método utiliza temperatura do injetor em 290 °C, injeção de 3 µL, fluxo de hélio em 1 mL/min, ionização em 70 eV e temperatura da fonte de íons de 230 °C. A análise foi desenvolvida sob o seguinte programa: temperatura inicial 100 °C por um minuto, aumentando 15 °C por minuto até 300 °C, mantendo em 300 °C por 10 minutos. O segundo método utiliza os mesmo parâmetros, com uma única alteração no programa de análise, que nesse caso inicia-se com 100 °C por um minuto e aumenta 5 °C por minuto até 300 °C, mantendo em 300 °C por 10 minutos, aumentando assim o tempo da análise cromatográfica.

3.6. Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE)

3.6.1. Ensaio Qualitativo por Bioautografia (CCDA)

Amostras do extrato bruto (200 µg), das frações semi-purificadas (100 µg) e das substâncias purificadas (50 µg) foram analisadas em CCDA de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Como controle positivo foi utilizado fisostigmina (0,05 µg). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com uma solução de enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%). Logo após, a placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com uma mistura da solução etanólica de acetato de 1-naftila (5 mL; 0,25%) e aquosa do sal Fast Blue B (20 mL; 0,25%) (Marston *et al.* 2002).

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca, sobre o fundo de coloração roxa indica inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

As cromatoplasmas obtidas foram observadas em (λ) 254 nm e 366 nm em equipamento CAMAG ReproStar 3, e fotografados em câmera fotográfica Epson PhotoPC 3000Z. Os valores dos R_f's (fator de retenção) foram calculados onde houve inibição da reação enzimática, observados pela presença de halos brancos sobre o fundo roxo.

As atividades observadas nesse ensaio são consideradas forte (+++), moderada (++) e fraca (+).

3.6.2. Quantificação da Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE) em Microplaca

A atividade inibidora da acetilcolinesterase foi avaliada quantitativamente usando um leitor de Elisa BIOTEK, modelo Power Wave, “software KC4”, baseado no método de Ellman (Ellman *et al.* 1961). Nas 96 cavidades da placa, foram adicionados 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de 5,5’-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução **C** (3 mM, DTNB ou reagente de Ellman), 50 µL da solução **B**, 25 µL da amostra de extrato dissolvida em metanol e diluída 10 vezes na solução **A** para obter uma concentração final de 0,2 mg mL⁻¹ (Rhee *et al.* 2001, Trevisan *et al.* 2003).

A absorbância foi medida a 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U mL⁻¹) e a absorbância foi medida novamente após 5, 10, 15 e 20 minutos de incubação da enzima. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10% de MeOH na solução **A**, considerada atividade total da AChE, 100%). O padrão utilizado como controle positivo é a fisostigmina em uma concentração de 1,56 µg/ml.

As diluições das amostras utilizadas nas avaliações quantitativas em microplaca, partindo de uma solução mãe com concentração de 20 mg/mL foram: 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,12 µg/ml, 1,56 µg/ml e 0,78 µg/ml.

Soluções - A: Tris/HCL 50 mM, pH=8; **B:** Tris/HCL 50 nM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina fração V; **C:** Tris/HCL 50nM, pH=8, com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de MgCL₂ .6H₂O.

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção e Rendimento do Extrato Etanólico, FALC e Fr.HEX

A extração do material vegetal (pó dos ramos caulinares) com o equipamento extrator ASE (Accelerated Solvent Extraction) foi realizada três vezes, com seis celas por extração, simplesmente para verificar o rendimento real, utilizando as respectivas massas, 152,51g (1º extração), 189,62g (2º extração) e 192,1g (3º extração).

Na primeira extração foram obtidos 4,06g de EE (2,66%); 0,0873g de FALC (2,15%); e 0,0263g de Fr.HEX (0,64%). Na segunda extração foram obtidos 4,84g de EE (2,55%); 0,1048g de FALC (2,16%); e 0,0320g de Fr.HEX (0,66%). Com a terceira extração foram obtidos 5,63g de EE (2,93%); 0,1213g de FALC (2,15%); e 0,0344g de Fr.HEX (0,61%). Os resultados em massas e rendimento em porcentagem do extrato etanólico, da FALC e da Fr.HEX em relação ao pó do caule e ao extrato etanólico bruto, respectivamente, obtidos a partir do método de extração em ASE 300 estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Valores das massas e respectivos rendimentos obtidos para extrato etanólico bruto (EE), fração de alcalóides totais (FALC) e fração hexânica (Fr.HEX).

Amostra	Massa do material (g) e Rendimento (%) obtido nas extrações e partições		
	1º Extração	2º Extração	3º Extração
Pó dos ramos caulinares	152,51g	189,62g	192,1g
EE	4,06g (2,66%)	4,84g (2,55%)	5,63g (2,93%)
FALC	0,0873g (2,15%)	0,1048g (2,16%)	0,1213g (2,15%)
Fr.HEX	0,0263g (0,64%)	0,0320g (0,66%)	0,0344g (0,61%)

O uso de altas temperaturas aumenta a capacidade de o solvente solubilizar amostras, além de poder agir quebrando a forte interação matriz-soluto causado pelas forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo entre as moléculas do soluto e os sítios ativos da matriz. Altas temperaturas também diminuem a viscosidade do solvente ajudando sua penetração na matriz e facilitando o contato com o analito. A utilização de pressão auxilia a extração de materiais presos em poros e regiões da matriz do material onde não seria alcançada em condições atmosféricas normais (Richter, 1996; Ong, 2000; Huie, 2002), como

alguns compartimentos subcelulares, o que é muito importante já que muitos metabólitos secundários como alcalóides, por exemplo, costumam serem produzidos e armazenados em regiões celulares como vacúolos, vesículas e regiões restritas da membrana do retículo endoplasmático (Hashimoto & Yamada, 1994). A pressão também auxilia a solubilização de bolhas de ar mais rapidamente, aumentando a superfície de contato do solvente com as partículas da matriz, além de manter o solvente orgânico no estado líquido em condições de altas temperaturas (Richter *et al.*, 1996; Huie, 2002).

A extração de material vegetal sob pressão e temperatura em comparação com outros métodos, como por exemplo, maceração, Soxhlet ou percolação apresenta vantagens em relação ao consumo reduzido de solvente, menor tempo de extração e maior rendimento obtido nas frações. (Kaufmann & Christen, 2002).

Ao todo foram utilizados 2,02 Kg de pó de ramos caulinares, obtendo 51,02g de extrato etanólico (2,53%). O teor de metabólitos secundários pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles o local e época de coleta da planta e principalmente a parte da planta utilizada (Falkenberg *et al.*, 1999).

4.2. Análises Cromatográficas e Purificação da FALC

A análise da FALC em HPLC teve boa resolução e no perfil cromatográfico foi observada a existência de quatro substâncias principais representadas como picos majoritários, conforme pode ser observado na **Figura 14**, nos tempos de retenção 8,67; 12,22; 14,35 e 16,18 minutos.

A purificação do material foi realizada em cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) conforme descrito na seção Material e Métodos, no item **3.4.2**. Para seleção das faixas que seriam purificadas foi usado como critério a atividade anticolinesteásica mais intensa observada no ensaio qualitativo em cromatografia de camada delgada analítica (**Figura 15**). A **Figura 15** mostra uma placa preparativa com a identificação das respectivas faixas selecionadas para purificação, observadas sob luz UV (λ) 366 nm e 254 nm. Na purificação foram utilizados um total de 300 mg de FALC em 70 placas preparativas. A **Tabela 2** mostra as massas e o rendimento de cada uma das cinco frações obtidas da FALC em CCDP, assim como o significado das siglas que representam cada substância isolada.

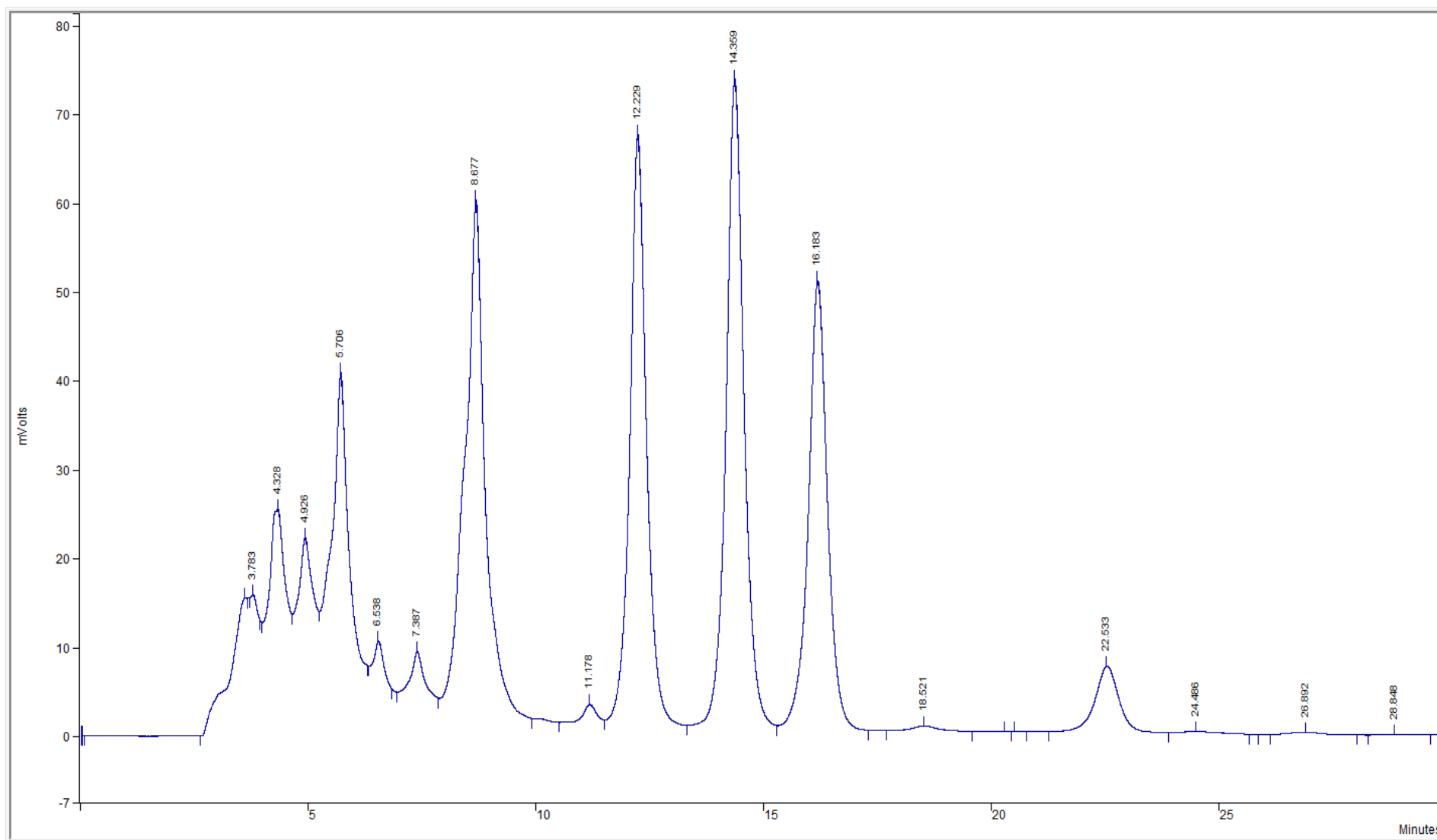


Figura 14: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da fração de alcalóides totais (FALC). Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min; fase móvel ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45, v/v, isocrático.

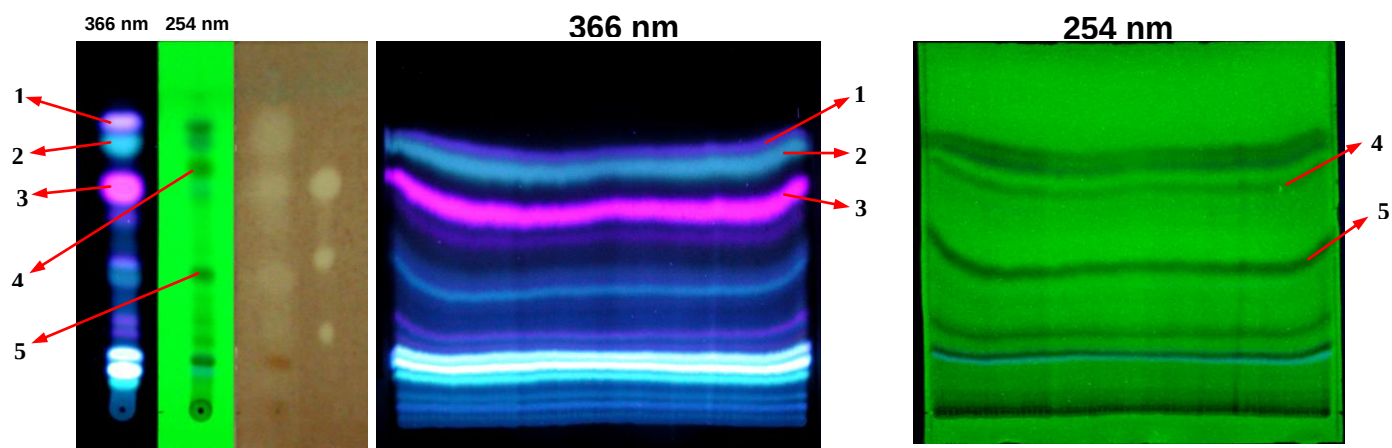


Figura 15: Da esquerda para a direita: Placa analítica da fração alcaloídica a (λ) de 366 nm, 254 nm e revelada para atividade anticolinesterásica, (utilizada como critério para seleção das faixas a serem isoladas); placa preparativa da fração alcaloídica a (λ) de 366 e 254 nm. As faixas selecionadas para purificação estão indicadas com as setas vermelhas e as respectivas nomenclaturas de cada uma. Sistema de solvente $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:NH}_4\text{OH}$, 90:7,5:2,5 v/v.

Tabela 2: Valores das massas obtidas no processo de purificação por CCDP. Os valores de rendimento são com relação à fração alcaloídica (FALC).

Rendimento Obtido na Purificação da FALC Ramos Caulinares		
Faixas Purificadas (sub-frações)	Massa	Rendimento (em relação a FALC)
1 (faixa 1-UV longo)	26,5mg	8,83%
2 (faixa 2-UV longo)	22,9mg	7,63%
3 (faixa 3-UV longo)	31mg	10,33%
4 (faixa 1-UV curto)	27,7mg	9,23%
5 (faixa 2-UV curto)	35,2mg	11,73%

Em busca de maior pureza dos compostos químicos isolados, foi realizada novamente purificação das sub-frações, sendo cada uma delas submetidas mais uma vez à CCDP. Essa purificação foi uma tentativa de reduzir a contaminação com fitalato, observada através das análises preliminares realizadas em GC-MS. No entanto isso

acarretou em uma perda de material, reduzindo a massa final das substâncias purificadas, conforme mostra a **Tabela 3**.

Tabela 3: Valores das massas obtidas após a 2º purificação realizada em CCDP.

Resultados da 2º Purificação em CCDP Realizado com os Compostos Purificados		
Faixas Purificadas (sub-frações)	(1º purificação)	(2º purificação)
1 (faixa 1-UV longo)	26,5mg	6,4mg
2 (faixa 2-UV longo)	22,9mg	4,2mg
3 (faixa 3-UV longo)	31mg	6,4mg
4 (faixa 1-UV curto)	27,7mg	3,9mg
5 (faixa 2-UV curto)	35,2mg	4,3mg

Após a purificação em CCDP, os compostos foram analisados por HPLC analítico com detector de luz UV (242 nm) para identificação dos picos correspondentes aos compostos purificados, por semelhança no tempo de retenção. Os tempos de retenção obtidos em HPLC após a análise cromatográfica dos compostos purificados, comparando com os tempos de retenção do cromatograma da fração de alcalóides totais (FALC) estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4: Comparação entre os valores dos tempos de retenção das sub-frações purificadas e os picos correspondentes da FALC.

Faixas Purificadas (sub-frações)	Correlação dos tempos de retenção das substâncias isoladas (minutos)	
	Compostos Purificados	Pico correspondente (FALC)
1A	14.718	14.359
1B	16.587	16.183
2	12.475	12.229
3	6.572	6.167
4	7.882	7.387
5	8.423	8.677

Nas análises em HPLC das sub-frações purificadas, as amostras foram preparadas em concentração de 1mg/mL em MeOH e foram injetados 20 µL. A **Figura 16A** mostra o cromatograma em HPLC da sub-fração 1, a primeira faixa purificada em CCDP em luz UV (λ) 366nm. Esta sub-fração trata-se de uma mistura, apresentando dois picos (1A e 1B). A **Figura 16B** é o cromatograma da análise em HPLC da sub-fração 2, a segunda faixa purificada em CCDP em luz UV (λ) 366nm. A **Figura 16C** mostra o cromatograma em HPLC da sub-fração 3, a terceira faixa purificada em CCDP em luz UV (λ) 366nm. As **Figuras 17A e 17B** são os cromatogramas das sub-frações 4 e 5, respectivamente. A sub-fração 4 foi a primeira faixa purificada em CCDP em luz UV (λ) 254nm e a sub-fração 5 foi a segunda faixa purificada em CCDP em luz UV (λ) 254nm.

A **Figura 18** mostra o cromatograma da fração alcaloídica (FALC) com a respectiva identificação de cada pico com a sub-fração correspondente.

Uma placa de cromatografia analítica contendo as sub-frações purificadas foi revelada com iodo platinato (**Figura 19**), um revelador químico utilizado para compostos nitrogenados. O resultado deu positivo para quatro das sub-frações purificadas. Apenas a sub-fração 3 teve resultado negativo.

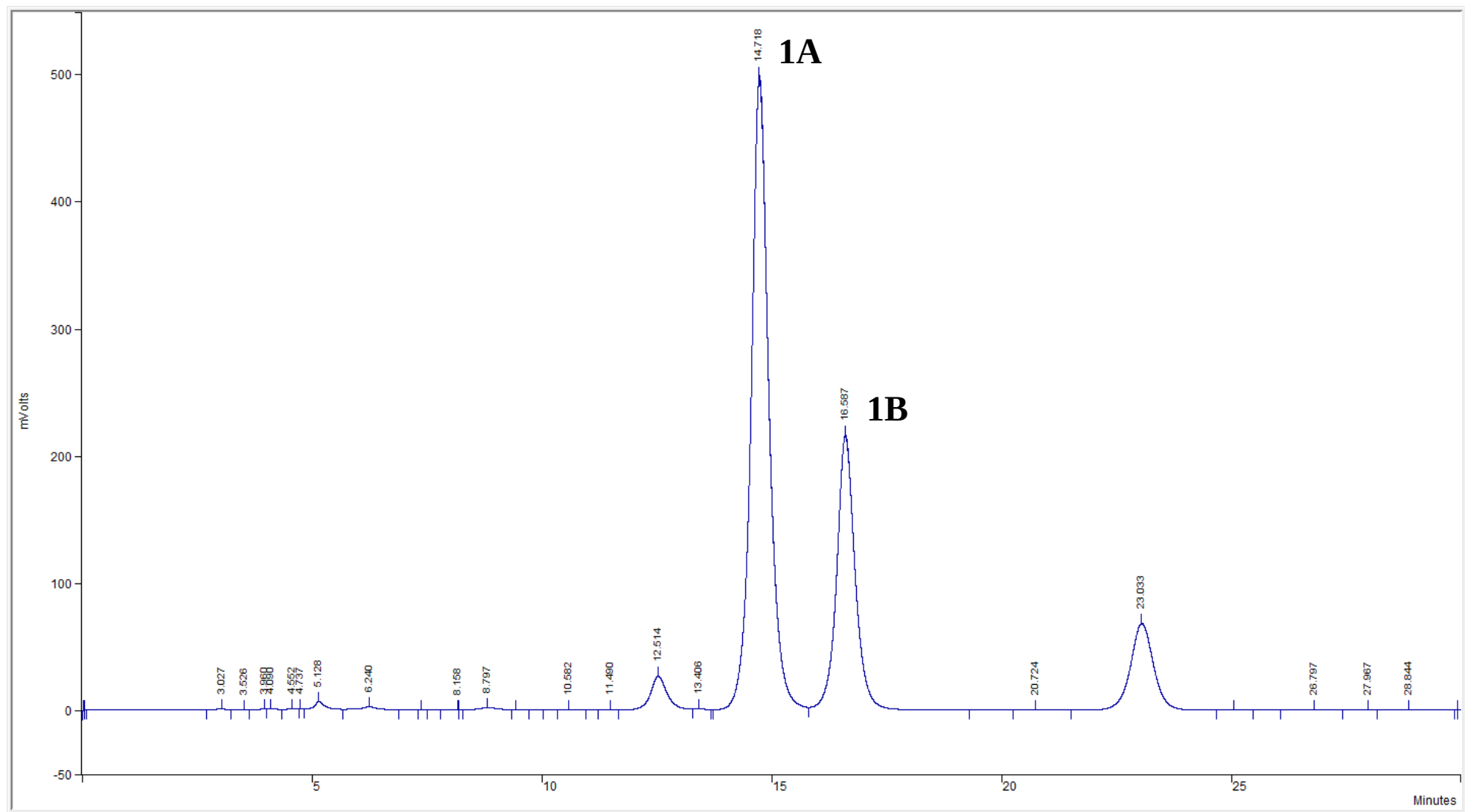


Figura 16A: Perfil cromatográfico por HPLC analítico da sub-fração 1. Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min; fase móvel ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45, v/v, isocrático.

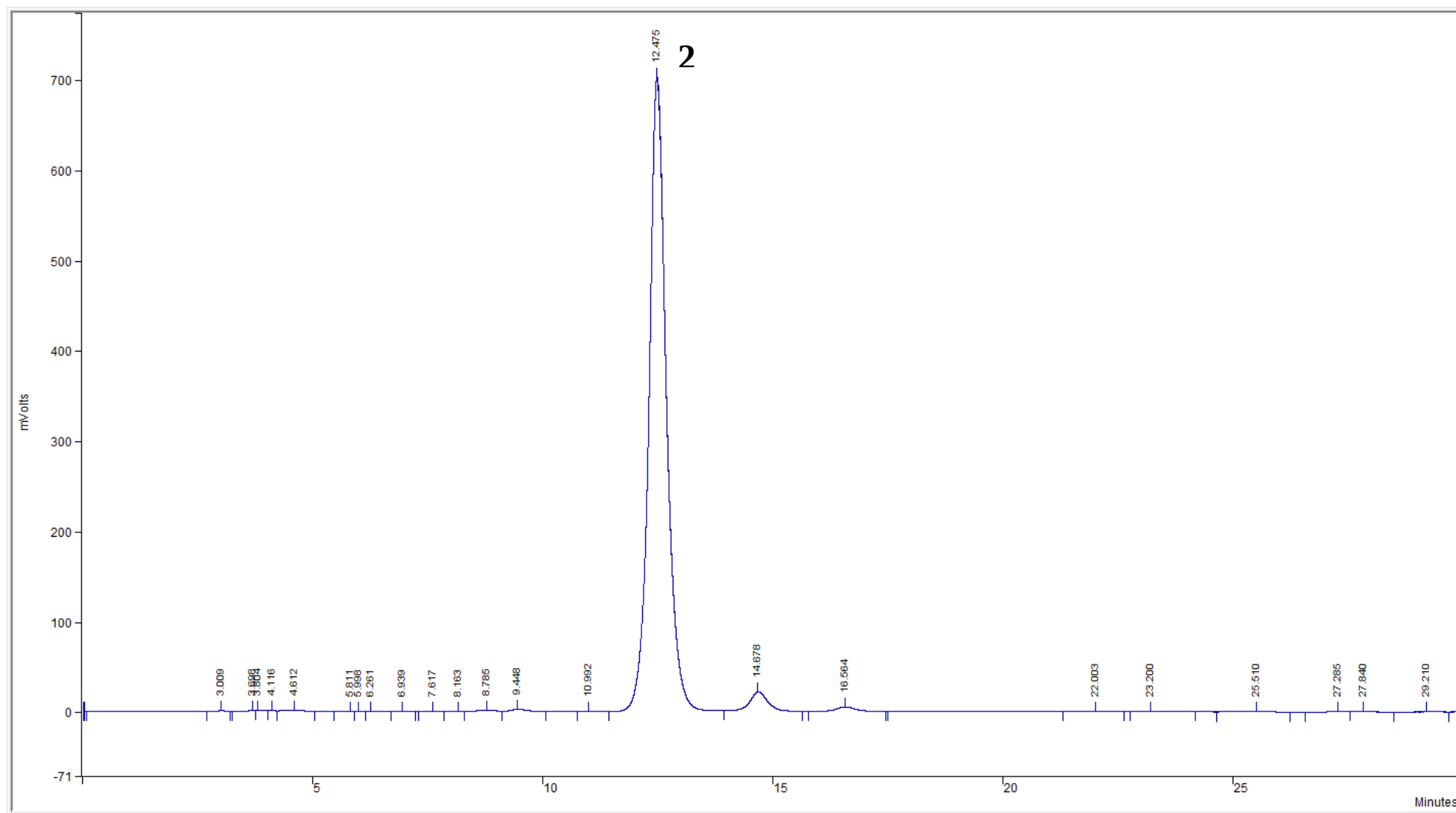


Figura 16B: Perfil cromatográfico da sub-fração 2 por HPLC analítico. Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min; fase móvel ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45, v/v, isocrático.

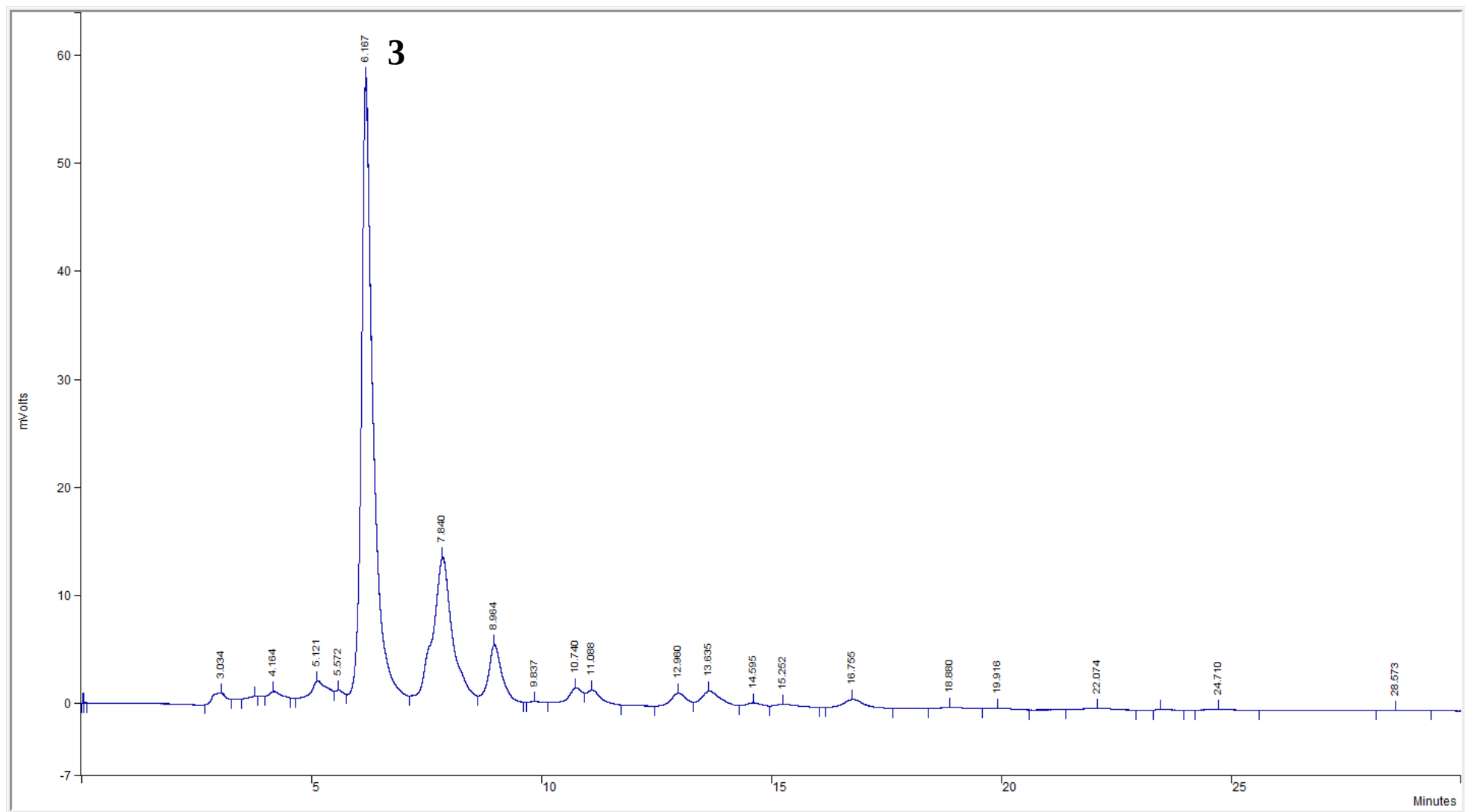


Figura 16C: Perfil cromatográfico da sub-fração 3 por HPLC analítico. Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min; fase móvel ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45, v/v, isocrático.

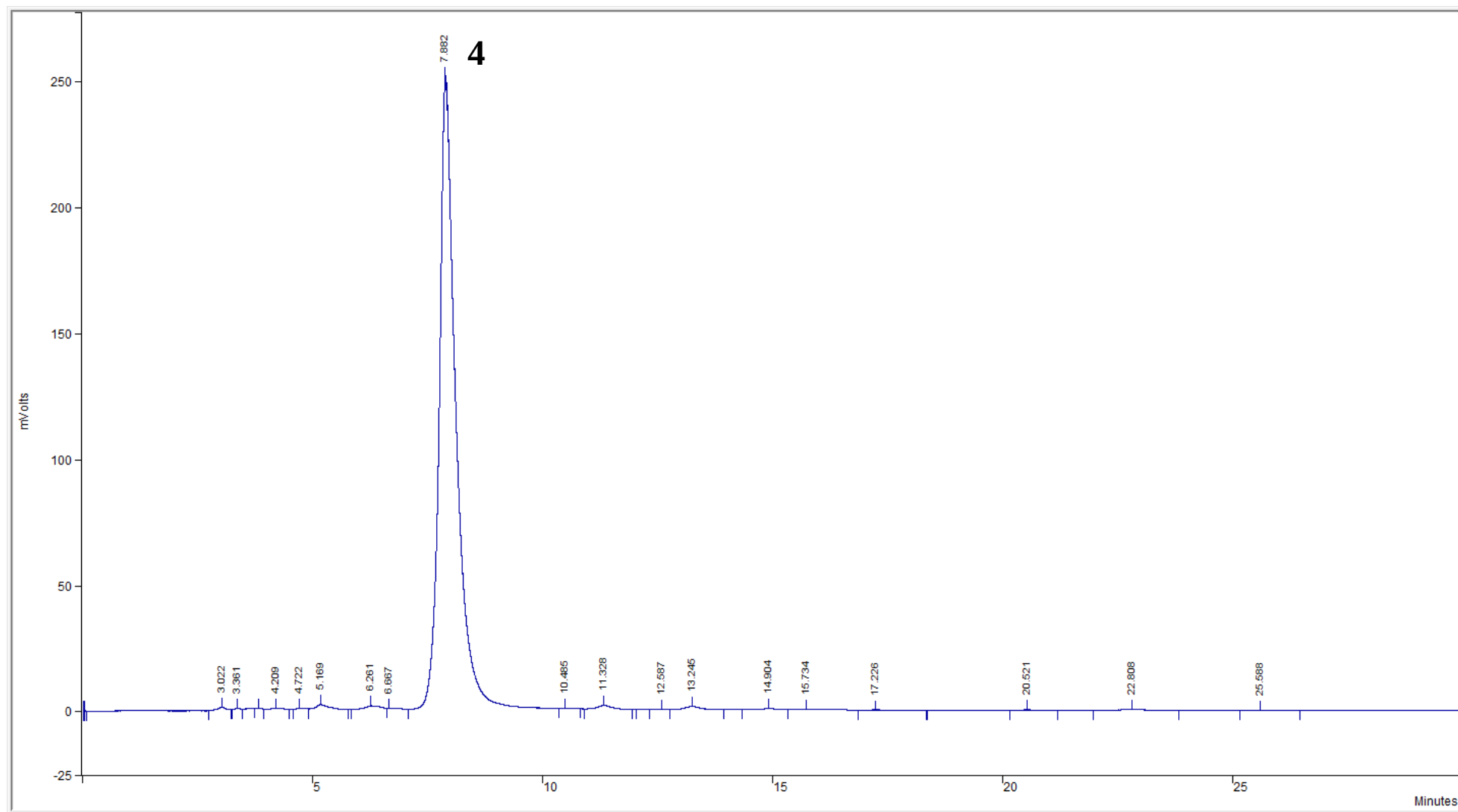


Figura 17A: Perfil cromatográfico da sub-fração 4 por HPLC analítico. Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min; fase móvel ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45, v/v, isocrático.

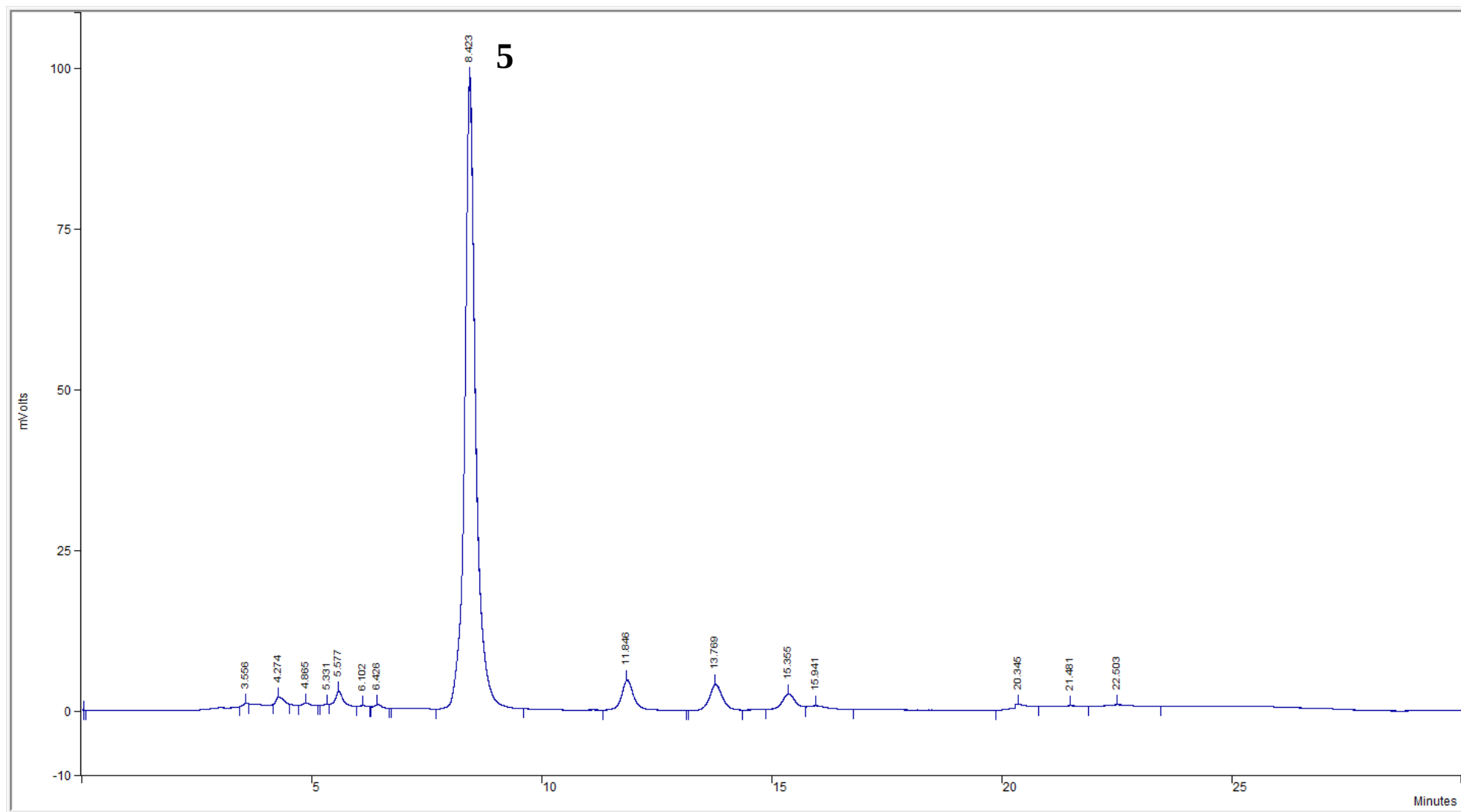


Figura 17B: Perfil cromatográfico da sub-fração 5 por HPLC analítico. Detecção sob luz ultravioleta a (λ) 242 nm, fluxo de 1 mL/min; fase móvel ACN:MeOH:H₂O, 10:45:45, v/v, isocrático.

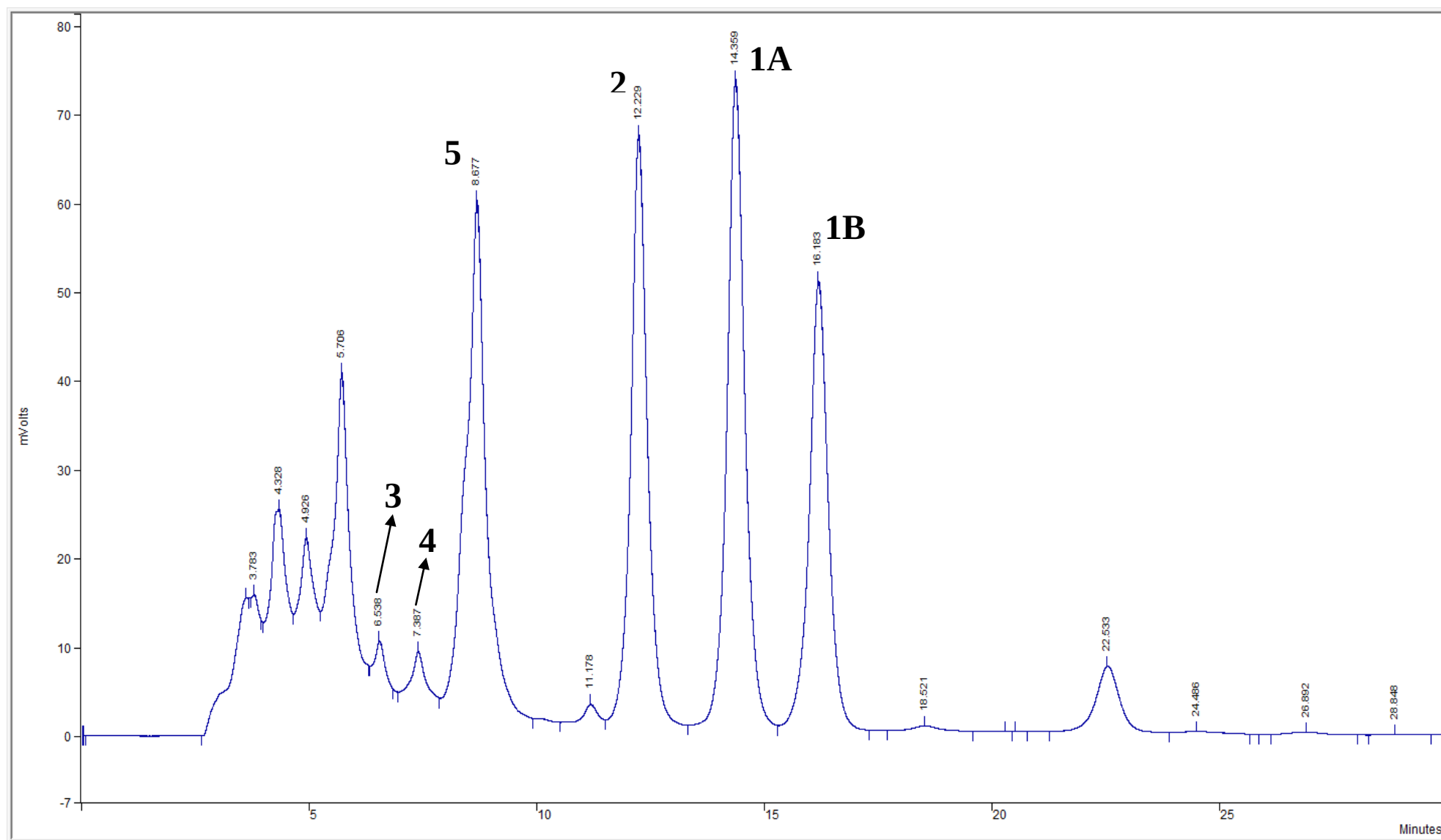


Figura 18: Perfil cromatográfico por HPLC da FALC identificando os picos correspondentes as subfrações purificados.

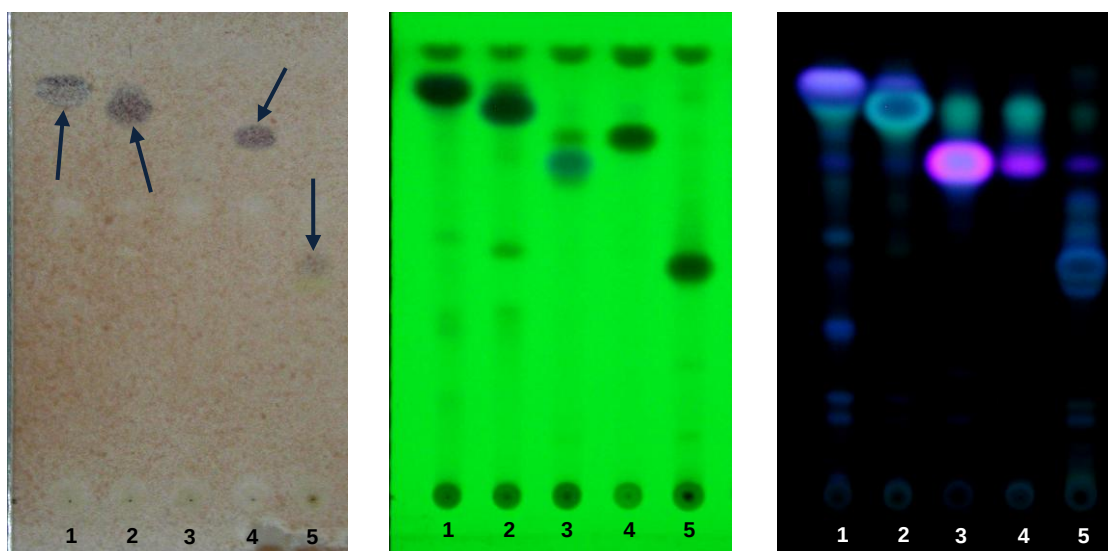


Figura 19: Da esquerda para a direita: Placa analítica com os compostos purificados revelados com iodo platinato; placa antes da revelação observada sob (λ) de 254 e 366 nm, respectivamente. [100 μ g] por spot. Sistema de solvente CHCl_3 :MeOH: NH_4OH ; 90:7,5:2,5 v/v. 1.Sub-fração 1. 2.Sub-fração 2. 3.Sub-fração 3. 4.Sub-fração 4. 5.Sub-fração 5.

As manchas reveladas nos R_f 's 0,84; 0,81; 0,74 e 0,47 correspondem com os R_f 's dos compostos purificados nas sub-frações 1, 2, 4 e 5, respectivamente.

4.3. Identificação dos Compostos Purificados

4.3.1. Análises por LC-MS e LC-DAD

A fração de alcalóides totais foi submetida à análise em LC-MS ESI(+) para verificar as massas moleculares (m/z) dos compostos isolados (**Figura 20 e 21**). O espectro de massas gerado pela análise em LC-MS utiliza um sistema de ionização por eletrospray que é mais brando, formando aductos com hidrogênio ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ou sódio ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). O analisador de massas do tipo quadrupolo de armadilha de íons aumenta a probabilidade de colisões bimoleculares, podendo ocorrer também à formação de dímeros ($[\text{2M}+\text{H}]^+$ ou $[\text{2M}+\text{Na}]^+$).

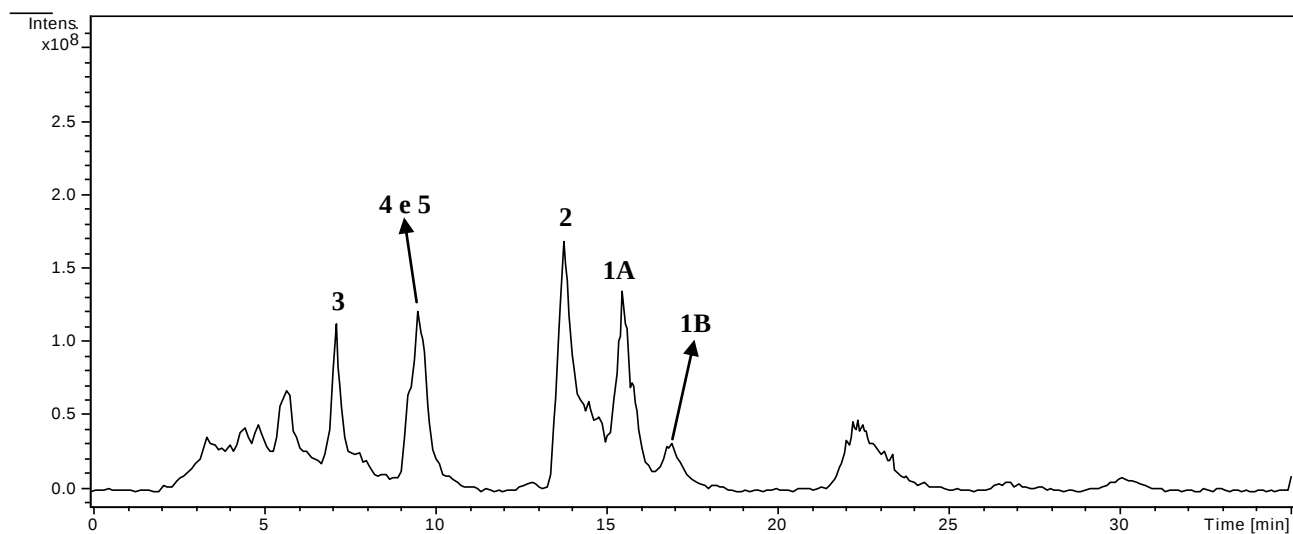


Figura 20: Cromatograma de contagem de íons totais (TIC - Total ions count) da FALC por HPLC-MS.

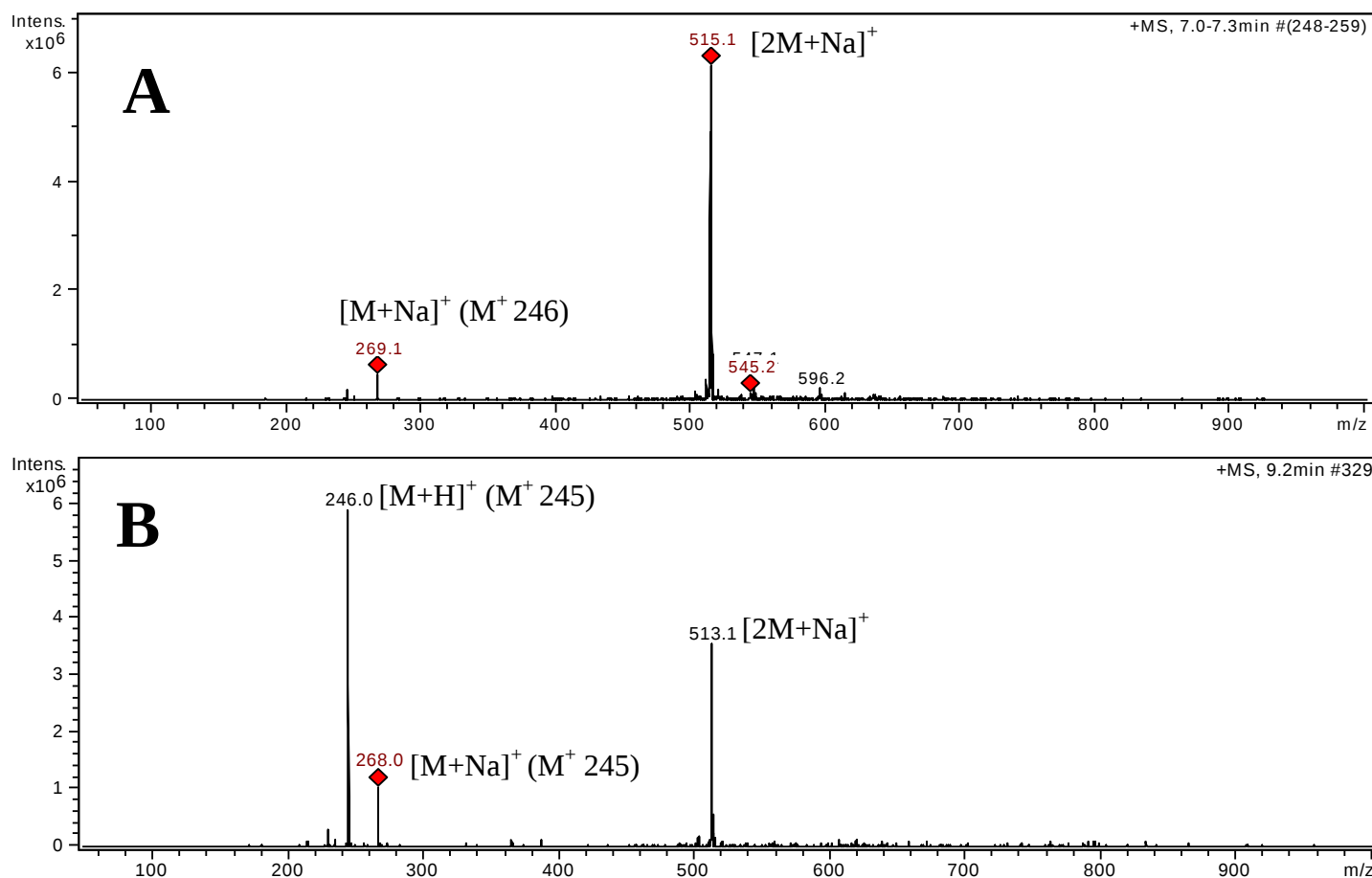
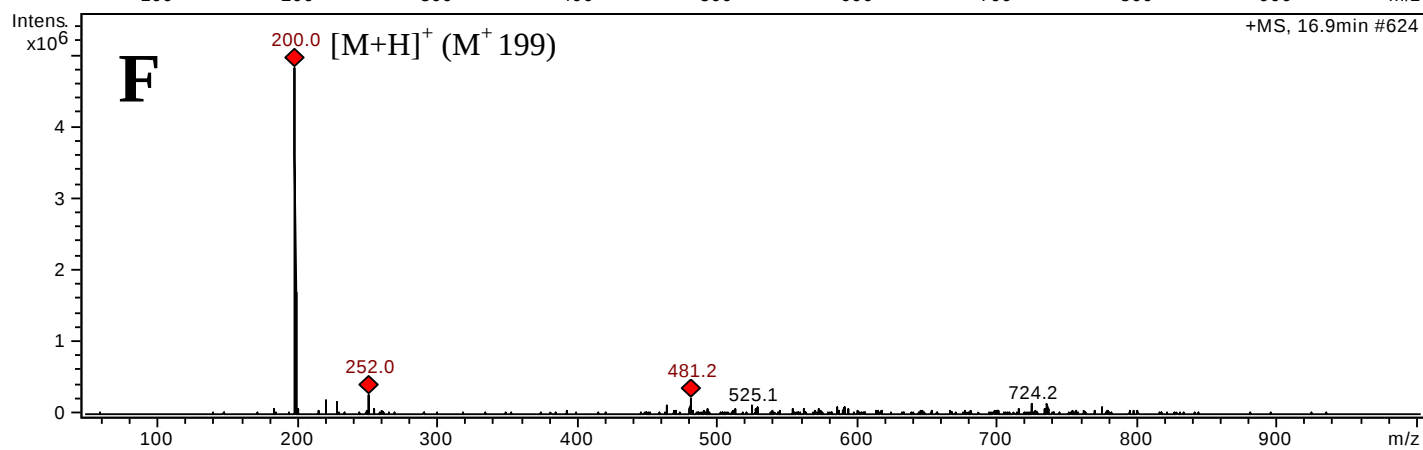
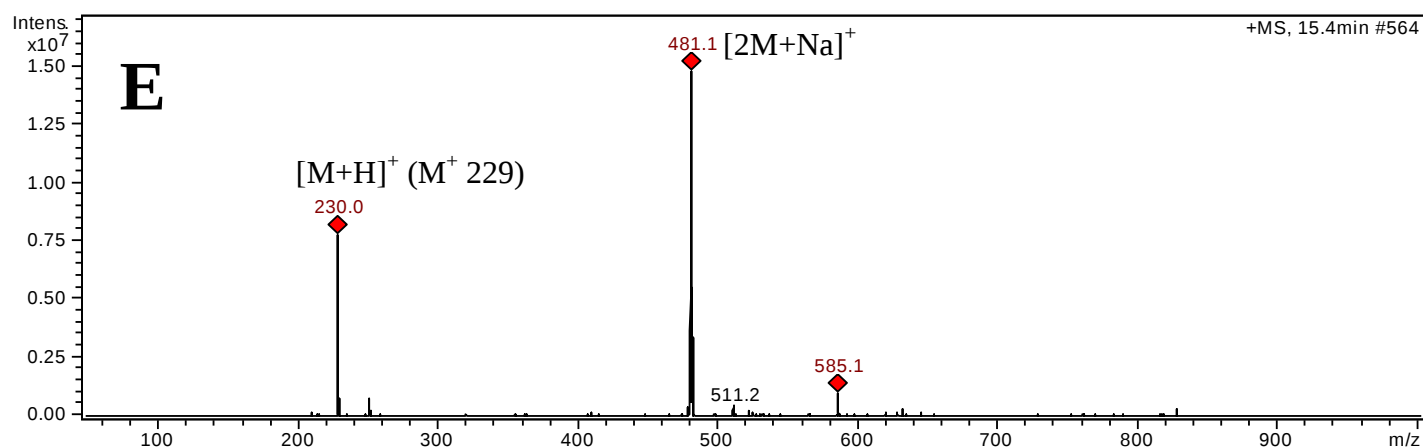
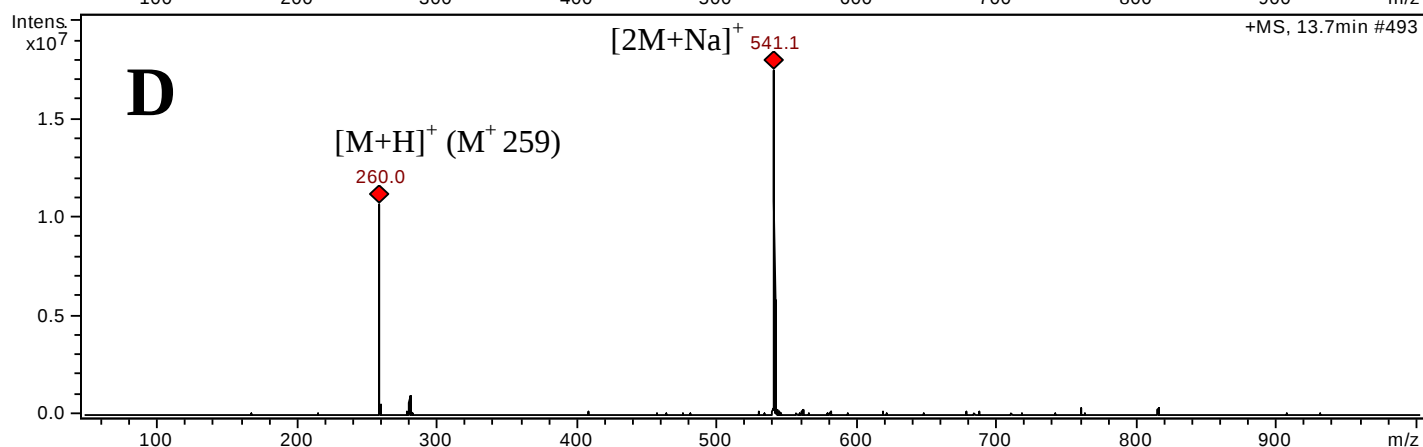
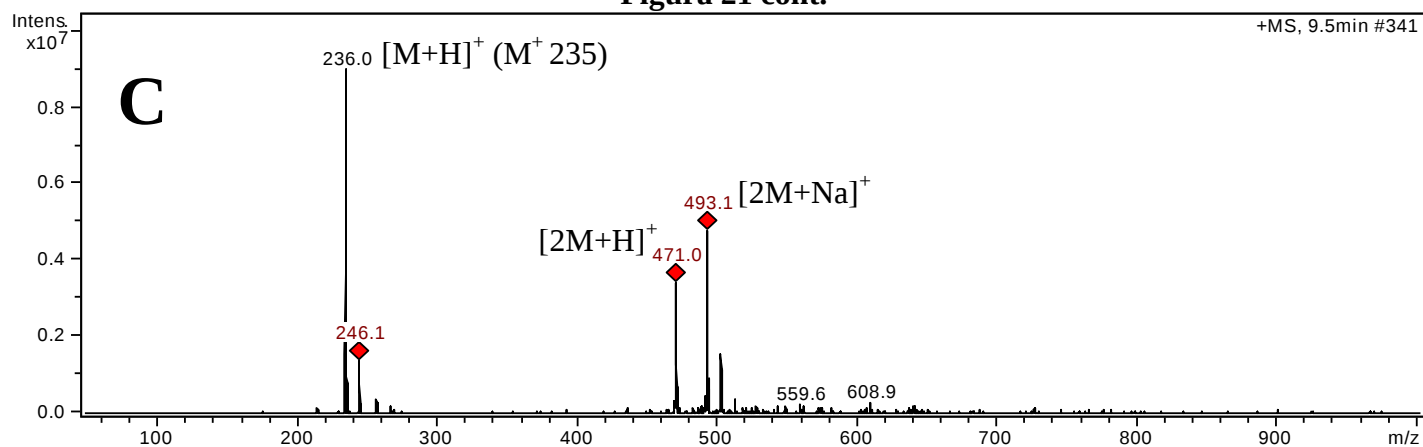


Figura 21: ESI(+)-MS da fração de alcalóides totais (FALC). (A) sub-fração 3, (B) sub-fração 5, (C) sub-fração 4, (D) sub-fração 2, (E) sub-fração 1A, (F) sub-fração 1B.

Figura 21 cont.



Após a análise anterior (**Figuras 20 e 21**), alguns dos íons mais intensos obtidos foram analisados por ESI(+)-MS/MS para observar os padrões de fragmentação (**Figura 22**).

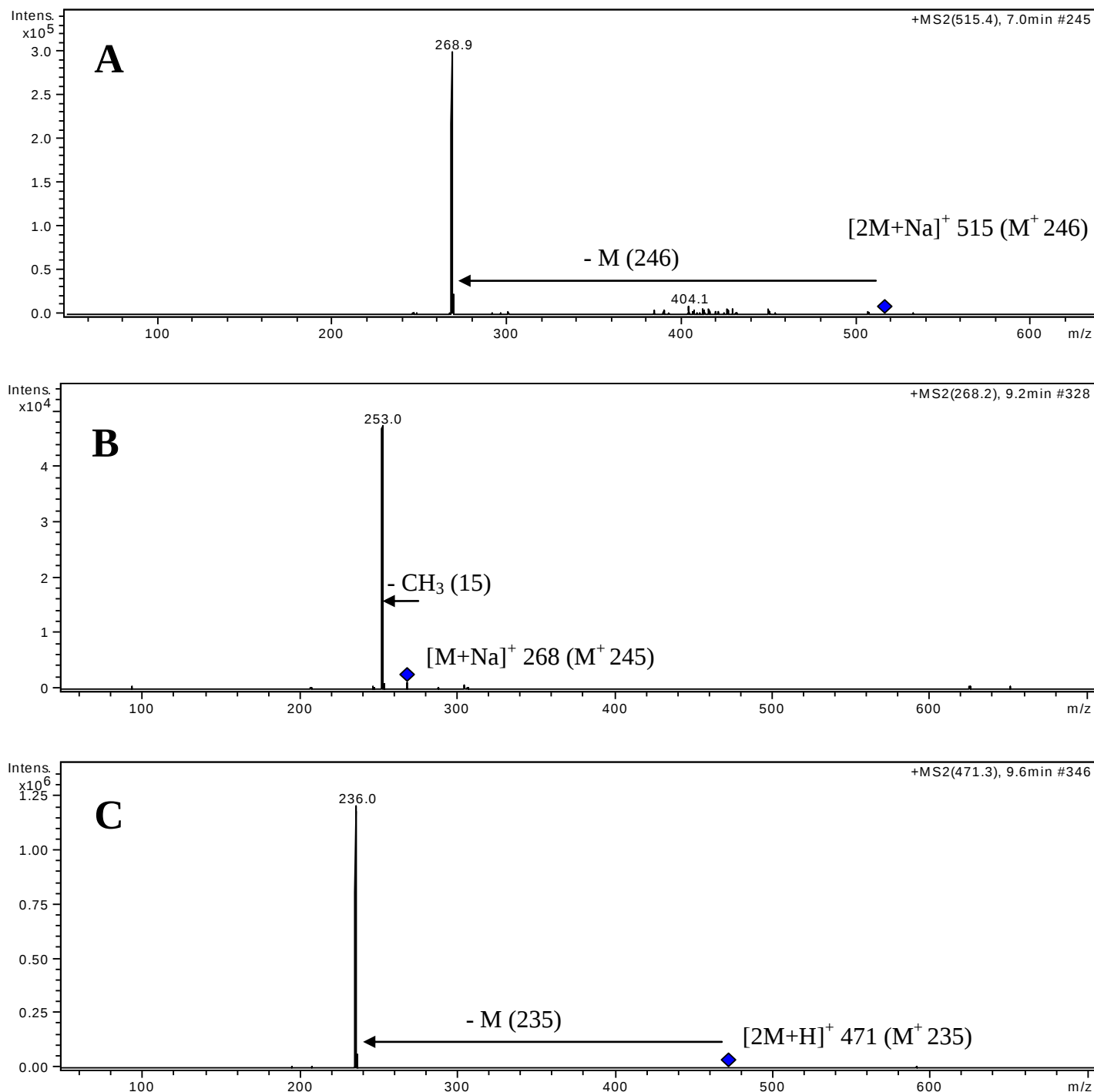
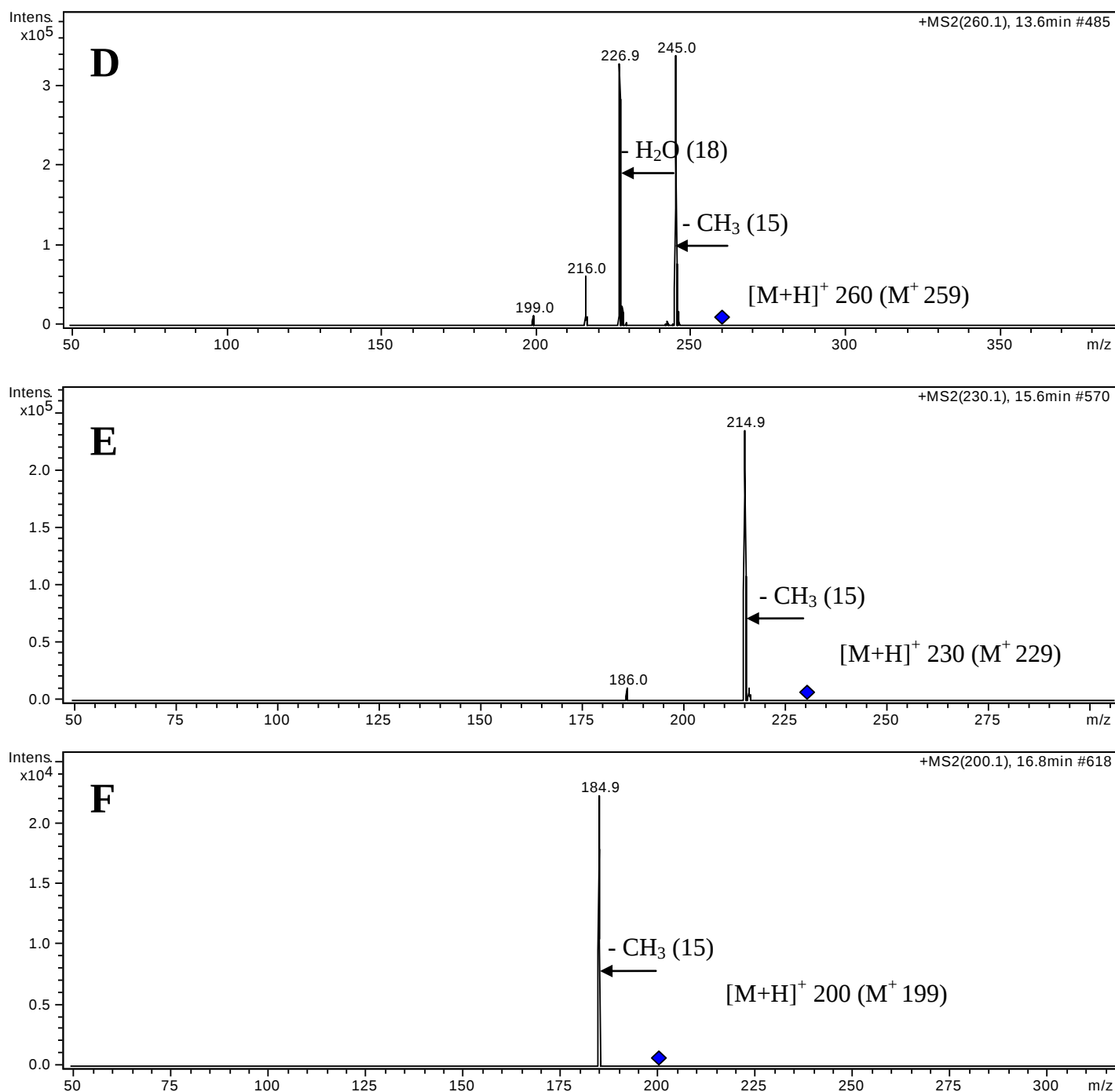


Figura 22: ESI(+)-MS/MS da fração de alcalóides totais (FALC). **(A)** sub-fração 3, **(B)** sub-fração 5, **(C)** sub-fração 4, **(D)** sub-fração 2, **(E)** sub-fração 1A, **(F)** sub-fração 1B.

Figura 22 cont.



A fração de alcalóides totais também foi submetida à análise em LC-DAD (**Figura 23**), onde foram observados os espectros de UV dos compostos purificados. Podemos observar padrão de semelhança nos espectros de UV dos compostos presentes nas sub-frações 1 (1A e 1B), 2 e 5, e diferença em relação ao composto presente na sub-fração 3 (Tabela 5). O composto da sub-fração 4 não foi detectado nessa análise.

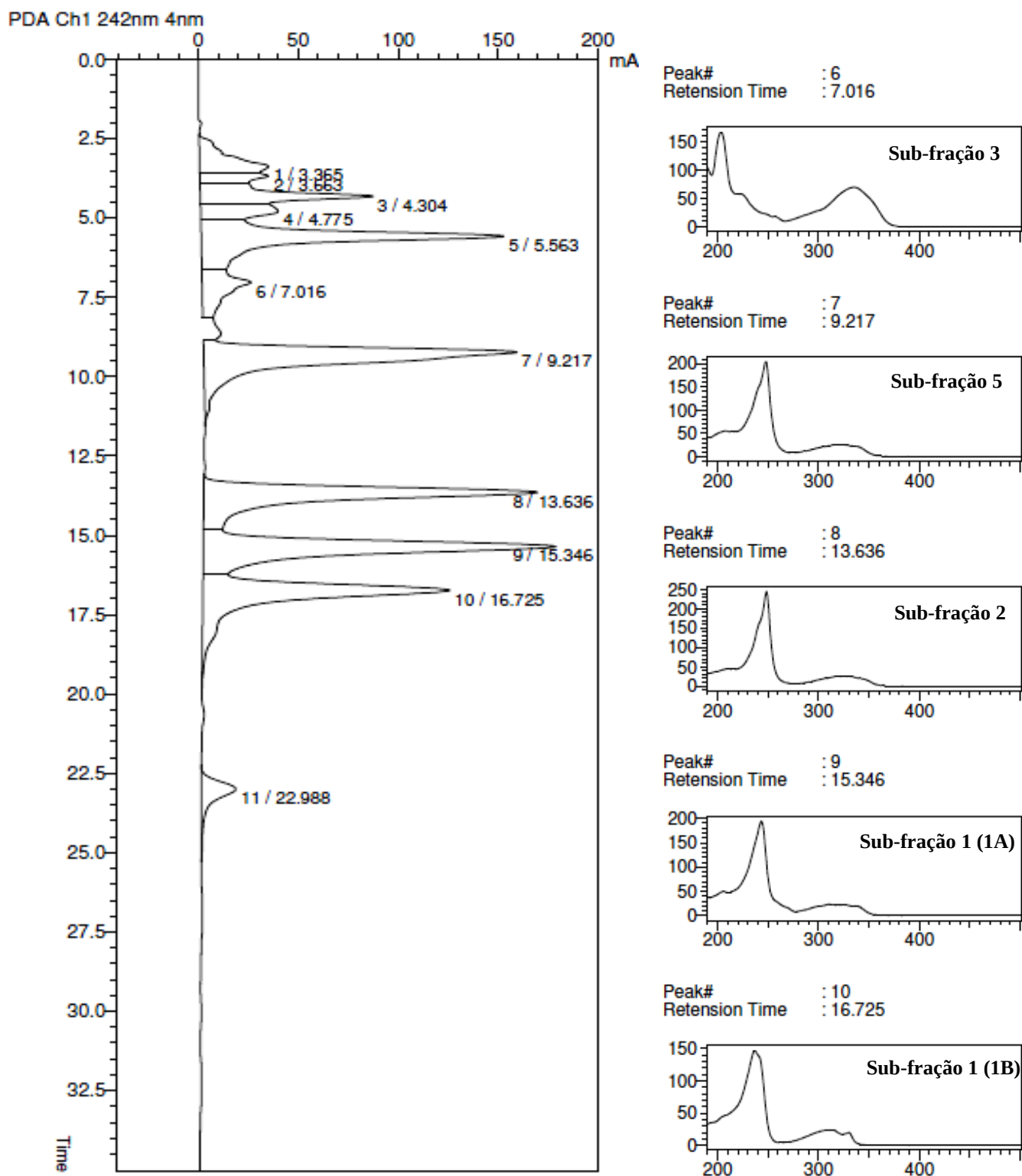


Figura 23: Cromatograma da FALC por LC-DAD. Os espectros de UV referentes aos compostos purificados estão representados do lado direito da figura.

Tabela 5: Espectro de absorção UV dos compostos presentes nas sub-frações.

Valores Máximos de Absorção do Espectro de Ultra Violeta	
Compostos Purificados	$\lambda_{\text{Máximo}}$ (nm)
Sub-fração 1 (1A)	243 / 311
Sub-fração 1 (1B)	237 / 310
Sub-fração 2	248 / 331
Sub-fração 3	208 / 335
Sub-fração 4	ñ detectado
Sub-fração 5	248 / 320

Observando os valores dos íons moleculares dos compostos purificados, podemos afirmar que apenas um não contém nitrogênio. Segundo a *Regra do Nitrogênio*, se um composto tiver um número par de átomos de nitrogênio (zero é um número par), seu íon molecular aparecerá em um valor de massa par. Por outro lado, se um composto tiver um número ímpar de átomos de nitrogênio, esse composto formará um íon molecular com massa ímpar. A *Regra do Nitrogênio* resulta do fato de que o nitrogênio, apesar de ter massa par, possui uma valência de número ímpar. Conseqüentemente, um átomo de hidrogênio extra é incluído como parte da molécula, fazendo com que tenha uma massa ímpar (Pavia *et al.*, 2010). Somente a sub-fração 3 não tem o valor de seu íon molecular ímpar, apresentando valor par (m/z 246).

4.3.2. Análise por ESI-MS

A fração de alcalóides totais (FALC) foi analisada por espectrometria de massas por inserção direta ESI(+)-MS, full scan (**Figura 24**). Os dois íons mais intensos foram selecionados para análise por ESI(+)MS/MS (**Figura 25**).

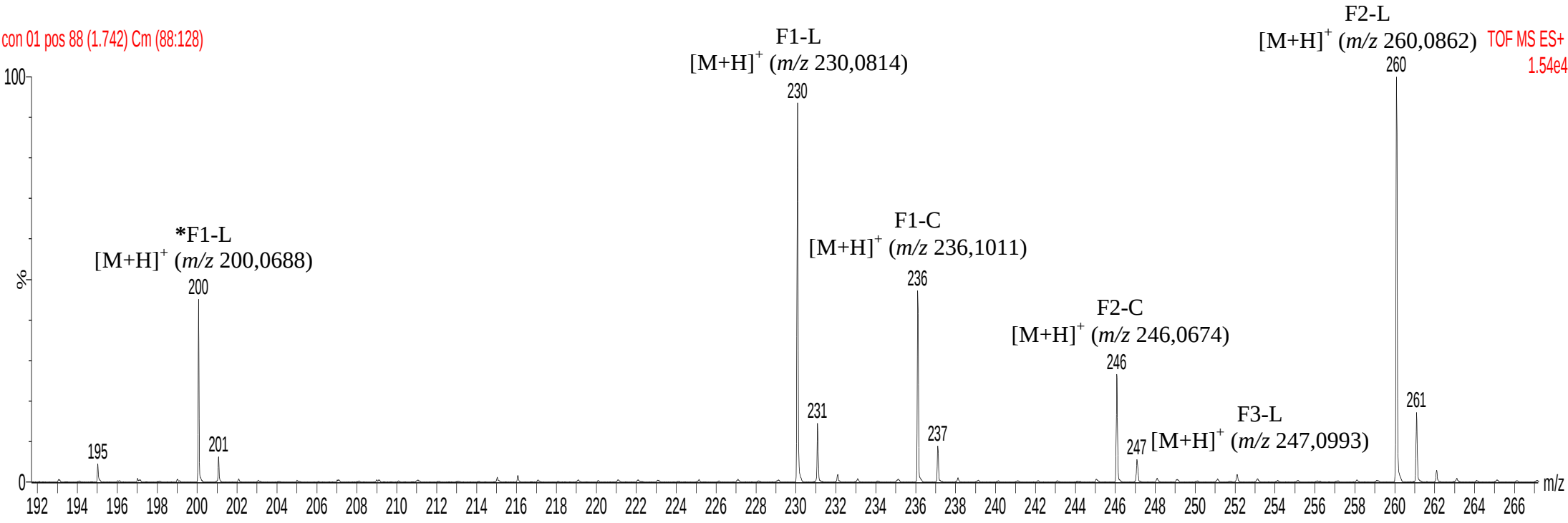
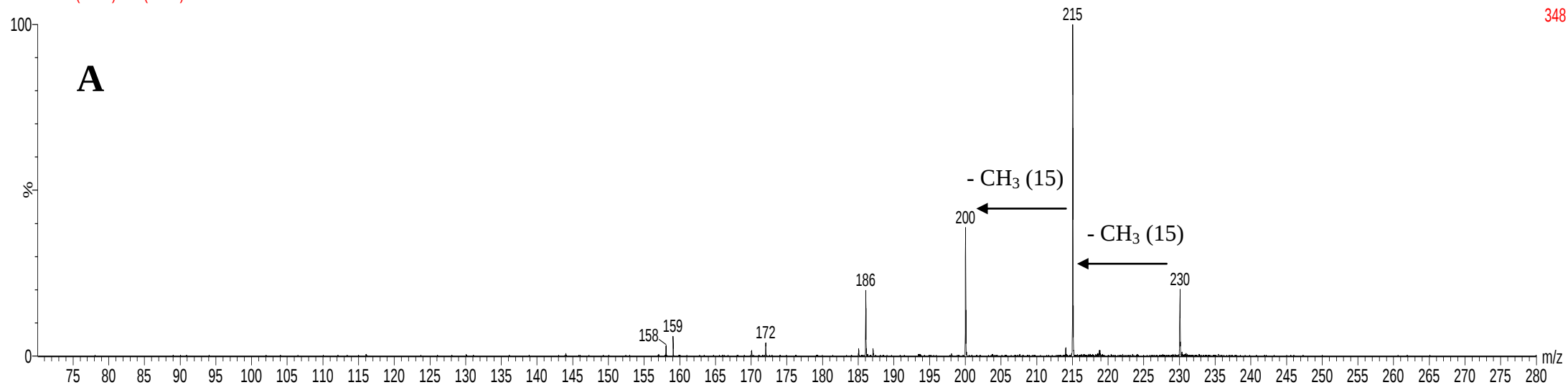


Figura 24: ESI(+)-MS full scan da fração de alcalóides totais dos ramos caulinares de *C. fontanesianus*.

con 230 92 (2.001) Cm (86:96)

TOF MSMS 230.08ES+
348



con 260 65 (1.342) Cm (60:66)

TOF MSMS 260.08ES+
322

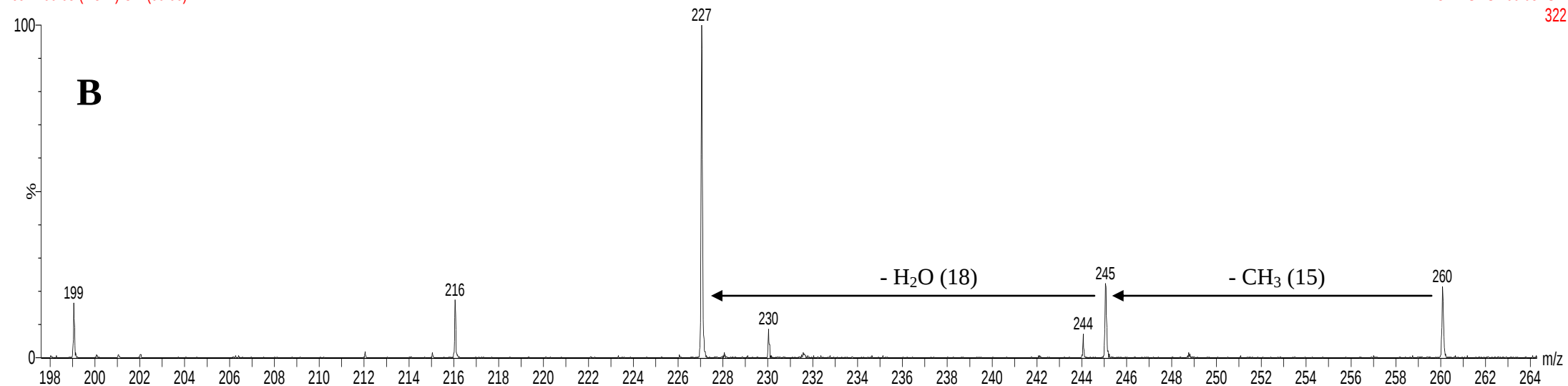


Figura 25: ESI(+)-MS/MS dos dois íons mais intensos obtidos na análise por ESI(+)-MS full scan da FALC dos ramos caulianres de *C. fontanesianus*. **(A)** Sub-fração 1 (composto majoritário – 1A), **(B)** Sub-fração 2.

Através da análise full scan por ESI(+)-MS foram confirmados os valores dos íons moleculares $[M]^+$ de cada composto purificado. Através da análise em ESI(+)-MS/MS dos dois íons mais intensos, foi observado um padrão de fragmentação igual ao observado em LC-MS/MS, com perda inicial de um grupo metila.

4.3.3. Análise por GC-MS

Após o processo de purificação, as sub-frações foram analisadas por GC-MS para obtenção dos espectros de massas e padrão de fragmentação. Os espectros de massas dos compostos purificados obtidos na sub-fração 1 (**Figura 26A e 26B**), sub-fração 2 (**Figura 27**), sub-fração 3 (**Figura 28**), sub-fração 4 (**Figura 29**) e sub-fração 5 (**Figura 30**) demonstram e confirmam as respectivas massas moleculares (m/z), observadas pelos valores dos íons moleculares.

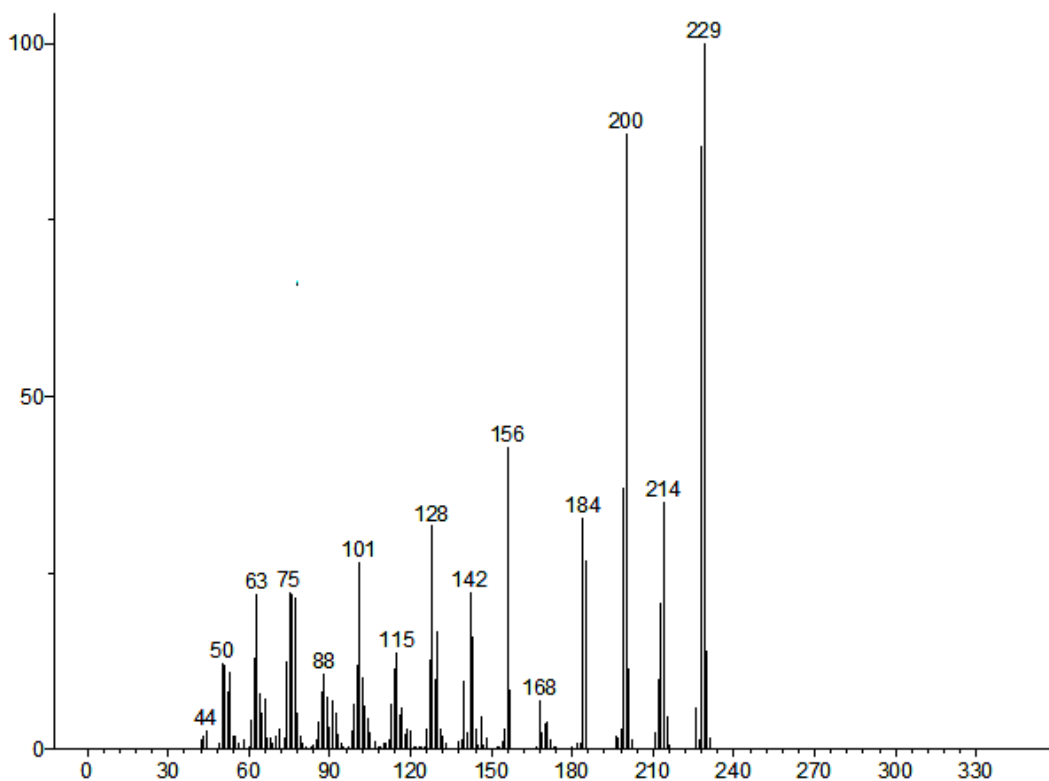


Figura 26A: Espectro de massas do composto majoritário (1A) purificado da sub-fração 1, com íon molecular $[M]^+$ 229.

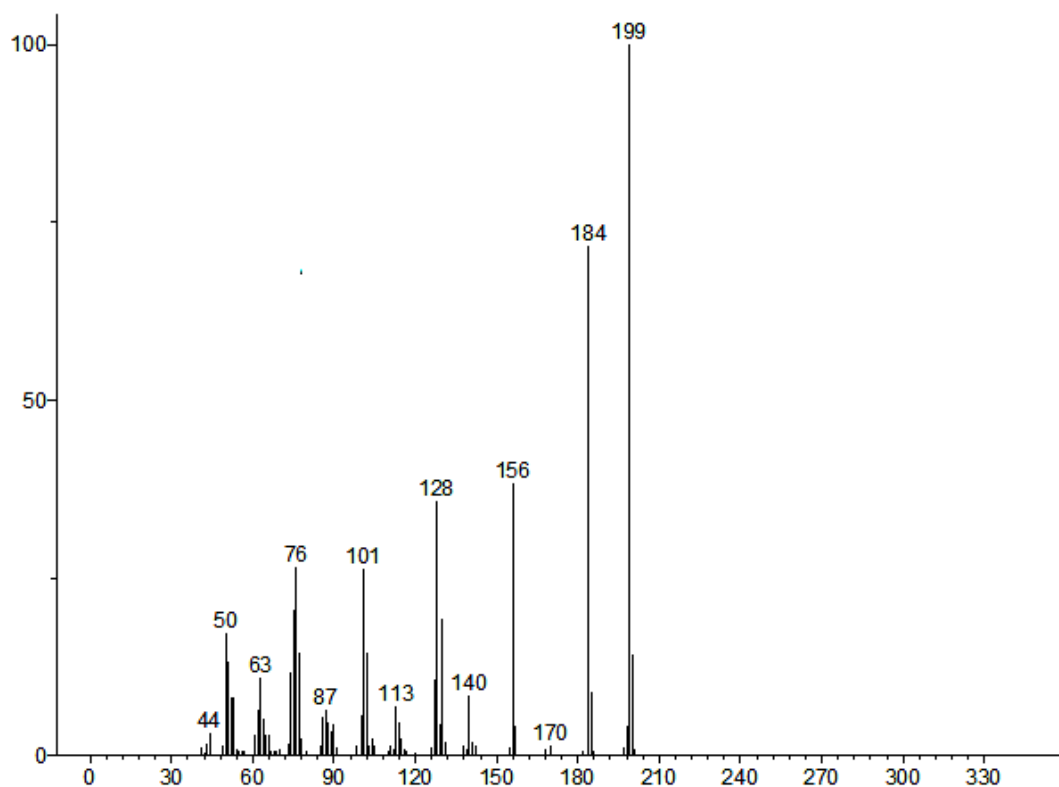


Figura 26B: Espectro de massas do composto minoritário (1B) purificado da sub-fração 1, com íon molecular $[M]^+$ 199.

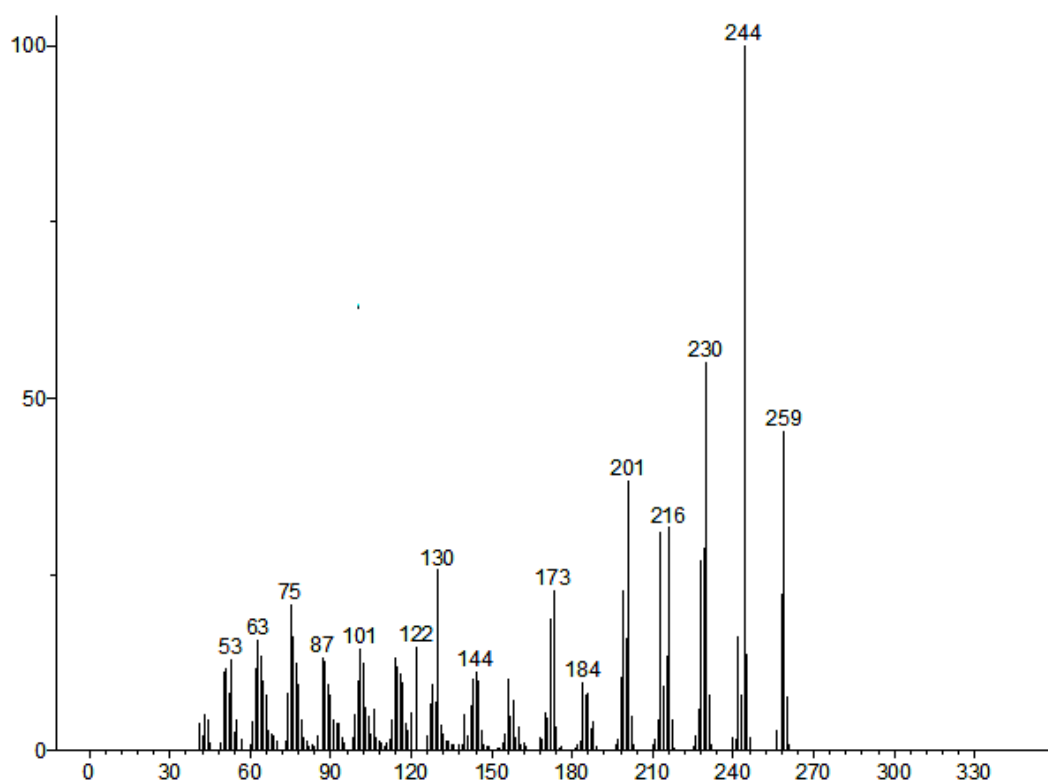


Figura 27: Espectro de massas do composto purificado da sub-fração 2, com íon molecular $[M]^+$ 259.

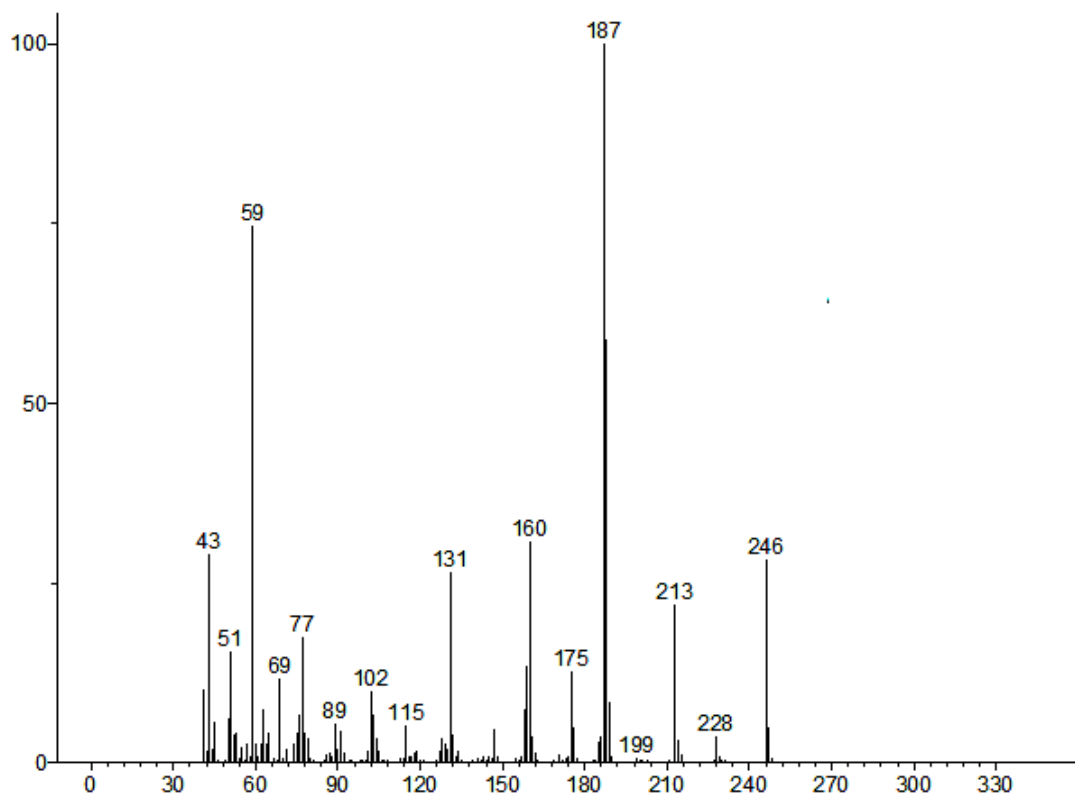


Figura 28: Espectro de massas do composto purificado da sub-fração 3, com íon molecular $[M]^+$ 246.

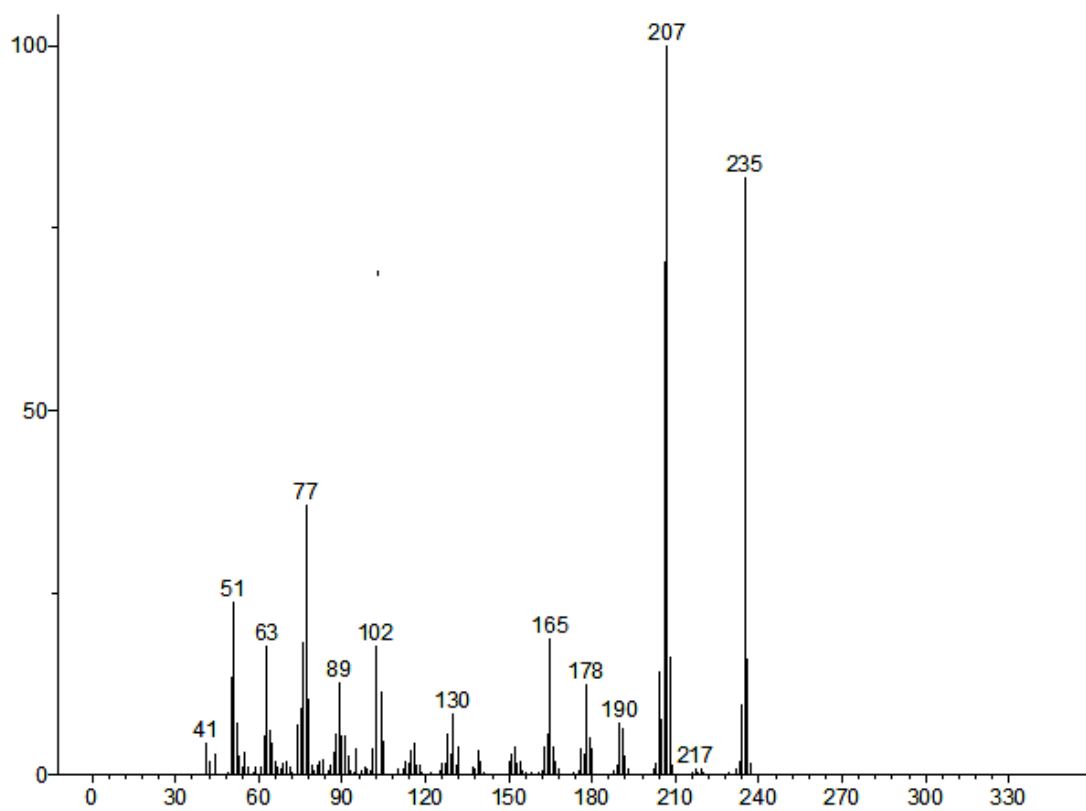


Figura 29: Espectro de massas do composto purificado da sub-fração 4, com íon molecular $[M]^+$ 235.

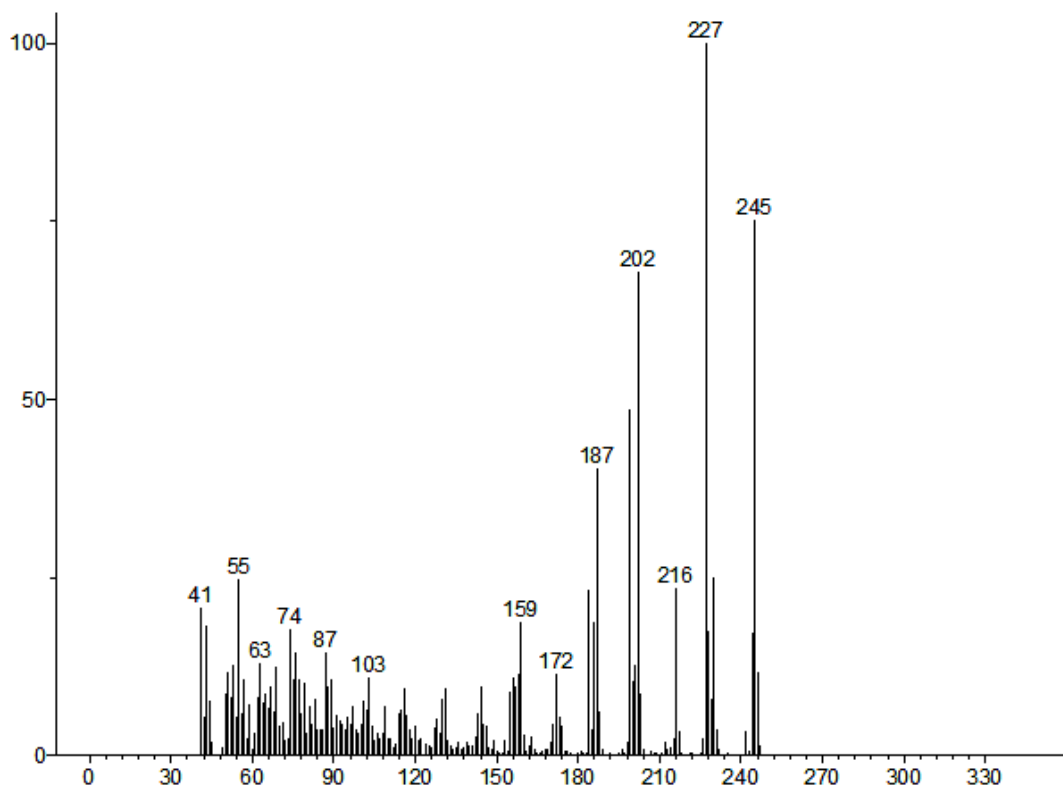


Figura 30: Espectro de massas do composto purificado da sub-fração 5, com íon molecular $[M]^+$ 245.

Se não houvesse certeza no valor do íon molecular $[M]^+$ para qualquer um dos compostos purificados, um método que poderia ser utilizado para confirmação de tais valores seria o de variação da energia do feixe ionizante de elétrons. Reduzindo a energia do feixe, a tendência do íon molecular é de se fragmentar menos. Como consequência, a tendência da intensidade do pico do íon molecular é aumentar conforme a diminuição do potencial dos elétrons (Pavia *et al.*, 2010).

4.3.4. Identificação dos compostos Purificados

Comparando os dados das análises apresentadas acima com os dados de fragmentação das bibliotecas WILEY e NIST e dados da literatura, podemos sugerir a identificação dos compostos purificados.

O composto minoritário (**1B**) presente na sub-fração 1 foi identificado como o alcalóide furoquinolínico dictaminina, apresentando semelhança com os dados de fragmentação das bibliotecas de espectros de massas WILEY (95%), NIST (96%) e com

os dados da literatura. O padrão de fragmentação do composto minoritário **1B** é [m/z (%): 199 (M^+ , 100), 184 (72), 156 (36), 130 (19), 128 (36), 101 (26), 76 (25), 75 (20), 50 (17)]. O padrão de fragmentação observado para o composto purificado pode ser comparado com o padrão observado por Clugston & MacLean (1965) para a dictaminina: M (199), $M-15$, $M-31$, $M-43$, $M-59$, $M-71$, $M-98$ e $M-123$ (**Figura 31**). Paulini *et al.* (1989) utilizaram a espectrometria de massas para identificar este alcalóide [m/z (%): 199 (M^+ , 100), 184 (48), 156 (17), 130 (4), 128 (14), 101 (4), 76 (4), 75 (4), 50 (3)]. O mesmo autor testou seu potencial mutagênico, observando forte atividade mutagênica contra *S. typhimurium*.

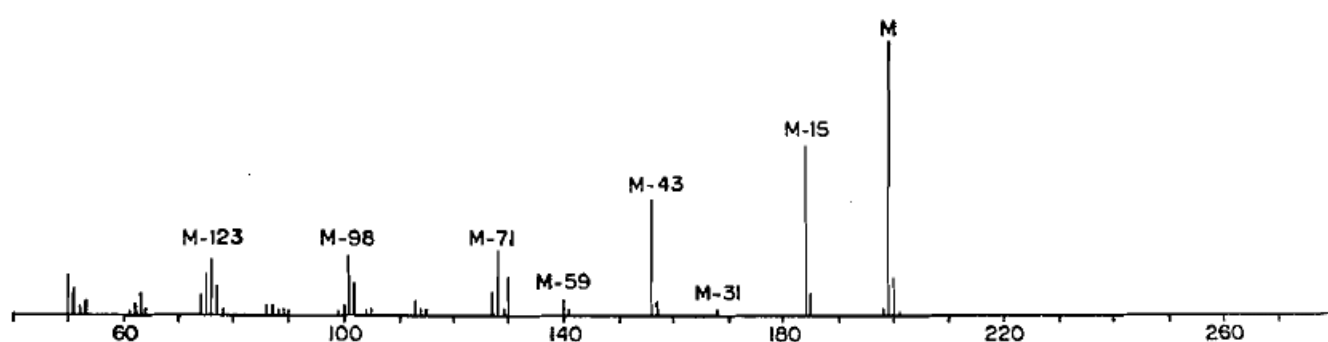


Figura 31: Padrão de fragmentação observado por Clugston & MacLean (1965) para o alcalóide dictaminina. ($M=199$).

Segundo Cortez *et al.* (2006), o espectro de absorção sob luz UV $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (log ϵ): 240 (3,93), 311 (3,22), corroborando com os dados de espectro de UV obtidos pela análise em LC-DAD. Nesse mesmo artigo a dictaminina é descrita como um sólido amarelo amorfo, ESI-MS: m/z (int. rel.): 200 [$M+H$] $^+$ e 222 [$M+Na$] $^+$. A dictaminina também tem ação inibitória sobre a agregação plaquetária (Chen *et al.*, 1995). Este alcalóide, denominado 4-metoxifuro [2,3-b] quinolínico, é comum em espécies da família Rutaceae, incluindo *Ruta graveolens* (Schimmer *et al.*, 1991), *Zanthoxylum ekmanii* (Facundo *et al.*, 2005), *Melicope pteleifolia* (Li *et al.*, 2011) e *Dictamnus albus* (Nam *et al.*, 2005). Sua fórmula estrutural está apresentada na **Figura 32**.

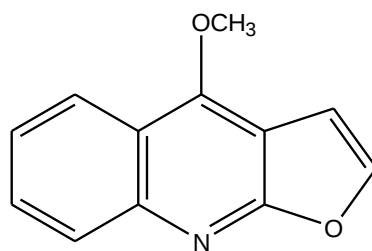


Figura 32: Estrutura do alcalóide furoquinolínico dictaminina.

O composto majoritário (**1A**) presente na sub-fração 1 não foi encontrado nas bibliotecas de espectros de massas WILEY e NIST. O padrão de fragmentação desse composto é [m/z (%): 229 (M^+ , 100), 228 (82), 214 (34), 200 (83), 199 (36), 185 (26), 184 (31), 156 (41)]. No trabalho realizado por Paulini *et al.* (1989), o alcalóide furoquinolínico γ -fagarina apresentou em seu espectro de massas o seguinte padrão de fragmentação [m/z (%): 229 (M^+ , 100), 228 (57), 214 (16), 200 (42), 199 (13), 185 (4), 184 (6), 156 (6)]. Em trabalho realizado por Grundon & McCorkindale (1957), a γ -fagarina apresentou espectro de UV $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (ϵ): 242 (60,3), 308 (6,6). A semelhança entre os dados referentes ao padrão de fragmentação, espectro de absorção UV e os dados da literatura sugerem que o composto majoritário (**1A**) purificado na sub-fração 1 seja γ -fagarina, também conhecida como 8-metoxidictaminina.

Para o alcalóide furoquinolínico γ -fagarina já foram descritas fraca atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas (Jansen *et al.*, 2006) e forte atividade mutagênica contra *Salmonella typhimurium* (Paulini *et al.*, 1987). A γ -fagarina é normalmente encontrada em espécies da família Rutaceae como *Dictamnus albus* (Nam *et al.*, 2005), *Esenbeckia pentaphylla*, *E. grandiflora* (Coy & Soares, 2007) e *Metrodorea flavida* (Baetas *et al.*, 1999). A γ -fagarina, determinada como 4-8-dimetoxifuro [2,3-b] quinolínico, tem sua estrutura química apresentada na **Figura 33**.

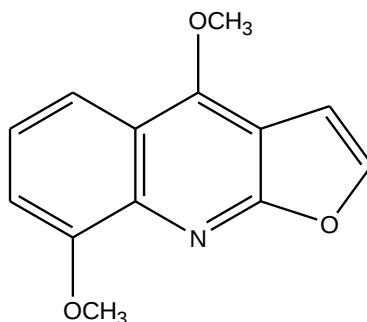


Figura 33: Estrutura do alcalóide furoquinolínico γ -fagarina.

O composto purificado na **sub-fração 2** foi identificado como o alcalóide furoquinolínico esquimianina, apresentando semelhança com os dados de fragmentação das bibliotecas de espectros de massas WILEY (93%), NIST (92%) e com os dados da literatura. O padrão de fragmentação observado foi [m/z (%): 259 (M⁺, 61), 258 (25), 244 (100), 230 (56), 229 (27), 228 (23), 216 (24), 213 (27), 201 (26), 199 (16)]. O padrão de fragmentação observado para esquimianina obtido por Paulini *et al.* (1989) [m/z (%): 259 (M⁺, 87), 258 (21), 244 (100), 230 (43), 299 (14), 228 (10), 216 (12), 213 (18), 201 (14), 199 (6)] foi utilizado por esse autor para identificação do alcalóide. Em outro trabalho, Inada *et al.* (2006) observaram o seguinte padrão inicial de fragmentação para esquimianina [m/z (%): 259 (M⁺, 85), 244 (100), 230 (44)]. Clugston & MacLean (1965) observaram que a fragmentação da esquimianina segue o seguinte padrão: M (259), M-15, M-29, M-43, M-58, M-75, M-86, M-101, M-129 (**Figura 34**). Esses dados demonstram a semelhança no padrão de fragmentação entre o composto purificado em F2-L e o alcalóide furoquinolínico esquimianina.

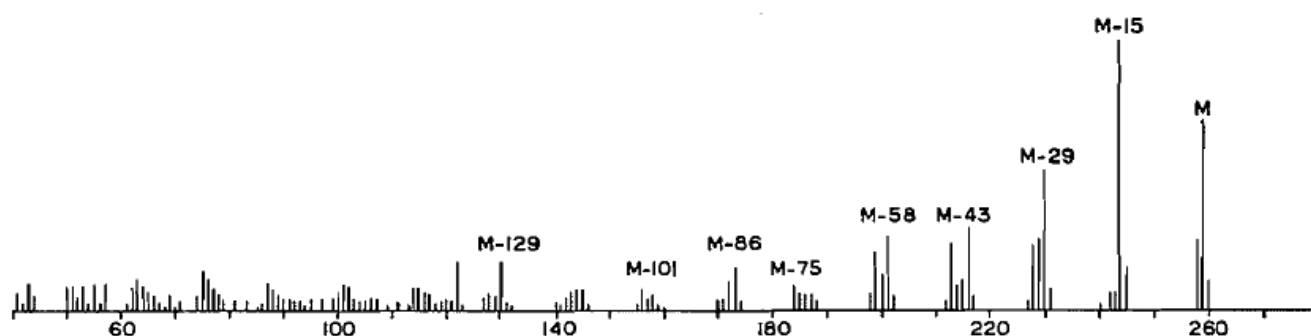


Figura 34: Padrão de fragmentação observado por Clugston & MacLean (1965) para o alcalóide esquimianina (M=259).

Cortez *et al.* (2006) descrevem o alcalóide esquimianina como um sólido amarelo amorfo, com absorção no ultravioleta $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (log ϵ): 251 (3,77), 328 (3,04) e com ESI-MS: m/z (int. rel.): 260 $[M+H]^+$ e 282 $[M+Na]^+$. Os dados obtidos nas análises em LC-DAD e GC-MS, juntamente com os dados da literatura indicam que o composto purificado em F2-L é o alcalóide esquimianina. O potencial antifúngico e inseticida da esquimianina já foram descritos na literatura (Terezan *et al.*, 2010). Este alcalóide também é comum na família Rutaceae, encontrado em espécies como *Almeidea*

coerulata (Cortez *et al.*, 2006), *Spiranthera odoratissima* (Terezan *et al.*, 2010), *Raulinoa echinata* (Biavatti *et al.*, 2002) e *Boninia glabra* (Inada *et al.*, 2008). A **Figura 35** mostra sua estrutura química.

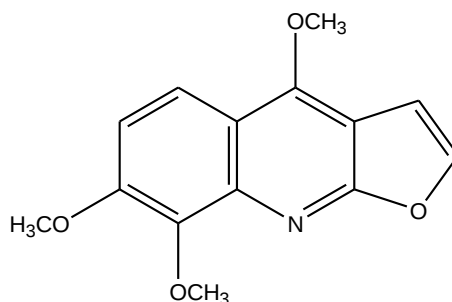


Figura 35: Estrutura do alcalóide furoquinolínico esquimianina.

O composto purificado na **sub-fração 3** foi identificado como sendo furanocumarina linear marmesina, apresentando semelhança com os dados de fragmentação das bibliotecas de espectros de massas WILEY (97%), NIST (91%) e com os dados da literatura. O padrão de fragmentação observado em F3-L é [m/z (%): 246 (M^+ , 28), 213 (21), 188 (58), 187 (100), 160 (31), 131 (26), 77 (17), 59 (74), 51 (15), 43 (28)]. No trabalho realizado por Joo *et al.* (2004), o padrão de fragmentação foi [m/z (%): 246 (M^+ , 74), 213 (34), 188 (87), 187 (100), 160 (30), 131 (15), 77 (11), 59 (60)]. Nesse mesmo trabalho foi citado que a absorção no UV é $\lambda_{\text{máx}}$ /nm: 335. Abu-Mustafa & Fayez (1961) observaram os espectros de absorção UV $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (log ϵ): 212 (3.89), 335 (4.09). Em trabalho realizado por Trumble & Millar (1996) foi observado o padrão de fragmentação para a marmesina [m/z (%): 246 (M^+ , 47), 213 (23), 188 (72), 187 (100), 160 (28), 131 (20), 77 (15), 59 (61), 51 (16), 43 (34)]. A similaridade dos dados obtidos nas análises realizadas com os dados obtidos na literatura corrobora para a identificação do composto purificado na **sub-fração 3** como sendo a furanocumarina linear marmesina.

A marmesina apresentou, em estudo realizado por Afek *et al.* (2002), um forte potencial anti-herbivoria pós colheita contra patógenos da salsa. Também já foi descrito seu o potencial contra fungos patogênicos presentes no aipo (salsão) (Afek *et al.*, 1995). Trumble & Millar (1996) relatam seu potencial contra herbivoria. Essa substância já foi descrita em espécies de Rutaceae, como por exemplo, *Hesperethusa crenulata* (Joo *et al.*, 2004). Sua estrutura está apresentada na **Figura 36**.

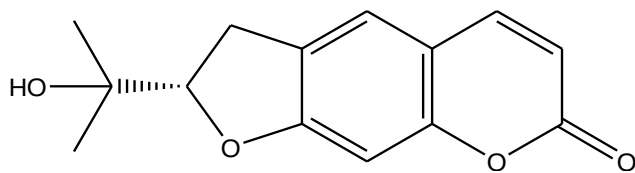


Figura 36: Estrutura da furanocumarina linear marmesina.

O composto purificado na **sub-fração 4** teve o padrão de fragmentação [m/z (%): 235 (M^+ , 76), 207 (100), 165 (19), 130 (11) 102 (18), 89 (17), 77 (37), 51 (25)]. O alcalóide quinolónico 2-fenil-1-metil-4-quinolona apresenta um padrão de fragmentação muito semelhante ao do composto purificado na **sub-fração 4**, [m/z (%): 235 (M^+ , 80), 207 (100), 165 (15), 130 (10), 102 (50), 89 (30), 77 (55), 51 (50)] (Biavatti *et al.*, 2002). A análise do espectro de massas do composto purificado em comparação com os dados da literatura, sugerem que o mesmo seja o alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona, já encontrado anteriormente na espécie *Conchocarpus heterophyllus* (Ambrozin *et al.*, 2008) e *Raulinoa echinata* (Biavatti *et al.*, 2002). Nesse alcalóide foi observada por Ambrozin *et al.* (2008) forte atividade tripanomicida sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Abaixo segue a estrutura química do alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**Figura 37**).

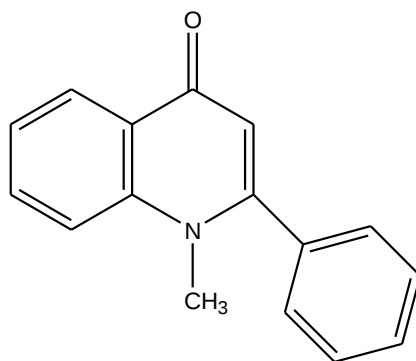


Figura 37: Estrutura do alcalóide quinolónico 2-fenil-1-metil-4-quinolona.

O composto purificado na **sub-fração 5** foi o único componente majoritário da FALC para o qual não foi possível sugerir até o momento nenhuma identificação. Porém, novos estudos deverão ser realizados para determinação desse e de outros compostos minoritários presentes no metabolismo secundário de *C. fontanesianus*.

4.4. Análise da Atividade Anticolinesterásica

Ainda não foi realizado qualquer estudo químico com a espécie *Conchocarpus fontanesianus*. A avaliação da atividade anticolinesterásica foi objeto de estudo, pois em análise preliminar foi observado potencial inibidor no extrato bruto dos ramos caulinares ($49\% \pm 0,2\%$ [200 $\mu\text{g/mL}$]). Nas análises qualitativas (CCDA), a formação de halos brancos indica que a reação da acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila foi inibida, não havendo assim a formação do α -naftol, que reagiria com o sal FAST BLUE B para formar o complexo diazo de coloração roxa, indicando assim a inibição da atividade enzimática (Marston *et al.*, 2002). Nas análises quantitativas a formação de coloração branca nos poços da microplaca indica que não houve a hidrólise da acetiltiocolina pela acetilcolinesterase, não ocorreu a formação de tiocolina livre que reagiria com DTNB para formar 5-tio-2-nitrobenzoato (de coloração amarela) e 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina. Isso indica a inibição da atividade enzimática no ensaio quantitativo (Rhee *et al.* 2001, Trevisan *et al.* 2003).

4.4.1. Avaliação da Atividade Anticolinesterásica no EE, FALC e Fr.HEX

A cromatografia em camada delgada analítica do EE, FALC e Fr.HEX reveladas para atividade anticolinesterásica utilizando o método de Marston *et al.* (2002), mostrou que todos apresentam atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, como o controle fisostigmina (**Figura 38**). A atividade no ensaio biológico qualitativo é considerada fraca (+), moderada (++) ou forte (+++). A FALC e a Fr.HEX se mostraram mais ativas, quando comparadas ao EE, com fraca atividade nos R_f 's 0,82; 0,68 e 0,36. A atividade anticolinesterásica da FALC foi observada nos R_f 's 0,76 (++); 0,63 (++); 0,38 (+) e 0,31 (+++) A Fr.HEX apresentou atividade nos R_f 's 0,82 (++); 0,71 (+) e 0,62 (++)

O controle positivo fisostigmina apresentou uma mancha branca principal no R_f 0,75. O mesmo teste para verificação da atividade anticolinesterásica foi realizado com o resíduo alcalino, obtido ao final do processo de partição em sistema ácido/base, porém o mesmo se mostrou inativo.



Figura 38: Cromatoplaça do extrato etanólico de ramos caulinares de *C fontanesianus*, fração de alcalóides totais, fração hexânica e padrão fisostigmina. 1.Extrato etanólico bruto (200 µg), 2.Fração de alcalóides totais (100 µg), 3.Fração hexânica (100 µg) e 4.Fisostigmina (0,05 µg). Sistema de solvente CHCl₃:MeOH:NH₄OH, 90:7,5:2,5 v/v.

A atividade anticolinesterásica do extrato etanólico, da FALC e Fr.HEX também foi quantificada em microplaca, utilizando o método de Ellman (Ellman *et al.* 1961) modificado por Rhee *et al.* (2001).

A atividade da acetilcolinesterase total, usando leitor de Elisa Biotek – KC4, foi 2,71 Abs (valor considerado para o branco 100%). O extrato etanólico (EE) dos ramos caulinares (0,78-200 µg/mL) de *C. fontanesianus* reduziu a atividade da AChE de 0,16 ± 0,08% a 51,23 ± 0,5%. A fração de alcalóides totais (FALC) (0,78-200 µg/mL) reduziu a atividade da AChE de 3,30 ± 0,2% a 71,08 ± 0,6% e a fração hexânica (Fr.HEX) (0,78-200 µg/mL) reduziu a atividade de 0,45 ± 0,2% a 54,94 ± 0,2% (**Figura 39**).

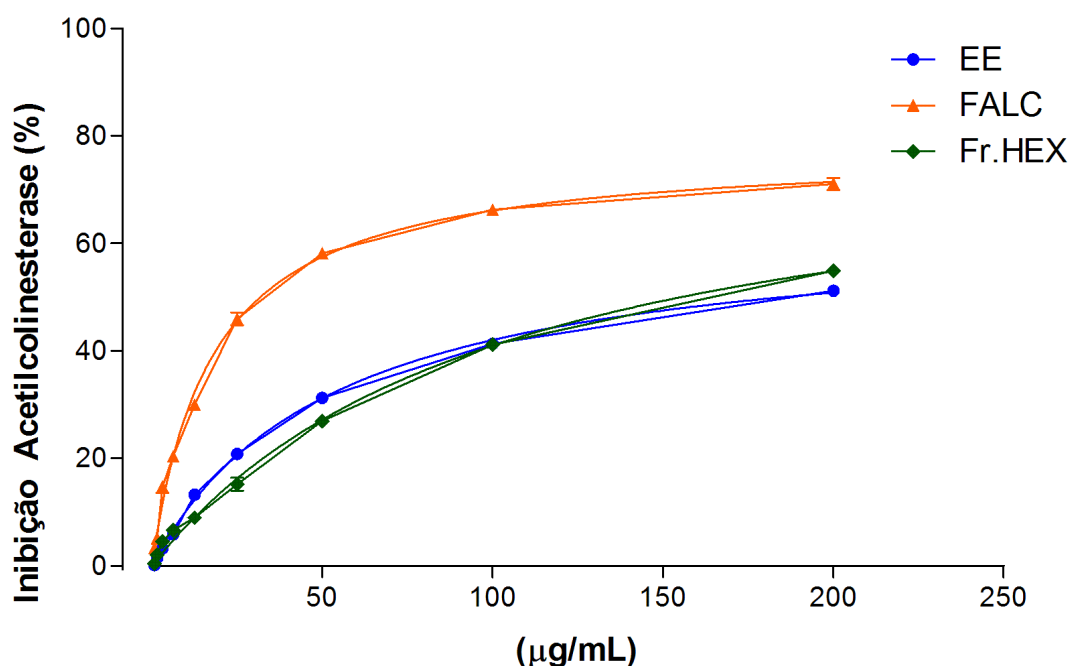


Figura 39: Avaliação quantitativa da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase do extrato etanólico bruto (EE), fração de alcalóides totais (FALC) e fração hexânica (Fr.HEX) (0,78-200 µg/mL). Os valores foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (em % de inibição da AChE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica.

Em alcalóides oriundos de fontes naturais, por exemplo, a fisostigmina e galantamina, já foram observados o potencial inibidor da acetilcolinesterase. Em trabalho anterior realizado por Cardoso-Lopes *et al.* (2010), foram isolados da fração de alcalóides totais dos ramos caulinares de *Esebeckia leiocarpa* alcalóides com forte atividade anticolinesterásica. Com base nos resultados obtidos acima e na literatura existente, a fração de alcalóides totais de *C. fontanesianus* foi selecionada para purificação dos compostos ativos.

4.4.2. Avaliação da Atividade Anticolinesterásica sobre os Compostos Purificados da Fração de Alcalóides

A avaliação qualitativa em CCDA da atividade anticolinesterásica dos compostos purificados nas sub-frações 1 (dictaminina e γ -fagarna), 2 (esquimianina), 3 (marmesina), 4 (2-fenil-1-metil-4-quinolona) e 5 (não identificado) utilizando o método de Marston *et al.* (2002) pode ser observada na **Figura 40**. A mistura na sub-fração 1

apresentou um halo de inibição no $R_f=0,88$. A sub-fração 2 se mostrou ativa, apresentando halo de inibição no $R_f=0,83$. A sub-fração 3 apresentou halo de inibição bem nítido no $R_f=0,71$. A sub-fração 4 apresentou atividade no $R_f=0,76$. A sub-fração 5 foi a que se mostrou menos ativa neste ensaio, apresentando halo de inibição no $R_f=0,48$. As setas na figura abaixo indicam os compostos purificados.

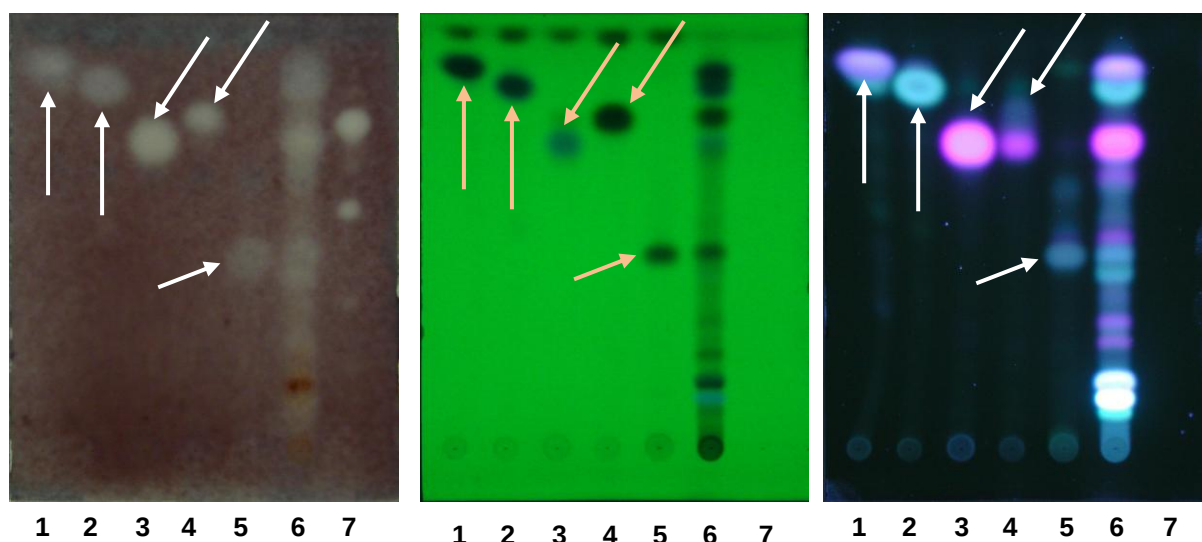


Figura 40: Cromatoplaça das substâncias isoladas da FALC dos ramos caulinares de *C fontanesianus*, juntamente com a FALC e o padrão fisostigmina, observadas da esquerda para direita em luz visível, em (λ) de 254 e 366 nm, respectivamente. 1.Sub-fração 1 (100 μ g), 2.Sub-fração 2 (100 μ g), 3.Sub-fração 3 (100 μ g), 4.Sub-fração 4 (100 μ g) 5.Sub-fração 5 (100 μ g). 6.Fração Alcaloídica (200 μ g) e 7.Fisostigmina (0,05 μ g). Sistema de solvente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (90:7,5:2,5 v/v). Atividade forte (+++), moderada (++) e fraca (+).

Os compostos purificados que apresentaram forte atividade inibidora da acetilcolinesterase no ensaio quantitativo foram a marmesina (+++) e 2-fenil-1-metil-4-quinolona (+++), sugerindo um potencial maior que as demais pela intensidade com que formou o halo de inibição. As sub-frações 1 (++) e 2 (++) mostraram moderado potencial inibidor no ensaio qualitativo, porém com halo de inibição mais intenso do que a sub-fração 5 (+), que apresentou fraco potencial inibitório em CCDA.

A atividade anticolinesterásica dos compostos purificados também foi quantificada.

Os compostos purificados demonstraram um potencial inibidor fraco na avaliação quantitativa em microplaca, comparado com o padrão fisostigmina, como pode ser observado na **Figura 41**. A mistura de alcalóides dictaminina e γ -fagarina (sub-fração 1) (0,78-200 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a atividade da AChE de $1,116 \pm 0,14\%$ a $52,00 \pm 0,2\%$. A esquimianina (sub-fração 2) (0,78-200 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a atividade da AChE de $0,98 \pm 0,26\%$ a $67,21 \pm 0,29\%$. A cumarina marmesina (sub-fração 3) (0,78-200 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a atividade da AChE de $0,61 \pm 0,13\%$ a $52,87 \pm 0,25\%$. A alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (sub-fração 4) (0,78-200 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a atividade da AChE de $0,34 \pm 0,09$ a $48,60 \pm 0,23\%$. O composto purificado na sub-fração 5 (não identificada) (0,78-200 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a atividade da AChE de $0,44 \pm 0,22\%$ a $58,03 \pm 0,66\%$.

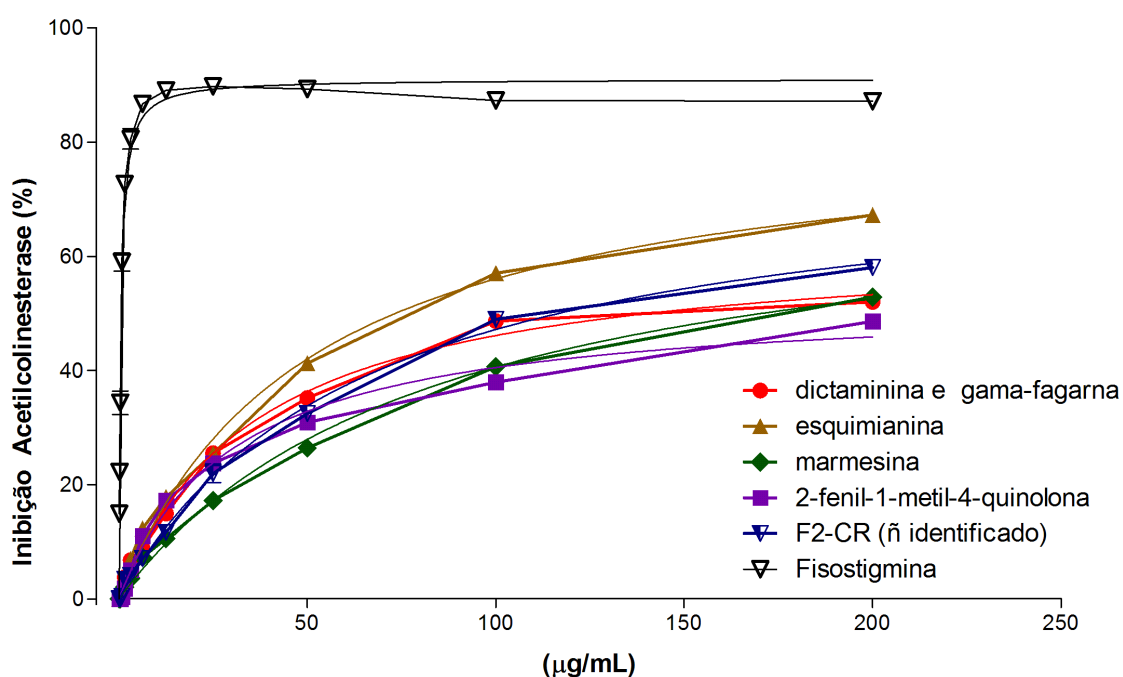


Figura 41: Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica dos compostos purificados (0,78-200 $\mu\text{g/mL}$), comparados com o padrão fisostigmina. Os valores foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (em % de inibição da AChE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica.

Dos cinco compostos testados, o que se mostrou mais ativo no ensaio quantitativo foi a esquimianina (sub-fração 2) ($IC_{50}=78,68 \mu\text{g/mL}$). Porém esse resultado foi muito inferior se comparada aos compostos utilizados como controle positivo e na clínica médica, fisostigmina ($IC_{50}= 0,51 \mu\text{g/mL}$ ou $IC_{50}=0,4\mu\text{M}$) e galantamina ($IC_{50}= 1,7\mu\text{M}$), respectivamente.

Em trabalho realizado por Cardoso-Lopes *et al.* (2010), foi avaliada a atividade anticolinesterásica dos compostos purificados da fração de alcalóides totais dos ramos caulinares de *Esenbeckia leiocarpa* (Rutaceae), sendo o mais ativo a leptomerina ($IC_{50}= 2,5\mu\text{M}$), com potencial inibitório próximo aos compostos de referência fisostigmina ($IC_{50}=0,4\mu\text{M}$) e galantamina ($IC_{50}= 1,7\mu\text{M}$). A esquimianina também foi purificada da fração de alcalóides totais de *E. leiocarpa* e apresentou potencial inibitório mais fraco ($IC_{50}=1,4\text{mM}$) se comparado aos compostos de referência. O potencial inibitório promissor do alcalóide quinolônico leptomerina (**Figura 42**) pode ser justificado pela diferença estrutural com os alcalóides furoquinolínicos. Além disso, a natureza do substituinte na posição dois da leptomerina parece ter influência na interação com o sítio ativo da enzima, uma vez que o alcalóide purificado na sub-fração 4 é do mesmo tipo que a leptomerina (4-quinolônico), porém com um substituinte fenil no lugar do n-propil.

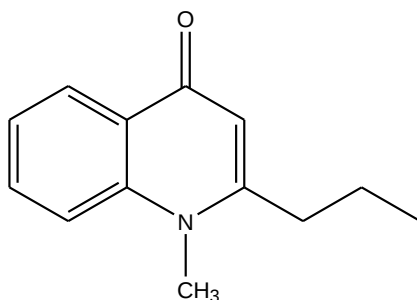


Figura 42: Estrutura do alcalóide quinolônico leptomerina.

Seria interessante futuramente realizar estudos com outros substituintes, tendo como núcleo central o 4-quinolônico, para verificar como se comportariam tais compostos frente à inibição da acetilcolinesterase.

Como já mencionado anteriormente, a procura por inibidores de AChE é de grande interesse, pelo fato de algumas das substâncias já utilizadas como medicamento

para o tratamento de Alzheimer, como por exemplo a tacrina (Cognex[®]), apresentarem limitações como baixa biodisponibilidade e hepatotoxicidade alta (Almeida, 1998) e o fato de medicamentos provenientes de fontes naturais utilizados atualmente (galantamina e huperzina A) apresentarem efeitos colaterais mais brandos em doses terapêuticas.

5. Conclusão

Foram purificados dos ramos caulinares três alcalóides furoquinolínicos (majoritários), um alcalóide do tipo 4-quinolónico e uma furanocumarina, constituintes comuns em espécies de Rutaceae. Este é o primeiro trabalho químico realizado com essa espécie e vem contribuir para ampliar o conhecimento da composição química do gênero *Conchocarpus* e reafirmar a importância quimiotaxonomica desses compostos em Rutaceae, além de auxiliar na compreensão das relações de afinidade aos níveis inter e infra-genérico.

Os alcalóides purificados apresentaram inibição em concentrações mais altas, se comparados aos compostos utilizados como padrão. Mais estudos farmacológicos são necessários para verificar a toxicidade desses compostos, assim como a dose letal e se os mesmos são inibidores reversíveis de ação média, reversíveis de ação curta ou irreversíveis.

Os estudos com diferentes substituintes tendo como modelo o núcleo central 4-quinolónico podem levar a descoberta de compostos com forte potencial anticolinesterásico.

A continuidade do estudo químico dos ramos caulinares e folhas, direcionado para avaliação de outras atividades biológicas, podem ampliar o conhecimento sobre o potencial dos metabólitos secundários presentes em *C. fontanesianus*.

As técnicas cromatográficas, mesmo as mais antigas, continuam de grande valia para isolamento e purificação de compostos oriundos do metabolismo das plantas.

A espectrometria de massas revelou-se, mais uma vez, como uma ferramenta extremamente importante e valiosa para a pesquisa de produtos naturais.

6. Resumo

Conchocarpus fontanesianus (Rutaceae), conhecida popularmente como pitaguará, é uma espécie endêmica de Floresta Ombrófila Densa de Encosta, em áreas de Mata Atlântica, mais precisamente em regiões de restinga do estado de São Paulo e Rio de Janeiro. Na literatura, não foram encontrados registros sobre o estudo químico dessa espécie, porém em espécies do mesmo gênero já foram encontrados diversos metabólitos como alcalóides (furoquinolínicos, acridônicos) e cumarinas (furanocumarinas). O entendimento dos mecanismos de doenças, acompanhado do aumento de ensaios com enzimas disponíveis permitiram o desenvolvimento de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios. A Doença de Alzheimer (DA), uma desordem neurodegenerativa de grande impacto sócio-econômico, é responsável por 50-60% do número total de casos de demência em pessoas de 65 anos. Além disso, dados epidemiológicos indicam uma potencialidade considerável de aumento na incidência da doença nas próximas duas décadas. Atualmente, o tratamento clínico mais eficiente utilizado tem foco na “Hipótese Colinérgica da Doença de Alzheimer”, e vem mostrando que alcalóides, inibidores da acetilcolinesterase, são candidatos potenciais para utilização no tratamento da doença. Estudos anteriores com o extrato bruto dos ramos caulinares de *C. fontanesianus* indicaram potencial inibição da acetilcolinesterase em testes *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico de *C. fontanesianus* direcionado para a obtenção dos compostos responsáveis pela atividade anticolinesterásica e avaliação da atividade dos compostos isolados em testes *in vitro*. Os ramos caulinares secos e sem folhas de *C. fontanesianus* (2,02 kg) foram moídos e extraídos com etanol, sob pressão e temperatura (ASE). O extrato etanólico (51,02 g) foi dissolvido em solução ácida (HCl 0,1 mol/L) e submetido a processo de extração STAS-OTTO (ácido-base) para obtenção da fração de alcalóides totais (300 mg). A fração de alcalóides totais foi submetida a análises em HPLC, LC-DAD, LC-MS e ESI-MS. A purificação dos compostos majoritários ativos foi realizada por meio de cromatografia de camada delgada preparativa. A identificação das estruturas químicas dos compostos purificados foi feita por análises em GC-MS e HPLC, e comparação dos dados adquiridos com os da literatura. Da fração de alcalóides totais foram isolados quatro alcalóides, sendo três furoquinolínicos (dictaminina, γ -fagarina e esquimianina) e um quinolônico (2-metil-1-fenil-4-quinolona). Foi isolado também um constituinte minoritário, a furanocumarina linear marmesina. Todos os compostos apresentaram

atividade anticolinesterásica moderada nos ensaios *in vitro*. Dentre os compostos isolados, o alcalóide esquimianina foi o que apresentou maior atividade ($IC_{50}=78,68 \mu\text{g/mL}$).

Palavras chave: *Conchocarpus fontanesianus*, Rutaceae, Mata Atlântica, atividade anticolinesterásica, alcalóides, ESI-MS, GC-MS.

7. Abstract

Conchocarpus fontanesianus (Rutaceae), commonly known as pitaguará, is an endemic native species found in the Atlantic Rain Forest, in areas of slopes and more specifically in those of sandbanks in the states of Sao Paulo and Rio de Janeiro. Specifically, no chemical studies were found for this species, but for the genus several metabolites have been described such as alkaloids (furoquinolines, acridones) and coumarins (furanocoumarins). The necessity to understand the disease mechanisms, accompanied by the increase in the availability of enzyme tests has enabled the development of rapid and efficient bioassays. Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder of great socioeconomic impact, accounts for 50-60% of the total number of cases of dementia in people over 65 years. Moreover, epidemiological data indicate a potential increase in disease incidence in the next two decades. Currently the most effective medical treatment used is focused on "Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease," and has shown that alkaloids, acetylcholinesterase inhibitors, are potential candidates for use in treating disease. Previous studies with the crude extract of stem branches of *C. fontanesianus* demonstrated potential inhibition of acetylcholinesterase *in vitro* tests. This study aimed to characterize and isolated the chemical compounds of *C. fontanesianus* responsible for the *in vitro* anticholinesterase activity. The branches without leaves of *C. fontanesianus* (2.02 kg) were ground and the ethanol extract was obtained by extraction under pressure and temperature (ASE). The ethanol extract (51.02 g) was dissolved in acid solution (HCl 0.1 mol/L) and partitioned by the STAS-OTTO process (acid-base) to obtain a fraction of total alkaloids (300 mg). The total alkaloid fraction was subjected to analysis by HPLC, HPLC-DAD, HPLC-MS and ESI-MS. The purification of the major compounds was conducted by preparative TLC. The identification of the chemical structures of the purified compounds was performed by GC-MS and HPLC analysis, and the data acquired was compared with those from the literature. From the crude alkaloids fraction of were isolated four alkaloids, three furoquinolines (dictaminine, γ -fagarine and skimmianine) and a quinolone (2-methyl-1-phenyl-4-quinolone). It was also isolated a minor constituent, a linear furanocoumarins, marmesin. All the compounds showed moderate anticholinesterase activity *in vitro* assays. Among the purified compounds, the alkaloid skimmianine showed the highest activity ($IC_{50}=79,68 \mu\text{g/mL}$).

Key words: *C. fontanesianus*, Rutaceae and Atlantic Rainforest, Anticholinesterase activity, alkaloids, ESI-MS, GC-MS.

6. Referências

- Abu-Mustafa, E.A. & Fayez, M.B.E.** 1961. Natural coumarins. I. Marmesin, further products from the fruits of *Ammi majus* L. Natural Products 481: 161-166.
- Afek, U., Aharoni, N., Carmeli, S.** 1995. The Involvement of Marmesin in Celery Resistance to Pathogens During Storage and the Effects of Temperature on Its Concentration. The American Phytopathology Society 85: 1033-1036.
- Afek, U., Orenstein, J., Carmeli, S., Aharoni, N.** 2002. Marmesin, a new phytoalexin associated with resistance of parsley to pathogens after harvesting. Postharvest Biology and Technology 24: 89-92.
- Agripino, D.G., Lima, M.E.L., Silva, M.R., Meda, C.I., Bolzani, V.S., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Moreno, P.R.H.** 2004. Screening of Brazilian Plants for Antimicrobial and DNA-Damaging Activities. I. Atlantic Rain Forest – Ecological Station Juréia-Itatins. Biota Neotropica 4: 1-15.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. & Bouwmeester, H.J.** 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. Phytochemistry Reviews 5: 49-58.
- Albarici, T.R., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F.** 2010. Cumarinas e Alcalóides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). Química Nova 33: 2130-2134.
- Almeida, O.P.** 1998. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. Arquivos de Neuropsiquiatria 56: 688-696.
- Ambrozin, A.R.P., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Fernandes, M.F.G.** 2008. Piroflavonas inéditas e atividades tripanomicidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. Química Nova 31: 740-743.
- Anand, R., Gharabawi, G., Enz A.** 1996. Efficacy and safety results of the early phase studies with Exelon™ (ENA-713) in Alzheimer's disease: an overview. Journal of Drugs Development & Clinical Practice 8: 1-8.
- Baetas, A.C.S., Arruda, M.S.P., Müller, A.H., Arruda, A.C.** 1999. Coumarins and Alkaloids from the Stems of *Metrodorea flavia*. Journal of the Brazilian Chemical Society 10: 181-183.

- Barbosa-Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S, Quintans-Junior, L.J.** 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16: 258-285.
- Barroso, G.M.; Guimarães, E.F.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Peixoto, A.L. & Lima, H.C.** 1986. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. v.2. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Bartus, R.T.** 1979. Physostigmine and Recent Memory: Effects in Young and Aged Nonhuman Primates. *Science* 206: 1087-1089.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer B., Lippa, A.S.** 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-417.
- Biavatti, M.W., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B., Victor, S.R., Pagnocca, F.C., Albuquerque, S., Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J.** 2002. Biological Activity of Quinoline Alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray Structure of Flindersiamine. *Journal of The Brazilian Chemical Society* 13: 66-70.
- Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Furlan, M., Cavaleiro, A.J., Araújo, A.R., Silva, D.H., Lopes, M.N.** 1999. Search for Antifungal and Anticancer Compounds from Native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciência* 71: 181-189.
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M.W., Fay, M.F., Reveal J.L., Soltis D.E., Soltis P.S., Stevens P.F.** 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of The Linnean Society*.
- Bullock, R. & Dengiz, A.** 2005. Cognitive performance in patients with Alzheimer's disease receiving cholinesterase inhibitors for up to 5 years. *International Journal of Clinical Practice* 59: 817-822.
- Cardoso-Lopes, E.M, Maier, J.A., Silva, M.R., Regasini, O., Simote, S.Y., Lopes, N.P., Pirani, J.R., Bolzani, V.S., Young, M.C.M.** 2010. Alkaloids from Stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as Potential Treatment for Alzheimer Disease. *Molecules* 15: 9205-9213.

- Castro, P.R.C., Kluge, R.A., Peres, L.E.P.** 2005. Manual de Fisiologia Vegetal (Teórica e Prática). 1ª ed. Ceres, São Paulo.
- Chase, M.W., Morton, C.M., Kallunki, J.A.** 1999. Phylogenetic Relationships of Rutaceae: A Cladistic Analysis of The Subfamilies Using Evidence From RBCL and ATPB Sequence Variation. American Journal of Natural Products 86: 1191-1199.
- Chen, I. S., Lin, Y. C., Tsai, I. L., Teng, C. M., Ko, F. N., Ishikawa, T., Ishii, H.** 1995. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. Phytochemistry 39: 1091– 1097.
- Clugston, D.M. & MacLean, D.B.** 1965. Mass Spectra of Some Furoquinoline Alkaloids. Canadian Journal of Chemistry 43: 2516-2521.
- Cortez, L.E.R., Cortez, D.A.G., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Ferreira, A.G., Silva, M.F.G.F.** 2009. New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. Heterocycles 78: 1-7.
- Cortez, L.E.R., Cortez, D.A.G., Ferreira, A.G., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B.** 2006. Constituintes químicos de *Almeida coerulata* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia 16: 164-169.
- Coy, C.A. & Suarez, L.E.C.** 2007. Metabólitos secundários Aislados de Los Géneros *Raputia* y *Esenbeckia* (Rutaceae). Scientia et Technica 33: 337-338.
- Cragg, G.M., Schepartz, S.A., Suffness, M. & Grever, M.R.** 1993. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. Journal of Natural Products 56: 1657-1668.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (eds.). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318.
- Cummings, J.L.** 2000. Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. The American Journal of Psychiatry 157: 4-15.

- Davies, P.** 1978. Studies on the neurochemistry of central cholinergic systems in Alzheimer's disease, in Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders. In: R. Katzmana, R.D. Terry, K.L. Bick (eds.). Raven Press, New York, pp. 453-459.
- DeFerrari, G.V., Canales, M.A., Shin, I., Weiner, L.M., Silman, I. & Inestrosa, N.C.** 2001. A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid β -Peptide Fibril Formation. *Biochemistry* 40 (35): 10447-10457.
- DeLucia, R. & Oliveira-Filho, R.M.** 2004. *Farmacologia Integrada*. 2º ed. Revinter, São Paulo.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr. & Featherstone, R.M.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
- Facundo, V.A., Silveira, A.S.P., Braz-Filho, R., Pinto, A.C., Reende, C.M.** 2005. Constituintes Químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain. *Química Nova* 28: 224-225.
- Falkenberg, M.B., Santos, R.I., Simões, C.M.O.** 1999. Introdução à análise fitoquímica. In: C.M.O. Simões, E.P. Sckenkel, G. Grosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, pp. 163-179.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K.** 1999. The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer Disease: A Review of Progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 66: 137-147.
- Giacobini E.** 2003. Cholinergic inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmaceutical Research* 50: 433-440.
- Groppo, M., Pirani, J.R., Salatino, M.L.F., Blanco, S.R., Kallunki, J.A.** 2008. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany* 95: 985-1005.
- Grundon, M.F. & McCorkindale, N.J.** 1957. The Synthesis of Dictamnine and γ -Fagarine. *Synthesis* 417: 2177-2185.

- Guedes, M.L.S., Batista, M.A., Ramalho, M., Freitas, H.M.B., Silva, E.M.** 2005. Breve incursão sobre a biodiversidade da Mata Atlântica. *In*: C.R. Franke, P.L.B. Rocha, W. Klein, S.L. Gomes (orgs.). *Mata Atlântica e Biodiversidade*. Edufba, Salvador, pp. 37-92.
- Guela, C. & Mesulam, M.M.** 1994. Cholinergic systems and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease*. *In*: R.D. Terry, R. Katzman, K.L. Bick (eds.). Raven Press, New York, pp. 263–291.
- Harborne, J.B.** 1988. *Introduction to Ecological Biochemistry*. 3^a ed. Academic, London, p. 356.
- Hashimoto, T. & Yamada, Y.** 1994. Alkaloid Biogenesis: Molecular Aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 257-285.
- Henriques, A.T., Limberger, R.P., Kerber, V.A., Moreno, P.R.H.** 2007. Alcalóide: Generalidades e Aspectos Básicos. *In*: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosman, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFRGS, Porto Alegre, pp. 765-791.
- Hess, D.** 1975. *Plant Physiology*. 1^a ed. Springer-Verlag, New York, p. 331.
- Huie, C.W.** 2002. A review of modern simple-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plantas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 23-30.
- Inada, A., Ogasawara, R., Koga, I., Nakatani, N., Inatomi, Y., Murata, H., Nishi, M., Nakanishi, T.** 2008. Three New Foroquinoline Alkaloids from the Leaves of *Boninia glabra*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 56: 727-729.
- Johnson, N., Davis, T., Bosanquet, N.** 2000. The epidemic of Alzheimer's disease; how can we manage the costs? *Pharmacoeconomics* 18: 215-223.
- Joo, S.H., Lee, S.C., Kim, S.K.** 2004. UV Absorbent, Marmesin, from the Bark of Thanakha, *Hesperethusa crenulata* L. *Journal of Plant Biology* 47: 163-165.
- Kallunki, J. & Pirani, J.R.** 1998. Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae). *Kew Bulletin* 53: 257-334.

- Kaufmann, B. & Christen, P.** 2002. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis* 13: 105-113.
- Kutchan, T.** 1995. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell* 7: 1059-1070.
- Leite, M.P., Fassin, J., Bazilonni, E.M.F., Almeida, R.N., Mattei, R., Leite, J.R.** 2008. Behavioral Effects of Essential Oil of *Citrus aurantium* L. Inhalation in Rats. *Braslian Journal of Farmacognosy* 18 (Supl.): 661-666.
- Li, S.G., Tian, H.Y., Ye, W.C., Jiang, R.W.** 2011. Benzopyrans and furoquinoline alkaloids from *Melicope pteleifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 64-67.
- Mafezoli, J., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Albuquerque, S.** 2000. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 335-340.
- Maltby, N., Anthony Broe, G., Creasey, H., Jorm, A.F., Christensen, H., Brooks, W.S.** 1994. Efficacy of tacrine and lecithin in mild to moderate Alzheimer's disease: double blind trial. *British Medical Journal* 308: 879-883.
- Mamede, M.C.H., Cordeiro, I., Rossi, L., Melo, M.M.R.F., Oliveira, R.J.** 2004. Mata Atlântica. In: O.A.V. Marques, W. Duleba (eds.). *Estação Ecológica Jureia-Itatins. Ambiente Físico, Flora e Fauna. Holos, Ribeirão Preto*, pp. 115-132.
- Mann, J.** 1987. *Secondary Metabolism*. 2^a ed. Clarendon, Oxford, p. 374.
- Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K.** 2002. A Rapid TLC Bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.
- Mori, S.M., Boom, B.M., Prance, G.T.** 1981. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia* 33: 233-245.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Fonseca, G.A.B., Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

- Nam, K., Je, K.H., Shin, Y.J., Kang, S.S., Mar, W.** 2005. Inhibitory effects of furoquinoline alkaloids from *Melicope confuse* and *Dictamus albus* against Human Phosphodiesterase 5 (hPDE5A) *in vitro*. Archives of Pharmacal Research 28: 675-679.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M.** 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. Journal of Natural Products 66: 1022-1037.
- Ong, E., Woo, S., Yong, Y.** 2002. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medical plants. Journal of Chromatography A 313: 57-64.
- Paulini, H., Waibel, R., Schimmer, O.** 1989. Mutagenicity and structura-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae. Mutation Research 227: 179-186.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R.** 2010. Introdução à Espectroscopia (Tradução da 4ª edição norte-americana). Cengage Learning, São Paulo, pp. 399-499.
- Pirani, J.R.** 2002. Conchocarpus J.C. Mikan. In: M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, A.M. Giulietti, T.S. Melhem, V. Bittrich, C. Kameyama (eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Hucitec, São Paulo, pp. 284-285.
- Pirani, J.R.** 2010. *Conchocarpus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000438>).
- Pirani, J.R. & Groppo M.** 2010. Rutaceae in Catalogo de Plantas e Fungos do Brasil. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 1591-1593.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C.X., Govoni S.** 2003. Acetylcholinesterase inhibitor: novel activities of old molecules. Pharmacological Research 50: 441-451.
- Rhee, I.K., Meent, M., Ingkaninan, K. & Verpoorte, R.** 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using sílica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. Journal of Chromatography 915: 217-223.

- Ribeiro, C.V.C & Kaplan, M.A.C.** 2002. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em ANGIOSPERMAE. *Química Nova* 25: 533-538.
- Ribeiro, T.A.N., Ndiaye, E.A.S., Veloso, E.S., Vieira, P.C., Ellena, J., Júnior, P.T.S.** 2005. Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16: 1347-1352.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L.** 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry* 68: 1033-1039.
- Robbers, J.E., Tyler, V.E., Speedie, M.K.** 1996. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. 1^a ed. Willian & Wilkim, Nova York.
- Rogers, S.L. & Friedhoff, L.T.** 1996. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Dementia* 7: 293-303.
- Santos, R.I.** 2007. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosman, J.C.P Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFRGS, Porto Alegre, pp. 403-434.
- Schimmer, O., Kiefer, J., Paulini, H.** 1991. Inhibitory effects of furocoumarins in *Salmonella typhimurium* TA98 on the mutagenicity of dictamnine and rutacridone, promutagens from *Ruta graveolens* L. *Mutagenesis* 6: 501-506.
- Scott, L.J. & Goa, K.L.** 2000. Galantamine: A Review of its Use in Alzheimer's Disease. *Drugs* 60: 1095-1122.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2008. *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II*. 2^a ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, pp. 485-490.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2006. *Fisiologia Vegetal*. 3^a ed. Artmed, Porto Alegre, p. 719.
- Taveria, F.S.N., Andrade, E.H.A., Lima, W.N., Maia, J.G.S.** 2003. Seasonal Variation in the Essential Oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 27-31.

- Terezan, A.P., Rossi, R.A., Almeida, R.N.A., Freitas, T.G., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Pirani, J.R.** 2010. Activities of Extracts and Compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in Leaf-cutting Ants and their Symbiotic Fungus. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21: 882-886.
- Trevisan, M.T.S., Macedo, F.V.V., Van de Meent, M., Rhee, In K., Verpoorte, R.** 2003. Seleção de Plantas com Atividade Anticolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. *Química Nova* 26: 301-304.
- Trumble, J.T. & Millar, J.G.** 1996. Biological Activity of Marmesin and Demethylsuberosin Against a Generalist Herbivore, *Spodoptera exigua* (Lepdoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2859-2864.
- Unicamp.** 1992. Consórcio Mata Atlântica. Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Plano de Ação. Vol. 1, São Paulo, p. 101.
- Viegas, C., Bolzani, V.S., Furlan, M., Fraga, C.A.B. & Bareiro, E.J.** 2004. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova* 27: 655-660.
- Vieira, P.C., Kubo, I., Kujime, H., Yamagiwa, Y. & Kamikawa, T.** 1992. Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures, and synthesis. *Journal of Natural Products* 55: 1112-1117.
- Veloso, E.S.** 1995. Fitoquímica comparada dos gêneros *Conchocarpus*, *Almeidea* e *Rauia* (Rutaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Xavier, A.F., Bolzani, B.M., Jordão, S.** 2008. Unidades de Conservação da Natureza em São Paulo. In: R.R. Rodrigues, V.L.R. Bononi (orgs.). Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 24-42.
- Warpman, U., Alafuzo, V.I. & Nordberg, A.** 1993. Coupling of muscarinic receptors to GTP proteins in postmortem human brain: alterations in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 150: 39-43.

Waterman, P.G. & Grundon, M.F. 1975. Alkaloids of the Rutaceae: Their Distribution and Systematic Significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 3: 149-180.